

# Biokonwersja materiałów ligninocelulozowych

Zdzisław Targoński

Katedra Technologii Przemysłu  
Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa  
Akademia Rolnicza  
Lublin

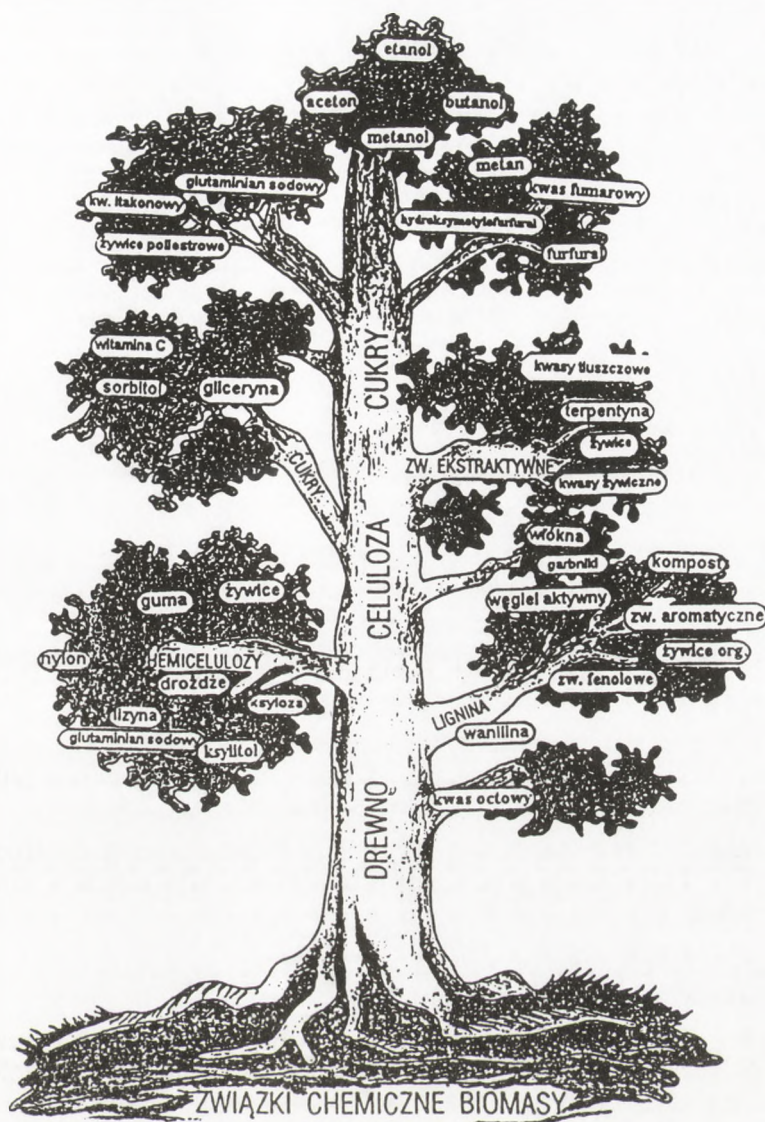
## 1. Wstęp

Perspektywy zwiększonego wykorzystania biomasy na cele energetyczne i produkcję chemikalii w nadchodzących latach są obiecujące. Wiązą się one z kilkoma przyczynami. Z około stu najważniejszych dla przemysłu chemicznego związków, które stanowią 99% ogólnej produkcji chemikalii, 74% jest produkowane z pięciu podstawowych związków, tj. etylenu, propylenu, benzenu, toluenu i ksylenu, które mogą być wytwarzane z biomasy roślinnej (1). Przykłady związków chemicznych, które można otrzymać z biomasy przedstawiono na rys. 1.

W szacunkowych danych dotyczących rocznej produkcji biomasy na kuli ziemskiej podaje się liczbę 100 - 200 miliardów ton, zaś energia zawarta w biomasie jest około 10-krotnie większa niż roczne jej zużycie (1). Dlatego też biomasa może stać się podstawową formą energii dla ludzkości, jednak z uwagi na niskie ceny paliw kopalnych komercyjnie wykorzystanie biomasy jest niewielkie i wynosi obecnie około 14%.

Można przyjąć co najmniej 2 prognozy wykorzystania energii pierwotnej do roku 2100 (2). Według pierwszej, rola ropy i gazu będzie malała, natomiast będzie wzrastało znaczenie węgla kamiennego i niewęglowych źródeł energii. W drugiej, znaczenie ropy i gazu będzie również malało, natomiast poziom wykorzystania węgla będzie w przybliżeniu stały, zaś wzrastać będzie rola biomasy i energii pochodzenia niewęglowego. Drugie przewidywanie jest o tyle korzystniejsze, że jego realizacja pozwoli na:

- 1) ograniczenie efektu cieplarnianego związanego z emisją CO<sub>2</sub>,
- 2) przeznaczenie biomasy na cele nieżywnościowe, co umożliwi użytkowanie ziemi odłogowej i skażonej chemicznie,
- 3) wykorzystanie obszarów nieprzydatnych na cele rolnicze z racji gleb ubogich i erodowanych,
- 4) zredukowanie konsumpcji energii przez gospodarstwa rolne,
- 5) przerób biomasy, co stworzy nowe miejsca pracy, w szczególności na obszarach jej produkcji,



Rys. 1. Związki chemiczne produkowane z biomasy.

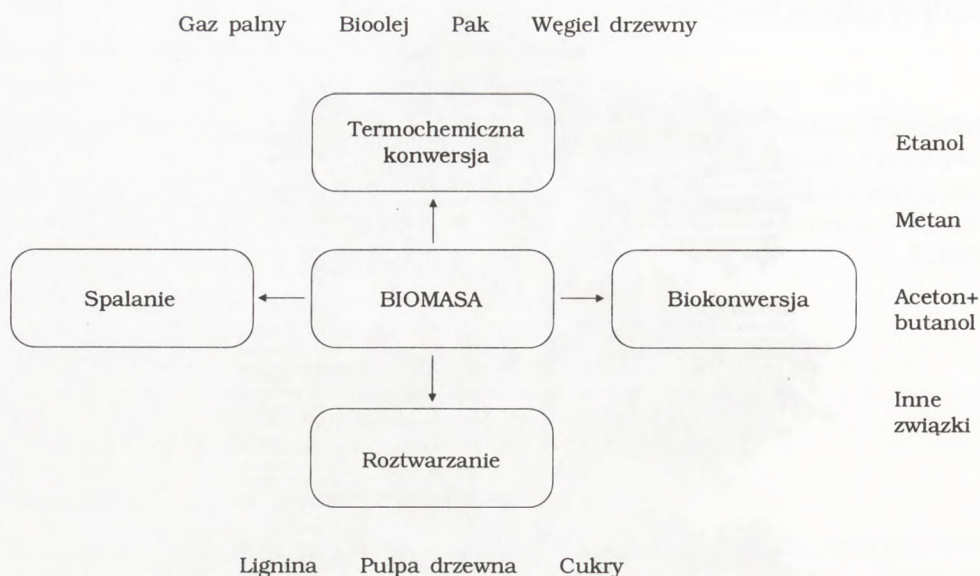
6) poprawienie warunków klimatycznych oraz obniżenie emisji  $\text{SO}_2$ ,

7) ograniczenie importu paliw, co ma szczególne znaczenie dla krajów ubogich,

8) zagospodarowanie produktów ubocznych i odpadów (słomy zbóż, roślin oleistych, trociny, makulatury).

Jedną z bardziej atrakcyjnych metod wykorzystania biomasy jest konwersja na paliwa płynne (rys. 2).





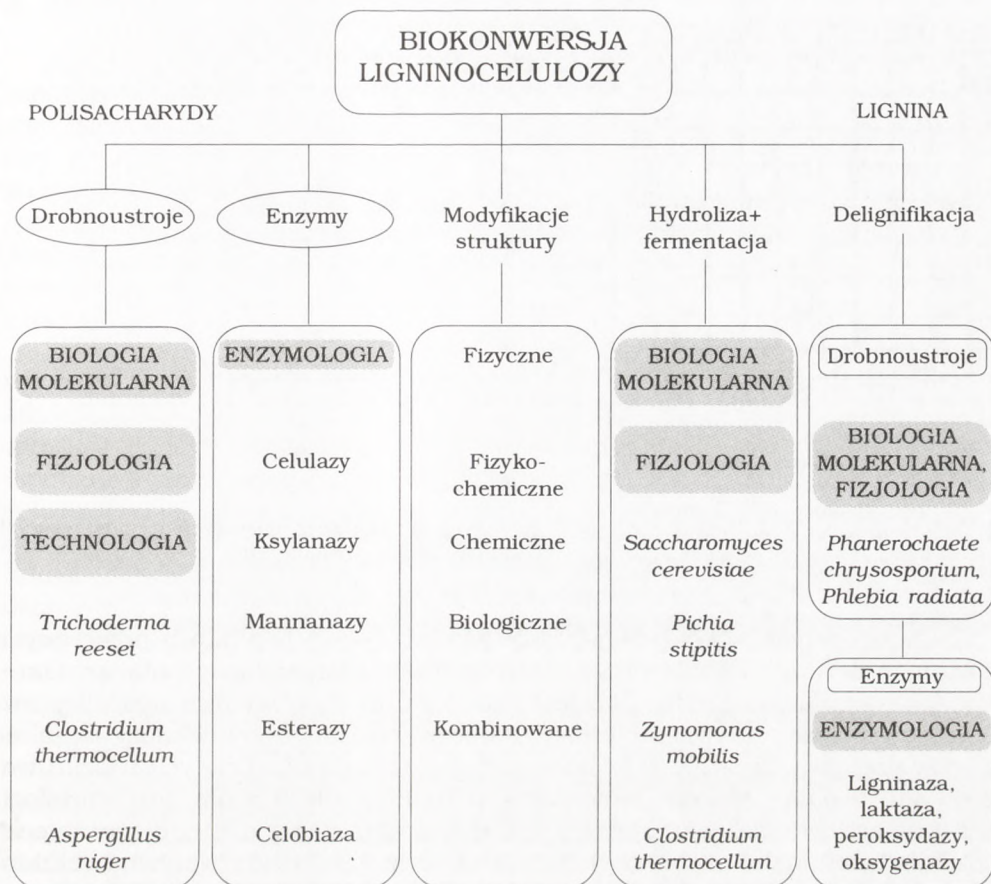
Rys. 2. Metody przetwarzania biomasy.

Znane są trzy główne procesy prowadzące do otrzymywania paliw gazowych i ciekłych na drodze fermentacji. Są to:

- beztlenowa fermentacja wytwarzająca biogaz zawierający średnio 60% metanu, który może być użyty do wytwarzania ciepła i energii elektrycznej,
- produkcja bioetanolu,
- produkcja acetonu i butanolu.

Jednym z perspektywicznych surowców, które będzie można wykorzystać do produkcji wymienionych związków są materiały ligninocelulozowe. Kompleks ligninocelulozowy stanowi podstawowy składnik strukturalny biomasy roślinnej i tworzą go: celuloza, hemicelulozy i lignina. Ligninoceluloza jest najbardziej rozpowszechnionym materiałem organicznym występującym na kuli ziemskiej. Duża liczba organizmów bierze udział w wydajnym obiegu tego kompleksu, a jest to proces bardzo skomplikowany z ekologicznego i enzymatycznego punktu widzenia.

Pomimo wieloletnich badań proces biokonwersji ligninocelulozy na paliwa płynne jest nadal zbyt kosztowny, by znalazł ekonomiczne uzasadnienie dla wprowadzenia go do skali przemysłowej. Jednak stały postęp w badaniach, w szczególności nad enzymatyczną hydrolizą celulozy i fermentacją pentoz, przybliżył moment wdrożenia tej technologii. Problemy biodegradacji ligninocelulozy są wielorakie (rys. 3) i wynikają m. in. z budowy samego kompleksu, oporności



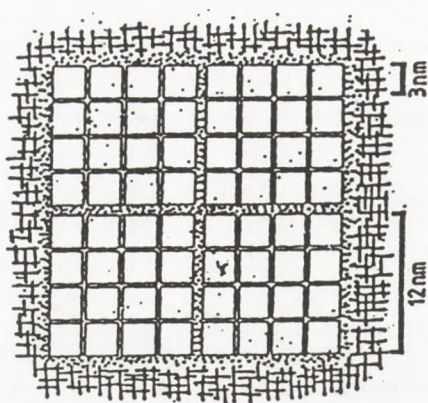
Rys. 3. Obszary badań w biokonwersji ligninocelulozy.

na hydrolizę, wieloskładnikowości, niskiej wydajności hydrolizy, produkcji enzymów celulozowych, trudności w wydajnej fermentacji pentoz, itp.

## 2. Budowa i składniki biomasy ligninocelulozowej

Ściana komórkowa roślin składa się z blaszki środkowej (ML), która skleja poszczególne komórki, ściany pierwotnej (P), ściany wtórnej (S1) i ściany wtórnej (S2), różniących się odmiennym ułożeniem włókien oraz ściany trzeciorzędowej (T). Rozkład celulozy, hemiceluloz i ligniny w komórce przedstawiono na rys. 4. Na uwagę zasługuje to, że lignina wykazująca największą oporność na działanie drobnoustrojów otacza mikrofibryle celulozy, co utrudnia lub uniemożliwia dostęp enzymów do celulozy i części hemiceluloz (3).





- fibryle celulozy  
 ▨ hemicelulozy, ▩ lignina

Rys. 4. Model rozmieszczenia podstawowych składników w drewnie (33).

Celuloza jest polisacharydem zbudowanym z reszt D-glukozy połączonych wiązaniem  $\beta$ -1,4-glukozydowym w nierozgałęziony łańcuchowy polimer. Okresowo powtarzającą się jednostką jest celobioza, która w wyniku hydrolizy rozpada się na dwie cząsteczki glukozy. Poszczególne łańcuchy celulozy łączą się ze sobą przeciwrównoległe w większe agregaty za pomocą licznych wiązań wodorowych, tworząc włókna elementarne o średnicy ok. 3,5 nm. (4). Morfologiczna budowa włókna celulozowego jest zhierarchizowana następująco: micela, włókna elementarne, mikrofibryle i makrofibryle (tab. 1) (5). Natiwna celuloza ma strukturę krystaliczną z obszarami amorficznymi bardziej podatnymi na enzymatyczną hydrolizę. Fibryle elementarne w materiałach ligninocelulozowych są otoczone przez hemicelulozy, a mikrofibryle ligniną (rys. 4). W celu przeprowadzenia enzymatycznej hydrolizy celulozy, niezbędne jest nie tylko usunięcie ligniny i przynajmniej części hemiceluloz, ale także zwiększenie powierzchni właściwej celulozy, tak by jej łańcuchy były dostępne dla celulaz.

TABELA 1  
 CHARAKTERYSTYKA ELEMENTÓW BUDOWY WŁÓKNI CELULOZOWYCH (5)

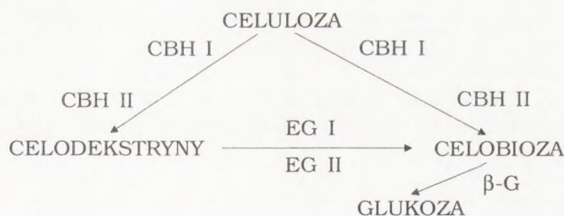
Rodzaj elementu	Szerokość (nm)	Grubość (nm)	Długość (nm)	Liczba łańcuchów w przekroju poprzecznym
micela	500 - 600	300	5000 - 10 000	50
fibryla element.	600 - 1000	300 - 500	nieogr.	100
mikrofibryla	2500	2500	nieogr.	2000
makrofibryla	40 000	40 000	nieogr.	500 000
włókno ramii	125 $\mu$ m	6 $\mu$ m	60 - 250 mm	2 000 000 000

### 3. Enzymatyczna hydroliza celulozy

Enzymatyczna hydroliza celulozy jest procesem złożonym i zachodzi przy udziale kompleksu enzymów. Enzymy celulolityczne tradycyjnie dzieli się na trzy klasy: endoglukanazy (E.C.3.2.1.41), egzoglukanazy lub cellobiohydrolazy (E.C.3.2.1.91) i  $\beta$ -glukozydazy (E.C.3.2.1.21) (6). Bakterie produkują te enzymy w małych ilościach (mniej niż 0,1 g/l) lub w przypadku *Clostridium thermocellum* celulazy tworzą zwarte wieloenzymowe kompleksy (celulozomy), których rozbitcie powoduje utratę aktywności poszczególnych składników (7). Grzybowe celulazy są produkowane w dużych ilościach (więcej niż 40 g/l) i nie tworzą ze sobą kompleksów, a ich działanie jest synergiczne (8,9).

Badania enzymatycznej hydrolizy nierozpuszczalnego substratu jakim jest celuloza nastęrczają wiele kłopotów. Podczas hydrolizy ubywa regionów amorficznych, a wzrasta procentowa ilość regionów krystalicznych, ponadto udział co najmniej 5 enzymów w procesie hydrolizy utrudnia wyjaśnienie mechanizmu degradacji celulozy. Jeden z ostatnich modeli procesu hydrolizy celulozy opisali Enari i Niku-Paavola (6). Zgodnie z tym modelem celobiohydrolazy I i II syntetyzowane przez *T. reesei* hydrolizują nierozpuszczalną celulozę do rozpuszczalnych celodekstryn i celobiozy. Endo- $\beta$ -glukanazy I i II działają na celodekstryny i hydrolizują je do celobiozy, a ta następnie jest rozszczepiana na dwie jednostki glukozowe przez  $\beta$ -glukozydazę (rys. 5).

Szybkość degradacji celulozy zależy nie tylko od dawki celulaz, oraz doboru optymalnych warunków hydrolizy, ale w decydującym stopniu od struktury celulozy. Natywna celuloza, np. pochodząca z bawełny, podobnie jak ligninocelulozy, charakteryzuje się małą powierzchnią właściwą, wysokim stopniem krystaliczności i polimeryzacji celulozy, co praktycznie uniemożliwia efektywną enzymatyczną hydrolizę (10). Wymiary cząsteczek celulaz wahają się w granicach 4,5 nm średnicy i 18 nm długości, podczas gdy przeciętne średnice kapilar natywnej celulozy i ligninocelulozy, które są materiałami porowatymi, są wielokrotnie mniejsze i wynoszą średnio około 1 nm (11,12). Dlatego stopień zhydrolizowania natywnej celulozy jest zaledwie kilku procentowy. Aby zapewnić efektywną hydrolizę celulozy wymiary jej kapilar muszą być znacznie większe, niż wymiary celulaz, gdyż im więcej enzymów zostanie zaadsorbowanych przez jednostkę wagową celulozy, tym szybciej przebiegnie jej hydroliza (13).



Rys. 5. Model enzymatycznej hydrolizy celulozy: CBH I i II — cellobiohydrolaza I i II, EG I i II — endoglukanaza I i II, G;  $\beta$ -glukozydaza (6).



Wykazano, że wzrost ilości por o średnicy w przedziale od 4 do 5 nm i powyżej w sposób widoczny zwiększał wydajność enzymatycznej hydrolizy celulozy (14). Dlatego też, wstępne przygotowanie celulozy, a w szczególności ligninocelulozy do enzymatycznej hydrolizy jest zabiegiem koniecznym. Proces ten ma na celu nie tylko zwiększenie wielkości por i przez to powierzchni właściwej substratu, ale także rozbitcie kompleksu ligninocelulozowego, usunięcie części ligniny, zmniejszenie krystaliczności i stopnia polimeryzacji celulozy.

#### 4. Wstępne przygotowanie ligninocelulozy

Metody przygotowania ligninocelulozy do enzymatycznej hydrolizy można podzielić na 5 grup:

- 1) fizyczne (mielenie kulowe, wibracyjne, ścinające),
- 2) fizykochemiczne (parowo-eksplozyjna, radiacyjna, rozpuszczanie i wytrącanie celulozy),
- 3) chemiczne (delignifikacja, częściowa hydroliza kwasowa),
- 4) biologiczne (delignifikacja przez drobnoustroje),
- 5) złożone z wymienionych.

Metody fizyczne są na ogół energochłonne, a ich skuteczność w dużej mierze zależy od pochodzenia materiału ligninocelulozowego. Z kolei metody biologiczne wykorzystujące do delignifikacji ligninocelulozy grzyby białej zgnilizny drewna, np. z rodzaju *Phanerochaeta*, *Phlebia* i in., są mało efektywne ze względu na wielotygodniowy czas trwania delignifikacji i trudności techniczne w prowadzeniu procesu (15,16).

Jedną z najefektywniejszych metod wstępnej obróbki jest parowanie materiałów ligninocelulozowych w przedziale temperatur od 170 do 220°C, niekiedy z niewielkim dodatkiem SO<sub>2</sub> lub kwasów mineralnych, a następnie gwałtowne rozprężenie mieszaniny (17). Podczas tych procesów zachodzi daleko posunięta hydroliza hemiceluloz i częściowa degradacja ligniny, a celuloza staje się stosunkowo łatwo podatna na enzymatyczną hydrolizę i przy stosunkowo niewysokiej dawce celulaz można osiągać wydajność scukrzenia dochodzącą do 100% (tab. 2) (18).

TABELA 2  
ENZYMATYCZNE SCUKRZENIE CELULOZY ZAWARTEJ W SŁOMIE PSZENNEJ  
IMPREGNOWANEJ 1,5% ROZTWOREM KWASU AZOTOWEGO I PAROWANEJ W TEMP. 185°C  
W RÓŻNYCH CZASACH (18)

Czas trwania obróbki wstępnej (min)	Czas trwania enzymatycznej hydrolizy (godz.) i procent scukrzenia (%)			
	0 (godz.)	1 (godz.)	24 (godz.)	48 (godz.)
6	6,1 (%)	25,2 (%)	72,8 (%)	92,6 (%)
12	24,4 (%)	37,6 (%)	89,6 (%)	100,0 (%)
18	21,5 (%)	44,8 (%)	84,3 (%)	96,8 (%)



## 5. Produkcja celulaz

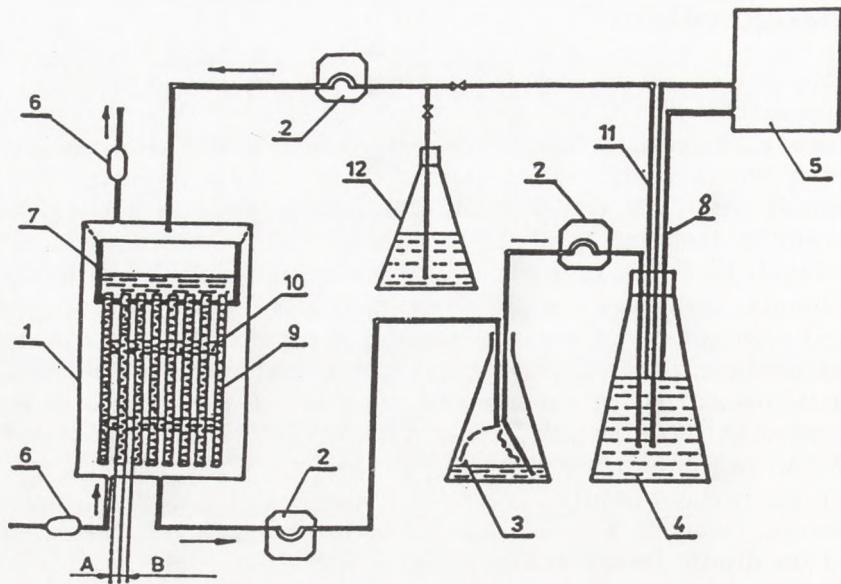
W obliczeniach ekonomicznych wykazuje się, że koszt otrzymania preparatów enzymatycznych w szczególności celulaz stanowi około 50% ceny otrzymywanego z materiałów ligninocelulozowych etanolu, podczas gdy koszt transportu biomasy stanowi co najwyżej kilkanaście procent (19). Szczep *Trichoderma reesei* QM 6a i jego mutanty produkują najefektywniejsze preparaty celulaz dostępne w skali przemysłowej (20). Jest to wynik wielu lat intensywnych badań w licznych ośrodkach naukowych, a ich owocem jest wyodrębnienie mutantów nadproducentów celulaz, zdolnych do wydzielania do 40 g/l zewnątrzkomórkowych enzymów w prostej pożywce z laktozą jako jedynym źródłem węgla (21). W celu sprostania wymogom ekonomicznym dąży się do osiągnięcia produktywności celulaz około 200 jednostek FPU/lxh, oraz aktywności filtratów pohodowlanych co najmniej 20 jednostek FPU/ml (22). W tym przypadku wiele uwagi poświęca się badaniom nad produkcją celulaz przez różne mutanty *T. reesei* w hodowlach: okresowych, okresowych z zasilaniem, ciągłych, stosując system hodowli wgłębnych; a także w złożu stałym i na drodze immobilizacji (20).

Zalety hodowli grzybów z zastosowaniem metody wgłębnej i w złożu stałym można łączyć w hodowlach na inertnych nośnikach stałych, np. na piankach poliuretanowych, impregnowanych ciekłą pożywką. Jedną z propozycji bioreaktora do tego typu hodowli przedstawiono na rys. 6 (23). W wyniku ciągłej hodowli szczepu *Trichoderma reesei* D-78085 w tym bioreaktorze uzyskano 2-krotnie większą wydajność celulaz z jednostki wagowej laktozy w porównaniu do hodowli wgłębnych wymagających energochłonnego mieszania i natleniania (23).

Nadal podstawową sprawą pozostaje wyjaśnienie mechanizmu indukcji celulaz przez nierozpuszczalny w wodzie substrat jakim jest celuloza, a także dwucukry, takie jak: laktoza, celobioza, safaroza, podczas gdy nawet w obecności głodowych ilości glukozy tylko niektóre mutanty wydzielają do podłoża hodowlanego niewielkie ilości celulaz (24). W wielu ośrodkach prowadzi się intensywne badania nad otrzymywaniem na drodze inżynierii genetycznej rekombinantów produkujących kompleksy celulaz o żądanym składzie. W tym celu zwiększa się liczbę kopii wybranych genów, kodujących poszczególne składniki celulaz, bądź eliminuje się wybrany gen by uzyskać kompleks celulaz o pożądanym składzie.

*Trichoderma reesei* QM 9414 ma po 1 kopii genów *cbh1* i *cbh2*, kodujących syntezę cellobiohydrolazy I (CBH I) i II (CBH II). W celu zwiększenia syntezy CBH II, enzymu wykazującego najwyższą specyficzną aktywność w kompleksie celulazowym, wprowadzono wiele kopii genu *cbh2*, wykorzystując pyr G aukсотroficzny mutant *T. reesei* QM 9414. Wyosobnione transformanty wykazały od 2. do 4-krotnie wyższą produkcję CBH II. Natomiast surowe preparaty celulaz charakteryzowały się 1,5 raza wyższą specyficzną aktywnością wobec celulozy, niż preparaty otrzymane z hodowli szczepu wyjściowego (25). Jest to zatem kolejny sposób zwiększenia produkcji kompleksu enzymów celulolitycznych przez *Trichoderma reesei*. Inną metodą modyfikacji





Rys. 6. Schemat bioreaktora wraz z urządzeniami towarzyszącymi do ciągłej produkcji celuloz przez immobilizowaną na piankach poliuretanowych grzybnie *Trichoderma reesei*; 1 - bioreaktor, 2 - pompy, 3 - zbiornik filtracyjny, 4 - zbiornik do kontroli pH 5 - pHmetr, 6 - filtr powietrza, 7 - perforowany zbiornik, 8 - elektroda pH, 9 - płyty z pianki poliuretanowej, 10 - płytki dystansowe, 11 - przewód doprowadzający pożywkę, 12 - zbiornik zasilający świeżą pożywką (23).

składu celuloz jest usunięcie wybranych genów kodujących poszczególne celulozazy, co ma znaczenie praktyczne w pozyskiwaniu preparatów ksylanolitycznych, pozbawionych celuloz, a stosowanych przy bieleniu celulozy w przemyśle celulozowo-papierniczym (26). Należy podkreślić, że rekombinanty *T. reesei* są w centrum zainteresowania już nie tylko jako producenci celuloz, ale także innych białek z racji wysokich możliwości sekrecyjnych gospodarza.

## 6. Bezpośrednie otrzymywanie etanolu z celulozy

Z uwagi na wysokie koszty produkcji celuloz prowadzi się obszerne badania, w których celem jest opracowanie technologii bezpośredniej fermentacji celulozy, np. do etanolu, wykorzystując jeden organizm wykazujący zarówno zdolności do syntezy celuloz, jak i fermentacji powstałych cukrów. Wykazano możliwości produkcji etanolu stosując szczepy *Clostridium thermocellum*, które w temperaturze 55 - 60°C z 1 mola celulozy wytwarzały około 1 mola etanolu (27,28). Znane są szczepy grzybów, np. *Fusarium oxysporum* syntetyzujące pełny kompleks enzymów celulozolitycznych zdolne do etanolowej fermentacji heksoz i pentoz, jednak te procesy są mało wydajne (29,30).

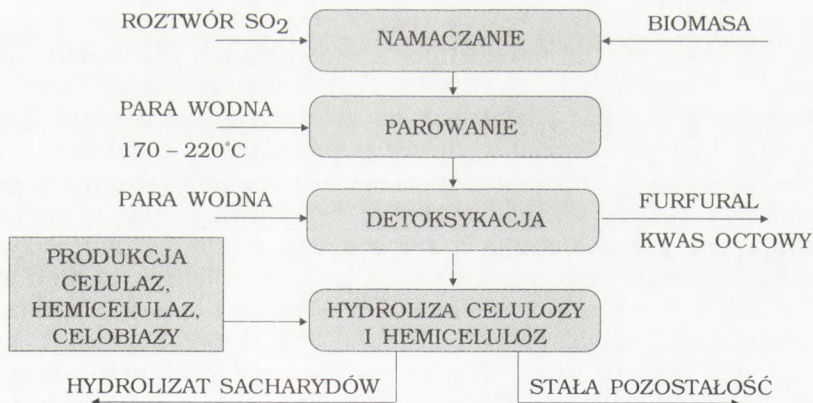
Większość szczepów drobnoustrojów mających potencjalne zastosowanie w biokonwersji ligninocelulozy do etanolu nie jest zdolna do prowadzenia tego



procesu samodzielnie, jednoetapowo z racji, np. niewytwarzania celulaz. Dla tego też skonstruowano szereg szczepów bakteryjnych jak i drożdżowych poprzez fuzję protoplastów i na drodze rekombinacji genetycznych zdolnych do etanolowej fermentacji celobiozy i amorficznej celulozy. Przykładem może być szczep *Klebsiella oxytoca* zawierający zrekombinowane chromosomalnie geny fermentacji etanolowej *Zymomonas mobiles* oraz gen kodujący endoglukanazę *Clostridium thermocellum* (31). Okazało się jednak, że podczas hodowli *K. oxytoca*, endoglukanaza, stanowiąca jeden z podstawowych enzymów kompleksu celulaz, gromadziła się wewnątrz komórek, co uniemożliwiało bezpośrednią hydrolizę krystalicznej celulozy, a jedynie obserwowano fermentację celobiozy i celodekstryn. Uzyskano natomiast sekrecję endoglukanazy I po wprowadzeniu genu *eg/1* z *T. reesei* do *S. cerevisiae*, przy czym poziom sekrecji był 10-krotnie wyższy, gdy gen umieszczono w wielokopiowych plazmidach, niż gdy był zintegrowany z chromosomem (32). Drożdże *S. cerevisiae*, jak wiadomo są wykorzystywane do produkcji etanolu, ale nie są zdolne do fermentacji celobiozy, celodekstryn, a tym bardziej celulozy. Uzyskany rekombinant był zdolny do hydrolizy celodekstryn, jednak ilość wydzielanej endoglukanazy była wielokrotnie mniejsza niż w przypadku mutantów *T. reesei*.

Zastosowanie szczepów rekombinowanych wydzielających pojedyncze składniki kompleksu celulolitycznego, w stosunkowo niewielkich ilościach, ma jednak ograniczone zastosowanie w hydrolizie enzymatycznej celulozy, a tym bardziej ligninocelulozy. Jednakże ten kierunek badań rodzi wiele nadziei na skonstruowanie takich szczepów drobnoustrojów, które efektywnie fermentowałyby pentozy i heksozy, a jednocześnie wydzielałyby znaczne ilości celulaz, co w sposób zasadniczy obniżyłoby koszty biokonwersji celulozy i hemiceluloz do produktów finalnych.

Podsumowując zagadnienie biokonwersji ligninocelulozy, w szczególności celulozy do cukrów prostych, można zaproponować następujący schemat technologiczny tego procesu (rys. 7). Głównymi produktami tego procesu są ksyloza i glukoza, a także stałą pozostałość stanowi w dużym stopniu lignina.



Rys. 7. Schemat procesu wstępnej obróbki ligninocelulozy.



## 7. Budowa i biokonwersja hemiceluloz

O ile zawartość glukozy w hydrolizie uwarunkowana jest głównie stężeniem i stopniem zhydrolizowania celulozy, o tyle skład hydrolizatu hemiceluloz jest uzależniony od rodzaju materiału ligninocelulozowego, wykorzystywanego do hydrolizy (tab. 3).

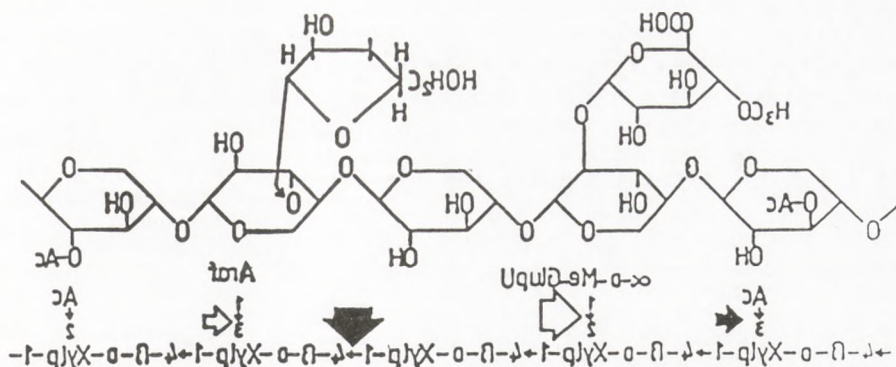
TABELA 3  
SKŁAD CHEMICZNY HEMICELULOZ WYBRANYCH MATERIAŁÓW LIGNINOCELULOZOWYCH (33)

Substrat	Ksyloza (%)	Galaktoza (%)	Arabinoza (%)	Ramnoza (%)	Mannoza (%)	Glukoza (%)	Kwas galakturonowy (%)
topola	72,5	6	4	3	0,75	3 – 10	6
brzoza	79,2	3,7	1,0	—	1,2	3,6	11,5
sosna	25,3	6,3	5,0	—	41,2	—	16,7
słoma	65,8	0,1	33,5	—	0,1	0,3	—

Hemicelulozy są złożone zarówno z liniowych jak i rozgałęzionych heteropolimerów D-ksylozy, L-arabinozy, D-mannozy, D-glukozy, L-galaktozy i kwasu galakturonowego. Większość hemiceluloz zawiera od 2 do 6 rodzajów cukrów prostych (33). Poszczególne reszty cukrowe w hemicelulozach mogą być częściowo zacetylowane lub zmetylowane. Poza hemicelulozami, których podstawowym składnikiem jest galaktoza (połączona wiązaniem typu  $\beta$ -1,3) w większości przypadków reszty cukrowe w hemicelulozach połączone są wiązaniem  $\beta$ -1,4-glukozydowym. W zależności od składu łańcucha głównego hemicelulozy dzielą się na: ksylany, mannany, glukany, galaktany, arabany oraz pektyny (34). W większości przypadków hemicelulozy mają budowę amorficzną, a tylko niektóre słabo krystaliczną. Dlatego też hemicelulozy stosunkowo łatwo ulegają hydrolizie kwasowej jak i enzymatycznej, można też je łatwo wyekstrahować za pomocą roztworów alkalicznych. Trudności pojawiają się dopiero w dalszej utylizacji hemiceluloz z uwagi na ich różnorodny skład, dominację pentoz w szczególności ksylozy (34), która trudno ulega fermentacji na tak wartościowe składniki jak etanol, kwasy organiczne, ksylitol (35).

Enzymatyczna hydroliza ksylanu, drugiego po celulozie najobficiej występującego polisacharydu w przyrodzie, wymaga udziału kilku enzymów o różnych funkcjach (rys. 8). Enzymy te klasyfikuje się na dwie grupy na podstawie natury wiązań, które rozszczepiają. Pierwszą grupę stanowią hydrolazy, powodujące hydrolizę wiązań glukozydowych w ksylanie. Należą do nich endoksyłanazy (E.C.3.2.1.8), które przypadkowo rozszczepiają łańcuch ksylanu do ksylooligosacharydów;  $\beta$ -ksylozydaza (E.C.3.2.1.3.7), które degradują ksylooligosacharydy w sposób egzo, dając ksylozę;  $\alpha$ -L-arabinofuranozydaza (E.C.3.2.1.55) i  $\alpha$ -glukuronidaza (E.C.3.2.1), które usuwają arabinozę i podstawniki kwasu 4-O-metyloglukuronowego z łańcucha ksylanu (36). Druga





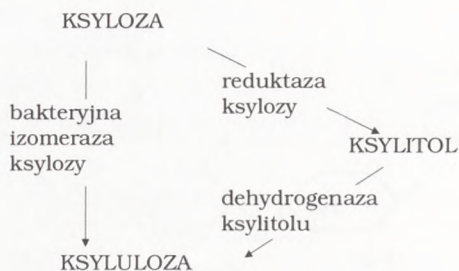
Rys. 8. Model enzymatycznej hydrolizy ksyłanu;  $\blacktriangleright$  endo-1-4-B-ksylanaza,  $\blacktriangleleft$  acetyloesteraza,  $\triangleleft$  glukuronidaza,  $\triangleleft$  arabinofuranozydaza (36).

grupa obejmuje enzymy, które rozrywają wiązania (esterazy E.C.3.1.1) między jednostkami ksylozy i kwasem octowym (esteraza acetyloksyanu, E.C.3.1.1.6) oraz między łańcuchami bocznymi, w skład których wchodzi arabinoza a kwasami fenolowymi, takimi jak kwas ferulowy (esteraza ferulowa) i kwas p-kumarowy (esteraza kumarowa). Zarówno endoksyłanazy jak i  $\beta$ -ksylozydaza są pierwszymi enzymami uczestniczącymi w degradacji ksyłanu, jednak jego całkowita degradacja wymaga synergistycznego działania pozostałych enzymów dla usunięcia dodatkowych związków. Idealny kompleks enzymów ksyłanolitycznych powinien charakteryzować się właściwościami, które pozwolą na równoczesną hydrolizę celulozy celulazami w optymalnych warunkach dla tego procesu.

W ostatnich latach podjęto próby wykorzystania hemicelulaz do procesu bielenia pulpy drzewnej, wykorzystując to, że hemicelulozy połączone są kowalencyjnymi wiązaniami z ligniną. Rozerwanie tych wiązań przez hemicelulozy pozwala łatwiej usunąć ligninę i zmniejszyć zużycie chloru o 25% w procesie bielenia (37). W tym przypadku preparaty hemicelulaz nie mogą zawierać celulaz, gdyż celulazy degradują włókno celulozowe, co jest w tym przypadku zjawiskiem niepożądanym.

Etanolowa fermentacja pentoz, w tym ksylozy, nastęrcza wiele problemów. Znanych jest kilka gatunków drożdży efektywnie fermentujących pentozy, należą do nich *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* (38). W przypadku *Saccharomyces cerevisiae*, zarówno asymilacja jak i fermentacja ksylozy nie jest możliwa z uwagi na niedostateczny poziom enzymów i brak równowagi w układzie redoks NAD/NADH (39,40). Jednak to drożdże *S. cerevisiae* obok bakterii *Zymomonas mobilis* są najlepszymi organizmami produkującymi etanol. Dlatego dąży się do konstrukcji takich rekombinantów *S. cerevisiae*, które byłyby zdolne do fermentacji zarówno pentoz jak i heksoz, a także dwucukrów, takich jak celobioza. Są tutaj co najmniej dwie możliwości oparte na metabolizmie ksylozy przez bakterie i drożdże.





Rys. 9. Schemat konwersji ksylozy do ksylulozy (35).

W wyniku izomeryzacji ksylozy wobec bakteryjnej izomerazy ksylozowej otrzymuje się ksylulozę, która jest dalej fermentowana na etanol przez *S. cerevisiae*. W związku z tym geny izomerazy ksylozowej z szeregu bakterii zostały sklonowane i transformowane do *S. cerevisiae*. Otrzymany transformant jednak nie fermentował ksylozy (41). Dlatego wybrano inną drogę wykorzystując enzymy drożdży fermentujących ksylozę, tj. reduktazę ksylozową pod wpływem której ksyloza jest redukowana do ksylitolu, a następnie w obecności dehydrogenazy ksylitolowej, ksylitol przechodzi w ksylulozę (rys. 9). Stosując metody inżynierii genetycznej otrzymano rekombinanty *S. cerevisiae* zawierające geny reduktazy ksylozowej i dehydrogenazy ksylitolu i osiągnięto ekspresję obu genów na tych samych lub współistniejących plazmidach. Transformenty dobrze asymilowały ksylozę jednak produkcja etanolu była niższa niż przez *P. stipitis*, klasyczny gatunek stosowany w fermentacji pentoz, z uwagi na znaczną produkcję ksylitolu wydzielanego do podłoża (42). Optymalizacja warunków hodowli powinna jednak przyczynić się do zwiększenia produkcji etanolu.

Dalszy postęp w poszukiwaniu nowych transformantów nie tylko drożdży, ale także bakterii, np. *Zymomonas mobilis* powinien rozwiązać trudny problem wydajnej fermentacji pentoz na etanol.

## 8. Uwagi końcowe

Biomasa jako surowiec dla pozyskania energii i związków chemicznych stanowi przedmiot zainteresowania wielu placówek badawczych. Co roku w Stanach Zjednoczonych ma miejsce sympozjum poświęcone konwersji biomasy, obecne, XVII nosi tytuł „Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals”. W Europie co 2 lata organizowane są konferencje pt. „European Conference for Energy, Environmental, Agriculture and Industry”, w których uczestniczy ok. 500 osób. W krajach rozwiniętych zainteresowanie problematyką biomasy winno, jak się wydaje, narastać i stanowić sygnał do większego zaangażowania krajowego potencjału badawczego w opracowanie nowoczesnych technologii przerobu biomasy, z możliwie szerokim uwzględnieniem biotechnologii, tym bardziej, że produkcja i przerób biomasy stanowią



przedmiot wykładów na coraz liczniejszych kierunkach studiów w naszych uczelniach.

W zakresie biokonwersji materiałów ligninocelulozowych pochodzenia rolniczego (słoma zbóż, rzepak, szybko rosnące drzewa i krzewy), leśnego (trociny, gałęzie), miejskiego i przemysłowego (makulatura, włókno zerowe) do etanolu, podstawowym problemem pozostaje biosynteza celulaz, a w szczególności pozyskanie szczepów rekombinowanych o podwyższonych uzdolnieniach do syntezy pełnego kompleksu enzymów celulolitycznych, wyjaśnienie mechanizmów regulacji i nadprodukcji celulaz, otrzymanie rekombinowanych szczepów *S. cerevisiae* i *Zymomonas mobilis* zdolnych do wydajnej fermentacji heksoz, pentoz, a także dwucukrów (celobioza, ksylbioza). Ważną rzeczą jest dalsze doskonalenie metod hodowli drobnoustrojów, w tym w bioreaktorach z komórkami immobilizowanymi, oraz obróbki materiałów ligninocelulozowych do enzymatycznej hydrolizy. Postęp w tych kierunkach badań powinien przyczynić się do obniżenia kosztów otrzymywania etanolu tak by jego cena była zbliżona do aktualnych cen tego surowca z tanich surowców skrobiowych. Problematyka wykorzystania ligniny, a w szczególności jej biotransformacja wymaga oddzielnego omówienia i nie może być pomijana przy kompleksowym opracowaniu technologicznego przerobu materiałów ligninocelulozowych.

## Literatura

1. Johansson A., Siple K., (1992), *Proc. Inter. Conf. on Biomass Industry*, Florence, Italy, 5-9 October, 292-298.
2. Spitzer J., Ahamer G., Weiss C., Fankhauser G., (1992), *Proc. Inter. Conf. on Biomass Industry*, Florence, Italy, 5-9 October, 72-29.
3. Meier H., (1977), *Die chemie der Pflanzenzellwand*, Ed. E. Treiber, Springer, Berlin, 1-511.
4. Ranby B., (1969). *Adv. Chem. Ser.*, 95, 139-151.
5. Frey-Wyssling, (1969), *Die Pflanzliche Zellwand*, Berlin, Springer Verlag, 1-367.
6. Enari T. M., Niku-Paavola M.-L., (1987), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 5, 67-87.
7. Robinson L. M., Chambliss G. H., (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 626-643.
8. Irwin D. C., Spezia M., Walker L. P., Wilson D. B., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 1002-1013
9. Kim D. W., Jeong Y. K., Lec J. K., (1994), *Enzyme Microb. Technol.*, 16, 649.
10. Thompson D. N., Chen H. Ch., (1992), *Bioresource Technol.*, 39, 155-163.
11. Stone J. E., Scallan A. M., Donefer E., Ahlgren E., (1969), *Adv. Chem. Series*, 95, 219-241.
12. Cowling E. B., Ellis B., Kirk T. K., (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, 6, 95-123.
13. Ooshima H., Burns D. S., Converse A. O., (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, 36, 446-452.
14. Grous W. R., Converse A. O., Grethlein H. E., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 274-280.
15. Deeble M. F., Lee M. L., (1985), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 15, 277-293.
16. Hatakka A., (1983), *Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.*, 18, 350-357.
17. Overend R. P., Chornet E., (1987), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.*, 321, 523-536.
18. Targoński Z., (1991), *Acta Biotechnol.*, 11, 173-175.
19. Hinman N. D., Schell D. J., Riley C. J., Bergeron P. W., Walter P. J., (1992), *Appl. Biochem. Biotech.*, 34/35, 639-645.
20. Esterbauer H., Steiner W., Labudowa I., Herman A., Hayn M., (1991), *Bioresource Technol.*, 36, 51-65.



21. Durand H., Clanet M., Tiraby G., (1988), *Enzyme Microb. Technol.*, 10, 431-435.
22. Persson I., Tjerneld F., Hahn-Hagerdal B., (1991), *Process Biochem.*, 26, 65-73.
23. Targoński Z., Pielecki J., (1995), *Acta Biotechnol.*, 15, 289-296.
24. Kubicek C. P., Messner R., Gruber F., Mach R. L., Kubicek-Pranz E. M., (1993), *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 90-99.
25. Kubicek-Pranz E. M., Gruber F., Kubicek C. P., (1991), *J. Biotechnol.*, 20, 83-94.
26. Fowler T., Grizoli M., Brown R. D. Jr., (1993), *Proceedings of the second Tricell symposium on Trichoderma reesei cellulases and other hydrolases*, Espoo, Finland, 199-210.
27. Volfova O., Suchardova O., Panos J., Krumphail V., (1985), *Appl. Environ. Biotechnol.*, 23, 246-248.
28. Kurose N., Yagyu J., Miyazaki T., Uchida M., Nanai S., Obayashi A., (1986), *J. Ferment. Technol.*, 64, 447-450.
29. Targoński Z., (1985), *Acta Microbiol. Pol.*, 34, 261-269.
30. Christakopoulos P., Macris B. J., Kekos D., (1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 18-20.
31. Wood B. E., Ingram L. O., (1992), *Appl. Environmental Microbiol.*, 58, 2103-2110.
32. Penttila M. E., Lehtavaara P., Knowles J., (1989), *Yeast Genetic Engineering*, Butterworth, Stoneham, USA, 247-267.
33. Fengal D., Wegener G., (1989), *Wood, Chemistry, Ultrastructure, Reaction*, Walter de Gruyter CO, Berlin, New York.
34. Wilkie K. C. B., (1979), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 36, 215-262.
35. Skoog K., Hahn-Hagerdal B., (1988), *Enzyme Microbiol. Technol.*, 10, 66-80.
36. Biely P., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 286-290.
37. Bajpai P., Bajpai P. K., (1992), *Process Biochem.*, 27, 319-325.
38. Prior B. A., Kilian S. G., du Preez J. C., (1989), *Process Biochem.*, Febr. 21-32.
39. Batt C. A., Carvallo S., Earsson D. D. Jr., Akedo M., Sinsky A. J., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 549-553.
40. Bruinenberg P. M., de Bat P. H. M., van Dijken J. P., Scheffer W. A., (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 256-260.
41. Amore R., Wilhelm M., Hollenberg C. P., (1989), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 351-357.
42. Tantirungki M., Nakarhima N., Seki T., Yashida T., (1993), *J. Ferment. Biotechnol.*, 75, 83-88.

## Bioconversion of lignocellulosic materials

### Summary

The degradation of lignocellulose to provide fuels and chemicals is the subject of intensive investigation. This paper outlines the current biotechnological methods and discusses the problems of cellulose and hemicellulose bioconversion to ethanol. The relationships between physical and chemical properties of lignocellulose and enzymatic hydrolysis are shown. The application of genetic engineering to *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae* and other organisms to increase the yield of ethanol from lignocellulosics materials is described.

### Key words:

lignocellulose, ethanol, *Trichoderma reesei*, *Saccharomyces cerevisiae*.

### Adres do korespondencji:

Zdzisław Targoński, Katedra Technologii Przemysłu Rolno-Spożywczego i Przechowalnictwa, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.