

## Możliwości wykorzystania surowców ligninocelulozowych w mikrobiologicznej produkcji etanolu

*Janusz Szczodrak*

*Jan Fiedurek*

Zakład Mikrobiologii Stosowanej  
Uniwersytet im. M. Curie-Skłodowskiej  
Lublin

Postępujące wyczerpywanie się nieodnawialnych zasobów surowców paliwowych na świecie oraz konieczność wzmoczenia ochrony środowiska naturalnego, skłaniają do upatrywania alternatywnych źródeł energii między innymi w biomasie roślinnej. Przez termin „biomasa” rozumie się każdy rodzaj materiału roślinnego, poczynając od produktów odpadowych mechanicznej obróbki drewna, a kończąc na specyficznych uprawach charakteryzujących się wysoką zawartością składników organicznych takich jak cukry czy oleje. Jeśli wyłączyć biomasę przeznaczoną do produkcji żywności, jako surowce odnawialne w rachubę wchodzi: roślinność lądowa i wodna (jedno- i wieloletnia), nadwyżki produkcji rolniczej i leśnej (zboża, trzcina, trawa), makulatura, wszelkie odpady organiczne (stałe i płynne), a także pozostałości z produkcji rolniczej (słoma), leśnej (wióry, trociny, kora, odcieki przemysłu celulozowo-papierniczego) i gospodarki komunalnej (śmiecie). O rozmiarach tej re-

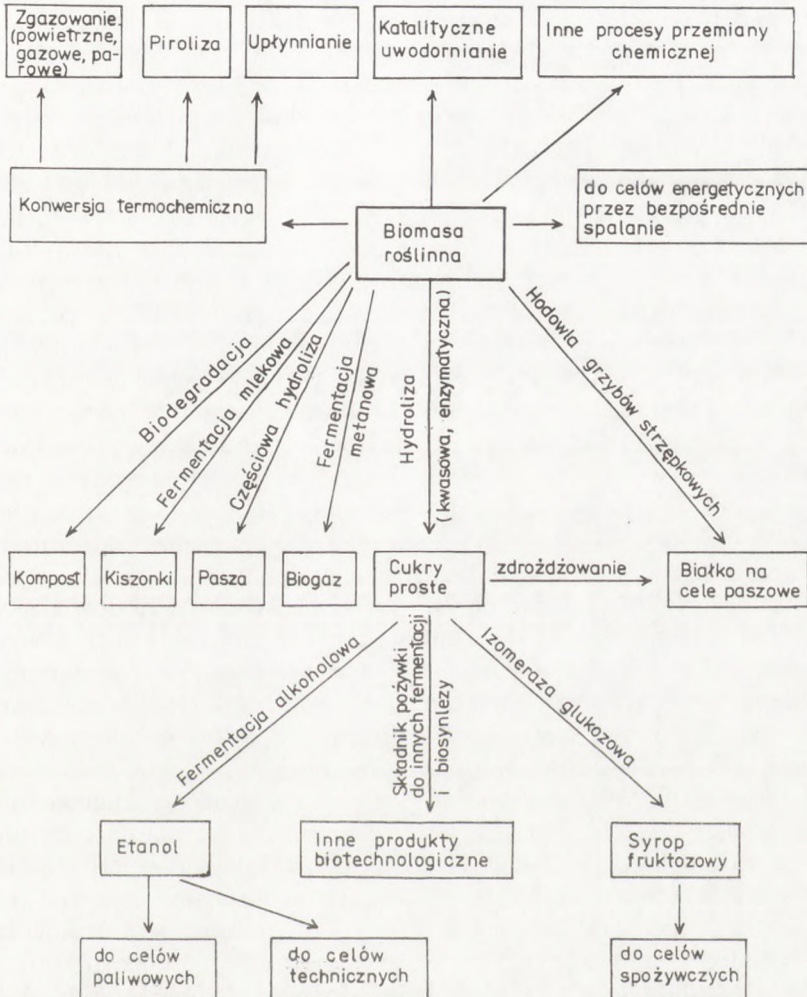
zerwy materii organicznej najlepiej świadczy fakt, że rocznie powstaje ona na Ziemi w ilości około 200 miliardów ton, z czego ponad 90% stanowi ligninoceluloza. Przy średniej wartości opałowej 17 500 kJ/kg biomasa ta odpowiada energii równej około 800 bilionów kWh, co stanowi wartość dziesięciokrotnie większą od ilości energii aktualnie wykorzystywanej przez ludzi i dwudziestokrotnie większą od zużywanej energii pochodzenia kopalnego. Człowiek zużytkowuje, jak dotąd, jedynie około 2% biomasy roślinnej, przeznaczając na cele gospodarcze  $1,0 \times 10^9$ t drewna,  $1,6 \times 10^9$ t zbóż,  $0,7 \times 10^9$ t słomy oraz  $0,4 \times 10^9$ t innych surowców zawierających ligninocelulozę (1). Szacuje się również, że około 40% biomasy staje się corocznie odpadami rolnymi, przemysłowymi i komunalnymi. Perspektywy szerszego sięgnięcia do tych zasobów węgla organicznego poprzez ich hydrolizę enzymatyczną do łatwo przyswajalnych przez organizmy cukrów prostych, jak się wydaje, są bardzo obiecujące. Mogłyby się one stać dzięki temu przydatne zarówno w rolnictwie, powiększając zasoby paszowe, jak również do produkcji białka mikrobiologicznego lub niektórych produktów fermentacji (2, 3). W praktyce jednak efektywna utylizacja materiałów ligninocelulozowych nie jest łatwa z powodu sezonowych zmian ich ilości, dużego rozproszenia oraz wysokich kosztów transportu i przechowywania tak dużej ilości materii organicznej.

Biomasa ligninocelulozowa może być przerabiana na produkty użyteczne zarówno na drodze konwersji fizykochemicznej lub biologicznej (rys. 1). Dotychczas przeważają technologie o profilu wyraźnie chemicznym, które są niestety stosunkowo drogie, i co gorsza, powodują z reguły powstawanie dodatkowych odpadów. Dlatego też istotnego znaczenia nabiera rozważenie biologicznych metod utylizacji odpadów ligninocelulozowych, polegających na pozytywnej ich transformacji przy użyciu mikroorganizmów lub ich enzymów. Byłoby to zatem umiejętne wykorzystanie w biotechnologii procesów zachodzących w bardzo wolnym tempie w przyrodzie. Nadanie takim przemianom odpowiedniej szybkości stanowi jeden z warunków ich opłacalności. Mimo wielu badań prowadzonych w tym zakresie nie udało się dotychczas osiągnąć rezultatów na tyle zachęcających, aby były możliwe do zastosowania na szerszą skalę (4).

Jedną z szans wykorzystania energii tkwiącej w związkach ligninocelulozowych biomasy roślinnej, stanowi możliwość ich biotransformacji do alkoholu etylowego. Mikrobiologiczna produkcja etanolu z celulozy jest przedmiotem szczególnego zainteresowania z uwagi na fakt, że może być on wykorzystany jako materiał pędny do silników spalinowych lub jako paliwo płynne uzupełniające benzynę. Mieszanka etanolu z benzyną w stosunku 1 : 9 lub 2:8, znana pod nazwą gazoholu, już dziś z dobrym skutkiem stosowana jest w takich krajach jak Brazylia czy USA. Wyniki badań, a także praktyka wskazują, że dodatek alkoholu etylowego do benzyny umożliwia czterokrotne zmniejszenie dodatku czteroetylku ołowiu, a nawet całkowite wyeliminowanie tego związku chemicznego bez żadnych zmian w silniku. Stwierdzenie to ma bardzo ważne znaczenie z punktu widzenia ochrony środowiska. Zużywając w Polsce około 3 mln ton benzyny, pojazdy emitują rocznie do atmosfery,

a następnie do gleby około 1400 ton ołowiu, którego szkodliwy wpływ na organizm człowieka jest znany i dobrze udokumentowany.

Proces produkcji etanolu z ligninocelulozanów obejmuje następujące etapy: biosyntezę celulaz, wstępne przygotowanie substratu, enzymatyczną jego hydrolizę oraz fermentację hydrolizatu i odzysk alkoholu. Produkcja enzymów celulolitycznych jest procesem najdroższym i stanowi około 60% całkowitych kosztów produkcji etanolu. W celu ich zmniejszenia prowadzone są badania nad intensyfikacją syntezy celulaz przez drobnoustroje w oparciu o różne techniki genetyczne jak mutagenizację (5, 6), fuzję protoplastów (7) lub prze-



Rys. 1. Możliwości wykorzystania biomasy roślinnej.

noszenie genów (8, 9). Ważną rolę odgrywa również optymalizacja warunków hodowli oraz stosowanie induktorów stymulujących syntezę celulaz (10). Trwają także poszukiwania tanich źródeł węgla do biosyntezy tych enzymów poprzez zastąpienie wysoko oczyszczonej celulozy odpadami ligninocelulozowymi po ich wstępnej obróbce (11 – 13). Wśród sposobów zmierzających do potania kosztów produkcji celulaz należy wymienić próby odzyskiwania ich z hydrolizatów celulozy (14), immobilizacji (15) lub stosowania metod hodowli drobnoustrojów efektywniejszych pod względem syntezy tych enzymów, takich jak hodowle ciągłe (16) oraz prowadzenie fermentacji na podłożach stałych (17). Zauważono, że dobre efekty w zakresie rozkładu odpadów ligninocelulozowych można też osiągnąć, stosując celulazy uzyskane przy udziale mieszanych kultur mikroorganizmów (18).

Poznano wiele gatunków drobnoustrojów zdolnych do biosyntezy enzymów celulolitycznych, ale tylko nieliczne z nich mogą znaleźć zastosowanie w produkcji przemysłowej. Jest ono uwarunkowane koniecznością syntezy pełnego kompleksu enzymów niezbędnych do biodegradacji celulozy natywnej. W skład jego wchodzi różne zewnątrzkomórkowe egzo- $\beta$ -1,4-D-glukanazy (EC 3.2.1.91) i endo- $\beta$ -1,4-D-glukanazy (EC 3.2.1.4) oraz  $\beta$ -1,4-D-glukozydazy (EC 3.2.1.21), których łączne działanie powoduje hydrolizę błonnika do glukozy. Obecnie do najlepszych celulolitów należą mutanty szczepu dzikiego *Trichoderma reesei* QM6a, który został wyizolowany w 1950 r. przez Reese'a i od tego czasu jest sukcesywnie doskonalony poprzez mutagenizację wielostopniową prowadzoną w różnych krajach. W USA wyizolowano szczepy *T. reesei* QM9414, MCG77, Rutger C30; w Finlandii szczep *T. reesei* VTT79124; we Francji *T. reesei* CL847; w byłej CSSR otrzymano szereg szczepów o symbolach MHC, zaś w Austrii serię SVG (1). Otrzymane mutanty różnią się aktywnością poszczególnych składników kompleksu celulaz, a w niektórych przypadkach również rodzajem wymaganego źródła węgla jako substratu do ich wytwarzania.

Preparaty celulolityczne otrzymywane są z płynów pohodowlanych drobnoustrojów w wyniku ich zagęszczania przez ultrafiltrację lub w wyparkach próżniowych, jak również na drodze wytrącania enzymów siarczanem amonu lub etanolem i przez wysuszenie ich metodą liofilizacji (19). Surowe preparaty wykorzystuje się do hydrolizy enzymatycznej odpadów celulozowych w celu ich rozkładu do postaci cukrów rozpuszczalnych.

Na wydajność hydrolizy enzymatycznej wpływa wiele czynników, między innymi: rodzaj wstępnej obróbki substratu, hamowanie działania enzymów przez końcowe produkty biodegradacji, termostabilność enzymów, ich stężenie i adsorpcja na substracie, czas hydrolizy, odczyn środowiska, stężenie substratu w podłożu i jego mieszanie. W związku z tym optymalizacja warunków hydrolizy odgrywa zasadniczą rolę w pomyślnym przebiegu całego procesu scukrzania.

Hydroliza celulozy jest wynikiem synergicznego działania endo- i egzoglukanaz oraz  $\beta$ -glukozydaz. W następstwie rozkładu celulozy przez dwa pierwsze zespoły enzymów powstaje celobioza i glukoza, które nagromadzając się w środowisku reakcji hamują, na zasadzie sprzężenia zwrotnego, aktywności

poszczególnych celulaz, co prowadzi z kolei do obniżenia szybkości i wydajności procesu scukrzania. Wykazano przy tym, że celobioza jest silniejszym inhibitorem celulaz niż glukoza (20). Wysoka aktywność w kompleksie celulaz  $\beta$ -glukozydazy (enzymu degradującego celobiozę do glukozy) usuwa z mieszaniny reagującej celobiozę, co zwiększa efektywność enzymatycznej hydrolizy błonnika. Hamowaniu hydrolizy przez glukozę można zapobiec, prowadząc scukrzanie celulozy z równoczesną fermentacją powstającej glukozy do etanolu przez drożdże lub bakterie (21).

Wiele preparatów handlowych celulaz (w tym również otrzymanych z *T. reesei*) charakteryzuje się małą zawartością  $\beta$ -glukozydazy (22), co prowadzi do nagromadzenia się zwiększonych ilości celobiozy w hydrolizatach enzymatycznych celulozy. Z drugiej strony szczepy drożdży stosowane w gorzelnictwie nie są zdolne do fermentacji tego cukru (23), co powoduje ograniczenie konwersji hydrolizatów celulozy do etanolu, obniżając w znacznym stopniu jego końcową wydajność. Można ten problem rozwiązać przez uzupełnianie preparatów celulaz *T. reesei*  $\beta$ -glukozydazą pochodzącą z innych źródeł (np. wytworzoną przez *Aspergillus*) (24), lub przez pozyskiwanie mutantów *T. reesei*, syntetyzujących pożądaną ilość tego enzymu (6), albo poprzez selekcję mutantów drożdży zdolnych równocześnie fermentować glukozę i celobiozę (25).

Podstawową trudność w rozwiązywaniu problemów enzymatycznej depolimeryzacji materiałów ligninocelulozowych stanowi ich ogromna złożoność. Błonnikowi towarzyszą zawsze hemicelulozy i ligniny, które inkrustując tkankę roślinną, uodparniają ją na działanie mikroorganizmów oraz wydzielanych przez nie enzymów. Dlatego też wszystkie procesy przemysłowe, których celem jest biokonwersja surowców celulozowych i ligninocelulozowych, powinny być poprzedzone wstępnym ich przygotowaniem. Zabiegi takie mają na celu zwiększenie powierzchni właściwej substratu, zmniejszenie stopnia krystaliczności celulozy oraz rozbicie kompleksu ligninowocelulozowego (26). Mimo opracowania wielu sposobów wstępnej obróbki biomasy ligninocelulozowej (tab. 1), brak jest w dalszym ciągu metody idealnie skutecznej i atrakcyjnej ekonomicznie.

Ze względu na prostotę i znaczną efektywność, dużymi walorami praktycznymi, odznacza się maceracja materiałów ligninocelulozowych w roztworach alkalicznych oraz ich rozkład hydrotermiczny. Obróbka tych surowców rozcieńczonym ługiem sodowym powoduje częściową ich delignifikację, a także pęcznienie celulozy, obniżenie stopnia jej polimeryzacji i krystaliczności oraz wzrost powierzchni dostępnej dla enzymu. Bardziej efektywna modyfikacja tej metody polega na traktowaniu substratu roztworem etanolu i wodorotlenku sodowego w temp. 170°C. Rozpuszczalniki organiczne, zmniejszając napięcie powierzchniowe wrzących płynów, umożliwiają dyfuzję produktów degradacji ligniny z substratu do roztworu i ułatwiają dostęp zasady do węglowodanów i ligniny, tkwiących w tym substracie. Ług sodowy, oprócz przemiany ligniny do jej bardziej rozpuszczalnych pochodnych sodowych, przemieszcza związki cukrowe o niskiej masie cząsteczkowej ze ściany komórkowej, powodując w ten sposób rozszerzenie porów w ścianie substratu ligninocelulozowego, a tym samym ułatwienie dostępu do niego odczynników (35).

TABELA 1  
METODY WSTĘPNEGO PRZYGOTOWANIA LIGNINOCELULOZANÓW DO HYDROLIZY ENZYMATYCZNEJ  
I WYWOŁANE NIMI ZMIANY W STRUKTURZE SUBSTRATU

Metoda	Operacje (czynniki) wywołujące zmianę struktury substratu	Rodzaj wywołanych zmian	Literatura
fizyczna	mielenie (kulowe, wibracyjne, ciśnieniowe, ścierające pomiędzy dwoma walcami), napromieniowywanie (wiązka elektronów, promienie $\gamma$ , mikrofałe), wysoka temperatura (piroliza, parowanie eksplozyjne)	zwiększenie powierzchni właściwej i wielkości porów, zmniejszenie stopnia polimeryzacji celulozy i jej amorfizacja, hydroliza hemiceluloz, częściowa depolimeryzacja ligniny	(27 – 29)
chemiczna	zasady, kwasy, gazy, utleniacze, reduktory, rozpuszczalniki organiczne	delignifikacja, obniżenie stopnia polimeryzacji i krystaliczności celulozy oraz jej pęcznienie, wzrost porowatości	(12, 30, 31)
biologiczna	grzyby białej zgnilizny drewna ( <i>Pleurotus</i> , <i>Pycnoporus</i> , <i>Ischnoderma</i> , <i>Phlebia</i> i in.)	delignifikacja	(32, 33)
mieszana	maceracja alkaliczna połączona z parowaniem eksplozyjnym, mielenie z następującą po nim obróbką alkaliczną lub kwasową	degradacja hemiceluloz, delignifikacja, pęcznienie celulozy, zwiększenie powierzchni właściwej i wielkości porów	(34)

Proces hydrotermiczny polega na ogrzewaniu biomasy celulozowej z wodą lub parą wodną w temp. 185 – 210°C przez 5 do 20 min lub w temp. 240 – 260°C przez kilkanaście lub kilkadziesiąt sekund oraz na eksplozyjnym rozprężeniu mieszaniny (36). Metoda ta pozwala rozdzielić substrat na frakcję rozpuszczalną w wodzie zawierającą hydrolizat hemiceluloz, frakcję ligninową oraz frakcję celulozową o zawartości błonnika od 70 do 90%. W wyniku tego rodzaju obróbki hydrotermicznej zachodzi daleko posunięta hydroliza hemiceluloz oraz częściowa depolimeryzacja ligniny. Katalizatorem tych reakcji jest kwas octowy powstający w wyniku ogrzewania substratu (37). Wykazano również, że metoda ta, nie wpływa na zmianę struktury krystalicznej celulozy.

Sądząc z informacji literaturowych, problem hydrolizy enzymatycznej surowców roślinnych być może zostanie w przyszłości częściowo rozwiązany poprzez zastosowanie w uprawach roślin (np. traw) inhibitorów biosyntezy ligniny. Jeden z takich inhibitorów — kwas aminooksy- $\beta$ -fenylopropionowy,

hamuje kluczowy enzym syntezy ligniny na drodze: fenyloalanina – kwas cyanomonowy (38). Badania nad wyhodowaniem traw „bezligninowych” od kilku lat prowadzone są w skali szklarniowej w Berkshire (Wielka Brytania). Rośliny pozbawione bariery ligninowej i zawierające w swej biomase głównie celulozę, będą niewątpliwie charakteryzowały się lepszą strawnością i stanowiły surowiec łatwo poddający się biokonwersji do cukrów prostych.

Miarą postępu w dziedzinie wykorzystania surowców celulozowych do produkcji etanolu jest szacowany koszt produkcji tego związku. Przed 10 laty oceniano, że koszt ten wynosił 4 USD za galon (około 4 dm<sup>3</sup>), natomiast w ostatnich latach koszt obniżył się do 1,8 USD/galon. Jeśliby wykorzystać bieżące wyniki badań naukowych to etanol z surowców ligninocelulozowych można by otrzymać po kosztach poniżej 1 USD/galon. Stosując zaś wielokrotne wykorzystanie enzymów celulolitycznych w procesie hydrolizy oraz pełniejszą utylizację produktów ubocznych, koszt produkcji etanolu może być zmniejszony poniżej 0,2 USD za 1 dm<sup>3</sup>. Dla porównania, planowana cena sprzedaży 1 galonu alkoholu pochodzącego z syntezy chemicznej (z etylenu jako surowca wyjściowego) określona została na 1,65 USD, zaś z fermentacji zboża — 1,88 USD.

Biotransformacja celulozy do etanolu może zachodzić zarówno na drodze bezpośredniej konwersji mikrobiologicznej tego polisacharydu jak i poprzez sukcesywne lub równoczesne jego scukrzanie i fermentację. Z punktu widzenia ekonomicznego, bezpośrednia konwersja celulozy do etanolu jest sposobem najbardziej korzystnym, ponieważ wszystkie etapy prowadzące do jego otrzymania, tj. produkcja enzymów, hydroliza i fermentacja — są tu wzajemnie powiązane. Metoda ta oparta jest na wykorzystaniu czystych bądź mieszanych kultur drobnoustrojów fermentujących celulozę do etanolu. Zdolność tę wykazują m.in. beztlenowe, termofilne bakterie *Clostridium thermocellum* (39), jak również grzyby nitkowate z gatunków *Monilia sp.* (40), *Neurospora crassa* (41) i *Paecilomyces sp.* (42). Badania procesu fermentacji z wykorzystaniem tych organizmów wykazały, że przebiega on bardzo powoli (3 – 12 dni) i jak na razie z niewielką tylko wydajnością (0,8 – 60 g etanolu/dm<sup>3</sup>) prawdopodobnie z powodu niewielkiej ich oporności na wyższe stężenia alkoholu etylowego (43). Innym mankamentem tego procesu (szczególnie w przypadku fermentacji bakteryjnych) jest wytwarzanie podczas fermentacji licznych produktów ubocznych, w tym głównie kwasu octowego i mlekowego (44).

Bezpośredniej konwersji wstępnie zmodyfikowanej słomy pszennej do etanolu, można też dokonywać przy wykorzystaniu kultur mieszanych szczepów *Cl. thermocellum* z beztlenowcami fermentującymi pentozy, a mianowicie: *Cl. thermosaccharolyticum* i *Cl. thermohydrosulphuricum* (45).

W celu zwiększenia efektywności procesu produkcji etanolu na drodze bezpośredniej konwersji mikrobiologicznej substratu ligninocelulozowego, trwają obecnie poszukiwania szczepów termofilnych, nie wytwarzających kwasów organicznych i wykazujących oporność na wyższe stężenia tego alkoholu.

Scukrzanie i sukcesywna fermentacja celulozy, podczas których poszcze-

gólne etapy (tj. wytwarzanie celulaz, hydroliza substratu i fermentacja hydrolyzatów), występują rozdzielnie, stwarza możliwość zoptymalizowania warunków przebiegu poszczególnych faz tego procesu i odpowiedniego nimi manipulowania. Jednak w tym wypadku produkty końcowe hydrolizy enzymatycznej, w postaci glukozy i celobiozy, hamują aktywność celulaz, co wpływa ujemnie na tempo procesu scukrzania i końcowe stężenie cukrów, a w rezultacie tego, także na wydajność etanolu (20).

Proces oparty na połączeniu hydrolizy enzymatycznej celulozy z jednoczesnym odfermentowaniem uzyskanych cukrów do etanolu, znany jest pod skrótową nazwą SSF (*simultaneous saccharification and fermentation* — równoczesne scukrzanie i fermentacja). W porównaniu z procesem, w którym obydwa etapy są rozdzielone, metoda ta pozwala na uzyskanie większej (o 25 – 40%) wydajności etanolu, na skutek zniesienia hamowania hydrolizy końcowymi jej produktami oraz eliminuje konieczność stosowania oddzielnych reaktorów służących do scukrzania i fermentacji. Do innych zalet tego systemu można zaliczyć krótki czas trwania procesu jak również wyraźne obniżenie ryzyka zakażeń mikroflorą postronną w związku z wysoką temperaturą jego przebiegu, obecnością etanolu w środowisku reakcji oraz warunkami beztlenowymi (46, 47). Pomimo wyraźnych korzyści, jakie daje system SSF, ma on też szereg ograniczeń, do których w pierwszym rzędzie należy zaliczyć różnice optimumów temperaturowych hydrolizy (45 – 50°C) i fermentacji (28 – 35°C). Poza tym wytwarzany etanol i substancje toksyczne, uwalniające się w procesie hydrolizy materiałów ligninocelulozowych poddanych wstępnej obróbce, mogą hamować zarówno wzrost i aktywność fermentacyjną drożdży jak i aktywność celulaz (48 – 50). Ważnym problemem w procesie równoczesnego scukrzania i fermentacji celulozy do etanolu jest uzyskanie stanu „zgodności” między drożdżami a enzymem. Pewne bowiem substancje (np. enzymy proteolityczne), uwalniające się z komórek niektórych szczepów, powodują degradację enzymów. Z drugiej zaś strony, komponenty preparatów enzymatycznych mogą prowadzić do lizy komórek drożdży.

Pomimo licznych prac badawczych nie uruchomiono dotychczas na świecie zakładu, który przerabiałby surowce celulozowe do etanolu metodą biologiczną w skali przemysłowej; zorganizowano natomiast kilka stacji pilotowych. W roku 1976 w Pittsburgu (USA) powstał pierwszy zakład doświadczalny produkcji etanolu z celulozy w oparciu o proces SSF, o zdolności przerobowej 1 t surowca (stałe odpady miejskie) dziennie. Uzyskane wyniki pozwoliły amerykańskiemu koncernowi przemysłowemu Gulf Oil na dokonanie dokładnej oceny ekonomicznej tego przedsięwzięcia oraz zaprojektowanie na początku lat osiemdziesiątych budowy zakładu o docelowej produkcji 150 000 galonów etanolu dziennie z 2000 t odpadów celulozowych i przewidywanej cenie sprzedaży produktu finalnego w 1983 r. ustalonej na 0,95 dolara za galon (46, 51). Koszty związane z tą inwestycją miały wynieść 112 milionów dolarów (dane z 1981 r.) ale, jak dotąd, nie doszło do jej realizacji.

W ramach programu RAPAD (The Research Association for Petroleum Alternatives Development) w Japonii uruchomiono w 1983 r. stację doświad-



czalną do przerobu około 700 kg surowca na dobę. Enzymy produkuje się w fermentorach o pojemności 4000 dm<sup>3</sup>, wykorzystując szczepy *T. reesei*. Odzyskiwanie części enzymów prowadzi się za pomocą ultrafiltracji. Otrzymano nowy szczep *Kluyveromyces celobiovorus* KY 5199, który fermentuje do etanolu zarówno ksylozę, jak celobiozę i glukozę (1).

Jedna z większych stacji doświadczalnych o zdolności przerobowej 1 do 4 t surowca na godzinę (metoda ciągła) została uruchomiona w 1988 r. w Soustons we Francji. Surowce celulozowe poddaje się wstępnej obróbce metodą parowania i eksplozyjnego rozprężania. Produkcja enzymów zachodzi w fermentorze o poj. 30 m<sup>3</sup>. Hodowlę *T. reesei* (szczep CL847) prowadzi się na podłożu z zawartością laktozy. Produktywność szczepu wynosi 140 j.FPU/dm<sup>3</sup>/godz. Według oceny autorów, którzy opracowali nową metodę produkcji kompleksu celulaz, koszt enzymów niezbędnych do produkcji 1 kg cukru jest bardzo niski, wynosi bowiem tylko 3 centy. Hydroliza enzymatyczna jest prowadzona w urządzeniu o pojemności 25 m<sup>3</sup>. W jednym cyklu można otrzymać 3 t cukru. Fermentacja ma być prowadzona w kadzi o pojemności 50 m<sup>3</sup>. Przewiduje się otrzymywanie etanolu, a także prowadzenie fermentacji acetonowo-butanolowej.

W kraju zamierza się zorganizować stację doświadczalną do przerobu surowców celulozowych (głównie słomy rzepakowej) o zdolności przerobowej 4 – 5 t/dobę. Projekt procesowy jest przygotowywany w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie.

W celu rozwiązania niektórych problemów odnoszących się do równoczesnego scukrzania i fermentacji celulozy do etanolu, przetestowano wiele gatunków drożdży oraz bakterie *Zymomonas mobilis* w połączeniu z celulazami wytwarzanymi przez mutanty *T. reesei* (6, 52 – 54). Stwierdzono, że dla zwiększenia efektywności procesu SSF należy poszukiwać termostabilnych szczepów mikroorganizmów zdolnych do produkcji znacznych ilości alkoholu etylowego w temperaturach bliskich optymalnej dla procesu scukrzania i wykazujących odpowiednią oporność wobec etanolu i celulaz. Ciekawy sposób wyeliminowania negatywnego wpływu nadmiernych stężeń etanolu na aktywność fermentacyjną drożdży i celulaz w systemie SSF opracowali Ghose i wsp. (55). Do prowadzenia tego procesu zastosowali oni specjalnej konstrukcji reaktor w którym, dzięki okresowemu usuwaniu etanolu, jego stężenie było przez cały czas utrzymywane na odpowiednio niskim poziomie.

Żaden z opisanych dotąd systemów utylizacji celulozy nie spełnia wymogów przemysłowych ze względu na małą szybkość hydrolizy celulozy, który to etap limituje szybkość wytwarzania etanolu. Dalszą trudnością jest fakt, iż większość drobnoustrojów, stosowanych do rozkładu materiału celulozowego, nie ma zdolności degradacji ksylozy, produktu hydrolizy hemicelulozy.

Można jednak na tym polu odnotować wyraźny postęp. Izolowano np. mutanty *Clostridium* o zwiększonej produktywności i tolerancji na etanol, nie wytwarzające ponadto produktów ubocznych. Odkryciem ważnym w tej dziedzinie jest wykazanie, że jeśli ksylozę przekształcić w ksylozozę to podlega ona fermentacji etanolowej pod wpływem drożdży. Otworzyło to drogę do prób

inkorporacji do genomu drożdży genu izomerazy ksylozowej. W przypadku powodzenia drożdże byłyby zdolne do fermentacji heksoz i pentoz. W celu obniżenia kosztów hydrolizy enzymatycznej otrzymuje się szczepy pleśni *T. reesei* syntetyzujące celulazy na roztworach cukru (np. laktozy) (56). Są to mutanty konstytutywne lub odporne na represję cukrową. Ponadto na drodze inżynierii genetycznej przeniesiono geny celulaz z *Trichoderma* do drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Wiąże się również nadzieje na uzyskanie pozytywnych wyników drogą rekombinacji DNA (9). Istnieje grupa drobnoustrojów o silnej aktywności celulolitycznej, jak również aktywnie fermentujących cukry proste do etanolu. W obrębie tej puli szczepów możliwe są zatem różnorodne kombinacje genów, nawet takie, w wyniku których mogłyby powstać superszczep zdolny do hydrolizy celulozy i ksyłanu wraz z fermentacją etanolową glukozy i ksylozy.

Analiza prac prowadzonych w kraju i na świecie odnośnie do wykorzystania surowców ligninocelulozowych do produkcji etanolu wskazuje, że pomimo licznych trudności, stanowi on nadal aktualny i ważny problem biotechnologiczny. Jego rozwiązanie może przynieść duże korzyści ekonomiczne w przemyśle paliwowo-energetycznym jak i w ochronie środowiska naturalnego. Wraz z wyczerpywaniem się światowych zasobów ropy naftowej i wzrostem jej ceny, zainteresowanie technologiami przetwarzającymi biomasę roślinną na paliwa płynne będzie wzrastało, w szczególności dotyczy to krajów nie posiadających złóż ropy naftowej. Dlatego też w dalszym ciągu w wielu laboratoriach badawczych realizowane są prace nad doskonaleniem technologii biokonwersji odpadów ligninocelulozowych do etanolu zarówno na poziomie badań podstawowych jak i technicznych.

## Literatura

1. Esterbauer H., Hayn M., (1985), *Das Papier*, 39, 608 – 616.
2. Leonowicz A., Wojtaś-Wasilewska M., Rogalski J., Luterek J., (1991), *Biotechnologia P.I.*, 1(11), 39 – 61.
3. Targoński Z., Rogalski J., Leonowicz A., (1992), *Biotechnologia P.I.*, 2(17), 56 – 65.
4. Bujak S., Targoński Z., (1988), *Post. Mikrobiol.*, 27, 211 – 241.
5. Kawamori M., Morikawa Y., Shinsha Y., Takayama K., Takasawa S., (1985), *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2875 – 2879.
6. Szczodrak J., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1112 – 1116.
7. Manczinger L., Ferenczy L., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 72 – 76.
8. Fowler T., Berka R. M., (1991), *Curr. Opin. Biotech.*, 2, 691 – 697.
9. Targoński Z., Wójcik W., (1993), *Biotechnologia P.I.*, 1(20), 14 – 19.
10. Kawamori M., Morikawa Y., Takasawa S., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 235 – 236.
11. Szczodrak J., Rogalski J., Ilczuk Z., (1984), *Acta Microbiol. Polon.*, 33, 217 – 225.
12. Szczodrak J., Ilczuk Z., Rogalski J., Leonowicz A., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 504 – 510.
13. Szczodrak J., (1988), *Acta Biotechnol.*, 8, 509 – 515.
14. Vallander L., Eriksson K. E., (1987), *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 714 – 720.
15. Rogalski J., Szczodrak J., Dawidowicz A., Ilczuk Z., Leonowicz A., (1985), *Enzyme Microb. Technol.*, 7, 395 – 400.
16. Taniguchi M., Kato T., Matsuno R., Kamikubo T., (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 218 – 224.

17. Kim J. H., Hosobuchi M., Kishimoto M., Seki T., Yoshida T., Taguchi H., Ryu D. D. Y., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1445 – 1450.
18. Mishra M. M., Yadav K. S., Kapoor K. K., (1981), *Zbl. Bakt. II. Abt.*, 136, 603 – 608.
19. Rogalski J., Szczodrak J., Ilczuk Z., (1983), *Acta Microbiol. Polon.*, 32, 363 – 372.
20. Ghosh P., Pamment N. B., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 425 – 430.
21. Szczodrak J., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 771 – 776.
22. Woodward J., Wiseman A., (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 73 – 79.
23. Ghose T. K., Tyagi R. D., (1979), *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1387 – 1400.
24. Sternberg D., Vijayakumar P., Reese E. T., (1977), *Can. J. Microbiol.*, 23, 139 – 147.
25. Bailey R. B., Benitez T., Woodward A., (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 631 – 639.
26. Fan L. T., Lee Y. H., Beardmore D. H., (1980), *Adv. Biochem Eng.*, 14, 101 – 117.
27. Lillehoj E. B., Han Y. W., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 2077 – 2084.
28. Azuma J. I., Asai T., Isaka M., Koshijima T., (1985), *J. Ferment. Technol.*, 63, 529 – 536.
29. San Martin R., Blanch W. H., Wilke O. R., Scimanna A. F., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 564 – 569.
30. Carr M. E., Doane W. M., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1252 – 1257.
31. Dale B. E., Henk L. L., Shiang M., (1985), *Dev. Ind. Microbiol.*, 26, 223 – 233.
32. Hatakka A. I., (1983), *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 350 – 357.
33. Mes-Hartree M., YU E. K. C., Reid I. D., Sandler J. N., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 120 – 125.
34. Puri V. P., Pearce G. R., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 480 – 485.
35. Marton R., Granzow S., (1982), *Tappi.*, 65, 103 – 106.
36. Overend R. P., Chornet E., (1987), *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, A321, 523 – 536.
37. Puls J., Poutanen K., Korner H. U., Viikari L., (1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 416 – 423.
38. Amrhein N., Frank G., Lemm G., Luhmann H.-B., (1983), *Eur. J. Cell Biol.*, 29, 139 – 144.
39. Gordon J., Cooney C. L., (1981), *Adv. Biotechnol.* (eds Moo-Young M., Robinson C. W.), Pergamon Press, New York, 2, 15 – 20.
40. Gong C. S., Maun C. M., Tsao G. T., (1981), *Biotechnol. Lett.*, 3, 77 – 82.
41. Rao M., Deshpande V., Keskar S., Srinivasan M. C., (1983), *Enzyme Microb. Technol.*, 5, 133 – 136.
42. Wu J. F., Lastick S. M., Updegraff D. M., (1986), *Nature*, 321, 887 – 888.
43. Herrero A. A., Gomez R. F., (1980), *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 571 – 577.
44. Zertuche L., Zall R. R., (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 57 – 68.
45. Sandler J. N., Chan, M. K.-H., (1984), *Can. J. Microbiol.*, 30, 212 – 220.
46. Emert G. H., Katzen R., (1980), *Chemtech.*, 10, 610 – 614.
47. Wyman C. E., Spindler D. D., Grohmann K., Lastick S. M., (1986), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 17, 221 – 238.
48. Ooshima H., Ishitani Y., Harano Y., (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 389 – 397.
49. Targoński Z., Achremowicz B., (1986), *Acta Microbiol. Polon.*, 35, 69 – 76.
50. Szczodrak J., Targoński Z., (1989), *Acta Biotechnol.*, 9, 555 – 564.
51. Emert G. H., Katzen R., Fredrickson R. E., Kaupisch K. F., (1980), *Chem. Eng. Prog.*, 76, 47 – 52.
52. Deshpande V., Sivaraman H., Rao M., (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 1679 – 1684.
53. Spangler D. J., Emert G. H., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 115 – 118.
54. Szczodrak J., Targoński Z., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 31, 300 – 303.
55. Ghose T. K., Roychoudhury P. K., Ghosh P., (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 377 – 381.
56. Allen A. L., Andreotti R. E., (1982), *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 12, 451 – 459.

## Microbial production of ethanol from lignocellulosic wastes

### Summary

Current trends in the production of ethanol from lignocellulosics are reviewed. Particular emphasis is laid on the pretreatment of the lignocellulose materials and their simultaneous saccharification and fermentation to ethyl alcohol.

### **key words:**

lignocellulosics, bioconversions, ethyl alcohol, fermentation.

### *Adres dla korespondencji:*

Janusz Szczodrak, Zakład Mikrobiologii Stosowanej, Uniwersytet im. M. Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20 - 033 Lublin.