

Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva

DOI: 10.15255/KUI.2014.032
KUI-4/2016
Pregledni rad
Prispjelo 27. listopada 2014.
Prihvaćeno 15. travnja 2015.

M. Ivančić Šantek,* E. Miškulin, S. Beluhan i B. Šantek

Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb

|| Sažetak

Povećanje emisije stakleničkih plinova, energetska ovisnost i nestabilnost isporuke energenata posljedica su ubrzane potrošnje fosilnih goriva zbog ubrzanog rasta svjetske populacije i industrijalizacije. Bioetanol je postao atraktivno zamjensko biogorivo jer se proizvodi iz obnovljivih sirovina i ekološki je prihvatljiv. Upotrebljava se kao pogonsko gorivo i to kao hidrirani (96 %) ili bezvodni (u mješavinama s benzinom). Bioetanol se proizvodi fermentacijom s kvascem *S. cerevisiae* ili nekim drugim mikroorganizmom iz ugljikohidrata kao što su jednostavni šećeri, škrob i celuloza. Nakon fermentacije, bioetanol se izdvaja i pročišćava destilacijom i dehidracijom. Sastav je propisan specifikacijama za primjenu u motornim gorivima. Uobičajeni usjevi, kao što su kukuruz, šećerna repa i trska, zasad su osnovne sirovine za proizvodnju bioetanola. Međutim, proizvodnja bioetanola iz ovih sirovina ne može zadovoljiti globalne potrebe za bioetanolom, zbog njihove primarne uloge u prehrani ljudi i životinja. Lignoceluloza je pogodna sirovina za proizvodnju bioetanola jer je široko rasprostranjena, obnovljiva i ne upotrebljava se u prehrani. Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je složen proces, koji se u mnogim aspektima razlikuje od proizvodnje iz šećernih ili škrobnih sirovina.

U ovom radu prikazane su dosadašnje i nove tehnologije u proizvodnji bioetanola uključujući primjenu različitih sirovina, postupaka proizvodnje i radnih mikroorganizama. Nadalje, navedene su mogućnosti integracije osnovnih koraka u bioprocima proizvodnje s ciljem povećanja produktivnosti i smanjenja troškova proizvodnje.

|| Ključne riječi

Bioetanol, sirovine, fermentacija, lignoceluloza, integrirani bioproceni sustavi

Proizvodnja bioetanola

Uvod

Značajan porast potrošnje neobnovljivih izvora energije (nafta, ugljen i prirodni plin) zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva uzrokuje brže iscrpljivanje njihovih zaliha i povećanje emisije stakleničkih plinova. Nestabilna cijena goriva i petrokemijskih sirovina, te potreba za sigurnijom dobavom energije pridonijeli su povećanju proizvodnje alternativnih goriva, tzv. biogoriva. Biogoriva se dobivaju preradom obnovljivih izvora energije, biomase. Biomasa je organska tvar biljnog ili životinjskog podrijetla (npr. poljoprivredni ostaci, drvo, komunalni otpad, aktivni mulj i slično). Biomasa se upotrebljava u kućanstvima za grijanje i kuhanje, proizvodnju električne energije i topline, te sve više u proizvodnji biogoriva: etanola, metanola, biodizela, Fischer-Tropschova dizela, vodika i metana.^{1,2} Svjetska proizvodnja biogoriva se od 1980. do 2013. godine povećala s 4,4 na 88,6 milijardi litara.³ Prema nekim predviđanjima godišnja proizvodnja bioetanola na svjetskoj razini do 2020. godine mogla bi premašiti 125 milijardi litara.⁴ Tekuća biogoriva dijele se prema vrsti sirovine iz koje se proizvode. U biogoriva prve generacije ubrajaju se goriva proizvedena iz škrobnih i šećernih sirovina, biljnih ulja i masti životinjskog podrijetla. Najpoznatije gorivo prve generacije, bioetanol, najčešće se proizvodi iz šećerne trske ili repe i kukuruza. Biodizel prve generacije proizvodi

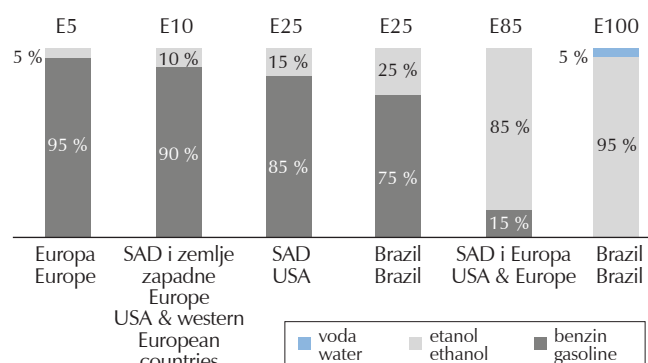
se transesterifikacijom biljnih ulja, uljane repice, otpadnih ulja i masti životinjskog podrijetla. Međutim, sirovine za proizvodnju goriva prve generacije rabe se i u proizvodnji hrane i krmiva, što značajno utječe na cijenu, a time i na porast troškova proizvodnje. Druga generacija goriva proizvodi se iz lignocelulozne biomase kao što su poljoprivredni ostaci (npr. pšenična ili ječmena slama, kukuruzni oklasak), ostaci drveno-prerađivačke industrije i slično. U odnosu na sirovine za proizvodnju goriva prve generacije, lignocelulozne sirovine su znatno jeftinije, te se ne rabe u prehrani ljudi i stoke. U biogoriva druge generacije spadaju etanol, butanol, biodizel, Fisher-Tropschov dizel poboljšanih svojstava, dimetil-eter i slično. Biogoriva treće generacije dobivaju se iz mikroorganizama i mikroalgi.¹

Bioetanol

Bioetanol se proizvodi fermentacijom sirovine, a primjenjuje se kao pogonsko gorivo u smjesi s benzinom ili čist (slika 1). U smjesama s benzinom upotrebljava se bezvodni etanol minimalne čistoće od 99,5 – 99,8 % (φ). Udjel etanola u smjesi s benzinom iznosi od 5 do 85 % (naziv goriva E5-E85). Smjesa 85 % etanola i 15 % benzina (E85) upotrebljava se samo u SAD-u i nekoliko europskih država, najviše u Švedskoj. U Brazilu se kao pogonsko gorivo upotrebljava etanol koji sadrži oko 5 % vode (E100). U Hrvatskoj etanol se dodaje u gorivo kao oksigenatni aditiv, a maksimalni dopušteni obujamski udjel iznosi 5 %.⁶ Smjese s manjim udjelom etanola mogu se primijeniti u većini

* Autor za dopisivanje: Izv. prof. dr. sc. Mirela Ivančić Šantek
e-pošta: mivancisantek@pbf.hr

suvremenih automobila pogonjenih benzinom, dok smjese s više od 20 % (φ) etanola zahtijevaju preinake na motoru. Na tržištu se također nalaze i tzv. *flexy-fuel* automobili koji se koriste gorivom s većim obujamskim udjelom etanola (npr. E85). Osim u smjesama s benzinom, bioetanol se upotrebljava i u proizvodnji *tert*-butil-metil-etera, koji se dodaje benzinu do 15 % (φ).



Slika 1 – Sastav mješavina etanola i benzina⁵

Fig. 1 – Composition of blended gasoline⁵

Fizikalno-kemijske karakteristike etanola i benzina značajno su različite (tablica 1). U odnosu na benzin, etanol ima veću oktansku vrijednost i mnogo je korozivniji. Molekula etanola sadrži kisik, što omogućava potpunije sagorijevanje ugljikovodika, smanjenje emisije stakleničkih plinova, ugljikova monoksida i dušikovih oksida (NO_x) te toksičnih aromatskih spojeva. Dodatak etanola benzinu utječe na oktanski broj, sadržaj kisika, hlapljivost i topljivost u vodi. Dodatkom 10 % (φ) etanola benzinu povećava se oktanski broj goriva za 3 – 4. Temperatura paljenja i latentna toplota isparavanja etanola znatno su veće nego za benzin, zbog čega alkoholna goriva slabije isparavaju, što uzrokuje probleme pri pokretanju vozila pri niskim temperaturama. Dodatak etanola benzinu utječe na odvajanje vode u gori-

vu.⁷ Etanol se sve češće dodaje i kao oksigenantni aditiv za poboljšanje oktanskog broja benzinskim gorivima umjesto toksičnog *tert*-butil-metil-etera.⁸

Tablica 1 – Usporedba svojstava etanola i benzina⁷

Table 1 – Comparison between characteristics of ethanol and gasoline⁷

Svojstva Characteristics	Etanol Ethanol	Benzin Gasoline
kemijski sastav chemical composition	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	ugljikovodici hydrocarbons $\text{C}_4 - \text{C}_{12}$
molarna masa/g mol ⁻¹ molecular weight/g mol ⁻¹	46,07	100 – 105
oktanski broj octane number	108	88 – 100
gustoća/kg dm ⁻³ density/kg dm ⁻³	0,79	0,69 – 0,79
donja ogrijevna vrijednost/10 ³ kJ dm ⁻³ lower heating value/10 ³ kJ dm ⁻³	21,1	30 – 33
vrelište/°C boiling point/°C	78	27 – 225
plamište/°C flash point/°C	13	–43
latentna toplota isparavanja/kJ kg ⁻¹ latent heat of vaporization/kJ kg ⁻¹	854	289
topljivost u vodi water solubility	topljiv soluble	netopljiv insoluble

Oko 90 % etanola proizvodi se u Sjedinjenim Američkim Državama i Brazilu (tablica 2). Prema predviđanjima Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) do 2022. godine proizvodnja etanola povećat će se za 70 % u odnosu na njezinu prosječnu vrijednost 2010. – 2012. godine i iznositi će oko 168 milijardi litara.¹⁰ Iako je proi-

Tablica 2 – Svjetska proizvodnja bioetanola u milijunima litara⁹

Table 2 – World ethanol fuel production in million liters⁹

Year	Svjetska proizvodnja bioetanola u milijunima litara World Ethanol Fuel Production in million litres						
	2006.	2007.	2008.	2009.	2010.	2011.	2012.
Europa Europe	1 627	1 882	2 855	3 645	4 254	4 429	4 973
Afrika Africa	0	55	65	100	130	150	235
Sjeverna i srednja Amerika North and Central America	18 716	25 271	35 946	42 141	51 584	54 765	54 580
Južna Amerika South America	16 969	20 275	24 456	24 275	25 964	21 637	21 335
Azija/Pacifik Asia/Pacific	1 940	2 142	2 753	2 927	3 114	3 520	3 965
Svijet World	39 252	49 625	66 075	73 088	85 047	84 501	85 885

zvodnja etanola rasla tijekom zadnjih desetak godina, zbog sve češćih vremenskih nepogoda dolazi do njezinog usporavanja. Tako je izvoz etanola iz Brazila posljednjih godina značajno smanjen. Proizvodnja etanola u Europskoj uniji 2011. godine iznosila je 4,4 milijarde litara, što predstavlja približno 5 % svjetske proizvodnje. Kina proizvodi oko 2 milijarde litara.^{9,11} Najveći izvoznik bioetanola do 2011. godine bio je Brazil, nakon čega su Sjedinjene Američke Države preuzele vodeću ulogu. Proizvodnja bioetanola značajno je utjecala na cijenu žitarica posebice u SAD-u, gdje je oko 40 % uroda kukuruza 2011. godine utrošeno za proizvodnju etanola.¹² U Europskoj uniji 2008. godine samo je 2,6 % uroda žitarica (najviše pšenice) utrošeno na proizvodnju etanola, što nije utjecalo na cijenu žitarica.^{10,13} Unatoč optimističnim najavama, u Hrvatskoj još nije pokrenuta industrijska proizvodnja bioetanola.

Sirovine za proizvodnju bioetanola

Sirovine za proizvodnju etanola prema kemijskom sastavu podijeljene su u tri osnovne skupine: (1) šećerne sirovine (šećerna trska i repa, sirak, sirutka, melasa itd.), (2) škrobne sirovine (kukuruz, pšenica, ječam, riža, krumpir, korijen kasave itd.) i (3) lignocelulozne sirovine (drvo, ostaci prerađivanja drveta, komunalni otpad, poljoprivredni ostaci itd.). Postupak proizvodnje etanola ovisi o vrsti sirovine. Prvi korak u proizvodnji etanola iz škrobnih i lignoceluloznih sirovina je hidroliza kompleksnih ugljikohidrata na jednostavne šećere. U idućem koraku jednostavni šećeri fermentiraju u etanol uz pomoć radnog mikroorganizma, najčešće kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Sirovine koje pretežno sadržavaju jednostavne šećere nakon mehaničkog usitnjavanja izravno fermentiraju u etanol. Tekuće sirovine poput sirutke, sok šećerne repe ili melasa upotrebljavaju se za fermentaciju bez prethodne obrade. Nakon završene fermentacije nastali proizvod izdvaja se iz podloge i pročišćava, najčešće destilacijom-rektifikacijom i dehidracijom.^{14,15}

Proizvodnja bioetanola s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasac *S. cerevisiae* najčešće se primjenjuje u komercijalnoj proizvodnji zbog visokog prinosa etanola ($\approx 0,45 - 0,50$ grama etanola po gramu glukoze), visoke produktivnosti ($2 - 5 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$), sposobnosti rasta pri visokim koncentracijama šećera i etanola. Nadalje, kvasac *S. cerevisiae* ima status GRAS (eng. *Generally Recognized as Safe*) što značajno pojednostavljuje proces proizvodnje. Kvasac može rasti na glukozi, fruktozi, saharozi i maltozi, ali ne i na pentozama (šećeri s pet ugljikovih atoma kao npr. ksiloza). Osnovni put razgradnje glukoze u stanicama kvasca *S. cerevisiae* odvija se glikolizom (tzv. Embden-Meyerhof-Parnasov put). Pritom iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule piruvata.¹⁵ Piruvat se u anaerobnim uvjetima dekarboksilira djelovanjem enzima piruvat-dekarboksilaze, pri čemu nastaje acetaldehid. Acetaldehid se reducira u etanol djelovanjem alkohol-dehidrogenaze uz oksidaciju koenzima nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH) u NAD^+ . Razgradnjom glukoze u glikolitičkom putu nastaju dvije molekule adenozin-trifosfata (ATP), koji je važan nositelj kemijske energije u živim organizmima. Kontinuirano trošenje

ATP-a za rast i održavanje stanice omogućava nesmetano odvijanje glikolitičkog puta.¹⁶ Teorijski prinos etanola po gramu glukoze iznosi 0,51 g, pri čemu nastaje i 0,49 g CO_2 .

Osim etanola i CO_2 tijekom alkoholne fermentacije nastaju različiti nusprodukti metabolizma kao što su glicerol, organske kiseline i viši alkoholi. Glavni nusprodukt fermentacije je glicerol za čiju sintezu se utroši do 4 % šećera u podlozi. Glicerol ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji osmotskog tlaka u stanici kvasca.¹⁷ Koncentracija ostalih nusproizvoda metabolizma znatno je manja.

Iako je alkoholna fermentacija prirodno zaštićen proces, kontaminacija stranim mikroorganizmima, najčešće bakterijama mliječne kiseline, divljim kvascima i bakterijama octene kiseline značajno smanjuju prinos etanola, te inhibira rast kvasca.¹⁹ Zbog utroška energije i trajanja procesa sterilizacije podloge koja prethodi fermentaciji, proizvodnja etanola u velikom mjerilu često se provodi u nestabilnim uvjetima. Rast kontaminanata suzbija se dodatkom antibiotika ili kemijskih tvari za dezinfekciju (kiseline, vodikov peroksid, sulfit, karbamid peroksid, amonijak itd.). U proizvodnji bioetanola najučinkovitijima su se pokazali antibiotici: penicilin (inhibicija sinteze stanične stijenke) i virginiamicin (inhibira sintezu proteina).^{19,20}

Tijekom fermentacije, stanica kvasca izložena je nizu negativnih utjecaja: nedostatku pojedinih nutrijenata u podlozi, visokom osmotskom tlaku (visoka koncentracija šećera), niskom pH ($< 3,5$), visokoj temperaturi te povećanoj koncentraciji inhibitora rasta, etanola i proizvoda metabolizma mikroorganizma kontaminanata (npr. mliječna i octena kiselina). Obujamski udjel etanola na kraju uzgoja najčešće iznosi 8 – 12 % (ϕ). Visoka koncentracija etanola utječe na sastav stanične membrane, smanjuje metaboličku aktivnost stanice, inhibira transport glukoze i rast stanice, te inhibira nastajanje produkta.²¹ Negativan učinak etanola dodatno pojačavaju visoka temperatura i nizak pH. Zbog sinergističkog učinka nekih od navedenih čimbenika stresa, negativan učinak na stanicu je daleko veći, što ima za posljedicu smanjenje preživljavanja stanica, smanjenu metaboličku aktivnost i sniženi prinos etanola.²² Iako kvasac *S. cerevisiae* može rasti u anaerobnim uvjetima, male količine kisika potrebne su za sintezu masnih kiselina i sterola. Potrebna količina kisika za rast može se osigurati dodatkom tvari poput karbamid peroksida kojim se stanica koristi kao izvorom dušika za rast, a ujedno ima i antiseptičko djelovanje (laktobacili). Dovoljna količina kisika može se osigurati i aeracijom podloge na početku fermentacije kao i kod proizvodnje piva.^{23,24}

U proizvodnji etanola istražena je mogućnost primjene niza drugih mikroorganizama kao što su *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Mucor indicus* itd.²³ Međutim još uvijek nije pronađena zadovoljavajuća alternativa kvascu *S. cerevisiae*.

Proizvodnja bioetanola iz šećernih sirovina

Šećerna trska i repa najčešće su upotrebljavane sirovine u proizvodnji bioetanola koje sadrže jednostavne šećere.²⁶ Šećerna trska je tropska i suptropska biljka, a upotrebljava

se u proizvodnji etanola u Brazilu, Indiji i Kolumbiji. Vode-
nom ekstrakcijom šećera iz prethodno usitnjene šećerne
trske dobiva se rijetki sok koji se upotrebljava u proizvodnji
etanola. Također se upotrebljavaju i nusproizvodi u pro-
izvodnji šećera, rijetki sok s $w = 15\%$ i melasa. Melasa
šećerne trske sadrži 45 – 60 % saharoze i 5 – 20 % gluko-
ze i fruktoze. U Europi je sve više zastupljena proizvodnja
etanola iz šećerne repe. Osim rijetkog soka šećerne repe
($w_{\text{šećer}} = 14 - 18\%$) u proizvodnji se upotrebljava i mela-
sa. Melasa šećerne repe sadrži malo reducirajućih šećera
($w = 0,5 - 4\%$) i 46 – 52 % (w) saharoze. Sirovi rezanci
šećerne repe također se mogu upotrebljavati za alkoholnu
fermentaciju.²⁷ Sok šećerne trske i melasa sadrže većinu
potrebnih nutrijenata i minerala potrebnih za rast kvasca.²⁸

Tablica 3 – Karakteristike proizvodnje etanola iz melase šećerne
trske s kvascem *S. cerevisiae*²⁹

Table 3 – Characteristics of ethanol production from sugarcane
mollases using yeast *S. cerevisiae*²⁹

Postupak proizvodnje Production process	Koncentracija etanola / g l ⁻¹ Ethanol concentration / g l ⁻¹	Produktivnost / g l ⁻¹ h ⁻¹ Productivity/ g l ⁻¹ h ⁻¹	Učinkovitost /% Efficiency / %
šaržni batch	80 – 100	1 – 3	85 – 90
šaržni s pritokom fed-batch	53,7 – 98,1	9 – 31	73,2 – 89,0
polukontinuirani repeated batch	89,3 – 92,0	2,7 – 5,25	79,5 – 81,7
kontinuirani continuous	70 – 80	7 – 8	–

U proizvodnji etanola iz jednostavnih šećera najčešće se
upotrebljava kvasac *S. cerevisiae*. Po završetku fermentaci-
je, biomasa kvasca se izdvaja centrifugiranjem, dezinficira
dodatkom sumporne kiseline ($\text{pH} = 2,0 - 2,5$), te se po-
novno upotrebljava u idućoj fermentaciji (Melle-Boinotov
proces). Sadržaj šećera na početku šaržnog procesa najče-
šće iznosi od 14 – 22 % (w). Višekratnom upotrebom kva-
šćeve biomase smanjuje se trošak za uzgoj inokuluma, te
se povećava produktivnost procesa (tablica 3).^{28,30,31,32} Na-
kon višekratne uporabe, zbog izloženosti nizu negativnih
čimbenika, kvašćevim stanicama smanjuju se aktivnost i
potrebne fermentacijske karakteristike, te se smanjuje broj
živih stanica u populaciji kvasca.

U Brazilu se najčešće primjenjuje Melle-Boinotov šaržni
postupak s pritokom supstrata (70 – 80 %). Kapacitet pogona
iznosi 400 – 2000 m³ etanola na dan. Zbog niske kon-
centracije šećera koja se održava tijekom šaržnog uzgoja,
s pritokom supstrata rast stanica kvasca nije inhibiran sup-
stratom. Povećanjem koncentracije inokuluma (10 – 14 %
vlažne biomase kvasca po obujmu podloge) smanjuje se
trajanje fermentacije na 6 – 10 h, pri čemu nastaje i do
11 % (φ) etanola što odgovara 91 % teorijskog prinosa eta-
nola.³³

Karakteristike kontinuiranog Melle-Boinotovog procesa je
visoka produktivnost (oko 7,9 g l⁻¹ h⁻¹), visoka prilagodlji-
vost i stabilnost procesa, mala potreba za dodatnim tvari-
ma rasta, te niža cijena proizvodnje etanola u usporedbi sa
šaržnim procesom. Kontinuirana proizvodnja provodi se u
više bioreaktora u nizu, najčešće 4 – 5 bioreaktora različi-
tih obujama. Prvi bioreaktor prihranjuje se sa supstratom
pomiješanim s ugušćenom kvašćevom biomasom izdvoje-
nom iz posljednjeg bioreaktora u nizu. Unatoč prednosti-
ma kontinuirani način proizvodnje u velikom mjerilu rijet-
ko je zastupljen u komercijalnoj proizvodnji etanola.³²

Troškovi izdvajanja kvašćeve biomase mogu se značajno
smanjiti imobilizacijom stanica kvasca. Naime, centrifugal-
ni separatori za izdvajanje kvašćeve biomase mogu se zami-
jeniti sa znatno jeftinijim taložnicima. Imobilizacija stanica
kvasca u gel kalcijeva alginata pokazala se neuspješnom u
velikom mjerilu. Poznato je da je nastajanje etanola veza-
no uz rast stanice. Međutim, rast stanica unutar gela ogra-
ničen je raspoloživim prostorom, zbog čega stanice presta-
ju rasti. Brzina sinteze etanola u stanicama koje ne rastu
manja je preko 30 puta u odnosu na stanice koje rastu. Ra-
zlog sporog rasta stanica nakupljanje je ATP-a koji inhibira
fosfofruktokinazu, jedan od ključnih regulacijskih enzima
glikolitičkog puta. Znatno učinkovitijom pokazala se imo-
bilizacija stanica adsorpcijom. Naime, stanice neometano
rastu na površini nosača stvarajući biofilm. Stanice koje ras-
tu u obliku biofilma otpornije su na visoke koncentracije
etanola u podlozi, što je posebno važno kod fermentacija
s visokom ili vrlo visokom koncentracijom šećera. Slično je
uočeno i kod "prirodne" imobilizacije kvasca, flokulacije.
Flokulacija stanica je reverzibilan proces tijekom kojeg se
stanice flokulentnog soja kvasca "lijepo" jedna za drugu
stvarajući flokulu. U jednoj flokuli može biti i do nekoliko
tisuća stanica.¹⁶ Flokulacija kvasca detaljno je istražena u
proizvodnji piva za koju je konstruiran niz različitih tipova
bioreaktora koji bi se mogli primijeniti i u proizvodnji
bioetanola.³⁴ Nakon šaržnog procesa, flokule kvasca talo-
že se na dnu bioreaktora, a prevrela komina se dekantira.
Biomasi kvasca u bioreaktoru dodaje se svježa podloga,
te započinje iduća fermentacija. Primjenom imobilizira-
nih stanica u kontinuiranom procesu proizvodnje etanola
postiže se velika koncentracija stanica u bioreaktoru te se
omogućava vođenje procesa pri većim brzinama razrjeđe-
nja uz postizanje velike produktivnosti bioprocesa.^{34,35,36}
Istražena je mogućnost proizvodnje etanola s flokulentnim
sojevima kvasca u bioreaktorima različitih konstrukcijskih
karakteristika: barbotirajuća kolona,^{37,38,39,40} kolona s nepo-
kretnim slojem flokula kvasca i odbijačem u gornjem dijelu
kolone za odvajanje CO₂,^{41,42} dva bioreaktora s miješalom
i taložnjakom⁴³ ili bez taložnjaka⁴¹ povezanih u seriju, bar-
botirajuća kolona s odbijačima za izdvajanje CO₂⁴⁵ ili sa
separacijskim tankom za CO₂.⁴⁶ Usprkos relativno velikoj
produktivnosti bioprocesa, ovi bioreaktori još uvijek nisu
primijenjeni u komercijalnoj proizvodnji etanola.

Značajne uštede u procesu proizvodnje mogu se postići
smanjenjem utroška energije za izdvajanje i pročišćavanje
etanola ako se koncentracija etanola u prevreloj podlozi
poveća. Fermentacijom podloge s veoma visokim sadržaj-
em šećera (iznad 250 g l⁻¹) uz pomoć kvasca *S. cerevisiae*
postižu se obujamski udjeli etanola iznad 15 % (φ).^{47,48}

Proizvodnja bioetanola iz škrobnih sirovina

U zemljama Sjeverne Amerike i Europe škrobne sirovine, kukuruz i pšenica, najčešće se upotrebljavaju u proizvodnji bioetanola. Škrob se nalazi u endospermu zrna kemijski vezan za gluten u obliku škrobnih zrnca. Oko 70 % suhe tvari zrna kukuruza čini škrob, dok ostatak otpada na proteine, vlakna, mast i ulje.⁴⁹ Škrob je polimer D-glukoze, te se sastoji od oko 30 % dugih ravnolančanih molekula amiloze spiralno uvijenih u obliku heliksa i približno 70 % razgranatih molekula amilopektina. Molekula amiloze sadrži 25 do 1000 glukoznih jedinica povezanih $\alpha(1\rightarrow4)$ -glikozidnom vezom u dugačke ravne lance. Molekula amilopektina građena je od oko 3000 glukoznih jedinica povezanih $\alpha(1,4)$ -glikozidnom vezom, a na mjestu grananja glukozne jedinice su međusobno povezane $\alpha(1,6)$ -glikozidnim vezama.⁵⁰

U proizvodnji etanola iz kukuruza najčešće se primjenjuju dva tipa procesa koji se razlikuju u načinu obrade zrna kojom se neposredno prije enzimske hidrolize oslobađa škrob. U prvom procesu suho zrno kukuruza melje se u grubo brašno ili kukuruznu krupicu (suho mljevenje). U drugom postupku (tzv. vlažno mljevenje) zrno kukuruza prvo se namače u razrijeđenoj otopini sumporne kiseline, usitnjava, a potom se izdvajaju pojedini sastojci zrna (škrob, klica, vlakna i proteini), od kojih se samo škrob upotrebljava u proizvodnji etanola. Zbog nižih kapitalnih troškova u proizvodnji etanola prevladava proces sa suhim mljevenjem zrna. Tijekom 2006. godine u SAD-u 82 % kukuruza obrađeno je postupkom suhog mljevenja.⁵¹ Prinos etanola po kilogramu kukuruza primjenom suhog postupka mljevenja iznosi 0,41 l, a u postupku vlažnog mljevenja nešto je manji i iznosi 0,37 l.⁵²

Neposredno prije fermentacije potrebno je hidrolizirati škrob na jednostavne šećere, glukozu i maltozu, koje kvasac *S. cerevisiae* može asimilirati. Škrob se može hidrolizirati dodatkom kiseline ili uz pomoć enzima, α -amilaze i glukoamilaze. U proizvodnji etanola najčešće se primjenjuje enzimska hidroliza škroba zbog specifičnosti enzima, blagih uvjeta hidrolize, bez nastajanja toksičnih nusproizvoda za kvasac. Enzim α -amilaza (EC 3.2.1.1) je endohidrolaza koja cijepa unutarnju α -D-1,4-glikozidnu vezu. Glukoamilaza (EC 3.2.1.3) hidrolizira krajnju α -D-(1,4)-glikozidnu vezu s nereducirajućeg kraja lanca i α -D-(1,6)-vezu na mjestu grananja, pa može potpuno razgraditi amilopektin do glukoze. Za proizvodnju α -amilaze upotrebljavaju se bakterija *Bacillus licheniformis* i genetički modificirani sojevi bakterija *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis*. Glukoamilaze proizvodi plijesan *Aspergillus niger* i plijesni roda *Rhizopus*.^{53,54}

Kukuruzna krupica miješa se s vodom u omjeru 1 : 2,5–3, te se doda α -amilaza i suspenzija zagrijava na temperaturu iznad 100 °C. Kuhanjem suspenzije, zrnca škroba primaju vodu, brzo bubre i pucaju. Oslobođen škrob formira viskoznu suspenziju koja se naziva škrobni lijepak, a postupak se naziva klajsterizacija. Molekule škroba postaju dostupne djelovanju α -amilaze koja ih djelomično hidrolizira na kraće lance dekstrine (oligosaharide sa 6–7 glukoznih jedinica) smanjujući postupno viskoznoću podloge (likvefakcija). U idućem koraku dekstrini se hidroliziraju do glukoze u postupku saharifikacije (ošećerenje) uz dodatak enzima glukoamilaze (EC 3.2.1.3) pri temperaturi 65 °C.⁵⁰

U podlogu se kao izvor dušika dodaje amonijev sulfat ili urea. Kvasac *S. cerevisiae* kao izvor dušika koristi se i aminokiselinama koje nastaju hidrolizom proteina iz kukuruza uz dodatak proteaza. Šaržni proces traje 48–72 sata, a koncentracija etanola na kraju procesa iznosi 10–12 % (ϕ). Tijekom fermentacije pH pada ispod 4, što smanjuje mogućnost bakterijske kontaminacije. Kontinuirani način proizvodnje etanola u SAD-u primjenjuje se u 27 % pogona sa suhim postupkom mljevenja zrna, koji proizvode više od 400 m³ etanola na dan.⁵⁵ U kontinuiranom postupku proizvodnje etanola često se upotrebljava više bioreaktora povezanih u seriju (kaskadni). U Kini je 2005. pokrenuta kontinuirana proizvodnja etanola s flokulentnim sojem kvasca *S. cerevisiae*. Proizvodnja se odvija u 6 bioreaktora, korisnog obujma 1000 m³, povezanih u seriju. Prvi bioreaktor prihranjuje se hidrolizatom kukuruzne krupice u kojoj je koncentracija šećera između 200 i 220 g l⁻¹. Brzina razrijeđenja iznosi 0,05 h⁻¹, a obujamski udjel etanola u izlaznom toku iz posljednjeg bioreaktora iznosi 11–12 %. U gornjem dijelu bioreaktora nalaze se odbijači koji omogućavaju učinkovitije zadržavanje flokula kvasca čija koncentracija iznosi 40–60 g l⁻¹.¹⁶

Fermentacija škrobne sirovine može se provoditi nakon ošećerenja (eng. *Separate Hydrolysis and Fermentation*, SHF) ili istodobno (simultano) s ošećerenjem (eng. *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF). U procesu u kojem se provodi istodobno ošećerenje sirovine i fermentacija, koncentracija supstrata je relativno mala, jer se glukoza i maltoza nastale hidrolizom škroba odmah troše za rast stanica kvasca.¹⁶ Zbog male koncentracije jednostavnih šećera ne dolazi do inhibicije amilaza i stanica kvasca, te se povećava produktivnost bioprocesa. Nadalje, prednosti postupka simultanog ošećerenja i fermentacije su smanjena mogućnost kontaminacije, smanjenje osmotskog tlaka podloge i bolja energetska učinkovitost.⁵¹ Smanjenje troškova proizvodnje i povećanje prinosa postiže se postupkom istodobnog umnožavanja stanica kvasca, ošećerenja sirovine i fermentacije (eng. *Simultaneous Saccharification, Yeast Propagation and Fermentation*, SSYPF).⁵⁶

Enzimska hidroliza škroba znatno povećava troškove proizvodnje etanola. Primjenom mikroorganizma koji bi uz fermentacijska svojstva karakteristična za kvasac *S. cerevisiae* imao i zadovoljavajuću amilolitičku aktivnost postigle bi se uštede u proizvodnji. Takav mikroorganizam omogućio bi proizvodnju etanola iz škrobne sirovine u jednom bioreaktoru, u kojem bi se istodobno umnožavao mikroorganizam, proizvodili amilolitički enzimi i hidrolizirao škrob, te nastajao etanol. Ovaj postupak proizvodnje etanola naziva se konsolidirani bioprocenjski sustav (eng. *Consolidate Bioprocessing*, CBP) i njime bi se postigle najveće uštede u proizvodnji. Međutim još uvijek nije pronađen mikroorganizam pogodan za primjenu u ovom postupku proizvodnje. Primjenom genetičkog inženjerstva nastoje se konstruirati sojevi kvasca *S. cerevisiae* s velikom amilolitičkom aktivnošću. Koekspresija gena za α -amilazu i glukoamilazu iz plijesni (najčešće iz roda *Aspergillus*) u kvascu, omogućava stanicama rast na škrobnim sirovinama bez dodatka amilolitičkih enzima. Međutim, dosada ni jedan od brojnih genetički modificiranih sojeva kvasca *S. cerevisiae* nije primijenjen u industrijskoj proizvodnji etanola zbog vrlo niske produktivnosti bioprocesa.⁵⁷

Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Sastav lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozne sirovine najzastupljeniji su oblik biomase na Zemlji, koji je i najmanje iskorišten. U lignocelulozne sirovine spadaju poljoprivredni otpadci (stabljika, oklasak i komušina kukuruza, trava, bagasa šećerne trske), otpadci drvoprerađivačke industrije (piljevina i strugotine, otpadci papirne industrije), otpadci prehrambene industrije, energetski usjevi i komunalni otpadni papir.

Lignoceluloza iz biljaka sastoji se od tri polimera: celuloze ($C_6H_{10}O_5)_n$ (35 – 50 % suhe tvari), hemiceluloze ($C_5H_8O_4)_m$ (20 – 35 % suhe tvari) i lignina $C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0,9-1,7}_n$ (10 – 25 % suhe tvari). Celuloza je polisaharid sastavljen od glukoznih jedinica međusobno povezanih β -1,4-glikozidnom vezom u linearne lance. Molekule celuloze najčešće sadržavaju od 2000 do 20 000 glukoznih jedinica.^{55,58,59} Dugi paralelni lanci povezani su vodikovim i van der Waalsovima silama koje daju celulozi visok stupanj molekulske uređenosti. Agregirane molekule celuloze tvore mikrovlakna koja su međusobno povezana i tvore vlakna. Vlaknasta struktura i intermolekulske veze čine celulozu otpornom na mehaničko rastezanje, slabo topljivom u otapalima i otpornom na enzimsku hidrolizu s celulazama. Nativna celuloza pretežito je kristalna, a tek je manji dio amorfna. U odnosu na kristalna područja, amorfna područja su pogodna za kemijsku i enzimsku hidrolizu. Celulozna vlakna u stijenkama viših biljaka povezana su s ligninom i hemicelulozom dajući im čvrstoću.⁶⁰

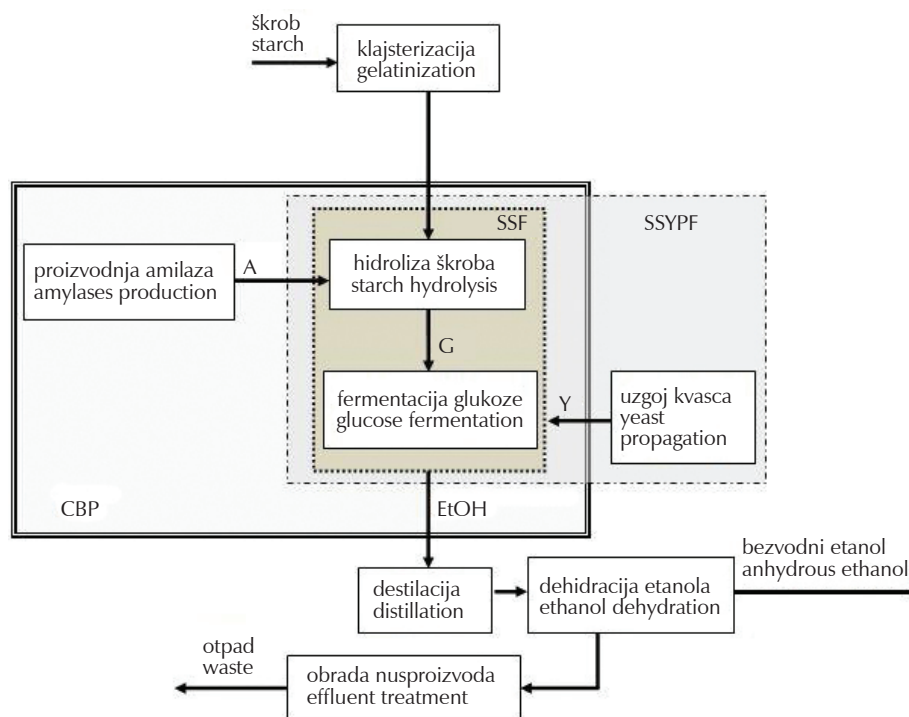
Hemiceluloza se sastoji od linearnih i razgranatih lanaca polimera sastavljenih od šećera pentozna (ksiloza i arabinosa), heksoza (pretežno manoze, glukoze i galaktoze) i šećernih kiselina (4-O-metil-galakturonska kiselina).⁵¹ Stupanj polimerizacije je 100 – 300. Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima amorfnu strukturu i lako se hidrolizira u razrijeđenim kiselinama i lužinama.

Lignin je makromolekulski polifenol složene građe i heterogenog sastava. Nalazi se u staničnoj stijenci biljaka vezan za celulozna vlakna u tzv. lignocelulozni kompleks. Vrlo je otporan na kemijsku i enzimsku razgradnju, ali je poput hemiceluloze potencijalno zanimljiva biotehnoška sirovina.⁵⁵

Proizvodnja bioetanola iz lignoceluloznih sirovina

Etanol proizveden iz lignocelulozne biomase spada u drugu generaciju biogoriva. Zbog složenosti procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozne sirovine cijena gotovog proizvoda još je uvijek veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, šećerne repe ili kukuruza. Međutim, zbog rasta cijena sirovina koje se upotrebljavaju i u proizvodnji hrane i krmiva poput kukuruza, pšenice i šećerne trske upravo lignocelulozna biomasa postaje sve važnija sirovina.

Proces proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina provodi se u pet osnovnih stupnjeva: prethodna obrada sirovine (1), hidroliza celuloze (2), fermentacija heksoza (3), izdvajanje (4) i obrada nusproizvoda (5) (slika 2). Šeće-



Slika 2 – Proizvodnja bioetanola iz škrobne biomase: SSF – istodobna saharifikacija i fermentacija; SSYPF – istodobna saharifikacija, uzgoj kvasca i fermentacija; CBP – konsolidirani bioproceni sustav; A – amilaze; G – glukoza; Y – kvasac; EtOH – etanol²⁶

Fig. 2 – Fuel ethanol production from starchy materials: SSF – simultaneous saccharification and fermentation; SSYPF – simultaneous saccharification, yeast propagation and fermentation; CBP – consolidated bioprocessing.; A – amylases; G – glucose; Y – yeast; EtOH – ethanol²⁶

ri pentoze u tekućoj fazi dobiveni postupkom prethodne obrade mogu zasebno fermentirati u bioetanol. Prema potrebi može se i provesti uklanjanje inhibitora rasta iz ligno-celuloznog hidrolizata.

(1) Prethodna obrada lignocelulozne sirovine

Prethodnom obradom lignocelulozne sirovine uklanja se lignin, djelomično ili potpuno hidrolizira hemiceluloza, dok se celuloza prevodi iz kristalnog u amorfni oblik pogodan za enzimsku hidrolizu.²⁶ Tijekom posljednjih godina razvijen je velik broj postupaka koji se primjenjuju u prethodnoj obradi lignocelulozne sirovine: fizikalni (mehaničko usitnjavanje, piroliza), fizikalno-kemijski (autohidroliza, eksplozija vlakana s amonijakom, CO₂ ili parom), kemijski (ozonoliza, kiselinska hidroliza, alkalna hidroliza, ekstrakcija otapalima, oksidativna delignifikacija) i biološki (mikroorganizmi i enzimi).⁶² Međutim neke od navedenih metoda još uvijek nisu ekonomski isplative ili tehnički izvedive u velikom mjerilu.

Izbor postupka predobrade ovisi o sastavu sirovine i nusproduktima koji nastaju određenim postupkom. Postupak prethodne obrade neposredno utječe na sve korake koji slijede u procesu proizvodnje bioetanolat tj. enzimsku hidrolizu, fermentaciju, izdvajanje i pročišćavanje proizvoda, obradu otpadnih voda te na utrošak energije za miješanje i energije u procesu izdvajanja i pročišćavanja proizvoda.⁶² Tijekom prethodne obrade sirovine nastaje niz kemijskih spojeva koji inhibiraju rast mikroorganizma kao što su octena kiselina, produkti razgradnje lignina i furfural.

Proces predobrade često uključuje i detoksikaciju hidrolizata s ciljem uklanjanja inhibitora rasta. Naime tijekom hidrolize lignoceluloze s kiselinama nastaje niz nusprodukata koji inhibiraju rast radnog mikroorganizma i smanjuju prinos etanola i produktivnost procesa. Inhibitori rasta po kemijskom sastavu su fenolni spojevi, alifatske kiseline, furanski aldehidi i anorganski ioni. Vrsta i koncentracija inhibitora ovisi o vrsti lignocelulozne sirovine i postupku hidrolize. Najzastupljeniji furanski aldehidi su furfural i 5-hidroksimetilfurfural koji nastaju razgradnjom šećera. Furfural nastaje dehidracijom pentozama, dok 5-hidroksimetilfurfural dehidracijom heksoza. Razgradnjom lignina nastaju fenolni spojevi od kojih su najzastupljeniji vanilin, dihidrokoniferil-alkohol, koniferil-aldehid, hidrokinon, acetogvajakon, homovanilinska kiselina, 4-hidroksibenzojeva kiselina. Octena, mravlja i levulinska kiselina najzastupljenije su alifatske kiseline u lignoceluloznim hidrolizatima, a nastaju iz polisaharida ili razgradnih produkata tijekom postupka kiselinske hidrolize. Tako octena kiselina nastaje deaciliranjem hemiceluloze, mravlja kiselina razgradnjom 5-hidroksimetilfurfurala, a levulinska razgradnjom furfurala i 5-hidroksimetilfurfurala.^{64,65}

(2) Hidroliza celuloze

Hidroliza celuloze do glukoze provodi se najčešće s kiselinama ili celulazama. Skupinu celulaza čine tri vrste enzima: endoglukanaze ili 1,4-β-D-glukan-4-glukanohidrolaze (EC 3.2.1.4), egzonukleaze koje uključuju 1,4-β-D-glukan-glukanohidrolaze (celodekstrinaze) (EC 3.2.1.74) i

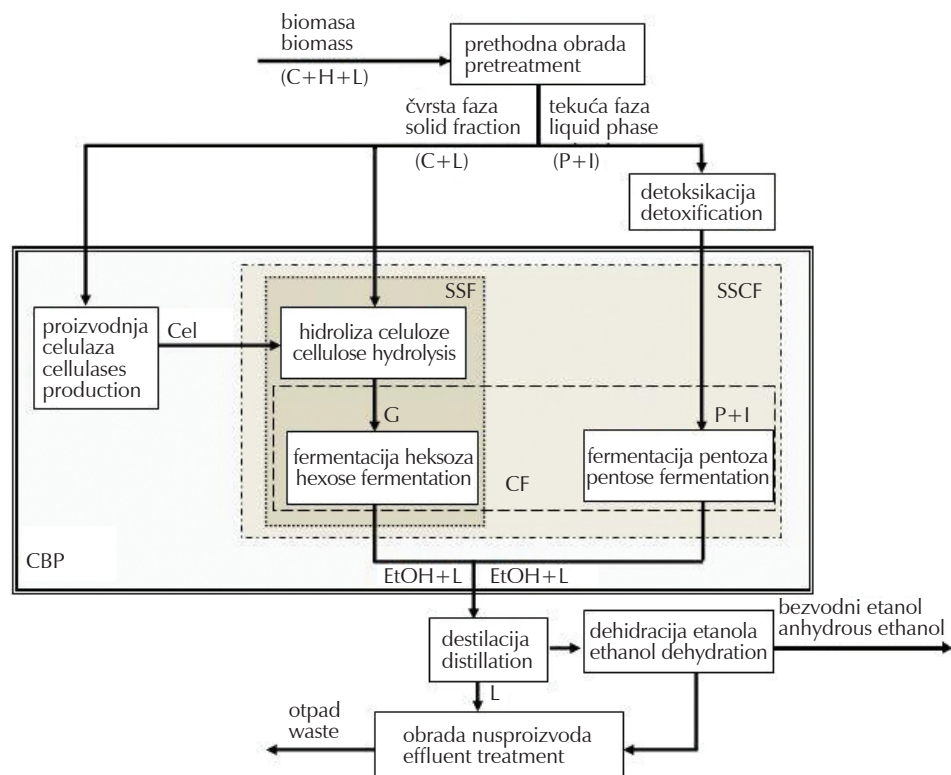
1,4-β-D-glukan-celobiohidrolaze (celobiohidrolaze, EC 3.2.1.91) i β-glukozidaza (EC 3.2.1.21).⁶⁷ Endoglukanaze nasumično cijepaju amorfnu područja celuloznog lanca oslobađajući oligosaharide. Egzoglukanaze djeluje na reducirajuće i nereducirajuće krajeve polisaharidnog lanca, pri čemu nastaje glukoza (glukanohidrolaze) i celobioza (celobiohidrolaza). β-Glukozidaze hidroliziraju topljivi celodekstrin i celobiozu do glukoze.^{68,69} Hidroliza se odvija u blagim uvjetima pri pH 4,5 – 5,0 i temperaturi 40 – 50 °C.

(3) Fermentacija

Tijekom fermentacije lignoceluloznog hidrolizata mikroorganizmi previru pentoze i heksoze u etanol. Najčešće se upotrebljava kvasac *S. cerevisiae* koji raste na šećerima heksozama, ali ne i na pentozama. Kvasci *Pichia stipitis* i *Candida shehata* previru i heksoze i pentoze.⁷⁰

Najčešće se primjenjuje postupak tzv. fermentacije uz prethodno ošećerenje, fermentacija šećera provodi se nakon hidrolize celuloze (slika 3). Nakon prethodne obrade lignocelulozne sirovine odvaja se čvrsta od tekuće faze koja sadrži pretežno šećere pentoze i nešto heksoza. Zadržana čvrsta faza nakon predobrade s razrijeđenom kiselinom sadrži uglavnom lignin i celulozu. Celuloza se zatim hidrolizira dodatkom celolitičkih enzima. Fermentacija hidrolizata koji sadrži pretežito heksoze i hidrolizata koji sadrži pentoze provodi se odvojeno s odgovarajućim mikroorganizmima. Provođenje enzimске hidrolize celuloze prije fermentacije omogućava odvijanje obaju bioprocesa u optimalnim uvjetima. Optimalna temperatura enzimске hidrolize celuloze je viša (45 – 50 °C) od optimalne temperature za rast mikroorganizama (za kvasac *S. cerevisiae* 32 °C).

Produkti enzimске hidrolize, glukoza i celobioza, inhibitori su celulaza što postepeno dovodi do smanjenja brzine ošećerenja.^{58,71} Smanjenje inhibicijskog učinka na aktivnost enzima postiže se provođenjem istodobnog ošećerenja celuloze i fermentacije (eng. *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, SSF, slika 3). Glukoza nastala enzimskom hidrolizom celuloze odmah se troši za rast mikroorganizma, pa je njezina koncentracija u podlozi vrlo mala. Nadalje, povećava se produktivnost bioprocesa, prinos i koncentracija etanola, vođenje bioprocesa je jednostavnije, a kapitalni troškovi su manji u odnosu na proces SHF. Šaržni proces proizvodnje etanola uz istodobni postupak ošećerenja i fermentacije (SSF) traje 3 – 7 dana uz 90 – 95 % konverzije i koncentraciju etanola 40 – 50 g l⁻¹.⁷² Osnovni nedostatak ovog postupka proizvodnje su različiti optimalni uvjeti za enzimsku hidrolizu supstrata i rast mikroorganizma. Zbog nižih temperatura kod kojih se vodi proces, aktivnost celulaza je i do 30 % niža nego kod optimalne temperature, pa je potrebno primijeniti veće količine enzima za ošećerenje, što poskupljuje proces proizvodnje. U literaturi je naveden niz različitih postupaka koji su imali cilj smanjenje troškova proizvodnje procesom SSF. Fermentacijom sa združenom kulturom mikroorganizama kvasca *S. cerevisiae* i plijesni *Fusarium oxysporum*, koja proizvodi celulaze i hemicelulaze, postignuti su niski prinosi etanola.⁷³ Primjena termotolerantnog kvasca *Kluyveromyces marxianus* omogućava provođenje fermentacije pri temperaturi 42 – 43 °C.⁷⁴ Umjesto komercijalnih celulaza, ošećerenje



Slika 3 – Proizvodnja bioetanola iz lignocelulozne sirovine. CF – kofermentacija; SSF – istodobna saharifikacija i fermentacija; SSCF – istodobna saharifikacija i kofermentacija; CBP – konsolidirani bioproceni sustav; C – celuloza; H – hemiceluloza; L – lignin; Cel – celuloze; G – glukoza; P – pentoze; I – inhibitor; EtOH – etanol²⁶

Fig. 3 – Production of bioethanol from lignocellulosic biomass: CF – co-fermentation; SSF – simultaneous saccharification and fermentation; SSCF – simultaneous saccharification and co-fermentation; CBP – consolidated bioprocessing; C – cellulose; H – hemicellulose; L – lignin; Cel – cellulase; G – glucose; P – pentose; I – inhibitors; EtOH – ethanol²⁶

celuloze može se uspješno provesti primjenom nepročišćene prevrele podloge na kojoj je rasla plijesan *Trichoderma reesei*.⁷²

Ekonomski isplativiji, ali tehnološki daleko zahtjevniji od prethodnih, je postupak kofermentacija uz istodobno ošećerenje (eng. *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*, SSCF).²⁶ Kofermentacijom pentozama i heksoza u jednom bioreaktoru smanjuju se kapitalni troškovi, ali i mogućnost kontaminacije. Kofermentacijom glukoze i ksiloze s kvascem *Pichia stipitis* postiže se potpuna konverzija šećera pri malim brzinama razrjeđenja tijekom kontinuiranog uzgoja. Produktivnost procesa je vrlo mala i iznosi 0,51 g l⁻¹ h⁻¹. Proučavana je i kofermentacija šećera uz istodobno ošećerenje i sa združenim kulturama dvaju mikroorganizama npr. *Saccharomyces diastolicus* i *Pichia stipitis*,⁷⁵ *Pichia stipitis* i *S. cerevisiae*,^{76,77} *Zymomonas mobilis* i *Pichia stipitis*,⁷⁸ *Zymomonas mobilis* i *Pachysolen tannophilus*,⁷⁹ itd. Kod odabira mikroorganizama za uzgoj u združenoj kulturi važno je da odabrani mikroorganizmi rastu u sličnim uvjetima s obzirom na temperaturu bioprocasa i pH podloge, što ograničava izbor mikroorganizama.⁷⁷ Tijekom kofermentacije sa združenom kulturom kvasaca *Pichia stipitis* (fermentira pentozama) i *S. cerevisiae* (fermentira

heksoze) postiže se veća konverzija heksoza u etanol od pentozama. Nepotpuna konverzija pentozama u etanol posljedica je veće brzine rasta kvasca *S. cerevisiae* i inhibicije rasta *P. stipitis* inhibitorima rasta iz lignoceluloznog hidrolizata i nastalim etanolom.^{26,75} Prinosi etanola i produktivnost bioprocasa sa združenom kulturom dviju bakterija, *Clostridium thermocellum*, (proizvodi celuloze i prevodi glukozu u etanol) i *C. thermosaccharolyticum* (fermentira pentozama) znatno je niža nego s kvascima zbog inhibicije rasta s etanolom i drugim proizvodima metabolizma (organske kiseline kao što su octena i mliječna kiselina).⁷²

Kao alternativa združenim kulturama primijenjen je niz genetički modificiranih mikroorganizama. Heterolognom ekspresijom gena za asimilaciju pentozama u kvascu *S. cerevisiae* i bakteriji *Z. mobilis* omogućen je rast ovim mikroorganizmima na pentozama. Tijekom kontinuiranog uzgoja u bioreaktoru s fluidiziranim slojem imobiliziranih stanica rekombinantnog soja *Z. mobilis* produktivnost je iznosila 6,5 – 8,6 g l⁻¹ h⁻¹. Međutim, na kraju bioprocasa u podlozi zaostaju značajne količine neprevrele ksilozama.⁵⁵

U visokointegriranom procesu proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, tzv. konsolidiranom bioprocenom

sustavu (eng. *Consolidated Bioprocessing*, CBP), biosinteza celuloza, ošecerenje prethodno obrađene lignocelulozne biomase i fermentacije šećera u etanol provodi se samo uz jedan mikroorganizam. Iako je ovaj koncept proizvodnje najinteresantiji s ekonomskog stajališta, još uvijek nije pronađen učinkovit mikroorganizam koji objedinjava sve potrebne fiziološke karakteristike. Primjenom genetičkog inženjerstva nastoje se poboljšati svojstva mikroorganizama koji se već primjenjuju u fermentaciji etanola. Mikroorganizmima s visokom celuloznom aktivnošću poboljšavaju se fermentacijska svojstva, a mikroorganizmima sa zadovoljavajućim fermentacijskim svojstvima dodaju se celulozitička i/ili hemicelulozitička aktivnost. Termofilna anaerobna bakterija *C. thermocellum* proizvodi celuloze i fermentira glukozu u etanol, ali prinos etanola je vrlo malen. Poboljšani rekombinantni soj *C. thermocellum* proizvodi i do 60 g l⁻¹ etanola, što je još uvijek znatno manje nego s kvascem *S. cerevisiae*.⁸⁰ Primjenom genetičkog inženjerstva poboljšana je celulozitička aktivnost visokoproduktivnih rekombinantnih sojeva bakterija *E. coli*, *K. oxytoca* i *Z. mobilis* i kvasca *S. cerevisiae*.^{26,80} U kvascu *S. cerevisiae* eksprimirani su geni za metabolizam ksiloze (ksiloza-reduktaza, ksilitol-dehidrogenaze i endogena ksilulokinaza) i hemicelulozitički enzimi (β -glukozidaza, β -ksilozidaza i

endoksilanaza). Rekombinantni soj kvasca raste na hidrolizatu rižine slame bez dodatka celulozitičkih enzima i detoksikacije podloge. Produktivnost ovog soja je vrlo mala i iznosi 0,114 g l⁻¹ h⁻¹.⁸¹

Unatoč globalnoj recesiji povećavaju se privatna ulaganja u razvoj procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozних sirovina. Većina pogona za proizvodnju etanola dosegla je komercijalnu razvojnu fazu, a prvi pogon za komercijalnu proizvodnju započeo je s radom krajem 2013. godine u Crescentinu (Italija) maksimalnog kapaciteta 75 milijuna litara godišnje (tablica 4).^{82,83,84}

Integracija procesa fermentacije i separacije etanola

U procesu proizvodnje etanola najviše energije troši se u tehnološkim operacijama izdvajanja i pročišćavanja etanola. Koncentracija etanola u prevreloj podlozi najčešće iznosi od 5 – 12 % (φ). Dehidracija etanola predstavlja najveći problem jer smjesa etanola s vodom čini azeotropnu smjesu ($w = 95,6$ %) pri temperaturi od 78,15 °C što onemogućava izdvajanje čistog etanola jednostavnom destilacijom. Izdvajanje etanola odvija se u dva stupnja:

Table 4 – Veća poluindustrijska i industrijska postrojenja za komercijalnu proizvodnju etanola iz celulozne sirovine^{82,83,84}
Tablica 4 – Main demo and commercial scale plants for cellulosic ethanol production^{82,83,84}

Vlasnik postrojenja Plant owner	Lokacija Location	Sirovina Feedstock	Ulazni godišnji kapacitet/t ⁻¹ Annual input capacity/t ⁻¹	Izlazni godišnji kapacitet/t ⁻¹ Annual output capacity/t ⁻¹
Clariant (prije Sud Chemie) (ex Sud Chemie)	Straubing (Njemačka) (Germany)	poljoprivredni ostaci, pšenična slama agriculture residues, wheat straw	–	1 000
Inbicon (Dong Energy)	Kalundborg (Danska) (Denmark)	pšenična slama i druge lignocelulozne sirovine wheat straw and other lignocellulosic raw materials	30 000	4 300
Abengoa Bioenergy, Biocarburantes Castilla y Leon, Erbo Puleva	Babilafuent, Salamanca (Španjolska) (Spain)	ječmena i pšenična slama, kukuruzna stabljika barley and wheat straw, corn stover	25 000	4 000
Chempolis	Oulu (Chempolis R&D Center) (Finska) (Finland)	slama i bagasa straw and bagasse	25 000	podatak nije dostupan unavailable data
Beta Renewables (JV Chemtex (M&G), TPG, Novozymes (part of Mossi Ghisolfi Group, and Novozymes)	Crescentino (Italija) (Italy)	pšenična i rižina slama i <i>Arundo donax</i> wheat straw, rice straw and <i>Arundo donax</i>	do 270 000 up to 270 000	40 000
Blue Sugars Corporation (KL Energy corporation)	Upton, Wyoming (SAD)	bagasa, drvna pulpa, drvni ostaci bagasse, wood pulp, wood residue	33 000	4 500
BP (Jennings Demo Facility)	Jannings, LA (SAD) (USA)	bagasa, divlji proso (<i>Panicum virgatum</i>), drvna biomasa bagasse, switchgrass, wood biomass	–	4 180

(1) jednostavna destilacija etanola iz fermentirane podloge, čime se dobiva 92,4 % etanola (w)

(2) dehidracija etanola primjenom azeotropne destilacija, ekstraktivna destilacija, ekstrakcija tekuće-tekuće, adsorpcija.⁶²

Značajne uštede u procesu proizvodnje mogu se ostvariti integracijom fermentacije i operacija izdvajanja i pročišćavanja etanola. Kontinuiranim izdvajanjem etanola tijekom fermentacije smanjuje se inhibicijski učinak etanola na rast i aktivnost radnog mikroorganizma, te se stoga postiže veća produktivnost bioprocesa.⁸⁵ Razvijen je niz metoda za kontinuirano uklanjanje etanola: vakuumska evaporacija,⁸⁶ istiskivanje etanola s CO₂,⁸⁷ ekstrakcija otapalima,^{88,89} adsorpcija,^{90,91} destilacija⁶² i pervaloracija.^{91,92}

Zaključak

Etanol se upotrebljava kao pogonsko gorivo čist ili u smjesama s benzinom. Prednost primjene bioetanola u odnosu na fosilna goriva značajno je smanjenje emisije stakleničkih plinova i toksičnih aromatskih spojeva. Svjetska proizvodnja etanola povećala se s 17,25 milijardi litara u 2000. godinu na 86 milijardi litara u 2012., što je posljedica potrebe vodećih svjetskih ekonomija za energetskom neovisnošću. Prema predviđanjima OECD-FAO u idućih deset godina svjetska proizvodnja etanola uvećat će se za 67 % i iznositi će 168 milijardi litara. Oko 80 % svjetske proizvodnje bioetanola otpadati će na danas vodeće proizvođače, SAD i Brazil, a ostatak će se proizvoditi najvećim dijelom u Kini.⁹³

Bioetanol je gorivo proizvedeno iz obnovljivih sirovina, danas još uvijek najvećim dijelom iz kukuruza i šećerne trske ili repe, ovisno o geografskom položaju. Ove sirovine se upotrebljavaju u proizvodnji hrane i krmiva, a njihova cijena posljednjih godina kontinuirano raste. Dodatan problem predstavlja dostupnost sirovina tijekom godine. Zbog toga se posljednjih godina provode brojna istraživanja s ciljem razvoja komercijalne proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina, koje su višestruko jeftinije od škrob-nih (npr. kukuruz) ili šećernih sirovina (npr. šećerna trska ili repa). Međutim, zbog složenosti procesa proizvodnje, cijena etanola proizvedenog iz lignoceluloznih sirovina je dva do tri puta veća od cijene etanola dobivenog iz šećerne trske, odnosno od cijene benzina.⁹⁴ Velik napredak u proizvodnji bioetanola napravljen je krajem 2013. godine puštanjem prve tvornice za komercijalnu proizvodnju etanola iz poljoprivrednih ostataka. U narednim godinama istraživanja će biti usmjerena na razvijanje i poboljšanje procesa proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina s ciljem smanjenja cijene gotovog proizvoda.

ZAHVALA

Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom 9158 Sustainable production of bioethanol and biochemicals from agricultural waste lignocellulosic raw materials (SPECH-LRM).

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

w	– maseni udjel, % – mass fraction, %
φ	– obujamski udjel, % – volume fraction, %
A	– amilaze – amylases
CBP	– konsolidirani bioprocesni sustav – consolidate bioprocessing
Cel	– celuloza – cellulase
CF	– kofermentacija – co-fermentation
FAO	– Organizacija za prehranu i poljoprivredu – Food and Agriculture Organization
G	– glukoza – glucose
GRAS	– Općeprihvaćeno kao sigurno – Generally recognized as safe
H	– hemiceluloza – hemicellulose
I	– inhibitor – inhibitors
L	– lignin – lignin
OECD	– Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj – Organisation for Economic Cooperation and Development
P	– pentoza – pentose
SHF	– fermentacija uz prethodno oštećenje – separate hydrolysis and fermentation
SSCF	– istodobno saharifikacija i kofermentacija – simultaneous saccharification and co-fermentation
SSF	– istodobna saharifikacija i fermentacija – simultaneous saccharification and fermentation
SSYPF	– istodobna saharifikacija, uzgoj kvasca i fermentacija – simultaneous saccharification, yeast propagation and fermentation
Y	– kvasac – yeast

Literatura

References

1. P. S. Nigam, A. Singh, Production of liquid biofuels from renewable resources, *Prog. Energ. Comb. Sci.* **37** (2011) 52–68, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2010.01.003>.
2. A. Demirbas, Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review, *J. Haz. Mat.* **157** (2008) 220–229, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.01.024>.
3. Renewable Fuels Association, 2013 World Fuel Ethanol Production. URL: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production> (2. 9. 2014.).
4. A. Demirbas, Progress and recent trends in biofuels, *Prog. Energ. Comb. Sci.* **33** (2007) 1–18, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecs.2006.06.001>.
5. O. K. Kadiman, Crops: beyond foods. In: Proceedings of the 1st International conference of crop security, Malang, Indonesia, September 20–23, 2005.

6. Uredba o kvaliteti tekućih naftnih goriva (NN 113/13) i Uredba o izmjenama i dopunama Uredbe o kvaliteti tekućih naftnih goriva (NN 76/14)
7. F. Yüksel, B. Yüksel, The use of ethanol–gasoline blend as a fuel in an SI engine, *Renew. Energ.* **29** (2004) 1181–1191, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2003.11.012>.
8. M. S. Luchansky, J. Monks, Supply and demand elasticities in the US ethanol fuel market, *Energ. Econ.* **31** (2009) 403–410, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2008.12.005>.
9. F. O. Licht's World Ethanol & Biofuels Report. URL: <http://www.agra-net.com/portal2/showservice.jsp?service-name=as072> (5. 9. 2014.).
10. OECD-FAO Agricultural Outlook 2013. URL: www.fao.org/.../OECD_2013_22_biofuels_proj.pdf (4. 9. 2014.).
11. Euroobserver. Biofuels barometer – Various issues. URL: <http://www.euroserv-er.org/> (24. 7. 2014.).
12. L. Pelkmans, K. Kessels, T. Bole, Induced market disturbances related to biofuels, Report D2.2 of ELOBIO subtask 2.3. URL: <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2009/009035.pdf> (27. 7. 2014.).
13. A. Demirbas, Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass, *Energ. Sour.* **27** (2005) 327–337, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00908310390266643>.
14. S. I. Mussatto, G. Dragone, P. M. Guimarães, J. P. A. Silva, L. M. Carneiro, I. C., Roberto, J. A. Teixeira, Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production, *Biotechnol. Adv.* **28** (2010) 817–830, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.001>.
15. S. Boubekour, N. Camougrand, O. Bunoust, M. Rigoulet, B. Guerin, Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* **268** (2001) 5057–5065, doi: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.02418.x>.
16. F. W. Bai, W. A. Anderson, M. Moo-Young, Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.* **26** (2008) 89–105, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.09.002>.
17. G. R. Cronwright, J. M. Rohwer, B. A. Prior, Metabolic Control Analysis of Glycerol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (9) (2002) 4448–4456, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.9.4448-4456.2002>.
18. P. M. Chin, W. M. Ingledew, Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset, *Enzyme Microb. Technol.* **16** (1994) 11–17, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90172-4](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(94)90172-4).
19. I. Watanabe, T. Nakamura, J. Shima, A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35** (2008) 1117–1122, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-008-0390-1>.
20. A. Muthaiyan, A. Limayem, S. C. Ricke, Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations, *Prog. Energy Comb.* **37** (2011) 351–370, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pecc.2010.06.005>.
21. T. D'Amore, G. Celotto, I. Russell, G. G. Stewart, Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °C, *Enzyme Microb. Technol.* **11** (1989) 411–416, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90135-X](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(89)90135-X).
22. C. Dorta, P. Oliva-Neto, M. S. Abreu-Neto, N. Nicolu-Junior, A. I. Nagashima, Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26), *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22** (2006) 177–182, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9016-1>.
23. N. V. Narendranath, K. C. Thomas, W. M. Ingledew, Urea hydrogen peroxide reduces the numbers of lactobacilli, nourishes yeast, and leaves no residues in the ethanol fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (2000) 4187–4192, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.10.4187-4192.2000>.
24. S. Alfenore, X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uri-belarra, G. Goma, S.É. Guillouet, Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63** (2004) 537–542, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1393-5>.
25. C. Geddes, I. U. Nieves, L. O. Ingram, Advances in ethanol production, *Curr. Opin. Biotechnol.* **22** (2011) 312–319, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.012>.
26. A. Cardona, O. Sanchez, Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities, *Bioresour. Technol.* **98** (2007) 15–27, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.002>.
27. M. Pavlečić, I. Vrana, K. Vibovec, M. Ivančić Šantek, P. Horvat, B. Šantek, Ethanol production from different intermediates of sugar beet processing, *Food Technol. Biotech.* **48** (2010) 362–367.
28. A. E. Wheals, L. C. Basso, D. M. G. Alves, H. V. Amorim, Fuel ethanol after 25 years, *Trends Biotechnol.* **17** (1999) 482–487, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01384-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01384-0).
29. O. J. Sánchez, C. A. Cardona, Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 5270–5295, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>.
30. J. Dorfler, H. V. Amorim, Applied bioethanol technology in Brazil. *Sugar Industry, Zuckerindustrie* **132** (9) (2007) 694–697.
31. A. Godoy, H. V. Amorim, M. L. Lopes, A. J. Oliveira, Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production, *Int. Sugar. J.* **10** (2008) 175–182.
32. G. M. Zanin, C. C. Santana, E. P. S. Bon, R. C. L. Giordano F. F. de Moraes, S. R. Andrietta, C. C. D. Neto, I. C. Macedo, D. L. Fo, L. P. Ramos, J. D. Fontana, Brazilian bioethanol program, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86** (2000) 1147–1161, doi: <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:1147>.
33. S. Brethauer, C. E. Wyman, Review: Continuous Hydrolysis and Fermentation for Cellulosic Ethanol Production, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 4862–4874, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>.
34. X. Q. Zhao, F. W. Bai, Yeast flocculation: New story in fuel ethanol production, *Biotechnol. Adv.* **27** (2009) 849–856, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.06.006>.
35. P. J. Verbelen, D. P. De Schutter, F. Delvaux, K. J. Verstrepen, F. R. Delvaux, Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications, *Biotechnol. Lett.* **28** (2006) 1515–1525, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>.
36. D. Smogrovicova, P. Gemeiner, A. Malovi, E. Sturdi, Reactors for continuous primary beer fermentation using immobilised yeast, *Biotechnol. Techn.* **11** (1997) 261–264, doi: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018494606777>.
37. S. T. Jones, R. A. Korus, W. Admassu, R. C. Heimsch, Ethanol fermentation in a continuous tower fermenter, *Biotechnol. Bioeng.* **16** (1984) 742–747, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260260717>.
38. W. Admassu, R. A. Korus, Ethanol fermentation with a flocculating yeast, *Chem. Eng. J.* **31** (1985) B1–B8, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9467\(85\)85014-0](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9467(85)85014-0).
39. T. C. Paiva, S. Sato, A. E. Visconti, L. A. Castro, Continu-

- ous alcoholic fermentation process in a tower reactor with recycling of flocculating yeast, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57** (1996) 535–541, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02941733>.
40. J. D. Bu'lock, D. M. Comberbach, C. Ghommidh, A study of continuous ethanol production using a highly flocculent yeast in the gas lift tower fermenter, *Chem. Eng. J.* **29** (1984) B9–B24, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0300-9467\(84\)80010-6](http://dx.doi.org/10.1016/0300-9467(84)80010-6).
 41. L. Chen, C. S. Gong, Continuous ethanol production using induced yeast aggregates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25** (1986) 208–212, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00253650>.
 42. C. S. Gong, L. F. Chen, Ethanol production by a self-aggregating mutant of *Saccharomyces uvarum*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **14** (1984) 257–68.
 43. H. Kuriyama, H. Ishibashi, H. Miyagawa, H. Kobayashi, E. Mikami, Optimization of two-stage continuous ethanol fermentation using flocculating yeast, *Biotechnol. Lett.* **15** (1993) 415–420, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00128287>.
 44. K. Kida, S. Asano, M. Yamadaki, K. Iwasaki, T. Y. Yamaguchi, Continuous high-ethanol fermentation from cane molasses by a flocculating yeast, *J. Ferment. Bioeng.* **69** (1990) 39–45, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(90\)90161-O](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(90)90161-O).
 45. S. Limtong, M. Nakata, H. Funahashi, T. Yoshida, T. Seki, J. Kumnuanta, Continuous ethanol production by a concentrated culture of flocculating yeast, *J. Ferment. Technol.* **62** (1984) 55–62.
 46. K. Kida, M. Yamadaki, S. Asano, T. Nakata, Y. Sonoda, The effect of aeration on stability of continuous ethanol fermentation by a flocculating yeast, *J. Ferment. Bioeng.* **68** (1989) 107–111, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(89\)90057-3](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(89)90057-3). F. W. Bai, L. J. Chen, W. A. Anderson, M. Moo-Young, Parameter oscillations in very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system, *Biotechnol. Bioeng.* **88** (2004) 558–66, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.20221>.
 47. F. W. Bai, L. J. Chen, Z. Zhang, W. A. Anderson, M. Moo-Young, Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions, *J. Biotechnol.* **110** (2004) 287–293, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.017>.
 48. M. Haros, M. P. Tolaba, C. Suárez, Influence of corn drying on its quality for the wet-milling process, *J. Food Eng.* **60** (2003) 177–184, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00038-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00038-4).
 49. V. Marić, M. Bošnjak, S. Grba, P. Raspor, *Biotehnologija i sirovine. Stručna i poslovna knjiga*, 2000.
 50. R. J. Bothast, M. A. Schlicher, Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67** (2005) 19–25, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1819-8>.
 51. D. R. Kelsall, T. P. Lyons, Grain dry milling and cooking for alcohol production. In *The Alcohol Textbook*, 9–22. 2nd ed. Nottingham, U.K.: Nottingham University Press, 2003.
 52. A. Pandey, P. Nigam, C. R. V. T. Soccol, V. Soccol, D., Singh, R. Mohan, Advances in microbial amylases, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31** (2000) 135–152, doi: <http://dx.doi.org/10.1042/BA19990073>.
 53. H. Shigechi, J. Koh, Y. Fujita, T. Matsumoto, Y. Bito, M. Ueda, A. Kondo, Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and α -amylase, *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 5037–5040, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.8.5037-5040.2004>.
 54. S. Brethauer, C. E. Wyman, Review: continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, *Biore Sour. Technol.* **101** (2010) 4862–4874, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009>.
 55. P. W. Madson, D. A. Monceaux, *Fuel ethanol production*, The Alcohol Textbook, Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido, 1995., str. 257–268.
 56. M. J. Viktor, S. H. Rose, W. H. van Zyl, M. Viljoen-Bloom, Raw starch conversion by *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Aspergillus tubingensis* amylases, *Biotechnol. Biofuels* **6** (2013) 167–178, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-167>.
 57. B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Lidén, G. Zacchi, Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today, *Trends Biotechnol.* **24** (2006) 549–556, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.10.004>.
 58. B. Erdei, M. Galbe, G. Zacchi, Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production, *Biomass Bioenerg.* **56** (2013) 506–514, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.05.032>.
 59. N. G. Taylor, Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants, *New Phytol.* **178** (2008) 239–252, doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02385.x>.
 60. D. Mohan, C. U. Pittman, P. H. Steele, Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review, *Energy Fuels* **20** (2006) 848–889, doi: <http://dx.doi.org/10.1021/ef0502397>.
 61. H. J. Huang, S. Ramaswamy, U. W. Tschirner, B. V. Ramarao, A review of separation technologies in current and future biorefineries, *Sep. Purif. Technol.* **62** (2008) 1–21, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>.
 62. A. T. W. M. Hendricks, G. Zeeman, Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Biore Sour. Technol.* **100** (2009) 10–18, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.027>.
 63. R. J. Ulbricht, S. J. Northup, J. A. Thomas, A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions, *Fund. Appl. Toxicol.* **4** (1984) 843–853, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(84\)90106-4](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(84)90106-4).
 64. L. J. Jönsson, B. Alriksson, N. O. Nilvebrant, Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification, *Biotechnol. Biofuels* **6** (2013) 16–26, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-16>.
 65. A. Demirbas, Ethanol from cellulosic biomass resources, *Int. J. Green Ener.* **1** (2004) 79–87, doi: <http://dx.doi.org/10.1081/GE-120027885>.
 66. A. Demirbas, Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass, *Energ. Source.* **27** (2005) 327–337, doi: <http://dx.doi.org/10.1080/00908310390266643>.
 67. L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, I. S. Pretorius, Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnolog, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66** (2002) 506–577, doi: <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>.
 68. H. Teugias, P. Våljamäe, Product inhibition of cellulases studied with 14 C-labeled cellulose substrates, *Biotechnol. Biofuels* **6** (2013) 104, doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-104>.
 69. B. C. Chu, H. Lee, Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation, *Biotechnol. Adv.* **25** (2007) 425–441, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.04.001>.
 70. A. K. Chandel, C. E. R. Rudravaram, M. L. Narasu, L. V. Rao, P. Ravindra, Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal, *Biotechnol. Molec. Biol. Rev.* **2** (2007) 14–32.
 71. C. E. Wyman, Ethanol from lignocellulosic biomass: tech-

- nology, economics, and opportunities, *Bioresour. Technol.* **50** (1994) 3–15, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90214-3](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)90214-3).
72. D. Mamma, D. Koullas, G. Fountoukidis, D. Kekos, B. J. Macris, E. Koukios, Bioethanol from sweet sorghum: simultaneous saccharification and fermentation of carbohydrates by a mixed microbial culture, *Process Biochem.* **31** (1996) 377–381, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(95\)00075-5](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(95)00075-5).
 73. M. Ballesteros, J. M. Oliva, J. M. Negro, M. J. Manzaneres, P. I. Ballesteros, Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, *Process Biochem.* **39** (2004) 1843–1848, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2003.09.011>.
 74. J. M. Laplace, J. P. Delgenes, R. Moletta, J. M. Navarro, Effects of culture conditions on the co-fermentation of a glucose and xylose mixture to ethanol by a mutant of *Saccharomyces diastaticus* associated with *Pichia stipitis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39** (1993) 760–763, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00164463>.
 75. D. R. J. Grootjen, L. H. H. M. Meijlink, R. G. J. M. van der Lans, K. Ch. A. M. Luyben, Cofermentation of glucose and xylose with immobilized *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Enzyme Microb. Technol.* **12** (1990) 860–864, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90023-J](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(90)90023-J).
 76. K. Srilekha Yadav, S. Naseeruddin, G. Sai Prashanthi, L. Saiteesh, L. Venkateswar Rao, Bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 6473–6478, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.019>.
 77. N. Fu, P. Peiris, J. Markham, J. Bavor, A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures, *Enzyme Microb. Technol.* **45** (2009) 210–217, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.04.006>.
 78. N. Fu, P. Peiris, Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tanophilus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24** (2008) 1091–1097, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9613-2>.
 79. L. Lynd, W. Zyl, J. McBride, M. Laser, Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update, *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** (2005) 577–583, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2005.08.009>.
 80. T. Sakamoto, T. Hasunuma, Y. Hori, R. Yamada, A. Kondo, Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells, *J. Biotechnol.* **158** (2012) 203–210, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.025>.
 81. Biofuels Digest – Cellulosic Biofuels Industry Progress Report 2012–2013. URL: http://www.biofuelstp.eu/cell_ethanol.html/ (2. 9. 2014.).
 82. Renewables 2012, Global Status report REN21. URL: <http://www.ren21.net/ren21activities/globalstatusreport.aspx> (2. 9. 2014.).
 83. European Biofuels Technology Platform (EBTP). URL: http://www.biofuelstp.eu/cell_ethanol.html#crescentino/ (2. 9. 2014.).
 84. D. Stanley, A. Bandara, S. Fraser, P. J. Chambers, G. A. Stanley, The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Appl. Microbiol.* **109** (2010) 13–24.
 85. G. R. Cysewski, C. R. Wilke, Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle, *Biotechnol. Bioeng.* **19** (1977) 1125–1143, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260190804>.
 86. T. C. Ezeji, N. Qureshi, H. P. Blaschek, Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63** (2004) 653–658, doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1400-x>.
 87. M. Miner, G. Goma, Ethanol production by extractive fermentation, *Biotechnol. Bioeng.* **24** (1982) 1565–1579, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260240710>.
 88. T. Cho, M. L. Schuler, Multimembrane bioreactor for extractive fermentation, *Biotechnol. Prog.* **2** (1986) 53–60, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.5420020110>.
 89. K. Schügerl, Integrated processing of biotechnology products, *Biotechnol. Adv.* **18** (2000) 581–599, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00051-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00051-3).
 90. L. M. Vane, Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths, *Biofuels Bioprod. Biorefin.* **2** (2008) 553–588, doi: <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.108>.
 91. C. Chen, X. Tang, Z. Xiao, Y. Zhou, Y. Jiang, S. Fu, Ethanol fermentation kinetics in a continuous and closed-circulating fermentation system with a pervaporation membrane bioreactor, *Bioresour. Technol.* **114** (2012) 707–710, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.089>.
 92. OECD-FAO Agricultural Outlook. URL: <http://www.greencongress.com/2013/10/20131006-oecd-fao.html/> (7. 9. 2014.).
 93. M. Balat, H. Balat, Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel, *Appl. Energ.* **86** (2009) 2273–2282, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.03.015>.

EXTENDED ABSTRACT

New Trends in the Ethanol Production as a Biofuel

Mirela Ivančić Šantek,* Ena Miškulin, Sunčica Beluhan, and Božidar Šantek

Rapidly growing fossil energy consumption, due to population and industrial growth, has caused increasing greenhouse-gas emissions, growing energy dependency and supply insecurity. Bioethanol has become an attractive alternative biofuel because of its environmental benefits and the fact that it is made from renewable resources. Ethanol is widely used as transport fuel, pure hydrous ethanol or anhydrous ethanol in mixtures with gasoline (Fig. 1).

Bioethanol is produced from carbohydrates such as sugar, starch and cellulose by fermentation with yeast *S. cerevisiae* or other microorganisms. Thereupon, ethanol is separated and purified by distillation-rectification-dehydration to meet fuel specifications. Currently, conventional crops such as corn or sugarcane are the main feedstock for bioethanol production. Bioethanol production from the sucrose-containing feedstock is simpler compared to the starchy materials and the lignocellulosic biomass due to an additional step – feedstock hydrolysis. The process of ethanol production from starchy materials includes the hydrolysis of starch to glucose using α -amylase (1,4- α -D-glucan-4-glucanohydrolase) and glucoamylase (1,4- α -D-glucanglucohydrolase). Finally, the glucose is fermented to ethanol by yeast cells. Enzymatic hydrolysis of starch and fermentation of glucose can be carried out in different process configurations, such as separate hydrolysis and fermentation (SHF), and simultaneous saccharification and fermentation (SSF, Fig. 2). In consolidated bioprocessing (CBP), the conversion of starch into ethanol is performed in one step without added enzymes. This process configuration has potential to lower the cost of biomass processing due to elimination of operating and capital costs associated with dedicated enzyme production.

Current bioethanol production from corn and sugarcane is unable to meet the global demand for bioethanol, due to their primary value as livestock feed and human food. The lignocellulosic biomass such as agricultural wastes (corn stover, crop straws, husks and bagasse), herbaceous crops (switchgrass), woody crops, forestry residue, waste paper and other wastes (municipal and industrial) is favourable feedstock for bioethanol production. The major advantages of lignocellulosic biomass are its renewable and ubiquitous nature and its noncompetitiveness with food crops. Ethanol production from lignocellulosic feedstock is complex and comprises two steps prior to fermentation: biomass pretreatment (breaking down the structure of the lignocellulosic matrix) and cellulose hydrolysis (enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose). The lignocellulosic hydrolysate contains not only hexoses, but also pentoses that are not assimilated by yeast *S. cerevisiae*. Furthermore, the lignocellulosic hydrolysate contains a broad range of compounds that inhibit the yeast's cells. The composition of the inhibitors depends on the type of the lignocellulosic material, and the chemistry and nature of the pretreatment process. The pretreated cellulose can be enzymatically hydrolysed either prior or simultaneously with glucose fermentation (Fig. 3). The four main steps involved in the process of lignocellulosic bioethanol production (pretreatment, cellulose hydrolysis, hexoses and pentoses fermentation) can be arranged in various process configurations, including separate hydrolysis and fermentation (SHF), simultaneous saccharification and fermentation (SSF), simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) and consolidated bioprocessing (CBP, Fig. 3). Specific strains of bacteria and yeasts have been developed to ferment sugars released from lignocellulosic biomass and hydrolysed cellulose, through a selection of new strains and genetic engineering of traditional strains.

Keywords

Bioethanol, feedstock, fermentation, lignocellulose, integrated bioprocess systems

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Pierottijeva 6
10 000 Zagreb, Croatia

Review
Received October 27, 2014
Accepted April 15, 2015