

Znaczenie doboru metody wstępnej obróbki substratów lignocelulozowych z uwzględnieniem wydajności produkcji bioetanolu*

Magdalena Świątek, Małgorzata Lewandowska, Włodzimierz Bednarski

*Katedra Biotechnologii Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn
e-mail: magdalena.swiatek@uwm.edu.pl*

Słowa kluczowe: lignoceluloza, obróbka wstępna, bioetanol

Wstęp

Upowszechnienie biopaliw w Polsce i na świecie wiąże się z pojęciem „paliw II generacji”, do produkcji których wykorzystywane będą surowce lignocelulozowe. Działania zmierzające do promowania tego kierunku badań zostały wymienione m.in. w harmonogramie Polskiej Strategicznej Agendy Badawczej działającej przy Polskiej Platformie Technologicznej Biopaliw i Biokomponentów. Wytwarzanie bioetanolu z biomasy lignocelulozowej, głównie pochodzenia odpadowego, nie stanowi konkurencji dla produkcji żywności, w przeciwieństwie do biopaliw I generacji, których produkcja oparta jest na surowcach skrobiowych i cukrowych, stwarzając zagrożenie wzrostu cen żywności.

Obfitość odpadowych surowców lignocelulozowych stanowi potencjalnie niewyczerpalne źródło, jednak efektywność ekonomiczna procesu ich przetwarzania nadal ustępuje technologiom tradycyjnym. Wiąże się to z szeregiem nierozwiązanych problemów natury technologicznej i poznawczej. W środowisku naturalnym biomasa roślinna podlega procesom utylizacji z udziałem mikroorganizmów, które prowadzą wydajną biokonwersję trudnodostępnych składników surowca lignocelulozowego.

* Artykuł przeglądowy opracowano w ramach Programu Strategicznego – Zaawansowane Technologie Pozyskiwania Energii; Zadanie nr 4 „Opracowanie zintegrowanych technologii wytwarzania paliw i energii z biomasy, odpadów rolniczych i innych”. Projekt współfinansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

W działaniach tych istotne znaczenie odgrywa wspomagająca rola czynników środowiska takich jak: woda, światło słoneczne, zmienna temperatura oraz wiatr. Niemniej jednak procesy te w warunkach naturalnych trwają często od kilku miesięcy do kilkunastu czy kilkudziesięciu lat, co świadczy o złożonym charakterze przemian lignocelulozy. O wytrzymałości tkanek roślinnych na działanie czynników zewnętrznych decyduje ich budowa, w której najistotniejszą rolę spełnia ochronna funkcja ligniny, ściśle powiązanej z pozostałymi polimerami: celulozą i hemicelulozą.

Uzyskanie korzystnej wydajności biokonwersji substratu do etanolu, gwarantującej opłacalność, wymaga zastosowania wstępnej obróbki surowca mającej na celu usunięcie ligniny, naruszenie struktury hemiceluloz oraz częściową amorfizację celulozy. Stanowi to ważny etap technologii otrzymywania bioetanolu wyznaczający efektywność procesów następczych.

Liczne doniesienia literaturowe wskazują, że opracowanie jednorodnego sposobu przetwarzania biomasy nie jest łatwe. Szeroka gama dostępnych surowców możliwych do zagospodarowania w tym kierunku (odpady rolnicze, leśne, komunalne czy uprawy dedykowane) determinuje różne sposoby postępowania na każdym etapie technologii: obróbki wstępnej i hydrolizy substratów, sposobu prowadzenia fermentacji czy operacji pośrednich [4, 5, 17, 19, 25].

Charakterystyka składu chemicznego surowców

Surowce lignocelulozowe stanowiące potencjalny substrat do produkcji bioetanolu można podzielić na sześć głównych grup: pozostałości produkcji rolnej (słoma pszenna, rzepakowa, kukurydziana, jęczmienna oraz ryżowa, wyłoki trzciny cukrowej, plewy ryżowe, wyłoki sorga), twarde drewno (osika, topola), miękkie drewno (sosna, świerk), odpady celulozowe (papier gazetowy, odpady biurowe), rośliny zielone (proso różgowe, cynodon palczasty) i glony oraz miejskie odpady stałe (municipal solid wastes – MSW) [24].

Lignina, celuloza i hemicelulozy są głównymi składnikami surowców lignocelulozowych, a ich udział zależy głównie od rodzaju rośliny, bądź też odpadu (tab. 1).

Tabela 1. Skład chemiczny materiałów lignocelulozowych [wg 8, 18, 23]

Surowiec	Lignina [%]	Celuloza [%]	Hemicelulozy [%]
Słoma pszenna	22	34	20
Słoma żytnia	25	31	22
Słoma kukurydziana	19	35	23
Trawy	10–30	25–40	25–50
Wyłoki trzciny cukrowej	24	39	23
Twarde drewno	18–25	45–55	24–40
Miękkie drewno	25–35	45–50	25–35

Celuloza jest liniowym polimerem cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi, a sąsiadujące łańcuchy celulozowe łączą się poprzez wiązania wodorowe i siły Van der Waalsa tworząc struktury krystaliczne, trudnodostępne dla enzymów hydrolitycznych. Pomiędzy fibrylami celulozowymi i ligniną usytuowane są struktury hemicelulozy, stanowiące rozgałęzione heteropolimery zawierające w swym składzie heksozy (galaktoza, mannoza, ramnoza), pentozy (ksyloza, arabinnoza) i kwas glukuronowy. Do najważniejszych składników hemiceluloz zaliczane są ksylany, występujące w znacznych ilościach w drewnie twardym oraz roślinach jednorocznych [27]. Cząsteczki hemicelulozy łączą się z ligniną poprzez wiązania kowalencyjne (głównie mostki kwasu diferulowego oraz wiązania estrowe pomiędzy ligniną i jednostkami kwasu glukuronowego hemiceluloz) i celulozą poprzez niekowalencyjne interakcje [29, 30].

Lignina jest polimerem o złożonej budowie, zbudowanym głównie z jednostek aromatycznych, takich jak: alkohol kumarylowy, koniferylowy, synapinowy, tworzących nieregularną strukturę. W przeciwieństwie do celulozy i hemiceluloz, hydroliza enzymatyczna ligniny charakteryzującej się skomplikowaną strukturą i różnorodnością występujących wiązań chemicznych jest wyjątkowo trudna. Pełni ona funkcję „kleju” spajającego kompleks lignocelulozowy, nadając mu trwałość i oporność na degradację, ponadto wykazuje zdolność do niespecyficznego wiązania enzymów, obniżając wydajność hydrolizy enzymatycznej. Rolę ochronną odgrywają również polisacharydowe kompleksy kwasów fenolowych (np. ester kwasu ferulowego i arabinozy związany z jednostkami ksylozy – FAXX i analogiczny ester kwasu kumarowego – PAXX) [2, 7].

Surowce drzewne i rośliny dwuliścienne zawierają znaczne ilości ligniny, natomiast w komórkach u roślin jednoliściennych (np. traw) występują oprócz ligniny niskocząsteczkowe kwasy fenolowe połączone wiązaniem estrowym z arabinozą. Ciepło-sezonowe rośliny trawiaste (m.in. cynodon palczasty (bermudagrass), proso różgowe (switchgrass), a także wyłoki trzciny cukrowej (bagasse) i słoma kukurydziana (corn stover)), pomimo że są ubogie w ligninę, to charakteryzują się znacznym udziałem estrów kwasów kumarowego i ferulowego z hemicelulozą, istotnie utrudniających biodegradację. Wiązanie utworzone przez kwas ferulowy pomiędzy hemicelulozą a ligniną wykazuje wrażliwość na alkaliczne środowisko, co zostało wykorzystane do opracowania skutecznej obróbki alkalicznej materiałów lignocelulozowych gwarantującej oddzielenie ligniny. Zimno-sezonowe rośliny trawiaste zawierające niewielkie ilości ligniny i estrów kwasów fenolowych znacznie łatwiej ulegają degradacji mikrobiologicznej [2, 18].

Obróbka wstępna surowców lignocelulozowych

Ze względu na skomplikowaną strukturę kompleksu lignocelulozowego wymagane jest zastosowanie wstępnej obróbki umożliwiającej przeprowadzenie procesu hydrolizy chemicznej lub enzymatycznej oraz fermentacji. Takie działanie powinno spełniać następujące wymagania: zapewnić rozdział ligniny od celulozy, zwiększyć udział frakcji celulozy amorficznej (bardziej podatnej na hydrolizę enzymatyczną), zwiększyć porowatość materiału (aby poprawić wrażliwość celulozy na proces hydrolizy), umożliwić pełną i szybką hydrolizę enzymatyczną w kolejnym etapie, wyeliminować straty cukrów oraz tworzenie inhibitorów procesu hydrolizy i fermentacji oraz zapewnić efektywność ekonomiczną. Obróbka wstępna jest więc etapem krytycznym procesu produkcji etanolu celulozowego, pochłaniającym około 18% kosztów ogółem i istotnie wpływającym na przebieg kolejno prowadzonych procesów jednostkowych. Stopień hydrolizy celulozy w surowcach nie poddanych wstępnemu traktowaniu nie osiąga 20% wartości teoretycznej, natomiast jego zastosowanie pozwala na osiągnięcie 90-procentowego lub wyższego stopnia hydrolizy celulozy, w zależności od zaproponowanej metody i właściwości fizykochemicznych substratu [3, 24].

We wstępnym przygotowaniu lignocelulozy stosuje się metody fizyczne, fizyko-chemiczne, chemiczne i biologiczne, co skutkuje różnym poziomem przemian zachodzących w obrębie kompleksu [7].

Metody fizyczne

Do najpowszechniej stosowanych metod fizycznej obróbki lignocelulozy zalicza się głównie rozdrabnianie przez mielenie (młyny kulowe, wibracyjne, młotkowe), ekstruzję oraz pirolizę. Rozdrabnianie pozwala na częściowe zniszczenie krystalicznej struktury celulozy i ułatwia dostęp celulaz do substratu, zwiększając ponadto wrażliwość polimerów kompleksu na działanie czynników chemicznych. Zastosowanie metod fizycznych nie pozwala na rozdzielenie poszczególnych składników kompleksu, jednak zmniejszenie wielkości cząstek, a przez to oporów transportu masy i ciepła, jest niezbędne dla skuteczności kolejnych etapów.

Jak podają Pedersen i Meyer [20] stopień rozdrobnienia słomy pszennej do wartości 53–149 μm pozwala na zwiększenie wydajności uwalniania glukozy i ksylozy po 24-godzinnej hydrolizie enzymatycznej o odpowiednio 39% i 20% w porównaniu do prób odniesienia (cząstki długości 2–4 cm). Metody te charakteryzują się jednak wysoką koszto- i energochłonnością, zależną od rodzaju surowców lignocelulozowych poddawanych obróbce i żądanej redukcji wielkości cząstek. W celu zmniejszenia energochłonności tego etapu Zhu i in. [32] oraz Zhu i in. [33] zaproponowali, aby proces mielenia stosować po chemicznej obróbce substratu lignocelulozowego (obróbka kwasowa lub termohydroliza). Energochłonność mechanicznej metody przygotowania substratów, które poddano uprzednio (fizyko)chemicznej obróbce była mniejsza o 20–80%, w zależności od zastosowanych parametrów.

Metody fizykochemiczne

Fizykochemiczne metody wstępnego traktowania lignocelulozy charakteryzują się większą efektywnością od metod fizycznych. Zalicza się do nich działanie nasyconą parą wodną, wodą, amoniakiem i ditlenkiem węgla przy podwyższonym ciśnieniu i temperaturze. Najlepiej zbadaną spośród wymienionych metod jest działanie parą wodną o wysokiej temperaturze (do 290°C) i ciśnieniu (0,69–4,85 MPa), w czasie od kilku sekund do kilku minut, po czym szybkie chłodzenie (z ang. steam explosion – SE). Głównym celem tej metody jest degradacja części hemiceluloz i ligniny i tym samym zwiększenie dostępności celulozy dla enzymów hydrolitycznych [10, 24]. Ruiz i in. [22] poddając obróbce parą wodną (220°C/5 min) łodygi słonecznika osiągnęli wydajność 96-godzinnej hydrolizy enzymatycznej celulozy na poziomie 72%, wobec 18% uzyskanych w próbie kontrolnej.

Inną metodą, w której stosuje się wysoką temperaturę i ciśnienie, jest termohydroliza (z ang. liquid hot water – LHW), czyli traktowanie surowców gorącą wodą pod ciśnieniem większym niż 5 MPa w temperaturze 170–230°C. Głównym celem jest częściowa hydroliza hemiceluloz oraz ich oddzielenie od celulozy, a uzyskany efekt zależy od parametrów obróbki, tj. temperatury i ciśnienia wody, czasu trwania oraz rodzaju substratu. Kwasowość środowiska utrzymywana jest w zakresie pH 4–7, co sprzyja hydrolizie, a jednocześnie ogranicza głęboką degradację polisacharydów. Pérez i in. [21], poszukując najkorzystniejszych parametrów termohydrolizy słomy pszennej, za najlepsze uznali zastosowanie wody o temperaturze 188°C w czasie 40 minut, co pozwoliło na osiągnięcie wydajności hydrolizy enzymatycznej na poziomie 79,8% teoretycznej wydajności glukozy.

Kolejna z metod: AFEX – ammonia fibre explosion – polega na traktowaniu biomasy amoniakiem pod dużym ciśnieniem. Proces jest prowadzony z udziałem amoniaku w stężeniach: od 0,6–2 g · g⁻¹ s.s. lignocelulozy, w temperaturach: od pokojowej (10–60 dni), aż do 120°C (kilka minut). Gwałtowne obniżenie ciśnienia i rozprężenie amoniaku powoduje pęcznienie surowca oraz zniszczenie wiązań pomiędzy ligniną a polisacharydami kompleksu, co więcej, następuje częściowa amorfizacja celulozy. Lotność amoniaku pozwala na jego szybkie i łatwe oddzielenie oraz recykling, ponadto biomasa może być poddana hydrolizie enzymatycznej bez uprzedniej detoksykacji. Jednakże, po zastosowaniu omawianej metody obróbki, konieczne jest użycie w kolejnym etapie obok enzymów celulolitycznych również hemicelulaz, gdyż w warunkach metody AFEX pentozany nie ulegają depolimeryzacji [1, 7, 10].

Kim i in. [14] poddali obróbce metodą AFEX oraz LHW wywar zbożowy po produkcji bioetanolu. Zarówno po zastosowaniu metody AFEX (dodatek amoniaku 0,8 g · g⁻¹ s.s. wywaru, 70°C · 5 min⁻¹), jak i LHW (160 · C · 20 min⁻¹) wydajność hydrolizy enzymatycznej celulozy, przeprowadzonej w kolejnym etapie, osiągnęła poziom 90% po 24 h.

Interesującą metodą wydaje się mikrofalowe ogrzewanie substratu lignocelulozowego, w połączeniu z działaniem alkaliów. Mikrofałe wykazują selektywność

względem bardziej polarnych składników, prowadząc tym samym do nierównomiernego ogrzewania wnętrza materiału, co prawdopodobnie wiąże się z szeregiem „mikroeksplozji”, intensyfikującym degradację kompleksu lignocelulozowego. Hu i Wen [11] stosując wstępną, 2-godzinną inkubację prosa różgowego w roztworze wodorotlenku sodu (stężenie s.s. substratu $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, 10% udział NaOH), w temperaturze 20°C , a następnie ogrzewanie mikrofalowe – 190°C w ciągu 30 minut, uzyskali wydajność hydrolizy enzymatycznej na poziomie 58,5 g glukozy i ksylozy łącznie ze 100 g biomasy, co stanowiło prawie 99% wydajności teoretycznej.

Metody chemiczne

W chemicznych metodach obróbki wstępnej lignocelulozy wykorzystywane są kwasy (organiczne i nieorganiczne), alkalia i nadtlenki, w wyniku działania których uzyskuje się różne efekty końcowe. Jednym z powszechniejszych sposobów jest stosowanie kwasu siarkowego (w stężeniu 0,05–5% i większym) w środowisku o temperaturze $100\text{--}200^\circ\text{C}$. W tych warunkach znaczna część ligniny jest uwalniana z kompleksu i wytrącana z jednoczesną hydrolizą niektórych polisacharydów, głównie hemiceluloz. Wymienionym zmianom towarzyszy również zwiększenie dostępności celulozy dla enzymów hydrolitycznych. Hydroliza hemiceluloz prowadzi do uwolnienia cukrów prostych, które mogą być degradowane do produktów takich jak: furfural (z pentoz), hydroksymetylofurfural (z heksoz), ponadto z grup acetylowych hemiceluloz uwalniany jest kwas octowy. Związki te wpływają inhibująco na proces hydrolizy oraz hamują wzrost mikroorganizmów odpowiedzialnych za fermentację alkoholową. Powstawanie furfuralu i hydroksymetylofurfuralu wiąże się ponadto ze stratą cukrów podlegających fermentacji, co skutkuje obniżeniem wydajności procesu [7, 16]. Metodę tę proponuje się jako korzystną w odniesieniu do surowców drzewnych [31, 32]. Surowiec po kwasowej obróbce wstępnej, przed poddaniem go hydrolizie enzymatycznej, wymaga przeprowadzenia neutralizacji (powstaje CaSO_4 – gips jako produkt uboczny) i detoksykacji (np. z zastosowaniem wodorotlenku wapnia, węgla aktywnego). Stosowanie wysokich stężeń kwasu siarkowego (10–30%) nie jest korzystną metodą, z uwagi na powstawanie znacznych ilości inhibitorów hydrolizy i fermentacji, i związaną z tym istotną stratą cukrów [10]. Guo i in. [9] wykazali, że zastosowanie kwasu siarkowego w stężeniu 3% (121°C) w obróbce wstępnej miskanta chińskiego pozwala na zniszczenie struktury kompleksu lignocelulozowego.

Do alkalicznych metod obróbki wstępnej wykorzystuje się: tlenek wapnia, wodorotlenek wapnia (lime), amoniak, czy też wodorotlenek sodu. Większość z tych związków oddziałuje na acetylowe grupy hemiceluloz i wiązania estrowe pomiędzy ligniną i pozostałymi polimerami, powodując częściowe upłynnienie kompleksu i usunięcie znacznej części ligniny [7]. Takie sposoby są przydatne głównie do obróbki pozostałości rolniczych (np. słomy) [1]. Jednym z nich jest stosowanie wodnego roztworu amoniaku (SAA – soaking in aqueous ammonia), gdzie stopień

delignifikacji i wydajność hydrolizy enzymatycznej w kolejnym etapie zależą od zastosowanych parametrów, tj. temperatury i czasu procesu oraz stężenia amoniaku. Ko i in. [15] za optymalne warunki obróbki słomy ryżowej uznali: stężenie amoniaku 21% (w/w), temperatura procesu – 69°C, czas – 10 h, stosunek frakcji stałej do płynnej – 1 : 6 (w/w). Zastosowanie wymienionych parametrów podczas obróbki wstępnej skutkowało usunięciem około 60% ligniny oraz pozwoliło na uzyskanie około 70% wydajności uwalniania glukozy (po hydrolizie enzymatycznej).

Kim i in. [13] potwierdzili wysoką efektywność obróbki z zastosowaniem amoniaku i za najbardziej korzystne warunki obróbki wstępnej plew jęczmiennych uznali: stężenie amoniaku 15% (w/w), temperatura procesu – 75°C, czas – 48 h, stosunek frakcji stałej do płynnej – 1 : 12 (w/w). W tych warunkach uzyskali stopień delignifikacji około 60%, wydajność hydrolizy enzymatycznej celulozy na poziomie 83% i ksylanu 63%.

Obiecującą metodą wydaje się stosowanie wodorotlenku wapnia, gdyż jony wapniowe wykazują szczególne powinowactwo do ligniny, powodując jej sieciowanie, w związku z czym mimo jej obecności, możliwa jest efektywna hydroliza enzymatyczna polisacharydów. Zadowolające rezultaty uzyskali Xu i in. [28] stosując stężenie $\text{Ca}(\text{OH})_2$ $0,1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ biomasy (proso różgowe), w temperaturze 50°C, w czasie 24 h. Wydajność hydrolizy celulozy i ksylanu kształtowała się na poziomie około 65%, mimo niskiego stopnia delignifikacji. Ponadto zauważono, iż obecność jonów wapnia w środowisku zmniejsza straty cukrów.

Kim i Holtzapple [12] stosując podobną metodę w obróbce słomy kukurydzianej uzyskali korzystniejsze rezultaty (wydajność hydrolizy celulozy 93% i ksylanu 80%), jednak parametry procesu były bardziej rygorystyczne: czas 4 tygodnie, dodatek wodorotlenku wapnia $0,5 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ biomasy i temperatura 55°C.

Porównanie czterech różnych metod wstępnego traktowania słomy kukurydzianej przeprowadzili Chen i in. [6]. Po zastosowaniu kwasu siarkowego, wodorotlenku sodu, wodorotlenku wapnia lub amoniaku z kwasem solnym do degradacji słomy kukurydzianej, najwyższą wydajność uwalniania cukrów redukujących po hydrolizie enzymatycznej substratu uzyskali po jego obróbce przy wykorzystaniu wodorotlenku sodu, natomiast najniższą – kwasu siarkowego. Wymienieni autorzy zaobserwowali ponadto korelację pomiędzy stopniem delignifikacji i wydajnością hydrolizy enzymatycznej. Metoda z zastosowaniem wodorotlenku sodu pozwoliła na osiągnięcie korzystnego stopnia delignifikacji – 74% i wydajności hydrolizy enzymatycznej tak przygotowanego substratu – 81%, wobec odpowiednio 12% i niespełna 40%, przy zastosowaniu kwasu siarkowego. W doświadczeniu z udziałem kwasu siarkowego stężenie uwalnianego kwasu octowego w hydrolizacie było najwyższe ($350 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), podobnie jak furfuralu ($10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), którego obecności nie stwierdzono w hydrolizatach po obróbce alkalicznej. Straty celulozy w każdej z metod obróbki wstępnej nie przekraczały 8%, w stosunku do jej zawartości w substracie, podczas gdy straty hemicelulozy (w wyniku przejścia do fazy ciekłej) wahały się w granicach od około

15% (dla $\text{Ca}(\text{OH})_2$) do ponad 75% (dla H_2SO_4). Przedstawione rezultaty badań udowodniły większą przydatność obróbki alkalicznej niż kwasowej dla słomy kukurydzianej, zarówno pod względem wydajności uwalniania cukrów redukujących po hydrolizie enzymatycznej, strat polisacharydów, a także powstawania inhibitorów hydrolizy i fermentacji.

Metody biologiczne

Biologiczne metody degradacji surowców lignocelulozowych charakteryzują się niskimi nakładami energetycznymi i łagodnymi warunkami procesu, w przeciwieństwie do większości metod chemicznych i fizykochemicznych, jednakże przebiegają zbyt wolno, aby znaleźć zastosowanie w produkcji etanolu celulozowego na skalę przemysłową. W wyniku rozwoju mikroorganizmów mogą następować straty polisacharydów w substracie, obniżając wydajność uwalniania cukrów podlegających fermentacji.

Wśród mikroorganizmów o stwierdzonych zdolnościach lignolitycznych wymienia się: grzyby białej, brunatnej i szarej zgnilizny (z ang. odpowiednio: white-, brown- and soft-rot fungi). Wytwarzają one enzymy degradujące ligninę, jak również celulozę i hemicelulozy, a uzyskany poziom przemian biomasy lignocelulozowej zależy od specyficznych właściwości stosowanego szczepu [7, 24]. Za najbardziej efektywne uznawane są grzyby białej zgnilizny (takie jak *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Pleurotus ostreatus*), dzięki którym można uzyskać najwyższy stopień delignifikacji [1].

Taniguchi in. [26] porównując efekty obróbki wstępnej słomy ryżowej z zastosowaniem 4 różnych szczepów należących do klasy *Basidiomycetes*, za dający najkorzystniejsze efekty uznali grzyb *Pleurotus ostreatus* (białej zgnilizny). Przeprowadzenie 60-dniowej obróbki biologicznej z wykorzystaniem wymienionego szczepu pozwoliło na uzyskanie delignifikacji na poziomie 41%, przy stracie masy ok. 25%. Straty celulozy po wstępnej obróbce słomy wyniosły 17%, hemicelulozy 48%, a całkowita wydajność cukrów po obu etapach (wstępnym traktowaniu i hydrolizie enzymatycznej) osiągnęła poziom 33%.

Ograniczenia w zastosowaniu metody biologicznej obróbki na skalę przemysłową związane są z długim czasem trwania, niską wydajnością hydrolizy enzymatycznej i stratami cukrów, tak więc determinują konieczność poszukiwania nowych szczepów, charakteryzujących się większą selektywnością względem składników kompleksu i zapewniających uzyskanie pożądanych efektów w krótszym czasie.

Porównując wszystkie – kolejno omówione – metody wstępnej obróbki surowców lignocelulozowych należy stwierdzić, że efekty ich zastosowania, tzn. delignifikacja, dekrystalizacja celulozy, degradacja hemiceluloz, wzrost dostępnej powierzchni substratu, uwalnianie inhibitorów mają kluczowy wpływ na procesy hydrolizy enzymatycznej i fermentacji. Usunięcie znacznej ilości ligniny, ograniczenie tworzenia inhibitorów, niskie zużycie energii, wody i związków chemicznych i możliwość

prowadzenia obróbki wstępnej w systemie ciągłym stanowią najważniejsze aspekty, pozwalające na obniżenie kosztów procesu i umożliwiające zastosowanie danej metody na skalę przemysłową. Zastosowanie wodorotlenku wapnia, amoniaku, pary wodnej czy też termohydrolyzy jest bardziej opłacalne niż stężonych kwasów i rozpuszczalników organicznych (uwzględniając ekonomikę procesu i uzyskane w wyniku obróbki efekty).

Podsumowanie

Biomasa lignocelulozowa zawarta w odpadach rolniczych, leśnych czy komunalnych stanowi potencjalnie niewyczerpalne i tanie źródło do produkcji bioetanolu II generacji. Problemem dotychczas nierozwiązanym jest opracowanie technologii produkcji etanolu celulozowego o cenie zbliżonej do ceny paliw pozyskiwanych z ropy naftowej. Ze względu na złożoność i odporność na degradację kompleksu lignocelulozowego niezbędne jest przeprowadzenie wstępnego traktowania surowca przed hydrolizą i fermentacją. Skuteczna obróbka wstępna powinna zapewnić m.in. zniszczenie krystalicznej struktury celulozy, rozdział ligniny od celulozy i zwiększenie dostępności substratu, aby możliwe było przeprowadzenie w kolejnym etapie jego hydrolizy, a następnie fermentacji uwolnionych cukrów. Ograniczenie powstawania inhibitorów hydrolizy i fermentacji, niskie zużycie wody, energii i środków chemicznych, zagospodarowanie wszystkich składników kompleksu lignocelulozowego i możliwość prowadzenia jego obróbki wstępnej w systemie ciągłym pozwalają osiągnąć wysoką efektywność i opłacalność procesu. Biorąc pod uwagę powyższe uwarunkowania, termohydrolyza, działanie parą wodną pod wysokim ciśnieniem, stosowanie amoniaku i wodorotlenku wapnia uważane są za bardziej korzystne metody w porównaniu do procedur z udziałem stężonych kwasów czy też frakcjonowania rozpuszczalnikami.

Literatura

- [1] Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J. 2010 Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis. A review. *Bioresour. Technol.* 101: 4851–4861.
- [2] Anderson W.F., Akin D.E. 2008. Structural and chemical properties of grass lignocellulose related to conversion for biofuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 355–366.
- [3] Balat M., Balat H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Appl. Energy* 86: 2273–2282.
- [4] Bura R., Chandra R., Saddler J. 2009. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. *Biotechnol. Prog.* 25(2): 315–322.
- [5] Chandra R.P., Bura R., Mabee W.E., Berlin A., Pan X., Saddler J.N. 2007. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108: 67–93.
- [6] Chen M., Zhao J., Xia L. 2009. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. *Biomass Bioenergy* 33: 1381–1385.
- [7] Da Costa Sousa L., Chundawat S. Ps, Balan V., Dale B.E. 2009. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20: 339–347.

- [8] García-Cubero M.T., González-Benito G., Indacochea I., Coca M., Bolado S. 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresour. Technol.* 100: 1608–1613.
- [9] Guo G.-L., Chen W.-H., Chen W.-H., Men L.-C., Hwang W.-S. 2008. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 99: 6046–6053.
- [10] Hendriks A.T.W.M., Zeeman G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 100: 10–18.
- [11] Hu Z., Wen Z. 2008. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochem. Eng. J.* 38: 369–378.
- [12] Kim S., Holtzaple M.T. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 1994–2006.
- [13] Kim T.H., Taylor F., Hicks K.B. 2008. Bioethanol production from barley hull using SAA (soaking in aqueous ammonia) pretreatment. *Bioresour. Technol.* 99: 5694–5702.
- [14] Kim Y., Hendrickson R., Mosier N.S., Ladisch M.R., Bals B., Balan V., Dale B.E. 2008. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. *Bioresour. Technol.* 99: 5206–5215.
- [15] Ko J.K., Bak J.S., Jung M.W., Lee H.J., Choi I.-G., Kim T.H., Kim K.H. 2009. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresour. Technol.* 100: 4374–4380.
- [16] Kootstra A.M.J., Beeffink H.H., Scott E.L., Sanders J.P.M., 2009, Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat. *Biochem. Eng. J.* 46: 126–131.
- [17] Kumar R., Mago G., Balan V., Wyman C.E. 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour. Technol.* 100: 3948–3962.
- [18] Malherbe S., Cloete T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 1: 105–114.
- [19] Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y.Y., Holtzaple M., Ladisch M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96: 673–686.
- [20] Pedersen, M., Meyer, A.S., 2009, Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biotechnol. Prog.* 25: 399–408.
- [21] Pérez J.A., Ballesteros I., Ballesteros M., Sáez F., Negro M.J., Manzanares P. 2008. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* 87: 3640–3647.
- [22] Ruiz E., Cara C., Manzanares P., Ballesteros M., Castro E. 2008 Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 160–166.
- [23] Sainz M.B. 2009. Commercial cellulosic ethanol: The role of plant-expressed enzymes. *In Vitro Cell. Dev. Biol., Plant* 45: 314–329.
- [24] Sánchez Ó.J., Cardona C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270–5295.
- [25] Sassner P., Galbe M., Zacchi G. 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy* 32: 422–430.
- [26] Taniguchi M., Suzuki H., Watanabe D., Sakai K., Hoshino K., Tanaka T. 2005. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J. Biosci. Bioeng.* 100(6): 637–643.
- [27] Tokarzewska-Zadora J., Rogalski J., Szczodrak J. 2005. Enzymy rozkładające ksyłan – charakterystyka i zastosowanie w biotechnologii. *Biotechnologia* 2(69): 163–182.
- [28] Xu J., Cheng J.J., Sharma-Shivappa R.R., Burns J.C. 2010. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresour. Technol.* 101: 2900–2903.
- [29] Zaldívar J., Nielsen J., Olsson L. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17–34.
- [30] Zhang Y.-H.P. 2008. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 367–375.
- [31] Zhu J.Y., Pan X.J. 2010. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresour. Technol.* 101: 4992–5002.
- [32] Zhu J.Y., Pa, X.J., Wan, G.S., Gleisner R. 2009. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresour. Technol.* 100: 2411–2418.
- [33] Zhu W., Zhu J.Y., Gleisner R., Pan X.J. 2010. On energy consumption for size-reduction and yields from subsequent enzymatic saccharification of pretreated lodgepole pine. *Bioresour. Technol.* 101: 2782–2792.

Importance of selecting lignocellulosic substrate pretreatment method with regard to bioethanol production efficiency

Key words: lignocellulose, pretreatment, bioethanol

Summary

Perspectives of biofuel market development in Poland and all over the world are related to second generation fuels which can be obtained from agricultural, municipal and forest lignocellulosic residues. Currently, research are carried out to develop an efficient and cost-effective technology for cellulosic ethanol production at competitive production costs. It is essential to learn the partial mechanisms of process stages (pretreatment, hydrolysis and fermentation of degradation products) and to define the sequential correlations. Pretreatment effectiveness of lignocellulosic substrates used to bioethanol production affects successive stages and final process efficiency.

This study presents examples of improving lignocellulosic substrate pretreatment methods in the context of their influence on successive processes with regard to technological, economical and ecological aspects of ethanol production.

