

## ROLA OBRÓBKII WSTĘPNEJ BIOMASY LIGNOCELULOZOWEJ W PRODUKCJI BIOETANOLU II GENERACJI

*Katarzyna Robak, Maria Balcerek*

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności  
Politechnika Łódzka  
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź  
e-mail: katarzyna.robak@dokt.p.lodz.pl

**Streszczenie.** Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu doniesień literaturowych dotyczących produkcji bioetanolu II generacji, ze szczególnym uwzględnieniem roli obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej. W artykule scharakteryzowano bazę surowcową i etapy wytwarzania bioetanolu oraz oceniano potencjalne korzyści związane z produkcją bioetanolu otrzymywanego z biomasy lignocelulozowej. Oprócz tego podkreślono trudności eksploatacji biomasy lignocelulozowej spowodowane głównie krystaliczną strukturą celulozy i występowaniem w strukturze biomasy ligniny. Przedstawiono klasyfikację wiodących metod obróbki wstępnej i ich konieczność dla efektywnego przygotowania surowców do fermentacji etanolowej. Omówiono zasadność doboru odpowiednich metod obróbki wstępnej biomasy, wskazując potencjalne korzyści, jak i straty powodowane stosowaniem nieodpowiednich reagentów i warunków. Przedstawiono problemy związane z użytkowaniem środków chemicznych podczas etapu obróbki wstępnej, obejmujące m. in. koszt zakupu, recykling odczynników, korozję sprzętu, konieczność neutralizacji bądź usunięcia przed etapem fermentacji. Zwrócono także uwagę na parametry procesowe, stosowane enzymy, drożdże i inne mikroorganizmy wykazujące uzdolnienia do fermentacji heksoz i pentoz generowanych podczas hydrolizy celulozy i hemicelulozy.

**Słowa kluczowe:** bioetanol II generacji, biomasa lignocelulozowa, produkcja bioetanolu II generacji, obróbka wstępna

### WSTĘP

Rozwój przemysłu i urbanizacja zmniejszają sukcesywnie rezerwy nieodnawialnych paliw kopalnych, takich jak węgiel i ropa naftowa. Sektor transportu na całym świecie jest prawie w całości zależny od paliw ropopochodnych i emituje ponad 70% globalnego tlenu węgla i 19% dwutlenku węgla (Goldemberg 2008). Wzrost zapotrzebowania na surowce energetyczne i troska o środowisko motywują do

poszukiwania zrównoważonych, łagodnych dla środowiska alternatywnych źródeł energii. Odnawialnymi biopaliwami, które zmniejszają zależność od paliw kopalnych, są m. in. bioetanol i biodiesel.

Zgodnie z ustawą o biokomponentach i biopaliwach bioetanol to ciekły alkohol etylowy wytwarzany z biomasy, w tym bioetanol zawarty w eterze etylo-tert-butylowym lub eterze etylo-tert-amylowym (art. 2. Ustawa 2006). Ciekły bioetanol dzieli się na bioetanol I, II i III generacji. Pierwsza generacja wykorzystuje do produkcji typowe rośliny uprawne bogate w skrobię (kukurydzę, pszenicę, ryż) i sacharozę (trzcinę cukrową, buraki cukrowe, słodkie sorgo). Bioetanol II generacji produkowany jest z odpadowej, niezagospodarowanej biomasy lignocelulozowej (Gnansounou 2010). Trzecia generacja bioetanolu wykorzystuje glony jako surowiec (Kang i in. 2014a). Bioetanol jest najczęściej używanym biopaliwem/biokomponentem na całym świecie (Balat 2011).

Światowa produkcja bioetanolu wzrosła z 50 mln m<sup>3</sup> w 2007 roku do ponad 100 mln m<sup>3</sup> w 2012 roku (Kang i in. 2014b). Brazylia i Stany Zjednoczone zapewniają około 80% światowych dostaw bioetanolu I generacji na świecie.

Konwersja biomasy lignocelulozowej do bioetanolu II generacji napotyka trudności ekonomiczne i technologiczne (Cardona i in. 2006). Paliwa ciekłe można otrzymać w procesie termochemicznym i biochemicznym. W pierwszym procesie biomasa ulega rozpadowi termicznemu i prawie wszystkie składniki organiczne biomasy są przekonwertowane. Natomiast proces biochemiczny wykorzystuje jedynie polisacharydy z biomasy, które są konwertowane do cukrów i poddawane fermentacji. Konwersja biomasy do cukrów stanowi główną przeszkodę technologiczną do produkcji opłacalnych biopaliw ciekłych (Gomez i in. 2008).

Celem niniejszego artykułu było dokonanie przeglądu doniesień literaturowych na temat otrzymywania bioetanolu II generacji, z wyszczególnieniem wiodących metod obróbki wstępnej i jej roli dla skutecznego i sprawnego przeprowadzenia hydrolizy enzymatycznej i fermentacji.

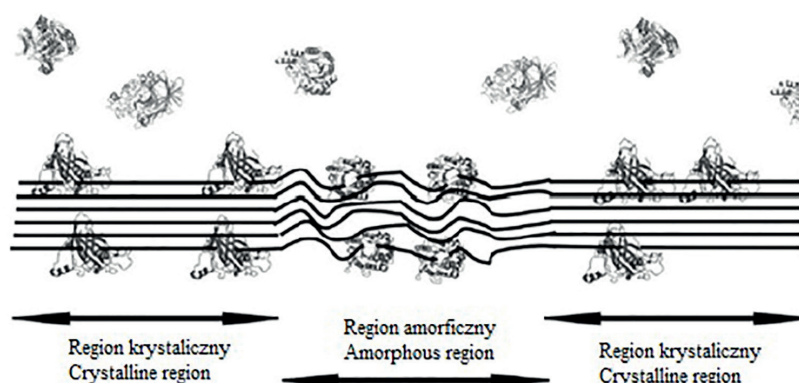
#### BAZA SUROWCOWA DO PRODUKCJI BIOETANOLU II GENERACJI

Biomasa lignocelulozowa wykazuje ogromny potencjał do produkcji biopaliw płynnych, biorąc pod uwagę: dostępność na dużą skalę, niski koszt i niską emisyjność gazów cieplarnianych (Delucci 1991). Źródłem biomasy lignocelulozowej do produkcji bioetanolu są surowce niejadalne. Ideą produkcji bioetanolu II generacji jest to, aby bezużyteczne przemysłowo odpady lignocelulozowe zostały przekształcone w biopaliwo. Technologia może wykorzystywać wiele pierwotnych i wtórnych źródeł biomasy. Źródłami pierwotnymi są uprawy roślin energetycznych, np. miskanta, bambusa, prosa różgowego, ślazuwca pensylwańskiego, wierzby energetycznej. Obawa przed niezaspokojeniem rosnącego popytu na paliwa płynne

przez wykorzystanie tylko odpadowej biomasy skłoniła do wykorzystania upraw dedykowanych. Pozostałości z procesów produkcyjnych stanowią źródła wtórne, do których należą odpady z: 1) rolnictwa, np. pozostałości poźniwne (śruta słomiana); 2) gospodarki leśnej (trociny, wióry, ścinki, odpady z kory, liście) (Werther i in. 2000, Bääth i in. 2002); 3) przetwórstwa produktów roślinnych (wyłoki, wysłodki, łuski ryżu, łupiny orzechów, sojowe i słonecznikowe, kolby kukurydzy) (Demirbas 2009). Natomiast źródłami trzeciorzędowymi są odpady organiczne pochodzące z zakładów komunalnych (odpady ulegające biodegradacji z pielęgnacji terenów zielonych, suszony obornik, makulatura) (Fischer i Schrattenholzer 2001).

### STRUKTURA BIOMASY LIGNOCELULOZOWEJ

Biomasa lignocelulozowa składa się ze ściany komórkowej, którą tworzą celuloza 40-55% s. m., hemiceluloza 24-40% s. m., lignina 18-25% s. m. (Sun i Cheng 2002) oraz występujące w mniejszości ekstrakty i związki nieorganiczne, czyli tzw. popiół (Dehkhoda 2008). Wysokie stężenia ligniny i popiołu w biomacie są niekorzystne z punktu widzenia wykorzystania biomasy jako surowca do produkcji bioetanolu. Proporcje podstawowych polimerów w materiałach lignocelulozowych różnią się, co odzwierciedla wpływy genetyczne i środowiskowe (Lee i in. 2007).



**Rys. 1.** Regiony krystaliczne i amorficzne włókien celulozowych (Xiros i in. 2013)

**Fig. 1.** The crystalline and amorphous regions of cellulose fibers (Xiros *et al.* 2013)

Celuloza jest liniowym homopolimerem zbudowanym z kilkunastu do kilkuset tysięcy jednostek  $\beta$ -D-anhydroglukopiranozy, które są połączone wiązaniami  $\beta$ -1,4- glikozydowymi. Równoległe ułożone względem siebie łańcuchy celulozowe upakowane są w mikrofibryle celulozowe, które są stabilizowane wewnątrzcząsteczkowymi wiązaniami wodorowymi i oddziaływaniami van der Waalsa. Struktura włókien celulozowych ma charakter krystaliczny w wyniku obecności rozległych wiązań wodorowych. Struktura krystaliczna włókien celulozowych czyni

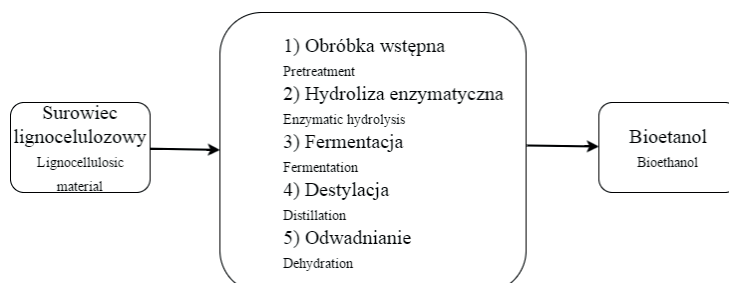
lignocelulozę wysoce odporną na ataki enzymów hydrolitycznych (Ebringerova i in. 2005). Regiony krystaliczne celulozy cechują się wysokim uporządkowaniem w przeciwieństwie do regionów amorficznych (rys. 1). Amorficzne mikrowłókna celulozowe wykazują zwiększoną podatność na degradację enzymatyczną. Mikrofibrylle celulozowe zanurzone w matrycy hemicelulozowo-ligninowej formują wiązki makrofibrylli, które stabilizowane są wiązaniami kowalencyjnymi i wodorowymi (Fernandes i in. 2011).

Hemicelulozy to rozgałęzione heteropolimery, które charakteryzują się niższą masą cząsteczkową niż celuloza. Składają się z pentoz (np. ksylozy i arabinozy), heksoz (np. mannozy, galaktozy) i kwasów uronowych (np. kwas glukuronowy). Obecność rozgałęzionych łańcuchów bocznych i amorficzny charakter sprawiają, że polimer ten jest bardziej podatny na hydrolizę niż celuloza. Hemicelulozy pogrupowane są na ksylany, ksyloglukany, mannany i glukomannany. Wyróżnia się również inne typy hemiceluloz, jak arabinogalakتان, galaktoglukomannan, arabinoglukuronoksylan i glukuronoksylan (Krajewski i Witomski 2003). Hydroliza hemiceluloz wymaga zastosowania wielu preparatów enzymatycznych, co wiąże się z ich różnorodną budową (Carvalho i in. 2008).

Lignina jest bezpostaciowym polimerem z grupy związków aromatycznych (Geng i Li 2002). Struktura ligniny zawiera wiele grup funkcyjnych, np. hydroksylowe i karbonylowe, nadających jej wysoką polarność (Feldman i in. 1991). Struktura ligniny zawiera liczne, nieulegające hydrolizie wiązania C-C i C-O-C, które utrudniają delignifikację (Ralph i in. 2004). Z punktu widzenia produkcji bioetanolu duża zawartość ligniny w biomasie lignocelulozowej jest czynnikiem niekorzystnym. Związek ten wykazuje oporność na degradację chemiczną i biologiczną, blokując enzymom hydrolitycznym dostęp do polisacharydów (Pan i in. 2005, Taherzadeh i Karimi 2008). Powierzchnia ligniny adsorbuje enzymy celulozowe, a to prowadzi do ich inaktywacji (Rahikainen i in. 2011). Poza tym lignina nie zwiększa puli monocukrów podczas scukrzania. Efektywność hydrolizy celulozy w obecności ligniny jest niższa, co zmniejsza końcową wydajność fermentacji.

#### CHARAKTERYSTYKA ETAPÓW WYTWARZANIA BIOETANOLU Z BIOMASY LIGNOCELULOZOWEJ

Produkcja bioetanolu jest procesem wieloetapowym, składającym się z obróbki wstępnej, hydrolizy enzymatycznej, fermentacji cukrów, destylacji i odwodnienia etanolu. Główne etapy produkcji bioetanolu przedstawia rysunek 2. Procesy poprzedzające etap fermentacji ukierunkowane są na oddzielenie ligniny i hemiceluloz od cząsteczek celulozy (Lynd i in. 2005).



**Rys. 2.** Etapy produkcji bioetanolu II generacji (opracowanie własne)

**Fig. 2.** Production stages of second generation bioethanol (own work)

### Obróbka wstępna

Rolą obróbki wstępnej jest naruszenie struktury ligniny oraz dekrystalizacja i depolimeryzacja celulozy w celu zwiększenia jej reaktywności i uzyskania wyższej wydajności cukrów fermentowalnych. Oddzielenie celulozy od pozostałych polimerów matrycy zwiększa dostępną powierzchnię polisacharydów dla enzymów hydrolitycznych i ogranicza ich dawkę (Mosier i in. 2005, Agbor i in. 2011). Jeśli obróbka wstępna jest przeprowadzana w zbyt ekstremalnych warunkach, to w następstwie wytwarzane są toksyczne związki – inhibitory, np. kwasy karboksylowe, pochodne furanów, związki fenolowe (Klinke i in. 2002). Pochodzą one z degradacji pentoz i heksoz i hamują hydrolizę enzymatyczną oraz fermentację. Obróbka wstępna biomasy celulozowej przeprowadzana w niedrogi sposób jest wyzwaniem dla naukowców, a to uzasadnia badania ukierunkowane na opracowanie optymalnych metod obróbki wstępnej, pozwalających na zminimalizowanie dawek enzymów i skrócenie czasu biokonwersji biomasy do etanolu (Chandel i in. 2007).

### Klasyfikacja metod obróbki wstępnej

Wyróżnia się następujące metody obróbki wstępnej: biologiczne, fizyczne, chemiczne i fizyko-chemiczne. Nie wszystkie z metod obróbki wstępnej są już wystarczająco opracowane, aby mogły być zastosowane w skali przemysłowej. Koszt obróbki wstępnej biomasy plasuje się na drugim miejscu (19-22%), zaraz za surowcem lignocelulozowym (30-32%) (Yang i Wyman 2008). Najbardziej popularnymi metodami są eksplozja parowa i obróbka rozcieńczonym kwasem (Hendriks i Zeeman 2009).

**Tabela 1** Zalety i wady wybranych metod obróbki wstępnej biomasy lignocelulozowej. Opracowanie własne na podstawie (Alvira i in. 2010)

**Table 1** Advantages and disadvantages of selected methods of lignocellulosic biomass pre-treatment. Own work based on (Alvira *et al.* 2010)

Metody obróbki wstępnej Pretreatment method	Zalety Advantages	Wady Disadvantages
Biologiczna Biological	Degradacja ligniny Degradation of lignin Brak konieczności zakupu odczynników i specjalnej aparatury There is no need to buy reagents and special apparatus Niskie zużycie energii Low energy consumption	Wolne tempo hydrolizy Low rate of hydrolysis Długi czas trwania procesu Long duration of process
Mielenie Milling	Zmniejszenie krystaliczności celulozy Reduction of cellulose crystallinity	Wysokie zużycie mocy i energii High power and energy consumption
Ozonoliza Ozonolysis	Ozon nie zanieczyszcza środowiska Ozone does not pollute the environment  Skuteczna delignifikacja Effective delignification Nie generuje toksycznych związków It does not generate toxic compounds	Kosztowna – wysokie zużycie ozonu It is expensive – high ozone consumption
Rozpuszczalniki organiczne Organosolv	Hydroliza ligniny Hydrolysis of lignin  Odzysk relatywnie czystej ligniny Recovery of relatively pure lignin	Wysoki koszt High cost  Potrzeba odwodnienia i recyklingu rozpuszczalników There is the need for dehydration and recycling of solvents
Stężony kwas Concentrated acid	Wysoka wydajność glukozy High glucose yield  Warunki otoczenia Ambient conditions	Wysoki koszt kwasu i potrzeba recyklingu High cost of acid and the need for recycling Problemy z korozją reaktorów Reactors corrosion problems Ryzyko powstawania inhibitorów Risk of creating inhibitors
Rozcieńczony kwas Diluted acid	Naruszenie struktury ligniny Violation of lignin structure	Powstają produkty degradacji Formation of degradation products

**Tabela 1 cd.**  
**Table 1 cont.**

Metody obróbki wstępnej Pretreatment method	Zalety Advantages	Wady Disadvantages
Eksplzja parowa Steam explosion	Transformacja ligniny Transformation of lignin Rozpuszczanie hemiceluloz Dissolution of hemicelluloses Brak negatywnego wpływu na środowisko Lack of negative impact on the environment  Wysoka wydajność glukozy High glucose efficiency	Niskie stężenie cukrów Low sugar concentration Wytwarzanie związków toksycznych Creation of toxic compounds Częściowa degradacja hemicelulozy Partial degradation of hemicellulose
AFEX AFEX	Zwiększenie dostępnej powierzchni Increase of available surface area  Poprawienie stopnia scukrzenia roślin zielnych Improving saccharification degree of herbaceous plants Częściowa dekrystalizacja celulozy hemicelulozy Partial decrystallization of cellulose hemicellulose Niska ilość związków toksycznych Low amount of toxic compounds	Niefektywna dla surowców o wysokiej zawartości ligniny Not efficient for raw materials with a high content of lignin Konieczny odzysk amoniaku Recovery of ammonia is necessary  Koszt związany ze zużyciem amoniaku Cost related to the use of ammonia
Eksplzja CO <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> explosion	Zwiększa dostępną powierzchnię Increase of available surface area  Brak tworzenia związków toksycznych Lack of creating toxic compounds	Wymaga bardzo wysokiego ciśnienia It requires very high pressure
Mokre utlenianie Wet oxidation	Skuteczne usunięcie ligniny Efficient removal of lignin  Niska ilość inhibitorów Low amount of inhibitors Minimalizacja wydatków energetycznych Minimising energy cost	Wysoki koszt tlenu i katalizatorów zasadowych High cost of oxygen and alkaline catalysts



### **Metoda biologiczna**

Obróbka biologiczna katalizowana jest przez mikroorganizmy, głównie grzyby o aktywności delignifikującej. Mikroorganizmy te charakteryzują się wybiórczym rozkładem ligniny i hemiceluloz, bez degradowania celulozy (Lang i in. 2001, Börjesson 2009). Biodelignifikacja powoduje powstawanie porów w ścianie komórkowej i poprawia podatność polisacharydów na hydrolizę enzymatyczną. Wśród mikroorganizmów wydzielających enzymy degradujące ligniny są grzyby białej, brązowej i miękkiej zgnilizny. Do grona grzybów białej zgnilizny należą m. in. gatunki takie jak: *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoleris*, *Ceriporiopsis subvermispora* (Maurya i in. 2015). Z kolei *Gloeophyllum trabeum*, *Oligoporus fragilis*, *Coniophora puteana* to przedstawiciele grzybów brązowej zgnilizny, a do grzybów miękkiej zgnilizny należą *Chaetomium spp.*, *Xylaria polymorpha* i *Cryphonectria parasitica* (Worall i in. 1997). Obróbka biologiczna zachodzi w łagodnych warunkach. Uznawana jest za metodę energooszczędną, bezpieczną, tanią, przyjazną dla środowiska i nietoksyczną. Hydroliza mykobiomasy została uznana za obiecującą metodę, która unika inhibitorów fermentacji i poprawia całkowity odzysk cukrów (Kang i in. 2014a). Wolne tempo reakcji hydrolizy jest czynnikiem ograniczającym (Sun i Cheng 2002).

### **Metody fizyczne**

Metody obróbki fizycznej wykorzystują m. in. techniki mechanicznego rozdrabniania. Efektem ich działania jest redukcja wielkości cząstek (Kumar i in. 2009) i obniżenie krystaliczności biomasy. Innymi technikami dezintegracji włókna lignocelulozowego są ultradźwięki, ekstruzja, promieniowanie (Chandel i in. 2015). Ekstruzja biomasy zachodzi w ekstruderze, w którym biomasa ulega ogrzaniu, mieszaniu i ścięciu, przy ustalonej szybkości ruchu ślimaka i temperaturze cylindra (Karunanithy i in. 2008). Techniki mechanicznego rozdrabniania zaliczane są do metod energochłonnych, czasochłonnych i kosztownych. Wysokość zużycia energii zależy od typu przerabianej biomasy i końcowej wielkości cząstek (McMillan 1994, Ruffell 2008).

### **Metody chemiczne**

Chemiczne metody obróbki wstępnej mogą używać żrących lub rozcieńczonych toksycznych związków chemicznych, które powodują korozyjność infrastruktury. Oprócz tego są kosztowne i szkodliwe względem środowiska (Wan i Li 2012). Metody obróbki chemicznej obejmują obróbkę ozonem, zasadami, kwasami, rozpuszczalnikami organicznymi, cieczami jonowymi.



Ozonoliza wykorzystuje ozon do skutecznego usuwania ligniny i zwiększania biodegradowalności celulozy i hemiceluloz. Metoda przebiega w temperaturze pokojowej i nie prowadzi do formowania toksycznych produktów (Vidal i Molinier 1988). Surowce lignocelulozowe mogące być przetwarzane tą metodą to odpady z rolnictwa i gospodarki leśnej (Neeley 1984). Po wykonaniu ozonolizy (Garcia-Cubero i in. 2009) uzyskano wydajność hydrolizy enzymatycznej 88,6% dla słomy pszenicznej i 57% dla słomy żytniej w porównaniu z wydajnością 29% i 16% z prób kontrolnych. Wysokie zużycie ozonu ogranicza ten proces z powodów ekonomicznych (Kumar i in. 2009).

Obróbka alkaliczna poprawia skuteczność hydrolizy enzymatycznej. Efektami działania alkaliów na biomasę są: zakłócenie struktury ligniny, pęcznienie surowca, zwiększenie powierzchni dostępu enzymów, spadek krystaliczności celulozy i rozszczepienie wiązań między ligniną i polisacharydami (Fang i in. 1987). Usunięcie ligniny może nastąpić wraz ze znaczną częścią cukrów, np. różnymi kwasami uronowymi, które są podstawnikami hemicelulozy (Silverstein i in. 2008, Agbor i in. 2011). Obróbka alkaliczna generuje straty cukrów fermentowalnych i powstawanie składników inhibujących, lecz degradacja cukrów w reakcji zasadowej jest niższa niż przy obróbce kwasowej. Zauważono, że jest to metoda bardziej przydatna do hydrolizy odpadów rolniczych niż pochodzenia drzewnego (Kumar i in. 2009). Po przeprowadzeniu hydrolizy zasadowej wymagany jest proces neutralizacji poprzedzający hydrolizę enzymatyczną. Na etapie neutralizacji usuwane są ligniny i inhibitory.

W hydrolizie kwasowej wykorzystuje się stężone lub rozcieńczone kwasy mineralne. Kwas o stężeniu 70-90% (w/w) zapewnia pełną i szybką konwersję polisacharydów, z niewielką degradacją cukrów (Iranmahboob i in. 2002, Balat 2011). Problemami związanymi ze stężonymi kwasami są utylizacja kwasu, skażenie środowiska oraz narażenie aparatury na korozję. Opłacalność procesu wiąże się z realizacją optymalnego odzysku cukrów i efektywnym recyklingiem kwasu (Demirbas 2008). W warunkach podwyższonej temperatury rozcieńczony kwas siarkowy o stężeniu poniżej 4% (w/w) hydrolizuje hemicelulozy do monomerów oraz przyczynia się do odsłonięcia celulozy. Rozcieńczony kwas siarkowy w warunkach podwyższonej temperatury powoduje tworzenie inhibitorów fermentacji (Galbe i Zacchi 2012). Obróbka rozcieńczonym kwasem jest skuteczna dla surowców pochodzących z rolnictwa (Zhu i in. 2008). Koszt obróbki rozcieńczonym kwasem jest stosunkowo wysoki w porównaniu z metodami fizykochemicznymi (Keshwani i Cheng 2009). Hydroliza kwasowa często następuje po hydrolizie alkalicznej i odpowiada głównie za usuwanie hemiceluloz. Przed przystąpieniem do fermentacji przetworzona biomasa wymaga detoksyfikacji i neutralizacji (Zheng i in. 2009).

Rozpuszczalniki organiczne, m. in. alkohole, estry, ketony, kwasy organiczne, fenole, etery usuwają lub rozkładają ligninę razem z częścią hemiceluloz (Curreli i in. 1997). W procesie lignocelulozę poddaje się mieszanemu z cieczą organiczną

i wodą, następnie ogrzewa. W efekcie lignina ulega rozpuszczeniu z częścią hemiceluloz, a reaktywna celuloza pozostaje w fazie stałej. Lignina, ekstrahowana za pomocą rozpuszczalnika z biomasy, cechuje się wysoką czystością i niską masą cząsteczkową (Pan i in. 2005). Rozpuszczalniki organiczne wymagają warunków wysokotemperaturowych, rzędu 150-200°C. Usunięcie rozpuszczalnika, np. etanolu, z poddanej obróbce wstępnej celulozy jest konieczne, ponieważ rozpuszczalniki mogą być inhibitorami hydrolizy enzymatycznej i fermentacji. Z powodów ekonomicznych stosowanie alkoholi o niskiej masie cząsteczkowej, takich jak etanol i metanol, jest korzystniejsze od alkoholi o wyższej temperaturze wrzenia, np. glikolu etylenowego (Chum i in. 1985).

Ciecze jonowe, m. in. chlorek 1-n-butylo-3-metyloimidazoliowy i chlorek 1-allylo-3-metyloimidazoliowy określane są mianem „zielonych rozpuszczalników”. Cechują się one niską prężnością pary oraz zdolnością rozpuszczania celulozy i uczynienia jej bardziej dostępną dla enzymów celulolitycznych. Po obróbce biomasy ciecze jonowe są łatwo odzyskiwane. Ponowne wykorzystanie cieczy jonowych zmniejsza koszt procesu (Li i in. 2013).

#### **Fizykochemiczna obróbka wstępna**

W celu uczynienia celulozy bardziej dostępną na etapie hydrolizy stosuje się fizykochemiczną obróbkę wstępną. Procesy te obejmują: eksplozję parową, eksplozję CO<sub>2</sub> lub SO<sub>2</sub>, eksplozję włókien amoniakiem, ekstrahowanie gorącą wodą, mokre utlenianie (Chandel i in. 2015).

Eksplozja parowa poprawia hydrolizę hemicelulozy i wspiera delignifikację. Metoda eksplozji parą jest powszechnie stosowana. Jej potencjał tkwi w zmniejszeniu nakładów inwestycyjnych wraz z poprawą efektywności energetycznej. Modyfikacjami eksplozji parowej są eksplozja CO<sub>2</sub> lub SO<sub>2</sub>. W metodach tych używa się katalizatorów w postaci H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (lub SO<sub>2</sub>), bądź CO<sub>2</sub>. Zastosowanie dodatkowych związków chemicznych przyczynia się do skrócenia czasu procesu, zastosowania niższych temperatur, skutecznej hydrolizy i zmniejszenia produkcji inhibitorów. Eksplozja parowa jest dedykowana do obróbki drewna twardego i odpadów z rolnictwa. Mniejsza skuteczność jest osiągnięta dla drewna miękkiego (Kumar i in. 2010). Produkty degradacji cukrów, powstałe ze zniszczenia np. ksylanu, w trakcie eksplozji parowej zmniejszają wydajność etapów hydrolizy i fermentacji.

Technika eksplozji włókien amoniakiem wykorzystuje ciekły amoniak, który oddziałuje z biomasą lignocelulozową. Proces zachodzi w warunkach wysokiej temperatury i ciśnienia, następnie powodowany jest wybuch przez obniżenie ciśnienia. W efekcie wybuchu osiągnięta jest poprawa scukrzania materiałów lignocelulozowych, m. in. roślin zielnych i traw (McMillan 1994, Abril i Abril 2009, Kumar i in. 2009). Amoniak jest zastosowany do obróbki wielu źródeł biomasy (Zheng

i in. 2009), jednak skuteczność metody jest ograniczona dla biomasy o wysokiej zawartości ligniny. Na skutek mniejszej zawartości ligniny w roślinach trawiastych otrzymuje się dla nich wydajniejszą hydrolizę enzymatyczną niż dla drewna (Balan i in. 2009). Odpowiednie dobranie warunków procesu skutkuje osiągnięciem wydajności hydrolizy enzymatycznej bliskiej wartości teoretycznej. Zużyty amoniak wymaga recyklingu.

Ekstrakcja gorącą wodą jest wykorzystywana w przemyśle celulozowym i należy do procesów hydrotermalnych (Taherzadeh i Karimi 2008). W procedurze LHW (Liquid Hot Water) biomasa lignocelulozowa namaczana jest w gorącej wodzie, przy zastosowaniu wysokiego ciśnienia. Efektem metody jest wysoka wydajność odzysku pentoz po hydrolizie enzymatycznej i rozpuszczenie 4-22% celulozy i 35-60% ligniny. Nie bez znaczenia jest generowanie niskiej ilości inhibitorów (Tomas-Pejo i in. 2008).

W procesie mokrego utleniania do zbiornika ze zmieloną biomasą lignocelulozową dodawana jest woda, następnie pompowane jest powietrze pod podwyższonym ciśnieniem i temperaturą (Pedersen i Meyer 2009). Tlen zachowuje się jak utleniacz i przyczynia się do usunięcia ligniny w ilości zależnej od rodzaju biomasy i użytych warunków reakcji. Mokre utlenianie skutecznie frakcjonuje biomasę o gęstej powłoczce woskowej zawierającej krzemionkę i białka, np. słoma pszenicy, wytloki trzciny cukrowej (Schmidt i in. 2002). Podczas mokrej oksydacji z wytlóków usuwana jest w większym stopniu frakcja lignin (ok. 50%) niż podczas ekstrakcji parą (ok. 35%), lecz mokra oksydacja uwalnia więcej inhibitorów niż eksplozja parą. Mokre utlenianie można łączyć z innymi technikami obróbki wstępnej. Połączenie eksplozji pary i mokrego utleniania nazywa się „mokrym wybuchem” (Sørensen i in. 2008).

### **Hydroliza enzymatyczna**

Proces enzymatycznego scukrzania uznany jest za najskuteczniejszy sposób uzyskania cukrów fermentowanych z biomasy (Galbe i Zacchi 2007). To etap katalizowany przez enzymy: celulazy i hemicelulazy (Zhang i in. 2015). Handlowe preparaty enzymatyczne wykorzystywane do scukrzania dostępne są w formie mieszanek kilku enzymów („koktajli enzymatycznych”) zawierających np. celulazy, celobiazę, pektynazy i inne. Enzymy są potrzebne do maksymalnej depolimeryzacji celulozy i hemicelulozy do cukrów fermentowanych przed etapem fermentacji (Chandel i in. 2015). Ksyłan rozkładany jest m. in. do wody, metanolu, kwasów karboksylowych, hydroksy-1-propanonu. Produktami rozkładu celulozy są glukan i cząsteczki glukozy. Enzymy wykorzystane do hydrolizy enzymatycznej działają w pełni selektywnie (Pike i in. 2008). Celulazy należą do III klasy enzymów. Hydrolizują one wiązania  $\beta$ -1-4-glikozydowe w celulozie. Do grupy celulaz należą: 1) endoglukanazy; 2) egzoglukanazy lub celobiohydrolazy; 3)  $\beta$ -glukozydazy (celobiazę). Endoglukanazy hydrolizują losowo dostępne wewnątrzcząsteczkowe

wiązania  $\beta$ -1,4-glikozydowe łańcuchów celulozowych. Celobiohydrolazy uwalniają celobiozę lub glukozę z końców łańcuchów celulozowych, natomiast  $\beta$ -glukozydazy hydrolizują celobiozę do glukozy (Zhang i in. 2006). Celulazy bakteryjne są wytwarzane m.in. przez szczepy z rodzaju *Clostridium sp.*, a celulazy typu grzybowego pochodzą od niektórych gatunków grzybów *Trichoderma* lub *Aspergillus*. Rozkład hemiceluloz wymaga zastosowania dużej liczby enzymów, z powodu ich skomplikowanej budowy. Enzymy hydrolizujące ksylan są produkowane przez grzyby, np. *Trichoderma* i bakterie, np. *Bacillus*. Do enzymów katalizujących hydrolizę ksylanu należą m. in. endoksyłanaza, egzoksyłanaza,  $\beta$ -ksylozydaza,  $\alpha$ -arabinofuranozydaza,  $\alpha$ -glukuronidaza (Saha 2003).

### Fermentacja

Fermentacja jest procesem biologicznym, w którym otrzymane po hydrolizie monocukry, tj. heksozy i pentozy, są konwertowane do etanolu przez różne mikroorganizmy, takie jak bakterie lub grzyby. Drożdże *S. cerevisiae* i bakterie Gram-ujemne *Zymomonas mobilis* są powszechnie stosowanymi mikroorganizmami do produkcji etanolu I generacji. Wspomniane drobnoustroje nie są zdolne do fermentowania pentozy zawartych w hydrolizatach, ponieważ brakuje im enzymów konwertujących m. in. ksylozę (Keshwani i Cheng 2009). Ponadto *Z. mobilis* wykazują umiarkowaną tolerancję na działanie kwasów i cukrów. Nie tolerują toksycznych inhibitorów obecnych w hydrolizatach lignocelulozowych, takich jak kwas octowy.

Prowadzone są badania nad konstrukcją mikroorganizmów fermentujących pentozy i heksozy pod kątem zastosowania przemysłowego, jako producentów bioetanolu, m. in. *E. coli* i *Klebsiella oxycota*, termofilnych bakterii anaerobowych (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) (Cook i Morgan 1994, Avcı i Donmez 2006). Zabiegi inżynierii metabolicznej zastosowane u drobnoustrojów fermentujących m. in. *S. cerevisiae* i *Z. mobilis* miały na celu wygenerowanie szczepów fermentujących pentozy. *Z. mobilis* zmodyfikowano przez wprowadzenie genu odpowiedzialnego za metabolizm ksylozy, wyizolowanego z *E. coli*. Utworzony rekombinant wymagał minimum składników odżywczych, wzrastał przy niskim pH i wysokich temperaturach, a także wykazywał status GRAS (Hahn-Hagerdal i in. 2006). Ksyloza może być fermentowana przez zrekombinowane szczepy *S. cerevisiae*, po wprowadzeniu do komórki mikroorganizmu heterologicznej aktywności, wyizolowanej ze szczepu drożdży lub bakterii naturalnie fermentujących ksylozę. Aktywnościami umożliwiającymi fermentację ksylozy są np. reduktaza ksylozowa (XR), która katalizuje konwersję ksylozy do ksylitolu; dehydrogenaza ksylitolowa (XDH) uczestnicząca w konwersji ksylitolu do ksylulozy (Zaldivar i in. 2001, Katahira i in. 2006).

### Destylacja i odwadnianie

Usunięcie wody z cieczy pofermentacyjnych wykonuje się w procesie destylacji poprzez wykorzystanie różnicy temperatur wrzenia substancji w roztworze. Mieszanina jest ogrzewana do temperatury wrzenia etanolu (78,2°C), co powoduje odparowanie etanolu z mieszaniny i oddzielenie od innych składników. Proces destylacji przebiega w kolumnie destylacyjnej i pozwala na oddzielenie etanolu z mieszaniny ciekłej. Następnie w kolumnie rektyfikacyjnej przebiega destylacja frakcyjna, której celem jest zateżenie etanolu do stężenia ok. 95,6% v/v (89,5 mol%), co odpowiada składem mieszaniny azeotropowej o temperaturze wrzenia 78,2°C (Kang i in. 2014c). Proces odwadniania etanolu ukierunkowany jest na otrzymanie produktu wysokiej jakości, zwanego bezwodnym etanolem. Bezwodny etanol (bioetanol) zawiera co najmniej 99,5% objętościowych etanolu (Kumar i in. 2010).

### PODSUMOWANIE

Stały postęp w opracowywaniu coraz bardziej efektywnych i energooszczędnych technologii produkcji biopaliw może sprawić, że bioetanol II generacji stanie się opłacalnym paliwem alternatywnym w wielu krajach. Jednak na podstawie dokonanego przeglądu doniesień literaturowych można wnioskować, iż zasadne są dalsze badania ukierunkowane na optymalizację parametrów procesowych (obróbki wstępnej i hydrolizy enzymatycznej) oraz dobór mikroorganizmów zdolnych do pełnego wykorzystywania substratów cukrowych i zapewniających wysoką wydajność procesu fermentacji.

### PIŚMIENNICTWO

- Abril D., Abril A., 2009. Ethanol from lignocellulosic biomass. *Cien. Inv. Agr.*, 36, 177-190.
- Agbor V.B., Cicek N., Sparling R., Berlin A., Levin D.B., 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.*, 29, 675-685.
- 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. *Bioresource Technol.*, 101, 4851-4861.
- Avcı A., Donmez S., 2006. Effect of zinc on ethanol production by two *Thermoanaerobacter* strains. *Process. Biochem.*, 41, 984-989.
- Balan V., Sousa L.C., Chundawat S.P.S., Marshall D., Sharma L.N., Chambliss C.K., Dale B.E., 2009. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*). *Biotechnol. Progr.*, 25, 365-375.
- Balat M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*, 52, 858-875.
- Bäath H., Gällerspång A., Hallsby G., Lundström A., Löfgren P., Nilsson M., Ståhl G., 2002. Remote sensing, field survey, and long-term forecasting: an efficient combination for local assessments of forest fuels. *Biomass Bioenerg.*, 22(3), 145-157.

- Börjesson P., 2009. Good or bad bioethanol from a greenhouse gas perspective – What determines this? *Appl. Energ.*, 86, 589-594.
- Cardona Alzate C.A., Sánchez Toro O.J., 2006. Energy consumption analysis of integrated flow sheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy*, 31, 2447-2459.
- Carvalho F., Duarte L.C., Girio F.M., 2008. Hemicellulose Biorefineries: A Review on Biomass Pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 849-864.
- Chandel A. K., Chan E.S, Rudravaram R, Narasu M. L., Rao L.V., Ravindra P., 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2, 14-32.
- Chandel A.K., Gonçalves B.C.M., Strap J.L, da Silva S.S., 2015. Biodelignification of lignocellulose substrates: An intrinsic and sustainable pretreatment strategy for clean energy production. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 35(3), 281-293.
- Chum H.L., Douglas L.J., Feinberg, D.A., Schroeder H.A., 1985. Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose. Solar Energy Research Institute: Golden, Colorado, 1-64.
- Cook G.M., Morgan H.W., 1994. Hyperbolic growth of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* (*Clostridium thermohydrosulfuricum*) increases ethanol production in pH-controlled batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 84-89.
- Curreli N., Fadda M.B., Rescigno A., Rinaldi A.C., Soddu G., Sollai F., Vaccargiu S., Sanjust E., Rinaldi A., 1997. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process Biochem.*, 32, 665-670.
- Dehkhoda A., 2008. Concentrating lignocellulosic hydrolysate by evaporation and its fermentation by repeated fedbatch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae*. Master thesis, Industrial Biotechnology Borås University and SEKAB E-Technology, Sweden.
- Delucci M.A., 1991. Emissions of greenhouse gases from the use of transportation fuels and electricity, Center for Transportation Research, Argonne National Laboratory, Argonne, IL., USA.
- Demirbas A., 2008. The importance of bioethanol and biodiesel from biomass. *Energ. Source*, 3, 177-185.
- Demirbas A., 2009. Biofuels securing the planet's future Energy needs. *Energ. Convers. Manage.*, 50, 2239-2249.
- Demirbas M. F., Balat M., and Balat H., 2009. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. *Energy Convers. Manage.*, 50(7), 1746-1760.
- Ebringerova A., Hromadkova Z., Heinze T., 2005. Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.*, 186, 1-67.
- Fang L.T., Gharpuray M.M., Lee Y.H., 1987. Cellulose hydrolysis biotechnology monographs. Berlin, Germany: Springer, 55.
- Feldman D., Banu D., Natansohn A., Wang J., 1991. Structure-properties relations of thermally cured epoxy-lignin polyblends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 42, 1537-1550.
- Fernandes A.N., Thomas L.H., Altaner C.M., Callow P., Forsyth V.T., Apperley D.C., Kennedy C.J., Jarvis M.C., 2011. Nanostructure of cellulose microfibrils in spruce wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1195-1203.
- Fischer G., Schrattenholzer L., 2001. Global bioenergy potentials through 2050. *Biomass Bioenerg.*, 20(3), 151-159.
- Galbe M., Zacchi G., 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, 108, 41-65.
- Galbe M., Zacchi G., 2012. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg.*, 46, 70-78.



- Garcia-Cubero M.T., Gonzalez-Benito G., Indacoechea I., Coca M., Bolado S., 2009. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technol.*, 100, 1608-1613.
- Geng X., Li K., 2002. Degradation of non-phenolic lignin by the whiterot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 60, 342-346.
- Gnansounou E., 2010. Production and use of lignocellulosic bioethanol in Europe: Current situation and perspectives. *Bioresource Technol.*, 101, 13, 4842-4850.
- Goldemberg J., 2008. Environmental and ecological dimensions of biofuels. Proceedings of the Conference on the Ecological Dimensions of Biofuels, March 10, Washington, DC.
- Gomez L.D., Steele-King C. G., McQueen-Mason S. J., 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New phytol.*, 178(3): 473-485.
- Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M.F., Liden G., Zacchi G., 2006. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.*, 24, 549-556.
- Hendriks A.T., Zeeman G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.*, 100(1), 10-18.
- Iranmahboob J., Nadim F., Monemi S., 2002. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass Bioenerg.*, 22, 401-404.
- Kang Q., Appels L., Baeyens J., Dewil R., Tan T., 2014b. Energy- efficient production of cassava-based bio-ethanol. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(12), 925-939.
- Kang Q., Appels L., Tan T., Dewil R., 2014a. Bioethanol from lignocellulosic biomass: Current findings determine research priorities. *Scientific World J.*, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/298153>
- Kang Q., Huybrechts J., van der Bruggen B., Baeyens J., Tan T.W., Dewil R., 2014c. Hydrophilic membranes to replace molecular sieves in dewatering the bio-ethanol/water azeotropic mixture. *Sep. Purif. Technol.*, 136, 144-149.
- Karunanithy C., Muthukumarappan K., Julson J.L., 2008. Influence of high shear bioreactor parameters on carbohydrate release from different biomasses. Conference Paper: Providence, Rhode Island, doi:10.13031/2013.24960
- Katahira S., Mizuike A., Fukuda H., Kondo A., 2006. Ethanol fermentation from lignocellulosic hydrolysate by a recombinant xylose- and celooligosaccharide-assimilating yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72, 1136-1143.
- Keshwani D.R., Cheng J.J., 2009. Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: a review. *Bioresource Technol.*, 100, 1515-1523.
- Klinke H.B., Ahring B.K., Schmidt A.S., Thomsen A.B., 2002. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technol.*, 82, 1, 15-26.
- Krajewski A., Witomski P., 2003. Ochrona drewna. Pod red. E. Ramus, Wyd. SGGW, Warszawa.
- Kumar P., Barrett D.M., Delwiche M.J., Stroeve P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 48, 3713-3729.
- Kumar S., Singh N., Prasad R., 2010. Anhydrous ethanol: a renewable source of energy. *Renew Sust. Energ. Rev.*, 14, 1830-1844.
- Lang X., Macdonald D.G., Hill G.A., 2001. Recycle bioreactor for bioethanol production from wheat starch II. Fermentation and economics. *Energ. Source*, 23, 427-436.
- Lee D., Owens V.N., Boe A., Jeranyama P., 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks. South Dakota State University Publication, SGINC1-07, Brookings, SD.
- Lee J.W., Gwak K.S., Park J.Y., Park M.J., Choi D.H., Kwon M., *et al.*, 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *J. Microbiol.*, 45, 485-491.
- Li C., Tanjore D., He W., Wong J., Gardner J.L., Sale K.L., Simmons B.A., Singh S., 2013. *Biotechnol. Biofuels*, 6, 154.



- Lynd L.R., Van Zyl W.H., McBride J.E., Laser M., 2005. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. in Biotech.*, 16(5), 577-583.
- Maurya D.P., Singla A., Negi S., 2015. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*, 5, 597-609.
- McMillan J.D., 1994. Pretreatment of lignocellulosic Biomass. In: Himmel M.E., Baker J.O., Overend R.P. *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*, ACS Symposium Series 566. American Chemical Society, Washington, DC, 292-324.
- Mosier N., Wyman C.E., Dale B.D., Elander R.T., Lee Y.Y., Holtzapple M., Ladisch C.M., 2005b. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 96, 673-686.
- Neeley W.C., 1984. Factor affecting the pretreatment of bio-mass with gaseous ozone. *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 59-65.
- Pan X., Arato C., Gilkes N., Gregg D., Mabee W., Pye K., Xiao Z., Zhang X., Saddler J., 2005. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol. Bioeng.*, 90, 473-481.
- 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. Progr.*, 25(2), 399-408.
- Pike P.W., Sengupta D., Hertwig T.A., 2008. Integrating biomass feedstocks into chemical production complexes using new and existing processes. Minerals Processing Research Institute, Louisiana State University, Baton Rouge, LA.
- Rahikainen J., Mikander S., Marjamaa K., Tamminen T., Lappas A., Viikari L., Kruus K., 2011. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. *Biotechnol. Bioeng.*, 108, 2823-2834.
- Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H., Boerjan W., 2004. Lignins: natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochem. Rev.*, 3, 29-60.
- Ruffell J., 2008. Pretreatment and hydrolysis of recovered fibre for ethanol production. Master of Applied Science, The University of British Columbia. DOI 10.14288/1.0058544 <http://hdl.handle.net/2429/1369>
- Saha B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 279-291.
- Schmidt A.S., Mallon S., Thomsen A.B., Hvilsted S., Lawther J. M., 2002. Comparison of the chemical properties of wheat straw and beech fibers following alkaline wet oxidation and laccase treatments. *J. Wood. Chem. Technol.*, 22(1), 39-53.
- Silverstein R.A., Chen Y., Sharma-Shivappa R.R., Boyette M.D., Osborne J., 2008. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technol.*, 98, 3000-3011.
- Sun Y.E., Cheng J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.*, 83(1), 1-11.
- Sørensen A., Teller P.J., Hilstrøm T., Ahring B.K., 2008. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pretreatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technol.*, 99, 14, 6602-6607.
- Taherzadeh M.J., Karimi K., 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 9, 1621-51.
- Tomas-Pejo E., Olive J.M., Ballesteros M., 2008. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *J. Sci. Ind. Res.*, 67, 874-84.
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych. Rozdział 1. Przepisy ogólne. Art. 2., *Dziennik Ustaw* Nr 169, poz. 1199.

- Vidal P.F., Molinier J., 1988. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*, 16, 1-17.
- Wan C., Li Y., 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.*, 30, 1447-57.
- Werther J., Saenger M., Hartge E.-U., Ogada T., Siagi Z., 2000. Combustion of agricultural residues. *Prog. Energ. Combust.*, 26(1), 1-27.
- Worall J., Anagnost S., Zabel R., 1997. Comparison of wood decay among diverse lignicolous fungi. *Mycologia*, 89(2), 199-219.
- Yang B., Wyman C.E., 2008. Pretreatment; the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod. Bioref.*, 2, 26-40.
- Xiros Ch., Topakas E., Christakopoulos P., 2013. Hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *WIREs Energy Environ.*, 2, 633-654.
- Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biot.*, 56,17-34.
- Zhang Y.H.P., Himmel M.E., Mielenz J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.*, 24, 452-81.
- Zhang Y. J., Li Q., Su J. M. i in., 2015. A green and efficient technology for the degradation of cellulosic materials: structure changes and enhanced enzymatic hydrolysis of natural cellulose pretreated by synergistic interaction of mechanical activation and metal salt. *Bioresource Technol.*, 177, 176-181.
- Zhao Y., Wang Y., Zhu J. Y., Ragauskas A., Deng Y., 2008. Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(6), 1320-1328.
- Zheng Y., Pan Z., Zhang R., 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. Biol. Eng.*, 2, 51-68.
- Zhu J.Y., Wang G.S., Pan X.J., Gleisner R., 2008. The status of and key barriers in lignocellulosic ethanol production: a technological perspective. In: International conference on biomass energy technologies, Guangzhou, China, December 3-5.

## ROLE OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS PRETREATMENT IN THE PRODUCTION OF 2<sup>ND</sup> GENERATION BIOETHANOL

*Katarzyna Robak, Maria Balcerek*

Institute of Fermentation Technology and Microbiology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences  
Łódź University of Technology  
ul. Wólczajska 171/173, 90-924 Łódź, Poland  
e-mail: katarzyna.robak@dokt.p.lodz.pl

**Abstract.** The aim of this paper was to review the literature reports on the production of second generation bioethanol, with particular emphasis on the role of the pre-treatment of lignocellulosic biomass. The paper characterises raw materials base and the stages of production of bioethanol. Moreover it provides an evaluation of potential benefits associated with the production of bioethanol from lignocellulosic biomass. Apart from that, it highlights difficulties of exploitation of lignocellulosic biomass which are mainly caused by the crystalline structure of cellulose and the presence of lignin in the structure of the biomass. It presents the classification of the leading methods of pre-treatment and their usefulness for effective preparation of raw materials for ethanol fermentation. It

discusses the desirability of selection of appropriate methods of pre-treatment of biomass, indicating the potential benefits as well as losses caused by the use of unsuitable reagents and conditions. It presents the problems related to the use of chemical agents in the pretreatment stage, e.g. the cost of purchase and recycling of chemicals, corrosion of equipment, the need for neutralisation or removal of chemicals before the fermentation stage. Attention is also paid to the process parameters, enzymes, yeasts and other microorganisms used in the process, having abilities to ferment hexoses and pentoses generated during the hydrolysis of cellulose and hemicellulose.

**Keywords:** second-generation bioethanol, lignocellulosic biomass, the production of second generation bioethanol, pretreatment