

# **Intensyfikacja wykorzystania monosacharydów w procesie otrzymywania bioetanolu drugiej generacji**

mgr inż. Katarzyna Robak

Promotor  
dr hab. inż. Maria Balcerek, prof. uczelni

Promotor pomocniczy  
dr inż. Urszula Dziekońska-Kubczak

## Streszczenie

Konieczność zapewnienia bezpieczeństwa energetycznego oraz redukcji emisji gazów cieplarnianych, wynikająca z realizacji celów polityki klimatyczno-energetycznej UE, obliguje państwa członkowskie do zwiększenia produkcji energii ze źródeł odnawialnych, w tym rozwoju biopaliw pochodzących z biomasy. Szczególną rolę w sektorze transportu odgrywają biopaliwa ciekłe, stosowane jako dodatki paliwowe. Do tej pory były to głównie biopaliwa pierwszej generacji, których produkcja wykorzystuje rośliny wysokoskrobiowe, cukrowe oraz oleiste. Jednak ze względu na potrzebę zapewnienia bezpieczeństwa żywnościowego, ryzyko wzrostu cen artykułów spożywczych i pasz oraz konieczność ochrony bioróżnorodności, w zgodzie z przyjętymi kryteriami zrównoważonego rozwoju, coraz większe zainteresowanie budzą biopaliwa wyższych generacji. Przykładem ciekłych biopaliw drugiej generacji jest bioetanol produkowany głównie z odpadowej biomasy lignocelulozowej. Surowce tego typu są cennym źródłem polisacharydów strukturalnych, są odnawialne, tanie, powszechnie dostępne i nie konkurują z produkcją żywności. Szczególnie użytecznym materiałem do wytwarzania biopaliw wydaje się być słoma zbóż, której szacunkowa nadwyżka produkcji w Polsce w 2020 r. wynosiła ponad 13 mln ton. Przekształcenie surowca lignocelulozowego do monosacharydów na drodze biochemicznej jest jednak procesem trudniejszym niż standardowa konwersja surowców skrobiowych i wymaga zazwyczaj jednego lub kilku etapów obróbki wstępnej z powodu krystalicznej struktury celulozy oraz obecności ligniny, które to utrudniają hydrolizę enzymatyczną. Innym problemem związanym z wytwarzaniem bioetanolu drugiej generacji jest jednoczesna fermentacja pentoz i heksoz dostępnych w hydrolizatach lignocelulozowych.

Celem pracy była intensyfikacja wykorzystania monosacharydów (glukozy, ksylozy i arabinozy) w produkcji bioetanolu drugiej generacji, otrzymanego w procesie fermentacji alkoholowej podłoża na bazie hydrolizatów słomy żytniej. W pracy dokonano optymalizacji trzech głównych etapów procesu produkcji bioetanolu lignocelulozowego, tj. obróbki wstępnej, hydrolizy enzymatycznej i fermentacji alkoholowej.

W pierwszej fazie badań określono skład chemiczny słomy żytniej, zarówno natywnej, jak i przetworzonej w wyniku obróbki wstępnej z udziałem wybranych odczynników chemicznych (tj. zasady sodowej, kwasu siarkowego (VI), nadtlenu wodoru i cieczy jonowych). Stwierdzono, że natywna słoma żytnia zawierała powyżej 65% łącznego udziału

polisacharydów strukturalnych, tj. celulozy i hemicelulozy, co kwalifikowało ją do dalszych badań. Spośród analizowanych rodzajów obróbki wstępnej surowca, najefektywniejsza była ta z udziałem 5% w/v zasady sodowej, po zastosowaniu której uzyskano najwyższą wydajność hydrolizy enzymatycznej glukanu w przeliczeniu na surowiec natywny (48,9% wyd. teoret.), co wynikało z ponad 98% usunięcia ligniny.

W kolejnym etapie badań optymalizowano proces hydrolizy enzymatycznej wstępnie przetworzonego surowca z użyciem pięciu komercyjnych preparatów enzymatycznych (tj. Cellic CTec2, Flashzyme Plus 200, Celluclast 1.5 L, Ultraflo Max, Viscoferm) oraz pięciu środków powierzchniowo czynnych (tj. PPG 400, PPG 4000, Tween 20, Tween 80, PEG 6000). Wykazano, że w większości przypadków zwiększenie dawki enzymu, wydłużenie czasu procesu, jak i aplikacja surfaktantu, przyczyniały się do poprawy wydajności hydrolizy enzymatycznej. Zastosowanie preparatu Cellic CTec2 w dawce 20 FPU/(g glukanu) oraz surfaktantu Tween 20 w dawce 2,0 g/l, umożliwiło uzyskanie po 72 h hydrolizy w temperaturze 50°C najwyższych stężeń glukozy (26,35 g/l), ksylozy (5,45 g/l) i arabinozy (0,55 g/l) w hydrolizacie. Synergistyczne działanie preparatu enzymatycznego i środka powierzchniowo czynnego skutecznie przeciwdziało nieodwracalnej adsorpcji enzymu do ligniny, co prowadziło do intensyfikacji uwalniania cukrów.

W ostatniej fazie badań otrzymane hydrolizaty celulozowe poddano fermentacji przy użyciu siedemnastu kultur drożdży, na które składały się: referencyjny szczep przemysłowy Ethanol Red (*S. cerevisiae*), dziewięć szczepów natywnych (*S. stipitis* 1541, *S. stipitis* 0047, *S. stipitis* 0048, *K. marxianus* 0024, *K. marxianus* 0025, *K. marxianus* 0027, *P. tannophilus* 0037, *P. tannophilus* 0042, *P. tannophilus* 0043) oraz siedem szczepów rekombinowanych genetycznie (UUU, SUU, SSS, S2A3K, S1A3, SXA-R2P-E, SXA-R2P). Kluczowym aspektem tego etapu pracy doktorskiej było wytypowanie drożdży najaktywniejszych pod względem stężenia i wydajności etanolu oraz wykorzystania cukrów pięciowęglowych. Spośród prób fermentowanych z wykorzystaniem szczepów natywnych, najwyższe stężenie alkoholu etylowego wynoszące 11,05 g/l oznaczono w próbie fermentowanej drożdżami *P. tannophilus* 0043, z wydajnością sięgającą 75,5% w przeliczeniu na wykorzystane cukry ogółem. Zużycie cukrów wynosiło odpowiednio: glukoza – 99,8%, ksyloza – 46,7%, arabinoza – 9,4%. Wśród drożdży rekombinowanych genetycznie, najwyższe stężenie etanolu (10,48 g/l etanolu z wydajnością 74,5% wydajności teoretycznej z wykorzystanych cukrów ogółem) wyprodukował szczep SSS. Podczas fermentacji z jego udziałem glukoza została wykorzystana

w 99,7%, ksyloza w 19,8%, a arabinoza w 69,4%. Dalsze badania wykazały, że stężenie etanolu w podłożach fermentacyjnych można zwiększyć poprzez prowadzenie fermentacji z udziałem kultur mieszanych drożdży, aplikowanych metodą jednoczesnej inokulacji, w odniesieniu do przynajmniej jednej z tworzących je monokultur (np. Ethanol Red + *S. stipitis* 0047 względem *S. stipitis* 0047).

W wyniku suplementacji soli mineralnych  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  do podłoża na bazie hydrolizatów słomy żytniej, niezależnie od drożdży użytych do prowadzenia fermentacji, po 72 h procesu nie odnotowano wzrostu stężenia etanolu w stosunku do prób kontrolnych ( $p > 0,05$ ). Natomiast dodatek do podłoża fermentacyjnych ekstraktu drożdżowego, będącego źródłem wolnych aminokwasów, w dawce 1,0 g/l wpłynął istotnie ( $p < 0,05$ ) na wzrost stężenia i wydajności alkoholu etylowego. Najwyższe wartości tych parametrów po 72 h procesu uzyskano w próbie fermentowanej drożdżami *P. tannophilus* 0043, tj. 11,74 g/l i 79,8% wydajności teoretycznej z wykorzystanych cukrów ogółem.

Oceniając wpływ obciążenia biomasą na fermentację etanolową hydrolizatów słomy żytniej zaobserwowano, że w większości badanych prób wraz ze zwiększającym się obciążeniem (od 3% do 12% w/v s.s.) rosło stężenie i produktywność etanolu, ale malała jego wydajność w odniesieniu do wydajności teoretycznej. W próbie fermentowanej z udziałem szczepu *P. tannophilus* 0043 osiągnięto najwyższe stężenie etanolu równe 44,42 g/l przy 12% w/v obciążeniu biomasą. Zaobserwowano przy tym, że w porównaniu do drożdży referencyjnych Ethanol Red i rekombinowanych genetycznie SSS, szczep natywny *P. tannophilus* 0043 dłużej dostosowywał się do podwyższonego stężenia cukrów na początku fermentacji, co skutkowało wydłużeniem czasu potrzebnego do osiągnięcia maksymalnego stężenia etanolu.

Przedstawione w pracy wyniki badań wskazują na możliwość wykorzystania drożdży natywnych *P. tannophilus* 0043 oraz rekombinowanych genetycznie SSS do fermentacji alkoholowej hydrolizatów na bazie słomy żytniej. Po 72 h fermentacji hydrolizatu słomy żytniej o 3% w/v obciążeniu biomasą, suplementowanego 1,0 g/l ekstraktu drożdżowego, z udziałem tych szczepów odnotowano zwiększenie stężenia etanolu (o 10% i 8%) oraz poprawę wykorzystania ksylozy (o 28% i 19%) w porównaniu do drożdży referencyjnych Ethanol Red. Przeprowadzone badania podstawowe mogą stanowić bazę do dalszego udoskonalania produkcji bioetanolu drugiej generacji metodą biochemiczną, w tym do badań aplikacyjnych.