

MOŽNOSTI PRODUKCE BIOETANOLU Z FYTOMASY A ODPADNÍCH MATERIÁLŮ NA BÁZI CELULÓZY

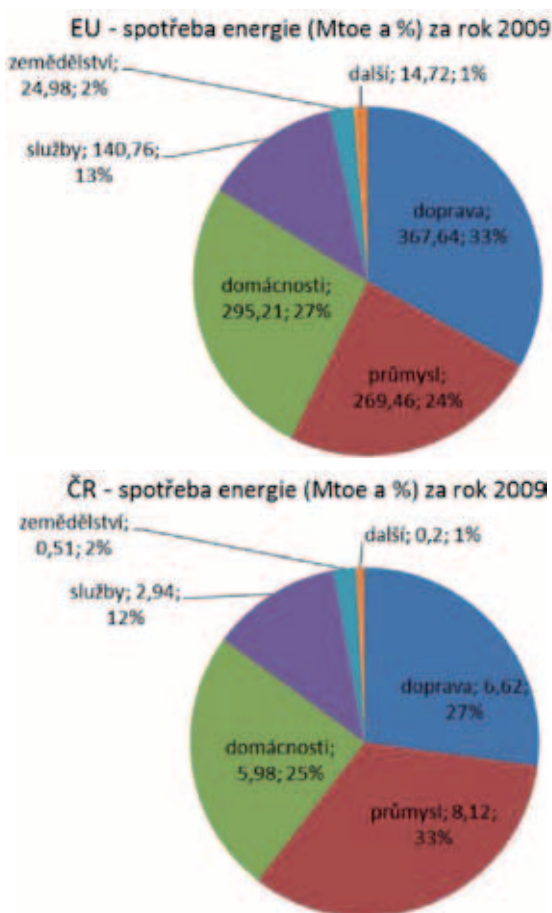
PAULOVÁ L., JAISAMUT K., PATÁKOVÁ P., RYCHTERA M., MELZUCH K.

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, Praha, leona.paulova@vscht.cz

V posledních desetiletích lze pozorovat rostoucí snahu jednotlivých států o snížení své závislosti na fosilních palivech a přechod k širšímu využívání alternativních zdrojů energií (větrná, vodní, solární či geotermální energie, energie vznikající při mořském přílivu a odlivu nebo energie obsažená v biomase). Hlavním důvodem jsou zejména stále častěji publikované údaje o snižujících se zásobách fosilních zdrojů, které vedou ke zvyšování ceny ropy a ropných produktů, nestabilitě trhu s těmito komoditami a hrozící politické a ekonomické závislosti na zemích, které tyto zdroje ovládají. Na základě velikosti současných známých ropných rezerv a odhadu ještě nenalezených zdrojů bylo publikováno, že roční produkce ropy klesne do roku 2050 ze současných 25 miliard barelů (1 barel je 158,97 litrů) zhruba pětkrát [1]. Prokázané světové zásoby ropy se ke konci roku 2007 pohybovaly kolem 1 239 miliard barelů a zásoby zemního plynu kolem 180 miliard m³ [2]. Zhruba 40 % celkových zásob ropy se nalézá na Středním východě na území Iránu, Iráku a Saudské Arábie. Vzhledem k rostoucímu ekonomickému rozvoji, zejména v oblasti průmyslu a dopravy, se světová spotřeba energie stále zvyšuje, což vede k další vzájemné energetické závislosti v rámci jednotlivých hospodářských regionů.

Zpráva Evropské komise pro energii [3] udává, že v roce 2009 se v rámci Evropské unie spotřebovalo 1 113,67 Mtoe energie (1 toe odpovídá množství energie uvolněné spálením jedné tuny ropy, tj. ~42 GJ). Největší podíl, 33 %, tvořila energie spotřebovaná v dopravě, 27% energie spotřebovaly domácnosti a 24 % průmyslová výroba. Spotřeba energie v rámci České republiky tvořila v tomtéž roce asi 2,2 % celkové energetické spotřeby Evropské unie (tj. 24,37 Mtoe), přičemž 33 % tohoto množství připadlo na průmyslovou výrobu, 27 % na dopravu a 25 % spotřebovaly domácnosti.

Obr. 1 – spotřeba energie v Evropské unii a České republice za rok 2009



V reakci na stále rostoucí spotřebu energetických zdrojů v oblasti dopravy, kterou navíc provází stoupající emise skleníkových plynů (emise produkované dopravním sektorem přispívají z 21 % k cel-

kovým emisím skleníkových plynů) a negativní dopady na životní prostředí, vydal Evropský parlament směrnici 2003/30/EC, která zavazuje členy Evropské unie k zavedení legislativy, zaručující přídavky biosložek do pohonných hmot prodáváných na jejich území. Tento podíl by se měl postupně zvyšovat a do roku 2020 by měl dosáhnout až 20 %. V souvislosti s tímto požadavkem v posledním desetiletí vzrostl v Evropské unii počet závodů produkujících bioetanol, který je vedle methylesteru vyšších mastných kyselin získávaného převážně z řepkového oleje nejvyužívanějším biopalivem. Ačkoli většina bioetanolu produkovaná v rámci Evropské unie využívá jako surovinu škrobnaté nebo cukernaté zemědělské plodiny, pozornost se stále častěji obrací k možnostem produkce etanolu tzv. druhé generace, tj. etanolu, který je vyroben z biomasy, která nemá potravinářské využití a v níž je hlavním zdrojem uhlíku a energie celulóza.

Využití fytomasy a odpadních materiálů na bázi celulózy a lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu procesem následné sacharifikace a fermentace

Suroviny na bázi celulózy a lignocelulózy, které lze použít jako výchozí materiál pro přípravu fermentačních médií, tvoří různorodou skupinu, v níž jsou zastoupeny zejména dřevo a odpady z jeho zpracování (dřevní štěpka, piliny), rychle rostoucí energetické rostliny (šřovík, miscantus, kostřava), zemědělské odpady (především obilná a kukuřičná sláma nebo oklasky) či odpadní suroviny, jako například odpadní papír či komunální odpady. Společným rysem všech těchto materiálů je poměrně vysoký obsah celulózy, který je však samozřejmě závislý na typu plodiny, stanovišti a klimatických podmínkách, ve kterých byla vypěstována a pohybuje se zhruba kolem 25–40 % v travinách, 30–35 % v pšeničné slámě, 40–50 % ve dřevě, až po 90 % v bavlněných vláknech. Obsah celulózy v novinovém papíru je zhruba 40–55 %, zatímco kartony obsahují asi 60–70 % celulózy [4]. Kromě vysokého obsahu uhlíku ve formě celulózy je další výhodou energetických plodin jejich rychlý růst, fakt, že nekonkurují potravinářské výrobě a že je lze s výhodou pěstovat na pozemcích, jež není možné využít pro pěstování potravinářských plodin, a to často s menšími nároky na pěstování včetně hnojení a ochrany chemickými prostředky, což se odráží i ve výsledné ceně suroviny. Velkou nevýhodou těchto materiálů je však to, že celulózu nelze přímo využít jako zdroj uhlíku a energie pro mikroorganismy produkující etanol, ale je potřeba ji nejprve převést na zkvasitelné cukry, což je poměrně komplikovaný a energeticky náročný proces, který celou výrobu značně prodražuje.

Výroba etanolu z lignocelulóзовých materiálů tedy sestává z dvou procesů, procesu hydrolyzy celulózy, v němž se získají fer-

mentovatelné sacharidy, a následné fermentace, kdy vzniklé cukry slouží jako zdroj uhlíku a energie pro mikroorganismy (kvasinky nebo bakterie), které produkují jako hlavní metabolit etanol. Převedení celulózy na zkvasitelný substrát je složitý proces sestávající z mechanické úpravy a následného fyzikálně-chemického rozrušení lignocelulóзовé matrice (většinou za zvýšené teploty a tlaku a s použitím více či méně zředěných roztoků kyselin, zásad, případně solí), při kterém je odstraněna podstatná část ligninu, částečně hydrolyzována celulóza a hemicelulóza a zároveň snížen stupeň polymerace a krystalinita celulózy. Tento krok je sice energeticky náročný, ale je potřeba ho zařadit, protože přítomnost ligninu spolu s vysokou krystalinitou celulózy by prakticky znemožnila následnou enzymovou hydrolyzu celulózy a hemicelulózy na jednoduché sacharidy (vedle glukózy se tvoří i další hexózy jako např. galaktóza a manóza, z pentóz jsou nejvíce zastoupeny xylóza a arabinóza). Konkrétní zastoupení zkvasitelných sacharidů uvolněných z lignocelulóзовého materiálu je dáno typem suroviny a způsobem fyzikálně-chemického rozkladu. Předúprava lignocelulóзовého materiálu by ideálně měla být provedena tak, aby spotřebovala co nejnižší možné množství energie a chemikálií, přitom byla dostatečně účinná, ale zároveň natolik šetrná, aby nedocházelo k degradacím nebo ztrátám cukrů a tvorbě inhibičních látek (zejména furfuralu, 4-hydroxymethylfurfuralu a kyseliny octové), které by ovlivňovaly aktivitu enzymů a metabolismus mikroorganismů použitých v dalších fázích procesu.

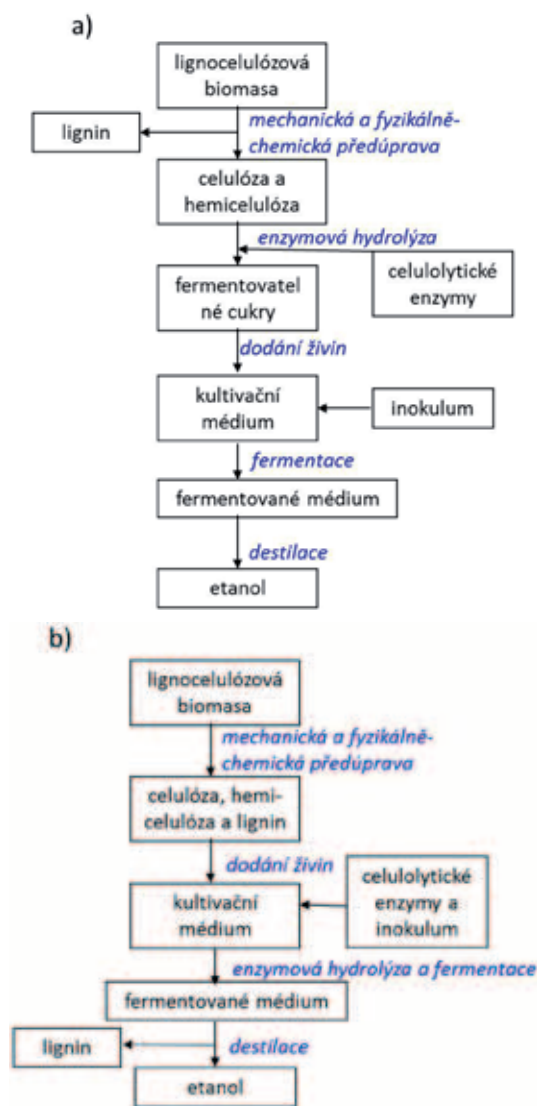
Pro enzymovou hydrolyzu celulózy jsou většinou používány komerčně dostupné, vysoce specifické celulytické enzymové preparáty, které jsou směsí endo- a exoglukanáz, jež štěpí polymerní celulóзовý řetězec uvnitř za produkce směsi oligosacharidů nebo na konci za uvolnění celobiózy a glukózy a β -glukosidáz, které rozkládají takto vzniklou celobiózu. Nevýhodou enzymových preparátů je jejich vysoká cena a to, že se během hydrolyzy jejich aktivita většinou snižuje, a to zejména v důsledku ireverzibilní adsorpce části enzymů na substrát. Také rychlost produkce jednoduchých cukrů se během procesu snižuje, a to v důsledku inhibice enzymů produktem reakce (glukózou), takže prakticky nikdy nedochází k 100% konverzi substrátu. Částečného snížení nákladů lze dosáhnout recyklací enzymových preparátů, tj. opětovným použitím kapalné fáze po hydrolyze. Uvádí se [4], že enzymovou směs přípravků Cellclast a Novozyme lze úspěšně recyklovat až pětkrát, aktivita opětovně používaných enzymů se však s každým cyklem snižuje. Levnější alternativou ke komerčně dostupným preparátům je produkce vlastních celulytických enzymů pomocí vláknitých hub (např. rodu *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*) nebo bakterií (rod *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus* a další) na částečně předupravené fytomase po dodání nezbytných živin (zejména zdroje dusíku). Snížení ceny celulytických preparátů lze dosáhnout i přípravou nových produkčních organismů metodami molekulární biologie, tj. klonováním sekvencí, které kódují produkci celulytických enzymů, do organismů, které je budou rychle a levně produkovat.

Substrát po enzymové hydrolyze obsahuje směs oligosacharidů, disacharidů, hexóz a pentóz a lze jej (většinou po dodání dalších živin) použít pro přípravu fermentačního média. Pokud proces probíhá klasickou cestou, tj. formou následné sacharifikace a fermentace, tj. procesem SHF (separate hydrolysis and fermentation), je do média zaočkováno inokulum (rostoucí populace mikrobiální kultury) a v bioreaktoru proběhne fermentace, tj. metabolická přeměna jednoduchých sacharidů na etanol a další metabolity (obr. 2a).

Problémem je, že nejvíce využívané produkční mikroorganismy, tj. kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Zymomonas mobilis* neumí utlizovat pentózy, takže část zdroje uhlíku a energie zůstává nevyužita, což se projeví ve snížené výtěžnosti procesu. Na druhou stranu mikroorganismy, které pentóзовé cukry využívají (*Escherichia coli*, *Klebsiella oxycola*, *Candida shehatae* nebo *Pichia stipitis*), zase nedosahují takové produkce etanolu, aby mohly být použity jako průmysloví producenti, od kterých se očekává, že budou produkovat etanol s vysokou výtěžností a produktivitou a navíc budou

tolerovat vysoké koncentrace etanolu. Tento problém je možné řešit použitím směsné kultury, kdy je do bioreaktoru kromě tradičního producenta etanolu zaočkováán i kmen utlizující pentózy nebo přípravou rekombinantních kmenů, které mohou být dvojího druhu. Buď se do „dobrých“ producentů etanolu naklonují geny potřebné pro syntézu enzymů zapojených v metabolismu odbourávání xylózy (v hydrolyzátech obvykle nejvíce zastoupený pentóзовý cukr) nebo se do kmene, který přirozeně fermentuje xylózu a arabinózu, vloží geny kódující enzymy nezbytné pro produkci etanolu [5]. Příprava a testování takových kmenů je však běh na dlouhou trať, proto se v současné době realizuje produkce etanolu tímto způsobem pouze na úrovni laboratorních experimentů.

Obr. 2 – Schéma výroby etanolu: a) SHF process, b) SSF proces



Výroba bioetanolu z lignocelulóзовých materiálů procesem současné sacharifikace a fermentace

Proces současné sacharifikace a fermentace (SSF – simultaneous saccharification and fermentation) představuje další možnost, jak z lignocelulóзовých materiálů produkovat etanol. Od klasického SHF procesu se liší tím, že proces enzymové hydrolyzy probíhá současně s procesem fermentace (obr. 2b). Hlavní výhodou je to, že proces probíhá kratší dobu v menším počtu nádob, protože enzymová hydrolyza a fermentace je realizována současně v jednom bioreaktoru. Spojení obou procesů představuje nižší investici do zařízení, která může dosahovat úspory více než 20 % [6]. Další výhodou je to, že je omezeno riziko inhibice enzymové aktivity vznikající glukózou, protože ta je ihned po uvolnění spotřebována

Dokončení na další straně

mikroorganismy. To vede i k rychlejší a úplnější konverzi celulózy a dovoluje tím pádem použití i nižší dávkování enzymů [7]. Spojení obou procesů s sebou přináší i některé problémy, hlavní z nich je spojen s tím, že teplotní optima procesu sacharifikace a fermentace se podstatně liší. Optimální teplota pro činnost celulózy je 45–50 °C, zatímco kmeny obvykle využívané při fermentaci rostou nejlépe při teplotě kolem 30 °C, proto je potřeba pracovat za kompromisních podmínek, což omezuje rychlost a účinnost obou procesů.

Řešením tohoto problému by mohlo být použití termofilních kmenů, které jsou schopny růst při teplotách blízkých teplotnímu optimu celulózy a zároveň dobře produkovat etanol, nebo termotolerantních kmenů, jejichž teplotní optimum je vyšší než u běžně používaných mikroorganismů. Například při použití kvasinky *Kluyveromyces marxianus* bylo dosaženo vysokého výtěžku etanolu (0,50 g/g) při 42 °C, další termotolerantní kvasinka, *Candida acidothermophilum* dosáhla při stejné teplotě 80% maximálního výtěžku etanolu, tj. 0,41 g/g [4], zatímco kvasinka *Fabospora fragilis* kultivovaná při 43 °C poskytovala výtěžnost etanolu 0,40 g/g [8].

Další možností je využití termotolerantních mutantů běžně používaných kmenů nebo využití kmenů, které mají kromě schopnosti produkovat etanol i celulólytickou aktivitu, a tak zvládnou oba kroky realizovat samy, bez přídavku enzymových preparátů (např. *Clostridium thermocellum*). Použití termofilních nebo termotolerantních kmenů v procesu SSF s sebou přináší ekonomické výhody, neboť tím, že se přiblíží optima obou procesů, dosáhne se vyššího výtěžku sacharifikace, zároveň se sníží náklady v důsledku nižší spotřeby energie na chlazení bioreaktoru a v neposlední řadě se sníží riziko kontaminace mezofilními mikroorganismy [9].

Nevýhodou SSF procesu je však to, že mikroorganismy ani enzymy nelze po fermentaci recyklovat, protože separace od přítomného ligninu je problematická, což s sebou nese zvýšené náklady spojené s přípravou inokula a nákupem komerčních nebo produkcí nové šarže vlastních enzymů. Všechny výše zmíněné problémy omezují potenciál využití tohoto procesu v průmyslovém měřítku. Avšak podle očekávání Národní laboratoře pro obnovitelnou energii (NREL – National Renewable Energy Laboratory, US) se technologie výroby lignocelulózoového etanolu během příštích dvaceti let zlepšit natolik, že bude možné z 1000 kg suché biomasy produkovat až 400 l etanolu, což oproti v současnosti produkovaným 270 l představuje značný pokrok [10].

Závěr

Lignocelulózoové materiály mají jako surovina pro výrobu etanolu mnoho výhod, ale jejich zpracování bohužel přináší i mnoho problémů, které se odrážejí v ekonomické bilanci procesu a brání tak zavedení této technologie do průmyslového měřítku. Ačkoli je cena etanolu produkovaná z lignocelulózoových materiálů v porovnání s cenou fosilních paliv stále relativně vysoká, přesto existuje několik cest, které by mohly její cenu částečně snížit a učinit tuto technologii ekonomicky akceptovatelnou. Jedná se především o snížení nákladů na suroviny a celulólytické enzymy, úspor lze dosáhnout i recyklací chemikálií použitých při chemické hydrolýze a enzymů použitých pro sacharifikaci celulózy. K lepší ekonomické bilanci přispěje i separace mikroorganismů po fermentaci a po regeneraci její opětovné použití, což sníží náklady na přípravu inokula. Další prostředky lze získat kompletním využitím všech vedlejších produktů, které při výrobě vznikají. Například lignin, hlavní vedlejší produkt vzniklý po fyzikálně chemické hydrolýze, může být použit jako pevné palivo nebo jako surovina pro výrobu dalších látek. Úspor může být dosaženo i využitím metod molekulární biologie, a to především přípravou fyto-masy s nižším obsahem ligninu a vysokým obsahem celulózy, produkcí vysoce specifických a aktivních celulólytických enzymů, přípravou kmenů, které by byly schopné účinně využít jak pentózoové, tak hexózoové sacharidy a přitom s vysokou účinností produkovat etanol a tolerovat jak vysoké koncentrace produktu, tak i přítomnost inhibičních látek přítomných v hydrolyzátech.

Literatura

- [1] CAMPBELL C.J., LAHERRERE J.H.: The end of cheap oil. *Scientific American*, 3, 78–83, 1988
- [2] WORLD PROVED RESERVES OF OIL AND NATURAL GAS, MOST RECENT ESTIMATES. <http://www.eia.gov/international/reserves.html>, staženo 8.8.2011
- [3] ENERGY BALANCE SHEETS 2008-2009, Eurostat Statistical Books, 2011 edition, Eurostat, European Commission, 2011, on-line. http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/product_details/publication?p_product_code=KS-EN-11-001, staženo 12.7.2011
- [4] SUN Y., CHENG J.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11, 2002
- [5] DELLOMONACO C., FAVA F., GONZALES R.: The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microbial Cell Factories*, 9:3, 1–37, 2010
- [6] OLOFSSON K., BERTILSSON M., LIDÉN G.: A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1:7, 1–14, 2008
- [7] BALLESTEROS M., OLIVA J.M., NEGRO M.J., MANYANARES P., BALLESTEROS I.: Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry*, 39, 1843–1848, 2004
- [8] KRISHNA H.S., REDDY J.T., CHOWDARY G.V.: Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 77, 193–196, 2001
- [9] TOMÁS-PEJÓ E., GARCÍA-APARICIO M., NEGRO M.J., OLIVA J.M., BALLESTROS M.: Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*, 100, 890–895, 2009
- [10] NIGAM S. P., SINGH A.: Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*, 37, 1, 52–68, 2011

Poděkování: Tato studie vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programového projektu výzkumu a vývoje Kontakt ME10146 a výzkumného záměru MŠM6046137305.

Abstract

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM BIOMASS AND WASTE MATERIALS BASED ON CELLULOSE

Summary: A growing consumption of energy sources in transport sector in the European Union (33% of total 113.67 Mtoe in 2009) accompanied by rising greenhouse gas emissions and negative impacts on the environment stimulated a national effort to reduce the dependence on fossil fuels by using bio-components in fuels sold in their territory. Although most of bioethanol is currently produced from starch or sugar raw materials, attention is increasingly turning to bioethanol of 2nd generation made from cellulose. In spite of all advantages of energy crops (rapid growth, no competition with food production, less fertilizers, lower price), the main problem is that cellulose cannot be directly used as a carbon source for a traditional ethanol producers (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*). It must be converted to simple sugars by a sequence of operations (mechanical and physico-chemical pretreatment, enzymatic hydrolysis) before fermentation, which are energy-intensive and thus increase the price of final product. But there are several possibilities how to reduce the cost of lignocellulose ethanol, such as use of simultaneous saccharification and fermentation process, recycling of chemicals, enzymes and microorganisms together with revaluation of most of byproducts (e.g. lignin can be used as a solid fuel or raw material for production of other valuable substances). Exploitation of molecular biology methods can help to develop new strains, which are able efficiently produce cellulolytic enzymes, utilize both pentose and hexose sugars, be resistant to inhibitors and produce high yield of ethanol.

Key words: lignocellulose, bioethanol, SSF and SHF processes