

# Proces proizvodnje etanola kao biogoriva u ovisnosti o ulaznoj sirovini

---

Mioč, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:244605>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**PROCES PROIZVODNJE ETANOLA KAO  
BIOGORIVA U OVISNOSTI O ULAZNOJ SIROVINI**

DIPLOMSKI RAD

Katarina Mioč

Zagreb rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

# **PROCES PROIZVODNJE ETANOLA KAO BIOGORIVA U OVISNOSTI O ULAZNOJ SIROVINI**

DIPLOMSKI RAD

Katarina Mioč

Mentor:

Doc. dr. sc. Vanja Jurišić

Zagreb, rujan, 2021.



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## **IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Katarina Mioč**, JMBAG 1003120822, rođen/a 10.08.1996. u Livnu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

### **PROCES PROIZVODNJE ETANOLA KAO BIOGORIVA U OVISNOSTI O ULAZNOJ SIROVINI**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studenta / studentice*



Sveučilište u Zagrebu  
Agronomski fakultet

University of Zagreb  
Faculty of Agriculture



## IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Katarina Mioč**, JMBAG 1003120822, naslova

### **PROCES PROIZVODNJE ETANOLA KAO BIOGORIVA U OVISNOSTI O ULAZNOJ SIROVINI**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

1. doc. dr. sc. Vanja Jurišić mentor
2. izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka član
3. izv. prof. dr. sc. Ana Matin član

potpisi:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja .....	1
2. Materijali i metode .....	2
2.1. Biomasa .....	3
3. Biogoriva .....	5
3.1. Razlozi uporabe biogoriva.....	5
3.2. Podjela biogoriva.....	5
3.2.1. Biogoriva prve generacije.....	5
3.2.2. Biogoriva druge generacije .....	7
4. Tehnologija proizvodnje etanola.....	9
4.1. Etanol.....	9
4.2. Sirovine za dobivanje etanola.....	10
4.2.1. Šećerne sirovine .....	10
4.2.2. Škrobne sirovine .....	11
4.2.3. Lignocelulozne sirovine .....	11
4.3. Faze proizvodnje etanola .....	12
4.4. Proizvodnja etanola u svijetu.....	13
5. Alkoholna fermentacija .....	15
5.1. Proizvodnja etanola.....	16
5.2. Uzlazni procesi u proizvodnji etanola .....	17
5.3. Silazni procesi u proizvodnji etanola .....	18
6. Mikroorganizmi koji proizvode etanol.....	20
6.1. Kvasci.....	21

6.1.1.	<i>Saccharomyces</i> sp.....	21
6.1.2.	<i>Schizosaccharomyces</i> sp.....	23
6.1.3.	<i>Kluyveromyces</i> sp.....	23
6.1.4.	<i>Candida</i> sp.....	25
6.1.5.	<i>Pichia</i> sp.....	26
6.2.	Bakterije .....	27
6.2.1.	<i>Clostridium</i> sp. ....	27
6.2.2.	<i>Zymomonas</i> sp.....	27
6.2.3.	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.....	29
6.3.	Mikroskopske gljive .....	29
6.3.1.	<i>Fusarium</i> sp. ....	29
6.3.2.	<i>Aspergillus</i> sp.....	30
6.3.3.	<i>Mucor</i> sp. ....	31
6.3.4.	<i>Neurospora</i> sp.....	32
7.	Zaključak .....	33
8.	Literatura .....	34

## Sažetak

Diplomskog rada studentice Katarine Mioč, naslova

### PROCES PROIZVODNJE ETANOLA KAO BIOGORIVA U OVISNOSTI O ULAZNOJ SIROVINI

S obzirom da je trend proizvodnje etanola iz biomase u svijetu rastući, u ovom su radu opisani procesi proizvodnje prve i druge generacije iz lignocelulozne biomase. Proces proizvodnje etanola prve i druge generacije razlikuju se uslijed različite kemijske strukture ulazne sirovine. Cilj ovog rada bio je prikazati pregled različitih tehnologija proizvodnje etanola iz različitih sirovina. Ukratko su opisani pojmovi biomase, biogoriva te tehnologija proizvodnje etanola, a najveći naglasak je stavljen na mikrobne kulture koje sudjeluju u proizvodnji etanola. U radu su prikazani čimbenici koji utječu na proces alkoholne fermentacije i mikroorganizmi koji imaju važnu ulogu u tom procesu.

Ključne riječi: biomasa, etanol, alkoholna fermentacija, mikroorganizmi



## Summary

Graduation thesis of student Katarina Mioč, entitled,

### FUEL ETHANOL PRODUCTION IN DEPENDANCE OF THE RAW MATERIAL

Given the fact that the trend of ethanol production from biomass is increasing globally, this diploma thesis describes the production processes of the first- and second-generation fuel ethanol production. First- and second-generation ethanol production processes differ due to different chemical structure of the feedstock. The concepts of biomass, biofuels and ethanol production technology are briefly described, with the greatest emphasis on microbial cultures involved in ethanol production. The aim of this thesis is to provide an overview of different technologies of ethanol production from different raw materials. The thesis also describes the main factors influencing the process of alcoholic fermentation and microorganisms that play the most important role in this process.

Key words: biomass, ethanol, alcoholic fermentation, microorganisms

# 1. Uvod

Zbog ubrzanog razvoja svjetskog gospodarstva dolazi do bržeg iscrpljivanja zaliha neobnovljivih izvora energije i povećanja emisije stakleničkih plinova, a time dolazi do povećanja proizvodnje alternativnih goriva, tzv. biogoriva. Biogoriva se kao takva dobivaju preradom obnovljivih izvora energije (biomase). Etanol se proizvodi fermentacijom s kvascima ili nekim drugim mikroorganizmom iz ugljikohidrata kao što su jednostavni šećeri, škrob i celuloza. Etanol se nakon fermentacije izdvaja i pročišćava destilacijom i dehidracijom. Najpoznatije gorivo prve generacije, etanol, najčešće se proizvodi iz šećerne trske ili repe i kukuruza. Druga generacija goriva proizvodi se iz lignocelulozne biomase kao što su poljoprivredni ostaci, ostaci drvno-prerađivačke industrije i slično.

Procesom fermentacije etanol se može proizvesti iz svih sirovina koje sadrže šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do jednostavnijih šećera. Sirovine za proizvodnju etanola su šećerne sirovine, škrobne sirovine, lignocelulozne sirovine i ostaci različitih industrija. Postoji ograničen broj mikroorganizama koji fermentiraju ugljikohidrate, uglavnom pentozne ili heksozne šećere u alkohole. Poznato je i da su mikroskopske gljive proizvođači etanola.

## 1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog diplomskog rada je dati pregled različitih tehnologija proizvodnje etanola kao goriva iz različitih sirovina te prikazati čimbenike koji utječu na proces alkoholne fermentacije, s naglaskom na mikrobne kulture. U ovom radu opisani su različiti mikroorganizmi i njihova uloga u proizvodnji etanola.

## 2. Materijali i metode

Prilikom izrade rada korišteni su primarni i sekundarni podaci. Od sekundarnih podataka korišteni su razni znanstveni i stručni radovi, službeni priručnici te statistički podaci, a primarni podaci su prikupljeni različitim metodama istraživanja:

- Induktivna metoda - sustavna je primjena induktivnog načina zaključivanja kojim se na temelju analize pojedinačnih činjenica dolazi do zaključka o općem mišljenju, od zapažanja konkretnih pojedinačnih slučajeva dolazi do općih zaključaka.
- Deduktivna metoda - u znanosti služi za: objašnjenje činjenica i zakona, za predviđanje budućih događaja, za otkrivanje novih činjenica i zakona, za dokazivanje postavljenih teza, za provjeravanje hipoteza i za znanstveno izlaganje.
- Metoda analize - je postupak znanstvenog istraživanja raščlanjivanjem složenih pojmova i zaključaka na njihove jednostavnije sastavne dijelove i elemente.
- Metoda sinteze - je postupak znanstvenog istraživanja i objašnjavanja stvarnosti putem sinteze jednostavnih pojmova u složenije.
- Metoda deskripcije - je postupak jednostavnog opisivanja ili očitavanja činjenica, procesa i predmeta u prirodi i društvu te njihovih empirijskih potvrđivanja odnosa i veza, ali bez znanstvenog tumačenja i objašnjavanja.
- Metoda kompilacije - je postupak preuzimanja tuđih rezultata znanstveno istraživačkog rada, odnosno tuđih opažanja, stavova, zaključaka i spoznaja.

## 2.1. Biomasa

Biomasa prema članku 4. Zakona o obnovljivima izvorima energije i visokoučinkovitoj kogeneraciji (NN 100/2015) je biorazgradivi dio proizvoda, otpada ili ostataka biološkog porijekla iz poljoprivrede (uključujući tvari biljnog i životinjskog porijekla), šumarstva i s njima povezanih proizvodnih djelatnosti uključujući ribarstvo i akvakulturu te biorazgradivi udio industrijskog i komunalnog otpada. Na slici 1. prikazani su različiti izvori biomase.



Slika 1. Biomasa

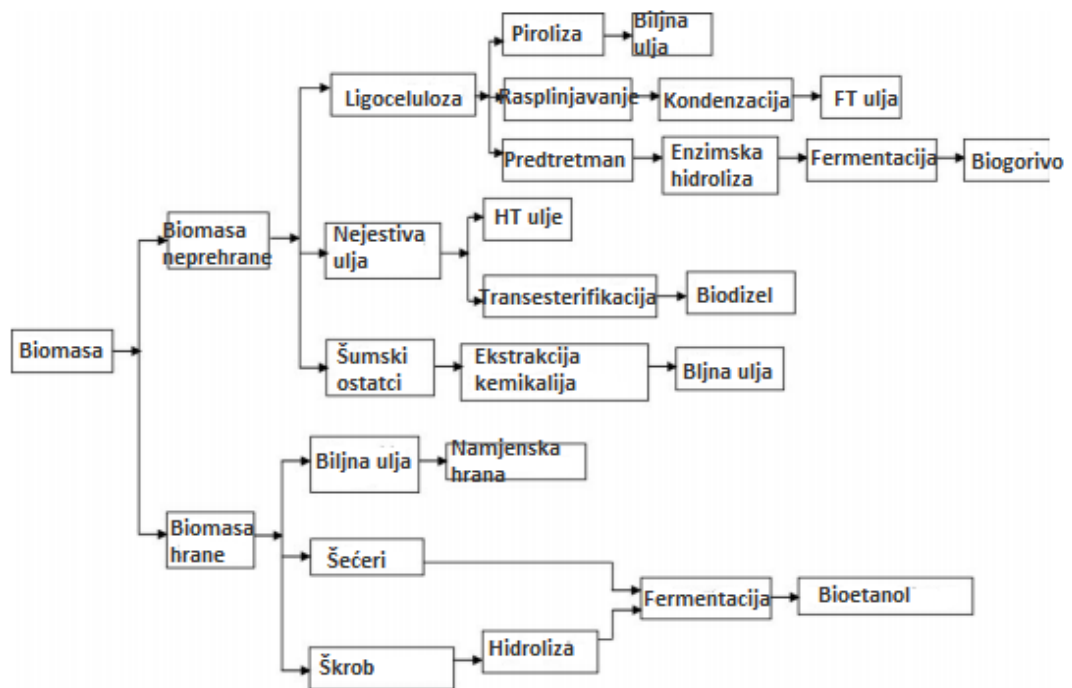
Izvor: <https://www.nationalgeographic.org/photo/2biomass-crops-dup/>

Biomasa se općenito može podijeliti na drvenu, nedrvnu i životinjski otpad, unutar čega se mogu razlikovati (Rački Kristić, 2011).

- Drvena biomasa (ostaci iz šumarstva, otpadno drvo, otpad nastao pri piljenju, brušenju i blanjanju)
- Drvena uzgojena biomasa (brzorastuće drveće)
- Nedrvna uzgojena biomasa (trave i brzorastuće alge)
- Ostaci i otpaci iz poljoprivrede (slama, kukuruzovina, koštice, ljuske)
- Životinjski otpad i ostaci (izmet, lešine)
- Biomasa iz otpada (mulj)

Procesima fotosinteze biljke pretvaraju ugljični dioksid i vodu u biokemikalije primarnih i sekundarnih metabolita. Lignocelulozna biomasa jedan je od najčešćih biopolimera u prirodi. Može se podijeliti u nekoliko skupina, a to su: poljoprivredni ostaci, šumarski ostaci i krut komunalni otpad (Wayman, 2001). Lignocelulozna biomasa se može pretvoriti u biogoriva. Činjenica da je velika količina lignoceluloznoga materijala, u stvari, ostatak koji potječe iz poljoprivredne proizvodnje ili industrije, otvara mogućnosti proizvodnje

etanola u velikim količinama (Cardona i Sánchez, 2007) Lignocelulozna biomasa po sastavu se sastoji od lignina, hemiceluloze i celuloze. Upravo kompleksnost strukture lignocelulozne biomase uvjetuje primjenu različitih tipova predtretmana, koji prethode procesu hidrolize celuloze i hemiceluloze na fermentabilne šećere (Janušić i sur., 2008). Na slici 2. prikazana je pretvorba biomase u goriva druge generacije.



Slika 2. Pretvorba biomase u goriva druge generacije (Chakraborty i sur., 2012)

## **3. Biogoriva**

### **3.1. Razlozi uporabe biogoriva**

Ubrzani razvoj svjetskog gospodarstva i značajan porast potrošnje neobnovljivih izvora energije uzrokuju iscrpljivanje zaliha izvora i stvaranje stakleničkih plinova. Preradom obnovljivih izvora energije dobivaju se biogoriva (Ivančić Šantek i sur., 2016). Energija predstavlja jedan od najbitnijih sastavnica razvoja i funkcioniranja društva i prirode, a osnovni je pokretač i dio svih ljudskih aktivnosti. Raspoloživost energetske izvora, korištenje postojećih i pronalaženje novih izvora energije, dobra i sigurna uporaba od presudnog su značaja za rast i razvoj društva i svijeta u cjelini.

O velikom značaju energije govori i činjenica da su se industrijske revolucije prije svega razlikovale po primjeni novih izvora energije. Tako je prvu industrijsku revoluciju obilježilo otkriće i primjena vodene pare, drugu otkriće i primjena nafte i električne energije, te treća koju je obilježilo otkriće i primjena nuklearne energije i usavršavanje postojećih izvora energije. Uslijed značajnog industrijskog i društvenog razvoja te porasta broja stanovnika i ubrzanog razvoja društva, došlo je do značajnog porasta potrošnje energije bez obzira na izražene negativne utjecaje na okoliš i životnu sredinu (Ivančić Šantek i sur., 2016) Od kraja 19. stoljeća potrošnja energije je rasla po relativno visokoj stopi rasta. Takvo stanje velike potrošnje dovelo je do brzog iscrpljivanja energetske izvora. Svemu tomu veliki doprinos je donijela energetska kriza koja je omogućila intenzivan razvoj politike racionalnog korištenja i štednje energije.

### **3.2. Podjela biogoriva**

Biogoriva se dijele na plinovita, tekuća i čvrsta goriva koja se mogu proizvesti iz biomase te imaju pozitivne učinke na zaštitu životne sredine (smanjuju emisiju CO<sub>2</sub>). U odnosu na konvencionalna goriva koja su po svojem kemijskom sastavu uglavnom ugljikovodici, biogoriva imaju zastupljeno manje ili više kisika, pa se još nazivaju i oksidativna goriva.

#### **3.2.1. Biogoriva prve generacije**

Prva generacija biogoriva su biogoriva proizvedena iz šećera, škroba, biljnih ulja i životinjskih masti, korištenjem razvijenih tehnologija. Najčešće sirovine koje se koriste za proizvodnju biogoriva prve generacije su kukuruz, šećerna trska i pšenica.

Šećerne kulture poput šećerne trske i šećerne repe sadrže značajne količine saharoze koje se mogu ekstrahirati i fermentira u etanol (Singh i sur., 2010).

### 3.2.1.1. Kukuruz

Kukuruz se smatra glavnom sirovinom prve generacije etanola osobito u Sjedinjenim Državama, odnosno oko 40% usjeva kukuruza u Sjedinjenim Državama je iskorišteno za proizvodnju etanola do 2012. (Wise, 2012). Tablica 1. prikazuje prednosti i nedostatke korištenja kukuruza kao sirovine za proizvodnju biogoriva.

Tablica1. Prednosti i nedostaci biogoriva dobivenog iz kukuruza (Naqvi i Yan, 2015)

Prednosti	Nedostaci
Jednostavna tehnologija pretvorbe škroba u etanol	Povećana potrošnja pesticida i gnojiva
Ostaci biljke se mogu koristiti za proizvodnju etanola	Veći troškovi zbog proizvodnje pesticide
Nema neizravnih troškova korištenja zemljišta	Onečišćenje tla i voda zbog uporabu pesticide
	Kukuruz je važan u prehrambenom lancu i njegova uporabu za proizvodnju biogoriva će dovesti do povećanja cijena hrane
	Prinos energije je nizak

### 3.2.1.2. Šećerna trska

Šećerna trska je druga glavna sirovina za proizvodnju etanola prve generacije. Šećerna trska sastoji se od jednostavih šećera koji se lako mogu pretvoriti u etanol pomoću fermentacije u usporedbi s kukuruzom, koji daje škrob, a za to je potrebno prvo zagrijavanje, a zatim fermentacija (Rendleman i Shapouri, 2007). U tablici 2. su prikazane prednosti i nedostaci etanola dobivenog iz šećerne trske.

Tablica 2. Prednosti i nedostaci biogoriva dobivenog iz šećerne trske (Naqvi i Yan, 2015)

Prednosti	Nedostaci
Postojeća infrastruktura za sadnju, berbu i transport	Relativno nizak prinos
Nema promjene namjene zemljišta	Specifičan uzgoj za određenu regiju
90% niža emisija CO <sub>2</sub> u odnosu na benzin	Ne može zadovoljiti globalnu potražnju za energijom

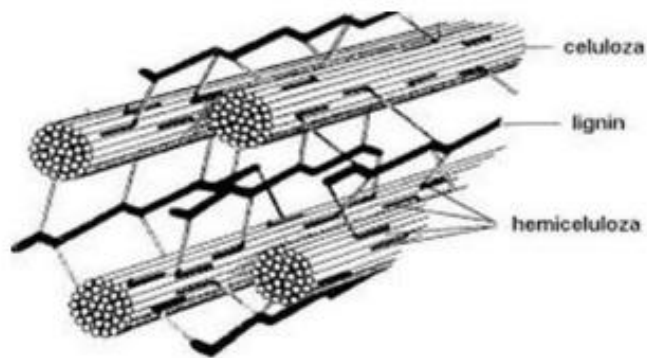
### 3.2.2. Biogoriva druge generacije

#### 3.2.2.1. Etanol iz lignocelulozne biomase

Etanol se danas proizvodi iz sirovina na bazi jednostavnih šećera ili škroba. To su sirovine iz usjeva koji se koriste za prehranu ljudi i ishranu stoke i zbog toga se takva proizvodnja biogoriva smatra neekonomičnom. Zbog toga se lignocelulozna biomasa smatra mogućim održivim, dugoročnim rješenjem (Janušić i sur., 2008). Druga generacija etanola proizvodi se iz lignocelulozne biomase primjenom naprednih tehnoloških procesa. Cilj druge generacije etanola je povećanje proizvodnje biogoriva korištenjem biomase koja se sastoji od ostataka neprehrambenih usjeva kao i drugih usjeva koji se koriste za prehranu, industriju ili građevinsku namjenu. Povećanjem proizvodnje druge generacije etanola povećala bi se energetska učinkovitost i smanjila emisija ugljika i energetska ovisnost o etanolu prve generacije (Ivančić Šantek i sur., 2016).

Lignocelulozna biomasa se sastoji od celuloze (40-50%), hemiceluloze (25-35%) i lignina (15-20%) i ima kompleksnu strukturu. Udio ovih komponenti razlikuje se ovisno o vrsti sirovine, kao što je stabljika kukuruza, klip kukuruza, slama, trava itd. Na slici 3. prikazana je stanične stijenke biljaka.





Slika 3. Prikaz stanične stijenke biljaka (Janušić i sur., 2008.)

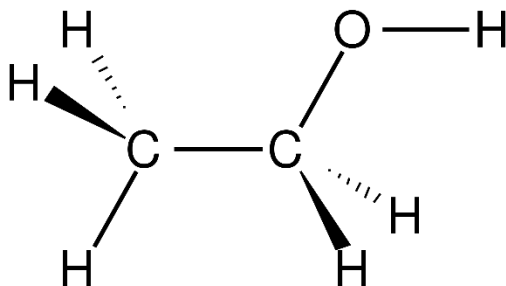
Celuloza i hemiceluloza su polisaharidi sastavljeni od nizova (lanaca) međusobno povezanih molekula monosaharida (najčešće glukoza i ksiloza). Hemiceluloza za razliku od celuloze ima puno kraće lance, dok je lignin visoko razgranati polimer. Lignin obavija celulozu i hemicelulozu i na taj način ih štiti od enzimske razgradnje do jednostavnih molekula (monomera). Jako čvrste veze s ligninom i celulozom tvori hemiceluloza.

Zbog ove kompleksne strukture proizvodnja etanola se razlikuje od konvencionalne tehnologije od škroba do etanola (Janušić i sur., 2008). Prije pretvorbe složenih šećera, odnosno polisaharida u jednostavne šećere provode se različiti predtretmani koji za cilj imaju modifikaciju lignoceluloznog materijala kako bi došlo do razgradnje njegove strukture te poboljšanja enzimske razgradnje. Cilj predtretmana je narušiti strukturu lignina.

## 4. Tehnologija proizvodnje etanola

### 4.1. Etanol

Etanol je bistra i bezbojna tekućina karakterističnog mirisa, zapaljiva je i lako hlapljiva. Molekulska formula etanola je  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , te pripada alkoholima. Točka tališta etanola iznosi 159 K (114 °C), a vrelište 352 K (78 °C). Pri miješanju etanola s vodom dolazi do razvoja topline i smanjenja volumena. Široki je spektar upotrebe etanola, pa se tako etanol koristi kao otapalo, kao sredstvo za ekstrakciju, dezinfekciju i konzerviranje (Car, 2015). Proizvodnja etanola za dobivanje alkoholnih pića ima najveću tradiciju, a proizvodnja etanola kao goriva je najveća po kapacitetu. Danas se najveća pozornost pridaje etanolu kao biogorivu. Tokom posljednjih trideset godina proizvodnja etanola u svijetu je porasla za oko šest puta, a razlog toga je činjenica da se etanol sve više koristi kao zamjena djela benzina za pogon motornih vozila. Na slici 4. prikazana je strukturna formula etanola.



Slika 4. Strukturna formula etanola

Izvor: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ethanol-3d-stick-structure.svg>

Među bioalkoholima, etanol je glavni predstavnik prve generacije biogoriva. Etanol se proizvodi od pšenice, šećerne repe, melase, šećerne trske, kukuruza i drugih sirovina koje sadrže šećer i škrob. Etanol ima veći oktanski broj od benzina što rezultira povećanjem omjera kompresije motora s većom toplinskom učinkovitošću. Etanol se može koristiti kao zamjena za benzin i može se miješati s benzinom u bilo kojem udjelu. Na globalnoj razini proizvodnjom biogoriva najveći volumen otpada na dobivanje etanola iz kukuruza i šećerne trske.

Iako je energetski ekvivalent etanola za 63% manji od naftnog goriva, izgaranje etanola je čišće jer sadrži kisik, a samim time emisija štetnih plinova je niža. Korištenje etanola kako goriva u transportu može itekako pomoći u smanjenju nakupljanja  $\text{CO}_2$  i to na dva načina:

1. Smanjenje uporabe fosilnih goriva, te recikliranjem CO<sub>2</sub> tj. oslobađanjem CO<sub>2</sub> pri izgaranju.
2. Korištenje etanola umjesto fosilnih goriva, a time se izbjegavaju emisije nastale korištenjem fosilnih goriva.

Izgaranjem etanola umjesto benzina smanjuje emisiju ugljika za više od 80%, dok se u potpunosti eliminira oslobađanje sumporovog dioksida koje uzrokuje kisele kiše (Lashinky i Schwartz, 2006).

## **4.2. Sirovine za dobivanje etanola**

Procesom fermentacije, etanol se može proizvesti iz svih sirovina koje sadrže šećere ili polisaharide koji se mogu razgraditi do šećera. Međutim, osnovne sirovine u industrijskoj proizvodnji alkohola su uglavnom šećerne i polisaharidne sirovine te u novije doba lignocelulozni materijali (Grba, 2010). Sirovine za proizvodnju etanola se mogu podijeliti na sljedeći način (Grba, 2010) :

1. Šećerne sirovine
2. Škrobne sirovine
3. Lignocelulozne sirovine
4. Ostaci različitih industrija

### **4.2.1. Šećerne sirovine**

Najčešće korištene šećerne sirovine su: melasa šećerne repe i šećerne trske, sokovi šećerne repe i šećerne trske, sirutka, sulfitna lužina i hidrol, a veoma rijetko voćne sirovine. S obzirom da ove sirovine sadrže već fermentabilne šećere (glukoza, fruktoza, manoza, saharoza i maltoza) nije potreban njihov predtretman kako bi se reducirali šećeri i zbog toga se za proizvodnju etanola iz šećernih sirovina koristi najmanje složena tehnologija i najjednostavniji postupak proizvodnje.

Šećerna repa, šećerna trska, slatki sirak i neka voća su dobar izvor sokova bogatih šećerima za proizvodnju etanola. Međutim, kratko vrijeme skladištenja i podložnost kontaminaciji različitim mikroorganizmima pokazali su se kao glavni nedostaci sokova kao supstrata (Zabed i sur., 2014).

Šećerna repa je kao kultura jako rasprostranjena i prilagodljiva različitim klimatskim uvjetima, a najznačajniji dio biljke je korijen. Kod šećerne trske kao i kod šećerne repe glavni sastojak je saharoza, a pored ovog šećera sadrži još i monomere glukozu i fruktozu. Jednostavniji procesi proizvodnje sokova obuhvaćaju usitnjavanje sirovine pomoću raznih

mlinova ili rezača, te nakon toga slijedi tiještenje ili ekstrakcija šećernog soka sve do njegovog pročišćavanja (Zabed i sur., 2014). Za proizvodnju etanola može se iskoristiti bagasa ili pulpa koja se dobiva nakon procesa ekstrakcije.

Šećernim sirovinama potreban je samo postupak mljevenja za ekstrakciju šećera do fermentacije (ne zahtijeva nikakav korak poput hidrolize) te to predstavlja relativno jednostavan proces pretvorbe šećera u etanol. U navedenom procesu etanol se može fermentirati izravno iz sokova trske i šećerne repe ili iz melase koja se dobiva kao proizvod nakon ekstrakcije šećera (Içoz i sur., 2009). Ukratko, proces proizvodnje etanola iz šećerne trske sastoji se od pripreme, mljevenja trske, proces fermentacije i destilacija - ispravljanje - dehidracija.

#### **4.2.2. Škrobne sirovine**

Škrobne sirovine koje se koriste za proizvodnju etanola su: zrno kukuruza, zrno pšenice, zrno ječma, zrno riže, zrno krumpira i ostale sirovine. Najveća proizvodnja etanola u svijetu je iz kukuruza, posebno u SAD-u. Proizvodnja etanola iz škrobnih sirovina je dosta slična kao i ona kod proizvodnje šećernih sirovina, samo se razlikuju u procesu pripreme supstrata. Kod škrobnih sirovina je važno škrob prevesti do fermentativnih šećera (monosaharida i disaharida) koje kvasci prevode u etanol. Zrno kukuruza kao škrobna sirovina predstavlja osnovnu sirovinu za proizvodnju etanola. Proces proizvodnje etanola iz škrobnih sirovina započinje pripremom i ukomljavanjem. Priprava se sastoji od čišćenja, namakanja te usitnjavanja sirovine.

#### **4.2.3. Lignocelulozne sirovine**

Lignocelulozna biomasa je kompleksna sirovina koja se sastoji od celuloze (45%), hemiceluloze (30%) i lignina (25%). Lignocelulozne sirovine mogu biti:

1. Poljoprivredni ostaci (kukuruzovina, slama, biomasa šećerne trske, pulpa šećerne repe)
2. Drvo (šumski ostatci, piljevina, otpaci od prerade drveta)
3. Energetski usjevi (višegodišnje trave, miskantus, topola)
4. Komunalni otpad

Lignoceluloza je pogodna sirovina za proizvodnju etanola jer je široko rasprostranjena, obnovljiva i ne upotrebljava se u prehrani. Proizvodnja etanola iz lignoceluloznih sirovina je složen proces koji se u mnogim aspektima razlikuje od proizvodnje iz šećernih ili škrobnih sirovina.

Problemi pri proizvodnji alkohola iz lignoceluloznih sirovina su vezani uz složenost same sirovine, transport biomase manje gustoće do centraliziranih biorafinerija te problemi vezani uz prethodnu obradu sirovina (predtretman) i hidrolizu do fermentabilnih šećera (Balan, 2014).

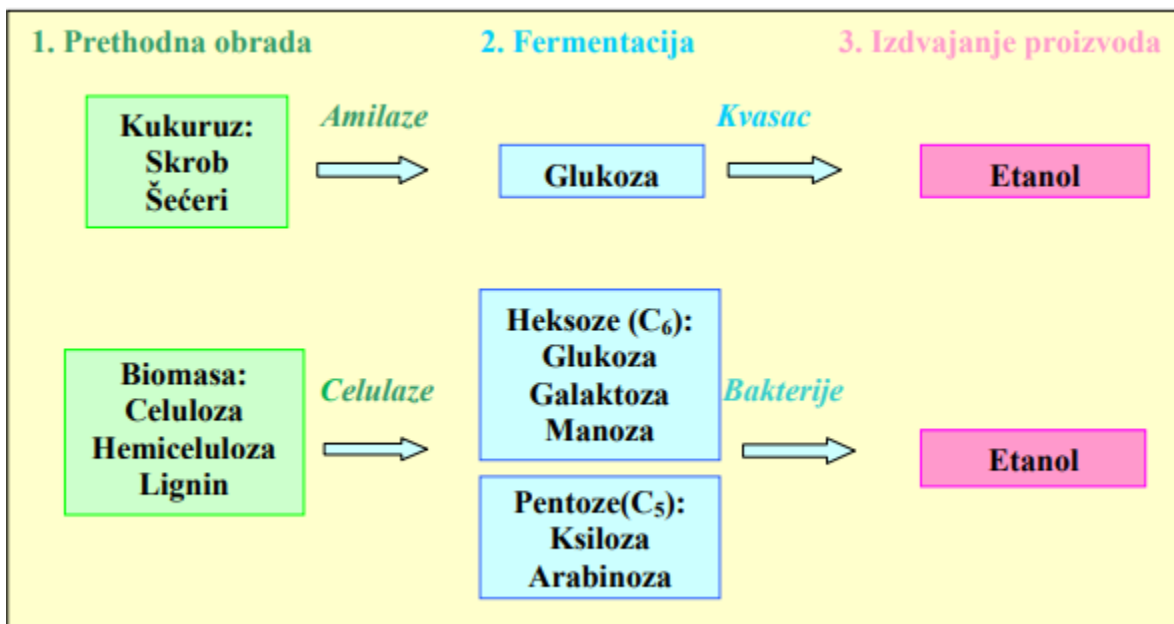
Iako je lignocelulozna biomasa vrlo rasprostranjena, komercijalizacija procesa proizvodnje etanola je limitirana zbog nedovoljnog istraživanja, osobito onih vezanih za smanjenje proizvodnih troškova (Joshi i sur. 2011).

### 4.3. Faze proizvodnje etanola

Najstariji način dobivanja etanola je alkoholna fermentacija. Etanol se kao takav proizvodi fermentacijom šećera koji se nalaze u biomasi ili iz šećera koji su proizvedeni prethodnom enzimskom hidrolizom biomase. Pomoću mikroorganizama, najčešće kvasaca, odvija se fermentacija šećera, a u novijim tehnologijama i bakterije imaju važnu ulogu u fermentaciji. Kao i svaki biotehnološki proces, tako i proizvodnja etanola se može podijeliti u tri glavne faze, a to su (Mojović i sur., 2007):

1. Priprema hranjive podloge, odnosno prethodna obrada supstrata
2. Bioproces (alkoholno vrenje, odnosno alkoholna fermentacija)
3. Izdvajanje i pročišćavanje proizvoda

Slika 5. prikazan je shematski prikaz dobivanja etanola iz biomase.



Slika 5. Prikaza sheme dobivanja etanola iz biomase (Mojović i sur., 2007)

Cilj faze pripreme hranjive podloge je pretvorba škrobne i celulozne komponente iz biomase u fermentativne šećere pomoću kiselina i enzima. Fermentativni šećeri su oni šećeri koje mikroorganizmi mogu metabolizirati, odnosno fermentirati do etanola.

Odabir sirovine ovisi o dostupnosti sirovine, proizvodnim i transportnim troškovima, sastavu sirovine, tržišnoj cijeni i utjecaju na okoliš. Nakon prve faze procesa slijedi fermentacija koja se odvija u bioreaktoru, nakon čega slijedi faza izdvajanja i pročišćavanja produkata i zbrinjavanja nastalog otpada tijekom reakcije. 96%-tni alkohol se dobiva nakon nekoliko faza destilacije. Procesom dehidracije dobiva se bezvodni etanol (Mojović i sur., 2007).

#### **4.4. Proizvodnja etanola u svijetu**

Etanol je postao atraktivno zamjensko biogorivo jer se proizvodi iz obnovljivih sirovina i ekološki je prihvatljiv. Upotrebljava se kao pogonsko gorivo i to kao hidrirani (96 % -tni) ili bezvodni (u mješavinama s benzinom). Nestabilna cijena goriva, te potreba za sigurnijim dobivanjem energije pridonijeli su povećanju proizvodnje biogoriva.

Trenutno se u svijetu proizvodi 85 milijuna barela nafte godišnje (1 barel = 158.987295 L), a predviđa se da će se do 2030. godine potražnja popeti na 116 milijuna barela (Balan, 2014). Prema RFA (engl. *Renewable Fuels Association*) svjetska proizvodnja biogoriva se od 1980. do 2013. godine povećala s 4,4 na 88,6 milijardi litara.

Etanol je jedan od značajnih alternativnih, obnovljivih izvora energije koji spada u biogoriva (pored biodizela, biometanola i dr.) koji se dobiva fermentacijom šećera iz biomase. Osnovna svrha etanola je: koristan je u industriji kao sirovina, koristi se za proizvodnju alkoholnih piće i koristi se kao gorivo. Najveća po kapacitetima je proizvodnja etanola kao biogoriva. Od ukupne proizvodnje etanola u svijetu preko 60% se proizvodi putem fermentacije.

Prva biogoriva proizvedena su krajem 19. stoljeća, a interes za komercijalnu proizvodnju biogoriva za transport javio se 70-ih godina zbog naftne krize.

Osnovni razlozi zbog kojih je povećana proizvodnja biogoriva su:

- Smanjenje uvoza fosilnih goriva iz drugih zemalja
- Osigurana opskrba za energijom
- Smanjena emisija stakleničkih plinova
- Podupiranje poljoprivrednog i ruralnog razvoja

Najviše etanola, 87% svjetske proizvodnje, proizvodi se u Sjedinjenim Američkim Državama i Brazilu, dok je samo 5% etanola proizvedeno u EU (Ajanovic i Haas 2014). Na slici 6. prikazana je proizvodnja etanola u svijetu u milijunima litara.

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

Slika 6. Proizvodnja etanola u svijetu u milijunima litara (Ivančić Šantek i sur.,2016)

Glavni proizvođači etanola u svijetu su Brazil i SAD, koji zajedno proizvode oko 88% od ukupne svjetske proizvodnje etanola. Iako je proizvodnja etanola rasla tijekom zadnjih desetak godina, zbog sve češćih vremenskih nepogoda dolazi do njezinog usporavanja. Zbog toga je izvoz etanola iz Brazila posljednjih godina značajno smanjen, dok je proizvodnja etanola u Europskoj uniji 2011. godine iznosila je 4,4 milijarde litara, što predstavlja približno 5 % svjetske proizvodnje. Kina proizvodi oko 2 milijarde litara. Najveći izvoznik etanola do 2011. godine bio je Brazil, nakon čega vodeću ulogu preuzimaju Sjedinjene Američke Države (Ivančić Šantek i sur., 2016).

## 5. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje, je biokemijski proces transformacije monosaharida (glukoze, fruktoze) u alkohol i ugljični dioksid posredstvom mikroorganizama i uz sudjelovanje cijelog niza enzima. Alkoholnu fermentaciju većinom vrše predstavnici kvasaca raznih rodova i vrsta (Regadon i sur., 1997).

U proizvodnji etanola istražena je mogućnost primjene niza drugih mikroorganizama kao što su *Zymomonas mobilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Mucor indicus* itd (Ivančić Šantek i sur., 2016)

Procesom alkoholne fermentacije prvo dolazi do dekarboksilacije piruvata nastalog glikolizom u acetaldehid, a zatim redukcijom acetaldehida uz pomoć  $\text{NADH}_2$  u etanol. Osim etanola i  $\text{CO}_2$  tijekom alkoholne fermentacije nastaju različiti nusprodukti metabolizma kao što su glicerol, organske kiseline i viši alkoholi. Glavni nusprodukt fermentacije je glicerol za čiju sintezu se utroši do 4 % šećera u podlozi. Glicerol ima važnu fiziološku ulogu u regulaciji osmotskog tlaka u stanici kvasca (Cronwright i sur., 2002). Koncentracija ostalih nusproduka metabolizma znatno je manja.

Iako je alkoholna fermentacija prirodno zaštićen proces, jer alkohol koji nastaje inhibira rast većine bakterijskih vrsta, pa one postupno nestaju kako napreduje alkoholno vrenje, kontaminacija drugim mikroorganizmima, najčešće bakterijama mliječne kiseline, divljim kvascima i bakterijama octene kiseline značajno smanjuju prinos etanola te inhibira rast kvasaca (Ivančić Šantek i sur., 2016). Zbog utroška energije i trajanja procesa sterilizacije podloge koja prethodi fermentaciji, proizvodnja etanola u velikom mjerilu često se provodi u nesterilnim uvjetima. Rast kontaminanata suzbija se dodatkom antibiotika ili kemijskih tvari za dezinfekciju (kiseline, vodikov peroksid, sulfid, karbamid peroksid, amonijak itd.). U proizvodnji etanola najučinkovitijima su se pokazali antibiotici: penicilin (inhibicija sinteze stanične stijenke) i virginiamicin (inhibira sintezu proteina) (Watanabe i sur., 2008).

Glavne karakteristike mikroorganizma koji se koriste u proizvodnji etanola su:

- sposobnost davanja visokog prinosa etanola
- podnošenje visoke koncentracije etanola

Nadalje, mikroorganizam bi trebao imati svojstvo upotrebe više šećera kao i podnošenje inhibitora koji su obično prisutni u hidrolizatu dobivenom nakon predobrade i enzimske saharifikacije. Istodobna hidroliza i fermentacija (engl. *simultaneous saccharification and fermentation* - SSF) glavni je put za proizvodnju etanola (Binod i sur., 2013).



## 5.1. Proizvodnja etanola

Fermentacija je bitan metabolički fenomen koji se u osnovi odvija anaerobno. U procesu fermentacije, polisaharidi se razrađuju na jednostavnije molekule pomoću različitih mikroorganizama. Fermentacija se obično odvija u kvascima i bakterijama različitih vrsta (mitcA., 2018). Dvije ključne komponente u procesu fermentacije su mikroorganizam i supstrat. Kontrola postupka, odsutnost onečišćenja, velika brzina fermentacije i prinos glavni su čimbenici koji određuju ukupnu učinkovitost fermentacije.

Većina fermentacija industrijskog etanola provodi se fermentacijom pod vodom (engl. *submerged fermentation* - SmF), pri čemu je neophodna opskrba kisikom. Što se tiče proizvodnje etanola iz lingoceluloznih ostataka, dva su glavna puta kojima se može odvijati proizvodnja etanola. Jedan od njih je odvojena hidroliza i fermentacija (engl. *separate hydrolysis and fermentation* - SHF ), a istodobna saharifikacija i fermentacija (engl. *simultaneous saccharification and fermentation* -SSF) je drugi put proizvodnje etanola (Binod i sur., 2013).

U procesu SHF biokonverzija lignoceluloze se odvija u dva odvojena reaktora, čime se razdvajaju procesi saharifikacije i fermentacije. U ovom procesu, svaki korak se može provesti u optimalnim uvjetima pH i temperature. Glavni koraci koji su uključeni u SHF su predtretman, hidroliza i fermentacija. Oba procesa, predtretman i hidroliza, vrlo su važni za dobivanje fermentabilnih šećera. Glavni cilj prethodne obrade je odvajanje celuloze i hemiceluloza od lignina. Predtretman se može izvoditi fizikalnim, kemijskim i biološkim sredstvima, a svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke.

Kemijska metoda je najpoželjniji način predtretman jer je vrlo jednostavna za izvođenje. Glavni nedostatak kemijske metode je stvaranje inhibitora i stvaranje otpadnih kemijskih voda. Stvaranje inhibitora negativno utječe na tijek proizvodnje etanola. Mikroorganizam može tolerirati inhibitore do određene koncentracije, nakon čega odumire. Kako bi se to izbjeglo, prije fermentacije potrebno je detoksicirati prethodno obrađene hidrolizirane tekućine (Binod, 2013).

Inhibitori koji utječu na fermentaciju uključuju octenu kiselinu, mravlju kiselinu, levulinsku kiselinu, furfural, hidroksimetil furfural, fenol i vanillin. Najviše je istražen učinak furfurala na uzgoj kvasca. Način na koji furfural inhibira metabolizam kvasca nije potpuno poznat, ali pretpostavlja se da inhibira središnje enzime u glikolizi.

Studije o procesu SSF pokazale su potencijal za visoki prinos etanola njegovom proizvodnjom iz lignoceluloznih sirovina. SSF omogućuje provođenje enzimskih hidroliza

polisaharidnih komponenata lignoceluloze, zajedno s fermentacijom, koristeći jedan reaktor. To rezultira smanjenjem inhibicijskih učinaka krajnjeg proizvoda na enzimsku hidrolizu i trenutnom dostupnošću fermentirajućih šećera. S druge strane, glavni nedostatak je potreba za pronalaskom povoljnih uvjeta (npr. temperatura i pH) za enzime u oba procesa, i hidrolize i fermentacije. Tehno-ekonomske analize pokazale su da je SSF mnogo konkurentniji postupak u odnosu na SHF. Zapravo, upotreba jednog bioreaktora rezultira snažnim smanjenjem investicijskih i operativnih troškova (Binod i sur., 2013).

## 5.2. Uzlazni procesi u proizvodnji etanola

Svi postupci prije početka fermentacije općenito se nazivaju uzlazni procesi (engl. *up-stream*), kao što su sterilizacija reaktora, priprema i sterilizacija kulture medija, priprema i rast odgovarajućih inokuluma mikrobnih kultura. Svi uzlazni procesi postupaka važni su za uspješnu fermentaciju među kojima priprema medija i fermentacijski parametri igraju važnu ulogu. Na primjer, u proizvodnji lignoceluloznog etanola, prethodna obrada biomase je ključni korak kako bi se osigurala dostupnost polisaharida za pretvaranje u fermentabilne šećere. Reakcijsko okruženje treba sadržavati izvor energije, vodu, izvore ugljika, izvore dušika, vitamine, minerale, pufere, kelatne čimbenike, zrak i sredstva protiv pjenjenja. Prethodno obrađivana lignoceluloza ne jamči uvijek sve te zalihe, čime se dolazi do potrebe dodavanja drugih komponenti koje mogu osigurati rast i fermentaciju mikroorganizama koji proizvode etanol (Binod i sur. 2013). Vrsta i količina hranjivih sastojaka medija su od iznimne važnosti za rast mikroorganizama koji sudjeluju u procesu alkoholne fermentacije.

U redukcijском okruženju ugljik može biti jedan od izvora energije za neke mikroorganizme. Svi mikroorganizmi trebaju ugljik, a izvor energije za metaboličke procese može biti organska ili anorganska tvar. Izvori ugljika za fermentaciju mogu biti jednostavni ili složeni ugljikohidrati, organske kiseline, proteini, peptidi, aminokiseline, ulja, masti i ugljikovodici (Binod i sur., 2013).

Dušik je isto tako neophodna supstanca koja se koristi u mediju za fermentaciju. Uobičajeno korišteni izvori dušika u fermentacijskim medijima su kvašćev ekstrakt, amonijeve soli i urea. Drugi izvori dušika uključuju aminokiseline, proteine itd. Izvori dušika se dodaju u SSF reaktor kako bi se osigurao rast etanol producirajućih mikroorganizama. Primjerice, ekstrakt kvasca se općenito dodaje u SSF proces, čime se osigurava odgovarajuća količina dušika (Binod i sur., 2013)

Minerali su esencijalni elementi potrebni za stanice tijekom njihovog rasta i razvoja. Esencijalni minerali za sve medije uključuju elemente poput kalcija, klora, magnezija, fosfora, kalija i sumpora. Drugi minerali poput bakra, kobalta, željeza, mangana,

molibdena i cinka potrebni su, ali u tragovima, stoga ih nazivamo elementima u tragovima. Elementi u tragovima mogu pridonijeti primarnoj i sekundarnoj proizvodnji metabolita. Specifična koncentracija različitih minerala svakako ovisi o vrsti mikroorganizma koji se koristi. Uloga elemenata u tragovima uključuje funkcioniranje koenzima za katalizu mnogih reakcija, sintezu vitamina i izgradnju stanične stijenke (Vogel i Todaro, 1996).

Kisik je normalno prisutan u vrlo niskim razinama u bioreaktoru tijekom proizvodnje etanola koji se proizvodi fermentacijom u komercijalnim razmjerima. U praksi proces ne može biti potpuno anaeroban, jer kisik je potreban za proizvodnju nezasićenih masnih kiselina koje su neophodne za rast kvasaca i proizvodnju etanola (Binod i sur., 2013).

Općenito se preporučuje izbjegavati čimbenike stresa za kvasce poput visokih temperatura, visokog osmotskog tlaka, visokog natrija kao i visoke koncentracije organskih kiselina. Prevencija bakterijski zagađivača ključna je za uspješnu fermentaciju etanola. Osim aditiva koje se dodaju kvascima za rast, visina doze kvasca utječe i na ukupni učinak stoga se doze moraju optimizirati za isplative učinke (Binod i sur., 2013). Na primjer, veća doza kvasaca rezultira bržim početkom fermentacije, što pomaže u kontroli onečišćenja.

### **5.3. Silazni procesi u proizvodnji etanola**

Glavni silazni (engl. *down-stream*) proces fermentacije etanola uključuje destilaciju. Nakon destilacije prinos od 95 % etanola poznat je pod nazivom kao rektificirani alkohol. Samom destilacijom nije moguće ukloniti preostalu vodu iz rektificiranog alkohola, zbog toga što etanol tvori konstantnu kipuću smjesu s vodom pri toj koncentraciji poznatoj kao azeotrop. Za ekstrakciju vode iz etanola potrebno je koristiti sredstva za dehidraciju koji mogu odvojiti vodu od etanola (Binod i sur., 2013)

Jednostavno sredstvo za dehidraciju je živo vapno (većinski sastav živog vapna je CaO) koje se dodaje rektificiranom alkoholu i ostavlja preko noći da bi reakcija bila potpuna. Smjesa se zatim destilira u koloni za frakcioniranje kako bi se dobio apsolutni alkohol. Taj se postupak uglavnom koristi u procesima manjih razmjera (Binod i sur., 2013)

Dehidracija pomoću molekularnog sita drugi je pristup koji se koristi u industriji. U ovoj tehnici, rektificirani alkohol se pregrijava parom u ulaznom super-grijaču (Binod i sur., 2013.). Zatim ta tekućina ide na jedan od parova molekularnih sita na nekoliko minuta. Vremenski gledano, tijekom pare rektificiranog alkohola se prebacuje na alternativni parasloj. Dio bezvodne pare etanola napušta svježi adsorpcijski sloj koji se koristi za regeneraciju napunjenog sloja (Binod i sur., 2013).

Prednosti tehnologije molekularnog sita su jednostavnost postupka i činjenica da je vrlo lako automatizirati proces smanjujući rad. Sam proces je inertan i nema uporabe kemikalija, a materijal za isušivanje ima vrlo dug životni vijek i upravo zbog toga bi se trebao češće koristiti u industriji (Binod i sur., 2013).

## 6. Mikroorganizmi koji proizvode etanol

Mikroorganizmi koji produciraju etanol trebaju zadovoljiti određene kriterije za korištenje u procesima proizvodnje. Mikroorganizam bi trebao brzo pretvarati supstrat u produkt i produkt (etanol) bi se morao lako odvojiti iz medija za uzgoj kulture. Učinkovitost ili prinos, glavni su ciljevi za odabir mikroorganizma za sve fermentacijske procese. Nekoliko postupaka se koristi za izolaciju i probir etanol producirajućih mikroorganizama iz različitih izvora. Ti postupci uključuju metodu uzgoja u tekućoj kulturi i metodu uzgoja na krutim podlogama (Binod i sur., 2013).

Nakon izolacije mikroorganizama, mikroorganizmi se mogu uzgajati bilo u tekućem ili krutom mediju, npr. podlozi koja uz agar sadrži željenu sirovinu koja predstavlja izvor ugljika kao i druge hranjive tvari potrebne za rast mikroorganizama, kao što su amonijak, soli i metali u tragovima. Etanol koji proizvode mikroorganizmi se izlučuje izvan stanica mikroorganizama i u okolni medij. Izlučeni etanol tada može biti detektiran i kvantificiran na bilo koji prikladan način kao što je plinska ili tekućinska kromatografija (Binod i sur., 2013). Od iznimne važnosti je koristiti metodu detekcije koja može barem djelomično kvantificirati etanol koji proizvodi svaki pojedinačni mikroorganizam.

Kvasac je najčešće korišten mikroorganizam za proizvodnju etanola fermentacijom. Postoje određena jedinstvena svojstva kvasaca po kojima se oni ističu u proizvodnji etanola. Neka od ovih svojstava su:

- brza stopa rasta
- učinkovita proizvodnja etanola
- tolerancija na stresove iz okoliša, poput visoke koncentracije etanola i niske razine kisika

Osim *S. cerevisiae*, koji je u najčešćoj komercijalnoj upotrebi, drugi primjeri kvasca koji se koriste za proizvodnju etanola su *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida* sp., *Pichia* sp, koji mogu fermentirati čak i pentozne šećere. Kvasac može rasti i aerobno i anaerobno. Aerobni uvjeti pogoduju proizvodnji stanica kvasca, što proizvođačima etanola ne odgovara. Međutim, rast tijekom anaerobnih stanja vrlo je ograničen i glavna reakcija je pretvaranje šećera u etanol za proizvodnju energije. Za rast i razmnožavanje, kvascu su potrebni upotrebljivi organski ugljik (šećeri), izvor dušika te različiti organski i anorganski čimbenici rasta u tragovima (Binod i sur., 2013).

Tijekom pretvorbe šećera u etanol proizvodi se energija koju stanice koriste za različite funkcije. Osim kvasca, veliki broj bakterija može proizvesti etanol, ali većina njih proizvodi

i druge krajnje proizvode poput butanola, izopropilnog alkohola, octene kiseline, mravlje kiseline, arabitola, glicerola, acetona, metana itd. (Binod i sur., 2013).

Bakterije koje proizvode etanol kao glavni produkt (tj. minimalno 1 mol proizvedenog etanola po molu iskorištene glukoze) prikazane su u Tablici 3 (Binod i sur., 2013).

Tablica 3. Etanol producirajuće bakterije (Binod i sur., 2013).

Bakterije	mmol proizvedenog etanola po mmol metabolizirane glukoze
<i>Clostridium sporogenes</i>	Do 4,15
<i>Clostridium indolis</i>	1,96
<i>Clostridium sphenoides</i>	1,8
<i>Clostridium sordelli</i>	1,7
<i>Zymomonas mobilis</i>	1,9
<i>Zymomonas mobilis</i>	1,7
<i>Spirochaeta aurantia</i>	1,5
<i>Spirochaeta stenostrepta</i>	0,84
<i>Spirochaeta litoralis</i>	1,1
<i>Erwinia amylovora</i>	1,2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,1
<i>Streptococcus lactis</i>	1,0
<i>Sarcina ventriculi</i> (syn. <i>Zyмосarcina</i> )	1,0

## 6.1. Kvasci

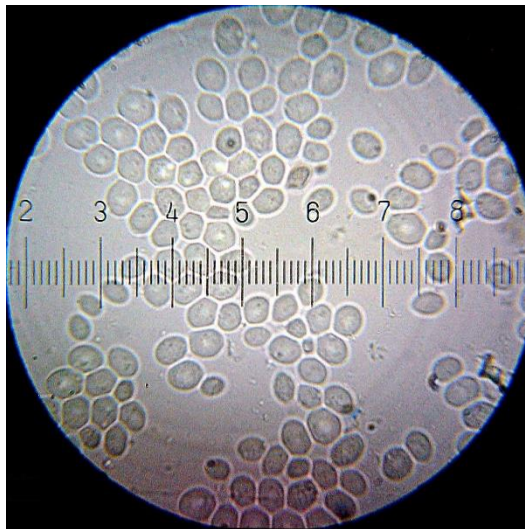
### 6.1.1. *Saccharomyces* sp.

Rod *Saccharomyces* je poznat po tome što u njega spadaju pivski i pekarski kvasac te vinski kvasci (Dufour i sur., 2011). Ovaj rod je vrlo važan u suvremenim biotehnološkim procesima. Rod *Saccharomyces* može fermentirati velik broj supstrata, uključujući glukozu, fruktozu, galaktozu, maltozu, saharozu, ksilulozu, dekstrin, rafinozu i škrob (Becker i Boles., 2003).

U svijetu se gotovo sva proizvodnja etanola postiže korištenjem jednog roda i vrste, kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Binod i sur., 2013). Kvasac *S. cerevisiae* ne može fermentirati pentoze poput ksiloze i arabinoze (Weber i sur., 2010).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* su robustne, vrlo su otporne na toksične inhibitore i produkte fermentacije te fermentiraju šećere pri niskim pH-vrijednostima, što smanjuje rizik kontaminacije (Weber i sur., 2010).

Poznati su i posebni sojevi koji proizvode etanol iz soka šećerne trske i melase te soka od repe i melase i stavljaju se u promet i za komercijalnu proizvodnju. Do sada se pokazalo da je kvasac sposoban proizvesti etanol od heksoznih šećera dobivenih saharifikacijom lignoceluloza. Nedavno su odabrani i komercijalizirani sojevi kvasca visokih učinaka za proizvodnju suho mljevenog kukuruznog etanola primjenom serijskih fermentacijski procesa (Binod i sur., 2013). Neki sojevi kvasca fermentiraju brže ili su sposobni pretvoriti supstrat u etanol s većim učinkom. Na slici 7 prikazana je *Saccharomyces cerevisiae* pod svjetlosnim mikroskopom.



Slika 7. Prikaz *Saccharomyces cerevisiae* pod svjetlosnim mikroskopom

Izvor: [https://commons.wikimedia.org/wiki/Saccharomyces\\_cerevisiae](https://commons.wikimedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae)

Etanol koji se proizvodi pomoću kvasca *S. cerevisiae*, kao i korištenjem većine ostalih mikroorganizama, odvija se u dva procesa, prvo procesom glikolize, a zatim procesom alkoholne fermentacije.

Prema istraživanju Linde i sur., (2007) istražena je proizvodnja etanola pomoću ječmene slame prethodno obrađene parom s niskim udjelom enzima i niskom koncentracijom kvasca, a najveći prinos etanola i koncentracija etanola od 82 % odnosno 15,5 g/L, postignuti su pri 5 % punjenju krute tvari, enzimskom unosu od 20 jedinica određene testom filtriranog papira i s 5 g/L kvasca.

Nedavno je prema istraživanju Ruiz i sur. (2012) ocijenjena proizvodnja etanola pomoću prethodno obrađene pšenične slame pomoću termo tolerantne flokulirajuće kulture *S.*

*cerevisiae*, a to istraživanje je pokazalo da je na koncentraciju etanola utjecalo opterećenje enzimima i opterećenje biomasom. Maksimalna koncentracija etanola od 14,84 g/L postignuta je pri 45 ° C, s 3 % opterećenja biomasom.

Prema istraživanju Choi i sur., (2012) proizvodnja etanola iz ostataka kave pomoću *S. cerevisiae* postigla je koncentraciju etanola i prinos (na temelju sadržaja šećera) od 15,3 g/L, odnosno 87,2 %.

Prethodna istraživanja pokazuju da koncentracija natrijevih iona ima značajne učinke na proizvodnju etanola pomoću *S. cerevisiae* te da postoji interaktivni učinak između kalcija i magnezija. Utvrđeno je da je optimalna koncentracija natrija 930 mg/L, a povećanje koncentracije natrija smanjilo je proizvodnju etanola zbog negativnog učinka na glikolizu, kao i zbog konkurentne inhibicije unosa kalija koja dovodi do iscrpljivanja kalija iz stanice i povećane razine natrija (Soyuduru i sur., 2009).

### **6.1.2. *Schizosaccharomyces* sp.**

*Schizosaccharomyces* je rod fisijskih kvasaca (vegetativno se razmnožava poprečnom diobom), sposoban fermentirati ksilozu u etanol pod mikroaerofilnim ili kisikom ograničenim uvjetima. Prema istraživanju koje je provedeno zaključeno je da istodobna fermentacija i izomerizacija ksiloze (SFIX) omogućuju potpunu fermentaciju ksiloze u jednom koraku (Lastick i sur., 1990). SFIX pruža značajno poboljšanje fermentacije ksiloze u etanol, jer je brži i tolerantniji na veće koncentracije ksiloze i etanola. Također kvasci ovog roda se najviše koriste zbog svoje sposobnosti podnošenja većih koncentracija alkohola dok je podnošenje SO<sub>2</sub> slično *S. cerevisiae*.

### **6.1.3. *Kluyveromyces* sp.**

Rod kvasaca *Kluyveromyces* (Slika 8) je prvi put zabilježen 1956. i karakteriziran impresivnom sposobnošću fermentacije, a u taj rod spadaju vrste koje mogu rasti na galaktozi, laktozi, inulinu, fruktozi i sirutki (Dufour i sur., 2011).

O izravnoj fermentaciji D-ksiloze u etanol pomoću *K. marxianus* soja SUB-80-S izvijestili su (Margaritis i Bajpai, 1982). Navedeni soj je proizveo etanol u anaerobnim uvjetima u mediju koji je sadržavao 20 g/l ksiloze. Koncentracija i prinos etanola bili su 5,6 g/l i 0,28 g etanola/g.

Proizvodnja etanola iz biomase topole i eukaliptusa istovremenom saharifikacijom i fermentacijom (SSF) pomoću termo tolerantnog soja kvasca *K. marxianus* CECT 10875 utvrđena je u istraživanju prema Ballesteros i sur., (2004).



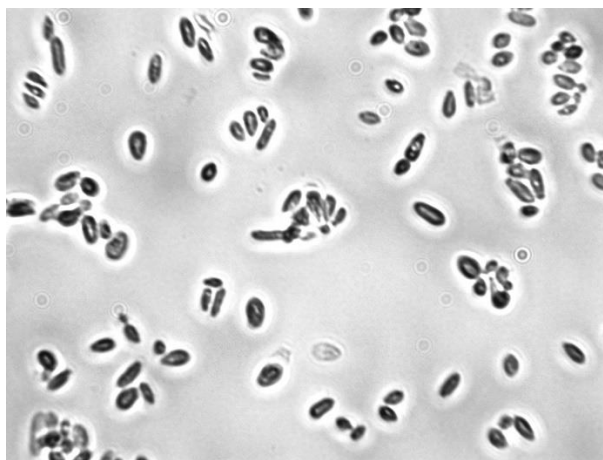
Rezultati su pokazali da je moguće postići prinose SSF-a u rasponu od 50–72 % maksimalnog iskorištenja SSF-a, za 72–82 h. Korištenje termo tolerantnih sojeva na visokim procesnim temperaturama (42°C) umanjuje rizik od onečišćenja drugim fermentacijskim kvascima. To omogućuje rad u nesterilnim uvjetima što je vrlo povoljno za kontrolu procesa.

Tomás-Pejo i sur., (2009) razvili su simultani proces saharifikacije i fermentacije za proizvodnju etanola pomoću termo tolerantnog soja *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. Prinos etanola iznosio je 36,2 g/L, što je 20 % više prinosa etanola u usporedbi sa serijskim SSF-om. Prema istraživanju Toyoda i Ohtaguchi, (2008) utvrđeno je da se u proizvodnji etanola *K. lactis* NBRC 1903 koristila sirutka kao izvor laktoze. Istraživanje je pokazalo da razina otopljenog kisika imala ključnu ulogu u proizvodnji etanola u *K. lactis* NBRC 1903.

U provedenom istraživanju, upotrebom divljeg prosa u SSF-u s termo tolerantnim sojem kvasca, *K. marxianus* IMB3, postignuta je koncentracija etanola i prinos od 22,5 g/L odnosno 86 %, nakon 168 h inkubacije (Pessani i sur., 2011).

Proizvodnja etanola iz topole (*Populus nigra*) uz predtretman eksplozijom parom i tekućom toplom vodom procesom SSF-a pomoću *K. marxianus* CECT dala je zanimljive rezultate (Negro i sur., 2003). Rezultati pokazuju da je proces proizvodnje etanola iz topole koja je prethodno obrađena eksplozijom pare dala 60 % bolji prinos tijekom SSF, u usporedbi s topolom prethodno obrađene tekućom toplom vodom.

Na slici 8. prikazan je izgled *Kluyveromyces marxianus*.

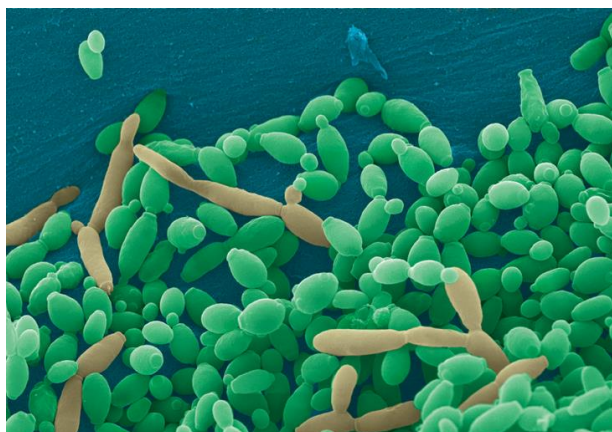


Slika 8. Izgled stanica *Kluyveromyces marxianus* pod svjetlosnim mikroskopom

Izvor: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/kluyveromyces-marxianus>

#### 6.1.4. *Candida* sp.

Rod *Candida*, osim svojih poznatih patogenih učinaka kod ljudi, također je poznat po proizvodnji etanola iz različitih sirovina. Procesima razgradnje šećera, pomoću enzima glukoamilaze, cijepa polisaharide te omogućuje daljnju pretvorbu šećera u etanol. Pretvorba šećera dobivenih iz drvnih sirovina u etanol ograničena je na heksoze jer ksiloza nije fermentabilan monosaharid, međutim, ksiloza je glavna komponenta lignoceluloznih ostataka (Binod i sur., 2013). Većina kvasaca koji metaboliziraju ksilozu ne proizvode etanol. Iako većina kvasaca može rasti na ksilozi u aerobnim uvjetima vrlo mali broj njih će fermentirati ksilozu. Jedan od prvih primjera vrsta iz roda *Candida* odnosi se na *Candida tropicalis*, koja je sposobna fermentirati ksilozu u uvjetima s ograničenim kisikom u prisutnosti povećanih koncentracija polietilen glikola (Hagerdal i sur., 1985). Na slici 9. prikazan je ilustracijski prikaz *Candida tropicalis*.



Slika 9. Ilustracijski prikaz *Candida tropicalis*

Izvor: [https://en.wikipedia.org/wiki/Candida\\_tropicalis#/media/File:C\\_tropicalis\\_YC466.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Candida_tropicalis#/media/File:C_tropicalis_YC466.png)

Prema Tanimura i sur., (2012) izoliran je novi soj kvasca *C. shehatae* koji je sposoban za fermentaciju etanola na povišenoj temperaturi. Prinos proizvodnje etanola iznosio je 71,6 % u SX mediju (3 % ksiloze i 0,67 % YNB (dušikova baza bez kvasaca) bez aminokiseline) nakon 24 sata inkubacije na 37 ° C. Ovaj soj je proizvodio etanol čak i od rižine slame, a utvrđeno je da je superiorniji od *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola iz lignocelulozne biomase.

*Candida tropicalis* može pretvoriti ksilozu u etanol u aerobnim uvjetima, a proizvodnja etanola ubrzava se prozračivanjem. Za pretvaranje ksiloze u etanol u aerobnim uvjetima potrebno je razgrađivati glukozu preko Embden Meyerhoffa puta i puta pentoze fosfata.

Kod kontinuirane fermentacije ksiloze pomoću *C. shehatae* u dvostupanjskom reaktoru se može prevladati glavni faktor koji sprječava kontinuiranu proizvodnju etanola. Stalan dotok svježih stanica i kontinuirano uklanjanje istrošenih stanica pomaže u smanjenju gubitka fermentacijske aktivnosti zbog anaerobioze i izloženosti visokim razinama koncentracije etanola (Alexander i sur., 1988).

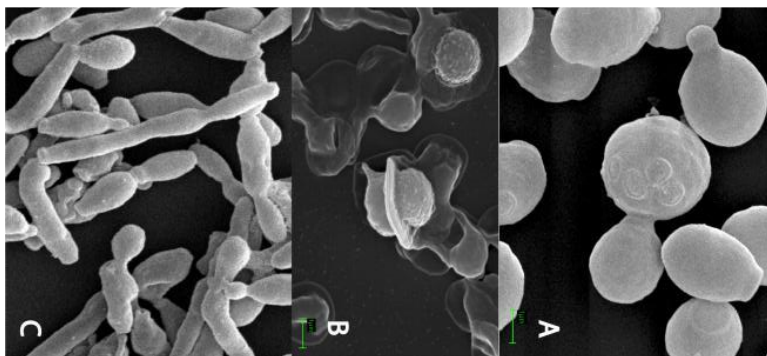
### 6.1.5. *Pichia* sp.

Među organizmima za fermentaciju pentoze pokazalo se da *P. stipitis* najviše primjenjuje u industriji (Slika 10) (Agbogbo i sur., 2006). Na primjer, hemicelulozni hidrolizati *Prosopis juliflora* (18,24 g šećera/l juhe) pri fermentaciji s *P. stipitis* proizvode 7,13 g/l etanola (Gupta i sur., 2009). Detoksificirani hidrolizat *L. camara* bogat ksilozom, fermentiran s *P. stipitis* 3498 pri pH 5,0 i 30 °C tijekom 36 sati, rezultirao je s 0,33 g alkohola/g upotrijebljene lignoceluloze (Kuhad i sur., 2010).

U još jednom primjeru, detoksificirani hidrolizat vodenog zumbula hemicelulozne kiseline (bogat šećerima pentoze) fermentiran s *P. stipitis* NCIM-3497 pri pH 6,0 i 30 °C rezultirao je s 0,425 g etanola/g lignoceluloze (Kuhad i sur., 2010).

U istraživanju Shupe i Liu, (2012) istraženi su utjecaji brzine miješanja na proizvodnju etanola iz hidrolizata javora *P. stipitis*. Zaključeno je da je najveći prinos etanola (29,7 g/l) opažen kada je brzina protoka zraka postavljena na 100 cm<sup>3</sup>, a brzina miješanja na 150 okretaja u minuti. Povećanje ili smanjenje brzine miješanja u rasponu 300–350 okretaja u minuti rezultiralo je padom proizvodnje etanola.

Na slici 10. prikazana je *Pichia stipitis* pod elektronskim mikroskopom.



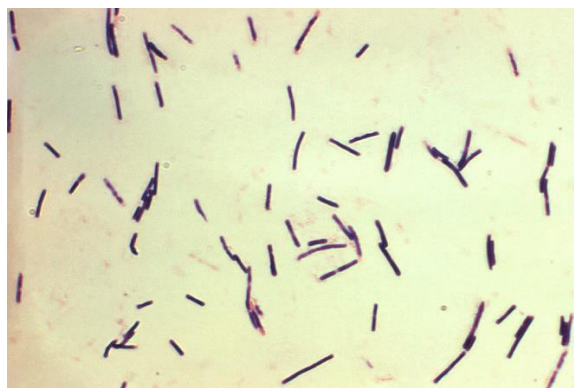
Slika 10. Prikaz *Pichia stipitis* pod elektronskim mikroskopom

Izvor: [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pichia\\_stipitis\\_three\\_morphology\\_photo.jpg](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/File:Pichia_stipitis_three_morphology_photo.jpg)

## 6.2. Bakterije

### 6.2.1. *Clostridium* sp.

Rod *Clostridium* je prvi puta opisan 1880., a radi se o Gram-pozitivnim štapićastim obligatnim anaerobima (Dufour i sur., 2011). Ovaj rod sadrži neke patogene vrste uključujući uzročnike botulizma i tetanusa. Vrste unutar roda koriste širok spektar supstrata od heksoza i pentozna pa do lignoceluloznih šećera arabinoze, ksiloze i celobioze, te složenih ugljikohidrata poput ksilana i škroba. Vrste unutar ovog roda također su poznate po nizu ekstracelularnih enzima koji učinkovito razgrađuju hemicelulozu i celulozu (Mitchell W. J., 1998). Na slici 11. prikazan je rod *Clostridium* pod svjetlosnim mikroskopom.



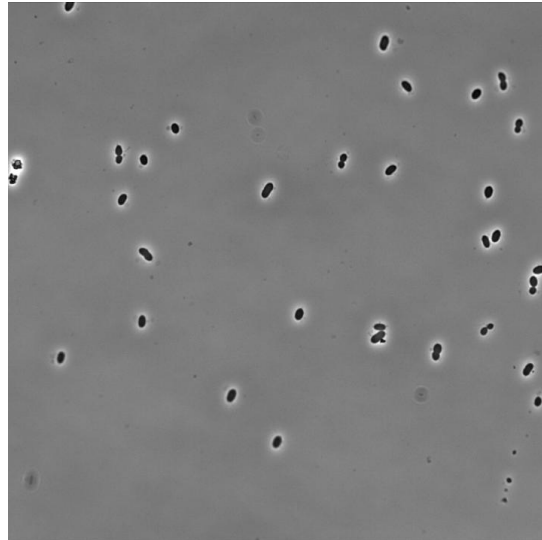
Slika 11. Prikaz roda *Clostridium* po svjetlosnim mikroskopom  
Izvor: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Clostridium>

Campos i sur., (2002). su utvrdili da *Clostridium beijerinckii* ima sposobnost aceton-butanol-etanol (ABE) fermentacije pomoću kukuruza. Serijska fermentacija rezultirala je s 8,93 g/l ukupne proizvodnje aceton butanol etanola u usporedbi s 24,80 g/l ukupnim aceton butanol etanolom kad se medij nadopuni hranjivim tvarima.

### 6.2.2. *Zymomonas* sp.

Unutar roda *Zymomonas* najpoznatija vrsta je *Zymomonas mobilis*. Zbog svoje velike učinkovitosti kojom provode šećere u etanol Gram-negativnim bakterijama roda *Zymomonas* se predaje sve veća važnost. Iako prirodno fermentira heksoze (tj. fruktozu,

glukoze i saharoze), pomoću genetičkog inženjerstva se uspjelo doći do sinteze enzima poput beta-glukozidaze, potrebnih za razgradnju i fermentaciju šećera poput ksiloze. Na slici 12. prikazana je *Zymomonas mobilis* pod svjetlosnim mikroskopom.



Slika 12. Prikaz *Zymomonas mobilis* pod svjetlosnim mikroskopom

Izvor: <https://www.eurekaalert.org/multimedia/785834>

Različite metaboličke karakteristike i uži spektar supstrata čine *Z. mobilis* neprikladnim za proizvodnju etanola iz sirovina na bazi šećera iz škroba, ali je dobar domaćin za proizvodnju etanola iz lingoceluloznih otopina (Xia i sur., 2019).

Bakterijske stanice *Z. mobilis* su znatno manje od stanica *S. cerevisiae* pa je velika površina dostupna za unos glukoze (Swings i DeLey, 1977). Upravo velika površina i Entner-Doudoroff put metaboliziranja glukoze daju bakteriji nadimak “katabolički brzi put” (engl. “*catabolic highway*”) (Sprenger, 1996).

U istraživanju Zhao i sur., (2014) uspoređena je proizvodnja etanola pomoću *Z. mobilis* ZM4 i *S. cerevisiae* iz medija sastavljenog od 200 g/L glukoze u kojem je 3,30 g/L biomase akumulirano pomoću ZM4 što je 50% manje od onog što je nakupio kvasac. Dva soja završila su fermentaciju etanola u isto vrijeme u trajanju od 50 sati, a specifična stopa proizvodnje etanola udvostručena je s bakterijom.

U istraživanju Lawford i Rousseau, (1997) proizvodnja etanola pomoću *Z. mobilis* koristeći kukuruzni strmi liker, kao isplativi mediji, pokazala je zanimljive rezultate. Utvrđeno je da je 1 % (v/v) kukuruznog strmog napitka optimalno, a učinkovitost pretvorbe šećera u etanol, bila je 98 %. Proizvodnju etanola iz hidrolizata škroba pomoću *Z. mobilis* i glukoamilaze imobilizirane u hidrogelu polivinil alkohola proveli su Rebros i sur., (2009).

Produktivnost etanola povećana je 2,1 puta s imobiliziranom glukoamilazom u usporedbi sa sustavom mikroorganizama bez slobodnih enzima.

Međutim, *Z. mobilis* metabolizira glukozu, fruktozu i saharozu, a prinos etanola iz saharoze je značajno ugrožen zbog stvaranja polisaharida levana (Sprenger G.A., 1996), što ga čini neprikladnim za proizvodnju etanola iz soka šećerne trske ili melase. Isto tako, žitarice sa škrobom kao glavnim ugljikohidratima koriste se u industriji, a škrob je potrebno hidrolizirati u glukozu. Iako je glukoza glavni šećer, u hidrolizatu postoje i drugi šećeri, poput maltoze i maltotrioze, koje fermentiraju *S. cerevisiae*, ali i *Z. mobilis*. Stoga se *Z. mobilis* ne može koristiti za proizvodnju etanola iz žitarica. (Xia i sur., 2019)

Prema istraživanju koje su proveli su Rebros i sur., (2009) u proizvodnji etanola iz hidrolizata škroba pomoću *Z. mobilis* i glukoamilaze zarobljene u hidrogelu polivinil alkohola, utvrđeno je da je produktivnost proizvodnje etanola povećana za 2,1 puta s imobiliziranom glukoamilazom u usporedbi sa sustavom mikroorganizama bez slobodnih enzima.

### **6.2.3. *Thermoanaerobacter* sp.**

*Thermoanaerobacter* sp. je Gram-negativna, anaerobna i nesporogena bakterija. Bakterija je istraživana u kontekstu proizvodnje biogoriva zbog njeznog širokog spektra supstrata, posebno prema šećerima koji su prisutni u lignoceluloznim sirovinama. Georgieva i sur., (2008) istraživali su proizvodnju etanola termofilnom bakterijom *Thermoanaerobacter* BG1L1 u kontinuiranom reaktoru koristeći mokru eksploziranu pšeničnu slamu. Fermentacija je provedena u reaktoru s fluidiziranim slojem na 70 ° C. Prinos etanola korištenjem nedetoksificiranog hidrolizata iznosio je 0,39-0,42 g/g. Ovo istraživanje otkrilo je potencijal vrsta *Thermoanaerobacter* pomoću reaktora s fluidiziranim slojem za anaerobnu fermentaciju etanola.

## **6.3. Mikroskopske gljive**

### **6.3.1. *Fusarium* sp.**

Proizvodnja etanola iz hidrolizata drva pomoću sojeva *Fusarium oxysporum* D-140 i NCIM1072 (Slika 13) pri pH-vrijednosti 5,5 i temperaturi 30 °C nakon 96 sati fermentacije iznosila je 12,3 g/L i 11,7 g/L. U prisutnosti ekstrakta kvasca i minerala nakon 108 sati inkubacije proizvodnja etanola je iznosila 13,2 g/L) (Binod i sur., 2013).

Pivski trop (eng. *spent brewer's grain*) je atraktivna jeftina sirovina za proizvodnju etanola. Xiros i Christakopoulos, (2009) su u istraživanju procijenili submerznu proizvodnju etanola pomoću *Fusarium oxysporum* uz primjenu integriranog procesa. Procijenjeni su učinci različitih procesnih parametara koji utječu na proizvodnju etanola. Hidroliza predstavlja usko grlo, a pomoću *F. oxysporum* postignut je prinos etanola od 109 g/kg suhe tvari što je 60 % od teorijskog prinosa i stoga je ovaj proces ekonomski opravdan te prikladan za komercijalnu primjenu. *F. oxysporum* može fermentirati ksilozu koja je prisutna u pivskom tropu, a učinak početne koncentracije šećera i aeracije utječu na provedbu fermentacije *F. oxysporum*.

Ruiz i sur., (2007) ocijenili su proizvodnju etanola iz lignoceluloznih ostataka koji su sadržavali 50 % ksiloze i 50 % glukoze pomoću *F. oxysporum*, uz postizanje prinosa etanola 0,28 g/g. Učinkovitost fermentacije bila je niža, ali njegova sposobnost za SSF predstavlja potencijalnu prednost. Na slici 13. prikazan je *Fusarium oxysporum*.



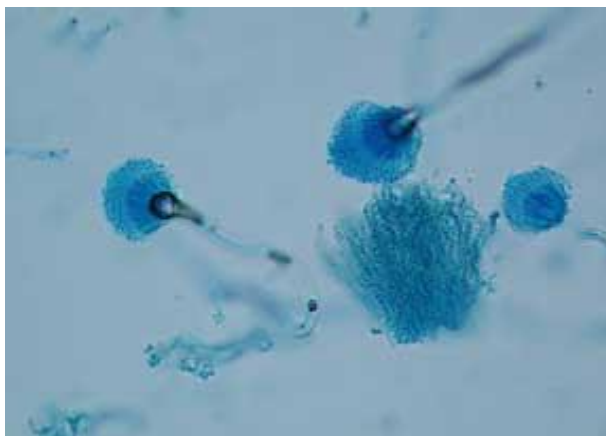
Slika 13. *Fusarium oxysporum* pod svjetlosnim mikroskopom  
Izvor: <https://en.wikipedia.org/wiki/Fusarium>

### 6.3.2. *Aspergillus* sp.

Pushalkar i Rao, (1998) opisali su celulolitičku gljivicu *Aspergillus terreus* koja je pokazala dodatno svojstvo fermentacije glukoze, drugih heksoza, pentoza i disaharida u etanol. Od različitih ispitanih izvora ugljika, glukoza maksimalno doprinosi proizvodnji etanola.

Vrijednosti etanola i teoretski prinosi koje je *A. terreus* proizvela s glukozom i celobiozom bili su veći od onih koje su bile kod drugih vrsta gljiva. Na slici 14. prikazan je *Aspergillus terreus* pod svjetlosnim mikroskopom.





Slika 14. Prikaz *Aspergillus terreus* pod svjetlosnim mikroskopom  
Izvor: [https://www.diark.org/diark/species\\_list/Aspergillus\\_terreus\\_NIH2624](https://www.diark.org/diark/species_list/Aspergillus_terreus_NIH2624)

### 6.3.3. *Mucor* sp.

Sues i sur., (2005) identificirali su *Mucor indicus* kao potencijalni soj za proizvodnju etanola koji može rasti aerobno, kao i anaerobno na različitim pentozama i heksozama s prinosom i produktivnošću istim kao kod *S. cerevisiae*.

Odabran je ekonomičan medij za proizvodnju etanola tako da su kvaščeveve ekstrakt u mediju za fermentaciju zamijenili ekstraktom plijesni *M. indicus* (Binod i sur., 2013). Prinos etanola iznosio je 0,46 g/g , a produktivnost 0,69 g/L. Proizvodnja etanola bila je veća pri aerobnom rastu na glukozu bez limitacije kisikom. Izgled sporangija sa sporama plijesni *Mucor* sp. prikazan je na slici 15.

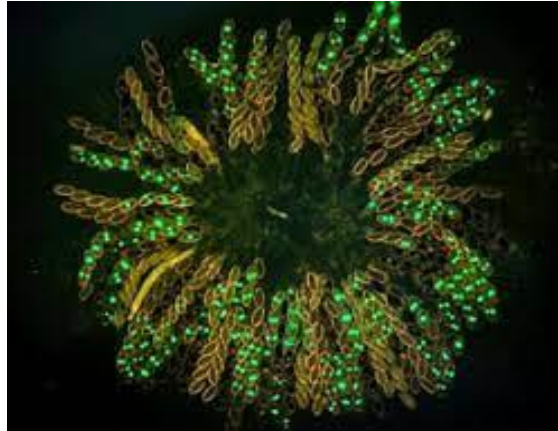


Slika 15. Prikaz spora plijesni *Mucor* pod svjetlosnim mikroskopom  
Izvor: [https://www.researchgate.net/figure/Mucor-on-Lactophenol-Cotton-Blue-staining-showing-broad-aseptate-hyphae-with-extension\\_fig2\\_304582832](https://www.researchgate.net/figure/Mucor-on-Lactophenol-Cotton-Blue-staining-showing-broad-aseptate-hyphae-with-extension_fig2_304582832)



#### 6.3.4. *Neurospora* sp.

Dogaris i sur., (2012) proveli su istraživanje o proizvodnji etanola pomoću *Neurospora crassa* iz bagaze slatkog sirka prethodno tretirane razrijeđenom kiselinom. Pokazalo se da je *N. crassa* superiorna u odnosu na kvasac *S. cerevisiae*, dok njihove miješane kulture imaju negativan utjecaj na proizvodnju etanola. Na slici 16. prikazan je izgled spora plijesni *Neurospora crassa*.



Slika 16. Izgled spora plijesni *Neurospora crassa* pod elektronskim mikroskopom  
Izvor: [http://www.genomenewsnetwork.org/articles/05\\_03/mold.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/articles/05_03/mold.shtml)

## 7. Zaključak

Zbog sve veće industrijalizacije i motorizacije došlo je do porasta potražnje za naftom. Proizvodnjom biogoriva smanjuje se ovisnost tržišta o uvozu nafte. Biogoriva se dobivaju preradom biomase, a mogu biti proizvedena neposredno iz biljaka ili posredno iz industrijskog i poljoprivrednog otpada i/ili otpada iz kućanstva. Danas se najveća pozornost pridaje etanolu kao biogorivu. Naime, u posljednjih tridesetak godina proizvodnja etanola u svijetu je porasla za oko šest puta, a razlog toga je činjenica da se etanol sve više koristi kao zamjena djela benzina za pogon motornih vozila.

Najstariji način dobivanja etanola je alkoholna fermentacija. Etanol se tako proizvodi fermentacijom šećera koji se nalaze u biomasi ili iz šećera koji su proizvedeni prethodnom enzimskom hidrolizom sastojaka biomase. Pomoću mikroorganizama, najčešće kvasaca, odvija se fermentacija šećera, a u novijim tehnologijama i bakterije imaju važnu ulogu u procesu. Postoji ograničen broj mikroorganizama koji fermentiraju ugljikohidrate, uglavnom pentozne ili heksozne šećere u alkohole. Glavni bakterijski sojevi koji proizvode etanol uključuju *Clostridium* sp., *Thermanerobacter* sp., *Zymomonas* sp., itd. Poznato je i da su mikroskopske gljive proizvođači etanola. Neke od najpoznatijih su *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., *Neurospora* sp. Najpoznatija vrsta kvasaca u svijetu pomoću kojih se postiže najveća proizvodnja etanola je *Saccharomyces* sp. Osim *Saccharomyces* sp. kvasci koji se koriste za proizvodnju etanola su *Schizosaccharomyces* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Pichia* sp. koji mogu fermentirati čak i pentozne šećere.

Svi gore navedeni mikroorganizmi veoma su važni za proizvodnju etanola, a glavne karakteristike u proizvodnji su im sposobnost davanja visokog prinosa etanola i podnošenje visoke koncentracije etanola. Za očekivati je da će se buduća proizvodnja etanola, zbog većeg stupnja korištenja lignocelulozne biomase kao sirovine, temeljiti na novim vrstama mikroorganizama s većom učinkovitosti proizvodnje etanola. Zbog složenosti procesa proizvodnje, cijena etanola proizvedenog iz lignoceluloznih sirovina je dva do tri puta veća od cijene benzina. Stoga će, osim učinkovitosti, ovi mikroorganizmi morati zadovoljiti i uvjet ekonomske isplativosti procesa proizvodnje etanola iz lignocelulozne biomase.

## 8. Literatura

1. Agbogbo F. K., Coward-Kelly G., Torry-Smith M., Wenger K. S., (2006) Fermentation of glucose/ xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem* 41:2333–2336
2. Ajanovic A., Reinhard H., (2014) »On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU.« *Applied Energy*, 15. December 2014: 730–737
3. Bai F. W., Anderson W. A., Moo-Young M., (2008) Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.* 26 89–105
4. Balan V. (2014) »Current challenges in commercial producing biofuels from lignocellulosic biomass.« *ISRN Biotechnology*: 1-31
5. Ballesteros M., Oliva J. M., Negro M.J., Manzanares P., Ballesteros I. (2004) Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochem* 39:1843–1848
6. Becker, J., Boles E., (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes LArabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7), 4144-4150
7. Binod, P., Sindhu, R., Pandey A. (2013) The alcohol fermentation step: The most common ethanologenic microorganisms among yeasts, bacteria and filamentous fungi. U: *Lignocellulose conversion - enzymatic and microbial tools for bioethanol production*, (Faraco, V., ured.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, London/ New York, str. 131-149
8. Bishnu J., Megh R. B., Jarina J., Rajani M., Lakshmaiah S. (2011). »Lignocellulosic ethanol production: Current practices.« *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2011: 172-182
9. Campos E. J., Qureshi N., Blaschek H. P. (2002) Production of acetone butanol ethanol from degermed corn using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Appl Biochem Biotechnol* 98–100:553–561

10. Canilha L., Carvalho W., Felipe M. G., Silva J. B., Giuli M. (2010) Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol* 161:84–92
11. Cardona, C.A., Sánchez, Ó.J. (2007): Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour Technol.* 98:2415-2457
12. Chakraborty, S., Aggarwal, V., Mukherjee, D., Andras, K. (2012) Biomass to biofuel: a review on production technology. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 7, S254–S262. doi:10.1002/apj.1642
13. Choi S., Wi S. G., Kim S. B., Bae H. J. (2012) Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresour Technol* 125:132–137
14. Davison B. H., Scott C. D. (1988) Operability and feasibility of ethanol production by immobilized *Zymomonas mobilis* in a fluidized-bed bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 18:19–34
15. Dogaris I., Gkounta O., Mamma D., Kekos D. (2012) Bioconversion of dilute acid pretreated sorghum bagasse to ethanol by *Neurospora crassa*. *Appl Biochem Biotechnol* 95:541–550
16. Dufour, N., Swana J., Rao R., (2011) Fermentation organisms for 5- and 6-carbon sugars. U: *Plant Biomass Conversion*, (Hood E.E., Nelson, P., Powell, R., ured.), John Wiley & Sons Inc., Chichester, str. 157-197
17. Ergun M., Mutlu S. F., Gurel O. (1997) Improved ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* with EDTA, ferrocyanide and zeolite X addition to sugar beet molasses. *J Chem Technol Biotechnol* 68:147–150
18. Fotheringham I., Kaftzik N., Oswald N. (2009) Method for detecting biofuel producing microbes, Patent WO/2009/014722, WIPO
19. García-Aparicio M.P, Oliva J.M., Manzanares P., Ballesteros M., Ballesteros I., González A., Negro M. J. (2011) Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel* 90:1624–1630
20. Georgieva T.I., Mikkelsen M.J., Ahring B.K. (2008) Ethanol production from wet-exploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium

- Thermoanaerobacter BG1L1 in a continuous immobilized reactor. *Appl Biochem Biotechnol* 145:99–110
21. Goldemberg, J., Guardabassi P. (2010) The potential for first generation ethanol production from sugarcane. *Biofuels, Bioproducts, and Biorefining*, 4, 17–24
  22. Grba S. (2010). *Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji*. Zagreb: Plejada
  23. Gupta R., Sharma K. K., Kuhad R.C. (2009) Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, woody substrate for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* NCIM 3498. *Bioresour Technol* 100:1214–1220
  24. Hagerdal B. H., Jonsson B., Vogel E. L. (1985) Shifting product formation from xylitol to ethanol in pentose fermentations using *Candida tropicalis* by adding polyethylene glycol (PEG). *Appl Microbiol Biotechnol* 21:73–175
  25. İçöz, E., Tuğrul, K.M., Saral, A. (2009) Research on ethanol production and use from sugar beet in Turkey, *Biomass and Bioenergy*, 33 (1), 1-7
  26. Ivančić Šantek M., Miškulin E., Beluhan S., Šantek B. (2016): Novi trendovi u proizvodnji etanola kao biogoriva, *Kem. Ind.* 65 (1-2) (2016) 25–38
  27. Jeffries T.W., Alexander M. A (2012) Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. In: Kirk TK, Chang H-M (eds) *Biotechnology in pulp and paper manufacture*. Proceedings of the fourth international conference on biotechnology in the pulp and paper industry, Butterworth-Heinemann, USA, pp 311–321
  28. Joshi S.K., Verma J. (1990) Production of ethanol from sugars in wood hydrolysate by *Fusarium oxysporum*. *World J Microbiol Biotechnol* 6:10–14
  29. Junior M. M., Batistote M., Cilli E. M., Ernandes J. R. (2009) Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeast in media containing structurally complex nitrogen sources. *J Inst Brewing* 115:191–197
  30. Kuhad R. C., Gupta R., Khasa Y. P., Singh A. (2010) Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresour Technol* 101:8348–8354

31. Laciš L. S., Lawford H. G. (1991) *Thermoanaerobacter ethanolicus* growth and product yield from elevated levels of xylose or glucose in continuous cultures. *Appl Environ Microbiol* 57(2):579–585
32. Lashinky A., Schwartz N. D. (2006). How to beat the high cost of gasoline. *Forever*
33. Lastick S. M., Mohagheghi A., Tucker M. P., Grohmann K. (1990) Simultaneous fermentation and isomerization of xylose to ethanol at high xylose concentrations. *Appl Biochem Biotechnol* 24(25):431
34. Linde M., Glabe G., Zacchi G. (2007) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzym Microb Technol* 40:1100–1107
35. Mani A. (2018). Food Preservation by Fermentation and Fermented food products. *Int. Journal of Academic Research & Dev.*, 1st special issue 51-57
36. Margaritis A., Bajpai P. (1982) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. *Appl Environ Microbiol* 44:1039–1041
37. Maziar S. A. (2010) A study on some efficient parameters in batch fermentation of ethanol using *S. cerevisiae* SC1 extracted from fermented *Siahe Sardasht* Pomace. *Afr J Biotechnol* 9:2906–2912
38. Meher, L. C., Vidyasagar, D., Naik, S. N. (2006) Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10, 248–268
39. Mitchell W.J. (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by *Clostridia*. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 31-130
40. Mojović L., Pejin D., Lazić M. (2007) *Bioetanol kao gorivo - stanje i perspektive*, Monografija, Tehnološki fakultet, Leskovac
41. Nakayama S., Morita T., Negishi H., Ikegami T., Sakaki K., Kitamoto D. (2008) *Candida krusei* produces ethanol without production of succinic acid: a potential advantage for ethanol recovery by pervaporation membrane separation. *FEMS Yeast Res* 8:706–714

42. Naqvi, M., Yan, J. (2015) First-Generation Biofuels. Handbook of Clean Energy Systems, 1–18
43. Negro M. J., Manzanares P., Ballesteros I., Oliva J. M., Cabañas A., Ballesteros M. (2003) Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. Appl Biochem Biotechnol 105–108:87–100
44. Panagiotou G., Villas-Boas S. G., Christakopoulos P., Nielsen J., Olsson L. (2005) Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. J Biotechnol 115:425–434
45. Parekh S., Wayman M. (1986) Fermentation of cellobiose and wood sugars to ethanol by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Biotechnol Lett 8:597–600
46. Pessani N. K., Atiyeh H. K., Wilkins M. R., Bellmer D. D., Banat I. M. (2011) Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. Bioresour Technol 102:10618–10624
47. Pushalkar S., Rao K. K. (1998) Ethanol fermentation by a cellulolytic fungus *Aspergillus terreus*. World J Microbiol Biotechnol 14:289–291
48. Rebros M., Rosenberg M., Grosová Z. (2009) Ethanol production from starch hydrolyzates using *Zymomonas mobilis* and glucoamylase entrapped in polyvinylalcohol hydrogel. Appl Biochem Biotechnol 158:561–570
49. Regadon, J. A., Perez, F., Valdes, M. E., Demiguel, C., Ramirez, M. (1997) A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. Food Microb. 3, 247-254
50. Rendleman, C., Shapouri, H. (2007) New Technologies in Ethanol Production. United States Department of Agriculture. Agricultural Economic Report No. 842
51. Rodrigues T. H., Rocha M. V., Macedo G. R., Goncalves L. R. (2011) Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. Appl Biochem Biotechnol 164:929–943
52. Ruiz E., Romero I., Moya M., Sanchez S., Bravo V., Castro E. (2007) Sugar fermentation by *Fusarium oxysporum* to produce ethanol. World J Microbiol Biotechnol 23:259–267

53. Ruiz H. A., Silva D. P., Ruzene D. S., Lima L. F., Vicente A. A., Teixeira J. A. (2012) Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain—effect of process conditions. *Fuels* 95:528–536
54. Serrat M., Bermúdez I. R. C., Villa T. G. (2004) Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*, potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Appl Biochem Biotechnol* 117:49–6
55. Shupe A. M., Liu S. (2012) Effect of agitation rate on ethanol production from sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol* 168:29–36
56. Silva J. P. A., Mussatto S. I., Roberto I. C. (2010) The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol* 162:1306–1315
57. Singh, A., Pant, D., Korres, N.E. (2010) Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 101, 5003–5012
58. Soyuduru D., Ergun M., Tosun A. (2009) Application of a statistical technique to investigate calcium, sodium, and magnesium ion effect in yeast fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 152:326–333
59. Sprenger, G.A. (1996) Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 301–307
60. Sues A., Millati R., Edebo L., Taherzadeh M. J. (2005) Ethanol production from hexoses, pentoses and dilute acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. *FEMS Yeast Res* 5:669–676
61. Swings, J. and DeLey, J. (1977) The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* 41, 1–46
62. Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, Liden G (2000) Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. *J Biosci Bioeng* 90:374–380
63. Tanimura A., Nakamura T., Watanabe I., Ogawa J., Shima J. (2012) Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature *SpringerPlus* 2012. 1:27. doi:10.1186/2193-1801-1-27



64. Tomás-Pejó E., Oliva J. M., González A., Ballesteros I., Ballesteros M. (2009) Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel* 88:2142–2147
65. Toyoda T., Ohtaguchi K. (2008) Production of Ethanol from Lactose by *Kluyveromyces lactis* NBRC 1903. *Thammasat Int J Sci Technol* 13:30–35
66. Vogel H. C., Todaro C. L. (1996) *Fermentation and biochemical engineering hand book*, 2nd edn. Noyes publications, New Jersey, pp 122–160
67. Watanabe I., Nakamura T., Shima J. (2008) A strategy to prevent the occurrence of *Lactobacillus* strains using lactate-tolerant yeast *Candida glabrata* in bioethanol production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35 1117–1122
68. Watanabe I., Nakamura T., Shima J. (2010) Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. *J Biosci Bioeng* 110:176–179
69. Wayman, S. E. (2001): Twenty ears of trials, tribulations, and research progress in bioethanol technology. *Appl Biochem Biotech.* 91-93: 5-21
70. Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T., Boles, E. (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1303-1315
71. Xia J., Yang Y., Liu C. G., Yang S., Bai F. W. (2019) Trends in Biotechnology
72. Xiros C., Christakopoulos P. (2009) Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnol Biofuels* 2:4
73. Xia J., Yang Y., Liu C. G., Yang S., Bai F. W. Trends in Biotechnology (2019) Engineering *Zymomonas mobilis* for Robust Cellulosic Ethanol Production. Trends in Biotechnology (2019) 1754:13
74. Yong Q., Li X., Yuan Y., Lai C., Zhang N., Chu Q., Xu Y., Yu S. (2012) An improved process of ethanol production from hemicellulose: bioconversion of undetoxified hemicellulosic hydrolyzate from steam-exploded corn stover with a domesticated *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol* 167:2330–2340

75. Zabed H., Golam F., Jaya N. S., Mohd S., Z., Rosli H., Amru N. B. (2014)  
»Bioethanol production from fermentable sugar juice.« The scientific world journal  
1-11
76. Zavargo, Z., Popov S., Dodić S., Razmovski R., Tomanović R., Dodić J. (2008)  
Mogućnosti razvoja proizvodnje i primjene bioetanolu u autonomnoj pokrajini  
Vojvodini, studija, Tehnološki fakultet Novi Sad
77. Zhao, N. i sur. (2014) Flocculating *Zymomonas mobilis* is a promising host to be  
engineered for fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. *Biotechnol. J.*  
9, 362–371