

DOSKONALENIE FERMENTACJI ETANOLOWEJ SŁOMY RZEPAKOWEJ

Natalia Kordala[✉], Małgorzata Lewandowska,
Włodzimierz Bednarski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. Przeprowadzono badania, których celem było określenie przydatności szczepu drożdży *Pachysolen tannophilus* KKP 546 do fermentacji hydrolizatów – pochodnych lignocelulozy ze słomy rzepakowej, poddanej łagodnej alkalicznej obróbce wstępnej. Proces fermentacji prowadzono w warunkach beztlenowych oraz tlenowych, stosując wytrząsanie z prędkością 120 obr. min⁻¹ w celu zapewnienia równomiernego rozpuszczenia tlenu w podłożu. Efekty procesu fermentacji wyrażono ilością wytworzonego etanolu w medium poreakcyjnym. Po 96-godzinnej fermentacji brzeczek przygotowanych na bazie hydrolizatów słomy prowadzonych w warunkach tlenowych lub beztlenowych uzyskano średnio 1,54 oraz 1,64% v/v etanolu, przy sprawności całkowitej fermentacji na poziomie odpowiednio 56,44 i 60,23%.

Słowa kluczowe: lignoceluloza, słoma rzepakowa, bioetanol, fermentacja etanolowa, *Pachysolen tannophilus*

WSTĘP

Paliwa kopalne zaspokajają obecnie w około 95% zapotrzebowanie na energię, jednak ich zasoby są ograniczone. Z upływem czasu pokłady paliw konwencjonalnych ulegną zmniejszeniu do poziomu determinującego graniczną opłacalność ich wydobycia. Dodatkowym czynnikiem inicjującym prace badawcze zmierzające do dywersyfikacji paliw silnikowych jest konieczność ograniczenia substancji toksycznych wydzielanych ze spalinami pojazdów samochodowych.

Produkcja biopaliw I generacji otrzymywanych z roślin jadalnych, takich jak zboża czy rośliny olejowe, jest dobrze poznana. Wykorzystanie biopaliw w transporcie zwiększa

[✉]natalia.kordala@uwm.edu.pl

się każdego roku o 4% i szacuje się, że do 2035 roku ich udział w tym sektorze wyniesie 25% [IEA 2011]. W celu redukcji zanieczyszczenia środowiska oraz ograniczenia zużycia roślin jadalnych coraz częściej do produkcji biopaliw wykorzystuje się rośliny niespożywcze lub materiały odpadowe (biopaliwa II generacji) [Rostek 2011]. Najczęściej wykorzystywanymi surowcami w produkcji tego rodzaju biopaliw są surowce lignocelulozowe: odpady rolnicze, drewno i trawy. Konwersja biomasy roślinnej do biopaliw i produktów pochodnych jest elementem niezbędnym w zrównoważonym rozwoju przemysłowym współczesnego społeczeństwa.

Implementacja tzw. dyrektyw biopaliwowych UE do polskiego ustawodawstwa i konieczność zwiększania udziału biokomponentów w paliwach płynnych przyczyniła się do rozwoju rynku biopaliw transportowych w Polsce. Wynikający z realizacji narodowych celów wskaźnikowych wzrost produkcji biodiesla w Polsce spowodował zwiększenie arealu rzepak, co wymusza również konieczność zagospodarowania odpadów poprodukcyjnych, w tym przypadku słomy rzepakowej [Kachel-Jakubowska i in. 2011]. Według FAO, w 2010 roku powierzchnia pól uprawnych rzepak na świecie wynosiła ponad 3 mln km². W Polsce w 2012 roku uprawy rzepak łącznie z rzepikiem zajmowały 720 tys. ha [GUS 2013]. Słoma rzepakowa może więc stanowić wartościowy i tani surowiec do produkcji bioetanolu [Díaz i in. 2010, Mathew i in. 2011]. Jej wykorzystanie w tym celu może być atrakcyjne również ze względu na stosunkowo dużą zawartość celulozy (42%). Oprócz wymienionego składnika odpady rolnicze takie jak słoma zawierają hemicelulozy (32%) i małe ilości ligniny (3–13%), co ułatwia ich degradację [Adapa i in. 2009].

W procesach biotechnologicznej konwersji lignocelulozy najważniejszy jest dobór odpowiedniego mikroorganizmu, tolerującego obecność ewentualnych inhibitorów, charakteryzującego się dużą wydajnością fermentacji (powyżej 90% wydajności teoretycznej) oraz szeroką specyficznością substratową [Balat 2011]. Dominującym źródłem cukrów w hydrolizatach słomy są heksozy, których fermentacja efektywnie zachodzi przy udziale drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, powszechnie wykorzystywanych w przemyśle gorzelnicznym. Ze względu na brak aparatu enzymatycznego pozwalającego na asymilację obecnych w hydrolizatach cukrów pięciowęglowych, drożdże *S. cerevisiae* nie wykorzystują w pełni potencjału surowca lignocelulozowego [Limayem i Ricke 2012]. Ostatnio obserwuje się wzrost zainteresowania drobnoustrojami zdolnymi do fermentowania pentoz oraz o innych korzystnych cechach operacyjnych (termofilność, duża produktywność etanolu, tolerancja na wysokie stężenie etanolu i inhibitory). Badania dotyczą zarówno szczepów naturalnych, jak i doskonalonych metodami inżynierii genetycznej [Sarkar i in. 2012].

Scharakteryzowano wiele mikroorganizmów pod względem predyspozycji do efektywnej fermentacji pentoz, między innymi drożdże z rodzajów *Pichia*, *Candida*, *Pachysolen*.

Pachysolen tannophilus był pierwszym szczepem drożdży, u którego zidentyfikowano zdolności do fermentowania ksylozy [Schneider i in. 1981]. Rodzaj powstającego produktu zależy od dostępności tlenu w środowisku. W warunkach tlenowych *P. tannophilus* syntetyzuje zarówno ksylitol, jak i etanol, a warunki beztlenowe sprzyjają wytwarzaniu ksylitolu. W wielu badaniach udowodniono, że najlepszym rozwiązaniem dla wydajnej produkcji bioetanolu przez ten szczep jest zapewnienie warunków mikroaerofilnych, czyli takich, w których stężenie tlenu jest niższe niż w ziemskiej atmosferze [Xu i Taylor 1993, Converti i in. 2001]. Wykazano również, że temperatura

przewodzenia procesu ma wpływ na rodzaj tworzącego się produktu. Sánchez i inni [2004] w swoich badaniach największą szybkość właściwą syntezy etanolu odnotowali, prowadząc fermentację w temperaturze 30°C, a ksylitolu – w temperaturze 15°C. Fermentacja w podwyższonej temperaturze jest pożądana ze względu na to, że zwiększa szybkość reakcji metabolicznych, zmniejsza koszty chłodzenia i ogranicza ryzyko kontaminacji. Znane są inne czynniki środowiskowe, takie jak na przykład ograniczenie biotyną, które mogą zmieniać proporcje syntezy etanolu i ksylitolu, faworyzując wytwarzanie pierwszego z wymienionych [Harner i in. 2014].

W niniejszym opracowaniu przedstawiono wyniki badań dotyczących określenia przydatności szczepu drożdży *P. tannophilus* KKP 546 do fermentacji pochodnych polisacharydów lignocelulozy ze słomy rzepakowej.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem doświadczalnym była słoma rzepakowa (*Brassica napus* L. var. *napus*) pozyskana z Zakładu Produkcyjno-Doświadczalnego „Bałcyny” Spółka z o.o. Surowiec w postaci wysuszonej (ok. 93% suchej masy) mielono (młyn tnący Retsch SM 100) do poziomu rozdrobnienia 1–2 mm.

Słomę rzepakową poddano chemicznej obróbce w warunkach: temperatura 120°C, czas 1 h, dodatek NaOH 0,1 g·g⁻¹ ss substratu, stosunek frakcji stałej do płynnej 1:9 (parametry te wyznaczono na podstawie wcześniejszych badań). Materiał po obróbce frakcjonowano metodą wirowania i w celu detoksykacji przemywano wodą destylowaną. Frakcję stałą następnie uzupełniono wodą do stężenia 10% materiału w zawiesinie. Kwasowość czynną medium reakcyjnego ustalono na poziomie pH 5,0 za pomocą stężonego kwasu fosforowego(V), a następnie pasteryzowano (90°C przez 20 min).

Do hydrolizy enzymatycznej wykorzystano kompozycję trzech preparatów enzymatycznych Sigma-Aldrich: celulazę z *Trichoderma longibrachiatum* (nr kat. C9748), ksylanazę z *Trichoderma longibrachiatum* (nr kat. X2629) oraz celobiazę (Novozyme 188, nr kat. C6105). Enzymy stosowano w dawkach wyrażonych w jednostkach aktywności na 1 g suchej masy substratu: celulaza – 15 U¹, ksylanaza – 15 FXU², Novozyme 188 – 30 CBU³ [Świątek i in. 2014]. Reakcję hydrolizy prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 500 cm³ zawierających 200 cm³ podłoża, w temperaturze 42°C, w laboratoryjnej wytrząsarce Innova 40 (New Brunswick Scientific) przy 250 obr·min⁻¹ przez 72 h. W otrzymanych hydrolizatach oznaczono stężenie uwolnionych cukrów redukujących przy użyciu metody z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) [Miller 1959] oraz przeprowadzono analizę zawartości związków o charakterze inhibitującym z wykorzystaniem wysokosprawnej chro-

¹ 1 U – ilość enzymu uwalniająca 1 μmol glukozy z celulozy w czasie 1 h (warunki reakcji: pH 5,0, temperatura 37°C, czas inkubacji 2 h).

² 1 FXU – ilość enzymu uwalniająca 1 μmol ksylozy z ksylanu w czasie 1 minuty (warunki reakcji: pH 4.5; temperatura 30°C).

³ 1 CBU – ilość enzymu przekształcająca 1 μmol celobiozy do 2 μmol glukozy w ciągu 1 min (warunki reakcji: pH 4,8, temperatura 50°C).

matografii cieczowej. Oznaczanymi związkami były: furfural, 5-hydroksymetylofurfural, kwas mrówkowy, kwas lewulinowy, 4-hydroksybenzaldehyd, wanilina.

Drożdże *P. tannophilus* KKP 546 pozyskano z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Szczep przechowywano w temperaturze 4°C, na stałym podłożu Sabouraud Agar (Merck), a inokulum do zaszczerpienia hydrolizatów słomy rzepakowej przygotowano w płynnej pożywce YPG o objętości 100 cm³ i kwasowości czynnej pH 5,1 ± 0,1. W tym celu dokonano zmywu ze skosu z namnożoną biomasa drożdży i inkubowano przez 24 h w temperaturze 25°C, w wytrząsarce Innova 40 przy 200 obr·min⁻¹. Hydrolizaty słomy rzepakowej (200 cm³) uzyskane zgodnie z procedurą opisaną wcześniej zaszczerpięto dodatkiem inokulum *P. tannophilus* w dawce 5% (v/v). Fermentację prowadzono w temperaturze 25°C, w warunkach beztlenowych, stacjonarnych, lub tlenowych, stosując wytrząsanie 120 obr·min⁻¹ przez 96 h. Po procesie fermentacji zawiesinę wirowano (RCF 4100 g, 10 min) i w uzyskanym supernatancie oznaczono stężenie etanolu [AOAC 1990] oraz zawartość cukrów redukujących.

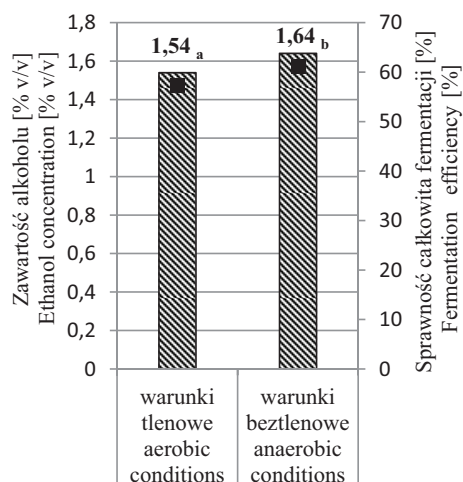
Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy wykorzystaniu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie Statistica przy poziomie istotności $p = 0,05$.

WYNIKI I DISKUSJA

Drożdże *Pachysolen tannophilus* wykazują zdolność do fermentacji szerokiego spektrum cukrów zawartych w hydrolizatach lignocelulozowych, z wyjątkiem L-arabinozy. Wraz z *Pichia stipitis* są wskazywane jako jedne z najbardziej obiecujących mikroorganizmów naturalnie fermentujących ksylozę. Metabolizm ten zachodzi poprzez konwersję ksylozy do ksylitolu za pomocą reduktazy ksylozy, a następnie do ksylulozy za pomocą dehydrogenazy ksylitolu. Ksyluloza jest następnie fosforylowana przez ksylulokinazę do ksylulozo-5-fosforanu, który występuje w szlaku pentozofosforanowym i w glikolizie [Chandel i in 2011a, Kuhad i in. 2011].

Po 96-godzinnej fermentacji brzeczki przygotowanych na bazie hydrolizatów słomy rzepakowej z zastosowaniem drożdży *P. tannophilus* uzyskano średnio 1,54 oraz 1,64% v/v etanolu (rys.), odpowiednio w warunkach tlenowych i beztlenowych. Istotność różnic została potwierdzona analizą statystyczną ($p = 0,032$). Proces charakteryzował się zbliżoną sprawnością oraz większą aktywnością fermentacyjną niż stosowane we wcześniejszych doświadczeniach drożdże *S. cerevisiae* 7 (56,62, 1,35% v/v) [Lewandowska i in. 2016], co może potwierdzać zdolność testowanego mikroorganizmu do fermentacji różnych cukrów (w tym również pięciowęglowych).

Badania nad możliwością zastosowania szczepu *P. tannophilus* do fermentacji pochodnych lignocelulozy prowadzili Sathesh-Prabu i Murugesan [2011], wykorzystując hydrolizaty słomy sorgo, którą – podobnie jak w badaniach własnych – wstępnie poddano obróbce wodorotlenkiem sodu. Po 96 h fermentacji brzeczki zawierających 200 g·dm⁻³ cukrów redukujących stężenie etanolu wyniosło 56 g·dm⁻³ hydrolizatu. Wynik uzyskany w niniejszej pracy (13,0 g EtOH dm⁻³ przy stężeniu cukrów 45,11 g·dm⁻³) jest obiecujący i potwierdza przydatność drożdży *P. tannophilus* w biokonwersji odpadów rolniczych.



Słoma rzepakowa/ Rape straw

■ Zawartość alkoholu [% v/v] ■ Sprawność całkowita fermentacji [%]
 Ethanol concentration [% v/v] Overall efficiency of fermentation [%]

a, b – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p = 0,05$.
 a, b – mean values denoted by the different letters are significantly different at $p = 0.05$.

Rys. Porównanie zawartości alkoholu i sprawności całkowitej fermentacji hydrolyzatów słomy rzepakowej w zależności od warunków procesu

Fig. Comparison of the final ethanol concentration in rape straw hydrolysates and efficiency of the fermentation process depending on the process conditions

Zdolność drożdży *P. tannophilus* do fermentacji cukrów pięciowęglowych wykorzystali w swoich badaniach Cheng i inni [2008], w których surowcem była trzcina cukrowa po obróbce wstępnej kwasem siarkowym(VI). Uzyskany hydrolyzат kwasowy, po uprzedniej detoksykacji z zastosowaniem elektrodializy, autorzy poddali fermentacji alkoholowej w warunkach tlenowych z zastosowaniem wytrząsania 150 obr.·min⁻¹, w temperaturze 30°C. Stężenie etanolu w medium reakcyjnym po 30 h fermentacji wyniosło 19 g·dm⁻³, co odpowiadało wydajności równej 0,34 g etanolu·g⁻¹ sacharydów. Podobne badania przeprowadzili Saleh i inni [2014], wykorzystując jako substrat do produkcji etanolu hydrolyzат kwasowy wyłoków z oliwek, zawierający jako źródło węgla głównie ksylozę (20 g·dm⁻³). Po procesie fermentacji, prowadzonej w temperaturze 30°C w warunkach beztlenowych, odnotowano głównie syntezę ksylitolu z produktywnością na poziomie 0,44 g·g⁻¹ ksylozy, co odpowiadało jego stężeniu na poziomie 8,20 g·dm⁻³ hydrolyzatu. Etanol syntetyzowany był jako produkt uboczny, a jego zawartość w medium reakcyjnym wyniosła zaledwie 1,21 g·dm⁻³. Autorzy zaobserwowali również, że drożdże w pierwszej kolejności asymilowały glukozę, a następnie ksylozę. Wnioski te są zgodne z doniesieniami Zhao i innych [2008], którzy potwierdzili, że w środowisku reakcyjnym zawierającym oba wymienione cukry *P. tannophilus* wykorzystuje najpierw glukozę jako źródło węgla. Obecność glukozy może wydłużyć okres adaptacji *P. tannophilus* do wy-

korzystania ksylozy w podłożach zawierających mieszane źródła węgla. Wyeliminowanie mechanizmu represji katabolicznej u szczepów przemysłowych jest więc niezmiernie istotne w celu zwiększenia wydajności syntezy bioproduktów, zwłaszcza gdy substratem jest biomasa lignocelulozowa, która składa się z mieszaniny cukrów, takich jak: arabinoza, glukoza, mannoza i ksyloza. Represja kataboliczna może prowadzić w tym przypadku do wydłużenia fermentacji oraz zmniejszenia wydajności, co utrudnia wdrożenie technologii w warunkach przemysłowych [Park i in. 2012].

Aplikacja drożdży *Pachysolen tannophilus* w biotechnologicznej konwersji lignocelulozy do bioetanolu ma pewne ograniczenia i wady. Mikroorganizm ten charakteryzuje się niską wydajnością etanolu, wymaga mikroaerofilnych warunków oraz nie fermentuje ksylozy w niskim pH [Limayem i Ricke 2012]. Dodatkowo cechuje go bardzo duża wrażliwość na inhibitory powstające w czasie obróbki wstępnej. Doniesienia literaturowe wskazują, że *P. tannophilus* jest szczepem szczególnie wrażliwym na furfural [Chandel i in. 2011b], którego dawka $0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ powoduje zahamowanie fermentacji z udziałem drożdży tego gatunku. Zastosowana w prezentowanym doświadczeniu alkaliczna obróbka wstępna pozwoliła na ograniczenie powstawania związków o charakterze inhibitorów hydrolizy i fermentacji. Dowodem tego jest przeprowadzona analiza chromatograficzna hydrolizatów otrzymanych ze słomy rzepakowej, która wykazała obecność jedynie kwasu lewulinowego w stężeniu $16,65 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że ten rodzaj wstępnego traktowania materiału lignocelulozowego jest korzystny pod względem późniejszej fermentacji – szczególnie w przypadku zastosowania szczepu *Pachysolen tannophilus*.

Wykorzystanie drożdży z gatunku *P. tannophilus* do produkcji bioetanolu na poziomie komercyjnym jest ograniczone głównie z powodu specyficznego zapotrzebowania na tlen, ich wrażliwości na inhibitory oraz małej tolerancji etanolu w porównaniu do powszechnie stosowanych drożdży *S. cerevisiae* [Limayem i Ricke 2012]. Wspomniane ograniczenia przyczyniają się do rozwoju metod inżynierii genetycznej mających na celu zwiększenie odporności drożdży *P. tannophilus* na związki hamujące lub etanol. Przykładem są badania prowadzone przez Harner i innych [2014], w których zastosowano mutagenizację promieniami UV dla uzyskania mikroorganizmów charakteryzujących się większą tolerancją na kwas octowy, w porównaniu do szczepu dzikiego. W wyniku eksperymentu wyselekcjonowano mutantą mającego zdolność do wzrostu przy stężeniu kwasu octowego w środowisku równym 0,90% (w/v) (wzrost odporności o 22% w porównaniu do szczepu dzikiego). Cytowane wyniki prac innych autorów sugerują kierunek kontynuacji badań zmierzających do doskonalenia genetycznego stosowanego szczepu drożdży.

WNIOSKI

1. Badany szczep *Pachysolen tannophilus* KKP 546 charakteryzuje się korzystniejszymi predyspozycjami do fermentacji cukrów w warunkach beztlenowych.
2. Próby fermentacyjne przeprowadzone z wykorzystaniem hydrolizatu słomy rzepakowej wskazują na przydatność testowanego szczepu drożdży w procesie biokonwersji lignocelulozy do etanolu.
3. Uzasadniona jest kontynuacja badań ze szczególnym uwzględnieniem genetycznego doskonalenia stosowanego szczepu drożdży.

LITERATURA

- Adapa P., Tabil L., Schoenau G., 2009. Compaction characteristics of barley, canola, oat and wheat straw. *Biosyst. Eng.* 104, 1–10.
- AOAC International, 1990. Official methods of analysis of AOAC International, 15. edycja, Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, Virginia, 22201, USA.
- Balat M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manag.* 52, 858–875.
- Chandel A.K., Chandrasekhar G., Radhika K., Ravinder R., Ravindra P., 2011a. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnol. Molec. Biol. Rev.* 6(1), 008–020.
- Chandel A.K., Silva S.S., Singh O.V., 2011b. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. W: M.A. Dos Santos Bernardes (red.), *InTech. Biofuel Production Recent Developments and Prospects*.
- Cheng K.K., Cai B.-Y., Zhang J.-A., Ling H.-Z., Zhou Y.-J., Ge J.-P., Xu J.-M., 2008. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochem. Eng. J.* 38, 105–109.
- Converti A., Perego P., Dominguez J.M., Silva S.S., 2001. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Tech.* 28, 339–345.
- Díaz M.J., Cara C., Ruiz E., Romero I., Moya M., Castro E., 2010. Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw. *Bioresour. Technol.* 101, 2428–2435.
- GUS, 2013. Wyniki produkcji roślinnej w 2012 r. Warszawa.
- Harner N.K., Bajwa P.K., Habash M.B., Trevors J.T., Austin G.D., Lee H., 2014. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* tolerant to hardwood spent sulfite liquor and acetic acid. *Anton. Leeuw.* 105, 29–43.
- IEA, 2011. Co-generation and Renewables. Solutions for a low-carbon energy future.
- Kachel-Jakubowska M., Kraszkiewicz A., Szpryngiel M., Niedziółka I., 2011. Możliwość wykorzystania odpadów poprodukcyjnych z rzepaku ozimego na cele energetyczne. *Inż. Rol.* 6, 61–68.
- Kuhad R.C., Gupta R., Khasa Y.P., Singh A., Zhang Y.H.P., 2011. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15, 4950–4962.
- Lewandowska M., Szymańska K., Kordala N., Dąbrowska A., Bednarski W., Juszczyk A., 2016. Evaluation of *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae* capability to ferment hydrolysates of rape straw and *Miscanthus giganteus* as affected by the pretreatment method. *Bioresour. Technol.* 212, 262–270.
- Limayem A., Ricke S.C., 2012. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energ. Combust.* 38, 449–467.
- Mathew A.K., Chaney K., Crook M., Humphries A.C., 2011. Alkaline pre-treatment of oilseed rape straw for bioethanol production: Evaluation of glucose yield and pre-treatment energy consumption. *Bioresour. Technol.* 102, 6547–6553.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3), 426–428.
- Park J.M., Vinuselvi P., Lee S.K., 2012. The mechanism of sugar-mediated catabolite repression of the propionate catabolic gens in *Escherichia coli*. *Gene* 504(1), 116–121.
- Rostek E., 2011. Biopaliwa pierwszej i drugiej generacji – metody otrzymywania i właściwości. *Logistyka* 6, 2520–2526.

- Sánchez S., Bravo V., Moya A.J., Castro E., Camacho F., 2004. Influence of temperature on the fermentation of d-xylose by *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol and xylitol. *Process Biochem.* 36, 673–679.
- Saleh M., Cuevas M., García J.F., Sánchez S., 2014. Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. *Biochem. Eng. J.* 90, 286–293.
- Sarkar N., Gosh S.K., Bannerjee S., Aikat K., 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew. Energ.* 37, 19–27.
- Sathesh-Prabu C., Murugesan A.G., 2011. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biore-sour. Technol.* 102, 2788–2792.
- Schneider H., Wang P.Y., Chan Y.K., Maleszka R., 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* 3, 89–92.
- Świątek K., Lewandowska M., Świątek M., Bednarski W., Brzozowski B., 2014. The improvement of enzymatic hydrolysis efficiency of rape straw and *Miscanthus giganteus* polysaccharides. *Biore-sour. Technol.* 151, 323–331.
- Xu J., Taylor K.B., 1993. Characterization of ethanol production from xylose and xylitol by a cell-free *Pachysolen tannophilus* system. *Appl. Environ. Microb.* 59(1), 231–235.
- Zhao L., Zhang X., Tan T., 2008. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. *Biomass Bioenerg.* 32, 1156–1161.

RAPE STRAW ETHANOL FERMENTATION IMPROVEMENT

Summary. Bioethanol has been recognized as a potential alternative to petroleum-derived transportation fuels. Cellulosic ethanol can be produced from almost any plant biomass, but favorable sources include wood chips, corn stover, rape and rice straw, grasses such as switchgrass and *Miscanthus* spp., garden clippings and food waste. Lignocellulose as a raw material is thus abundant, widely-distributed (often free) and readily replenished and sustainable because plants produce lignocellulose by first converting CO₂ into sugars and then into polymers using the energy from sunlight. However, the production of ethanol from cellulose requires a greater amount of processing than first-generation biofuels fermented directly from starch and sugars. Specifically, the bottlenecks are the reduction of biomass to particles small enough to make enzymatic conversion efficient (i.e. comminution) followed by the conversion of lignocellulose into sugars ready for fermentation (i.e. saccharification). The yeasts traditionally used in fermentation processes are able to consume hexoses as substrate but not pentoses. Nevertheless, to obtain the fullest return from lignocellulose waste, within which there is a considerable hemicellulose fraction (18–34%) composed mainly of xylose, it is essential to resort to yeasts which also have the capacity to consume this pentose. To this end, *Pachysolen tannophilus* is capable of transforming d-xylose into useful bioproducts, such as ethanol and xylitol. The research was carried out with the aim of determining the utility of a strain of yeast *P. tannophilus* KKP 546 for fermentation of hydrolysates – derived from lignocellulose. The research material was rape straw after alkaline pretreatment. The hydrolysates of rape straw were fermented at 30°C, under anaerobic stationary conditions and aerobic conditions with shaking at 120 rpm for 96 h. The effects of the fermentation were expressed as the amount of ethanol produced in a fermentation medium. After

a 96-hour fermentation of rape straw hydrolysates ethanol synthesis reached 1.54 and 1.64% v/v, with a total fermentation efficiency of 56.44 and 60.23%, for anaerobic and aerobic conditions respectively. The performance ability in ethanol production by *P. tannophilus* brings promising potential to ferment hydrolysate of lignocellulosic biomass. This study also provided information on rape straw utilization as an inexpensive potent substrate for the production of eco-friendly liquid fuel.

Key words: lignocellulose, rape straw, bioethanol, ethanolic fermentation, *Pachysolen tannophilus*

