

**Grzegorz Kłosowski\*, Dorota Macko\*, Dawid Mikulski\***

## **ROZWÓJ METOD BIOTECHNOLOGICZNYCH PRODUKCJI BIOPALIW ZE ŹRÓDEŁ ODNAWIALNYCH**

### **DEVELOPMENT OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF BIOFUELS PRODUCTION FROM RENEWABLE SOURCES**

**Słowa kluczowe:** biopaliwa, alkohole wyższe, mikrodiesel, etanol celulozowy.

**Key words:** biofuels, higher alcohols, microdiesel, cellulosic ethanol.

*The review showed the current methods of bioethanol production from lignocellulosic biomass implemented recently worldwide. According to leading scientific periodicals, new biotechnological concepts were introduced to the production of the liquid biofuels different from bioethanol (biodiesel, DMF, higher alcohol) acquired from biomass. Biotechnological concepts based on methods of the microbiological biosynthesis, biocatalysis, genetic engineering as well as methods linking the thermochemical synthesis and biocatalysis were discussed. Presented methods are on a different grade of the research, and implantation procedures for the industrial practice.*

#### **1. WPROWADZENIE**

Sukcesywnie wzrastające zapotrzebowanie na energię prowadzi do przyspieszonego zmniejszania się zasobów paliw kopalnych. Szacunkowe prognozy wskazują [Agarwal 2007, Gilbert, Pearl 2005], że zasoby paliw konwencjonalnych pozwolą na pokrycie rosnącego zapotrzebowania na energię, jeżeli chodzi o węgiel kamienny na najbliższe 218 lat, o ropę naftową – na 41 lat, a gaz ziemny – na 63 lata. Paliwa kopalne zaspokajają obecnie około 95% zapotrzebowania na energię, ale ich zasoby są ograniczone. Poszukuje się zatem nowych alternatywnych rozwiązań. Szczególnie poszuki-

---

\* *Dr inż. Grzegorz Kłosowski, mgr Dorota Macko, mgr Dawid Mikulski – Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz; tel.: 52 341 32 86; e-mail: klosowski@ukw.edu.pl*

wane są biopaliwa, będące w stanie realnie konkurować z nośnikami konwencjonalnymi, a jednocześnie pozbawione ich podstawowych wad, tj. mające charakter odnawialny i pozwalające na ograniczenie negatywnego wpływu na środowisko, w tym niekorzystnych zmian klimatycznych [Agarwal 2007; Gilbert, Pearl 2005; Dołęgowska 2009]. Biopaliwa nie znajdowały szerszego zastosowania i akceptacji społecznej ze względu na łatwiejszą dostępność paliw kopalnych i do niedawna również niższą ich cenę. Ze względu na coraz wyższe koszty eksploatacji nowych złóż te niekorzystne w odniesieniu do biopaliw proporcje uległy zmianie w ostatnich latach. Przykładem może być rynek brazylijski, gdzie w 2005 r. cena bioetanolu uległa zmniejszeniu w stosunku do ceny etyliny, z uwzględnieniem różnic w wydajności energetycznej obydwu nośników. Wprowadzenie alternatywnych źródeł energii nie oznacza jednocześnie całkowitej rezygnacji z paliw tradycyjnych, przeciwnie – biopaliwa są wprowadzane stopniowo, stanowią niekiedy kilkuprocentową, powoli zwiększającą się domieszkę do paliw konwencjonalnych [Kupczyk 2007].

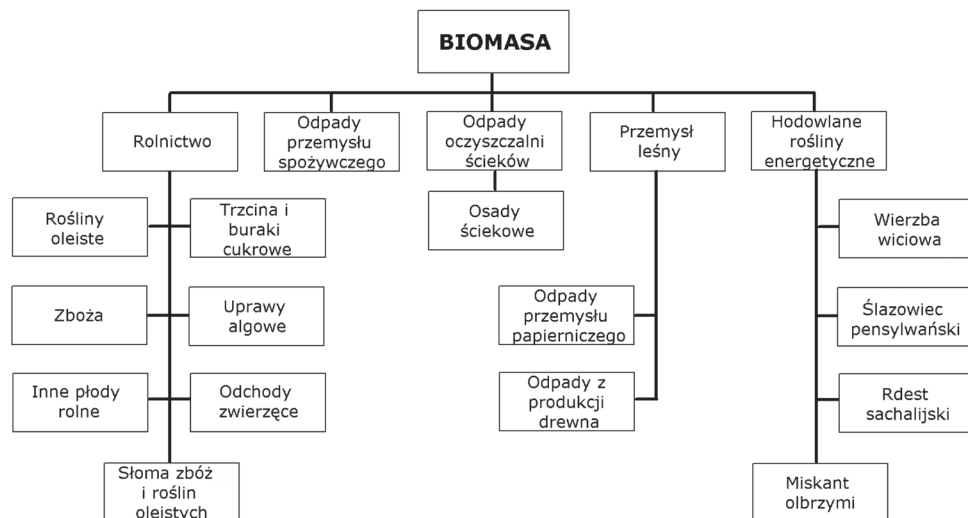
Ludzkość od początku swego istnienia korzystała z odnawialnych źródeł energii. Od 1840 r. używano alkoholu etylowego jako paliwa do lamp. W roku 1970, gdy nastąpił kryzys naftowy spowodowany nałożeniem embarga na ropę naftową przez Organizację Krajbów Eksportujących Ropę Naftową (OPEC), zaczęto stosować etanol jako dodatek do benzyny. Brazylijczycy na szeroką skalę wykorzystują etanol jako paliwo od 1925 r.

Pierwsze próby komercjalizacji produkcji etanolu z drewna podjęto w Niemczech w II połowie XIX w. Niemcy szybko uprzemysłowili proces produkcji etanolu, uzyskując aż 50 galonów etanolu z tony odpadów drewnianych. Pierwszy silnik napędzany czystym etanolem (1860 r.), skonstruował Nicolaus August Otto. Sponsorowała go firma cukrownicza Eugena Langena, który zainteresowany był masową produkcją alkoholu etylowego z przeznaczeniem na paliwo. W 1900 roku dr Rudolf Diesel zasłynął na Wystawie Światowej w Paryżu prezentując model silnika napędzanego 100% olejem arachidowym. Diesel był wizjonerem, uważał, że wykorzystanie olejów roślinnych jako paliwa, pomoże w rozwoju rolnictwa, a w przyszłości bioolej stanie się równie znaczącym paliwem jak ropa naftowa. Po śmierci odkrywcy stworzony przez niego silnik przekształcono na silnik napędzany olejem pochodzenia naftowego, nazywanym dziś „dieslem”, a oleje roślinne stosowano jedynie w wyjątkowych sytuacjach. Siedem lat później w Paryżu Henry Ford zaprezentował, na takiej samej wystawie, skonstruowany przez siebie pojazd model „T”. Według oczekiwań wynalazcy miał on być zasilany czystym alkoholem etylowym otrzymanym z naturalnych produktów, który miał stać się głównym paliwem samochodowym [Agarwal 2007, Antoni i in. 2007].

Twórcy wyżej wymienionych silników stworzyli je z myślą o wykorzystaniu biopaliw jako źródła energii. Przez wiele lat ze względów ekonomicznych wybierano paliwa pochodzenia naftowego. Nadszedł jednak czas, gdy znane zasoby paliw kopalnych znacznie zmalały, ich ceny wzrosły, a regulacje prawne dotyczące zmniejszenia emisji gazów cie-

plarnianych stały się bardziej rygorystyczne, przez co zaczęto większą uwagę koncentrować na wykorzystaniu biopaliw [Czaja, Florek 2005, Demirbas 2005, Kraużlis 2007, Pączosa 2004].

Biopaliwem nazywa się stałe, płynne lub gazowe paliwa produkowane z biomasy, materii organicznej zawartej w żywych organizmach. Zalicza się do niej wszelkie substancje organiczne roślinne oraz zwierzęce, a także produkty pozyskane z ich przetworzenia (rys. 1) [Demirbas 2009, Szeptycki 2007, Budzyński, Bielski 2004, Leja i in. 2009, Roszkowski IBMER].



**Rys. 1.** Potencjalne źródła biomasy [Kłosowski i in. 2007]

**Fig. 1.** Potential sources of the biomass [Kłosowski i in. 2007]

Ze względu na odnawialny charakter, biomasa jest surowcem o największym potencjale jako nośnik energii. Najbogatszym znanym źródłem węglowodanów jest lignoceluloza, podstawowy składnik ściany komórkowej roślin, składająca się z około 25% ligniny oraz około 75% polimerów węglowodanowych (celulozy i hemicelulozy).

Poddając biomasę przemianom biochemicznym, termochemicznym oraz biologicznym uzyskują się między innymi paliwa płynne i gazowe. Do tej pory biopaliwa były wytwarzane głównie drogą fermentacji alkoholowej produktów skrobiowych (etanol), odpadów komunalnych, osadów ściekowych i in. (biogaz), w procesach suchej destylacji drewna (metanol), transestryfikacji wyższych kwasów tłuszczowych (biodiesel). Takie paliwa zalicza się do paliw pierwszej generacji. Obecnie większe znaczenie mają trudniej przetwarzalne produkty, jak celuloza oraz bardziej skomplikowane metody biotechnologiczne [Dellomonaco i in. 2010, Hill i in. 2006].

## 2. PODZIAŁ BIOPALIW

### 2.1. Metan – komponent biogazu

Metan jest obok dwutlenku węgla i małych ilości innych gazów głównym składnikiem biogazu. Pozyskiwany jest w drodze beztlenowej fermentacji substancji organicznych. Istnieje wiele technologii i typów instalacji do pozyskiwania biogazu. W wielu wypadkach powstawanie biogazu jest efektem ubocznym procesu zagospodarowania odpadów. Do produkcji biogazu wykorzystuje się wszelkiego rodzaju materiały: odchody zwierzęce, frakcję organiczną odpadów komunalnych i przemysłowych (roślinnych, zwierzęcych) oraz całe rośliny.

Spalanie biogazu nie powoduje niekorzystnych skutków dla środowiska, ponieważ produktami spalania są w tym wypadku woda i dwutlenek węgla. Metan jest zaliczany do gazów cieplarnianych, a więc jego zagospodarowanie prowadzi do ograniczenia emisji tych gazów do atmosfery [Antoni i in. 2007].

Brak możliwości bezpiecznego transportu biogazu zmusza do wykorzystywania go w miejscach jego produkcji. Wytwarzany lokalnie może zaspokajać potrzeby energetyczne oczyszczalni ścieków oraz gospodarstw rolnych, przerabiany na energię cieplną (spalanie) oraz elektryczną. Istnieją również rozwiązania pozwalające na wykorzystanie biogazu do napędu pojazdów. Gaz sprężony w stalowych zbiornikach pod ciśnieniem 20–25 MPa nosi nazwę CNG (Compressed Natural Gas). Po raz pierwszy wykorzystano go do napędu autobusów komunikacji miejskiej w Bernie.

### 2.2. Estry kwasów tłuszczowych

Do niedawna oleje roślinne i tłuszcze zwierzęce postrzegane były głównie jako składniki żywności. Przez długi czas pomijano możliwość ich wykorzystania jako paliwa ze względu na niską cenę ropy naftowej. Obecnie popularność olejów roślinnych jako nośnika energii sukcesywnie wzrasta.

Wysoka lepkość oraz kompozycja kwasów tłuszczowych wyklucza użycie surowego oleju jako paliwa. Poprawę walorów paliwowych dokonuje się przez rozcieńczanie surowego oleju roślinnego olejem napędowym pochodzenia naftowego oraz mikroemulgację z alkoholami małowcząsteczkowymi, metanolem, etanolem, propanolem i 1-butanolem, w obecności emulgatora, a także pirolizę – krawing termiczny lub transestryfikację czyli reakcję wymiany glicerolu na małowcząsteczkowy alkohol w obecności katalizatora (kwasu lub zasady), której produktem jest biodiesel. Ten sposób transformacji oleju roślinnego zaliczany jest do najbardziej efektywnych [Agarwal 2007, Antoni i in. 2007, Atsumi i in. 2008, Wackett 2008].

Biodiesel składa się głównie z estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME – fatty acid methyl esters), gdzie długość części kwasowej jest uzależniona od biologicznej struk-

tury tłuszczu. Tłuszcze do produkcji biodiesla to głównie triacyloglicerydy, które poddaje się procesowi katalitycznej transestryfikacji metanolem (kataliza chemiczna). Powstałym produktem są estry metylowe kwasów tłuszczowych, a produktem ubocznym reakcji jest glicerol [Antoni i in. 2007, Wackett 2008]. Chemiczna transestryfikacja prowadzona przy użyciu zasady lub kwasu jako katalizatora prowadzi do powstania w bardzo krótkim czasie estrów metylowych z triglicerydów. Wadą tak realizowanej transestryfikacji jest energochłonność. Ponadto pozostałości katalizatorów, wolnych kwasów tłuszczowych (zmydlanie) oraz woda zakłócająca reakcję muszą zostać oddzielone od produktu. Problem, częściowo rozwiązany metodami biotechnologicznymi, stanowi zagospodarowanie dużych ilości gliceryny, kłopotliwego produktu ubocznego transestryfikacji.

Wiele wspomnianych ograniczeń można wyeliminować przez enzymatyczną transestryfikację prowadzoną przy użyciu lipaz. Transestryfikacja enzymatyczna odbywa się dwuetapowo. W pierwszej fazie zachodzi rozkład triglicerydów przy udziale lipazy pochodzenia mikrobiologicznego (*Rhizopus oryzae*, *Candida rugosa*, *C. antarctica*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas capacia*, *P. fluorescence*) na glicerol i wolne kwasy tłuszczowe. Powstałe wolne kwasy tłuszczowe zostają całkowicie przetworzone na estry kwasów tłuszczowych w reakcji z alkoholami (metanol, etanol, propanol, izopropanol, 2-etyl-1-heksanol i in.). Główny produkt uboczny produkcji biodiesla – glicerol – jest wykorzystywany przy produkcji kosmetyków. Połączenie technik katalizy chemicznej oraz enzymatycznej może w znaczący sposób ułatwić konwersję triglicerydów do estrów alkoholowych, proces ten jest również bardziej ekonomiczny [Fukuda i in. 2001].

Znane są technologie, w których glicerol poddawany jest procesowi fermentacji prowadzącej do powstania 1,3-propanediolu, przy użyciu mikroorganizmów (*Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium butyricum* i *Enterobacter agglomerans*). Ito i inni [2005], proponują wykorzystanie glicerolu do produkcji wodoru oraz etanolu. Badany przez nich szczep *E. aerogenes* HU-101 jest zdolny do przemiany węglowodanów i glicerolu w wodór, etanol, 2,3-butanodiol, mleczan i aceton. Szczep HU-101 produkuje około 0,6 mola etanolu z 1 mola glicerolu, przy stężeniu 10–25 g/L. Bakterie te są zdolne do produkcji wodoru i etanolu nawet w podwyższonych stężeniach soli (np. chlorku sodu), które również powstają jako produkt uboczny w transestryfikacji zasadowej [Ito i in. 2005].

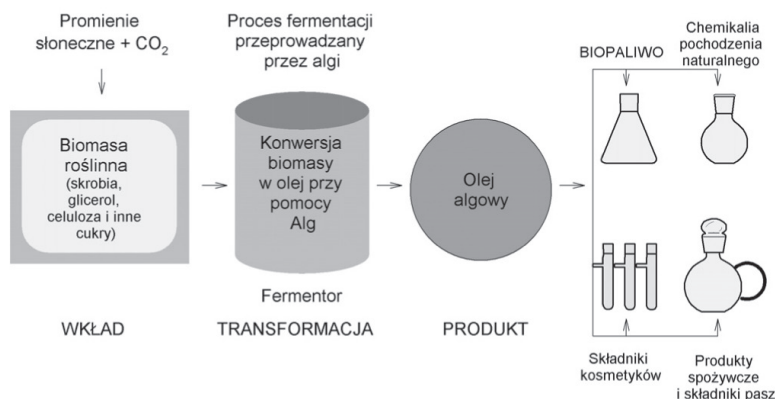
Produkcja biodiesla z olejów spożywczych (rzepak, soja, słonecznik) nie należy do rozwiązań korzystnych ze względu na możliwość wzrostu cen żywności, a głównie zajmowania coraz większego areалу ziem pod uprawę tych roślin.

Paliwem przyszłości może stać się „mikrodiesel”, powstający dzięki rekombinowanym komórkom *Escherichia coli*. Bakterie te nie są w stanie wytworzyć FAME, natomiast produkują estry (triacyloglicerydy, woski). Modyfikowana genetycznie *E. coli* posiadająca gen wyizolowany z *Acinetobacter baylyi* posiada zdolność syntezy estrów woskowych. Natomiast transgeneza genem pochodzącym od *Zymomonas mobilis* umożliwia produkcję etanolu. Przy udziale acetylotransferazy możliwa jest biosynteza estrów etylowych kwasów tłuszcz-

czowych (mikrodiesel). Komórki muszą wzrastać w warunkach tlenowych, w obecności glukozy jako źródła energii i kwasów tłuszczowych. Zmodyfikowane szczepy *E. coli* są w stanie wytworzyć do 26% estrów etylowych kwasów tłuszczowych w suchej masie komórek [Wackett 2008, Borowitzka 2008].

Innym rozwiązaniem jest możliwość wykorzystania oleju z alg do produkcji biodiesla. Niektóre szczepy alg są w stanie wytworzyć więcej oleju w przeliczeniu na hektar niż rośliny oleiste. Istotnie większa wydajność alg jeżeli chodzi o produkcję oleju stwarza możliwość produkcji biopaliw bez wykorzystania surowców spożywczych. Tworzenie sztucznych upraw na lądzie jest wielkim wyzwaniem technologicznym, dlatego wiele firm skłania się do wykorzystania mórz i oceanów oraz terenów pustynnych o dużym nasłonecznieniu do tworzenia plantacji alg. Trwają również badania nad stworzeniem reaktorów do hodowli alg i możliwością wykorzystania ich do produkcji nie tylko biooleju, ale również etanolu, metanolu, metanu oraz wodoru [Dellomonaco 2010, Borowitzka 2009, Gross 2008, Reijnders 2008].

W roku 2003 firma Solazyme Inc. w USA opracowała unikalną technologię wykorzystującą algi do produkcji oleju i biomateriałów w procesie fermentacji. Proces powstawania biooleju z alg (rys. 2) rozpoczyna się od dostarczenia do podłoża hodowlanego odpadów roślinnych, promieniowania słonecznego oraz dwutlenku węgla z atmosfery. W tych warunkach, odpowiednie szczepy alg przeprowadzają proces fotosyntezy, zwiększając intensywnie biomasę i produkując równolegle olej algowy, który może być substratem do produkcji biopaliw i kosmetyków lub wykorzystany do celów spożywczych. Opracowana przez firmę Solazyme Inc. technologia sprzyja wykorzystaniu biomasy roślinnej na biopaliwa przy jednoczesnej redukcji emisji dwutlenku węgla nawet do 95% emisji powstającej w procesie spalania paliw kopalnych [www.solazyme.com].



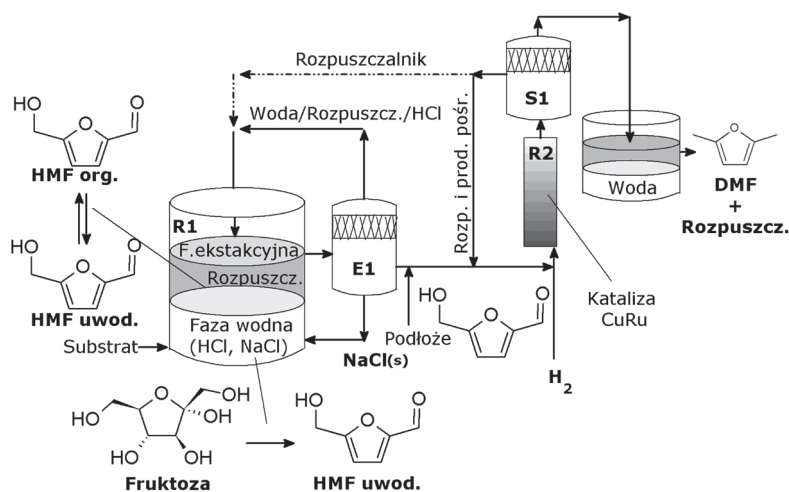
**Rys. 2.** Proces produkcji biooleju (na podstawie materiałów firmy Solazyme Inc.)

**Fig. 2.** Biooil production process (on the basis of Solazyme Inc. data)

### 2.3. DMF – pochodna heksozy

Przy tak wielu technikach produkcji biopaliw zrodziła się poważna debata pomiędzy zwolennikami systemu syntezy termochemicznej (piroliza i kataliza metaliczna) a biotechnologami (biokataliza i synteza mikrobiologiczna) na temat optymalnego sposobu przekształcania biomasy.

Shmidt i Dauenhauer [2007] i Roman-Leshkow [2007] przedstawili metodę połączenia obydwu procesów, której wynikiem jest powstanie koncepcji produkcji paliwa zwanego 2,5-dimetylfuranem (DMF). Celem naukowców było otrzymanie z bogatej w węglowodany (glukoza, skrobia) biomasy paliwa zawierającego jak najmniejszą liczbę atomów tlenu. Wyzwaniem dla badaczy stało się znalezienie sposobu na rozbitcie długich łańcuchów węglowodanowych do jednostek sześciowęglowych, z których jednocześnie można wyeliminować atomy tlenu, minimalizując utratę energii. W fazie wstępnej wykorzystywane są biokatalizatory i rozpoczyna się enzymatyczna degradacja biomasy (głównie skrobi) na fragmenty sześciowęglowe, połączone z enzymatyczną izomeryzacją glukozy do fruktozy. Dalsze przemiany fruktozy polegają na selektywnym odłączaniu cząsteczek tlenu i mogą przebiegać w dwóch etapach (rys. 3 i rys. 4, C).

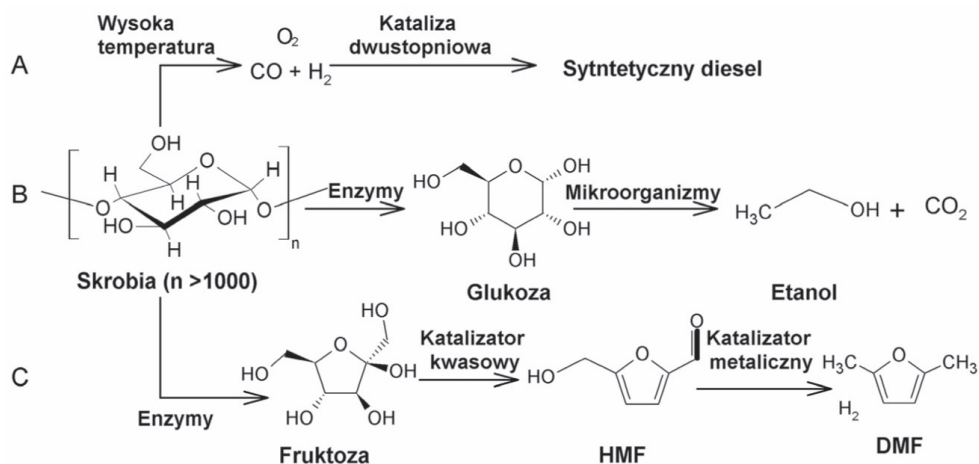


**Rys. 3.** Schemat procesu przemiany fruktozy w DMF: R1 – reaktor dwufazowy, E1 – wyparka (odparowywanie wody, HCl i wytrącanie NaCl z roztworu zawierającego HMF), R2 – reaktor (odwodornienie HMF do DMF z zastosowaniem katalizatora miedziowego), S1 – separator (rozdzielenie produktu DMF od roztworu ekstrakcyjnego) [Kłosowski i in. 2007]

**Fig. 3.** Transformation process of the fructose into DMF (R1 – biphasic reactor, E1 – evaporation of water and HCl from the liquid solvent containing HMF, leading to precipitation of NaCl, R2- hydrogenolysis of HMF to DMF over metallic catalysis, S – separation of the DMF product from the extracting solvent) [Kłosowski i in. 2007]

Pierwszy etap prowadzony w reaktorze dwufazowym (zawierającym katalizator kwasowy, cukry i fazę ekstrakcyjną) prowadzi do odłączenia trzech atomów tlenu w reakcji odwodnienia (kataliza kwasowa), z uzyskaniem 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF), podlegającego ekstrakcji ciągłej w roztworze fazy rozpuszczalnika organicznego (np. 1- lub 2-butanolu). Drugi etap procesu ma na celu odłączenie dwóch atomów tlenu w reakcji dehydrogenizacji (odwodornienia z zastosowaniem katalizatora miedziowego) HMF, z powstaniem DMF, oraz produktów pośrednich 2-metyl-5-hydroksymetylofuranu i 2-metylofuranu, charakteryzującego się również doskonałymi właściwościami jako paliwo. Selektywne wyłączenie atomów tlenu z cząsteczki heksozy (np. fruktoza), prowadzące do powstania DMF, nie tylko obniża temperaturę wrzenia, ale również zmniejsza rozpuszczalność w wodzie oraz pozwala osiągnąć większą liczbę oktanową cząsteczek zawierających jeden atom tlenu [Roman-Leishkow i in. 2007, Schmidt, Dauenhauer 2007]. Przedstawione na rysunku 4 metody alternatywne, obejmujące pirolizę połączoną z produkcją syntetycznego diesla (rys. 4, A) oraz metoda fermentacji alkoholowej (rys. 4, B) są mniej wydajne pod względem energetycznym lub bardziej czasochłonne.

Zastąpienie etapu biokonwersji cukrów prostych w wyniku fermentacji alkoholowej, przez metodę konwencjonalnej katalizy chemicznej sprawia, że przemiana węglowodanów w paliwo staje się setki, a nawet tysiące razy szybsza niż wcześniej. Technika produkcji 2,5-dimetylofuranu stanowi nowość i jest zbyt wcześnie, aby nazwać DMF paliwem przyszłości, jednak takie zalety jak hydrofobowość i wysoka wartość energetyczna skłaniają do badań nad rozwojem technologii jego produkcji [Schmidt, Dauenhauer 2007].



**Rys. 4.** Przykłady produkcji biopaliw ze skrobi [Schmidt, Dauenhauer 2007]

**Fig. 4.** Examples of the production of biofuels from starch [Schmidt, Dauenhauer 2007]



## 2.4. Alkohole wyższe i bioetanol celulozowy

Fermentacja alkoholowa jest najstarszym i najlepiej poznanym procesem biotechnologicznym pozyskiwania bioetanolu. Surowcami wykorzystywanymi w tym procesie niemal zawsze były produkty zawierające skrobię (nasiona zbóż, kukurydza, bulwy ziemniaka) lub sacharozę (trzcina cukrowa, buraki cukrowe). Do wad bioetanolu jako paliwa zalicza się higroskopijność, korozje elementów silników spalinowych oraz wzrost cen żywności i pasz [Agarwal 2007, Cardona, Sanchez 2007].

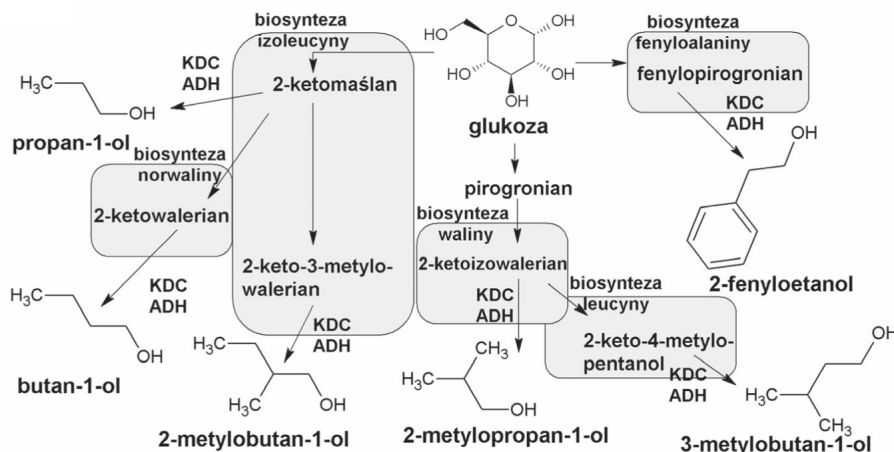
W porównaniu do tradycyjnych paliw, etanol i wyższe alkohole posiadają wiele korzystnych cech jako substytuty pochodnych ropy naftowej, ze względu na większą energię spalania i mniejszą toksyczność. Dodatkową, równie istotną cechą alkoholi jest większa liczba oktanowa w porównaniu do liczby oktanowej paliw kopalnych. Wyższe alkohole, które mogą potencjalnie stanowić alternatywę dla paliw ropopochodnych, nie są wytwarzane przez mikroorganizmy w drodze biologicznej w wystarczających ilościach i z zadowalającą wydajnością. Dzięki technikom molekularnym i inżynierii metabolicznej uzyskano duży postęp w pozyskiwaniu i adaptacji mikroorganizmów do produkcji tych komponentów paliw, z efektywnością, jakiej nie są w stanie uzyskać organizmy niemodyfikowane. Produktami biosyntezy mikrobiologicznej są alkohole C3-C5, estry kwasów tłuszczowych i terpeny. Badania wykorzystujące komórki *Escherichia coli* i *Sacharomyces cerevisiae*, poddawane modyfikacjom, dowiodły, że są one w stanie efektywnie wytwarzać wyższe alkohole z glukozy jako źródła węgla. W metodzie tej wykorzystano zachodzącą we wszystkich organizmach żywych wysoko aktywną drogę biosyntezy aminokwasów (droga Erlicha) [Shen, Liao 2008, Connor i in. 2010, Fisher i in. 2008, Erlich 1907].

Atsumi i in. [2008] przedstawili technologię produkcji alkoholi wyższych jako biopaliw drugiej generacji, przy wykorzystaniu biosyntezy mikrobiologicznej z użyciem *E. coli* i *S. cerevisiae*. Mikroorganizmy te wybrano, ponieważ szybko zwiększają biomasę, są fakultatywnymi beztlenowcami, łatwo poddają się modyfikacji genetycznej, a metody monitorowania ich hodowli są proste, co ułatwia znacznie aspekty procesowe i produkcję alkoholi na większą skalę. Wykorzystano wspólny dla wielu mikroorganizmów szlak metaboliczny biosyntezy aminokwasów, związany z powstawaniem intermediatów w postaci 2-ketokwasów. Powstające ketokwasy zostają włączone w cykl dwóch ostatnich etapów przemiany metabolicznej aminokwasów do wyższych alkoholi na drodze zaproponowanej przez Erlicha [Erlich 1907]. Przy obecności dekarboksylazy 2-ketokwasowej (KDC – 2-keto acid decarboxylase), metabolity te ulegają przemianie do aldehydów, a następnie do alkoholi przy udziale dehydrogenazy alkoholowej (ADH – alkohol dehydrogenase). Podczas biosyntezy izoleucyny powstają 2-ketomaślan i 2-keto-3-metylowalerianian, które następnie mogą zostać przekształcone odpowiednio w 1-propanol i 2-metylo-1-butanol. Biosynteza waliny prowadzi do powstania 2-ketoizowalerianianu, będącego prekursorem izobutanolu, biosynteza leucyny natomiast do powstania 2-keto-4-metylopentanol, z którego powstaje 3-metylo-1-butanol.

Podczas biosyntezy fenyloalaniny tworzy się fenylopirogonian, który jest prekursorem do wytworzenia 2-fenyletanolu. Podczas przebiegu biosyntezy norwaliny, będącej pośrednim produktem podczas biosyntezy leucyny, wytwarzany jest 2-ketowalerian, z którego powstaje 1-butanol (rys. 5) [Atsumi i in. 2008, Shen, Liao 2008].

Podczas produkcji alkoholi wyższych niezbędny jest enzym dekarboksylaza 2-ketokwasowa, który naturalnie występuje w roślinach, drożdżach i grzybach, lecz nie jest wytwarzany przez bakterie. Koniecznym enzymem jest również dehydrogenaza alkoholowa, występująca powszechnie w wielu organizmach żywych. Aby umożliwić *E. coli* syntezę alkoholi wyższych z zadowalającą wydajnością, poddano ją modyfikacji genetycznej, włączając do komórek geny kodujące KDC pochodzące z innych organizmów (*S. cerevisiae*, *Lactococcus lactis*, *Clostridium acetobutylicum*), oraz geny kodujące ADH pochodzące od *S. cerevisiae*.

Przekierowanie szlaku metabolicznego biosyntezy mikrobiologicznej aminokwasów w oparciu o substrat glukozowy na produkcję alkoholi wyższych pozwala rozszerzać spektrum badań nad różnymi gatunkami mikroorganizmów wykorzystywanych do produkcji wyższych alkoholi na cele paliwowe [Connor i in. 2010, Fisher i in. 2008, Erlich i in. 1907, Janssen 2004, Wen i in. 2009].



**Rys. 5.** Produkcja alkoholi wyższych drogą syntezy mikrobiologicznej [Atsumi i in. 2008]

**Fig. 5.** Higher alcohols production with synthetic pathway [Atsumi i in. 2008]

Najczęściej stosowanym biopaliwem ciekłym jest obecnie bioetanol, dotychczas wytwarzany głównie z surowców skrobiowych i sacharoz. Nowo opracowane technologie pozwalają na wykorzystanie biomasy celulozowej do otrzymywania alkoholu etylowego. Technologia produkcji etanolu z biomasy zawierającej celulozę wzbudziła duże zainteresowanie w środowisku naukowym. Wiele pomysłów udoskonalenia procesu przetwarzania surowca celulozo-

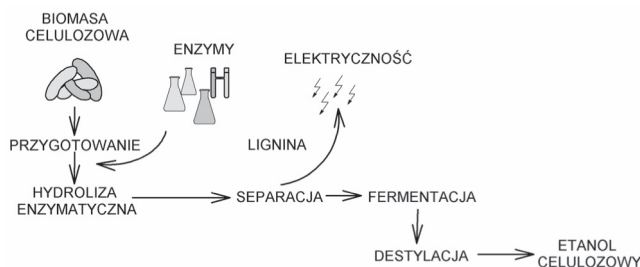
wego w celu jego wykorzystania w procesie fermentacji znalazło zastosowanie w powstałych niedawno korporacjach, zajmujących się komercyjną produkcją bioetanolu z celulozy [Chundawat i in. 2008, Evans 2009, Peralta-Yahya i in. 2008, Rubin 2008, Wheals i in. 1999].

Etanol celulozowy jest biopaliwem wytwarzanym z drewna, traw lub niejadalnych części roślin (słoma zbóż, łodygi kukurydzy itp.). Polisacharydy zawarte w ścianie komórkowej roślin (celuloza i hemiceluloza) mogą posłużyć jako substrat do produkcji etanolu, po wcześniejszym rozbiciu ich na cukry proste. Proces ten znacznie utrudnia lignina, tworząca kompleksy z molekułami celulozowymi. Znane są dwie podstawowe technologie produkcji etanolu z celulozy:

- 1) biotechnologiczne,
- 2) chemiczne.

Metody biotechnologiczne polegają na hydrolizie przygotowanego wcześniej materiału lignocelulozowego na cukry proste (pięcio-, sześciowęglowe) przy użyciu enzymów celulolitycznych (pozyskiwanych z genetycznie modyfikowanych organizmów) lub kwasów, a następnie kolejno na stosowaniu fermentacji i destylacji. Metody chemiczne obejmują gazyfikację, proces przekształcający surowiec lignocelulozowy w gazowy tlenek węgla i wodór, który może zostać wykorzystany do syntezy biopaliwa z zastosowaniem klasycznej katalizy chemicznej lub biosyntezy etanolu, a następnie destylacji. Proces biologicznej przemiany celulozy w alkohol etylowy przebiega w pięciu etapach. Pierwszy etap to proces fizyczny lub chemiczny (ang. pretreatment), mający na celu przygotowanie materiału do dalszej hydrolizy. Obejmuje on oczyszczenie i rozdrobnienie surowca, obróbkę baro-termiczną parą wodną skojarzoną niekiedy z obróbką chemiczną, mającą na celu przygotowanie surowca do fazy hydrolizy enzymatycznej. Drugi etap polega na hydrolizie enzymatycznej wcześniej przygotowanego materiału i obejmuje oddzielenie ligniny od kompleksu z celulozą, a następnie rozbiciu łańcuchów celulozy na cukry proste. W kolejnym, trzecim etapie następuje rozdzielenie substancji zbędnych od roztworu cukrów, w szczególności ligniny (wykorzystywanej jako paliwo do wytwarzania pary na etapie wstępnym). Czwarty etap obejmuje proces fermentacji cukrów z wykorzystaniem mikroorganizmów (najczęściej modyfikowanych genetycznie) zdolnych przetwarzać cukry zarówno pięcio-, jak i sześciowęglowe [Tengborg i in. 2001, Weng i in. 2008, [www.iogen.com](http://www.iogen.com)]. Proces technologiczny kończy destylacja powstałej mieszaniny, dająca około 95-procentowy etanol, który następnie zostaje odwodniony najczęściej za pomocą sit molekularnych, co zatęża produkt do 99,7%, czyli do poziomu wymaganego dla bioetanolu paliwowego [PKN 1999].

Firma Iogen Corporation prowadzi produkcję etanolu celulozowego, powstającego z przerobu biomasy celulozowej, przy użyciu kombinacji metod baro-termicznych, chemicznych i biologicznych (rys. 6). Wydajność osiągnięta z 1 tony włókien celulozowych wynosi ponad 340 litrów etanolu. Pozostająca jako produkt uboczny procesu lignina jest zużywana do wytwarzania pary i energii elektrycznej, w procesie technologicznym nie są więc potrzebne inne źródła energii, jak węgiel kamienny lub gaz ziemny.

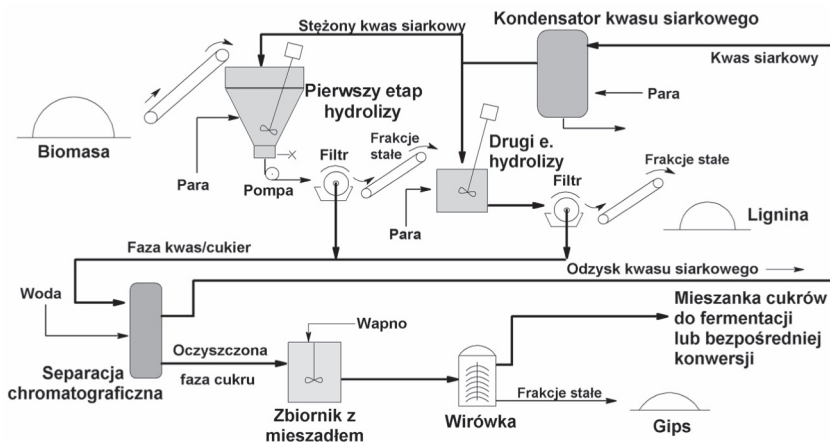


**Rys. 6.** Proces produkcji alkoholu etylowego przez firmę Iogen Corporation

**Fig. 6.** Ethyl alcohol production pathway according to Iogen Corporation

Technologie firmy Iogen Corporation wykorzystują skuteczne oraz wydajne enzymy z grupy celulaz, pozyskiwane ze szczepów *Trichoderma reesei*. Enzymy celulolityczne wprowadzane są już na etapie przygotowania biomasy (rys. 6). Penetracja struktury ligno-celulozowej przez enzymy wspomagana jest przez odpowiednio zmodyfikowany proces parowania (ang. steam explosion). Dzięki temu znacznie zwiększono wydajność oraz zredukowano koszty procesu. Hydroliza enzymatyczna zachodzi w reaktorach, które zwiększają szybkość degradacji celulozy do cukrów prostych, a sam proces ma charakter wieloetapowy. Fermentacja odbywa się przy udziale specjalnie wyselekcjonowanych szczepów drobnoustrojów, przetwarzających zarówno cukry C5 jak i C6 w etanol [www.ioген.com].

Inny potentat na rynku bioetanolu celulozowego – firma BlueFire Ethanol Inc. (USA) – wykorzystwała do produkcji alkoholu etylowego znaną od setek lat właściwość kwasów, skutecznie hydrolizujących cząsteczki celulozy do cukrów prostych (rys. 7).

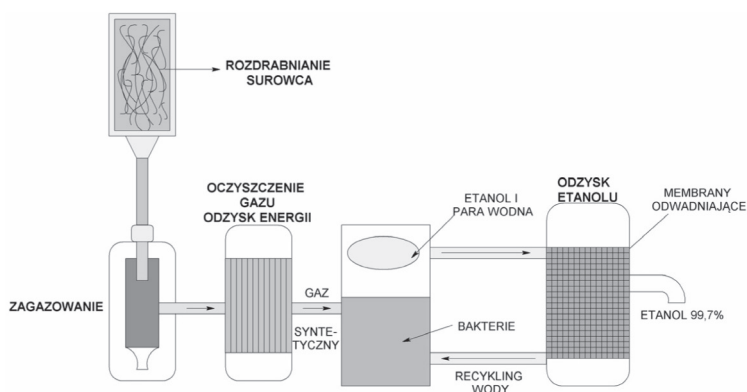


**Rys. 7.** Proces produkcji alkoholu etylowego firmy BlueFire Ethanol Inc., z wykorzystaniem kwasu siarkowego do hydrolizy biomasy celulozowej

**Fig. 7.** Process of the cellulose bioethanol production by the BlueFire Ethanol Inc., with sulphuric acid use in biomass hydrolysis process

Proces ten jest wydajny, jednak problem stanowi wyeliminowanie kwasu siarkowego z roztworu cukrów, ponieważ działa on hamująco na proces fermentacji. Naukowcy firmy rozwiązali problem przez zastosowanie metod chromatografii do odseparowania z mieszaniny substancji zbędnych po zakończonej hydrolizie. Technologia wymiany jonowej pozwala rozdzielić substancje bez konieczności rozcieńczenia roztworu cukrów. Pozostała w mieszaninie niewielka ilość kwasu siarkowego zostaje usunięta w reakcji z wapniem, tworząc gips nierozpuszczalny w wodzie, a więc łatwy do usunięcia. Technologia ta pozwala na otrzymanie czystej mieszaniny cukrów C5 i C6, gotowych do fermentacji alkoholowej. Zarówno proces fermentacji, jak i destylacja, odbywają się metodami tradycyjnymi. Drożdże wykorzystane do fermentacji są po przeprowadzeniu procesu separowane przez wirowanie i wykorzystywane ponownie w procesie fermentacji. Otrzymywanie bioetanolu odbywa się w drodze destylacji zacieru odfermentowanego i odwodniania otrzymanego etanolu na sitach molekularnych. Wolny od drożdży wywar podestylacyjny zawierający między innymi wodę i frakcje stałe (m.in. pentozy) zostaje zawrócony i ponownie wykorzystany do produkcji etanolu. Otrzymany produkt jest wykorzystywany jako biopaliwo drugiej generacji [www.bluefire.com].

Kolejną interesującą koncepcją wykorzystania odnawialnych źródeł energii jest technologia firmy Coskata Inc. W procesie przetwarzania surowca lignocelulozowego wykorzystuje się znaną technologię gazyfikacji.



**Rys. 8.** Proces produkcji etanolu firmy Coskata Inc., z wykorzystaniem połączonych technologii gazyfikacji i konwersji przy udziale bakterii

**Fig. 8.** The Coskata Inc. ethanol production process, with gasification technology, and conversion with bacteria use

Gazyfikacja w przeciwieństwie do hydrolizy nie jest procesem chemicznego rozkładu celulozy. Zamiast rozbijać cząsteczkę na cukry proste surowiec zostaje przetworzony w gaz syntetyczny, będący mieszanką tlenu węgla i wodoru. Zamiast fermentacji lub konwersji

termochemicznej, pompuje się gaz do reaktora zawierającego bakterie, które wykorzystują go jako substrat, produkując etanol (rys. 8). Bakterie są w stanie wytworzyć nawet 99,7-procentowy etanol. Zarówno gazyfikacja, jak i konwersja za pomocą bakterii, to procesy znane od dawna, jednak firma Coskata Inc. jako pierwsza połączyła oba procesy. Przedstawiciele firmy zapewniają, że z jednej tony biomasy można uzyskać więcej etanolu (ponad 100 galonów z 1 tony suchej masy surowca) niż przy fermentacji kukurydzy, przy jednoczesnym mniejszym zużyciu wody, energii, pary i redukcji kosztów stałych [www.coskata.com].

Do tej pory klasyczne technologie produkcji etanolu opierały się na tradycyjnych technikach hydrolizy enzymatycznej i fermentacji cukrów, przy udziale drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. Proces zachodził wewnątrz komórek wytwarzających enzymy, dekarboksylazę pirogronianową i dehydrogenazę alkoholową.

Taylor i in. [2009] porównali różne gatunki bakterii termofilnych, które są w stanie wytworzyć etanol. Szukano szczepów termofilnych, zdolnych fermentować nie tylko pentozy i heksozy, ale również struktury polimeryczne, jak celuloza. Szczepy te powinny także charakteryzować szeroka tolerancja na zmiany pH, temperatury, oraz innych warunków fizykochemicznych środowiska. Przeanalizowano bakterie z rodzaju *Clostridium*, zaliczane do termofilnych organizmów anaerobowych, wytwarzających etanol i inne związki. Cechą charakterystyczną tych drobnoustrojów jest zdolność fermentowania celulozy przy użyciu enzymów endo- $\beta$ -glukanazy, egzoglukanazy, fosforylasy celobiozowej, fosforylasy celodekstrynowej i  $\beta$ -glukozydazy. Enzymy te występują często wewnątrz komórki, w kompleksie zwanym celulosomem. Najlepiej poznanym gatunkiem jest ekstremofilny *C. thermocellum*. Dowiedziono, że gatunek ten jest w stanie fermentować celulozę, celobiozę i wiele innych węglowodanów. Charakteryzuje go również szerokie spektrum tolerancji substratu, może wzrastać na celulozie, celobiozie, ksylooligomerach, tak samo jak na glukozie, fruktozie i ksylozie. Lu i inni dowiedli, że proces prowadzony przez *C. thermocellum* jest bardziej efektywny niż proces scukrzania i fermentacji [Durrant i in. 1991, Lu i in. 2006, Taylor i in. 2009].

Drożdże *S. cerevisiae* nie są w stanie samodzielnie utylizować ksylozy. Wyodrębniony z *Thermus thermophilus* i *Piromyces sp.* E2 gen xyl A został wszczepiony do komórek drożdży, co umożliwiło im przemianę ksylozy i ksylulozy w etanol, z efektywnością 0,42g na g ksylozy. Szczep *S. cerevisiae* poddano również rekombinacji, wszczepiając do niego geny xyl1 i xyl2, pochodzące od drożdży *Pichia stipilis*, naturalnie fermentujących ksylozę. Obciążenie komórek spowodowane przemianą ksylozy i ksylulozy powodowało brak równowagi w ilości związków redukujących (gromadzenie się NADPH i nadmierne zużywanie NADH) w komórce. Podczas dalszej rekombinacji usunięto geny GDH1 (odpowiedzialne za produkcję NADPH) i zwiększono ekspresję genów GDH2 (odpowiedzialnego za produkcję NADH). Rezultatem zmian była 44-procentowa redukcja gromadzenia ksylitolu oraz 16-procentowy wzrost produkcji etanolu. Analizy wykazały, że modyfikacja zmieniła źródło działania reduktazy ksylolowej (XR) z NADPH na NADH [Dellomonaco 2010].

Arabinoza jest kolejnym 5-węglowym cukrem pozyskiwanym w wyniku hydrolizy ligno-celulozy. W przyrodzie istnieją dwie możliwości utylizacji tego cukru, za pomocą bakterii oraz grzybów. Geny pochodzące z obu organizmów wszczepiono do komórek *S. cerevisiae*. Komórki drożdżowe również wzbogacono o zdolność utylizacji arabinozy. Gen przeniesiony z *Lactobacillus plantarum* koduje nieutleniające enzymy PPP. W rezultacie drożdże były w stanie wyprodukować do 0,29g etanolu na gram arabinozy w ciągu godziny [Del-lomonaco 2010].

Bakterie z rodzaju *E. coli* posiadają zdolność utylizacji wielu substratów organicznych, włączając wszystkie cukry lignocelulozowe (glukozę, ksylozę, arabinozę, mannozę, galaktozę). Rozwój bakterii zachodzić może zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych, bakterie są zatem w stanie przeprowadzać proces fermentacji. Produktami metabolizmu bakterii są obok etanolu kwasy mlekowy, octowy, mrówkowy oraz bursztynowy. Zminimalizowanie wytwarzania produktów ubocznych i zwiększenie produkcji alkoholu stało się możliwe przez włączenie plazmidu (geny *pdc* i *adhB*) pobranego z komórek *Zymomonas mobilis*. Wskutek modyfikacji udało się uzyskać stężenia alkoholu do 95% [Kessler i in. 1991, Igram i in. 1987].

Bakterie *Zymomonas mobilis* są kolejnym, przykładem dobrze poznanych mikroorganizmów, zdolnych wytworzyć alkohol etylowy z glukozy i sacharozy. Aby umożliwić tym organizmom wykorzystanie pentoz również jako substratów pokarmowych wszczepiono im geny pochodzące z *E. coli*. Zmodyfikowany szczep *Z. mobilis* CP4 (p.ZB5), z genami kodującymi izomerazę ksylozową, transketolazę oraz transaldolazę utylizując ksylozę, był w stanie wytworzyć etanol o stężeniu do 86%. Podobnie metabolizm arabinozy przeniesiony do komórek szczepu ATCC39676 (p. ZB206) *Z. mobilis* przez ekspresję genu *ara-ABD* kodującego izomerazę L-arabinozową, kinazę L-rybulozy i epimerazę rybulozo 5-fosforanu, skutkowało uzyskaniem 98-procentowego stężenia alkoholu etylowego [Zhang i in. 1995, Deana i in. 1996].

### 3. PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę ograniczone zasoby konwencjonalnych nośników energii, jak również ich rosnące zużycie, rozwój metod biotechnologicznych pozyskiwania biopaliw ze źródeł odnawialnych, wydaje się być jednym z interesujących rozwiązań alternatywnych zaspokojenia części potrzeb energetycznych. Technologie te z założenia są przyjazne dla środowiska w wielu aspektach, w tym związanych ze składem spalin, jak również nie generują uciążliwych odpadów lub są bezodpadowe oraz cechuje je korzystny bilans emisji dwutlenku węgla w związku z wykorzystaniem biomasy jako podstawowego surowca.

Zaprezentowane najnowsze koncepcje technologiczne wykorzystujące biomasę celulozową pozwalają ograniczyć obawy związane ze wzrostem cen produktów żywnościowych i pasz, na co zwracano uwagę przy masowym wykorzystaniu surowców skrobiowych

do produkcji bioetanolu. Biopaliwa nowej generacji są ponadto pozbawione wad cechujących bioetanol, takich jak higroskopijność, korozja elementów silników spalinowych i problemy z zapłonem w niskich temperaturach.

Niektóre z prezentowanych rozwiązań są wdrożone na skalę przemysłową, inne znajdują się w fazie koncepcyjnej i wymagają dodatkowych badań w celu wyjaśnienia wszystkich aspektów środowiskowych i toksykologicznych pozyskiwanych biopaliw (np. DMF) oraz opracowania technologii produkcji w skali przemysłowej.

## PIŚMIENICTWO

- AGARWAL A.K. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Prog. Energ. Combust.* 33 (3): 233–271.
- ANTONI D., ZVERLOV V.V., SCHWARZ W.H. 2007. Biofuels from microbes. *Appl. Microbiol. Biot.* 77 (1): 23–35.
- ATSUMI S., HANAI T., LIAO J.C. 2008. Non fermentative pathways for synthesis of branched- chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451: 86–89.
- BOROWITZKA M.A. 2008. Marine and halophilic algae for the production of biofuels. *Journal Biotechnol.* 136 (S1): 7.
- BUDZYŃSKI W., BIELSKI S. 2004. Surowce energetyczne pochodzenia rolniczego cz. I. Biokomponenty paliw płynnych. *Acta Sci. Pol., Agricultura* 3(2): 5–14.
- CARDONA C.A., SANCHEZ Ó.J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technol.* 98: 2415–2457.
- CHUNDAWAT S.P.S., BALAN V., DALE B.E. 2008. High-throughput microplate technique for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 99(6): 1281–1294.
- CONNOR M.R., CANN F. A., LIAO J.C. 2010. 3-Methyl-1-butanol production in *Escherichia coli*: random mutagenesis and two-phase fermentation. *Applied Microbial and Cell Physiology* 86(4): 1155–1164.
- CZAJA M., FLOREK A. 2005. Biopaliwa – pokarm czy opał. *Nauka i technika* 1: 5–8.
- DEANA K, HANG M., EDDY C., PICATAGGIO S. 1996. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12): 4465–70.
- DELLOMONACO C., FAVA F., GONZALEZ R. 2010. The path to next generation biofuels: successes and challenges in the era of synthetic biology. *Microb Cell Fact* 9(3): 1–15.
- DEMIRBAS A. 2005. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energ. Source* 27: 327–337.
- DEMIRBAS M. F. 2009. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Appl. Energ.* 86(1): 151–161.
- DOŁĘGOWSKA S. 2009. Biopaliwa – krok ku zrównoważonemu rozwojowi. *Problemy Ekorozwoju* 4(1): 117–121.



- DURRANT A.J., HALL J., HAZLEWOOD G.P., GILBERT H.J. 1991. The non-catalytic C-terminal region of endoglucanase E from *Clostridium thermocellum* contains a cellulose-binding domain. *Biochem. Journal* 273 (Pt 2): 289–293.
- ERLICH F. 1907 Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiwaissaufbau der Hefe. *Berichte Deutsch Chem Gesellschaft* 40: 1027–1047.
- Etanol absolutny. PN-A-79521:1999, ISBN: 83-236-3013-5, ICS: 71.080.60-Alkohole. Etery.** 1999. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.
- EVANS J. 2009. Cellulosic ethanol. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 3/111.
- FISHER C.R., KLEIN-MARCUSCHAMER D., STEPHANOPOULUS G. 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* 10(6): 295–304.
- FUKUDA H., KONDO A., NODA H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal Biosci. Bioeng.* 92(5): 405–416.
- GILBERT R., PEARL A. 2005. Energy and transport futures. Prepared for the National Round Table on the Environment and the Economy. University of Calgary 1–96.
- GROSS M. 2008. Algal biofuel hopes. *Curr Biol.* 18(2): 46–47.
- HILL J., NELSON E., TILMAN D., POLASKY S., TIFFANY D. 2006. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS* 103(30): 11206–11210.
- IGRAM L.O., CONWAY T., CLARK D.P., SEWELL G.W., PRESTON J.F. 1987. Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(10): 2420–2425.
- ITO T., NAKASHIMADA Y., SENBA K., MATSUI T., NISHIO N. 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal Biosci. Bioeng.* 100(3): 260–265.
- JANSSEN P.H. 2004. Propanol as an end product of threonine fermentation. *Arch. Microbiol.* 182(6): 482–486.
- KESSLER D., LEIBRECHT I., KNAPPE J. 1991. Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl CoA reductase activators of *Escherichia coli* reside on polymeric protein particle encoded by *adhE*. *Febs. Lett.* 281(1–2): 59–63.
- KRAUŻLIS M. 2007. Rynek bioetanolu i jego rozwój w Unii Europejskiej. Zeszyty Naukowe SGGW w Warszawie, seria: Problemy Rolnictwa Światowego tom 2 (XVII).
- KUPCZYK A. 2007. Stan obecny i perspektywy wykorzystania biopaliw transportowych w Polsce na tle UE. Część II. Wybrane aspekty zasobowe, techniczno-technologiczne i ekologiczne. *Energetyka i Ekologia* 2: 131–137.
- LEJA K., LEWANDOWICZ G., GRAJEK W. 2009. Produkcja bioetanolu z surowców celulozowych. *Biotechnologia* 4(87): 88–101.
- LU Y., ZHANG Y. H., LYND L.R. 2006. Enzyme – microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103(44): 16165–16169.

- PACZOSA A. 2004. Zwiększenie wykorzystania biopaliw jako jeden z priorytetów „Strategii rozwoju energetyki odnawialnej”. Ministerstwo Środowiska, Warszawa.
- PERALTA-YAHYA P., CARTER B.T., LIN H., TAO H., CORNISH V.W. 2008. High-throughput selection for cellulase catalysts using chemical complementation. *Journal Am. Chem. Soc.* 130(51): 17446–17452.
- REIJNDERS L. 2008. Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants? *Trends Biotechnol* 26(7): 349–350.
- ROMAN-LESHKOWY., BARRET C.J., LIU Z.Y., DUMESIC J.A. 2007. Production of dimethylfurfuran for liquid fuels from biomass-derived carbohydrates. *Nature* 447: 982–986.
- ROSZKOWSKI A. Perspektywy wykorzystania biomasy jako źródła paliw silnikowych. IBMER w Warszawie.
- RUBIN E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 454(14): 841–845.
- SCHMIDT L.D., DAUENHAUER P.J. 2007. Hybrid Routes to biofuels. *Nature* 447: 914–915.
- SHEN C.R., LIAO J.C. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* 10(6): 312–320.
- SZEPTYCKI A. 2007. Biopaliwa – zalecenia UE, potrzeby, realne możliwości produkcji. *Inżynieria Rolnicza* 7(95): 201–206.
- TAYLOR M.P., ELEY K.L., MARTIN S., TUFFIN M.I., BURTON S.G., COWAN D.A. 2009. Thermophilic ethanogenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends Biotechnol.* 27(7): 398–405.
- TENGBORG C., GABLE M., ZACCHI G. 2001. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme Microb. Tech.* 28: 835–844.
- WACKETT L.P. 2008. Biomass to fuels via microbial transformations. *Curr Opin. Chem. Biol.* 12(2): 187–193.
- WEN F., NAIR N. U., ZHAO H. 2009. Protein engineering in designing tailored enzymes and microorganisms for biofuels production. *Curr Opin Biotech* 20(4): 412–419.
- WENG J-K., LI X., BONAWITZ N.D., CHAPPLE C. 2008. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. *Curr Opin. Biotech.* 19(2): 166–172.
- WHEALS A.E., BASSO L.C., ALVES D.M.G., AMORIM H.V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Focus* 17(12): 482–487.
- [www.bluefire.com](http://www.bluefire.com)**
- [www.coskata.com](http://www.coskata.com)**
- [www.iogen.ca](http://www.iogen.ca)**
- [www.solazyme.com](http://www.solazyme.com)**
- ZHANG M., EDDY C., DEANDA K., FINKESTEIN M., PICATAGGIO S. 1995. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanogenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267(5195): 240–243.