Mikroorganizmi za fermentaciju lignoceluloznih hidrolizata

Tolvajčić, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:092800

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Martina Tolvajčić

6241/BT

MIKROORGANIZMI ZA FERMENTACIJU LIGNOCELULOZNIH HIDROLIZATA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 3

Mentor: ***izv. prof. dr. sc. Vlatka Petravić Tominac***

Zagreb, 2016.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr.sc. Vlatki Petravić Tominac na pomoći i savjetima pri izradi ovog rada.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

MIKROORGANIZMI ZA FERMENTACIJU LIGNOCELULOZNIH HIDROLIZATA

Martina Tolvajčić 6241/BT

Sažetak: Velika količina lignoceluloznog otpada, kojeg čine uglavnom celuloza, hemiceluloza i lignin, nastaju u šumarstvu, poljoprivredi i prehrambenoj industriji. Lignoceluloza je jeftina, ali i kompleksna obnovljiva sirovina koja se može prevesti u razne visokovrijedne biotehnološke proizvode. Da bi se iskoristio potencijal lignoceluloze potrebno je primijeniti prikladne metode predobrade. Lignocelulozni hidrolizati su složene smjese heksoza i pentoza te drugih spojeva od kojih neki mogu djelovati kao inhibitori fermentacije. Optimalni radni mikroorganizam trebao bi fermentirati pentoze i heksoze pri čemu se preferira da ih troši istodobno. Također bi trebao imati visoku toleranciju prema inhibitorima i produktima fermentacije, biti otporan na mikrobiološke kontaminacije te postizati visoku produktivnost i prinos proizvoda. Uz to, trebao bi tolerirati visoke temperature i niske pH-vrijednosti kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. Poželjno je da radni mikroorganizam posjeduje i izlučuje celulolitičke i hemicelulolitičke enzime. Ova svojstva mogu biti prirodno prisutna u mikroorganizmu ili se mogu postići primjenom metoda genetičkog inženjerstva. U ovom radu dan je pregled prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama koji su istraživani za dobivanje etanola, ali i nekih drugih ekonomski važnih proizvoda koji se mogu dobiti biotehnološkom preradom lignoceluloznih sirovina.

Ključne riječi: lignoceluloza, mikroorganizmi, heksoze, pentoze

Rad sadrži: 84 stranice, 29 slika, 5 tablica, 210 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *izv. prof. dr.sc. Vlatka Petravić Tominac*

Rad predan: srpanj 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing

MICROORGANISMS FOR FERMENTATION OF LIGNOCELLULOSIC HYDROLYZATES

Martina Tolvajčić 6241/BT

Abstract: Huge amounts of lignocellulosic waste, consisting mainly of cellulose, hemicellulose and lignin, are generated through forestry, agriculture and food industry. Lignocellulose is a cheap but complex renewable raw material that can potentially be converted into various value-added biotechnological products. In order to exploit lignocellulose potential, it is necessary to implement appropriate pretreatment methods. Lignocellulosic hydrolysates are complex mixtures of hexoses, pentoses and other compounds, some of which may act as inhibitors of fermentation. Optimal working microorganism should ferment pentoses and hexoses, which should be preferentially simultaneously consumed. It should also have a high tolerance to inhibitors and fermentation products, to be resistant to microbiological contamination as well as to achieve a high productivity and high product yields. In addition, it should tolerate high temperatures and low pH-values in order to reduce the risk of contamination. It is also desirable for working microorganism to produce and secrete cellulolytic and hemicellulolytic enzymes. These properties can be naturally present in the microorganism or can be achieved by using genetic engineering methods. This paper gives an overview of prokaryotic and eukaryotic microorganisms which have been investigated for production of ethanol as well as other economically important products which can be obtained by biotechnological processing of lignocellulosic raw materials.

Keywords: lignocellulose, microorganisms, hexoses, pentoses

Thesis contain: 84 pages, 29 figures, 5 tables, 210 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Vlatka Petravić Tominac, Associate Professor*

Thesis delivered: July 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD……...……..…… 1

2. TEORIJSKI DIO……..……..... 2

2.1. Lignocelulozne sirovine …….……..…. 2

2.1.1. Sastav lignoceluloznih sirovina..…… 2

2.1.1.1. Celuloza……..…… 4

2.1.1.2. Hemiceluloza……..…… 4

2.1.1.3. Lignin……..……... 5

2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina …….……..…..... 8

2.3. Mikroorganizmi koji rastu na lignoceluloznim hidrolizatima …….. 10

2.3.1. Etanologeni mikroorganizmi..…… 11

2.3.1.1. Kvasci roda *Candida* ……..……... 14

2.3.1.2. Kvasci roda *Kluyveromyces* ……..…… 16

2.3.1.3. Kvasci roda *Pichia*……..……... 18

2.3.1.4. Kvasci roda *Saccharomyces* ……..…… 22

2.3.1.5. Kvasci roda *Schizosaccharomyces* …… 26

2.3.1.6. Kvasci roda *Pachysolen*……..……... 26

2.3.1.7. Bakterije roda *Bacillus* …….. 28

2.3.1.8. Bakterije roda *Clostridium* ……..…….. 29

2.3.1.9. Bakterije roda *Escherichia* …… 31

2.3.1.10. Bakterije roda *Klebsiella* ……. 33

2.3.1.11. Bakterije roda *Zymomonas* …….. 33

2.3.1.12. Bakterija *Corynebacterium glutamicum* ……. 36

2.3.1.13. Termofilne bakterije……. 37

2.3.1.14. Cijanobakterije……. 39

2.3.1.15. Druge etanologene bakterije……..…….. 41

2.3.1.16. *Fusarium* sp..……..…….. 42

2.3.1.17. *Aspergillus* sp.……..…… 43

2.3.1.18. *Mucor* sp.……..…… 43

2.3.1.19. *Neurospora* sp…….. 44

2.3.2. Mikroorganizmi za dobivanje ostalih proizvoda iz lignoceluloznih

hidrolizata……..……. 45
2.3.2.1. Proizvodnja 1-butanola pomoću bakterija roda *Clostridium* 48
2.3.2.2. Uzgoj oleaginoznih mikroorganizama……..…… 49

3. ZAKLJUČCI……. 56

4. LITERATURA……...……...……. 57

5. PRILOZI…….…….……. 75

Lignocelulozni materijali su glavna komponenta biomase i predstavljaju najobilniji obnovljivi izvor energije dostupan na Zemlji (Salvachua i sur., 2011). Nastaju kao sekundarni proizvodi u drvnoj i prehrambenoj industriji, a uključuju različite poljoprivredne ostatke (npr. pšenični, repini i kukuruzni ostaci, pulpa šećerne repe, sijeno, zelena i suha trava) i ostatke drvne biomase (npr. piljevina i ostaci drva) (Sun i Cheng, 2002). Sastoje se od celuloze, hemiceluloze i lignina, a njihov udio ovisi o vrsti biljke.

Mogućnosti korištenja lignoceluloznih materijala su brojne pa se tako mogu koristiti za proizvodnju bioplina, bioetanola, organskih kiselina, enzima, mikrobne biomase te u mnogim drugim biotehnološkim postupcima (Alriksson, 2006). Većina ugljikohidrata može se hidrolizom razgraditi do jednostavnih šećera te potom fermentirati u etanol ili prevesti u neki drugi proizvod (Janušić i sur., 2008).

Lignocelulozni materijali su teško razgradivi zbog svoje kompleksne strukture. Stoga je prije korištenja potrebna predobrada, koja ovisi o procesu. Metode predobrade su fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke (Alriksson, 2006).

Hidrolizom lignoceluloznih materijala, osim šećera, nastaje i veliki broj nusprodukata, kao npr. furfural, hidroksimetil furfural, vanilin, octena kiselina i dr. Ovi nusprodukti razgradnje šećera i lignina negativno utječu na efikasnost fermentacije. Neki od njih su toksični za radne mikroorganizme jer inhibiraju njihov metabolizam (Mussatto i Roberto, 2003). Važno je odabrati odgovarajuće mikroorganizme koji mogu fermentirati šećere prisutne u lignoceluloznim hidrolizatima te dovoljno otporne na prisutne inhibitore.

Stoga su ciljevi ovog završnog rada:

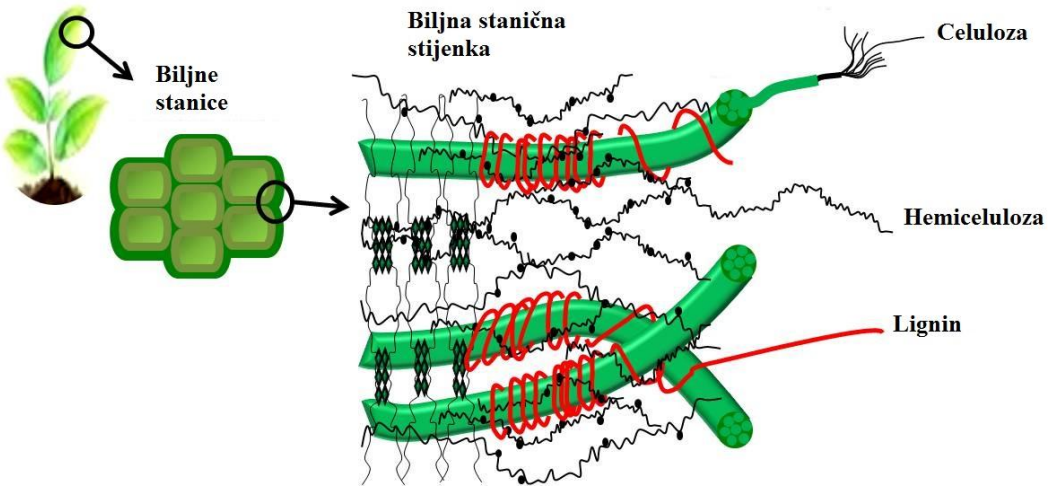
- opisati kemijski sastav lignoceluloznih sirovina;
- pojasniti zbog čega je potrebna njihova predobrada koja prethodi biotehnološkom procesu;
- navesti mikroorganizme koji mogu rasti u lignoceluloznim hidrolizatima;
- opisati glavne karakteristike navedenih mikroorganizama.

Pritom je posebna pažnja posvećena procesima proizvodnje etanola iz lignoceluloznih hidrolizata, a također su prikazani neki primjeri dobivanja drugih biotehnoloških proizvoda.

2.1. Lignocelulozne sirovine

2.1.1 Sastav lignoceluloznih sirovina

Lignocelulozna biomasa je nejestivi biljni materijal, sastavljen pretežno od dva polisaharida, a to su celuloza (25-50 %) i hemiceluloza (20-40 %). Treća strukturna komponenta lignoceluloze je lignin (10-35 %) (Sluiter i sur., 2010; Ioelovich, 2014). Lignin okružuje hidrofobna vlakna hemiceluloze i celuloze te ih na taj način štiti od utjecaja enzima (Ioelovich, 2014). Struktura lignocelulozne biomase prikazana je na Slici 1, a nešto više podataka o sastavu nekih lignoceluloznih materijala vidljivo je iz Tablice 1.



Slika 1. Shematski prikaz stanične stijenke biljaka (Ratanakhanokchai i sur., 2013).

Manje zastupljene komponente lignocelulozne biomase uključuju proteine, pepeo, organske kiseline, pektin, spojeve s dušikom i druge spojeve koji ne izgrađuju osnovnu strukturu biomase (Suiter i sur., 2010; Chen, 2014).

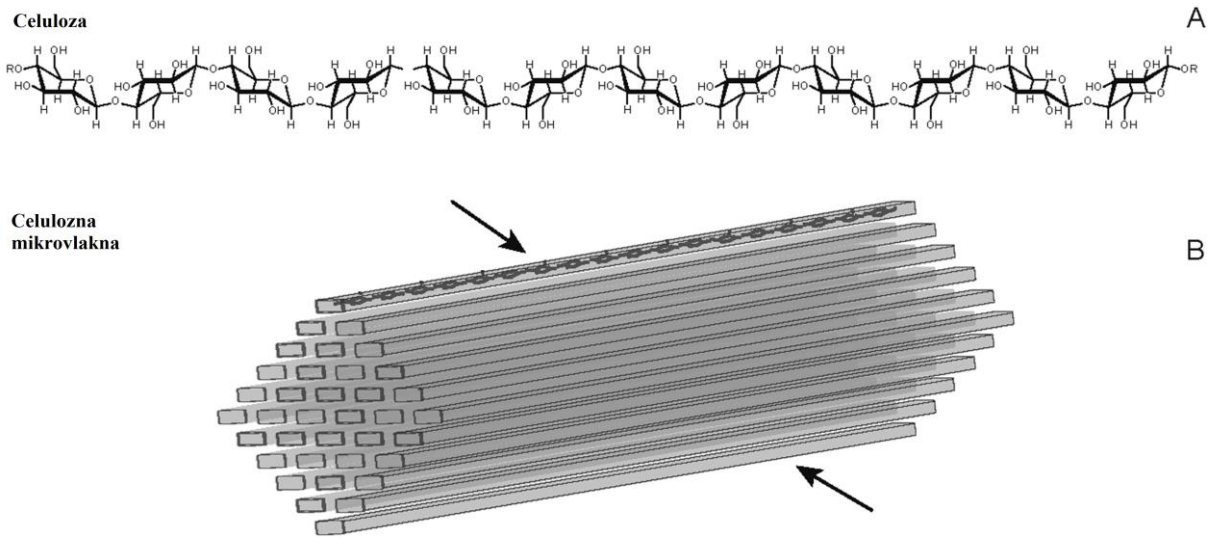
Materijali koji nisu dio strukture stanice i mogu biti uklonjeni odgovarajućim otapalima nazivaju se ekstraktivne tvari (Tablica 1). To je kompleksna smjesa mnogih spojeva koja se u biljnoj stanici nalazi u relativno maloj koncentraciji, a uključuje smole, biljne sokove, masti, sterole, tanine, terpene, kinone, flavinoide, nestrukturne šećere te druge manje molekule (Hames, 2009; Sluiter i sur., 2013).

Tablica 1. Kemijski sastav nekih lignocelulozni materijala (Palonen, 2004).

Lignocelulozni materijal	**Celuloza [%]**	**Ksilan [%]**	**Manoza [%]**	**Galaktoza [%]**	**Arabinoza [%]**	**Lignin [%]**	**Ekstrakt [%]**
smreka (lat. *Picea abies*)	41,5	6,1	14,3	nije navedeno	1,2	27,1	9,6
bor (lat. *Pinus silvestris*)	37,7	4,6	7,0	nije navedeno	nije navedeno	27,5	10,8
breza (lat. *Betula pendula*)	38,2	18,5	1,2	nije navedeno	nije navedeno	22,8	4,8
topola (lat. *Populus alba*)	49,9	17,4	4,7	1,2	1,8	18,1	nije navedeno
kukuruzovina (eng. corn stover)	36,4	18,0	0,6	1,0	3,0	16,6	7,3
slama pšenice (eng. wheat straw)	38,2	21,2	0,3	0,7	2,5	23,4	13,0
trave (eng. grasses)	31,0	20,4	0,3	0,9	2,8	17,6	17,0

2.1.1.1. Celuloza

Formula celuloze, čija je $(C_6H_{10}O_5)_n$, a radi se o polisaharidu koji može sadržavati od 100 do više od 10 000 jedinica D-glukoze povezanih β-1,4-glikozidnom vezom (Slika 2a). Lanci celuloze povezuju se u mikrovlakna preko vodikovih veza i Van der Waalsovih interakcija (Slika 2b). Mikrovlakna su kristalne strukture te nisu topljiva u vodi i organskim otapalima, a predstavljaju problem prilikom djelovanja enzima u procesu saharifikacije (razlaganje složenijih šećera na jednostavne). Uzastopne jedinice šećera duž lanaca celuloze kristalne strukture rotirane su za 180°, što znači da je ponavljajuća jedinica disaharid (celobioza). Celuloza sadrži dobro uređene kristalne regije i neuređene amorfne regije (Horn i sur., 2012).

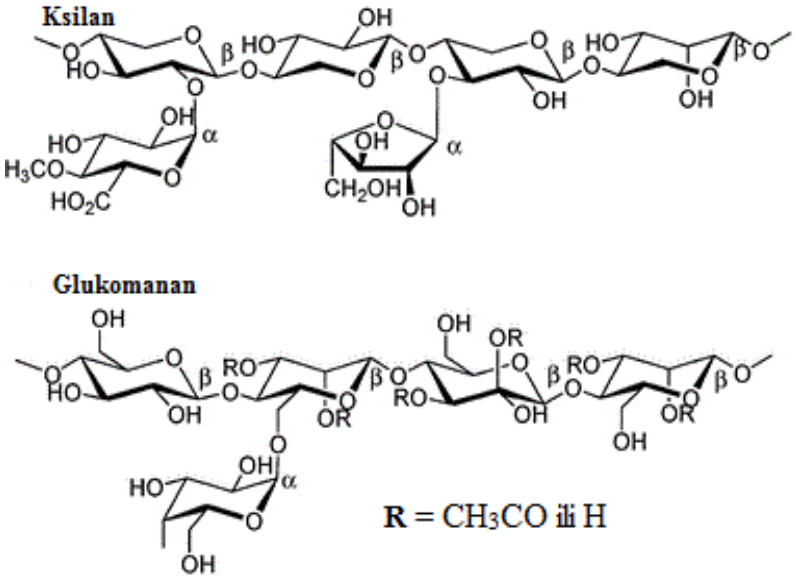


Slika 2. Kemijska struktura celuloze (A) i prikaz celuloznih mikrovlakana (B) (Horn i sur., 2012).

2.1.1.2. Hemiceluloza

Hemiceluloza je zajedničko ime koje se odnosi na necelulozne polisaharide. Oni se bitno razlikuju ovisno o biljci, ali mogu postojati i razlike među različitim biljnim tkivima iste vrste (Horn i sur., 2012). Različiti oblici hemiceluloze klasificiraju se prema glavnom šećernom ostatku u okosnici, npr. ksilani, manani, glukani, galaktani. Glavne grupe su manani i ksilani. Molekule hemiceluloze često su povezane ili isprepletene sa drugim polisaharidima, proteinima ili ligninom. Ksilan se smatra glavnom vezom između lignina i ostalih ugljikohidrata.

U tvrdom drvetu i jednogodišnjim biljkama u okosnici hemiceluloze najzastupljeniji je ksilan (15-30 %), dok se u mekom drvetu hemiceluloza pretežito sastoji od galaktoglukomanana (15-20 %) i ksilana (7-10 %) (Slika 3). Hemiceluloza je topljivija od celuloze i iz drveta se može izolirati ekstrakcijom. Stupanj polimerizacije varira između 70 i 200, ovisno o vrsti drveta (Palonen, 2004).



Slika 3. Najvažnija hemiceluloza u mekom drvetu: ksilan i glukomanan (Dutta i sur., 2012).

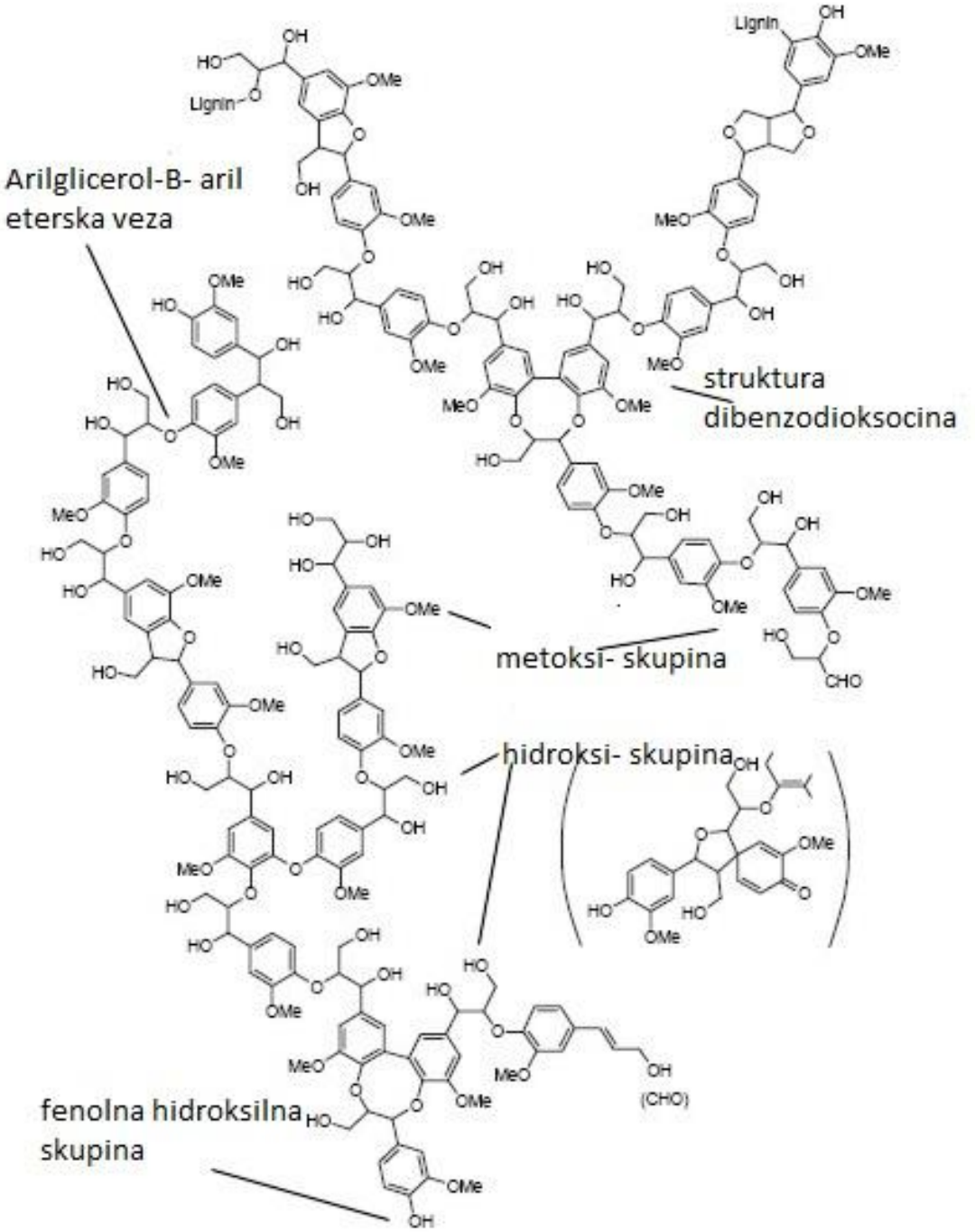
2.1.1.3. Lignin

Lignin je, nakon celuloze, najzastupljeniji organski polimer u biljkama (Chen, 2014). To je amorfna, visoko razgranata polifenolna makromolekula kompleksne strukture, koja obično čini trećinu mase drvnog materijala. Osnovna struktura lignina prikazana je na Slici 4, no ona se bitno mijenja nakon izdvajanja lignina (Anonymous 1, 2015).

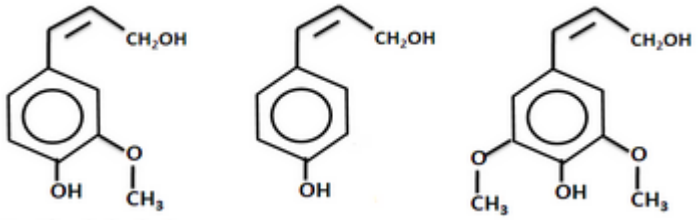
Lignin je sastavni dio stanične stijenke biljaka, ugrađen u polimerni matriks celuloze i hemiceluloze. Osigurava čvrstoću biljaka, a time i otpornost na mehanički stres (Palonen, 2004). Osim toga, lignin olakšava trasport vode kroz stanicu, ometa razaranje polisaharida stanične stijenke te štiti biljku od patogena, insekata i ostalih biljojeda (Hatfield i Fukushima, 2005).

Kompliciranu strukturu lignina čine nelinearno i nasumično vezane molekule fenilpropana Tri glavna monomera su: kumaril alkohol, koniferil akohol i sinapil akohol

(Slika 5) zbog kojih lignin može biti podijeljen u tri različita tipa (Chen, 2014): siringil lignin, gvajacil lignin i hidroksifenil lignin.



Slika 4. Struktura lignina u mekom drvetu uz istaknute najbitnije funkcionalne skupine (Palonen, 2004).



a) b) c)

Slika 5. Prekursori pri biosintezi lignina (Sederoff i sur., 1999; Anonymous 1, 2012).

a) 4-hidroksi-3-metoksicinamil-alkohol (koniferil-alkohol);

b) 4-hidroksicinamil-alkohol (*p*-hidroksicinamil-alkohol, kumaril-alkohol);

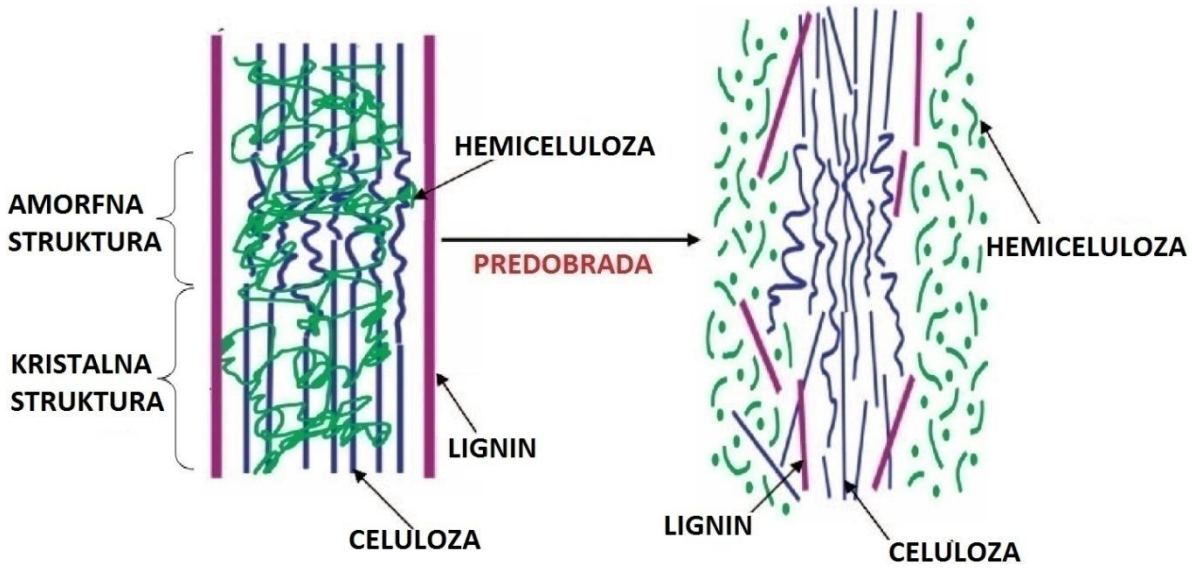
c) 4-hidroksi-3,5-dimetoksicinamil-alkohol (sinapil-alkohol).

Prekursor gvajacila je trans-koniferil-alkohol, siringila trans-sinapil-alkohol, dok je prekursor hidroksifenil lignina trans-p-kumaril alkohol. U svrhu klasifikacije mekog drveta, tvrdog drveta i trave, lignin se može podijeliti u dvije velike skupine: gvajacil lignin i gvajacil-siringil lignin. Meko drvo sadrži uglavnom gvajacil, dok tvrdo drvo sadrži i siringil (Palonen 2004).

Lignin ima različite primjene: služi kao antioksidans (prirodna antioksidacijska svojstva lignina koriste se u kozmetici te ova svojstva osiguravaju termalnu zaštitu za stiren, butadien, gumu, polipropilen...), u proizvodnji asfalta (dodatak lignin amina osigurava toplu mješavinu koja može izmijeniti fluidnost i smanjiti troškove proizvodnje asfaltnih mješavina), prirodni ili industrijski lignin mogu se koristiti u proizvodnji karbonskih vlakana (karbonske nanocijevi sačinjene su od lignina ili lignosulfonata), za kontrolu prašine (površina ceste ili nekog puta može se poprskati emulzijom asfalta, lignosulfonata i vode), u raznim kemikalijama, u baterijama lignin povećava trajnost energije uređaja za pohranu (Anonymous 2, 2015).

2.2. Predobrada lignoceluloznih sirovina

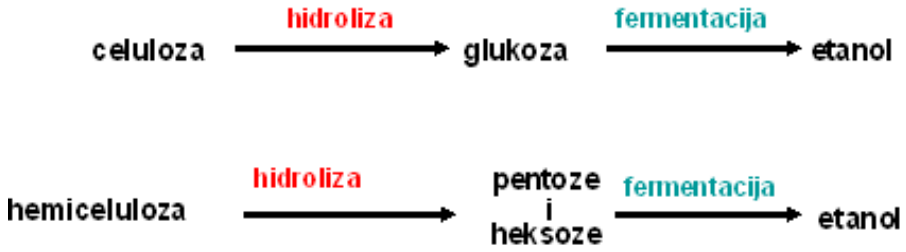
Zbog vrlo složene strukture lignoceluloznih materijala, njihova predobrada nije jednostavna, a potrebna je prije provođenja mnogobrojnih biotehnoloških procesa u kojima se koriste ove sirovine. Cilj predobrade je promijeniti svojstva lignoceluloznih materijala kako bi ih se pripremilo za enzimsku razgradnju. Najbolji način i uvjeti prethodne obrade uvelike ovise o vrsti lignoceluloze (Taherzadeh i Karimi, 2008). Učinak predobrade vidljiv je na Slici 6.



Slika 6. Struktura lignoceluloze prije i nakon predobrade (Kumar i sur., 2009).

Cilj postupka predobrade je razbiti strukturu lignina i narušiti kristalnu strukturu celuloze tako da kiseline ili enzimi mogu lako hidrolizirati celulozu (Palmqvist i Hahn-Hägerdal, 2000). Obrađena lignocelulozna biomasa se koristi za dobivanje etanola, bioplina, električne i toplinske energije te kemikalija. Cilj predobrade je poboljšati razgradnju lignoceluloze. Svaka vrsta predobrade ima vlastiti učinak na celulozu, hemicelulozu i lignin.

Celulozu i hemicelulozu iz lignoceluloznih sirovina prije submerzne fermentacije treba hidrolizom prevesti u jednostavne šećere (Taherzadeh i Karimi, 2007). Postoji nekoliko mogućnosti za provođenje hidrolize, a najčešće se primjenjuju kemijska i enzimska hidroliza . Slika 7 prikazuje primjer hidrolize i kasnije fermentacije u proizvodnji etanola (Taherzadeh i Karimi, 2007). Šećeri oslobođeni hidrolizom celuloze i hemiceluloze mogu se prevesti u etanol, a lignin ostaje kao sekundarni produkt.



Slika 7. Konverzija lignoceluloze u fermentabilne šećere, a potom u etanol (Taherzadeh i Karimi, 2007).

2.3. Mikroorganizmi koji rastu na lignocelulozним hidrolizatima

Ima puno organizama koji mogu fermentirati šećere s pet i šest ugljikovih atoma i ti organizmi spadaju u različite skupine: arheje, bakterije i eukariote (Dufour i sur., 2011). Među njima postoje velike razlike u uvjetima rasta, supstratima koji se koriste za fermentaciju i krajnjim produktima fermentacije. Potpun opis fermentacijskih organizama je nepraktičan za potrebe ovog teksta, a ovdje će biti prikazan samo kratak pregled značajnih rodova i vrsta s naglaskom na one od posebne važnosti. U Prilogu 1 su sumirani različiti mikroorganizmi koji fermentiraju pentoze i heksoze ili ih koriste za druge proizvode.

Lignocelulozni hidrolizati su složene smjese heksoza i pentoza te drugih spojeva od kojih neki mogu djelovati kao inhibitori fermentacije. Optimalna mikrobna stanica za proizvodnju naprednih biogoriva trebala bi objedinjavati sljedeća svojstva (Weber i sur., 2010):

1. efikasna fermentacija heksoza i pentoza pri čemu se preferira da ih troši istodobno,
2. visoka toleranciju na inhibitore i produkte fermentacije,
3. otpornost prema mikrobiološkim kontaminacijama, npr. infekcije bakteriofagima,
4. visoka produktivnost i prinosi.

Također, bilo bi poželjno posjedovanje i izlučivanje celulolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Ova svojstva mogu biti prirodno prisutna u mikroorganizmu ili se mogu postići primjenom metoda genetičkog inženjerstva. Istražuju se razni mikroorganizmi, prokariotski i eukariotski.

Postoji ograničen broj mikroorganizama koji fermentiraju ugljikohidrate, uglavnom pentoze i heksoze, u etanol. Glavni bakterijski sojevi koji proizvode etanol su *Clostridium acetobutylicum, Klebsiella pneumoniae, Leuconostoc mesenteroides, Sarcina ventriculi, Zymomonas mobilis*. Također je zabilježeno da više vrsta funga može proizvoditi etanol, a neki od primjera su: *Aspergillus oryzae, Endomyces lactis, Kloeckera sp., Kluyveromyees fragilis, Mucor sp., Neurospora crassa, Rhizopus sp., Saccharomyces beticus, S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. oviformis, S. saki, Torula sp., Trichosporium cutaneum.* Glavne karakteristike mikroorganizama koji se koriste u proizvodnji etanola su visok prinos etanola, visoka produktivnost i tolerancija na visoke koncentracije etanola (Binod i sur., 2013).

Također, mikroorganizam bi trebao imati sposobnost pretvorbe više različitih šećera kao i toleranciju prema inhibitorima koji su obično prisutni u hidrolizatima dobivenima nakon predobrade i enzimske saharifikacije. Uz to, trebao bi tolerirati visoke temperature i niske pH-

vrijednost kako bi se smanjio rizik od kontaminacije. S industrijskog stajališta, preferiraju se sojevi koji mogu tolerirati visoke temperature jer veća temperatura fermentacije smanjuje mogućnost pojave mezofilnih kontaminanata pa se smanjuje potreba za sterilizacijom i proces postaje ekonomičniji. Simultana saharifikacija i fermentacija (eng. simultaneous saccharification and fermentation, SSF) je glavni način proizvodnje etanola iz lignoceluloznih sirovina, a princip je da se u jednom reaktoru istodobno provodi enzimska hidroliza i fermentacija dobivenih šećera. Pritom se koriste etanologeni mikroorganizmi, pretežno kvasci. Za uspješnu provedbu SSF-procesa potrebno je podesiti vrijednosti temperature i pH-vrijednosti s ciljem optimizacije uvjeta provedbe enzimske hidrolize i fermentacije, bez negativnog učinka na prinos oslobođenih šećera i proizvodnju etanola (Binod i sur., 2013).

2.3.1. Etanologeni mikroorganizmi

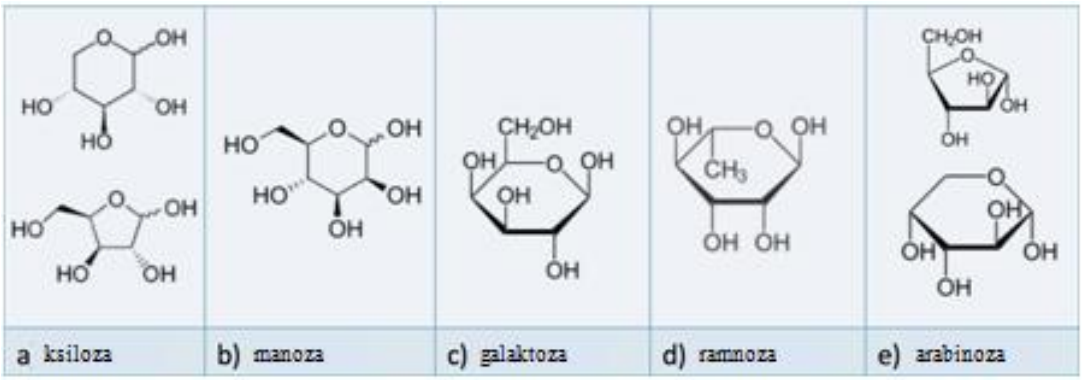
Etanologeni mikroorganizmi trebaju zadovoljiti određene kriterije, između ostalog i korištenje jeftine hranjive podloge. Trebali bi brzo prevesti supstrate u proizvod, a proizvod bi se lako trebao izolirati iz hranjive podloge (Binod i sur., 2013).

Učinkovitost i prinos, kao i mogućnost testiranja velikog broja izoliranih sojeva te postojanost njihovih svojstva su glavni ciljevi za selekciju organizma za bilo koji fermentacijski postupak. Za izolaciju i odabir etanologenih mikroorganizama iz raznih izvora koristi se više tehnika.Uzgajaju se u tekućoj i na čvrstoj podlozi. Postoji niz metoda za selekciju mikroorganizma. Nakon izolacije mikroorganizama iz različitih izvora, oni se mogu uzgajati u tekućoj ili čvrstoj podlozi, npr. podlozi koja uz agar sadrži željenu sirovinu koja predstavlja izvor ugljika kao i druge hranjive tvari potrebne za mikrobni rast, kao što su amonijak, soli i metali u tragovima. Mikroorganizmi izlučuju proizvedeni etanol u hranjivu podlogu te se on potom može detektirati i kvantificirati prikladnim metodama poput plinske kromatografije (eng. gas chromatography, GC) ili tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. high performance liquid chromatography, HPLC). Poželjno je upotrijebiti metodu detekcije koja barem djelomično može kvantificirati koliko etanola može proizvesti svaki pojedini mikroorganizam ili pojedina kolonija. Kolorimetrijsku metodu detekcije prisutnosti etanola razvili su Fotheringham i sur. (2009). Koristili su otopinu koja sadrži alkohol-oksidazu, peroksidazu i peroksidni kosupstrat. Reakcija oksidaze s alkoholom daje

vodikov peroksid, koji reagira s drugim enzimom kao što je peroksidaza iz hrena u prisutnosti kosupstrata peroksidaze koji je odgovoran za proizvodnju boje (Binod i sur., 2013).

Kvasac je najčešće korišteni mikroorganizam za proizvodnju etanola procesom fermentacije. Postoje određena jedinstvena svojstva kvasaca po kojima se ističu od drugih mikroorganizama za proizvodnju etanola. Neka od tih svojstava su: velika brzina rasta, učinkovita represija glukozom, dobra proizvodnja etanola i tolerancija na okolišni stres, poput visokih koncentracija etanola i niskih razina kisika. U odnosu na druge vrste kvasaca, *S. cerevisiae* je industrijski značajan kvasac za alkoholnu fermentaciju, iako može fermentirati isključivo heksoze (Binod i sur., 2013).

Jedna od najznačajnijih mogućnosti daljnjeg smanjenja troškova proizvodnje bioetanola je povećanje količine šećera oslobođenog iz lignoceluloze. To uključuje iskorištavanje hemiceluloze, koja je uglavnom građena od pentoza. Stoga su za ekonomičnu i održivu pretvorbu lignoceluloze u etanol potrebni mikroorganizmi koji mogu fermentirati druge šećere poput ksiloze, manoze, arabinoze ili galaktoze (Slika 8) (Binod i sur., 2013).



Slika 8. Šećeri koji se nalaze u sastavu hemiceluloze (Anonymous 2, 2016).

Osim kvasca *S. cerevisiae*, drugi primjeri kvasaca koji se koriste za proizvodnju etanola su: *Schizosaccharomyces pombe, Kluyveromyces lactis, Candida spp., Pichia spp* koji mogu fermentirati i pentoze (Binod i sur., 2013).

Kvasci mogu rasti u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Aerobni uvjeti pogoduju rastu stanica kvasca, što nije od interesa za proizvođače etanola. Međutim, rast u anaerobnim uvjetima je vrlo mali i uglavnom se odvija pretvorba šećera u etanol pri čemu nastaje energija. Za rast i razmnožavanje kvasac zahtjeva odgovarajuće organske izvore ugljika i dušika te različite organske i anorganske faktore rasta u tragovima. Tijekom pretvorbe šećera u etanol

proizvodi se energija koju stanice koriste za različite funkcije. Uz kvasce, veliki broj bakterija također ima sposobnost proizvodnje etanola, ali većina proizvodi druge krajnje produkte poput butanola, izopropil- alkohola, octene kiseline, mravlje kiseline, arabitola, glicerola, acetona, metana, itd. (Binod i sur., 2013).

Industrijski procesi koji koriste mikroorganizme većinom su usmjereni na relativno malu skupinu bakterija i funga. Svaka grupa sa sobom nosi određene prednosti i nedostatke. U funge spadaju kvasci, koji su u uporabi mnogo tisuća godina, a odlikuju se visokom proizvodnjom etanola i tolerancijom na etanol. Bakterije se međusobno veoma razlikuju u pogledu brzine nastajanja proizvoda kao i njihove tolerancije na inhibitore (Dufour i sur., 2011).

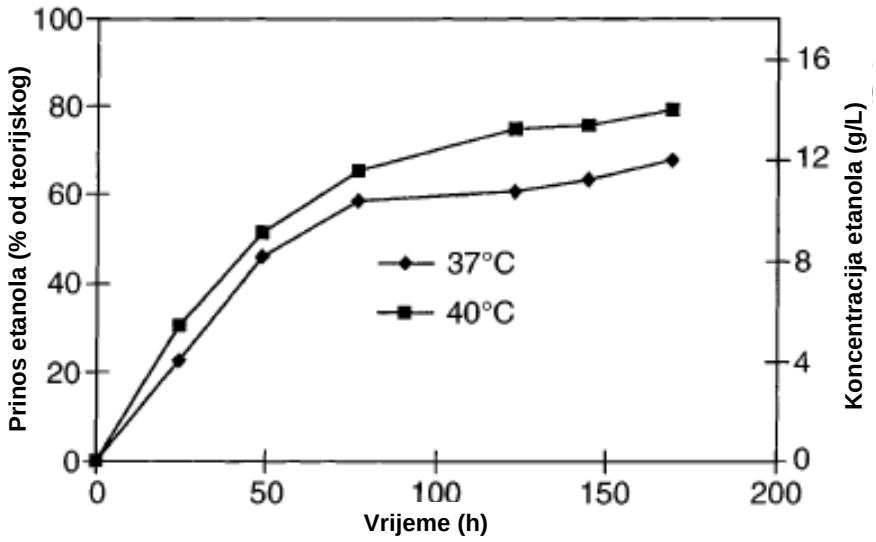
Bakterije koje proizvode etanol kao glavni produkt (tj. minimalno 1 mol proizvedenog etanola po molu iskorištene glukoze) prikazane su u Tablici 2 (Binod i sur., 2013). Također je za produkciju etanola istraživano više vrsta filamentoznih funga (Binod i sur., 2013). Različiti etanologeni mikroorganizmi bit će ukratko prikazani u tekstu koji slijedi.

Tablica 2. Glavne etanologene bakterije (Binod i sur., 2013).

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

2.3.1.1. Kvasci roda *Candida*

Kvasac roda *Candida* poznat je po vrsti *Candida albicans*, koja je patogena za ljude i uzrokuje kandidijazu i gljivične infekcije (Dufour i sur., 2011). Rod *Candida* je velik i uključuje oko 200 poznatih vrsta, od kojih su mnogi od velike važnosti za proizvodnju biogoriva. Nekoliko vrsta, uključujući *C. lusitaniae* (Maleszka i sur., 1982), *C. shehatae* (Du Preez i sur., 1986; Preez i sur., 1986; Toivola i sur., 1984) i *C. tropicalis* (Gong i sur., 1981; Jeffries, 1981) može koristiti ksilozu. *C. tropicalis* je također poznati ljudski patogen, koji djeluje na imunokompromitirane pacijente (Wingard i sur., 1979). Kod vrsta u rodu također je primijećeno korištenje celobioze (s *C. tenuis* (Toivola i sur., 1984; Dufour i sur., 2011)), manoze, saharoze i fruktoze. *Candida* proizvodi etanol kao glavni proizvod fermentacije s *Candida acidothermophilum*, termotolerantnim kvascem, koji proizvodi etanol do 80 % stehiometrijskog prinosa iz glukoze (Kadam i Schmidt, 1997; Dufour i sur., 2011) (Slika 9).



Slika 9. Simultana saharifikacija i fermentacija (SSF) s kvascem *Candida acidothermophilum* u kojoj se kao sirovina koristi isprana predobrađena (160 °C / 10 min) topola (Kadam i Schmidt, 1997).

Pretvorba šećera koji potječu iz drveta u etanol ograničena je na heksoze jer ksiloze nisu fermentabilne, no ksiloza je glavna komponenta lignoceluloznog otpada.Većina tih kvasaca

može rasti na ksilozi u aerobnim uvjetima, ali samo nekolicina može fermentirati ksilozu i time proizvesti etanol (Binod; 2013).

Jedan od prvih primjera je kvasac *Candida tropicalis*, koja ima sposobnost fermentacije ksiloze u uvjetima limitacije kisikom u prisustvu povišenih koncentracija polietilen glikola (Hagerdal i sur. 1985).

Kvasac *C. shehatae* uzgajan je na ksilozi kako bi se proizveo etanol u kontinuiranim i šaržnom uzgoju s pritokom supstrata (Binod, 2013). Koncentracija proizvedenog etanola bila je proporcionalna je energiji (eng. vigor), održivosti (eng. viability) i brzini rasta inokuluma. Razvijen je postupak u dvije faze za proizvodnju etanola. U prvoj fazi proveden je kontinuirani uzgoj kvasca, a u drugoj fazi provedena je fermentacija s pritokom supstrata koji se sastojao od koncentrirane otopine šećera pri semiaerobnim uvjetima. Stanice se prilagođavaju uvjetima ograničenja kisikom tako da sintetiziraju alkohol dehidrogenazu (ADH) i brzo fermentiraju ksilozu u etanol. Za ekonomičnu proizvodnju bioetanola, soj kvasca bi trebao biti u mogućnosti razgraditi glukozu i ksilozu pri povišenoj temperaturi. Tanimura i suradnici (2012), izolirali su novi soj kvasca *C. shehatae* koji može provesti alkoholnu fermentaciju pri povišenoj temperaturi. Prinos proizvodnje etanola iznosio je 71,6 % nakon 24 sata inkubacije pri 37 °C u SX mediju koji je sadržavao 3 % ksiloze i 0,67 % YNB (eng. yeast nitrogen base) bez amino kiselina. Ovaj soj proizveo je etanol čak i iz rižine slame te je utvrđeno da je superioran u odnosu na *S. cerevisiae* za proizvodnju etanola iz lignocelulozne biomase.

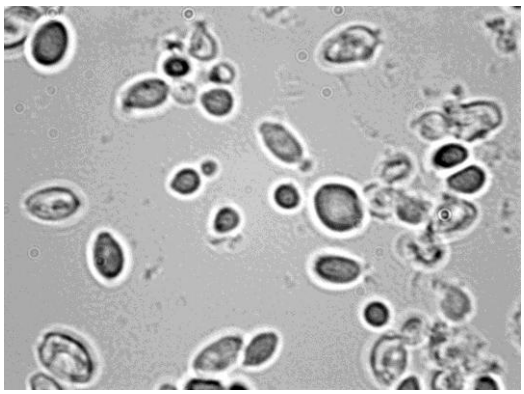
Watanabe i suradnici (2010), su koristili kvasac *C. glabrata* koja nema respiratorni lanac i zabilježili su sposobnost veće proizvodnje etanola u procesu simultane saharifikacije i fermentacije. Povišena temperatura (42 °C) i miješanje (150 o/min) pogodni su za proizvodnju etanola iz netopljivih sirovina uz primjenu simultane saharifikacije i fermentacije (SSF). Nakayama i suradnici (2008), izvijestili su da *C. krusei* IA-1 proizvodi 55 g etanola /L iz 150 g/L glukoze. Njihovo istraživanje je pokazalo da se *C. krusei* može koristiti kao potencijalna alternativa umjesto *S. cerevisiae* za ekonomičnu proizvodnju etanola.

Dahiya i Vij (2012) izvijestili su o proizvodnji etanola iz sirutke pomoću različitih sojeva imobiliziranih vrsta kvasaca iz roda *Candida* (*C. inconspicua* W16 i *C. xylopsoci* W23). Imobilizirani kvasac *C. inconspicua* W16 pokazao se učinkovitijim u proizvodnji etanola (3,03 % v/v) iz sirutke. *Candida tropicalis* može konvertirati ksilozu u etanol u aerobnim uvjetima te se aeracijom ubrzava proizvodnja etanola. Kako bi se u aerobnim uvjetima ksiloza prevela u etanol, potrebno je imati aktivan Embden Meyerhoff-ov put i pentoza-fosfatni put koji nisu reprimirani zrakom.

Alexander i suradnici (1988) su procjenjivali kontinuiranu fermentaciju ksiloze sa *C. shehatae* u dvostupanjskom reaktoru. To može prevladati glavni čimbenik koji sprječava kontinuiranu proizvodnju etanola u šaržnom uzgoju. Stalan dotok svježih stanica i kontinuirano uklanjanje potrošenih stanica pomaže u smanjenju gubitka fermentacijske aktivnosti zbog anaerobnih uvjeta i izloženosti visokim koncentracijama etanola. Konačni prinos etanola iznosio je 37 g/L u dvostupanjskom procesu, dok u šaržnom uzgoju iznosio 38 g/L.

2.3.1.2. Kvasci roda *Kluyveromyces*

Rod kvasaca *Kluyveromyces* (Slika 10) je prvi put zabilježen 1956. i karakteriziran impresivnom sposobnošću fermentacije, a u taj rod spadaju vrste koje mogu rasti na galaktozi, laktozi, inulinu, fruktozi, sirutki (u slučaju *K. fragilis* i ksilozi (primjerice *K. marxianus)* (Dufour i sur., 2011). *K. marxianus* proizveo je 5,6 g/L etanola fermentacijom ksiloze, što je zanimljivo za industrijsku proizvodnju etanola iz lignoceluloze. Ipak, spori rast na ksilozi otežava komercijalizaciju.
Osim toga, kao i kod roda *Candida*, neke od vrsta su poznati oportunistički patogeni kod imunokompromitiranih bolesnika, što otežava postizanje GRAS statusa koji ima *S. cerevisiae*.



Slika 10. Izgled stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus* (Anonymous 3, 2016).

Među vrstama kvasaca iz roda *Kluyveromyces,* dvije su vrste od velikog interesa za biotehnološku primjenu: *Kluyveromyces lactis* i *Kluyveromyces marxianus.* Biotehnološki potencijal kvasca *K. marxianus* za proizvodnju etanola i drugih proizvoda opisan je u radu

koji su objavili Fonseca i sur. (2008). Do sada je glavni fokus usmjeren na primjene poput heterologne proizvodnje proteina (van Ooyen i sur., 2006). To je zbog jake Crabtree-negativne prirode *Kluyveromyces* vrste i niske sklonosti da proizvede etanol kada se izloži suvišku šećera (Weber i sur., 2010).

Proizvodnja etanola u ovom kvascu povezana je s ograničenjem kisika (Bellaver i sur., 2004). Ipak, neke osobine posebno od *K. marxianus* čine ovaj kvasac zanimljivim organizmom za pretvorbu biomase u etanol. Jedna prednost je termotolerancija koja omogućuje *K. marxianus* rast pri temperaturama do 52 °C (Banat i sur., 1992) te mogućnost fermentacije pri temperaturama iznad 40 °C. S industrijskog gledišta to bi moglo smanjiti troškove hlađenja i rizik od kontaminacije, pojednostaviti uklanjanje etanola te predstavlja prednost kod simultane saharifikacije i fermentacije jer takvi uvjeti odgovaraju optimalnim temperaturama za celulolitičke enzime. Više temperature fermentacije povećavaju produktivnost postrojenja. Osim toga, kvasac *K. marxianus* pokazuje visok stupanj varijabilnosti unutar iste vrste, tako da je izolirano puno različitih sojeva sa širokim spektrom supstrata. Do danas su istražena svojstva mnogih sojeva kvasca *K. marxianus* koji se razlikuju po svojoj sposobnosti rasta i fermentacije na različitim šećerima ili supstratima (npr. Suryawati i sur., 2008; Wilkins i sur., 2008; Kumar i sur., 2009; Weber i sur., 2010). Unatoč obećevajućim rezultatima fermentacije glukoze pri temperaturama iznad 40 °C uz prinos koji je iznosio do 98 % od teorijskog (Banat i sur., 1992), fermentacija ksiloze u etanol je loša. Umjesto toga, ksiloza se prevodi u ksilitol u velikoj mjeri, što je nepoželjno za ekonomičnu proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina. Kao što je spomenuto, povišene temperature za fermentaciju su moguće, ali također imaju negativan utjecaj na prinos etanola, preživljavanje stanica i toleranciju na etanol.

Izravnu fermentaciju D-ksiloze u etanol pomoću *Kluveromyces marxianus* SUB 80-S opisali su Margaritis i Bajpai (1982). Nakon 48 sati uzgoja pri aerobnim uvjetima u podlozi sa 20 g/L ksiloze koncentracija etanola iznosila je 5,6 g/L, a prinos je bio i 0,28 grama etanola po gramu ksiloze (Binod i sur., 2013).

Proizvodnju etanola od biomase topole i eukaliptusa simultanom saharifikacijom i fermentacijom pomoću termotolerantnog soja kvasca *K. marxianus* CECT 10875 istražili su Ballesteros i sur. (2004). Nakon 72-82 sata procesa je postignuto iskorištenje od 50-72 %, izračunato obzirom na maksimalni teorijski prinos SSF. U fermentacijskom mediju dobivena je maksimalna koncentracija etanola od 16-19 g/L u fermentiranoj hranjivoj podlozi, ovisno o istraživanom materijalu. Uporabom termotolerantnih sojeva pri visokim temperaturama procesa (42 °C) smanjuje se rizik od kontaminacije u usporedbi s drugim fermentirajućim

kvascima. To omogućava rad pod nesterilnim uvjetima, što je vrlo povoljno za unaprjeđenje procesa.

Tomas-Pejo i sur. (2009) razvili su simultanu saharifikaciju i fermentaciju (SSF) koja se provodi šaržno s pritokom supstrata za proizvodnju bioetanola pomoću termostabilnog soja kvasca *Kluveromyces marxianus* CECT 10875. Prinos etanola iznosio je 36,2 g/L, što je 20 % više nego u slučaju šaržnog vođenja SSF.

Garcia-Aparicio i sur. (2011) prikazali su ekonomičan proces koji daje visok prinos etanola fermentacijom koju provodi *K. marxianus* CECT 10875 u hranjivoj podlozi dobivenoj iz ječmene slame obrađene parnom eksplozijom.

Toyoda i Ohtaguchi (2008) (citirano u Binod i sur., 2013) izvijestili su o proizvodnji etanola pomoću *K. lactis* NBRC 1903, pri čemu je supstrat bila laktoza iz sirutke koja je dobivena kao nusproizvod prilikom proizvodnje sira. Studija je pokazala da koncentracija otopljenog kisika ima ključnu ulogu u proizvodnji etanola pomoću ovog mikroorganizma. Prinos etanola nakon 24 sata šaržnog uzgoja iznosio je 63,7 g/L.

Proizvodnja etanola iz ukrasnog prosa (eng. switchgrass, lat. *Panicum virgatum*) uz simultanu saharifikaciju i fermentaciju s termotolerantnim kvascem *K. marxianus* IMB3 opisana je u radu koji su objavili Pessani i sur. (2011), gdje je nakon 168 sati pri 45 °C postignuta koncentracija etanola 22,5 g/L, što odgovara prinosu etanola od 86 %.

Istovremenu proizvodnju etanola i poligalakturonaze pomoću kvasca *K. marxianus* u šaržnom pilot-fermentoru u podlozi sastavljenoj od kvaščevog ekstrakta, glukoze i melase dobivene iz šećerne repe istražili su Serrat i suradnici (2004). Produktivnost je iznosila 1,94 g etanola/L/h, a iskorištenje 95,1 %. Proizvodnja etanola simultanom saharifikacijom i fermentacijom topole (*Populus nigra*), prethodno ekspandirane parom i obrađene tekućom vrućom vodom, provedena je pomoću kvasca *K. marxianus* CECT 10875 i opisana u radu koji su objavili Negro i sur. (2003). Rezultati pokazuju da fermentacija uz prethodnu ekspanziju parom daje iskorištenje 60 % u odnosu na teorijsko, te da omogućava bolje prinose u odnosu na tretman topole tekućom vrućom vodom.

2.3.1.3. Kvasci roda *Pichia*

Rod *Pichia* (noviji naziv roda je *Scheffersomyces*) sadrži kvasac *Pichia stipitis* (*Scheffersomyces stipitis*), koji je zanimljiv prvenstveno zbog endogenog metaboličkog puta ksiloze (Dufour i sur., 2011). *Pichia stipitis* (Slika 11a) nije prvi kvasac otkriven s takvim

svojstvom, primjerice kod kvasca *Pachysolen tannophilus* također je nađeno da fermentira ksilozu u etanol (Schneider i sur., 1981). Međutim, kvasac *P. stipitis* pokazuje visoku proizvodnju etanola iz ksiloze, pri čemu neki sojevi proizvode gotovo 6 g/L etanola. To je 67 % od teorijskog prinosa koji iznosi 9 g/L etanola nakon 10 dana u primijenjenoj hranjivoj podlozi sa 2 % ksiloze (Toivola i sur., 1984; Dufour i sur., 2011). Optimiranjem koncentracije kisika, u kontinuiranom uzgoju je postignut maksimalni prinos od 0,48 g/g (gram etanola po gramu ksiloze) i specifična produktivnost 0,20 g/L/h (Skoog i Hahn-Hägerdal, 1990). Osim toga, pokazalo se da je za proizvodnju etanola u podlozi koja sadrži 150 g/L ksiloze pomoću *P. stipitis* optimalna pH-vrijednost 4 - 7 te optimalna temperatura 34 °C, čime se postiže maksimalni prinos od 57 g/L (Slininger i sur., 1990).

Stoga se može reći da kvasac *P. stipitis* proizvodi slične koncentracije etanola kao *C. shehatae*, koja također fermentira ksilozu. Nadalje, *P. stipitis* premašuje *C. shehatae* u smislu maksimalne proizvodnje etanola iz ksiloze. Jedna studija pokazala je da *P. stipitis* u podlozi sa 150 g/L ksiloze troši većinu šećera, pri čemu preostaje samo 7 g/L ksiloze, a pritom teorijski prinos etanola iznosi 76 % od teorijskog prinosa, što je ekonomski održivo (Slininger i sur., 1985; Dufour i sur., 2011).

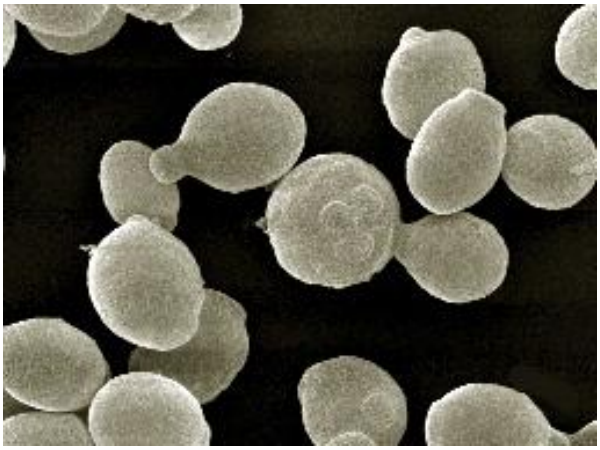
P. stipitis je jedan od rijetkih kvasaca koji mogu fermentirati ksilozu i zato je obećavajući kandidat za proizvodnju etanola iz lignoceluloznih sirovina (Weber i sur., 2010). Kvasac *P. stipitis* također može fermentirati glukozu, galaktozu i celobiozu (Parekh i Wayman, 1986; Weber i sur., 2010) te zahvaljujući tome što je genom ovog kvasca u potpunosti sekvencioniran znamo da također posjeduje različite celulaze i hemicelulaze (Jeffries i sur., 2007). To može biti od koristi u SSF (simultanoj saharifikaciji i fermentaciji) iako je optimalna temperatura rasta ovog kvasca oko 30 °C. Fermentacija ksiloze kvascem *Pichia stipitis* CBS 6054 u minimalnoj hranjivoj podlozi prikazana je na Slici 11b iz koje je vidljivo da pritom kao nusproizvod nastaje i nešto ksilitola (Jeffries i sur., 2007).

U usporedbi s kvascem *S. cerevisiae*, brzine potrošnje šećera u kvascu *P. stipitis* su niže i čini se da je to djelomično povezano s transportom šećera (Ligthelm i sur., 1988; Agbogbo i Coward-Kelly, 2008; Weber i sur., 2010).

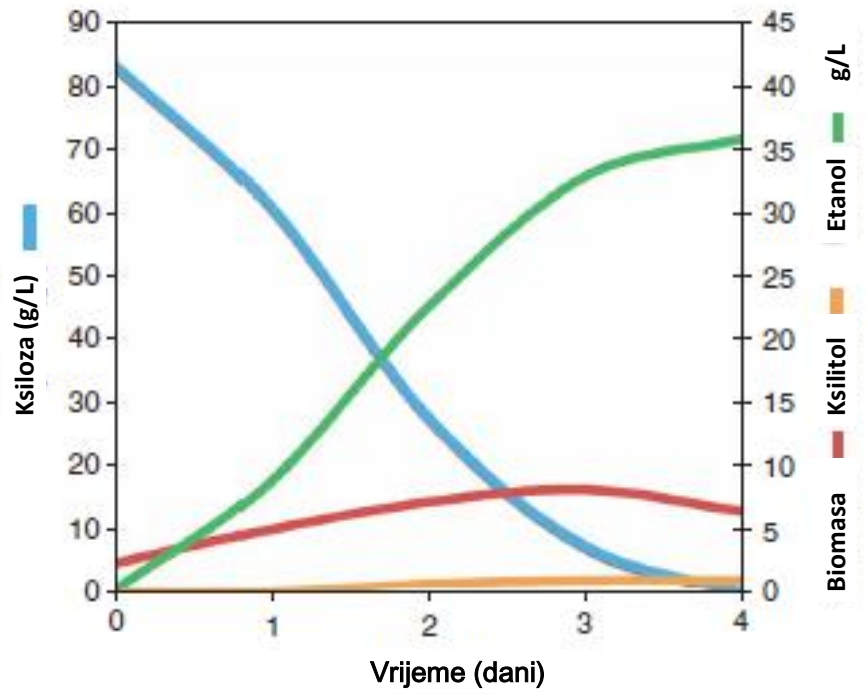
Glukoza je preferirani izvor ugljika i u mješavinama glukoza/ksiloza transport ksiloze je inhibiran. Novija istraživanja idu u dva smjera, od kojih je prvi povećanje tolerancije prema inhibitorima i etanolu primjenom genetičkih modifikacija, a drugi je optimiranje nutrijenata da bi se postigli veći prinos etanola i tolerancija prema inhibitorima (Bajwa i sur., 2009; Bajwa i sur., 2010; Slininger i sur., 2009). U optimiziranom definiranom mediju koji sadrži

150 g/L ksiloze moguće je postići maksimalno 61 g/L etanola sa prinosom od 0,41 gram etanola/gramu ksiloze (Slininger i sur., 2006).

a)



b)



Slika 11 a) Izgled stanica kvasca *Pichia stipitis (*Anonymous 4, 2016); b) primjer fermentacije ksiloze pomoću kvasca *Pichia stipitis* CBS 6054 (Jeffries i sur., 2007).

Izvor dušika ima osobito velik utjecaj na proizvodnju etanola i preduvjet je za proizvodnju etanola u fazi procesa kada stanice više ne rastu. Zbog toga je za industrijsku primjenu potrebno odabrati prikladan izvor dušika. Nadalje, kvasac *P. stipitis* pokazuje optimalnu proizvodnju etanola samo u mikroaerofilnim uvjetima, dok se pod aerobnim

uvjetima nema proizvodnje etanola čak i uz suvišak šećera. Produktivnost etanola je istraživana u nizu različitih hidrolizata, pri čemu su uočeni prinosi u rasponu od 0,31 do 0,48 g etanola/g utrošenog šećera (Weber i sur., 2010).

Pokazalo se da za industrijsku primjenu među mikroorganizmima koji fermentiraju pentoze, najviše obećava *Pichia stipitis* (Agbogbo i sur., 2006). Primjerice, iz hemiceluloznih hidrolizata šumske vrste *Prosopis juliflora* (18,24 g šećera/L podloge) *P. stipitis* je proizvela 7,13 g/l etanola (Gupta i sur., 2009) (Binod i sur., 2013).

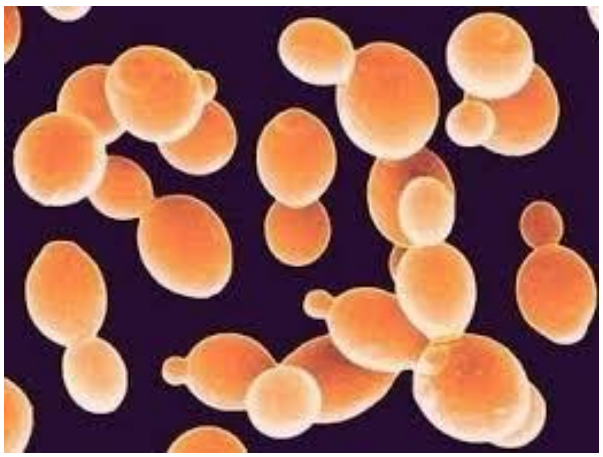
Razrijeđenom kiselinom hidrolizirana je biljka *Lantana camara, a* dobiveni hidrolizat je detoksiciran i sadržavao je 16.83 g/L šećera. Fermentacija ovog hidrolizata bogatog ksilozom provedena je kvascem *P. stipitis* 3498 pri pH-vrijednosti 5,5 i 30 ºC te je nakon 24 sata proizvedeno od 5,16 g etanola / L uz prinos 0,33 g/g i produktivnost 0,23 g/L/h (Kuhad i sur., 2010; Binod i sur., 2013). Drugi sličan primjer je korištenje kiselinskog hidrolizata vodenog zumbula (eng. water hyacinth), koji je prvo detoksiciran, a potom je takva podloga bogata pentozama fermentirana pomoću kvasca *P. stipitis* NCIM-3497 pri pH 6,0 i 30 ºC te je dobiveno 0,425 g etanola /g lignoceluloze (Binod i sur., 2013).

Canilha i suradnici (2010) procijenili su hemicelulozni hidrolizat bagase, zaostale nakon prerade šećerne trske, za proizvodnju etanola pomoću kvasca *Pichia stipitis* DSM 3651. Fermentacija je provedena uz dodatak 3 g/L kvaščevog ekstrakta i sladnog ekstrakta te 5 g/L peptona. Uočeno je da se detoksikacijom hemiceluloznog hidrolizata promjenom pH-vrijednosti i korištenjem aktivnog ugljena poboljšava biokonverzija hemiceluloze u etanol. Prinos fermentacije u detoksiciranom hidrolizatu iznosio je 0,30 g/g, dok je bez detoksikacije bio 0,20 g/g. Učinke različitih procesnih parametara koji utječu na proizvodnju etanola iz hemiceluloznih hidrolizata rižine slame pomoću *P. stipitis* NRRL Y-7124 istraživali su Silva i sur. 2010. Ocijenjeni su parametri kao što su početna koncentracije ksiloze, miješanje i aeracija. Utvrđeno je da je optimalna početna koncentracija ksiloze 50 g/L, dok je povećanje aeracije i miješanja dovelo do promjene metabolizma kvasca tako da je umjesto etanola proizvedena biomasa. Pri optimiranim uvjetima postignuta je efikasnost procesa od 72,5 %. Shupe i Liu (2012) proučavali su utjecaj brzine miješanja na proizvodnju etanola iz hidrolizata drveta *Acer saccharum* (hrv. šećerni javor) pomoću kvasca *P. stipitis*. Najveći prinos etanola (29,7 g/L) zabilježen je kada je uz vrlo nisku koncentraciju kisika i miješanje 150 okretaja u minuti. Povećanje ili smanjenje brzine miješanja u rasponu od 300-350 okretaja u minuti dovelo je do pada proizvodnje etanola. Poboljšana metoda proizvodnje etanola iz kukuruzovine obrađene metodom parne eksplozije bez detoksikacije procijenjena je korištenjem *P. stipitis* CBS 5776 (Young i sur., 2012). Opaženo je da prilagodba *P. stipitis*

poboljšava potrošnju šećera i povećava prinos etanola sa povećavanjem omjera hidrolizata u mediju. Prinos etanola iznosio je 80 %, a potrošnja šećera 90 %.

2.3.1.4. Kvasci roda *Saccharomyces*

Rod *Saccharomyces* je poznat po tome što u njega spadaju pivski i pekarski kvasac te vinski kvasci (Dufour i sur., 2011). Ovaj rod je od velike važnosti u suvremenim biotehnološkim procesima, međutim njegova uporaba je znatno starija. Rod *Saccharomyces* može fermentirati velik broj supstrata, uključujući glukozu, fruktozu, galaktozu, maltozu, saharozu, ksilulozu, dekstrin, rafinozu i škrob te su metodama genetičkog inženjerstva neki sojevi modificirani tako da metaboliziraju lignocelulozne šećere kao što su ksiloza i arabinoza (Becker i Boles, 2003; Hahn-Hägerdal, 2001; Karhumaa, 2005; Kotter i Ciriacy, 1992; Kuyper i sur., 2005; Sonderegger i sur., 2004; Wisselink i sur., 2007, Dufour i sur., 2011).



Slika 12. Izgled stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae (*Anonymous 5, 2016).

Stanice kvasca *S. cerevisiae* (Slika 12) 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; Dufour i sur., 2011). Stoga se kvasac *S. cerevisiae* tradicionalno koristi u industriji hrane i pića, kao i za industrijsku proizvodnju specijalnih kemikalija i bioetanola (Weber i sur., 2010). Čovjek koristi kvasac *S. cerevisiae* za dizanje tijesta pri izradi kruha najmanje pet tisućljeća i za proizvodnju fermentiranih alkoholnih pića otprilike 4000 godina prije toga, unatrag barem do Neolitika. Kvasac *S. cerevisiae* posjeduje visoku toleranciju na etanol i veliku sposobnost njegove proizvodnje

(Dufour i sur., 2011). On je među najpoznatijim mikroorganizmima te postoji velik broj metoda za njegovu genetičku modifikaciju (Weber i sur., 2010). Međutim, kvasac *S. cerevisiae* ne može fermentirati pentoze poput ksiloze i arabinoze (Olofsson i sur., 2008; Weber i sur., 2010). Stoga su primijenjeni različiti pristupi kako bi se metabolički putevi za korištenje ksiloza i arabinoza integrirali u kvasac *S. cerevisiae* (van Maris i sur., 2007; Weber i sur., 2010).

Ostale vrste iz roda *Saccharomyces* koriste slične supstrate za proizvodnju etanola (D'Amore i sur., 1989; Dufour i sur., 2011). Posebno je zanimljiva vrsta *S. diastaticus*.

Određeni sojevi kvasca *S. cerevisiae* su modificirani kako bi mogli proizvoditi enzime potrebne za razgradnju škrobnih supstrata. *S. cerevisiae* je prije više od dva desetljeća genetički modificiran tako da eksprimira, glikozilira i izlučuje enzim glukoamilazu koji razgrađuje škrob (Innis i sur., 1985), a kasnije je modificiran s ciljem proizvodnje etanola iz složenih supstrata (Kondo i sur., 2002; Dufour i sur., 2011).

Postoje valjani razlozi zbog kojih je *S. cerevisiae* ostao u fokusu istraživanja proizvodnje biogoriva. Kvasac *S. cerevisiae* tolerira visoke koncentracije etanola u tekućoj kulturi (Morais i sur., 1996; Dufour i sur., 2011). Alfenore i sur. (2002) su optimirali količinu i način prihrane vitaminima tijekom procesa alkoholne fermentacije. Pritom je postignuto maksimalno 147 g etanola/L nakon 45 sati šaržnog uzgoja s prihranjivanjem, uz konačnu koncentraciju 19 % (v/v) etanola i specifične brzine proizvodnje koja je iznosila čak 9,5 g/L/h. Još veća tolerancija je ostvarena sa kvascem *Saccharomyces sake*, koji proizvodi i tolerira oko 160 g/L etanola (Hayashida i Ohta, 1981), ali je vrijeme iznosilo 20 dana. Da bi se pomoću kvasca mogla uspješno provesti biokonverzija lignoceluloze u biogoriva koristi se genetičko inženjerstvo za konstruiranje sojeva kvasca koji koriste šećere prisutne u lignocelulozi. Metode koje se pritom koriste opisane su u revijalnom radu koji je objavio Nevoigt (2008). Pritom se u kvasac ubacuju geni za odgovarajuće enzime koji potječu iz drugih organizama (poput *Trichoderma reesei*), što umogućuje kvascu da razgradi lignocelulozne polimere bez skupe predobrade enzimskom hidrolizom (Lynd i sur., 2005).

Širom svijeta, skoro sva proizvodnja etanola se postiže pomoću jednog roda i vrste kvasca, a to je *Saccharomyces cerevisiae* (Binod i sur., 2013). Za komercijalnu proizvodnju se koriste posebni sojevi koji proizvode etanol iz soka šećerne trske i melase te soka od repe i melase. Kvasac može proizvesti etanol iz heksoza dobivenih saharifikacijom lignoceluloze. U novije vrijeme su selekcionirani visokoproduktivni sojevi kvasaca i komercijalizirani za proizvodnju etanola iz suho mljevenog kukuruznog zrna (eng. dry grind corn) primjenom šaržnog uzgoja. Neki sojevi kvasca fermentiraju brže ili daju veće prinose. Na rast kvasca i

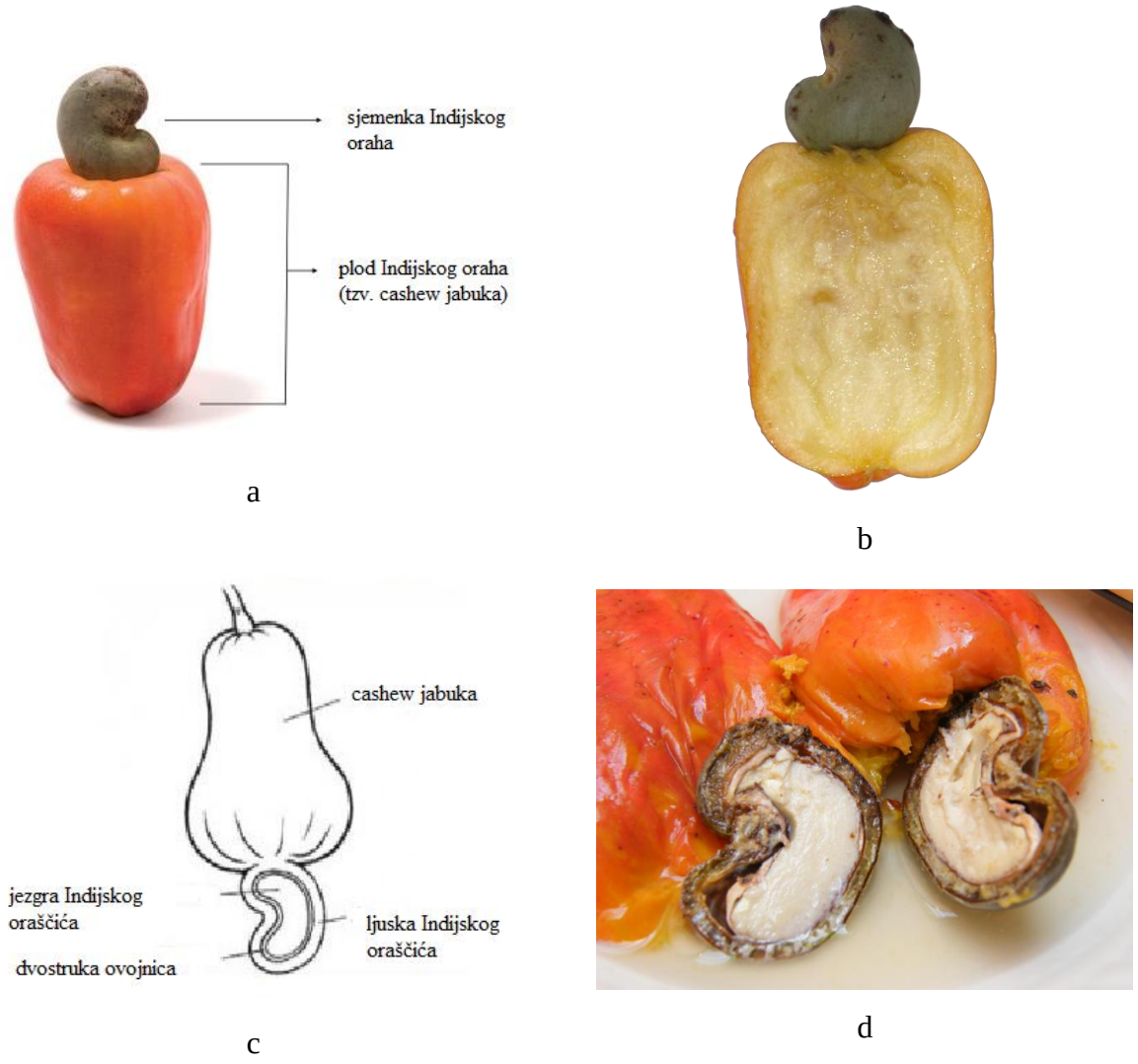
proizvodnju etanola može utjecati više induktora i čimbenika stresa. Genetski unaprijeđeni mikroorganizmi za proizvodnju etanola su u različitim fazama razvoja i ukratko će biti objašnjeni u nastavku teksta (Binod i sur., 2013).

Optimalni parametri fermentacije pomoću kvasca *S. cerevisiae* su hranjiva podloga koja sadrži 22 % (w/v) šećera, po 1 % (w/v) amonijevog sulfata i kalijevog dihidrogenfosfata pri pH-vrijednosti 5,0 i temperaturi 30 °C (Junior i sur., 2009). U takvim uvjetima tipičan soj *S. cerevisiae* može proizvesti 46,1 g etanola/L hranjive podloge (Maziar 2010). Trščana melasa koja je obrađena pomoću EDTA (Etilendiamintetraoctena kiselina), ferocijanida ili zeolita te potom fermentirana pri sličnim uvjetima omogućava povećanje proizvodnje etanola (Binod i sur., 2013). Nadalje, pokazalo se da dodatak minimalne koncentracije hmeljnih kiselina u fermentacijsku smjesu sprječava rast bakterija i na taj način povećava prinos etanola. Također se pokazalo da se učinkovitost fermentacije može povećati za gotovo 20 % ukoliko se koriste imobilizirane stanice kvasca i hranjive podloge kojima su dodani magnezij, cink, bakar i kalcijev pantotenat (Binod i sur., 2013).

Proizvodnju etanola iz ječmene slame, koja je prethodno tretirana parom, uz korištenje malih količina enzima i male koncentracije kvasca istraživali su Linde i sur. (2007). Najveći prinos etanola i koncentracija etanola od 82 % odnosno 15,5 g/L dobiveni su uz 5 % suhe tvari, 20 FPU/g enzima i 5 g/L kvasca. Primijećeno je da se prinos etanola smanjuje s povećanjem udjela suhe tvari u podlozi i smanjenjem dodane količine enzima.

Ruiz i sur. (2012) su istraživali proizvodnju etanola iz pšenične slame, prethodno podvrgnute hidrotermalnoj predobradi, pomoću termotolerantnog flokulentnog kvasca *S. cerevisiae*. Njihovi rezultati pokazali su da je koncentracija etanola ovisila o količini korištenog enzima i količini biomase, pri čemu je maksimalna koncentracija etanola od 14,84 g/L dobivena pri temperaturi od 45 °C, uz 3 % biomase i enzimsku aktivnost 30 FPU.

Objavljen je rad u kojem je kao potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola korišten lignocelulozni otpad koji se dobiva nakon cijeđenja ploda Indijskog oraha. Tzv. cashew jabuka (eng. cashew apple) (Slika 13) je plod Indijskog oraha (*Anacardium occidentale*). Ova biljka je malo zimzeleno drvo visine do najviše 12 m, podrijetlom iz Brazila. Indijski orah se sada uzgaja u mnogim tropskim područjima svijeta zbog svog ploda i sjemena (Anonymous 6, 2016). Bagasa ploda Indijskog oraha (eng. cashew apple bagasse) je procijenjena kao potencijalna sirovina za proizvodnju bioetanola pomoću kvasca (Rodrigues i sur., 2011). Fermentacijom hidrolizata pomoću kvasca *S. cerevisiae* dobivena je koncentracija etanola od 5,6 g/L uz produktivnost 1,41 g/Lh.



Slika 13. Izgled ploda Indijskog oraha (*Anacardium occidentale*) (Anonymous 7-10, 2016).

Wilkins i sur. (2007) istražili su proizvodnju etanola pomoću kvasca *S. cerevisiae* tako da su proveli simultanu saharifikaciju i fermentaciju (SSF) otpadne kore citrusa, koja je prethodno obrađena parnom eksplozijom (eng. steam exploded). Parnom eksplozijom uklonjen je D-limonen, inhibitor prisutan u otpadnoj kori agruma. Najviše koncentracije etanola dobivene su kada je početna pH-vrijednost kore agruma podešena na 6,0.

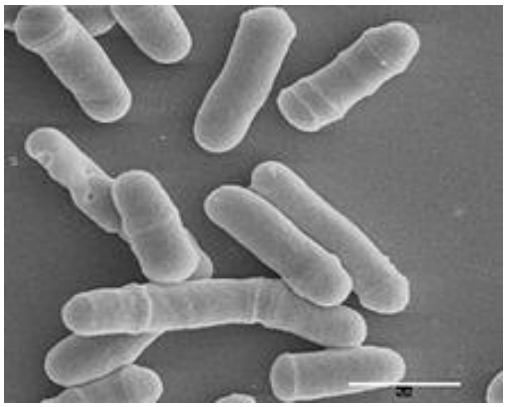
Choi i sur. (2012) izvijestili su o proizvodnji bioetanola iz ostataka dobivenih pri proizvodnji kave pomoću *S. cerevisiae*, gdje je postignuta koncentracija etanola od 15,3 g/L uz iskorištenje 87,2 % (računato na temelju polaznog šećera).

Prethodne studije pokazuju da koncentracija iona natrija ima značajan utjecaj na proizvodnju etanola pomoću *S. cerevisiae*, uz interaktivni učinak između kalcija i magnezija. Optimalna koncentracija natrija iznosila je 930 mg/L (Soyuduru i sur., 2009), a povećanjem

koncentracije natrija pala je proizvodnju etanola zbog negativnog utjecaja na glikolizu i zbog kompetitivne inhibicije ulaska kalija u stanicu što dovodi do iscrpljenja kalija u stanici i povećanja koncentracije natrija.

2.3.1.5. Kvasci roda *Schizosaccharomyces*

Schizosaccharomyces je rod fisijskih kvasaca, koji mogu fermentirati ksilozu u etanol pri mikroaerofilnim ili kisikom limitiranim uvjetima. Lastick i sur. (1990) su dokazali da simultana fermentacija i izomerizacija ksiloze (eng. simultaneous fermentation and isomerization of xylose, SFIX) omogućuje potpunu fermentaciju ksiloze u jednom koraku. SFIX omogućuje značajno poboljšanje fermentacije ksiloze u etanol obzirom da je brža i bolje tolerira veće koncentracije ksiloze i etanola (Binod i sur., 2013). Izgled stanica kvasca *Schizosaccharomyces pombe* prikazan je na Slici 14.



Slika 14. Izgled stanica kvasca *Schizosaccharomyces pombe* (Anonymous 11, 2016).

2.3.1.6. Kvasci roda *Pachysolen*

Saharan i Sharma (2010) istraživali su kvasac *Pachysolen tannophilus* (Slika 15) i dokazali da trehaloza ima zaštitnu ulogu u stanjima oksidativnog stresa uzrokovanog etanolom. U jednom drugom istraživanju (Binod i sur., 2013) u kojem su primijenjene različite metode uzgoja kvasca *Pachysolen tannophilus* (šaržni uzgoj, šaržni uzgoj s prihranjivanjem i kontinuirani uzgoj) na različitim supstratima u aerobnim, anaerobnim i mikroaerobnim uvjetima u bioreaktoru s miješanjem uočeno je da se pri anaerobnim uvjetima

dobiva malo biomase i mala količina etanola. Najviše etanola proizvedeno je u mikroaerobnim uvjetima (Binod i sur., 2013).



Slika 15. Izgled stanica kvasca *Pachysolen tannophilus* (Anonymous 12, 2016).

2.3.1.7. Bakterije roda *Bacillus*

Rod *Bacillus* je velika i raznolika skupina bakterija, koje općenito nisu patogene i uglavnom su saprofitske te su od velikog značaja za industrijsku proizvodnju (Dufour i sur., 2011). U industriji se koriste za proizvodnju enzima, insekticida i antibiotika. Vrste iz ovog roda su karakterizirane kao Gram-pozitivni, fakultativni ili obligatni anaerobi štapićastog oblika (Dufour i sur., 2011). Među poznatijim vrstama nalaze se *Bacillus anthracis*, koji je uzročnik antraksa, i *B. subtilis* (Slika 16) kao dobro istraživani modelni organizam.



Slika 16. Izgled bakterije *Bacillus subtilis* (Anonymous 13, 2016).

Rod *Bacillus* je također poznat po različitim produktima fermentacije i korištenim supstratima. Osim uobičajenih podloga koje sadrže heksoze kao supstrate, određene vrste roda *Bacillus* mogu koristiti i arabinozu, ksilozu, škrob, rafinozu i trehalozu (Dufour i sur., 2011). Zabilježeno je da ove bakterije mogu proizvesti značajne količine etanola, acetata i 2,3-butandiola. U jednom radu je objavljen podatak da *B. subtilis* proizvodi 23,3 mM laktata, 16,4 mM acetata i 16,7 mM 2,3-butandiola nakon 10 sati uzgoja na 37 °C u kulturi koja sadrži 50 mM glukoze i 50 mM piruvata (Dufour i sur., 2011).

Unutar roda *Bacillus* postoje brojne termofilne vrste koje rastu pri daleko višim temperaturama nego većina drugih organizama. Termofilne vrste su od posebnog značaja za industriju zbog svoje sposobnosti preživljavanja pri visokim temperaturama, s obzirom da se brzina kemijskih reakcija mijenja sa temperaturom. Također, osim otpornosti na toplinu, termofilne vrste su otpornije i na druge stresove (Wiegel i Ljungdahl, 1981; Wiegel i sur., 1979; Dufour i sur., 2011) kao što je izloženost inhibitorima i teškim metalima. Jedna osobito dobro istraživana vrsta, *B. stearothermophilus*, koristi velik broj šećera za proizvodnju etanola (Sharp i sur., 1980), uključujući škrob, arabinozu, ksilozu i sorbitol. Nažalost, ovi prinosi etanola su relativno niski, daleko od stehiometrijskog odnosa od 2 mola etanola po molu

glukoze koji je karakterističan za divlji tip (Atkinson i sur., 1975), iako su kasnija istraživanja pokazala da se smanjena sposobnost fermentacije *B. stearothermophilus* može značajno poboljšati (Payton, 1984; Pennock i Tempest, 1988). *B. stearothermophilus* također proizvodi mnoštvo enzima koji razgrađuju lignocelulozu (Nanmori i sur., 1990; Dufour i sur., 2011), a uz to može brzo rasti pri visokim temperaturama (generacijsko vrijeme mu je 30 min pri 70 °C) pa je zanimljiv za proizvodnju biogoriva.

Druga značajna vrsta, *B. caldolyticus*, otkrivena u termalnim izvorima Nacionalnog parka Yellowstone (Heinen i Heinen, 1972) je ekstremnija od prethodne obzirom da raste pri temperaturama dovoljno visokim da ju možemo smatrati hipertermofilnim organizmom (Wiegel i sur.,1985; Dufour i sur., 2011). *B. caldolyticus* raste pri temperaturama do 105 °C, a pri temperaturi od 75 °C ima zadivljujuće generacijsko vrijeme koje iznosi samo 15 minuta. Ova bakterija proizvodi octenu kiselinu iz supstrata poput glukoze, škroba i glicerola (Heinen i Heinen, 1972; Dufour i sur., 2011). Poput bakterije *B. stearothermophilus*, proizvodi ekstracelularne enzime (najznačajniji su amilaze) koji su stabilni kod visokih temperatura te se potencijalno mogu koristiti prilikom pripreme hranjivih podloga za proizvodnju bioetanola.

2.3.1.8. Bakterije roda *Clostridium*

Rod *Clostridium* je prvi puta opisan 1880., a radi se o Gram-pozitivnim štapićastim obligatnim anaerobima (Dufour i sur., 2011). Poput roda *Bacillus*, ovaj rod sadrži neke patogene vrste uključujući uzročnike botulizma i tetanusa. Vrste unutar roda koriste širok spektar supstrata od heksoza i pentoza 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, 1998). Značajne vrste iz ovog roda svrstane su u skupinu mikroorganizama koji provode aceton-butanol-etanolnu fermentaciju (eng. acetone–butanol–ethanol fermentation, ABE fermentation), pri čemu također nastaju i drugi proizvodi (Maddox, 1989; Dufour i sur., 2011). ABE fermentacija odnosi se na procese fermentacije ugljikohidrata u kojima nastaju različiti udjeli pojedinih otapala, a provode ih uglavnom vrste iz razreda *Clostridia,* među kojima je i rod. Iz perspektive biogoriva, proizvodnja butanola ABE-fermentacijom ima veliku važnost. Udio nastalih proizvoda u ABE-fermentaciji ovisi o više čimbenika, a to su vrsta i soj mikroorganizma, supstrati te uvjeti uzgoja. Puno se očekuje od istraživanja ABE

fermentacije pomoću bakterija iz razreda *Clostridia,* među kojima je i rod *Clostridium* (Dufour i sur., 2011).

Quareshi i Blaschek (1999) objavili su istraživanje soja bakterije *Clostridium beijerinckii* BA101, koji proizvodi veliku količinu otapala. Pri šaržnom uzgoju u podlozi koja je sadržavala 57,3 g/L glukoze ovaj soj je proizveo 24,2 g/L otapala (od toga je 19,6 g butanola/L). Pritom je brzina proizvodnje otapala iznosila 0,34 g/Lh. Primjenom integriranog procesa fermentacije i izdvajanja proizvoda, proizvodnja otapala se gotovo udvostručila za 51,5 g/L.

Zbog interesa za lignocelulozu biomasu kao sirovinu za proizvodnju biogoriva, bakterije koje koriste celulozu za proizvodnju etanola su interesantne za istraživanja. Bakterija *Clostridium cellulolyticum* je jedan od takvih mikroorganizama koji ima sposobnost razgradnje i izravnog korištenja netopive celuloze. Ova bakterija daje tri glavna proizvoda fermentacije, a to su acetat, etanol i laktat. Obzirom da je relativno lako provesti genetičku manipulaciju roda *Clostridium* to daje mogućnost unaprjeđenja ABE fermentacije u kojima se celuloza prevodi u etanol u jednom stupnju (Dufour i sur., 2011).

Sposobnost bakterije *C. beijerinckii* za ABE-fermentaciju zrna kukuruza opisali se Campos i sur. (2002)(Binod i sur., 2013). Šaržnim uzgojem dobiveno je ukupno 8,93 g ABE/ L, dok je uz dodatak hranjivih tvari u P2 podlozi dobiveno 24,80 g ABE /L. Istraživala se mogućnost jeftinije proizvodnje etanola primjenom filter-papira, kukuruzne močevine (eng. corn steep liquor, CSL), cistein hidroklorida, magnezijevog klorida i željeznog sulfata te se pokazalo da su navedeni nutrijenti bitni za rast i proizvodnju etanola pomoću *Clostridium sp.*

Clostridium phytofermentans je Gram-pozitivna, anaerobna sporogena bakterija izolirana iz šumskog tla (Weber i sur., 2010). Njezina je optimalna temperatura rasta 35-37 °C pri pH-vrijednostima u rasponu od 6,0 do 9,0 (Warnick i sur., 2002). Poput raznih drugih vrsta iz roda *Clostridia* ima sposobnost saharifikacije i fermentacije raznih polisaharida (npr. celuloze, pektina, poligalakturonske kiseline, škroba, ksilana), oligosaharida (npr. celobioze, genciobioze, laktoze, maltoze) i monosaharida poput heksoza (npr. glukoze, fruktoze, galaktoze, manoze) i pentoza (npr. arabinoze i ksiloze). Glavni krajnji produkti fermentacije su etanol i male količine acetata, formijata, laktata i vodika. Većina bakterija iz roda *Clostridia* izlučuje enzime koji razgrađuju ugljikohidrate (Maki i sur., 2009; Weber i sur., 2010). Na temelju dosadašnjih istraživanja i sekvencioniranja genoma bakterija iz roda *Clostridium* pokazalo se da genom bakterije *C. phytofermentans* kodira za najveći broj enzima koji modificiraju i razgrađuju kompleksnu strukturu ugljikohidrata te da sadrži gene za 161 enzim koji razgrađuju ugljikohidrate od kojih je 108 glikozid-hidrolaza koje čine 39 obitelji

(Cantarel i sur., 2009; Weber i sur., 2010). Također, smatra se zanimljivim organizmom za konsolidirane bioprocese. Za uporabu u komercijalne svrhe, bakterija će se još morati unaprijediti kako bi se mogla primijeniti u industriji. Trenutno su u tijeku istraživanja tvrtke Qteros, sa sjedištem u Hadley Massachusetts koja planira pilot i demonstracijsko postrojenje za proizvodnju etanola fermentacijom biomase s *C. phytofermentans* (Weber i sur., 2010).

2.3.1.9. Bakterije roda *Escherichia*

Rod *Escherichia* sadrži modelni organizam *E. coli* (Slika 17), crijevnu bakteriju štapićastog oblika čija je uporaba dovela do velikog napretka na području molekularne biologije i mikrobiologije (Dworkin, 2006; Kellogg i Shaffer, 1993) (Dufour i sur., 2011). *E. coli* koristi širok raspon supstrata te može metabolizirati sve značajnije šećere prisutne u biljnoj biomasi (Alterthum i Ingram, 1989). Pri anaerobnim uvjetima, *E. coli* (kao i ostale vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*) provodi fermentacije u kojima uz etanol nastaju mliječna, octena, mravlja i jantarna kiselina (tzv. fermentacija mješovitog tipa, eng. mixed acid fermentation) (Moat i sur., 2002; Dufour i sur., 2011). Međutim, prilikom uzgoja na glukozi, *E. coli* proizvodi dvostruko više mliječne kiseline nego etanola.



Slika 17. Izgled stanica bakterije *Escherichia coli* (Anonymous 14, 2016).

Obzirom na jednostavnost genetičke manipulacije *E. coli*, da bi se povećala količina etanola proizvedenog tijekom fermentacije mješovitog tipa, nastali su brojni genetski modificirani sojevi sa različitim sposobnostima proizvodnje etanola uz korištenje različitih supstrata (Dufour i sur., 2011). Korištenjem gena iz bakterije *Zymomonas mobilis* dobiveni su impresivni rezultati iz nastale genetički modificirane *E.coli*. U jednom istraživanju dobiveno je 54,4 g/L etanola iz 10 % glukoze i 41,6 g/L etanola iz 8 % ksiloze (Dufour i sur., 2011).

Ovi prinosi etanola nalaze se izvan granica teoretskih vrijednosti za proizvodnju etanola. Takvi prinosi postignuti su korištenjem složenih sirovina za proizvodnju etanola. Soj KO11 podvrgnut je adaptaciji na etanol (postupnim izlaganjem sve većim koncentracijama etanola) (Yomano i sur., 1998). Također se istraživalo povećanje tolerancija na etanol primjenom tehnike imobilizacije, a u nekim slučajevima je tolerancija na etanol povećana do 15 puta (Zhou i sur., 2008; Dufour i sur., 2011).

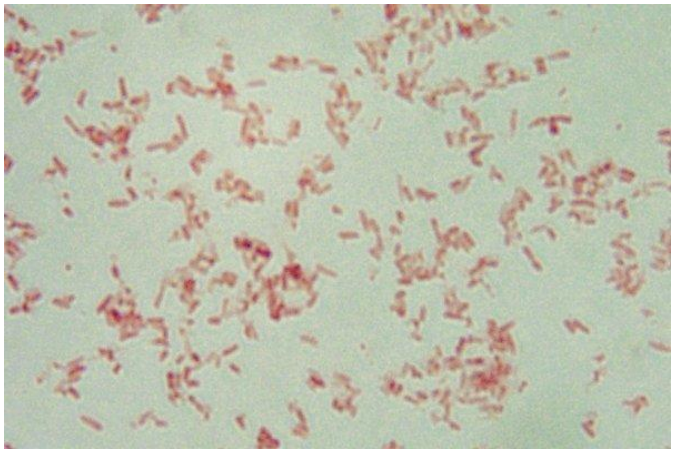
Imobilizacija je imala daljnji učinak u povećanju stabilnosti fenotipa, što je važno obzirom da je KO11 smatran fenotipski nestabilnim (u smislu produktivnosti etanola), posebno na supstratima koji ne sadrže glukozu. Nedavno je za soj KO11 koji sadrži casAB operon iz bakterije *Klebsiella oxytoca* utvrđeno da može efikasno fermentirati celobiozu (Moniruzzaman i sur., 1997) zbog mutacija u casAB operonu kojima je inaktivirana regiju u operatoru.

Sposobnost *E.coli* da koristi heksoze i pentoze čini ovaj mikroorganizam pogodnim za proizvodnju biogoriva iz lignocelulozne biomase (Feldmann i sur., 1992; Dufour i sur., 2011) (Weber i sur., 2010). Pentoze poput D-ksiloze i L-arabinoze su najzastupljeniji šećeri u hemiceulozi te mogu sačinjavati više od 30% biomase biljaka. Da bi proces proizvodnje biogoriva iz lignoceulozne biomase bio ekonomski održiv potrebna je i mogućnost korištenja pentoza. Bakterija *E. coli* se već koristi u drugim industrijskim procesima (npr. proizvodnja rekombinantnih proteina). Manipulacija *E. coli* za homoetanolnu fermentaciju ekspresijom gena piruvat-dekarboksilaze i alkohol-dehidrogenaze (PET operon) iz *Zymomanas mobilis* bila je jedna od prvih uspješnih primjena metaboličkog inženjerstva (Dufour i sur., 2011). U novije vrijeme, konstruirani su različiti sojevi *E. coli* za proizvodnju naprednijih bioalkoholnih goriva, poput izopropanola (Hanai i sur., 2007), n-butanola (Atsumi i sur., 2008), n-propanola (Shen i Liao, 2008), izobutanola, 2-metil-1-butanola i 3-metil-1-butanola (Atsumi i sur., 2008). Osim toga, unutar *E. coli* eksprimirani su novi putevi za proizvodnju goriva iz masnih kiselina (Steen i sur., 2010) ili goriva iz izoprenoida (Peralta-Yahya i Keasling, 2010), ali produktivnost i prinosi još nisu dovoljno visoki za industrijsku primjenu.

Glavni izazov u genetičkoj modifikaciji *E. coli* za fermentaciju šećera iz biomase je simultana potrošnja svih šećera dobivenih iz lignoceluloze (Jojima i sur., 2010).

2.3.1.10. Bakterije roda *Klebsiella*

Rod *Klebsiella* sastoji se od štapićastih nepokretnih Gram-negativnih stanica. Poznati su po svojoj polisaharidnoj kapsuli koja se nalazi izvan stanične stijenke (Dufour i sur., 2011). Vrste unutar ovog roda mogu fermentirati različite vrste pentoza i heksoza (uključujući arabinozu, galaktozu, glukozu, manozu i ksilozu) kao i glicerol (Biebl i sur., 1998), celobiozu i celotriozu (Dien i sur., 2003). Tijekom fermentacije vrste unutar roda *Klebsiella* daju niz produkata, uključujući organske kiseline, stoga su mnoga istraživanja usmjerena k tome da nastane više etanola.



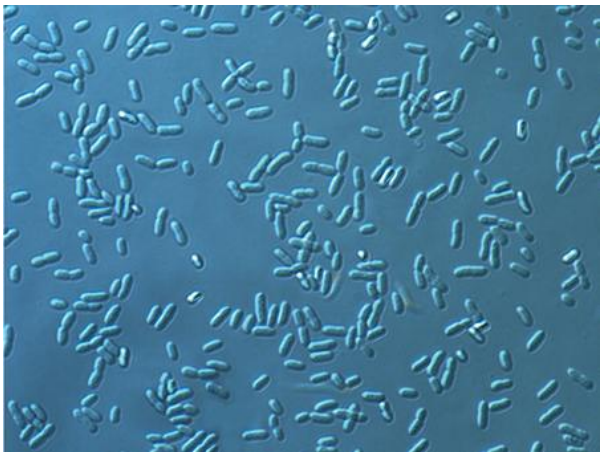
Slika 18. Izgled stanica bakterije *Klebsiella oxytoca* (Anonymous 15, 2016).

Transformacijom soja *K. oxytoca* M5A1 (Slika 18) s genom za proizvodnju etanola koji potječe iz *Z. mobilis* dobiven je soj P2 koji proizvodi 46,4 g/L etanola na 10 % glukoze i 45,2 g/L etanola kada se uzgaja na 1 % celobioze (Wood i Ingram, 1992). Pored toga dobiveni soj može transportirati celobiozu i celotriozu pa je stoga enzimski tretman daljnje depolimerizacije supstrata nepotreban.

2.3.1.11. Bakterije roda *Zymomonas*

Unutar roda *Zymomonas* najpoznatija vrsta je *Zymomonas mobilis* (Slika 19). Bakterija *Z. mobilis* je prvi anaerobni mikroorganizam za kojeg je 1950. godine otkriveno da koristi Entner-Duodoroff-ov mehanizam za katabolizam glukoze (Swings i De Ley, 1977). Postoji daljnji interes za istraživanja bakterija roda *Zymomonas* zbog velike učinkovitosti kojom prevode ugljikohidrate u etanol (do 98 %) (Skotnicki i sur., 1981). Pritom svi sojevi bakterije

Z. mobilis pokazuju ekstremnu efikasnost u proizvodnji etanola (Rogers i sur., 1982) te su zahvaljujući tome konkurentni kvascu *S. cerevisiae* i čak ga nadmašuju (Dufour i sur., 2011).



Slika 19. Izgled stanica bakterije *Zymomonas mobilis* (Anonymous 16, 2016).

Dok su istraživanja proizvodnje biogoriva pomoću rodova *Clostridium, Escherichia* i *Klebsiella* naišla na poteškoće zbog nastajanja više različitih proizvoda fermentacije, primarni fokus genetičkog poboljšanja roda *Zymomonas* je bilo povećanje broja mogućih fermentacijskih supstrata, obzirom da fermentiraju samo glukozu i fruktozu, dok neki sojevi mogu koristiti saharozu, sorbitol i rijetko rafinozu (Swings i De Ley, 1977). U jednoj studiji 1995., transformiran je soj CP4 sa dva operona koji su kodirali ukupno četiri gena za asimilaciju ksiloze i pentoza-fosfatni put. Rekombinantni CP4 proizveo je etanol iz ksiloze kao jedinog izvora ugljika uz prinos od 0,44 g/g ili 1,43 mol/mol (u usporedbi s teorijskim koeficijentom konverzije 0,51 g/g i 1,67 mol/mol) (Zhang i sur., 1995). Rekombinantnim sojem je nakon 16 sati proizvodnje etanola iz glukoze postignuto iskorištenje 94 % u usporedbi s kontrolnim sojem koji je postigao 97 % nakon jednakog vremenskog perioda. Pri uzgoju u podlogama koje sadrže ksilozu i glukozu, utvrđeno je da rekombinantni CP4 soj potpuno metabolizira oba šećera nakon 30 sati, pri čemu najprije potroši glukozu. Godine 1996., nedugo nakon razvoja rekombinantnog CP4 soja koji asimilira ksilozu, konstruiran je drugi soj koji je mogao koristiti arabinozu (Deanda i sur., 1996).

Godine 1997., Nacional Renewal Energy Laboratory (NREL) je proveo istraživanje kojim je utvrdio da bakterija *Z. mobilis* ima najveći potencijal za genetske manipulacije kojima je cilj proizvodnja bioetanola, posebno iz lignoceluloznog materijala kao što je poljoprivredni otpad (Lawford i Rousseau, 1997). NREL-ovom prvom generacijom *Zymomonas* sojeva postignuta je fermentacija raznih supstrata, ali je problem bila genetska nestabilnost u podlogama koje nisu sadržavale pentoze kao primarni izvor ugljika (Lawford i

Rousseau, 2002). Zbog ograničenja korištenja u velikom mjerilu, antibiotici se ne mogu koristiti za postizanje genetske stabilnosti. Međutim, sojevi druge generacije postižu znatno veću genetsku stabilnost i veću sposobnost korištenja supstrata. Tako je soj AX101 bio sposoban istovremeno učinkovito fermentirati glukozu, ksilozu i arabinozu, uz prinos od oko 84 % (Mohagheghi i sur., 2002). Važno je da se ubačeni geni, kao u ovom slučaju, integriraju u genom, za razliku od postojećih na plazmidu, čime se dobiva daleko stabilniji soj, uz postizanje istog prinosa etanola.

Lawford i Rousseau (1997) izvijestili su o proizvodnji etanola pomoću roda *Zymomonas* koristeći kukuruznu močevinu kao ekonomičan medij. Pokazalo se da je optimalno dodati 1 % (v/v) te kukuruzne močevine pri čemu je koeficijent konverzije šećera u etanol iznosio 98 %, a uspješnost izdvajanja 100 %. Imobilizacijom bakterije *Z. mobilis* postignute su visoka produktivnost i pretvorba u usporedbi sa slobodnim stanicama (Davison i Scott 1988), te je pri temperaturi 30 °C i pH 5 prinos etanola iznosio 97 % u odnosu na teorijski. Rebroš i sur. (2009) istraživali su proizvodnju etanola iz škrobnog hidrolizata pomoću *Z. mobilis* i glukoamilaze imobilizirane u u hidrogelu polivinilnog alkohola. U odnosu na primjenu slobodnog mikroorganizma i slobodnog enzima, produktivnost etanola je primjenom imobilizacije povećana 2,1 puta (Binod i sur., 2013).

Zymomonas mobilis je Gram-negativna bakterija koja je privukla pozornost razvojem tehnologije proizvodnje etanola (Weber i sur., 2010). Ima homoetanolni fermetacijski put te tolerira do 120 g/L etanola. Produktivnost etanola je 2,5 puta veća u odnosu na vrste iz roda *Saccharomyces* te prinos etanola iznosi približno 97 % u odnosu na teorijski maksimum pri optimalnoj temperaturi od 30 °C. Visoki prinos etanola i visoka produktivnost rezultat su jedinstvene fiziologije. *Z. mobilis* metabolizira glukozu koristeći Entner-Doudoroff put pri čemu nastaje manje ATP-a nego u glikolizi. Također, bakterija *Z. mobilis* proizvodi manje biomase nego npr. kvasci te se više ugljika ugrađuje u proizvode fermentacije (Weber i sur., 2010).

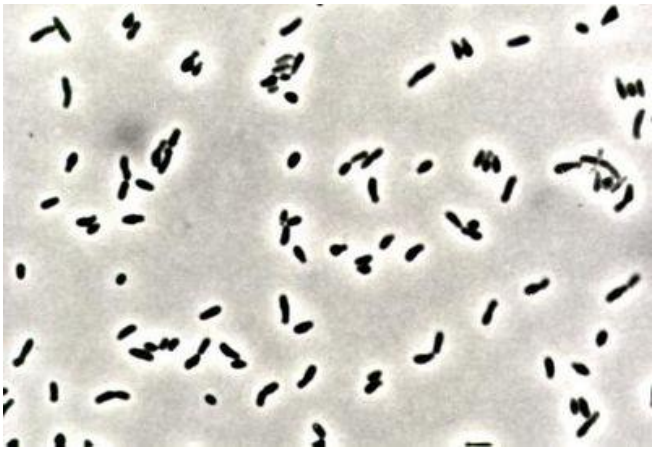
Unatoč tim prednostima, bakterija *Z. mobilis* nije dobro prilagođena za konverziju biomase pošto može fermentirati samo glukozu, fruktozu i saharozu. Razlog tomu je nedostatak pojedinih enzima iz glikolize i puta pentoza fosfata koji su neophodni za fermentaciju ostalih šećera poput ksiloze i arabinoze. Kako bi se proširio ograničeni raspon podloge, u ovu bakteriju su uneseni različiti katabolički geni. Uvođenje i ekspresija heterologne ksiloza izomeraze, ksilulokinaze, transaldolaze i transketolaze dovelo je do funkcionalnog metaboličkog puta u kojemu se ksiloza konvertira u središnje intermedijere Entner-Douderoff-ovog puta gdje se ksiloza fermentira u etanol (Zhang i sur., 1995).

Uvođenjem i ekspresijom heterologne arabinoza izomeraze, ribulokinaze, ribuloza-5-fosfat-4-epimeraze, transaldolaze i transketolaze omogućeno je bakteriji *Z. mobilis* da asimilira arabinozu (Deanda i sur., 1996). Postoji određeni redoslijed potrošnje šećera, pa najbrže fermentira glukozu, zatim ksilozu i potom arabinozu. Značajan problem koji se javlja u oplemenjenim sojevima koji koriste pentoze je niska tolerancija prema octenoj kiselini koja se često nalazi u hidrolizatima biomase (Mohagheghi i sur., 2002). Uvođenjem bakterijskog gena za *β*-glukozidaze fuzioniranog za izlučivanje signalnog peptida za premještanje kroz citoplazmatsku membranu omogućeno je da soj *Z. mobilis* koristi celobiozu (Yanase i sur., 2005). Osim toga, istraženi su procesi fermentacije celuloze ili škroba u etanol pomoću bakterije *Z. mobilis* uz primjenu preko simultane saharifikacije i fermentacije (eng. simultaneous saccharification and fermentation). U oba slučaja izvori ugljika su fermentirani u etanol uz produktivnost od 1,5 g/Lh) za bagasu šećerne trske i 10 g/Lh za škrob u opisanim uvjetima (Rebroš i sur., 2009).

Nedavno je tvrtka DuPont Danisco Cellulosic Ethanol (DDCE) izgradila demonstracijsko postrojenje za proizvodnju celuloznog etanola primjenom genetički modificirane bakterije *Z. mobilis* uz godišnji kapacitet proizvodnje od 250.000 galona etanola i korištenje poljoprivrednih ostataka i energetskih usjeva, uključujući i kukuruzne oklaske i travu.

2.3.1.12. Bakterija *Corynebacterium glutamicum*

Bakterija *C. glutamicum* (Slika 20) je dobro poznata kao industrijski organizam za proizvodnju aminokiselina (Weber i sur., 2010). Ova Gram-pozitivna bakterija je modificirana s ciljem proizvodnje etanola, tako da je uveden gen za heterolognu piruvat-dekarboksilazu i alkohol-dehidrogenazu iz *Z. mobilis* pod kontrolom endogenog *ldhA* promotora, koji se inducira bez prisutnosti kisika. Iako ne raste u tim uvjetima, *C. glutamicum* je sada bio u stanju proizvesti etanol uz acetat, laktat i sukcinat kao nusproizvode. Pritom je konverzija glukoze u etanol i organske kiseline bila 79 %, od čega je etanol činio 20 %. Nakon delecije endogene laktat-dehidrogenaze i dodavanjem piruvata u hranjivu podlogu postignuta je produktivnost od 29,5 g etanola/L/h što odgovara koeficijentu konverzije glukoze u etanol od 53 % (Weber i sur., 2010). Zanimljiva je činjenica da je u uvjetima bez kisika *C. glutamicum* vrlo otporan na fenole i furane koji se obično nalaze u kiselinskim lignoceluloznim hidrolizatima (Sakai i sur., 2007; Weber i sur., 2010).



Slika 20. Izgled stanica bakterije *Corynebacterium glutamicum* (Anonymous 17, 2016).

Za razliku od bakterije *E. coli*, većina sojeva *C. glutamicum* ne koristi pentoze (Kawaguchi i sur., 2009). Uvođenjem gena iz bakterije *E. coli* koji omogućavaju korištenje arabinoze i ksiloze, *C. glutamicum* je mogao koristiti oba šećera u aerobnim i anaerobnim uvjetima (Kawaguchi i sur., 2006, 2008). Povećanom ekspresijom gena za transport arabinoze, potrošnja oba šećera može se povećati (Sasaki i sur., 2009). Zanimljivo je da prisutnost glukoze nije utjecala na potrošnju ksiloze i arabinoze, što predstavlja prednost u usporedbi s drugim bakterijama, npr. s bakterijom *E. coli*. Nedavno je konstruiran soj *C. glutamicum* koji koristi mješovite šećere (Sasaki i sur., 2009). U uvjetima bez kisika, u hranjivim podlogama koje sadrže minerale i mješavinu glukoze, ksiloze, arabinoze i celobioze ovaj soj istovremeno u potpunosti troši sve navedene šećere. Nedavno su Smith i sur. (2010) konstruirali soj *C. glutamicum* za proizvodnju izobutanola, koji nakon 96 h uzgoja daje prinos izobutanola od 4 g/L.

2.3.1.13. Termofilne bakterije

Glavni nedostatak u procesima kod kojih se hidroliza lignoceluloze provodi odvojeno od fermentacije (eng. separate hydrolysis and fermentation, SHF) je inhibicija produktom hidrolize (inhibicija celulaze glukozom) (Weber i sur., 2010). To se može zaobići korištenjem SSF-procesa. Jedan od glavnih izazova SSF-procesa su različite optimalne temperature za celulaze (> 50 °C) i fermentirajuće organizme (npr. < 35 °C za kvasce). Ako se termofilni organizam može koristiti za fermentaciju cijeli proces može se odvijati pri višim

temperaturama. To može smanjiti troškove proizvodnje (npr. nepotrebno hlađenje hidrolizata) i inhibicija produktom (npr. glukoza se istovremeno troši). Postoji nekoliko zanimljivih termofilnih organizama koji spadaju u rodove *Clostridium*, *Thermoanaerobacter* ili *Thermoanaerobacterium*, koji mogu proizvesti etanol iz šećera koji potječu iz biomase (Lynd i sur., 2005; Weber i sur., 2010).

Lacis i Lawford (1991) istraživali su mogućnost korištenja bakterije *Thermoanaerobacter ethanolicus* za proizvodnju etanola iz glukoze ili ksiloze. Zapaženo je da prinos etanola ovisi o vremenu uzgoja i brzini rasta. Najveći prinos etanola (0,42 g/g) postignut je pri malim brzinama rasta. Istraživana je proizvodnja etanola pomoću termofilne bakterije *Thermoanaerobacter* BG1L1 u kontinuiranom reaktoru primjenom prethodno obrađene pšenične slame. Fermentacija je provedena anaerobno pri 70 °C u reaktoru s fluidiziranim slojem (eng. fluidized bed reactor). Prinos etanola bez prethodne detoksikacije hidrolizata iznosio je 0,39 - 0,42 g/g (Binod i sur., 2013).

U 2008. godini, Lynd i suradnici su modificirali *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, termofilnu anaerobnu bakteriju koja može koristiti ksilan i monomerne šećere za proizvodnju etanola. Delecijom gena koji sudjeluje u proizvodnji organskih kiselina dobiven je soj koji proizvodi 37 g etanola/L u šaržnom uzgoju s pritokom supstrata i 33 g/L u kontinuiranom uzgoju te istovremeno troši ksilozu i glukozu (Shaw i sur., 2008). Ostali kandidati poput *Geobacillus thermoglucosidasius* (Weber i sur., 2010) trenutno se istražuju i stalno se otkrivaju nove termofilne bakterije koje pokazuju zanimljiva svojstva kao što su široki spektar korištenja supstrata te istodobna proizvodnja etanola i vodika (npr. Koskinen i sur., 2008).

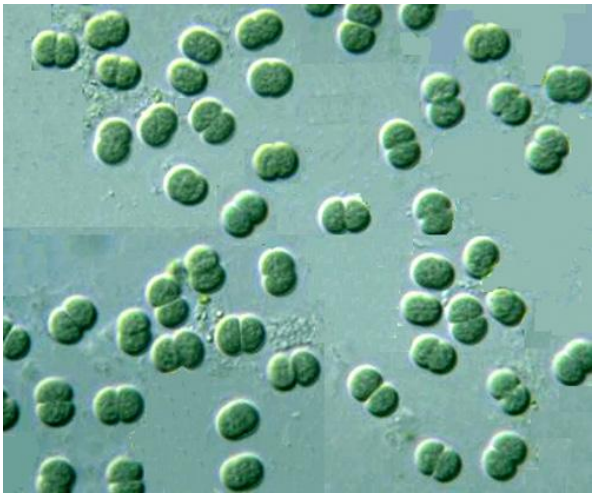
Osim višeg temperaturnog optimuma u odnosu na mezofilne organizame poput kvasaca, dodatna prednost termofilnih bakterija je njihova metabolička raznolikost koja omogućava razgradnju velikog broja ugljikohidrata dobivenih iz lignocelulozih sirovina (Weber i sur., 2010). Budući da neke od termofilnih vrsta, poput *Clostridium thermocellum, Thermomonospora* sp. N-35 i *Anaerocellum thermophilum,* pokazuju celulolitičku aktivnost, uzeti su u obzir za integrirane bioprocese (eng. consolidated bioprocessing, CBP) (Lynd i sur., 2002). Korištenjem modificiranih sojeva u SSF eksperimentima pri 50 °C, moguće je smanjiti količinu korištene celulaze za 2,5 puta u usporedbi sa *Saccharomyces cerevisiae* pri 37 °C (Shaw i sur., 2008). U dosadašnjim istraživanjima pokazalo se da su brzine proizvodnje termofilnih bakterija daleko manje u odnosu na dosad korištene fermentirajuće organizme poput kvasca *S. cerevisiae* ili bakterije *Z. mobilis*. Uz malu brzinu konverzije glukoze, značajno ograničenje većine termofilnih organizama je njihova niska tolerancija prema

etanolu, a to je obično oko 2 % (v/v). Primjenom klasičnih metoda poboljšanja sojeva može se povećati tolerancija ovih sojeva prema etanolu (npr. Mikkelsen i sur., 2007), ali dobiveni rezultati su još uvijek daleko od sadašnjih industrijskih zahtjeva.

2.3.1.14. Cijanobakterije

Nekoliko je stvari karakteristično za fermentaciju lignocelulozne biomase. Prvo, energija sunca koristi se u biljnim stanicama pri čemu fotosintezom nastaju šećeri ili čak složeniji polimeri kao što su škrob ili lignocelulozni polimeri. Zatim se ti spojevi prikupljaju, podvrgavaju predobradi, hidroliziraju i na kraju fermentiraju u alkohol pomoću mikroorganizmima. Bilo bi vrlo korisno kombinirati te odvojene fototrofne i kemotrofne načine rada metabolizma u neku vrstu "fotofermentativnog" metabolizma u istom organizmu (Hellingwerf i Teixeira de Mattos, 2009; Weber i sur., 2010). To znači da se solarna energija ne bi koristila za izgradnju stanične biomase i rezervnih ugljikohidrata, nego bi je fotosintetski (mikro)-organizmi izravno koristili za proizvodnju bio-alkohola iz H_2O i CO_2

Mnoge mikroalge imaju metaboličke putove za proizvodnju etanola, a u nekima od njih proizvodnja etanola u fototoautotrofnom metabolizmu nije dokazana (Radakovits i sur., 2010). S druge strane, cijanobakterija *Synechocystis* sp. (Slika 21) čini se vrlo pogodnom za foto-fermentativnu proizvodnju alkohola, relativno brzo raste i nema posebnih nutritivnih zahtjeva. Također, ekspresijom bakterijske piruvat-dekarboksilaze i alkohol-dehidrogenaze u cijanobakterijama *Synechococcus* sp. PCC 7942, dobiveni rekombinantni mikroorganizam proizveo je do 230 mg/L etanola izravno iz CO_2 tijekom uzgoja koji je trajao 4 tjedna (Deng i Coleman, 1999; Weber i sur., 2010). Štoviše, metabolička mreža modelnog genoma *Synechocystis* sp. PCC 6803 korištena je za poboljšanje proizvodnje etanola pomoću cijanobakterija do 690 mg/L u 1 tjednu (Fu, 2009). Još su intrigantniji rezultati postignuti ekspresijom metaboličkog puta izobutanolne fermentacije u *Synechococcus elongates* PCC 7942, zajedno sa prekomjernom ekspresijom ribuloza-1,5-bifosfosfat-karboksilaze koja limitira brzinu fiksacije CO_2 rezultirala je foto-fermentativnom bakterijom koja proizvodi i do 450 mg/L izobutanola u 6 dana s maksimalnom produktivnošću od oko 3 mg/Lh (Weber i sur., 2010).



Slika 21. Izgled stanica cijanobakterije *Synechocystis* sp. (Anonymous 18, 2016).

Međutim, konačne koncentracije alkohola su daleko ispod vrijednosti izračunate za ekonomski i energetski učinkovite postupke destilacije koji se rutinski koriste za izdvajanje proizvoda i iznose minimalno oko 40 - 50 g/L za etanol. Stoga neki autori smatraju izobutiraldehid perspektivnijim fermentacijskim proizvodom (Weber i sur., 2010). Njegov visoki tlak pare omogućava „in situ“ izdvajanje proizvoda, a kontinuirana evaporacija izobutiraldehida smanjuje toksičnost za stanice i produžuju fazu proizvodnje. Izobutiraldehid je prekursor za sintezu izobutanola i drugih kemikalija u koje se može lako prevesti biološkim ili kemijskim putem. Zanimljivo je da je ekspresijom izobutanol-fermentacijskog puta u *Synechocystis elongates* PCC 7942 bez alkohol-dehidrogenaze proizvedeno je 1,1 g/L izobutiraldehida tijekom 8 dana uz brzinu proizvodnje od oko 6 mg/Lh. Iako se čini da je volumetrijska produktivnost fotofermentativnih rekombinantnih organizama vrlo niska u usporedbi s tradicionalnim mikrobnim fermentacijama, produktivnost izražena u litri biogoriva proizvedenog po jedinici površine (hektar) godišnje je značajno veća (Weber i sur., 2010). Ipak, kao i kod proizvodnje biodizela iz algi mnogi tehnički problemi prilikom proizvodnje u velikom mjerilu i visoki kapitalni troškovi ostat će teška prepreka za komercijalizaciju.

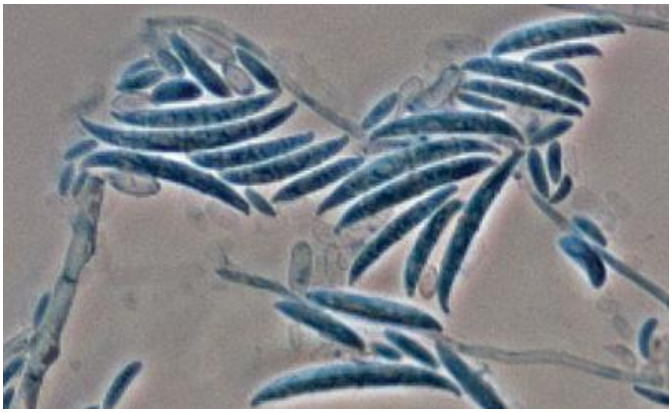
2.3.1.15. Druge etanologene bakterije

Istraživan je potencijal raznih drugih bakterija za proizvodnju biogoriva (Weber i sur., 2010). Pritom sve istraživane bakterije pokazuju različita svojstva koja bi mogla biti od koristi za proces fermentacije. *Klebsiella oxytoca* je Gram-negativna bakterija koja je genetski slična bakteriji *E. coli* i može koristiti sve monomerne šećere te celobiozu i celotriozu (Wood i Ingram, 1992; Weber i sur., 2010). Integracijom PET-operona iz *Z. mobilis* omogućeno je da ova bakterija proizvodi etanol iz različitih supstrata (Wood i Ingram, 1992; Weber i sur., 2010). Međutim, u usporedbi s *E. coli, K. oxytoca* je manje učinkovita za proizvodnju etanola, a uzrok bi mogla biti niska tolerancija prema etanolu. PET-operon je također uspješno eksprimiran u sojevima bakterije *Erwinia chrysanthemi* koji izvorno imaju sposobnost izlučivanja endoglukanaze, eksprimirajući fosfotransferazne sustave za korištenje celobioze i celotrioze i izlučivanje pektat liaze i drugih enzima koji depolimeriziraju ugljikohidrate stanične stijenke (Weber i sur., 2010).

Bi i sur. (2009) izolirali su *Enterobacter asburiae* JDR-1 iz koloniziranog drva. Ova bakterija fermentira metilglukuronoksilozu i ksilozu. Uvođenje PET-operona dovelo do homoetanolne fermentacije u kojoj kao sekundarni produkt nastaje acetat. Dodatnom delecijom piruvat-formijat-liaze dobiven je soj koji proizvodi etanol iz hidrolizata ksilana uz prinos koji iznosi 99 % od teorijskog i brzinu od 0,11 g etanola/g/h (Bi i sur. 2009) (Weber i sur., 2010).

2.3.1.16. *Fusarium* sp.

Proizvodnja etanola iz hidrolizata drva pomoću sojeva *Fusarium oxysporum* D-140 i NCIM-1072 (Slika 22) (Binod i sur., 2013) pri pH-vrijednosti 5,5 i temperaturi 30 ºC 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.



Slika 22. Izgled spora plijesni *Fusarium oxysporum* (Anonymous 19, 2016).

Pivski trop (eng. spent brewer's grain) je atraktivna jeftina sirovina za proizvodnju bioetanola. Xiros i Christakopoulos (2009) procijenili su submerznu proizvodnju bioetanola 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 bioetanola od 109 g kg^{-1} 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*.

Panagiotou i sur. (2005) su istražili simultanu hidrolizu i fermentaciju (SSF) celuloze pomoću *F. oxysporum*. Ustanovljeno je da *F. oxysporum* raste maksimalnom specifičnom brzinom rasta od 0,023 h^{-1} na celulozi pri aerobnim uvjetima, te da pri tim uvjetima može proizvesti etanol uz volumetrijsku produktivnost od 0,044 g/Lh. 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.

2.3.1.17. *Aspergillus* sp.

Istraživana je celulolitička plijesan *Aspergillus terreus* (Slika 23) koja može fermentirati glukozu, druge heksoze, pentozu i disaharide u etanol (Binod i sur., 2013). Od različitih testiranih izvora ugljika, glukoza maksimalno doprinosi proizvodnji etanola (2,46 % w/v). Količina proizvedenog etanola i teorijski prinosi proizvodnje etanola pomoću plijesni *A. terreus* iz glukoze i celobioze su usporedivi ili veći u odnosu na druge fungalne vrste.

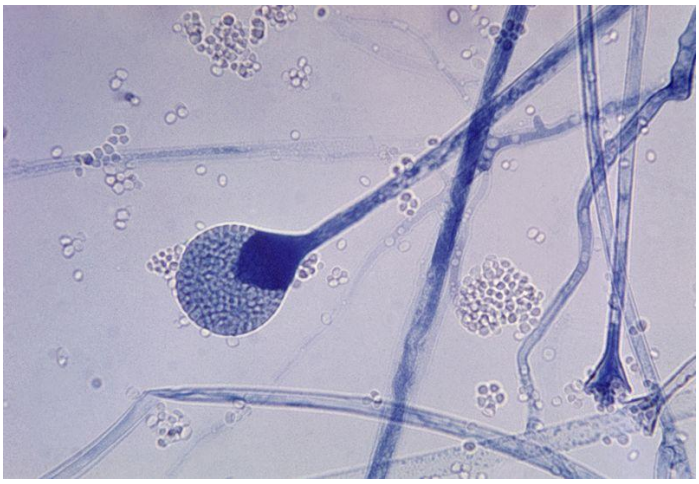


Slika 23. Izgled spora plijesni *Aspergillus terreus* (Anonymous 20, 2016).

2.3.1.18. *Mucor* sp.

Sues i sur. (2005) identificirali su *Mucor indicus* kao potencijalni soj za proizvodnju etanola koji može rasti aerobno i anaerobno na različitim pentozama i heksozama, dajući pritom isti prinos i produktivnost koji se dobivaju i sa *S. cerevisiae*.

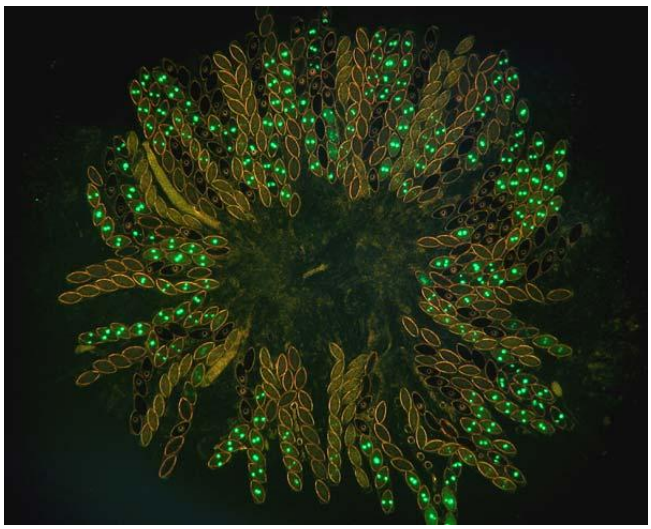
Odabran je ekonomičan medij za proizvodnju etanola tako da su kvaščev ekstrakt u mediju za fermentaciju zamijenili ekstraktom plijesni *M. indicus* (Binod i sur., 2013). Prinos etanola iznosio je 0,46 g/g , a produktivnost 0,69 g/Lh. Proizvodnja etanola bila je veća pri aerobnom rastu na glukozi bez limitacije kisikom. Izgled spora plijesni *Mucor* sp. prikazan je na slici 24.



Slika 24. Izgled spora plijesni *Mucor* sp. (Anonymous 21, 2016).

2.3.1.19. *Neurospora* sp.

Dogaris i suradnici (2012) izvijestili su o proizvodnji bioetanola pomoću *Neurospora crassa* (Slika 25) 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.



Slika 25. Izgled spora plijesni *Neurospora crassa* (Anonymous 22, 2016).

2.3.2. Mikroorganizmi za dobivanje ostalih proizvoda iz lignoceluloznih hidrolizata

Također je važno uzeti u obzir druge industrijske produkte mikrobnih fermentacija iz pentoza i heksoza. Tablica 3 uključuje 12 produkata koji imaju velik industrijski značaj i važni su u kemijskoj industriji i industriji goriva. Budući da nije moguće sastaviti popis koji uključuje sve sadašnje ili potencijalne proizvode fermentacije pentoza i heksoza, iz Tablice 3 su izostavljene neke skupine proizvoda mikrobne fermentacije, kao npr. antibiotici, enzimi, sladila, itd. Navedeni popis sadrži niz spojeva koji se trenutno proizvode u velikim količinama ili imaju utjecaj na određena značajna tržišta (Werpy i sur., 2004; Gavrilescu i Chisti, 2005; Dufour i sur., 2011).

U poglavljima koja slijeda bit će navedeno nešto detalja o proizvodnji 1-butanola pomoću bakterija roda *Clostridium* te o uzgoju oleaginoznih mikroorganizama.

Tablica 3. Primjeri ostalih relevantnih proizvoda koji se mogu dobiti fermentacijom pentoza i heksoza (uz produkte fermentacije prikazana su i područja njihove primjene te radni mikroorganizmi) (Dufour i sur., 2011).

Proizvod	**Upotreba**	**Organizam**	**Godišnja proizvodnja (Gavrilescu i Chisti 2005) (tone)**
Etanol	Gorivo, otapalo	*Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Escherichia coli*	26.000.000,00
L-glutaminska kiselina Poli- (glutaminska kiselina)	Poboljšivač okusa, dodaci prehrani, farmaceutika, kozmetika, umjetna gnojiva, uguščivači, krioprotektori, sredstva za održavanje vlažnosti, kapsule za lijekove, adhezivna sredstva, apsorpcija teških metala	*Corynebacterium glutamicum* *Bacillus subtilis* *Bacillus Licheniformis*	1.000.0000,00
Limunska kiselina	Aditivi u hrani, farmaceutika, aditivi u detergentima, kozmetika	*Aspergillus niger*	1.000.000,00
Mliječna kiselina Poli- (mliječna kiselina)	Aditivi u hrani, konzervansi, petrokemijski intermedijeri plastičnih polimera, antioksidansi, kozmetika, lijekovi	*Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus helveticus, Lactobacillus casei*	250.000,00
Vitamin C	Antioksidans, aditiv u hrani, kozmetika, lijekovi	*Gluconobacter spp., Erwinia herbicola*	80.000,00
Glukonska kiselina	Građevinska industrija, sredstvo za čišćenje, farmaceutika, prehrambeni aditiv	*Aspergillus niger*	50.000,00
Ksantan	Prehrambeni aditiv, zgušnjivači, lubrikanti, farmaceutika	*Xanthomonas campestris*	30.000,00
Jantarna kiselina	Prehrambeni aditiv, farmaceutika, površinski aktivne tvari, detergenti, otapala, biorazgradiva plastika, petrokemijski intermedijeri	*Actinobacillus succinogenes*	-

Tablica 3. (nastavak)

Proizvod	**Upotreba**	**Organizam**	**Godišnja proizvodnja (Gavrilescu i Chisti 2005) (tone)**
Itakonska kiselina	Zamjena za petrokemijski intermedijere, plastični materijali, adhezivna sredstva, elastomeri, detergenti, farmaceutika, poljoprivreda	*Aspergillus terrus, Aspergillus itaconicus*	-
Poli- hidroksialkanoati (PHAs)	Plastični materijali, elastomeri, gume, terapijski sustavi	*Ralstonia eutropha*	-
2,3- butandiol	Zamjena za petrokemijske sirovine, izvor goriva	*Klebsiella oxytoca*	-
Butanol	Izvor goriva, otapalo	*Clostridium beijerinkii; Clostridium acetobutylicum*	-

2.3.2.1. Proizvodnja 1-butanola pomoću bakterija roda *Clostridium*

Ostale vrste iz roda *Clostridia*, posebno *Clostridium acetobutylicum* (Slika 26) su zanimljive jer proizvode aceton, butanol i etanol u omjeru 3:6:1 u procesu poznatom pod nazivom ABE-fermentacija (Jones i Woods 1986; Weber i sur., 2010).



Slika 26. Izgled stanica bakterije *Clostridium acetobutylicum* (Anoymous 23, 2016).

Tipične ABE-fermentacije imaju prvo acidogenu fazu koju karakterizira proizvodnja acetata i butirata, koji se konvertiraju u odgovarajuća otapala u solventogenoj fazi (faza nastajanja otapala) (Maddox i sur., 2000). U prošlosti su istraživanja bila usmjerena ka poboljšanju produktivnosti odgovarajućih otapala. Kao primjer dobrih rezultata takvih istraživanja Nair i sur. (1999) i Harris i sur. (2001) su naveli genetičku modifikaciju koja je omogućila proizvodnju 8,2 g/L acetona, 2,2 g/L etanola i 17,6 g/L butanola, što je iznosilo 66 %, 194 % odnosno 51 % više nego primjenom divljeg tipa bakterije. Mnoge strategije usredotočene su na poboljšanje selektivne proizvodnje butanola.. Međutim, prekomjerna ekspresija enzima uključenih u proizvodnju butanola nije poboljšala selektivnu proizvodnju butanola. Tummala i suradnici (2003) primijenili su drugačiji princip modifikacije čime je omjer butanola i acetona povećan više nego dva puta, iako je titar butanola neznatno smanjen na približno 9,8 g/L u usporedbi s divljim tipom uz 10,2 g/L (Weber i sur., 2010).

Pored navedenih, provedena su i brojna druga istraživanja klostridija koji proizvode otapala kako bi se bolje razumjeli regulacija proizvodnje metabolita, tolerancija na metabolite, tolerancija na stres i korištenje ugljikohidrata (Lee i sur., 2008; Ezeji i sur., 2010; Weber i sur., 2010). Međutim, pozitivni pomaci su u osnovi otežani zbog nedostatka učinkovitih genetičkih alata, no razvoj univerzalne metode inaktivacije gena doveo je do poboljšanja ove skupine mikroorganizama metodama metaboličkog inženjerstva (Heap i sur., 2007; Weber i sur., 2010).

Ipak rod *Clostridia* ima nekoliko nedostataka u industrijskim proizvodnim procesima koji su do danas samo djelomično riješeni i teško se prevladavaju metodama metaboličkog inženjerstva. Npr., klostridiji su strogo anaerobni i sporo rastu. Vrlo se brzo degeneriraju i gube sposobnost proizvodnje otapala, a osim toga mnoge vrste su osjetljive na infekcije bakteriofagima (Kashket i Cao 1993; Jones i sur., 2000). Također, bakterije su vrlo osjetljive na butanol (Hermann i sur., 1985; Lee i sur., 2005). Iako je u nekoliko slučajeva već poboljšana rezistencija na otapala (Ezeji i sur., 2010), čini se da će biti potrebno postići kontinuirano izdvajanje proizvoda tijekom fermentacije što je obično vrlo skupo. Stoga je naglasak i na tome da se metabolički put za proizvodnju butanola kakav posjeduju kostridiji uvede u druge mikroorganizme poput kvasca i *E. coli* (Atsumi i sur., 2008;. Inui i sur., 2008; Steen i sur., 2008; Weber i sur., 2010).

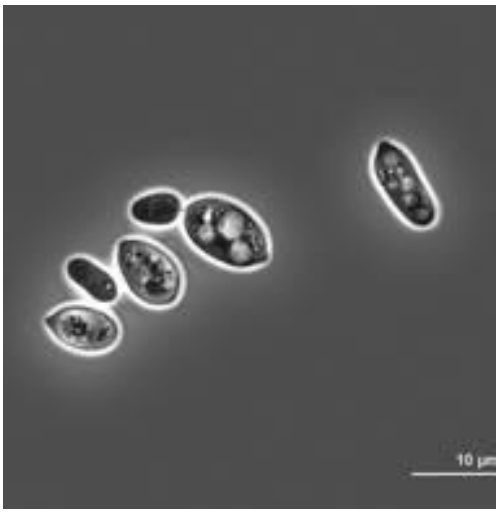
2.3.2.2. Uzgoj oleaginoznih mikroorganizama

Pored navedenih primjera primjene lignoceluloze u biotehnološkoj proizvodnji različitih proizvoda, nešto opširnije će u nastavku teksta biti prikazan primjer uzgoja oleaginoznih mikroorganizama. Oleaginozni mikroorganizmi nakupljaju lipide unutar stanice u obliku neutralnih triacilglicerola, a možemo ih naći među kvascima, mikroalgama, bakterijama i plijesnima (Meng i sur., 2009). Neki rodovi kvasaca, poput *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula* sp. i *Lipomyces* sp. mogu akumulirati unutarstaničnih lipida i do 70 % suhe tvari biomase (Meng i sur., 2009). Vrlo je učinkovit oleaginozni kvasac *Trichosporon oleaginosus* (Slika 27).

Lipidi oleaginoznih organizama su privlačne sirovina za proizvodnju obnovljivih goriva. Dvije najzastupljenije vrste biogoriva proizvedenih iz lipida su biodizel i obnovljivi dizel. U oleaginoznim mikroorganizmima lipidi su prisutni uglavnom u obliku triacilglicerola (eng. triacylglycerols, TAGs), a neki i u obliku slobodnih masnih kiselina (eng. free fatty acids, FAs). Oleaginoznim mikroorganizmima smatraju se oni koji mogu akumulirati lipide u količini preko 20% suhe tvari stanice, prvenstveno kao TAG i FA (Jin i sur., 2015) Udjeli lipida u suhoj tvari biomase nekih mikroorganizama i sastav ovih lipida prikazani su u Tablicama 4 i 5.

Jin i sur. (2015) objavili su pregledni rad o proizvodnji lipida iz lignoceluloze u biorafinerijama. U ovom radu navode niz oleaginoznih mikrobnih vrsta koje rastu na lignocelulozi uz odgovarajuću predobradu sirovine: *Cryptococcus curvatus, Rhodotorula glutinis, Lipomyces starkeyi, Rhodosporidium toruloides, Trichosporon coremiiforme,*

Trichosporon fermentans, Neurospora crassa, Cryptococcus curvatus, Trichosporon dermatis, Rhodococcus opacus, Mucor circinelloides, Chlorella pyrenoidosa.



Slika 27. Izgled stanica kvasca *Trichosporon oleaginosus* (Anonymous 24, 2016).

Tablica 4. Udjeli lipida u suhoj tvari biomase različitih mikroorganizama (Meng i sur., 2009).

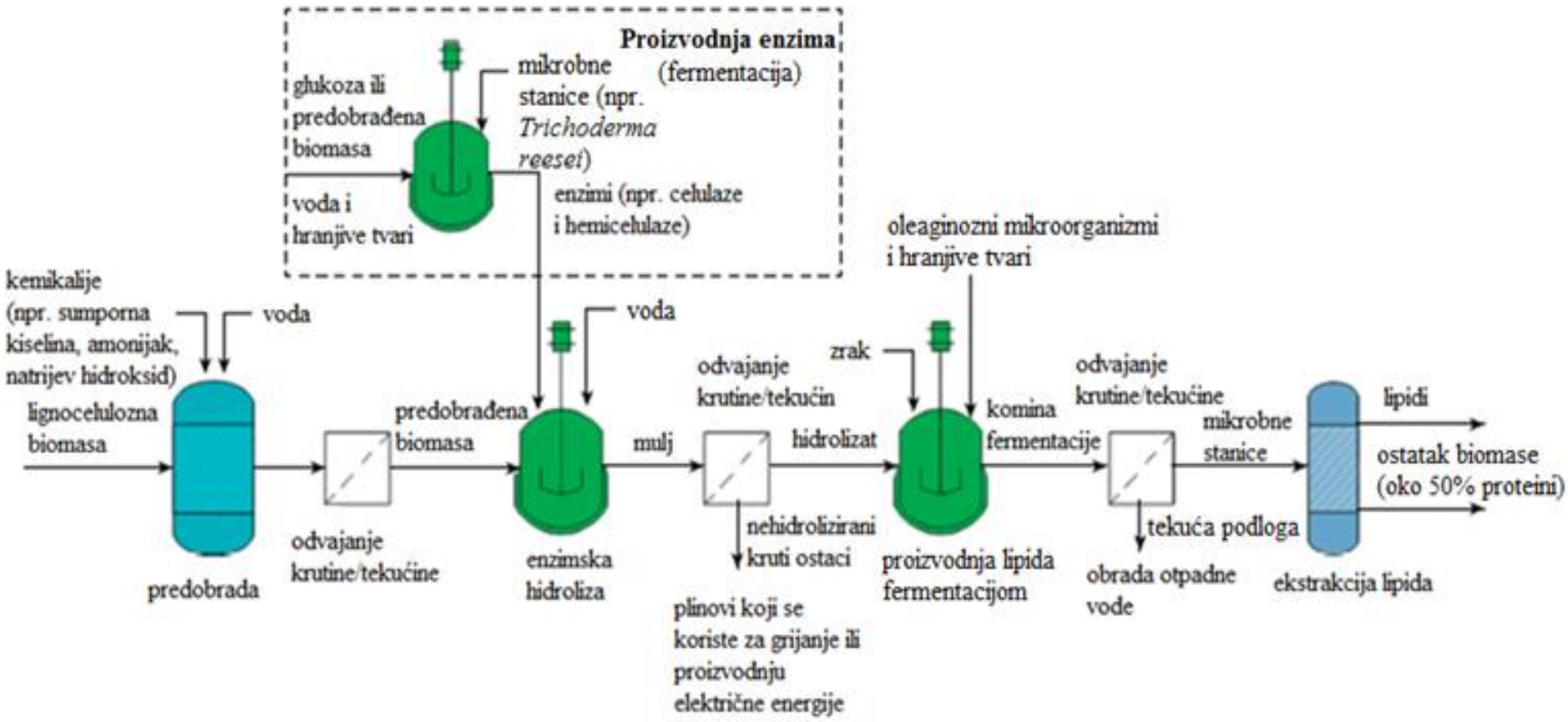
Mikroorganizmi		**Maseni udio lipida [% s.tv.]**
Mikroalge	*Botryococcus braunii*	25 – 75
	Cylindrotheca sp.	16 – 37
	Nitzschia sp.	45 – 47
	Schizochytrium sp.	50 – 77
Bakterije	*Arthrobacter sp.*	> 40
	Acinetobacter calcoaceticus	27 – 38
	Rhodococcus opacus	24 – 24
	Bacillus alcalophilus	18 – 24
Kvasci	*Candida curvata*	58
	Cryptococcus albidus	65
	Lipomyces starkeyi	64
	Rhodotorula glutinis	72
Plijesni	*Aspergillus oryzae*	57
	Mortierella isabellina	86
	Humicola lanuginosa	75
	Mortierella vinacea	66

Tablica 5. Sastav lipida (maseni udjeli pojedinih masnih kiselina u lipidima) nekih mikroorganizama (Meng i sur., 2009).

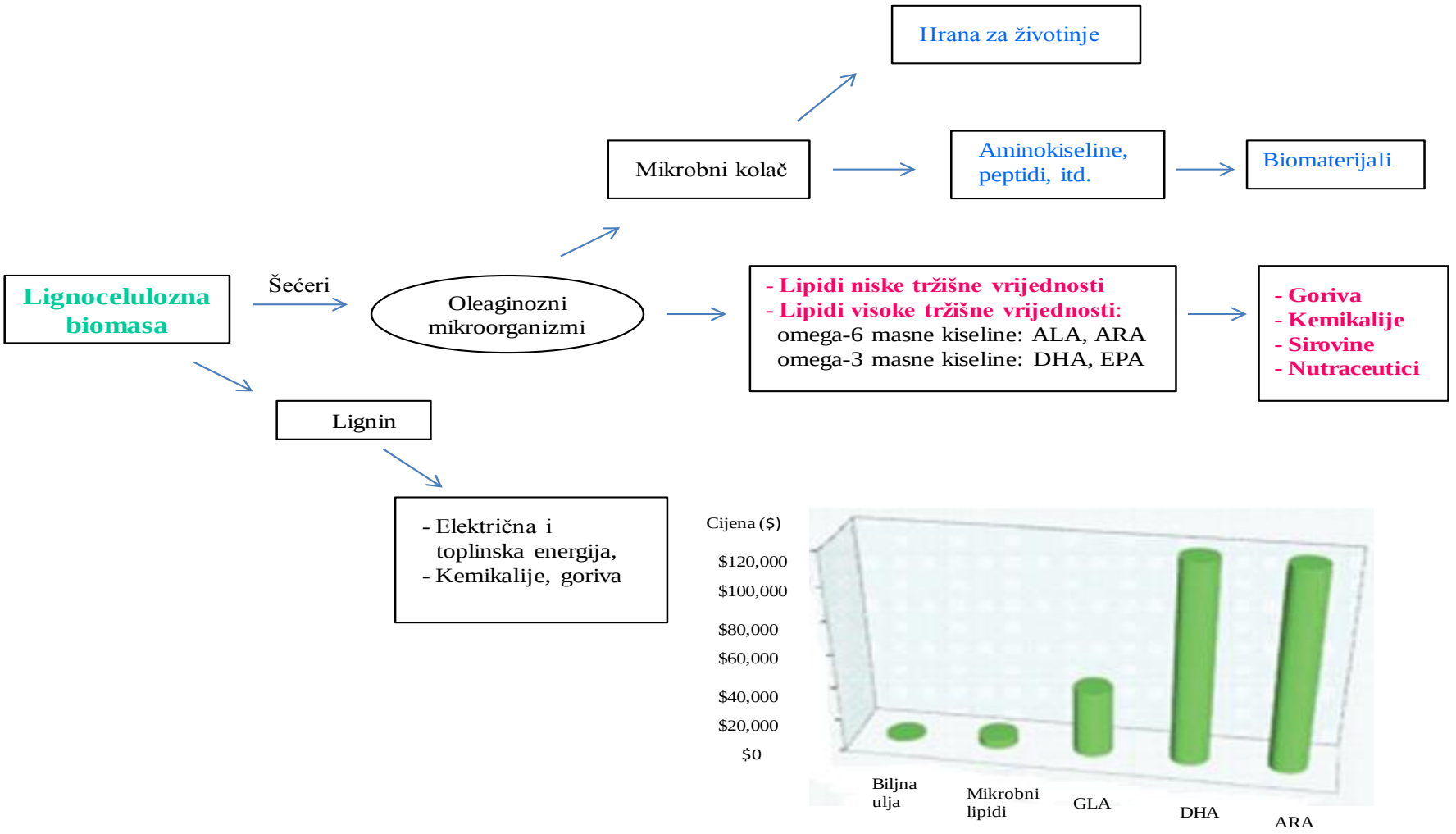
Mikroorganizmi	**Sastav lipida (maseni udio u ukupnim lipidima) [%]**					
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Mikroalge	12 - 21	55 – 57	1 – 2	58 - 60	4 - 20	14 – 30
Kvasci	11 - 37	1 – 6	1 – 10	28 - 66	3 - 24	1 – 3
Plijesni	7 - 23	1 – 6	2 – 6	19 - 81	8 - 40	4 – 42
Bakterije	8 - 10	10 – 11	11 – 12	25 - 28	14 - 17	-

Budući da su među šećerima dobivenim iz lignoceluloze uglavnom glukoza i ksiloza, preferiraju se oleaginozni sojevi koji troše ova dva šećera (Jin i sur., 2015). Također je poželjna sposobnost potrošnje manje zastupljenih šećera poput arabinoze, manoze ili galaktoze. Postoje dvije opcije enzimske hidrolize - odvojena hidroliza i fermentacija (eng. separate hydrolysis and fermentation, SHF) (Slika 28) i simultana saharifikacija i fermentacija (eng. simultaneous saccharification and fermentation, SSF). Prilikom provođenja simultane saharifikacije i fermentacije jednostavni šećeri oslobođeni enzimskom hidrolizom se odmah troše, čime se sprečava inhibicija enzima šećerom i povećava se prinos enzimske hidrolize. Također se smanjuju rizik kontaminacije i troškovi proizvodnje lipida. Proizvodnja enzima se može integrirati u proces koji onda nazivamo konsolidiranim bioprocesom (eng. consolidated bioprocessing, CBP) u kojem su troškovi proizvodnje smanjeni na minimum. Lipidi se iz lignoceluloze proizvode uglavnom submerzno. Izvedivi su i procesi fermentacije na čvrstim supstratima (eng. solid-state fermentation, SSF), ali oni imaju brojne nedostatke kao što su prijenos topline i tvari, problemi prilikom prijenosa u veće mjerilo te izdvajanja stanica i lipida (Jin i sur., 2015).

Nakon izdvajanja lipida, kao nusproizvodi nakon uzgoja oleaginoznih mikroorganizama na lignocelulozi dobivaju se lignin i ostatak biomase. Njihovo je racionalno korištenje važno kako bi se pokrili visoki troškovi proizvodnje biogoriva (Slika 29) (Jin i sur., 2015).



Slika 28. Biotehnološka proizvodnja mikrobnih lipida iz lignoceluloze (Jin i sur., 2015).



Slika 29. Nusproizvodi koji se mogu dobiti u nakon proizvodnje mikrobnih lipida iz lignoceluloze (Jin i sur., 2015).

Neke vrste oleaginoznih kvasaca mogu se uzgajati na hidrolizatima lignoceluloznih materijala kao što su drvo, trava, energetski usjevi, šumski otpad, poljoprivredni ostaci, otpad od prerade hrane i komunalni otpad. Važno je selekcionirati kvasce kompatibilne sa sastavom lignoceluloznih hidrolizata kako bi se postigla pretvorba ugljikohidrata u lipide koji se koriste za proizvodnju biogoriva i drugih kemikalija. Sitepu i sur. (2014) su smatrali da bi neki od rjeđe istraživanih oleaginoznih vrsta kvasca mogli naći industrijsku primjenu pa su istražili veći broj kvasaca (ukupno 48 sojeva oleaginoznih kvasaca koji pripadaju u 45 vrsta), a kriteriji su bili sposobnost iskorištavanja izvora ugljika prisutnih u lignoceluloznim hidrolizatima, tolerancija prema inhibitorima i rast u mediju koji nije obogaćen vitaminima. Cilj je bio pronaći robustnije sojeva kvasca, što znači ove koji mogu koristiti širi spektar ugljikohidrata, odnosno imaju veću toleranciju na inhibitore koji se mogu naći u određenim vrstama lignoceluloznih hidrolizata. Inhibitori koji su korišteni u ovom istraživanju bili su furfural i 5-hidroksmetilfurfural (HMF) koji nastaju razgradnjom pentoza i heksoza te octena kiselina koja nastaje razgradnjom hemiceluloze. Sposobnost rasta u podlozi koja nije obogaćena vitaminima vrednovana je kako bi se moglo smanjiti troškove proizvodnje. Rast kvasaca je u ovom radu samo vizualno procijenjen na temelju zamućenja tekuće podloge. Također je vizualno procijenjeno svojstvo flokulacije.

Zahvaljujući sposobnosti korištenja više izvora ugljika, među istraženim sojevima su se kao potencijalni kandidati za industrijsku upotrebu izdvojile neke istraživanije vrste oleaginoznih kvasaca, ali i neke koje su do sada manje istraživane, uključujući *Cryptococcus aureus, Cryptococcus laurentii, Hanaella* aff. *zeae, Tremella encephala* i *Trichosporon coremiiforme*. Ostale vrste, koje su se odlikovale većom tolerancijom na inhibitore, bile su *Candida* aff. *tropicalis, Cyberlindnera jadinii, Metschnikowia pulcherrima Schwanniomyces occidentalis* i *Wickerhamomyces ciferii*. Treba naglasiti da je navedeno istraživanje vrednovalo samo rast na odabranim izvorima ugljika i zato su potrebni dodatni eksperimenti kako bi se utvrdila učinkovitosti pretvorbe tih izvora ugljika u biomasu kvasca te udjeli i sastav proizvedenih staničnih lipida (Sitepu i sur., 2014).

Niti jedan od testiranih kvasca nije mogao koristiti sve izvore ugljika i tolerirati sve korištene inhibitore, što znači da sojeve kvasca treba odabrati na temelju kompatibilnosti njihovih karakteristika sa sastavom ciljanog hidrolizata. Ostali faktori koje treba uzeti u obzir su proizvodnja vrijednih nusproizvoda kao što su karotenoidi, dostupnost genetičkih alata za modifikaciju ovih mikroorganizama, kao i razina biološke sigurnosti i sposobnost flokulacije (Sitepu i sur., 2014).

Sitepu i sur. (2014) navode da pored svojstava istraženih u njihovom radu na odabir soja kvasca mogu utjecati i neki dodatni faktori. Npr., unatoč činjenici da kvasac *Yarrowia lipolytica* koristi relativno mali broj izvora ugljika i ima nisku toleranciju na furfural, ovaj kvasac je vrlo zahvalan za genetičke modifikacije i već se dugo koristi u industriji. Postoje oleaginozni kvasci, uključujući neke korištene u ovom istraživanju, koji spadaju u humane patogene, kao što su *Trichosporon coremiiforme* i *Candida tropicalis*, te prije industrijske primjene treba biti testirana njihova sigurnost. Nadalje, mnogi od kvasaca istraživanih u ovom istraživanju su ružičaste boje zbog proizvodnje karotenoidnih pigmenata koji se mogu ekstrahirati skupa s lipidima, što zahtijeva dodatni korak odvajanja, ali pruža i mogućnost dobivanja vrijednih nusproizvoda. Zbog svog antioksidacijskog djelovanja karotenoidi mogu stabilizirati triacilglicerole. Neki sojevi koji se koriste u ovom istraživanju pokazuju blagu do značajnu flokulaciju, što može olakšati izdvajanje stanica, ali bi moglo zakomplicirati miješanje i aeraciju.

Na temelju činjenica navedenih u teorijskom dijelu doneseni su slijedeći zaključci:

1. Lignocelulozni materijali su biljna biomasa koja uključuje ostatke iz drvne i prehrambene industrije, različite poljoprivredne ostatke te komunalni otpad. Nekada su poljoprivredni ostaci bili tretirani kao otpad i njihova vrijednost je bila niska, dok se u današnje vrijeme njihovom obradom dobivaju različiti proizvodi visoke vrijednosti.
2. Ove sirovine sastoje se od tri glavne komponente, a to su celuloza, hemiceluloza i lignin. Sastav ovih sirovina ovisi o vrsti biljke, uvjetima rasta i metodama skladištenja.
3. Obzirom na teško razgradivu strukturu lignoceluloznih materijala, prije početka bioprocesa koriste se odgovarajuće metode predobrade. Lignocelulozni hidrolizati su složene smjese heksoza i pentoza te drugih spojeva od kojih neki mogu djelovati kao inhibitori fermentacije.
4. Optimalni radni mikroorgnizam trebao bi fermentirati pentoze i heksoze pri čemu se preferira da ih troši istodobno. Također su važni tolerancija na inhibitore i produkte fermentacije, otpornost prema mikrobiološkim kontaminacijama te visoka produktivnost i visok prinos proizvoda.
5. Izoliran je cijeli niz prokariotskih i eukariotskih mikroorganizama koji mogu fermentirati lignocelulozne hidrolizate. Navedeni mikroorganizmi su istraživani za dobivanje etanola, ali i nekih drugih ekonomski važnih biotehnoloških proizvoda.
6. Pored selekcije i adaptacije mikroorganizama izoliranih iz raznih staništa, primjenjuju su i metode genetičkog inženjerstva kako bi se dobili novi sojevi radnih mikroorganizama za fermentaciju lignoceluloznih hidrolizata.

Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G. (2008) Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 515-1524.

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.

Alexander, M.A., Chapman, T.W., Jeffries, T.W. (1988) Continuous xylose fermentation by *Candida shehatae* in a two-stage reactor. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **17**, 221-229.

Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.-L., Goma, G., Benbadis, L. (2002) Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **60**(1), 67-72.

Alriksson, B. (2006) Ethanol from lignocellulose: Alkali detoxification of dilute-acid spruce hydrolysates. Dissertation for the degree of Doctor of Science in Technology, Karlstad University Studies.

Alterthum, F., Ingram, L.O. (1989) Efficient ethanol production from glucose, lactose and xylose by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(8), 1943-1948.

Anonymous 1 (2012) Prekursori pri biosintezi lignina, <http://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=188&sim=778&cnt=1> Pristupljeno 25. Lipnja 2016.

Anonymous 2 (2016) Šećeri koji se nalaze u sastavu hemiceluloze, < https://www.e-education.psu.edu/egee439/node/664> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 3 (2016) Izgled stanica kvasca *Kluyveromyces marxianus,* <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/kluyveromyces_marxianus.html> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 4 (2016) Izgled stanica kvasca *Pichia stipitis,* <http://genome.jgi.doe.gov/Picst3/Picst3.home.html> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 5 (2016) Izgled stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae,* <http://birdi.ctu.edu.vn/aun/minhchung/Exh.5.05-2-3082645%20-%20Nguyen%20Huu%20Tuong%20-%20LVTN.pdf> Pristupljeno 10. lipnja 2016.

Anonymous 6 (2016) Cashew jabuka- plod Indijskog oraha, <http://alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/indijski-orascic> Pristupljeno 14. lipnja 2016.

Anonymous 7 (2016) Izgled ploda Indijskog oraha, <http://funke-koleosho.blogspot.hr/2015/06/food-profile-cashew-apples.html> Pristupljeno 14. lipnja 2016.

Anonymous 8 (2016) Izgled ploda Indijskog oraha, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cashew_Brazil_fruit_cut.png> Pristupljeno 14. lipnja 2016.

Anonymous 9 (2016) Izgled ploda Indijskog oraha, < http://www.discount-supplements.co.uk/blog/cashew-apple-juice-fat-burning-trend> Pristupljeno 14. lipnja 2016.

Anonymous 10 (2016) Izgled ploda Indijskog oraha, <http://www.hobotraveler.com/2008-0041-Cashew-Nut.shtml> Pristupljeno 14. lipnja 2016.

Anonymous 11 (2016) Izgled stanica kvasca *Schizosaccharomyces pombe,* <*https://en.wikipedia.org/wiki/Schizosaccharomyces_pombe*> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 12 (2016) Izgled stanica kvasca *Pachysolen tannophilus,* <http://www.17gang.com/goods.php?id=86531> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 13 (2016) Izgled stanica bakterije *Bacillus subtilis,* <http://www.nyrture.com/blog/2015/5/23/the-subtle-beauty-of-bacillus-subtilis-part-ii> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 14 (2016) Izgled stanica bakterije *Escherichia coli,* <https://www.gov.uk/government/news/phe-investigating-national-outbreak-of-e-coli> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 15 (2016) Izgled stanica bakterije *Klebsiella oxytoca,* <*http://www.vetbakt.se/vetbakt/popup/image.php?imgtable=bakteriebilder&imgid=167* > Pristupljeno 25. lipnja 2016.

Anonymous 16 (2016) Izgled stanica bakterije *Zymomonas mobilis,* <http://jgi.doe.gov/why-sequence-zymomonas-mobilis-transcriptomes-and-resequencing-z-mobilis-industrial-strain-zm4/> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 17 (2016) Izgled stanica bakterije *Corynebacterium glutamicum,* <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Corynebacterium> Pristupljeno 4. lipnja 2016.

Anonymous 18 (2016) Izgled stanica cijanobakterije *Synechocystis* sp., <http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_unicells/SYNECHOCYSTIS/Synechocystis_Image_page.htm> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 19 (2016) Izgled spora plijesni *Fusarium oxysporum,* <http://www.mycology.adelaide.edu.au/images/foxy1.gif> Pristupljeno 4. lipnja 2016.

Anonymous 20 (2016) Izgled spora plijesni *Aspergillus terreus,* <http://www.dehs.umn.edu/iaq_fib_fg_gloss_aspergillusterreus_photo2.htm> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 21 (2016) Izgled spora plijesni *Mucor* sp., <https://en.wikipedia.org/wiki/Mucormycosis> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 22 (2016) Izgled spora plijesni *Neurospora crassa,* <http://modelorganisms.nih.gov/neurospora> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 23 (2016) Izgled stanica bakterije *Clostridium acetobutylicum,* <https://www.sbi.uni-rostock.de/research/research-projects/single/29/> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Anonymous 24 (2016) Izgled stanica kvasca *Trichosporon oleaginosus,* <https://www.tum.de/en/about-tum/news/press-releases/short/article/33150/> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Atkinson, A., Ellwood, D.C., Evans, C.G.T., Yeo, R.G. (1975) Production of alcohol by *Bacillus stearothermophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **17**(9), 1375-1377.

Atsumi, S., Cann, A.F., Connor, M.R., Shen, C.R., Smith, K.M., Brynildsen, M.P., Chou, K.J.Y., Hanai, T., Liao, J.C. (2008) Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng*. **10**, 305-311.

Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J.C. (2008) Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451,** 86-89.

Bajwa, P.K., Pinel, D., Martin, V.J.J., Trevors, J.T., Lee, H. (2010) Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. *J. Microbiol. Meth.* **81**, 179-186.

Bajwa, P.K., Shireen, T., D'Aoust, F., Pinel, D., Martin, V.J.J., Trevors, J.T., Lee, H. (2009) Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 892-900.

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.

Banat, I.M., Nigam, P., Marchant, R. (1992) Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World J. *Microbiol. Biotechnol*. **8**, 259-263.

Becker, J., Boles, E. (2003) A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-Arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(7), 4144-4150.

Bellaver, L.H., de Carvalho, N.M., Abrahao-Neto, J., Gombert, A.K. (2004) Ethanol formation and enzyme activities around glucose-6-phosphate in *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 exposed to glucose or lactose excess. *FEMS Yeast Res.* **4**, 691-698.

Bi, C., Zhang, X., Ingram, L.O., Preston, J.F. (2009) Genetic engineering of *Enterobacter asburiae* strain JDR-1 for efficient production of ethanol from hemicellulose hydrolysates. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**(18), 5743-5749.

Biebl, H., Zeng, A.-P., Menzel, K., Deckwer, W.-D. (1998) Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol and 2, 3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**(1), 24-29.

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.

Canilha, L., Carvalho, W., Felipe, M.das G., Silva, J.B., Giulietti, M. (2010) Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **161**, 84-92.

Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B. (2009) The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. **37**, 233-238.

Cheirsilp, B., Kitcha, S. (2015) Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for directconversion of lignocellulosic biomass into lipids: fed-batch and repeated-batch fermentations. *Ind. Crops Prod.* **66**, 73-80.

Chen, H. (2014) Biotechnology of lignocellulose, Theory and practice, 1.izd., Springer, Netherlands.

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.

Dahiya, M., Vij, S. (2012) Comparative analysis of bioethanol production from whey by different strains of immobilized thermotolerant yeast. *Int . J. Sci. Res. Publ*. **2**(3), 2250-3153.

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.

Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., Picataggio, S. (1996) Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(12), 4465-4470.

Deng, M.-D., Coleman, J.R. (1999) Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol*. **65**(2), 523-528.

Desvaux, M., Guedon, E., Petitdemange, H. (2001) Carbon flux distribution and kinetics of cellulose fermentation in steady-state continuous cultures of *Clostridium cellulolyticum* on a chemically defined medium. *J. bacteriol.* **183**(1), 119-130.

Dien, B.S., Cotta, M.A., Jeffries, T.W. (2003) Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**(3), 258-266.

Dogaris, I., Gkounta, O., Mamma, D., Kekos, D. (2012) Bioconversion of dilute-acid pretreated sorghum bagasse to ethanol by *Neurospora crassa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 541-550.

Du Preez, J., Bosch, M., Prior, B. (1986) Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microb. Technol.* **8**(6), 360-364.

Du Preez, J.C., Bosch, M., Prior, B.A. (1986) The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(3), 228-233.

Dufour, N., Swana J., Rao R.P. (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.

Dutta, S., De, S., Saha, B., Alam, I. (2012) Advances in conversion of hemicellulosic biomass to furfural and upgrading to biofuels, Catal. Sci. Technol., **2**, 2025-2036, <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/cy/c2cy20235b/unauth#!divAbstract > Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Ezeji, T., Milne, C., Price, N.D., Blaschek, H.P. (2010) Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 1697-1712.

Feldmann, S.D., Sahm, H., Sprenger, G.A. (1992) Cloning and expression of the genes for xylose isomerase and xylulokinase from *Klebsiella pneumoniae* 1033 in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 201-210.

Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C., Gombert, A.K. (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**, 339-354.

Fotheringham I, Kaftzik N, Oswald N (2009) Method for detecting biofuel producing microbes, Patent WO/2009/014722, WIPO.

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.

Gavrilescu, M., Chisti, Y. (2005) Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol. Adv.* **23**(7–8), 471-499.

Georgieva, T.I., Mikkelsen, M.J., Ahring, B.K. (2007) High ethanol tolerance of the thermophilic anaerobic ethanol producer *Thermoanaerobacter* BG1L1. *Cent. Eur. J. Biol.* **2**(3), 364-377.

Gong, C., Chen, L., Tsao, G. (1981) Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnol. Lett.* **3**(3), 130-135.

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.

Hahn-Hägerdal, B., Jönsson, B., Lohmeier-Vogel, E. (1985) Shifting product formation from xylitol to ethanol in pentose fermentations using *Candida tropicalis* by adding polyethylene glycol (PEG). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 173-175.

Hahn-Hägerdal, B., Wahlbom, C.F, Gárdonyi, M., van Zyl, W.H., Cordero Otero, R.R., Jönsson, L.J. (2001) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* **73**, 53-84.

Hames, B. R. (2009) Biomass compositional analysis for energy applications. U: Biofuels, Methods In Molecular Biology Vol. 581, (Mielenz J.R. ured), Humana Press, a part of Springer Science + Business Media, New York/Berlin, str. 145-167.

Hanai, T., Atsumi, S., Liao, J.C. (2007) Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol*. **73**(24), 7814-7818.

Harris, L.M., Blank, L., Desai, R.P., Welker, N.E., Papoutsakis, E.T. (2001) Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated solR gene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **27**, 322-328.

Hatfield, R., Fukushima, R. S. (2005) Can Lignin Be Accurately Measured?, *Crop Sci.* **45**, 832-839.

Hayashida, S., Ohta, K. (1981) Formation of high concentrations of alcohol by various yeasts. *J. Inst. Brew.* **87**, 42-44.

Heap, J.T., Pennington, O.J., Cartman, S.T., Carter, G.P., Minton, N.P. (2007) The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J. Microbiol. Methods* **70**, 452-464.

Heinen, U. J., Heinen, W. (1972) Characteristics and properties of a caldo-active bacterium producing extracellular enzymes and two related strains. *Arch. Microbiol.* **82**(1), 1-23.

Hellingwerf, K.J., Teixeira de Mattos, M.J. (2009) Alternative routes to biofuels: light-driven biofuel formation from CO2 and water based on the 'photanol' approach. *J. Biotechnol*. **142**, 87-90.

Hermann, M., Fayolle, F., Marchal, R., Podvin, L., Sebald, M., Vandecasteele, J.-P. (1985) Isolation and characterization of butanol-resistant mutants of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. **50**(5), 1238-1243.

Horn, S. J., Vaaje - Kolstad, G., Westereng, B., Eijsink, V. GH. (2012), Novel enzymes for the degradation of cellulose, *Biotechnology for Biofuels*, <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/45> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Hyun, H.H., Zeikus, J.G. (1985) General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(5), 1168-1173.

Hyun, H.H., Zeikus, J.G. (1985) Simultaneous and enhanced production of thermostable amylases and ethanol from starch by cocultures of *Clostridium thermosulfurogenes* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(5), 1174-1181.

Innis, M. A., Holland, M.J., McCabe, P.C., Cole, G.E., Wittman, V.P., Tal, R., Watt, K.W.K., Gelfand, D.H., Holland, J.P., Meade, J.H. (1985) Expression, glycosylation, and secretion of an *Aspergillus* glucoamylase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **228**, 21-26.

Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N., Yukawa, H. (2008) Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **77**, 1305-1316.

Ioelovich, M. (2014) Correlation analysis of enzymatic digestibility of plant biomass, *Biomass Conv. Bioref.* **4** (3), 269-275, <http://www.academia.edu/9097146/Correlation_Analysis_of_Enzymatic_Digestibility_of_Plant_Biomass> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Janušić, V., Ćurić, D., Krička, T., Voća, N., Matin, A. (2008) Predtretmani u proizvodnji bioetanola iz lignocelulozne biomase. *Poljoprivreda* **14** (1), 53-58.

Jeffries, T.W. (1981) Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis. Biotechnol. Lett.* **3**(5), 213-218.

Jeffries, T.W., Grigoriev, I.V., Grimwood, J., Laplaza, J.M., Aerts, A., Salamov, A., Schmutz, J., Lindquist, E., Dehal, P., Shapiro, H., Jin, Y.-S., Passoth, V., Richardson, P.M. (2007) Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 319-326.

Jin, M., Slininger, P.J., Dien, B.S., Waghmode, S., Moser, B.R., Orjuela, A., Da Costa Sousa, L., Balan, V. (2014) Microbial lipid-based lignocellulosic biorefinery: feasibility and challenges. *Trends Biotechnol.* **20**, 1-12.

Jojima, T., Omumasaba, C.A., Inui, M., Yukawa, H. (2010) Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **85**, 471-480.

Jones, D.T., Shirley, M., Wu, X., Keis, S. (2000) Bacteriophage infections in the industrial acetone butanol (AB) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. **2**(1), 21-26.

Jones, D.T., Woods, D.R. (1986) Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol. Rev*. **50**(4), 484-524.

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. Brew.* **115**, 191-197.

Kadam, K.L., Schmidt, S.L. (1997) Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**(6), 709-713.

Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M. -F. (2005) Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. *Yeast* **22**(5), 359-368.

Kashket, E.R., Cao, Z.-Y. (1993) Isolation of a degeneration-resistant mutant of *Clostridium acetobutylicum* NCIMB 8052. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(12), 4198-4202.

Kawaguchi, H., Sasaki, M., Vertes, A.A., Inui, M., Yukawa, H. (2009) Identification and functional analysis of the gene cluster for L-arabinose utilization in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol*. **75**(11), 3419-3429.

Kawaguchi, H., Sasaki, M., Vertès, A.A., Inui, M., Yukawa, H. (2008) Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **77**, 1053-1062.

Kawaguchi, H., Vertès, A.A., Okino, S., Inui, M., Yukawa, H. (2006) Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**(5), 3418-3428.

Kellogg, E.A., Shaffer, H. (1993) Model organisms in evolutionary studies. *Syst. Biol.* **42**(4), 409-414.

Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M., Uyama, K., Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kishimoto, M., Fukuda, H. (2002) High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**(3), 291-296.

Koskinen, P.E.P., Beck, S.R., Örlygsson, J., Puhakka, J.A. (2008) Ethanol and hydrogen production by two thermophilic, anaerobic bacteria isolated from Icelandic geothermal areas. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 679-690.

Kötter, P., Ciriacy, M. (1993) Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**(6), 776-783.

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.

Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., Stroeve, P. (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48** (8), 3713-3729.

Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M., Adhikari, D.K. (2009) Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **36**, 1483-1489.

Kuyper, M., Toirkens, M.J., Diderich, J.A., Winkler, A.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2005) Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. *FEMS Yeast Res.* **5**(10), 925- 934.

Lacis, 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.

Laluce, C., Mattoon, J. (1984) Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrins to ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(1), 17-25.

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), 431-439.

Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (1997) Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas* ethanol fermentations. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**(1), 287-304.

Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (2002) Performance testing of *Zymomonas mobilis* metabolically engineered for cofermentation of glucose, xylose and arabinose. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**(1), 429-448.

Lee, J., Mitchell, W.J., Tangney, M., Blaschek, H.P. (2005) Evidence for the presence of an alternative glucose transport system in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA101. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6), 3384-3387.

Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S. (2008) Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol. Bioeng*. **101**, 209-228.

Li, Q., Du, W., Liu, D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 749-756.

Ligthelm, M.E., Prior, B.A., du Preez, J.C., Brandt, V. (1988) An investigation of d-1-13C xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 293-296.

Lynd, L.R., van Zyl, W.H., McBride, J.E., Laser, M. (2005) Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 577-583.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**(3), 506-577.

Maddox, I.S. (1989) The acetone-butanol-ethanol fermentation: recent progress in technology. *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* **7**(1), 189-220.

Maddox, I.S., Steiner, E., Hirsch, S., Wessner, S., Gutierrez, N.A., Gapes, J.R., Schuster, K.C. (2000) The cause of "acid-crash" and "acidogenic fermentations" during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**(1), 95-100.

Maki, M., Leung, K.T., Qin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int. J. Biol. Sci*. **5**(5), 500-516.

Maleszka, R., Wang, P.Y., Schneider, H. (1982) Yeasts that ferment D-cellobiose as well as D-xylose. *Biotechnol. Lett.* **4**(2), 133-136.

Margaritis, A., Bajpai, P. (1982) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(5), 1039-1041.

Martínez, E.J., Raghavan, V., González-Andrés, F., Gómez, X. (2015) New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 9385-9405.

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**(20), 2906-2912.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009) Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renew. Energy* **34**, 1-5.

Mitchell, W.J. (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by *Clostridia*. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 31-130.

Mohagheghi, A., Evans, K., Chou, Y.-C., Zhang, M. (2002) Cofermentation of glucose, xylose and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98**(1), 885-898.

Moniruzzaman, M., Lai, X., York, S.W., Ingram, L.O. (1997) Isolation and molecular characterization of high-performance cellobiose-fermenting spontaneous mutants of ethanologenic *Escherichia coli* KO11 containing the *Klebsiella oxytoca casAB* operon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(12), 4633-4637.

Morais, P.B., Rosa, C.A., Linardi, V.R., Carazza, F., Nonato, E.A. (1996) Production of fuel alcohol by *Saccharomyces* strains from tropical habitats. *Biotechnol. Lett.* **18**(11), 1351-1356.

Mussatto, S.I., Roberto, I.C. (2003) Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Biores. Technol*. **93**, 1-10.

Nair, R.V., Green, E.M., Watson, D.E., Bennett, G.N., Papoutsakis, E.T. (1999) Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *J. Bacteriol.* **181**(1), 319-330.

Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., Clark, D.P. (1997) Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. *J. Bacteriol.* **179**(21), 6749-6755.

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.

Nanmori, T., Watanabe, T., Shinke, R., Kohno, A., Kawamura, Y. (1990) Purification and properties of thermostable xylanase and ß-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol.* **172**(12), 6669-6672.

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.

Nevoigt, E. (2008) Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**(3), 379- 412.

Olofsson, K., Bertilsson, M., Liden, G. (2008) A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biof.* **1**, 1-14.

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000a). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol*. **74**, 17-24.

Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B. (2000b) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol*. **74**, 25-33.

Palonen, H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Dissertation for the degree of doctor of technology VTT Technical Research Centre of Finland, <http://lib.tkk.fi/Diss/2004/isbn9513862720/isbn9513862720.pdf> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

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.

Payton, M.A. (1984) Production of ethanol by thermophilic bacteria. *Trends Biotechnol.* **2**(6), 153-158.

Pennock, J., Tempest, D.W. (1988) Metabolic and energetic aspects of the growth of *Bacillus stearothermophilus* in glucose-limited and glucose-sufficient chemostat culture. *Arch. Microbiol.* **150**(5), 452-459.

Peralta-Yahya, P.P., Keasling, J.D. (2010) Advanced biofuel production in microbes. *Biotechnol. J.* **5**, 147-162.

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.

Qureshi, N., Blaschek, H.P. (1999) Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation. *Biotechnol. Prog.* **15**(4), 594-602.

Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., Posewitz, M.C. (2010) Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production. *Eukaryot. Cell* **9**(4), 486-501.

Ratanakhanokchai, K., Waeonukul, R., Pason, P., Tachaapaikoon, C., Kyu, K. L., Sakka, K., Kosugi, A., Mori, Y. (2013) *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. U: Biomass Now -Cultivation and Utilization (Matović, M. D., ured.), str. 369 - 394. < http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/44405.pdf> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Rebroš, M., Rosenberg, M., Grosová, Z., Krištofíková, L., Paluch, M., Šipöcz, M. (2009) Ethanol production from starch hydrolyzates using *Zymomonas mobilis* and glucoamylase entrapped in polyvinylalcohol hydrogel. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **158**, 561-570.

Rodrigues, T.H.S., Rocha, M.V.P., de Macedo, G.R., Goncalves, L.R.B. (2011) Ethanol production from cashew apple bagasse: improvement of enzymatic hydrolysis by microwave-assisted alkali pretreatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 929-943.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. (1982) Ethanol production by *Zymononas mobilis*. *Adv. Biochem. Eng*. **23**, 37-84.

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.

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. *Fuel* **95**, 528-536.

Saharan, R.K., Sharma, S.C. (2010) Correlation studies of trehalose with oxidative stress in ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2**(5), 300-305.

Sakai, S., Tsuchida, Y., Okino, S., Ichihashi, O., Kawaguchi, H., Watanabe, T., Inui, M., Yukawa, H. (2007) Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of and ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(7), 2349-2353.

Salvachua, D., Prieto, A., Lopez-Abelairas, M., Lu-Chau, T., Martinez, A.T., Martinez, M.J. (2011) Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw, *Bioresource Technol*. **102**, 7500-7506.

Sasaki, M., Jojima, T., Kawaguchi, H., Inui, M., Yukawa, H. (2009) Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **85**, 105-115.

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**(2), 89-92.

Sederoff, R.R., McKay, J.J., Ralph, J., Hatfield R.D. (1999) Unexpected variation in lignin, *Curr. Opin. Plant Biol*. **2**, 145-152.

Serrat, M., Bermúdez, R.C., Villa, T.G. (2004) Polygalacturonase and ethanol production in *Kluyveromyces marxianus*, potential use of polygalacturonase in foodstuffs. *Appl. Biochem. Biotechnol*. **117**, 49-64.

Sharp, R.J., Bown, K.J., Atkinson, A. (1980) Phenotypic and genotypic characterization of some thermophilic species of *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* **117**(1), 201-210.

Shaw, A.J., Podkaminer, K.K., Desai, S.G., Bardsley, J.S., Rogers, S.R., Thorne, P.G., Hogsett, D.A., Lynd, L.R. (2008) Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(37), 13769-13774.

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**, 312-320.

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.

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.

Sitepu, I., Selby, T., Lin, T., Zhu, S., Boundy-Mills, K. (2014) Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **41**(7), 1061-1070.

Skoog, K., Hahn-Hägerdal, B. (1990) Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(11), 3389-3394.

Skotnicki, M.L., Lee, K.J., Tribe, D.E., Rogers, P.L. (1981) Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(4), 889-893.

Slininger, P.J., Bothast, R.J., Ladisch, M.R., Okos, M.R. (1990) Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 727-731.

Slininger, P.J., Bothast, R.J., Okos, M.R., Ladisch, M.R. (1985) Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnol. Lett.* **7**(6), 431-436.

Slininger, P.J., Dien, B.S., Gorsich, S.W., Liu, Z.L. (2006) Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **72**, 1285–1296.

Slininger, P.J., Gorsich, S.W., Liu, Z.L. (2009) Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol. Bioeng.* **102**(3), 778-790.

Sluiter, A., Sluiter, J., Wolfrum, E. J. (2013) Methods for biomass compositional analysis. U: Catalysis for the Conversion of Biomass and Its Derivatives (Behrens, M, Datye, A. K., ured.), str. 213-254. <http://www.edition-open-access.de/proceedings/2/toc.html> Pristupljeno 31. svibnja 2016.

Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., Templeton, D. W. (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks, 1. Review and description of methods, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 9043-9053.

Smith, K.M., Cho, K.-M., Liao, J.C. (2010) Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1045-1055.

Sonderegger, M., Jeppsson, M., Larsson, C., Gorwa-Grauslund, M.-F., Boles, E., Olsson, L., Spencer-Martins, I., Hahn-Hägerdal, B., Sauer, U. (2004) Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* **87**(1), 90–98.

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.

Steen, E.J., Chan, R., Prasad, N., Myers, S., Petzold, C.J., Redding, A., Ouellet, M., Keasling, J.D. (2008) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microb. Cell Fact.* **7**(36), 1-8.

Steen, E.J., Kang, Y., Bokinsky, G., Hu, Z., Schirmer, A., McClure, A., Del Cardayre, S.B., Keasling, J.D. (2010) Microbial production of fatty-acid- derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature* **463**, 559-562.

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.

Sun, Y., Cheng, J. (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review, *Bioresource Technol*. **83**, 1-11.

Suryawati, L., Wilkins, M.R., Bellmer, D.D., Huhnke, R.L., Maness, N.O., Banat, I.M. (2008) Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass pretreated by

hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnol. Bioeng.* **101**(5), 894-902.

Swings, J., De Ley, J. (1977) The biology of *Zymomonas. Bacteriol. Rev.* **41**(1), 1-46.

Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007) Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources.*

Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **9** (9), 1621-1651.

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* **1**(27), 1-7.

Toivola, A., Yarrow, D., van den Bosch, E., van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1984) Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(6), 1221-1223.

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.

Tummala, S.B., Junne, S.G., Papoutsakis, E.T. (2003) Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcohologenic *Clostridium acetobutylicum* fermentations. *J. Bacteriol.* **185**(12), 3644-3653.

Tummala, S.B., Welker, N.E., Papoutsakis, E.T. (2003) Design of antisense RNA constructs for downregulation of the acetone formation pathway of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **185(**6), 1923-1934.

Van Maris, A.J.A., Winkler, A.A., Kuyper, M., de Laat, W.T.A.M., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2007) Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: xylose isomerase as a key component. *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol*. **108**, 179-204.

Van Ooyen, A.J.J., Dekker, P., Huang, M., Olsthoorn, M.M.A., Jacobs, D.I., Colussi, P.A., Taron, C.H. (2006) Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res*. **6**, 381-392.

Warnick, T.A., Methe, B.A., Leschine, S.B. (2002) *Clostridium phytofermentans* sp. nov., a cellulolytic mesophile from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **52**, 1155-1160.

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**(2), 176-179.

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.

Werpy, T., Peterson, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A. (2004) Top value added chemicals from biomass, in volume I: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas, (T. Werpy, and Peterson, G., ured), Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) i National Renewable Energy Laboratory (NREL), Springfield, Virginia, str. 1-67.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G. (1981) *Thermoanaerobacter ethanolicus* gen. nov., spec. nov., a new, extreme thermophilic, anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **128**(4), 343-348.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., Demain, A.L. (1985) The importance of thermophilic bacteria in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* **3**(1), 39-108.

Wiegel, J., Ljungdahl, L.G., Rawson, J.R. (1979) Isolation from soil and properties of the extreme thermophile *Clostridium thermohydrosulfuricum. J. Bacteriol.* **139**(3), 800-810.

Wilkins, M.R., Mueller, M., Eichling, S., Banat, I.M. (2008) Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4 and IMB5 under anaerobic conditions. *Process Biochem*. **43**, 346-350.

Wilkins, M.R., Widmer, W.W., Grohmann, K. (2007) Simultaneous saccharification and fermentation of citrus peel waste by *Saccharomyces cerevisiae* to produce ethanol. *Process Biochem.* **42**, 1614-1619.

Wingard, J.R., Merz, W.G., Saral, R. (1979) *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann. Int. Med.* **91**(4), 539-543.

Wisselink, H.W., Toirkens, M.J., Berriel, M. del R.F., Winkler, A.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., van Maris, A.J.A. (2007) Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(15), 4881- 4891.

Wood, B.E., Ingram, L.O. (1992) Ethanol production from cellobiose, amorphous cellulose and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7), 2103-2110.

Xiros, C., Christakopoulos, P. (2009) Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. *Biotechnol. Biofuels* **2**(4), 1-12.

Yanase, H., Nozaki, K., Okamoto, K. (2005) Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett*. **27**, 259-263.

Yomano, L.P., York, S.W., Ingram, L.O. (1998) Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **20**(2), 132-138.

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.

Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., Picataggio, S. (1995) Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* **267**, 240-243.

Zhou, B., Martin, G., Pamment, N. (2008) Increased phenotypic stability and ethanol tolerance of recombinant *Escherichia coli* KO11 when immobilized in continuous fluidized bed culture. *Biotechnol. Bioeng.* **100**(4), 627-633.

Prilog 1. Djelomična lista značajnih organizama koji mogu fermentirati šećere s pet i šest ugljikovih atoma (Dufour i sur., 2011). Navedeni su supstrati fermentacije, produkti, optimalne temperature i pH-vrijednosti za rast mikroorganizma.

Organizam	**Klasifikacija**	**Supstrati**	**Produkti fermentacije**	**Optimalna temperatura (°C)**	**Optimalna pH-vrijednost**	**Generacijsko vrijeme (min)**
Acetivibrio cellulolyticus	Bakterija	Glukoza, celobioza,celuloza	H_2, acetat, etanol (3,7;0,73;0,39 mol/mol celuloze)	35	6,7	240
Acetobacterium woodii	Bakterija, obligatni anaerob, autotrofna	Glukoza, laktat, fruktoza, glicerat, fumarat, mravlja kiselina	Acetat (3 mol/mol heksoze), etanol	30	5,0 (nije optimalno za rast ali može preživjeti nekoliko tjedana)	360
Ambrosiozyma monospora	Fungi (kvasac), fakultativni anaerob	Arabinoza, ksiloza, eritritol, ksilitol	Etanol (< 4,1 g/L na arabinozi)	35 - 37 optimalno za etanol, a za rast 24-26	7,0	-
Bacillus caldolyticus	Aerobna bakterija hipertermofilna	Glukoza, škrob, dekstran, glicerol, fruktoza, maltoza, manitol, manoza, rafinoza, saharoza	Octena koselina	70 (može rasti do 105)	6,9-7,1	15
Bacillus stearothermophilus	Anaerobna termofilna bakterija	Većina heksoza i pentoza, uključujući ksilozu i arabinozu, škrob	Etanol (0,30 g/g saharoze) – podatak za genetički modificirani soj	65	~7,0	30 (pri 70 °C)
Bacillus subtilis	Bakterija, fakultativni anaerob	Glukoza, piruvat	Laktat, acetat, 2,3-butan-diol (23,3 mM, 16,4 mM osnosno 16,7 mM), etanol	30 (25-30)	~7,0	60

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	**Klasifikacija**	**Supstrati**	**Produkti fermentacije**	**Optimalna temperatura (°C)**	**Optimalna pH-vrijednost**	**Generacij-sko vrijeme (min)**
Butyribacterium methylotrophicum	Anaerobna autotrofna bakterija	H_2-CO_2, metanol, glukoza, fruktoza, laktat, piruvat	Acetat, maslačna kiselina (25 mM), H_2, butirat	37	7,2	1200
Candida acidothermophilum	Fungi (kvasac), termotolerantni	Glukoza	Etanol (80% efikasnosti na glukozi)	40	5,0	-
Candida lusitaniae (poznata i kao *Clavispora lusitaniae*)	Fungi (kvasac)	Glukoza, ksiloza, celobioza	Etanol (nastaje iz glukoze, ksiloze i celobioze, uz najveći prinos pri kofermentaciji ksiloze i celobioze)	35	6,8-7,0	-
Candida shehatae	Fungi (kvasac)	Glukoza, manoza, galaktoza, ksiloza, maltoza, trehaloza	Etanol (maksimalna zabilježena vrijednost 6,6 g/L ksiloze)	30	4-5,5	-
Candida pseudotropicalis (često ali zastarjelo ime za anamorf *Kluveromyces marxianus*) - trenutno prihvaćeno ime je *Candida kefyr*	Fungi (kvasac)	Ksiloza, glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, saharoza, trehaloza, laktoza	Etanol (24,4 g/L na glukozi; 5,6 g/L na ksilozi)	30	5,5	345
Candida tropicalis	Fungi (kvasac)	Glukoza, fruktoza, saharoza, ksiloza (aerobna potrošnja), ksiluloza	Ksilitol (nastaje samo pri rastu na ksilozi), etanol (8,28 g/L ksiloze), arabitol	24-26	7,0	-

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacij-sko vrijeme (min)
Clostridium acetobutylicum	Anaerobna bakterija	Većina heksoza i pentoza, škrob	Etanol, aceton, acetoin, acetat, butirat, butanol, H2 (0,07; 0,22, 0,06; 0,14; 0,04; 0,56; odnosno 1,35 mol/mol glukoze) - fermentacijski produkti ovise o pH (pri pH > 5 nastaju kiseline, pri nižim pH nastaju otapala)	37	7,0 (raste dobro pri pH 4.2 - 8.0)	-
Clostridium beijerinckii	Anaerobna bakterija	Saharoza	N-butanol, aceton, izopropanol (10,2; 69,6; odnosno 9,8 mmol) Više sojeva proizvodi izopropanol umjesto acetona.	35	5,0-6,8	-
Clostridium butylicum	Anaerobna bakterija	Glukoza, većina heksoza, škrob	Butanol, aceton, acetoin, acetat, butirat, H_2 (0,60; 0,22; 0,06, 0,14, 0,04; odnosno 0,78 mol/mol glukoze)	35	5,0-6,8	-
Clostridium formicoaceticum	Bakterija, fakultativni anaerob	Fruktoza; 2,3,4,5,6-pentahidroksi-heksanoična kiselina**;** 2,3,4,5-tetrahidroksi-6-oksooheksanoična kiselina); fumarat; malat	Octena kiselina (3 mol/mol fruktoze tijekom faze rasta), acetat, formijat (tijekom stacionarne faze), sukcinat	37	8,0-8,5	-

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Clostridium kluyveri	Bakterija, obligatni anaerob	Zahtjeva etanol i niže masne kiseline (kao što su acetat, propionat ili butirat) - *Clostridium kluyveri* ne može fermentirati ugljikohidrate.	Kapronska kiselina, butirat, kaproat i H_2 (1,04; 1,46; 1,11 mM iz 4,55 mM etanola odnosno iz 2,18 mM acetata), heksanol	35-37 (područje: <25°C–43°C)	6,4 (pH područje 5.2 do >8.0)	-
Clostridium papyrosolvens	Anaerobna bakterija	Glicerol, celobioza (optimalna koncentracija celobioze 6 g/L.)	Etanol	37	7,0	150
Clostridium pasteurianum	Anaerobna bakterija	Glukoza, glicerol (*Clostridium propionicum* će fermentirati biomasu algi uz dodatak glicerola)	Laktat, etanol, butanol, 1,3-propan-diol	37	7,0	30
Clostridium propionicum	Bakterija, obligatni anaerob	Alanin, laktat, piruvat, serin, treonin, sirutka, mliječna kiselina	Propionska kiselina, akrilna kiselina	37	7,0-7,4	-
Clostridium sordellii	Anaerobna bakterija	Glukoza	Etanol (1,7 mol/mol glukoze)	37	6,8	-
Clostridium thermoaceticum	Anaerobna termofilna bakterija	Većina heksoza i pentoza (preferira ksilozu, potom fruktozu, a zatim glukozu) uključujući ksilozu i arabinozu, škrob	Acetat, octena kiselina (2,41 mol/mol glukoze), mravlja kiselina (0,4 mol/mol glukoze)	60	6,0	-
Clostridium thermocellum	Anaerobna termofilna bakterija	Većina heksoza, celobioza, škrob, celuloza, sorbitol	Etanol (0,3 mol/mol celuloze), acetat i laktat, H_2	55-60	7,5	130

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	**Klasifikacija**	**Supstrati**	**Produkti fermentacije**	**Optimalna temperatura (°C)**	**Optimalna pH-vrijednost**	**Generacijsko vrijeme (min)**
Clostridium thermohydrosulfuricum	Anaerobna termofilna bakterija	Većina heksoza i pentoza, uključujući ksilozu, arabinozu, celobiozu te škrob, ksilan, pektin	Etanol, octena kiselina, mliječna kiselina, H_2 (1,95; 0,11, 0,02; odnosno 0,11 mol/mol glukoze)	65-70	4,8-9,7	75
Clostridium thermosaccharolyticum	Anaerobna termofilna bakterija	Većina heksoza i pentoza, uključujući ksilozu, arabinozu i celobiozu kao i škrob, ksilan, acetat, piruvat	Etanol (1,1 mol/mol glukoze) te octena kiselina, mliječna kiselina, butirat i H_2	58-64	4,7-7,6	90
Erwinia amylovora	Fakultativna anaerobna bakterija, biljni patogen	Glukoza, saharoza, galaktoza, fruktoza, manoza, sorbitol, manitol, rarinoza	Etanol, mliječna kiselina, octena kiselina, mravlja kiselina, jantarna kiselina, acetoin, 2,3-butan-diol (1,5; 0,18; 0,07; 0,06; 0,02; 0,01; odnosno 0,01 mol/mol glukoze)	26-28 (minimalna temperatura 3°C, a maksimalna 37 °C)	7,0 (područje 4.0–8.8)	-
Erwinia carotovora (novi naziv *Pectobacterium carotovorum)*	Fakultativna anaerobna bakterija, biljni i ljudski patogen	Glukoza, ksiloza, arabinoza, galakturonska kiselina	Mliječna kiselina, jantarna kiselina, 2,3-butilen glikol, etanol, octena kiselina, mravlja kiselina	26	7,0	90 min. na glukozi, 240 min. na arabinozi, 480 min. na ksilozi

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Erwinia chrysanthemi (kasnije klasificirana kao *Pectobacterium chrysanthemi i Dyckeya chrysanthemi)*	Fakultativna anaerobna bakterija	Glukoza, ksiloza, arabinoza	Etanol (0,72 mol/mol ksiloze)	26-30	7,0	90 min. na glukozi, 240 min.na arabinozi, 480 min.na ksilozi
Escherichia coli	Fakultativna anaerobna bakterija	Glukoza, galaktoza, fruktoza, laktoza	Etanol, mravlja kiselina, octena kiselina, jantarna kiselina (0,85; 1,12; 0,72; odnosno 0,121 mol/mol glukoze)	37 (raste čak pri 45)	7,1-7,5	20 (aerobno) 50 (anaerobno)
Fusarium oxysporum	Fungi (kvasac)	Glukoza, ksiloza, manoza, galaktoza, saharoza, ksilitol, celuloza, hemiceluloza, škrob	Etanol (4,3% v/v iz glukoze; 2,5% v/v iz ksiloze; 25 g/L ili 0,50 g/g ksiloze), octena kiselina	24	5,6	-
Hansenula anomala (poznata i kao Candida pelliculosa, Candida beverwijkiae, Pichia anomala, Wickerhamomyces anomalus)	Fungi (kvasac), fakultativni anaerobni ljudski patogen	Većina heksoza i pentoza, uključujući arabinozu, topljivi škrob, natrijev acetat, etanol	Etil-acetat (0,85% v/v iz glukoze), etanol, izoamil alkohol, izoamil-acetat	24-26	6,8-7,0	-

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Klebsiella oxytoca	Fakultativna anaerobna bakterija	Većina heksoza i pentoza, uključujući celobiozu i celotriozu	Etanol (46,4 g/L/0,37 g/g na glukozi; 45,2 g/L celobioze; 0,42 g/g ksiloze; 0,34 g/g arabinoze)	37	7,3	-
Klebsiella pneumoniae	Fakultativna anaerobna bakterija	Glicerol, ksiloza, citrat, glukoza, saharoza, fruktoza	1,3-propandiol (96% teoretskog prinosa; 48,5 g/L na glicerolu), 2,3-butan-diol, etanol, H_2 (g), acetat, butirat, butanol	37	7,0	-
Kluyveromyces fragilis	Fungi (kvasac), oportunistički ljudski patogen	Glukoza, galaktoza, laktoza, inulin, može rasti na sirutki	Etanol (49,0 g/L na glukozi, 10,6% v/v prinosa na sirutki)	30	5,8	240 (180 min uz dodatak lipida)
Kluyveromyces marxianus	Fungi (kvasac)	Ksiloza, glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, saharoza, trehaloza, laktoza	Etanol (24,4 g/L na glukozi; 5,6 g/L na ksilozi)	30	5,5	345 (ne ksilozi)
Lactobacillus brevis	Anaerobna bakterija	Većina heksoza i pentoza	Octena kiselina, mliječna kiselina, etanol, glicerol (0,15; 0,83; 0,74; odnosno 0,32 mol/mol glukoze)	30	6,0-6,5	-

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Lactobacillus casei	Anaerobna bakterija	Glukoza, manitol, citrat, celobioza (većina heksoza i pentoza)	Laktat (1,6 mol/mol glukoze), etanol (1,29 mol/mol manitola), acetat (1,96 mol/mol citrata), formijat (1,6 mol/mol manitola)	37	6,3	60 (anaerobno na glukozi)
Leuconostoc mesenteroides	Bakterija	Većina heksoza i pentoza, uključujući arabinozu, ksilozu i celobiozu; škrob	Etanol (1,1 mol/mol glukoze)	25-30	6,8	<130
Pachysolen tannophilus	Fungi (kvasac)	Glukoza, ksiloza, celobioza	Etanol (2,1 g/L na ksilozi)	32	pH 4,5 optimalno za rast, a pH 2,5 optimalno za proizvodnju etanola	140
Pichia stipitis (Scheffersomyces stipitis)	Fungi (kvasac)	Glukoza, ksiloza, galaktoza, maltoza, trehaloza	Etanol (61 g/L na ksilozi)	25-30	6,5-7,0	-
Saccharomyces cerevisiae (divlji i modificirani sojevi)	Fungi (kvasac), fakultativni anaerob	Saharoza, glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, ksiluloza, dekstran, škrob, rafinoza	Etanol (47,9 do 91,8 g/L na glukozi; 96,7 g/L na saharozi; 40,0 g/L na galaktozi; 18,4 g/L na melasi), glicerol, organske kiseline	30	4,5-6,0	90

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Saccharomyces diastaticus	Fungi (kvasac)	Glukoza, fruktoza, galaktoza, maltoza, maltotrioza, saharoza, škrob, dekstran	Etanol (1,45; 1,25% v/v na dekstrinu odn. škrobu; 60 g/L na glukozi)	25	5,4	-
Sarcina maxima	Bakterija, obligatni anaerob	Glukoza, piruvat, formijat	H_2 (2,23 mol/mol glukoze; 0,52 mol/mol piruvata), maslačna kiselina, octena kiselina, jantarna kiselina, mravlja kiselina (0,77; 0,40; 0,05; odn. 0,04 mol/mol glukoze), acil-fosfat (0,66 mol/mol piruvata), mliječna kiselina	30	6,8-7,0	-
Sarcina ventriculi	Anaerobna bakterija	Uglavnom heksoze	Etanol, H_2, acetat, acetoin (1,71; 0,41; 0,90 odn.0,04 mol/mol glukoze), acetil-fosfat, acetaldehid	30-37	7,8	-
Schizosaccharomyces pombe	Fungi (kvasac), fakultativni anaerob	Glukoza, malat, oksalacetat, piruvat, ksiluloza, ksiloza	Etanol, acetoin, octena kiselina	25-30	5,5-6,0	-
Spirochaeta aurantia	Bakterija, fakultativni anaerob	Većina heksoza i pentoza, uključujući arabinozu, ksilozu i celobiozu, škrob, glicerol	Etanol, H_2, octena kiselina, mravlja kiselina, mliječna kiselina (1,50; 1,07; 0,69; 0,05 odn. 0,01 mol/mol glukoze), acetoin, diacetil	30	7,0-7,3	230 (aerobno)

Tablica 1. (nastavak)

Organizam	Klasifikacija	Supstrati	Produkti fermentacije	Optimalna temperatura (°C)	Optimalna pH-vrijednost	Generacijsko vrijeme (min)
Spirochaeta litoralis	Bakterija, obligatni anaerob	Glukoza, piruvat	Etanol, acetat, laktat (1,40; 0,57 odn.<0,01 mol/mol glukoze), formijat, piruvat	30	7,5-7,6	-
Streptococcus lactis	Bakterija	Glukoza, galaktoza, laktoza, citrat, arabinoza, ksiloza, maltoza, manitol, salicin	Etanol, laktat, acetat (2,00; 0,07 mol/mol glukoze), formijat	31,5 (max. 42)	7,0	42
Thermoanaerobacter ethanolicus	Anaerobna termofilna bakterija	Glukoza, ksiloza, maltoza, fruktoza, saharoza, riboza, laktoza, galaktoza, ksiluloza, škrob, celobioza	Etanol (1,95 mol/mol glukoze), mliječna kiselina, octena kiselina	40-77	5,8-8,5	120 (jednako na ksilozi i glukozi)
Thermobacteroides acetoethylicus	Bakterija, termofilna, obligatni anaerob	Glukoza, manoza, celobioza, laktoza, maltoza, saharoza, škrob	Etanol, acetat, H_2, izobutirat, butirat (1,39; 1,39; 2,85; 0,02 odn. 0,09 mol/mol glukoze)	65	5,5-8,5	25
Zymomonas mobilis	Bakterija, obligatni anaerob	Glukoza, saharoza, fruktoza, rafinoza, sorbitol	Etanol (1,93 mol/mol glukoze; 0,46 g/g na škrobu tretiranom amilazom), octena kiselina, mliječna kiselina	30 optimalno za etanol (može i 37 prema nekim autorima)	5,0-7,0	120