Biological Journal of Microorganism
11 Year, No.43, Autumn 2022
Received: 2021-11-03
Accepted: 2022-01-25

(Research Paper)

Lignocellulosic Biomass: Renewable Sources for Bioethanol Production

Sara Tavallaei
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Iran, fadack.st2012@yahoo.com
Sharareh Harirchi*
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Iran, sharareh_harirchi@yahoo.com
Zahra Etemadifar
Department of Cell and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Iran, zetemadifar@gmail.com
Mohammad J. Taherzadeh
Swedish Centre for Resource Recovery, University of Borås, 501 90 Borås, Sweden, mohammad.taherzadeh@hb.se

Abstract

Introduction: Fossil fuels are the main sources of water, soil, and air pollution that threaten human life and other organisms on Earth. Nowadays, the climate change and pollution are critical issues; however, many countries still use polluting fossil fuels. Therefore, finding alternative and clean fuels is a concern for many environmental activists and scientists. One of these alternative fuels is ethanol, which ignites cleaner due to its higher hydroxyl groups and lack of sulfur and nitrogen in its formula. Ethanol can be produced both chemically and biologically. Till now, four generations of bioethanol have been introduced. In the second generation, lignocellulosic materials are used as the main source for bioethanol production. These materials are frequently found in plant biomasses and agricultural residues, which are inexpensive and environmentally sustainable. Therefore, it is of importance to improve the

*Corresponding Author

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.131065.1425

20.1001.1.23225173.1401.11.43.6.7

production process and find novel techniques that increase final yields and process efficacy. In this study, the structural properties of lignocellulosic materials, pretreatment techniques, the second-generation bioethanol production process, and the effective bacterial and fungal strains in this procedure are investigated.

Materials and Methods: This review study is a narrative review in which a logical search approach was selected. For data analysis, a comparative approach between the different methods was expressed in each section.

Results: Among four bioethanol generations, the second generation has received remarkable attention due to its non-competition with human food and its industrial potential rather than other generations. Therefore, it is of particular significance to improve the production process of bioethanol second generation. A deep understanding of lignocellulosic components, pretreatment methods optimization, and increasing hydrolysis and fermentation processes efficiency make bioethanol production industrially possible and cost-effective.

Discussion and Conclusion: However, despite extensive studies to select the most suitable microorganisms during the fermentation stage, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* are still at the forefront of studies.

Key words: Lignocellulosic Materials, Bioethanol, Pretreatment, Renewable Resources, Clean Fuel

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال یازدهم، شماره ۴۳، پاییز ۱۴۰۱ ، صفحه ۹۵ - ۷۱
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۴

مقاله مروری

زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی: منابعی تجدیدپذیر برای تولید اتانول زیستی

سارا تولایی: گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران fadack.st2012@yahoo.com

شراره حریرچی*: گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران sharareh_harirchi@yahoo.com

زهرا اعتمادی‌فر: دانشیار گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

محمد طاهرزاده: استاد مرکز سوئدی بازیافت منابع، دانشگاه بوروس، بوروس، سوئد، mohammad.taherzadeh@hb.se

چکیده

مقدمه: سوخت‌های فسیلی به‌دلیل ایجاد آلودگی‌های فراوان در محیط، جان انسان‌ها و دیگر موجودات کره زمین را تهدید می‌کنند. باوجود تغییرات اقلیمی و آلودگی‌های فراوان، تعداد چشمگیری از کشورهای جهان هنوز از این سوخت‌های آلاینده استفاده می‌کنند؛ بنابراین، یافتن سوخت‌های جایگزین و پاک دغدغهٔ بسیاری از پژوهشگران است. یکی از متداول‌ترین این سوخت‌ها، اتانول است که به‌علت گروه‌های هیدروکسیل بیشتر و نداشتن گوگرد و نیتروژن در ساختار خود، تمیزتر می‌سوزد که هم به روش شیمیایی و هم به روش زیستی به دست می‌آید. تاکنون چهار نسل از اتانول زیستی معرفی شده‌اند که تولید آنها از ترکیبات لیگنوسلولزی با عنوان نسل دوم شناخته می‌شود. این ترکیبات شامل زیست‌تودهٔ کشاورزی یا صنعتی‌اند که ازنظر زیست‌محیطی پایدار و ازنظر اقتصادی مقرون‌به‌صرفه هستند.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.131065.1425
20.1001.1.23225173.1401.11.43.6.7

مواد و روش‌ها: رویکرد کلی این مقاله به‌صورت مقالهٔ مروری روایتی است و تا حد امکان در جستجوی مطالب، رویکرد جستجوی منطقی در پیش گرفته شد. در جمع‌بندی و تجزیه و تحلیل نهایی اطلاعات سعی شد در هر بخش، از رویکرد مقایسه‌ای بین روش‌های مختلف بیان‌شده استفاده شود.

نتایج: از میان چهار نسل موجود، نسل دوم اتانول زیستی، به‌دلیل عدم رقابت با غذای انسان و قابلیت صنعتی‌شدن بیشتر نسبت به نسل سوم و چهارم، شایان توجه قرار گرفته است؛ درنتیجه، بررسی دقیق فرایند تولید اتانول زیستی نسل دوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شناخت درست اجزای ترکیبات لیگنوسلولزی، بهینه‌سازی روش‌های پیش‌تیمار و یافتن روش هیدرولیز و تخمیر با بازده بالا ازجمله مواردی‌اند که باید به دقت بررسی شوند تا این فرایند را از لحاظ صنعتی مقرون‌به‌صرفه کند.

بحث و نتیجه‌گیری: باوجود پژوهش‌های گسترده برای انتخاب مناسب‌ترین میکروارگانیسم در مرحله تخمیر، همچنان *ساکارومایسس سرویزیه* و *زایمومونَاس موبیلیس* در صدر بررسی‌ها قرار دارند.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات لیگنوسلولزی، اتانول زیستی، پیش‌تیمار، منابع تجدیدپذیر، سوخت پاک

مقدمه

امروزه بنزین و دیزل، جزء سوخت‌های اصلی به‌ویژه در زمینهٔ حمل‌ونقل هستند. مصرف جهانی بنزین طی دهه‌های اخیر به مراتب افزایش یافته است؛ درحالی‌که این سوخت‌ها تجدیدناپذیرند و مصرف بی‌رویهٔ آنها به آسیب‌های زیست‌محیطی جبران‌ناپذیری مانند آلودگی هوا، تولید پساب‌های خطرناک و گرم‌شدن زمین منجر می‌شود. هنگامی که سوخت‌های فسیلی به‌طور کامل می‌سوزند، یعنی با اکسیژن موجود در هوا ترکیب می‌شوند، دی‌اکسیدکربن و آب تولید می‌کنند. حال اگر عمل سوختن کامل نباشد، به جای مقداری از دی‌اکسیدکربن، منواکسیدکربن تولید می‌شود که ماده‌ای بسیار خطرناک و سمی است. همچنین برخی از اتم‌های کربن موجود در ترکیبات هیدروکربنی به‌صورت کامل نمی‌سوزند و همراه با ذرات جامد کربن روی هم انباشته می‌شوند و از اگزوز اتومبیل‌ها به‌صورت دوده خارج می‌شوند. علاوه بر این، هیدروکربن‌های سوخته‌نشده به همراه مقادیری از سوخت که پیش از ورود به موتور، تبخیر و به هوا منتشر می‌شوند، در مجاورت نور خورشید با ترکیبات اکسیدهای نیتروژن حاصل از عمل احتراق در موتور، ترکیب می‌شوند و تولید ازون می‌کنند. ازون در لایه استراتوسفر مانع از عبور نور فرابنفش و رسیدن آن به سمت زمین می‌شود؛ اما در سطح زمین از مهم‌ترین عوامل ایجاد مه‌دود شیمیایی و مواد سمی مضر برای سلامتی انسان محسوب می‌شود (۱)؛ بنابراین، جایگزینی منابع تجدیدپذیر و دوستدار محیط زیست مانند سوخت‌های زیستی از دغدغه‌های اصلی پژوهشگران در زمینهٔ انرژی و سوخت است (۲, ۳). براساس گزارش‌های آژانس بین‌المللی انرژی[1] دو سوم کل تأمین انرژی در سال ۲۰۵۰ از انرژی باد، خورشید، زیست‌توده، زمین گرمایی و آب خواهد بود. انرژی خورشیدی بزرگ‌ترین منبع انرژی است که یک پنجم از منابع انرژی را به خود اختصاص می‌دهد. سوخت‌های زیستی تولیدشده از ضایعات، پسماندها و ترکیباتی که با محصولات غذایی رقابت

نمی‌کنند (مانند محصولات کشت‌شده در زمین‌های حاشیه‌ای) ۴۵ درصد از سوخت‌های زیستی مصرف‌شده در سال ۲۰۳۰ را تشکیل خواهند داد؛ درحالی‌که در سال ۲۰۲۰ این مقدار در حدود ۷ درصد تخمین زده می‌شد (۴).

مطابق منابع موجود، سوخت زیستی به سوختی اطلاق می‌شود که از ترکیبات زیست‌توده (شامل مواد آلی زنده یا مواد آلی که زمانی زنده بوده‌اند) طی فرایندهای تولید به دست آید که می‌تواند مایع یا گاز باشد (۵, ۶). به‌طور کلی، سوخت‌های زیستی قابلیت تجزیه توسط میکروارگانیسم‌های موجود در آب و خاک را دارند و بنابراین اگر لکه‌ای از سوخت‌ها در محیط پخش شود، به راحتی توسط میکروارگانیسم‌ها از بین می‌رود. همچنین، این سوخت‌ها فاقد گوگرد هستند و فرایند تولیدشان قابل کنترل است تا دیگر آلاینده‌های جوی همانند اکسیدهای نیتروژن نیز در کمترین حد خود در این سوخت‌ها وجود داشته باشند؛ درحالی‌که سوخت‌های فسیلی به‌ویژه زغال مقادیر بالایی گوگرد دارند که با سوختن آنها گوگرد، آزاد و وارد اتمسفر می‌شود و سپس به‌صورت باران‌های اسیدی به زمین بازمی‌گردد. علاوه بر این، اگر این سوخت‌ها طی فرایند کاملا درست و قابل کنترل تولید شوند (استفاده از کمترین مقدار حلال، اسید، باز یا دیگر ترکیبات لازم که ممکن است برای محیط زیست خطرناک باشند)، نه‌تنها به افزایش گازهای گلخانه‌ای منجر نمی‌شوند، بلکه به میزان چشمگیری از انتشار آنها جلوگیری می‌کنند. توصیف این مسئله به استفادهٔ گیاهان از دی‌اکسیدکربن برمی‌گردد که مهم‌ترین گاز گلخانه‌ای است. گیاهان قادرند مقداری از دی‌اکسیدکربن موجود در اتمسفر را مصرف و اثر گلخانه‌ای را در زمین کاهش دهند. تولید سوخت‌های زیستی از این گیاهان، به نوعی موازنهٔ دی‌اکسیدکربن را متعادل می‌کند؛ زیرا موقع سوختن این سوخت‌ها، دوباره دی‌اکسیدکربن تولیدشده توسط گیاهان مصرف می‌شود. همچنین، استفاده از انرژی خورشیدی در مراحل مختلف تولید این سوخت‌ها سبب کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای می‌شود (۷). دربارهٔ سوخت‌های زیستی می‌توان به مقالات داتا[۲] و همکاران (۸)، علوی نائینی و همکاران (۹) و استریمایکین[۳] و همکاران (۱۰)، استناد و برای مطالعه بیشتر به آنها رجوع کرد.

اتانول زیستی[۴] یکی از انواع سوخت‌های زیستی است. شکل‌گیری صنعت اتانول امروزی تقریبا یک قرن به طول انجامید. نسل اول اتانول عمدتا از قندهای گیاهی یا نشاسته و درواقع به‌طور مستقیم از محصولات غذایی تولید می‌شود. در ابتدا، ذرت تنها ماده اولیه در دسترس برای تولید اتانول بود. ذرت، گندم و نیشکر عمده‌ترین مواد اولیه استفاده‌شده هستند. ایراد اصلی سوخت‌های زیستی نسل اول بحران غذا در برابر سوخت است که یکی از دلایل افزایش قیمت مواد غذایی، افزایش تولید این سوخت‌ها است؛ بنابراین، جستجو برای جایگزین‌های کارآمدتر و مولدتر آغاز شد. زیست‌توده‌های گیاهی پسماندی، عمدتا حاوی ترکیبات لیگنوسلولزی، منابع خوبی برای تولید اتانول هستند. نسل دوم اتانول زیستی به‌گونه‌ای طراحی شده است که از درگیری غذا و سوخت جلوگیری می‌کند و بر بقایای کشاورزی و ضایعات جنگلی متمرکز شده که عمدتا شامل انواع مختلف ترکیبات لیگنوسلولزی است. نسل دوم فرایندهای تولید اتانول زیستی در ابتدا مشکلات زیادی داشت؛ اما با پیشرفت در استراتژی‌های فرایند زیستی، کاهش هزینه‌ها و در دسترس بودن منابع پایدار درخور توجه قرار گرفت (۱۱)؛ البته امروزه نسل سوم اتانول زیستی نیز ایجاد شده است که از زیست‌تودهٔ جلبکی برای اهداف تولید استفاده می‌کند. ناهاک[۵] و همکاران گزارش دادند خزه‌های

دریایی و جلبک‌های دریایی مانند گونه‌های *انترومورفا*[۶] حاوی ۷۰ درصد کربوهیدرات (براساس وزن خشک) هستند که می‌توان آنها را برای تولید اتانول زیستی بررسی کرد. با توجه به پتانسیل تبدیل زیست‌توده با کربن بالا، امروزه تحقیقات بیشتری در زمینهٔ تولید سوخت‌های زیستی نسل سوم، به‌ویژه سوخت‌های زیستی از جلبک‌ها یا ریزجلبک‌ها انجام می‌شود. بسیاری از پژوهشگران استدلال می‌کنند سوخت‌های زیستی جلبکی می‌توانند بهترین جایگزین برای سوخت‌های زیستی نسل اول و دوم باشند. اشکال عمده این است که به‌طور مستقیم قندهای قابل تخمیر در این روش ایجاد نمی‌شوند و نیاز ضروری به پیش‌تیمارهای بهینه و بیشتر دارند (۱۲). تاکنون تمرکز پژوهشگران عمدتا بر استفاده از قندهای گیاهی برای تولید دیزل زیستی و اتانول بوده است. در زمان حاضر، رویکردهای جدیدتر و راهگشا مانند واردکردن ژن‌های خاص به *اشریشیا کلای*[۷] برای تجزیهٔ زیست‌تودهٔ لیگنوسلولزی و درنتیجه ایجاد قند فراوان و ارزان شانس بالایی دارند؛ به‌ویژه به‌دلیل اینکه این میکروارگانیسم بسیار خوب مطالعه شده است و تغییرات ژنتیکی را به خوبی انجام می‌دهد. علاوه بر این، این گونه سه برابر سریع‌تر از مخمر و ۱۰۰ برابر سریع‌تر از بیشتر میکروب‌های کشاورزی رشد می‌کند. مشکل عمده در ارتباط با باکتری *اشریشیا کلای* این است که حداکثر قندی که ایجاد می‌شود تنها ۱۰ درصد است و تا زمانی که بازدهی به ۷۰ تا ۹۰ درصد نرسد، تجاری‌سازی مشکل خواهد بود. این مشکل را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های مهندسی متابولیک برای افزایش بازدهی قند حل کرد؛ زیرا مسیر متابولیک آن به خوبی درک شده است (۱۳). به‌تازگی نسل چهارم اتانول زیستی نیز معرفی شده است که ازطریق تثبیت دی‌اکسیدکربن موجود در اتمسفر با کمک گیاهان ایجاد می‌شود (۱۴). در سیستم‌های تولید نسل چهارم، گیاهان و جلبک‌ها دستکاری می‌شوند تا بتوانند به‌عنوان دستگاه‌هایی برای جذب کارآمد کربن عمل کنند که دی‌اکسیدکربن را از اتمسفر، خارج و آن را در شاخه‌ها، تنه‌ها و برگ‌های خود تثبیت کنند. این زیست‌تودهٔ غنی از کربن سپس به سوخت تبدیل می‌شود. یافته‌های کلیدی دو گروه از پژوهشگران در طراحی درختانی که دی‌اکسید کربن بیشتری نسبت به نمونه‌های معمولی خود ذخیره می‌کنند، افق‌های جدیدی را برای دسترسی به قند قابل تخمیر ارزان‌تر باز کرده است. آنها برای گیاهان *اکالیپتوس* و *لارچ داهوریان*[۸] به‌ترتیب در شمال شرقی آسیا و سیبری به این موفقیت دست یافتند (۱۵).

امروزه به‌دلیل تغییرات اقلیمی، توجه به زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی برای تولید سوخت زیستی و دیگر ترکیبات با ارزش افزوده بیش از گذشته است؛ زیرا این نسل مشکلات نسل اول را ندارد و نسبت به نسل‌های جدیدتر که هنوز در مرحله آزمایشگاهی‌اند، توانسته است در مرحله نیمه‌صنعتی وارد شود. علاوه بر این، با توجه به جایگاه کشاورزی در صنعت ایران و به همان نسبت تولید ضایعات لیگنوسلولزی فراوان مرتبط، اهمیت این ترکیبات برای تولید سوخت زیستی بیش از پیش مشخص شده است؛ بنابراین، در این مقاله مروری سعی شده است فرایندهای نسل دوم، یعنی تولید اتانول زیستی از منابع لیگنوسلولزی به‌طور دقیق بررسی شود. در این مقاله در ابتدا، اتانول در جایگاه یک سوخت زیستی بررسی شده و سپس ساختار ترکیبات لیگنوسلولزی توضیح داده شده است. در ادامه، انواع پیش‌تیمارهای لازم به تفکیک بیان شده و انواع روش‌های تولید اتانول زیستی مشخص شده‌اند. درنهایت، میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در مراحل مختلف تولید اتانول زیستی توصیف شده‌اند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعهٔ مروری، از موتور جستجوی انتشارات گوناگون بین‌المللی مانند الزویر[۹]، اسپرینگر[۱۰]، تیلور اند فرانسیس[۱۱]، MDPI[۱۲] و هینداوی[۱۳] و مجلات مختلفی استفاده شد که در زمینهٔ زیست فناوری، تولید سوخت زیستی، انرژی‌های پاک، اتانول زیستی و روش‌های تولید سوخت‌های پاک فعال‌اند و یافته‌های جدید در این باره را منتشر می‌کنند. بستر اطلاعاتی در رابطه با مطالعات انجام‌شده حول محور تولید اتانول زیستی به‌عنوان سوخت از سوبستراهای لیگنوسلولزی، روش‌های پیش‌تیمار و انواع میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده، صورت گرفته و به جدیدترین یافته‌ها نیز اشاره شده است. در جستجوی مطالب تا حد امکان رویکرد جستجوی منطقی در پیش گرفته شده است و واژه‌های کلیدی استفاده‌شده عموما اتانول زیستی نسل دوم، انواع روش‌های پیش‌تیمار سوبستراهای لیگنوسلولزی، تخمیر، روش‌های استخراج و خالص‌سازی بود. در جمع‌بندی و تجزیه و تحلیل نهایی اطلاعات سعی شد در هر بخش، رویکرد مقایسه‌ای بین روش‌های مختلف ذکرشده اتخاذ شود.

اتانول زیستی به‌عنوان سوخت: الکل‌های مشتق از زیست‌توده[۱۴] به همراه دیزل‌های زیستی[۱۵]، هیدروژن زیستی[۱۶] و گاز سنتز[۱۷] جزء سوخت‌های جایگزین نسل دوم به حساب می‌آیند (۱۶, ۱۷). اتانول، معمول‌ترین الکل مشتق از زیست‌تودهٔ گیاهی است که به‌عنوان سوخت زیستی به کار می‌رود. این ترکیب در مقایسه با سوخت‌های فسیلی، به‌علت داشتن گروه‌های هیدروکسیل بیشتر و نداشتن گوگرد و نیتروژن در ساختار خود، تمیزتر می‌سوزد و بنابراین گزینهٔ مناسب‌تری برای جایگزینی سوخت‌های فسیلی است (۱۸)؛ اما باید بتوان با کاهش سرمایه‌گذاری اولیه و هزینه‌های تولید و افزایش بهره‌وری فرایندهای تولیدی، قابلیت رقابت آن را با سوخت‌های فسیلی حال حاضر افزایش داد (۱۶, ۱۹, ۲۰). تبدیل ترکیبات لیگنوسلولزی به اتانول، فرایندی چندمنظوره است که می‌تواند در مصارف گوناگونی مانند جایگزینی یا بهبود محصولات نفتی (سوخت‌های پاک یا مواد افزودنی به سوخت)، تیمار پساب‌ها (زباله‌های جامد شهری یا ضایعات کشاورزی و باقی‌مانده‌های جنگلی) یا کاهش آلودگی‌ها استفاده شود. باوجود مزایای بسیار زیاد این نوع سوخت، گفتنی است واحدهای صنعتی تولید اتانول زیستی با تولید حجم بالایی از پساب، جزء صنایع آلوده‌کننده به شمار می‌روند و مشکلاتی را برای محیط زیست فراهم می‌آورند.

ترکیبات لیگنوسلولزی: ترکیبات لیگنوسلولزی پلیمری دیوارهٔ سلولی گیاهان که حاصل فتوسنتز هستند، فراوان‌ترین ذخیرهٔ طبیعی تجدیدپذیر و قابل دسترسی برای انسان به شمار می‌روند که با انجام تغییراتی می‌توان از این منابع با ارزش در فرایند تولید سوخت‌های زیستی بهره برد (۲۱, ۲۲). ساختار زیست‌توده‌های گیاهی متشکل از موادی است که با عنوان ترکیبات لیگنوسلولزی شناخته می‌شود. این زیست‌توده‌ها انواع مختلفی از گیاهان و ضایعات گیاهی را شامل می‌شوند که می‌توانند در تولید اتانول زیستی بهره‌برداری شوند. به‌طور کلی، ترکیبات لیگنوسلولزی متشکل از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین هستند که میزان هریک از آنها در زیست‌توده‌های گیاهی مختلف، متفاوت است (۲۳-۲۵). علاوه بر این سه بخش ساختاری عمده، ترکیبات استخراج‌پذیر (محلول در آب یا حلال‌های آلی) و استخراج‌ناپذیر غیرسلولی (خاکستر معدنی مانند سیلیکا و نمک‌های قلیایی) نیز در زیست‌توده‌های گیاهی وجود دارد. همچنین، انواع پروتئین‌ها، پکتین[۱۸] و نشاسته نیز در این زیست‌توده‌ها یافت می‌شوند (۲۶-۲۹). محتوای

خاکستر در زیست‌توده‌های گیاهی چوبی کمتر از یک درصد است؛ اما مقادیر متغیری از ترکیبات استخراج‌پذیر مانند رزین[۱۹]ها، ترپن[۲۰]ها، فنول[۲۱]ها، کوئینون[۲۲]ها و تانین[۲۳]ها در آنها شناسایی شده‌اند (۲۶). ترکیبات لیگنوسلولزی از صنایع مختلفی مانند کاغذسازی، جنگلداری، کشاورزی (محصولات غذایی مانند برنج، گندم و ... و محصولات غیرغذایی مانند علف‌ها، چمن و ...) و حتی پسماندهای جامد شهری به دست می‌آیند؛ برای مثال، می‌توان به باگاس[۲۴] (ضایعات گیاه نیشکر) اشاره کرد که به‌طور تقریبی حاوی ۴۰ تا ۴۵ درصد سلولز، ۳۰ تا ۳۵ درصد همی‌سلولز و ۲۰ تا ۳۰ درصد لیگنین است (۱۷, ۳۰). برای تولید اتانول زیستی از این ترکیبات که یکی از فرایندهای جدید تولید است، ابتدا باید قندهای موجود در این ذخایر آزاد شوند و سپس در اختیار مخمر قرار گیرند. برخلاف ساختار به ظاهر سادهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی، آزادسازی و تولید مؤثر قندهای مونومری از آنها آسان نیست و به تیمارهای خاصی ازجمله تیمار با آنزیم‌هایی نیازمند است که قادرند این پلیمرها را بشکنند و قند آزاد کنند (۱۹, ۳۱). به‌طور کلی، دانش مرتبط با ترکیبات لیگنوسلولزی، فعالیت آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ آنها، عوامل مؤثر بر تولید و عملکرد این آنزیم‌ها و میکروارگانیسم‌هایی که این آنزیم‌ها را تولید می‌کنند، برای افزایش بازدهی فرایند بازیافت زیست‌توده‌های گیاهی در راستای تولید سوخت‌های زیستی مانند اتانول بسیار مهم است.

سلولز: سلولز- فراوان‌ترین ذخیرهٔ سوخت تجدیدپذیر در کرهٔ زمین - یک هوموپلیمر[۲۵] خطی متشکل از یک نوع قند (گلوکز) است که با پیوندهای گلیکوزیدی بتا-۴،۱ بهم متصل شده‌اند. گیاهان عمده‌ترین تولیدکنندگان سلولزند؛ درحالی‌که برخی جانوران و باکتری‌ها نیز قادر به تولید این پلیمر هستند (۱۷, ۳۲, ۳۳). اصلی‌ترین واحد تکرارشوندهٔ این پلیمر، سلوبیوز نام دارد که حاصل ترکیب دو واحد گلوکز است. سلولز حدود نیمی از مواد آلی در زیست‌کره را شامل می‌شود و مهم‌ترین پلی‌ساکارید موجود در زیست‌تودهٔ گیاهی به شمار می‌رود. برخلاف دیگر پلی‌ساکاریدها، این مولکول ساختار بلورین دارد و از به هم پیوستن حدود ۳۰ مولکول مجزای سلولز، واحدهای بزرگ‌تری به نام فیبریل‌های ابتدایی (پروتوفیبریل[۲۶]) ایجاد می‌شود که خود در واحدهای بزرگ‌تری به نام میکروفیبریل[۲۷] دسته‌بندی می‌شوند؛ درنهایت، از تجمع میکروفیبریل‌ها الیاف‌های سلولزی معمول به وجود می‌آیند. پیوندهای هیدروژنی درون و بین مولکولی این الیاف‌ها باعث سختی و نامحلول‌شدن آنها می‌شود. میکروفیبریل‌ها معمولا در زمینه‌ای[۲۸] از همی‌سلولز، لیگنین، پروتئین و عناصر معدنی جای می‌گیرند که این به هم پیوستگی به شدت سلولز را در برابر هیدرولیز آنزیمی مقاوم می‌کند (۳۱, ۳۲, ۳۴, ۳۵). علاوه بر این، بلورینگی[۲۹] ساختار سلولز عامل تعیین‌کنندهٔ مهمی در چگونگی هیدرولیز آن به شمار می‌آید که با انجام پیش‌تیمار[۳۰]های مناسب، معمولا این بلورینگی کاهش می‌یابد و سوبسترا برای هیدرولیز آنزیمی آماده‌تر می‌شود؛ البته گاهی پیش‌تیمارها منجر به افزایش بلورینگی ساختار سلولز می‌شوند که هیدرولیز آنزیمی را با مشکل مواجه می‌کنند. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند هیدرولیز آنزیمی سلولزهای بی‌شکل[۳۱]، ۵ تا ۱۰ برابر سریع‌تر از سلولزهای بلوری صورت می‌گیرد (۳۲). امروزه، پژوهش‌های زیادی در رابطه با تبدیل سلولز به گلوکز و تخمیر آن به اتانول درحال انجام است؛ زیرا این فرایند، پتانسیل اقتصادی چشمگیری دارد و با محیط زیست سازگار است (۲۸, ۳۱). برای تبدیل آنزیمی سلولز به قند قابل تخمیر گلوکز، از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ سلولز (سلولازها) استفاده می‌شود.

همی‌سلولز: پس از سلولز، همی‌سلولزها فراوان‌ترین پلی‌ساکاریدهای ناهمگن[۳۲] طبیعی‌اند که ۲۵ تا ۴۵ درصد زیست‌توده‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند و معمول‌ترین آنها عبارت‌اند از بتاگلوکان غیرسلولزی، زایلان، زایلوگلوکان، آرابینوزایلان، مانان، گالاکتومانان، آرابینان، گالاکتان، پلی‌گالاکتومانان (۲۸, ۳۳, ۳۶). مهم‌ترین ترکیب همی‌سلولزی و دومین ذخیرهٔ انرژی تجدیدپذیر در طبیعت، زایلان نام دارد که زنجیرهٔ اصلی آن به‌صورت هموپلیمر و متشکل از واحدهای زایلوپیرانوز است که با پیوندهای بتا-۱،۴ دی-گلیکوزیدی به هم متصل شده‌اند. در بیشتر زایلان‌ها، زنجیره اصلی دارای گروه‌های جانبی مانند استیل-آرابینوفورانوزیل، گلوکورونوزیل یا متیل‌گلوکورونوزیل نیز هست (۱۷, ۲۳, ۳۷)؛ البته زایلان خطی و بدون گروه‌های جانبی در غلاف بذر گوآر[۳۳]، علف اسپراتو[۳۴] و ساقه‌های تنباکو شناسایی شده است. ساختار همی‌سلولز، واحدهای زنجیره اصلی، میزان شاخه‌های جانبی و نوع آنها به شدت بین گونه‌های گیاهی مختلف، متغیر است؛ برای مثال، زایلوگلوکان‌ها بیشتر در دیوارهٔ سلولی اولیهٔ گیاهان دولپه‌ای[۳۵] دیده می‌شوند؛ درحالی‌که گلوکورونوآرابینوزایلان‌ها در هر دو دیوارهٔ سلولی اولیه و ثانویهٔ گیاهان تک‌لپه‌ای برگ‌بیدی[۳۶] همچون نیشکر و ذرت به وفور یافت می‌شوند. همچنین، زایلان‌های چوبی به‌صورت استیل-متیل‌گلوکورونوزایلان در سخت‌چوب‌ها (آنژیوسپرم‌های چوبی[۳۷]) یا به‌صورت آرابینومتیل‌گلوکورونوزایلان در نرم‌چوب‌ها (ژیمنوسپرم‌ها[۳۸]) وجود دارند و درجهٔ پلیمریزاسیون[۳۹] آنها در سخت‌چوب‌ها بیشتر از نرم‌چوب‌ها است. به‌طور کلی، نقش همی‌سلولزها در زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی، اتصال لیگنین به الیاف‌های سلولزی است و به احتمال زیاد، این اتصال ازطریق پیوندهای کوالانسی بین گروه‌های جانبی همی‌سلولزها با لیگنین به وجود می‌آید (۱۷, ۳۶, ۳۸).

لیگنین: لیگنین فراوان‌ترین پلیمر آروماتیک در طبیعت، بزرگ مولکولی ناهمگن با خواص فنولی است و درنتیجهٔ پلیمریزاسیون و آبگیری از سه نوع الکل تک‌پاری[۴۰] یا لیگنول[۴۱]ها تولید می‌شود که از اسید *پارا*-سینامیک[۴۲] مشتق می‌شوند. این الکل‌ها شامل *ترانس-پارا*-کوماریل الکل[۴۳] (۹ کربنه)، *ترانس-پارا*-کونیفریل الکل[۴۴] (۱۰ کربنه) و *ترانس-پارا*-سیناپیل الکل[۴۵] (۱۱ کربنه) هستند (۳, ۱۶, ۲۴). نسبت حلقه‌های آروماتیک در لیگنین به شدت وابسته به نوع زیست‌تودهٔ گیاهی است. بیشتر لیگنین موجود در نرم‌چوب‌ها از کونیفریل الکل و مقادیر کمی کوماریل الکل مشتق شده است. لیگنین سخت‌چوب‌ها نیز از مقادیر نسبتا مساوی کونیفریل الکل و سیناپیل الکل و مقدار کمی کوماریل الکل تشکیل شده است و در گیاهان علفی علاوه بر لینگول‌های فوق، *پارا*-هیدروکسی سینامیک اسیدهایی[۴۶] همچون اسید *پارا*-کوماریک[۴۷]، اسید فرولیک[۴۸] و اسیدهای سیانپیک[۴۹] نیز درون لیگنین ادغام شده‌اند. به‌طور کلی، محتوای سلولزی انواع مختلف ترکیبات چوبی مشابه است؛ اما محتوای لیگنین در نرم‌چوب معمولا بیشتر از سخت‌چوب‌ها است (۱۶, ۲۶, ۳۷). لیگنین موجود در زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی به‌علت ساختار سه‌بعدی که دارد همانند یک مانع فیزیکی در برابر حملهٔ آنزیم‌های سلولازی و همی‌سلولازی عمل می‌کند و عملکرد این آنزیم‌ها را مختل می‌کند؛ درواقع نقش حفاظتی را در ساختار زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی بر عهده دارد (۳۹). اجزای لیگنین به‌دلیل اثر رقیق‌کننده بر

فرایندهای هیدرولیز و تخمیر اهمیت پیدا می‌کنند. گروه‌های فنولی ایجادشده از تجزیهٔ لیگنین، آنزیم‌های سلولازی را تا حد زیادی، غیرفعال و ازاین‌رو هیدرولیز آنزیمی را مختل می‌کنند. اصلاح لیگنین ازطریق مهندسی ژنتیک، تشکیل لیگنین را به میزان چشمگیری کاهش می‌دهد و بازدهی اتانول را بهبود می‌بخشد؛ اما این امر می‌تواند مشکل‌ساز باشد؛ زیرا اجزای لیگنین به‌عنوان اصلی‌ترین سیستم دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و حشرات عمل می‌کنند و اصلاح ژنتیکی آنها می‌تواند حفاظت طبیعی گیاهان را مختل کند. حفظ لیگنین علاوه بر صرفه‌جویی در مصرف انرژی فرایند، با توجه به اینکه پس از بازیابی می‌توان آن را در واحد ترکیبی حرارت و نیرو[۵۰] استفاده کرد، یک منبع بالقوهٔ انرژی پایدار برای این فرایند است. در مجموع، مواد اولیهٔ زیست‌توده با محتوای لیگنین بالا به آسانی به‌عنوان مادهٔ اولیه برای تخمیر قابل استفاده نیست (۴۰).

پیش‌تیمار ترکیبات لیگنوسلولزی: سوبستراهای لیگنوسلولزی به‌دلیل داشتن سه بخش اصلی سلولزی، همی‌سلولزی و لیگنینی، تخلخل کمی دارند و بنابراین نسبت به هیدرولیز آنزیمی مقاوم‌اند؛ درنتیجه، برای تولید اتانول زیستی از اینگونه سوبستراهای نامحلول، معمولاً این ترکیبات باید تحت‌تأثیر فرایندها و موادی قرار گیرند که کاسته‌شدن مقاومت آنها، افزایش دسترسی آنزیم‌ها به سوبسترا، ایجاد قندهای قابل تخمیر بیشتر و افزایش بازدهی هیدرولیز آنزیمی و تخمیر قندی را سبب شود (۳, ۴۱-۴۴). اگر پیش‌تیماری روی ترکیبات لیگنوسلولزی انجام نشود، میزان بازدهی هیدرولیز آنزیمی با آنزیم قارچی کمتر از ۲۰ درصد خواهد شد (۷). به‌طور کلی، ایدئال‌ترین پیش‌تیمارها بر پایهٔ حذف همی‌سلولز یا لیگنین، افزایش تخلخل و کاهش بلورینگی سلولز استوار است تا سطح تماس کافی برای حملهٔ آنزیم سلولاز ایجاد شود. همچنین، در یک پیش‌تیمار ایدئال ترکیبات مهارکنندهٔ فرایند تخمیر تا حد امکان نباید آزاد شوند؛ شرایط عملیاتی باید ارزان، راحت و کارآمد باشد و ضایعات جامد نیز تولید نشوند (۳, ۳۹, ۴۴-۴۶)؛ البته توجه به این نکته نیز ضروری است که در بیشتر این روش‌ها شرایط سختی مانند استفاده از ترکیبات خورنده، دما یا فشار بالا اعمال می‌شود و ممکن است به ایجاد ترکیبات مهارکننده در شیرابهٔ لیگنوسلولزی منجر شود که مجموعهٔ این عوامل اثرات منفی در اقتصاد فرایند تولید اتانول زیستی بر جای می‌گذارد (۴۷-۴۹).

انواع روش‌های پیش‌تیمار شامل انواع فیزیکی، شیمیایی، فیزیکوشیمیایی، زیستی یا ترکیبی از آنها هستند که در جدول ۱ به تفکیک آورده شده‌اند (۵۰). با وجود این، هیچ‌یک از این پیش‌تیمارها آنقدر توسعه نیافته‌اند که بتوانند از نقطه‌نظر اقتصادی یا تکنیکی در فرایندهای تولیدی با مقیاس بزرگ به راحتی استفاده شوند؛ حتی در برخی موارد یکی از این روش‌ها برای افزایش کارایی روش دیگر به کار می‌رود (۵۱, ۵۲). از بین روش‌های موجود، استخراج بازی و اسید کربنیک بهترین کارایی را دارند؛ اگرچه روش‌های انفجار بخار و هیدرولیز اسیدی رقیق معمول‌تر هستند. به‌طور میانگین حدود ۳۳ درصد از هزینهٔ کل فرایند تولید اتانول زیستی از ترکیبات لیگنوسلولزی به این مرحله تعلق دارد (۴۰) و درنهایت، کارآمدی این فرایند در بازده سوخت زیستی تولیدی تأثیرگذار است (۵۰).

جدول ۱- انواع روش‌های پیش‌تیمار ترکیبات لیگنوسلولزی

نوع پیش‌تیمار	روش‌های به‌کاررفته	کاربرد	معایب	منابع
فیزیکی	- میلینگ[۵۱] (آسیاب کردن[۵۲]/خردکردن با تیغهٔ چرخان[۵۳]) - همگن‌سازی فشار قوی[۵۴] - تابش پرتو الکترون[۵۵] - فشرده‌سازی داغ[۵۶] - فوتوکاتالیز - آذرکافت (پیرولیز) - امواج فراصوت و مایکروویو - میدان الکتریکی ضربان‌دار - پرتودهی با پرتوی گاما - استفاده از آب داغ مایع در فشار بالا	- کاهش درجهٔ بلورینگی و درجهٔ پلیمریزاسیون سلولز - هیدرولیز جزئی همی‌سلولزها و دپلیمریزاسیون لیگنین - افزایش سطح دسترسی برای آنزیم‌های هیدرولیزکننده با افزایش سطح مقطع و اندازهٔ سوراخ‌ها در ترکیبات لیگنوسلولزی	- مصرف بالای انرژی - کارآمدی پایین	(۴۱, ۴۹-۵۷)
فیزیکوشیمیایی	- استفاده از بخار اشباع با فشار بالا در زمان کم - اکسیداسیون مرطوب - انبساط الیافی با آمونیاک - تراوش بازیافتی آمونیاک - خیساندن در آمونیاک فاز آبی - انفجار با دی‌اکسیدکربن یا دی‌اکسیدگوگرد	- جداکردن همی‌سلولز و لیگنین - ایجاد تغییراتی در ساختار لیگنین - دهیدرولیز بخش همی‌سلولزی	تولید ترکیبات مهارکنندهٔ فرایند هیدرولیز و تخمیر	(۴۰, ۵۰, ۵۸)
شیمیایی	- هیدرولیز اسیدی (رقیق و غلیظ) - هیدرولیز بازی - ازون کافت - استفاده از گازهای دی‌اکسیدکلر یا دی‌اکسیدنیتروژن - استفاده از عوامل متورم کننده، استفاده از پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) - استفاده از مایعات یونی - لیگنین‌زدایی اکسیداتیو یا بر پایهٔ استخراج با حلال‌هایی مانند اتانول، بنزن، اتیلن گلایکول یا بوتانول و استفاده از حلال‌های آلی فسفاته یا حلال‌های سلولز مانند کادوکسن	- لیگنین‌زدایی - هیدرولیز نسبتا کامل همی‌سلولزها - کاهش بلورینگی سلولز و درجهٔ پلیمریزاسیون آن	- هزینهٔ بالای عملیات - ایجاد آلاینده‌های زیست‌محیطی و بازیافت دشوار آنها - ایجاد رسوبات تیره‌رنگ هومیک یا تانن مانند در شیرابه پیش‌تیمارشده - خورندگی در تجهیزات - تولید ترکیبات مهارکنندهٔ فرایند هیدرولیز و تخمیر	(۳, ۴۷, ۵۱, ۵۴, ۵۹, ۶۰)
زیستی	استفاده از انواع سویه‌های قارچی (*فانروکیت کریزوسپوریوم*، *تریکودرما ریسئی*، *تریکودرما ویریده*، *آسپرژیلوس نایجر* و ...) و باکتریایی (گونه‌های *کلستریدیوم*، *سلولوموناس*، *باسیلوس*، *ترمومونوسپرا*، *استرپتومایسس* و ...) - استفاده از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ سویه‌ها (مثل پکتیناز، لیگنین پراکسیداز، زایلانازها، مانانازها و ...)	- ایجاد شکلی از سلولز به‌وسیلهٔ تخریب ساختار بلوری آن - شکست یا حذف بخش لیگنینی - به حداقل رساندن از دست رفت قند	زمان انکوباسیون طولانی	(۴۴, ۵۰)

هیدرولیز آنزیمی: در فرایند تولید اتانول زیستی از زیست‌توده‌های لیگنوسلولزی، مرحلهٔ هیدرولیز آنزیمی از دهه ۱۹۸۰ میلادی توجه خاصی را به خود معطوف کرده است و هنوز هم به‌عنوان یک تنگنای مهم فنی-اقتصادی در این فرایند مطرح است که مطالعه و پژوهش‌های بیشتری را در این زمینه طلب می‌کند. به بیانی ساده، پس از هیدرولیز همی‌سلولزها و لیگنین‌زدایی از ترکیبات لیگنوسلولزی، الیاف‌های سلولزی به راحتی در معرض سلولازها قرار می‌گیرند و قند گلوکز برای تخمیر و تولید اتانول آزاد می‌شود. به‌دلیل اختصاصیت عملکرد آنزیم‌های هیدرولیزکننده در تولید محصولات خاص و بازده بالای آنها، با توسعه و بهبود این مرحله می‌توان تنوع و در دسترس‌پذیری منابع لیگنوسلولزی را برای تولید اتانول زیستی مقرون‌به‌صرفه افزایش داد (۵۹, ۶۱-۶۳).

مرحلهٔ هیدرولیز و به‌کارگیری آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ مناسب یکی از مراحلی است که می‌تواند بهره‌وری تولید اتانول زیستی را بهبود بخشد. کارایی هیدرولیز آنزیمی تأثیرگرفته از عوامل بسیاری است که می‌توان به نوع سوبسترا و غلظت آن، نوع پیش‌تیمار انجام‌شده، محتوای لیگنین و همی‌سلولز، تخلخل زیست‌توده، تبلور الیاف سلولزی، دما، pH، چگونگی همزنی، افزودن ترکیبات خاص مانند مواد فعال سطحی[۵۷] برای تغییر سطوح مولکول سلولز و نوع و فعالیت آنزیم هیدرولیزکننده اشاره کرد (۳۳, ۵۱, ۵۴, ۶۴). به‌طور کلی، تعیین میزان دوز بهینهٔ آنزیم کار دشواری است؛ زیرا بهای آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی همیشه ثابت نیستند و تغییر می‌کنند. نوع ترکیب لیگنوسلولزی استفاده‌شده نیز در تعیین این دوز مؤثر است؛ به‌طوری‌که دوز کمتری از آنزیم برای چوب‌های نرم و دوز بیشتری برای چوب‌های سخت به کار می‌رود. همچنین، غلظت مواد جامد نامحلول در آب به‌وجودآمده طی روش قندسازی و تخمیر همزمان[۵۸] در تعیین این دوز تأثیر دارد (۳۹, ۶۵). در زمان حاضر، از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی تجاری در مرحلهٔ هیدرولیز استفاده می‌شود که به‌صورت کوکتل[۵۹] آنزیمی سلولازی و همی‌سلولازی متشکل از ۴۰ تا ۵۰ نوع آنزیم با فعالیت‌های خاص خود هستند. همچنین، میزان و نوع آنزیم‌های اختصاصی درون کوکتل با توجه به نوع زیست‌توده تغییرپذیر است (۴۷, ۴۹, ۶۶-۶۸).

هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی با آنزیم‌ها مزایای زیادی را نسبت به پیش‌تیمارهای شیمیایی شامل می‌شود که می‌توان به اختصاصیت بالا، شرایط واکنش ملایم (pH در حدود ۴/۵ تا ۵ و دمای ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد)، بی‌نیازی به تجهیزات خاص، نبود مهارکننده‌های سمی مانند وانیلین و فورآلدهید و سالم‌ماندن سوبسترا طی تغییرات شیمیایی اشاره کرد (۵۱, ۵۴, ۶۹, ۷۰). محصولات هیدرولیز آنزیمی ترکیبات لیگنوسلولزی می‌توانند به سوخت‌های مایع، پروتئین تک‌یاخته[۶۰]، حلال‌ها و دیگر ترکیبات خاصی تبدیل شوند که قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌های تخمیرکننده‌اند. استفاده از این منابع لیگنوسلولزی به کاهش و حتی حذف ضایعات کشاورزی و پساب کمک شایانی می‌کند (۷۱, ۷۲). با این حال و در زمان حاضر، به‌علت زمان‌بربودن مرحلهٔ هیدرولیز آنزیمی، پایین‌بودن فعالیت سلولازهای طبیعی، مهار کاتابولیکی آنزیم با محصولات قندی تولیدشده و بالابودن میزان آنزیم مصرفی و بهای آن (در حدود ۵۰-۲۵ درصد کل هزینه تولید اتانول زیستی نسل دوم)، استفاده از این روش در مقیاس‌های کلان صنعتی هنوز به قطعیت کامل نرسیده است (۵۴, ۵۹, ۷۳).

تخمیر و تولید اتانول زیستی: ترکیبات لیگنوسلولزی پس از مراحل پیش‌تیمار، سمیت‌زدایی و هیدرولیز وارد مرحلهٔ تخمیر می‌شوند تا اتانول زیستی تولید شود؛ یعنی تبدیل قندهای پنج و شش کربنه به اتانول. حداکثر بازده تئوری قندهای پنج و شش کربنه موجود در شیرابه ۰/۵۱۱ کیلوگرم اتانول و ۰/۴۸۹ کیلوگرم دی‌اکسیدکربن به‌ازای هر کیلوگرم قند است؛ ازاین‌رو، بازده کلی تئوری اتانول (در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) به‌ترتیب ۰/۷۱۳ و ۰/۷۳۶ لیتر در کیلوگرم گلوکان (و / یا سایر ساختارهای شش کربنه) و زایلان (و / یا سایر ساختارهای پنج کربنه) می‌شود. با وجود این، توسعهٔ این مرحله هنوز موانعی دارد که یکی از آنها فقدان میکروارگانیسم‌های مناسبی است که بتوانند به‌صورت مؤثر همه قندهای موجود در شیرابهٔ تیمارشده را تخمیر و به اتانول تبدیل کنند (۱۶, ۳۶, ۷۴).

در کل، مرحلهٔ تولید اتانول زیستی از شیرابهٔ تیمارشدهٔ لیگنوسلولزی با استفاده از روش‌های قندسازی و تخمیر همزمان[۶۱]، قندسازی جزئی همراه با تخمیر[۶۲]، قندسازی و تخمیر نیمه‌همزمان[۶۳]، پردازش زیستی یکی‌شده یا فرآوری زیستی تلفیقی[۶۴]، قندسازی و تخمیر همراه با هم همزمان[۶۵]، قندسازی و تخمیر همزمان غیر هم‌دمایی[۶۶] و هیدرولیز و تخمیر جداگانه[۶۷] صورت می‌گیرد که در ادامه به برخی از مهم‌ترین آنها اشاره شده است (۷۵, ۷۶). در هریک از این روش‌ها، نوع کشت استفاده‌شده نیز اهمیت می‌یابد. در رابطه با نوع کشت گفتنی است هر دو نوع کشت بسته[۶۸] و پیوسته[۶۹] برای این منظور استفاده می‌شوند؛ اما معمولا برای تولید در مقیاس صنعتی، کشت پیوسته به‌دلایل اقتصادی همچون حجم بالاتری از بهره‌وری، صرف زمان کمتر برای تخلیه، شستشو و بارگیری دوباره، نیروی کار کمتر و احتمال آلودگی پایین‌تر مقرون‌به‌صرفه‌تر است. همچنین، کشت پیوسته در ایجاد سازگاری میکروارگانیسم‌های تخمیرکننده نسبت به مهارکننده‌هایی تأثیرگذار است که به‌واسطهٔ پیش‌تیمار زیست‌توده تولید می‌شوند (۳۰, ۷۷). افزون بر کشت‌های بسته و پیوسته، سلول‌های تثبیت‌شده[۷۰] نیز در تولید اتانول استفاده می‌شوند؛ زیرا با ایجاد تراکم سلولی بالا بهره‌وری را در راکتور افزایش می‌دهند و با حذف مرحلهٔ شستشو در سامانه‌های پیوسته، نیاز به مراحل جداسازی یا بازیافت برای به دست آوردن تراکم سلولی بالا در راکتور زیستی از بین می‌رود و فرایندهای زیستی مؤثرتر با بازدهی اقتصادی بهتری انجام می‌شوند. علاوه بر تثبیت، استفاده از نانوذرات فلزی[۷۱]، نانوفیبرها[۷۲]، نانولوله‌ها[۷۳] و نانوصفحات[۷۴] به‌عنوان نانوکاتالیزور و همچنین، پایین نگه داشتن غلظت اتانول تولیدی با حذف آن ازطریق استخراج حلالی به حفظ و نگهداری سلول‌ها در راکتورها و درنتیجه، افزایش تولید اتانول زیستی کمک شایانی می‌کند (۷۸-۸۰).

روش قندسازی و تخمیر همزمان: یکی از موفق‌ترین روش‌های تولید اتانول زیستی از مواد لیگنوسلولزی، روش قندسازی و تخمیر همزمان است. در این روش هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی به‌منظور آزادسازی واحدهای قندی از بخش پلیمری همزمان با تبدیل قندهای آزادشده توسط مخمر یا دیگر میکروارگانیسم‌ها به اتانول در شرایط بی‌هوازی صورت می‌گیرد (۵۱, ۸۱). در این روش، بازده تولید اتانول با به حداقل رساندن اثر مهاری محصول، جذب سریع قندهای آزادشده توسط مخمر، کاهش دوز مصرفی آنزیم یا آنزیم‌های هیدرولیزکننده، کاهش مصرف آب

و به طبع، کاهش انرژی مورد نیاز برای تقطیر، بی‌نیازی به راکتورهای جداگانه برای فرایندهای هیدرولیز و تخمیر و کاهش سرمایه‌گذاری اولیه افزایش می‌یابد (۶۵, ۸۲). سویه‌های اصلاح ژنتیکی شدهٔ *ساکارومایسس سرویزیه*[۷۵] که تخمیرکنندهٔ زایلوز هستند، برای فرایند تخمیر همراه با هم استفاده می‌شوند و بازده اتانول ۰/۳۲ گرم به‌ازای هر گرم قند را نشان می‌دهند که این یک فرایند مناسب برای ترکیبات لیگنوسلولزی غنی از زایلوز است؛ اگرچه بازده اتانول ۳۵ درصد کمتر از حداکثر بازده است (۵۸). علاوه بر مخمر، قارچ‌های میانه‌پسندی[۷۶] همچون *فوزاریوم*[۷۷] و *موناسکوس*[۷۸] در این روش استفاده شده‌اند (۸۳)؛ با وجود این، متفاوت‌بودن دمای بهینه برای فرایندهای هیدرولیز (حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد) و تخمیر (۳۵ درجه سانتی‌گراد)، یکی از اصلی‌ترین معایب این روش به شمار می‌رود (۲, ۸۴, ۸۵). گفتنی است درجه حرارت می‌تواند افزایش یابد؛ اما اگر مخمرها در معرض دمای بالاتر از دمای مطلوب خود قرار بگیرند، تغییرات ریخت‌شناسی و فیزیولوژی در آنها ایجاد و آسیب سلولی مشاهده می‌شود که باعث کاهش دوام سلول و متابولیسم مخمر می‌شود؛ همچنین دمای بالا به کاهش غلظت اتانول، عملکرد و بهره‌وری منجر می‌شود. در این زمینه، میکروارگانیسم‌های گرمادوست و تحمل‌کنندهٔ گرما به‌عنوان تولیدکننده‌های بالقوهٔ اتانول لیگنوسلولزی برای روش تخمیر و قندسازی همزمان شناسایی شدند (۳۰, ۸۶) که هنوز محدودیت‌های زیادی ازجمله توانایی کم در تحمل اتانول و نرخ تولید پایین را دارند؛ اما احتمال خطر آلودگی در این روش کمتر از روش هیدرولیز و تخمیر جداگانه است (۸۷).

روش قندسازی و تخمیر همراه با هم همزمان: در این روش پس از انجام پیش‌تیمار، شیرابهٔ همی‌سلولزی از بخش جامد سلولزی جدا نمی‌شود و در مرحلهٔ بعدی هیدرولیز و تخمیر قندهای پنج و شش کربنه همزمان و همراه با هم صورت می‌گیرد که درواقع تخمیر همراه با هم در نام این روش به این مرحله اشاره دارد. در مقایسه با روش قندسازی و تخمیر همزمان این روش به دو راکتور جداگانه برای تخمیر قندهای پنج و شش کربنه و دو راکتور جداگانه برای تولید زیست‌تودهٔ میکروبی تخمیرکنندهٔ این قندها نیاز ندارد و همزمان می‌توان تخمیر قندهای پنج و شش کربنه را در یک راکتور و با یک نوع میکروارگانیسم تخمیری انجام داد (۴۰, ۴۵, ۵۱, ۸۸).

روش قندسازی و تخمیر همزمان غیر هم‌دمایی: در روش قندسازی و تخمیر همزمان، هیدرولیز آنزیمی در دمایی پایین‌تر از دمای بهینهٔ واکنش انجام می‌شود که باعث کاهش فعالیت آنزیمی و افزایش دوز آنزیم مصرفی می‌شود. برای غلبه بر این مشکل، استفاده از روش قندسازی و تخمیر همزمان غیر هم‌دمایی پیشنهاد شده است. در این روش، قندسازی و تخمیر همزمان با هم در دو راکتور جداگانه و با دماهای متفاوت انجام می‌شود. ترکیبات لیگنوسلولزی درون راکتور هیدرولیز باقی می‌مانند و در دمای بهینهٔ آنزیم هیدرولیز می‌شوند. سپس مایع خروجی از این راکتور خارج می‌شود و درون راکتور تخمیر به گردش درمی‌آید که دمای آن روی دمای بهینهٔ رشد میکروارگانیسم تخمیری تنظیم شده است (۵۱).

روش هیدرولیز و تخمیر جداگانه: همان‌طور که از نام این روش پیداست، هیدرولیز آنزیمی ترکیبات لیگنوسلولزی به‌منظور آزادسازی واحدهای قندی از

بخش پلیمری و تبدیل قندهای آزادشده به اتانول توسط مخمر یا مخمرهای مختلف در مراحل و راکتورهای جداگانه‌ای صورت می‌گیرد (۵۱, ۸۸)؛ البته، تولید آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی نیز بخشی از این روش محسوب می‌شود؛ اما می‌توان آنزیم‌های مورد نیاز را به‌صورت تجاری تهیه کرد (۸۹). اثر مهاری محصول نهایی اصلی‌ترین مشکل این روش است؛ برای مثال، سلوبیوز تولیدشده در بخش هیدرولیز به‌عنوان مهارکنندهٔ سلولاز عمل می‌کند. همچنین این روش به زمان زیادی به‌خصوص برای بخش هیدرولیز نیازمند بوده و گران قیمت است (۴۰, ۵۸).

روش پردازش زیستی یکی‌شده: در تمامی روش‌های توضیح داده شده، یک نکتهٔ مشترک وجود دارد و آن نیاز به یک واحد جداگانه برای تولید آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی یا تأمین آنها به‌صورت تجاری است. همچنین، وجود سموم آزادشده در مرحلهٔ پیش‌تیمار ترکیبات لیگنوسلولزی و مشکلات مربوط به تخمیر همزمان قندهای پنج و شش کربنه، فرایند تولید اتانول زیستی را به چندین مرحله تقسیم کرده است؛ درنتیجه، برای کاهش هزینه‌های سرمایه‌گذاری اولیه و حین فرایند، در هم ادغام کردن برخی مراحل و ساده‌سازی آنها تا جای ممکن، روشی را به نام روش پردازش زیستی یکی‌شده به وجود آورده است (۲۷, ۸۸). در این روش، از یک نوع میکروارگانیسم یا یک کشت مخلوط[۷۹] از میکروارگانیسم‌هایی استفاده می‌شود که آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی را تولید و سپس قندهای پنج و شش کربنهٔ تولیدشده را به اتانول و دیگر ترکیبات با ارزش تبدیل می‌کنند (۹۰, ۹۱). یکی از ویژگی‌های این روش، بی‌نیازی از افزودن آنزیم‌های سلولازی و هموسلولازی خالص به‌صورت جداگانه است که مشکل استفاده از آنزیم‌های صنعتی گران قیمت را برطرف می‌کند (۹۲). همچنین، دمای بهینهٔ هیدرولیز و تخمیر یکسان است و به راکتور جداگانه برای هیدرولیز آنزیمی یا تخمیر نیاز نیست (۲۲, ۹۳). *کلستریدیم ترموسلوم*[۸۰] میکروارگانیسم اصلی استفاده‌شده در این فرایند است که با تولید طبیعی سلولازها، زیست‌توده را به قندهای قابل تخمیر، تجزیه و سپس اتانول تولید می‌کند (۵۸).

میکروارگانیسم‌های استفاده‌شده در تولید اتانول زیستی: با توجه به مراحل مختلف تولید اتانول زیستی، بسیاری از میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها و مخمرها می‌توانند برای تولید این سوخت زیستی استفاده شوند (۹۴). علاوه بر مخمرها و باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای مانند *موکور ایندیکوس*[۸۱]، *نوروسپورا اینترمدیا*[۸۲]، *رایزوپوس اورایزه*[۸۳]، *پنیوفورا سینرئال*[۸۴] و *ترامیتس سایئولنس*[۸۵] برای تولید اتانول بررسی شده‌اند (۸۷, ۹۵, ۹۶). بعضی از این میکروارگانیسم‌ها قادر به تخمیر قندهای پنج و شش کربنه هستند و با توجه به اینکه بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها هم توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی را دارند و هم توانایی تولید اتانول، می‌توان از آنها برای پردازش زیستی یکی‌شده استفاده کرد. با وجود این، بازده کم اتانول، به‌دلیل تشکیل مقادیر چشمگیری از محصولات جانبی (برای مثال، اسید استیک)، بهره‌وری پایین و نرخ رشد کم از معایب تولید اتانول توسط قارچ‌های رشته‌ای به شمار می‌روند (۸۷)؛ بنابراین، تلاش‌ها برای دستورزی ژنتیکی میکروارگانیسم‌هایی افزایش یافته است که قابلیت‌هایی همچون مصرف قندهای پنج کربنه، تحمل به غلظت‌های بالای اتانول و

بازدهی تولید بالا را یکجا داشته باشند. در برخی از مطالعات نشان داده شده است جهش‌یافته‌هایی از جنس *ژئوباسیلوس* که در ژن لاکتات دهیدروژناز خود نقص دارند، اتانول بیشتری تولید می‌کنند. همچنین، این جنس از نقطه‌نظر مهندسی متابولیک برای تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی حاصل از زیست‌توده‌های گیاهی، دستورزی ژنتیکی نیز شده است (۲, ۹۷). برخی از انواع میکروارگانیسم‌هایی که در این فرایند به کار می‌روند، در ادامه توضیح داده شده‌اند. انواعی از مخمرهایی که در تولید اتانول زیستی کاربرد دارند، در جدول ۲ آورده شده‌اند.

جدول ۲- برخی از انواع مخمرهای استفاده‌شده در فرایند تولید اتانول زیستی

نام علمی	مزایا	معایب	منابع
ساکارومایسس سرویزیه	- تحمل طیف وسیعی از pH - بازده تولید بالا	- حساسیت به غلظت بالای اتانول - استرس اسمزی - احتمال آلودگی کشت با باکتری‌های اسیددوست - کاهش کارایی تولید در حضور مهارکننده‌ها	(۹۹ ,۹۸)
اسکیتزوساکارومایسس پومبه[۸۶]	- تحمل طیف وسیعی از pH و دما - مقاومت به سموم و نگهدارنده‌ها	- سرعت رشد پایین - تولید مقادیر زیادی از سولفید هیدروژن طی فرایند تخمیر	(۱۰۰)
کلایوروما یسس مارکسیانوس[۸۷]	- توانایی مصرف طیف وسیعی از قندهای پنج، شش و ۱۲ کربنه - مقاومت در برابر دمای بالا و سموم - تحمل طیف وسیعی از pH	- بازده تولید پایین	(۱۰۱)
پاکیسولن تانوفیلوس[۸۸]	- توانایی مصرف طیف وسیعی از قندهای پنج و شش کربنه	- حساسیت به غلظت‌های بالای اتانول - نیازمندی به ایجاد شرایط میکروآئروفیلی دقیق - حساسیت بالا به مهارکننده‌ها - ناتوانی در تخمیر زایلوز در pHهای پایین	(۱۰۳ ,۱۰۲)
کاندیدا شهاتائی[۸۹]	- توانایی مصرف قندهای پنج و شش کربنه	- حساسیت به غلظت‌های بالای اتانول	(۱۰۳)
پیچیا استیپیتیس[۹۰]	- بالاترین ظرفیت تخمیز زایلوز بین مخمرهای متداول	حساسیت به غلظت‌های بالای اتانول - نیازمندی به ایجاد شرایط میکروآئروفیلی دقیق	(۱۰۵ ,۱۰۴)

ساکارومایسس سرویزیه: *ساکارومایسس سرویزیه* معمول‌ترین مخمری است که در فرایند تولید الکل استفاده می‌شود. این مخمر می‌تواند در شرایط بهینه با سرعت بسیار بالایی فرایند گلیکولیز را انجام دهد و از گلوکز تولید اتانول کند؛ درحالی‌که قادر به مصرف قندهای پنج کربنه به‌ویژه زایلوز نیست و این مسئله بر کارایی *ساکارومایسس سرویزیه* دربارهٔ تخمیر شیرابه‌های لیگنوسلولزی تأثیرگذار است که بخشی از آنها قندهای پنج کربنهٔ حاصل از تخریب همی‌سلولزهاست (۱۰۶, ۱۰۷).

میزان اتانول تولیدی در شرایط بهینه از گلوکز تا ۵۰ میلی‌مول در ساعت در هر گرم از پروتئین سلولی

ساکارومایسس سرویزیه می‌رسد؛ اما این شرایط تنها برای مدت کوتاهی در کشت تخمیری بسته ایجاد می‌شود و با افزایش غلظت اتانول در محیط اطراف سلول‌ها، سرعت تولید به شدت کاهش می‌یابد (۳۹, ۱۰۸). عوامل محیطی زیادی در تعیین غلظت بحرانی اتانول نقش دارند که سبب مهار رشد مخمر و کاهش بازده فرایند تولید می‌شوند؛ ازجمله دما، pH، ترکیبات مهارکننده‌ای مانند هیدروکسی فورفورال، فورفورال، استات و ... موجود در شیرابهٔ لیگنوسلولزی، ترکیبات محیط کشت تخمیری مانند عصارهٔ مخمر و یون‌های کلسیم، منیزیم و آمونیوم و ترکیبات دیگری مانند بیوتین، مزو-اینوزیتول و پانتوتنیک‌اسید که برای رشد سلول‌های مخمری ضروری‌اند. کاهش میزان ترکیبات مهارکننده به زیر حد مهارکنندگی، افزایش زیست‌تودهٔ مخمری و استفاده از سلول‌های تثبیت‌شده در خود فرمانتور بدون وجود مواد پوشش‌دهنده از راهکارهای مقابله با این مسئله است (۱۰۹, ۱۱۰). در مطالعه‌ای که ایمانی و همکاران انجام دادند، لجن فعال به‌عنوان مکمل در محیط کشت تولید اتانول زیستی توسط *ساکارومایسس سرویزیه* استفاده شد که نتایج نشان دادند استفاده از ۱۰ گرم در لیتر لجن فعال به همراه گلوکز در محیط کشت این مخمر، بازده تولید اتانول زیستی را تا ۹۰ درصد افزایش داده است (۱۱۱). همچنین، در مطالعهٔ اخیری که رباط جزی و همکاران منتشر کردند، مشخص شد شربت گلوکز و عصارهٔ خیساندهٔ ذرت می‌توانند جایگزین مناسبی برای محیط کشت حاوی ملاس در تولید اتانول زیستی توسط *ساکارومایسس سرویزیه* باشند (۱۱۲). علاوه بر ترکیبات محیط کشت، سویه یا سویه‌هایی که برای تولید اتانول زیستی از مواد لیگنوسلولزی به کار برده می‌شوند، باید مسیرهای متابولیکی متنوعی داشته باشند (برای مثال، قابلیت مصرف زایلوز)، با تغییرات pH و دما خود را تطبیق دهند، اثرات سمی الکل را تحمل کنند و توانایی تولید اتانول نزدیک به میزان بیشینهٔ تئوری را داشته باشند (۳۷, ۱۱۳). علاوه بر این، سویه‌های نوترکیب این مخمر که پایداری ژنتیکی و بیان قابل قبولی دارند، می‌توانند در افزایش بازده تولید اتانول زیستی نقش داشته باشند (۱۱۴).

قارچ های بی‌هوازی: قارچ‌های بی‌هوازی متعلق به راستهٔ *نئوکالیماستیگومایکوتا*[91] نیز گزینه مناسبی برای تولید اتانول زیستی محسوب می‌شوند؛ زیرا آنها توانایی چشمگیری در تجزیهٔ ترکیبات لیگنوسلولزی خام دارند و قادر به تبدیل اجزای پلیمری دیوارهٔ سلول‌های گیاهان به هیدورژن و اتانول هستند. قارچ‌های بی‌هوازی معمولا در مجاری گوارشی پستانداران بزرگ گیاه‌خوار یافت می‌شوند. ترکیبی از روش‌های مهندسی فرایند و مهندسی ژنتیک (مولکولی) می‌تواند به انتقال موفقیت‌آمیز قارچ‌های بی‌هوازی از زیستگاه طبیعی آنها در گیاه‌خواران به بهره‌برداری مؤثر در تولید سوخت‌های زیستی صنعتی کمک کند. در استفاده از مهندسی فرایند توجه به جنبه‌های طراحی مانند ساختار مخازن تخمیر، زمان ماند، تلقیح مناسب و ورودی سوبسترای گیاهی ضروری است. مهندسی ژنتیک نیز فرصتی را برای دستورزی سلول‌های قارچی بی‌هوازی و بهره‌برداری از پتانسیل ژنتیکی آنها برای محصولات بیشتر و هیدرولیز سریع‌تر ترکیبات لیگنوسلولزی فراهم می‌کند (۱۱۵).

باکتری‌های گرمادوست: استفاده از باکتری‌های گرمادوست برای تخمیر قندی و تولید اتانول زیستی مزایایی دارد که عبارت‌اند از (۱۱۶-۱۱۹) خواص

فیزیکی مناسب محیط کشت در دماهای بالا (کاهش گرانروی، کشش سطحی و درنهایت، کاهش مصرف انرژی برای همزنی و جداسازی آسان‌تر مواد جامد از مایع)، سرعت بالای واکنش نسبت به میانه‌پسندها، رشد سریع و سرعت بالا در مصرف سوبسترا، بازده تولید بالا در هر واحد سوبسترا، افزایش ارزش گرمایی متابولیکی، کاهش حلالیت اکسیژن (مناسب برای تولید اتانول با کمک باکتری‌های بی‌هوازی)، تسهیل در به دست آوردن محصول (به‌علت فشار بخار بالای ترکیبات فرار)، پایین‌بودن هزینه‌های خنک‌کردن سامانه، در دسترس‌پذیری زیستی و حلالیت بیشتر ترکیبات آلی در دماهای بالا، آلوده‌نشدن محیط کشت با میکروارگانیسم‌های میانه‌پسند و مصرف قندهای پنج کربنه و تولید آنزیم‌های سلولازی موجود در مکان (این دو ویژگی آخر می‌توانند در تعامل با یکدیگر تا ۴۷ درصد بازده تولید اتانول از هر واحد سوبسترای چوبی را افزایش دهند). همچنین، نیازی نیست مراحل هیدرولیز آنزیمی و تخمیر جدا شوند. ترکیب این مراحل می‌تواند اثر مهاری محصول نهایی را با تولید محصولات حاصل از هیدرولیز آنزیمی کاهش دهد که درنهایت، به کاهش هزینه‌های کلی منجر می‌شود؛ اما باید توجه داشت ممکن است سلولازهای صنعتی استفاده‌شده، در شرایط احیایی محیط کشت‌های باکتری‌های گرمادوست بی‌هوازی غیرفعال شوند (۳, ۱۲۰). باوجود مزایای فراوان باکتری‌های گرمادوست در تولید اتانول زیستی، استفاده از باکتری‌های گرمادوست بی‌هوازی به‌ویژه *کلستریدیوم‌ها* برای تولید اتانول زیستی در مقیاس صنعتی مناسب نیست که مهم‌ترین آنها عبارت‌اند از تولید اسیدهای آلی مانند اسید استیک و اسید لاکتیک علاوه بر اتانول از قندهای آزادشده از ترکیبات لیگنوسلولزی، ناتوانی یا محدودیت در مصرف قندهای پنج کربنه به‌ویژه زایلوز و زایلوبیوز، پایین‌بودن بازدهی اتانول تولیدی، پایین‌بودن آستانهٔ تحمل نسبت به اتانول تولیدشده در محیط به‌علت ایجاد سیالیت در غشای سلولی که سبب به هم خوردن عملکرد غشا می‌شود، مهار برخی آنزیم‌های گلیکولازی یا به هم خوردن تعادل پتانسیل اکسید و احیای سلول، کند رشد و سخت رشد بودن، داشتن نیازمندی‌های پیچیدهٔ غذایی که ساخت محیط کشت را دشوار می‌کند و نبود یک سامانهٔ ژنتیکی مناسب برای دستورزی سویه‌های گرمادوست بی‌هوازی (۱۱۹, ۱۲۱, ۱۲۲).

زایموموناس موبیلیس[۹۲]: در میان باکتری‌ها، *زایموموناس موبیلیس* بیشتر از دیگر باکتری‌ها مطالعه شده است که یک باکتری گرم منفی و قادر به تخمیر گلوکز، ساکارز و فروکتوز است. درمقایسه با مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*، باکتری *زایموموناس موبیلیس* دارای بازدهی بهره‌وری ویژهٔ اتانول بالایی است؛ زیرا زیست‌تودهٔ کمتری را تولید و غلظت بالاتری از اتانول را تحمل می‌کند. با این حال، این باکتری قادر به استفاده از انواع محدودتری از قندهاست و تحمل کمتری به مهارکننده‌هایی مانند اسید استیک دارد. علاوه بر این، *زایموموناس موبیلیس* تنها در محدودهٔ pH خنثی رشد می‌کند که ویژگی مشترک بیشتر گونه‌های باکتریایی است (۸۷). ویژگی جالبی که این باکتری دارد مربوط به غشای پلاسمایی آن است که حاوی هوپانوئیدهاست (ترکیبات پنج حلقه‌ای مانند استرول‌های یوکاریوتی)؛ بنابراین، تحمل فوق‌العاده‌ای به اتانول (حدود ۱۶ درصد وزنی) نشان می‌دهد. تلاش‌های متعددی برای مهندسی *زایموموناس موبیلیس* انجام شده است تا با مهندسی متابولیسم، جهش‌زایی یا جهش تطبیقی بر نقص ذاتی این باکتری غلبه شود و

سویه‌های مقاوم به اسید استیک ایجاد شود. با این حال، هنگامی که این سویه‌های مهندسی‌شده قندهای مخلوط را در حضور مهارکننده‌ها متابولیزه می‌کنند، بازده و بهره‌وری بسیار پایین‌تر است و سبب ایجاد محدودیت آنها در کاربری صنعتی می‌شود (۴۰). در برخی موارد نیز می‌توان ژن‌های کلیدی فرایند تولید اتانول زیستی را از *زایموموناس موبیلیس* به سویه‌های *اشریشیا کلای*، منتقل و سویه‌هایی با قابلیت‌های بهبودیافته ایجاد کرد (۱۲۳).

***استرپتومایسس فولویسیموس* CKS7[۹۳]:** به‌طور کلی، اعضای جنس *استرپتومایسس* پتانسیل چشمگیری برای به‌کارگیری در تولید سوخت‌های زیستی دارند. *استرپتومایسس فولویسیموس* که گونه‌ای از این جنس است، انواع مختلفی از آنزیم‌های هیدرولیزکنندهٔ خارج سلولی همچون سلولازها (کربوکسی‌متیل‌سلولاز و آوی‌سلاز)، آمیلاز، پکتیناز و زایلاناز تولید می‌کند. این سویه قادر به رشد در پلیت حاوی سلولز، نشاسته، زایلان و پکتین آگار است و در بازهٔ دمایی ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد با دمای بهینهٔ رشد ۳۰ درجه سانتی‌گراد، pH بین ۸-۶ و pH بهینهٔ ۷ رشد می‌کند. سویهٔ CKS7 قادر به هیدرولیز هر دو شکل سلولز محلول و نامحلول سلولز است و می‌تواند روی ضایعات مختلف کشاورزی رشد کند. به نظر می‌رسد سبوس چاودار مناسب‌ترین سوبسترای زائد برای تبدیل زیستی توسط این سویه است. اگرچه بازدهی اتانول حاصل از آن متوسط است، این سویه مشابه سایر اعضای جنس *استرپتومایسس* گزینهٔ امیدوارکننده‌ای برای تجزیهٔ ضایعات لیگنوسلولزی است که می‌تواند در تولید سوخت‌های زیستی استفاده شود (۱۲۴).

جمع‌بندی

آسیب‌های زیست‌محیطی سوخت‌های فسیلی جهان را به سمت یافتن منابع جدید انرژی ازجمله سوخت‌های زیستی سوق داده است. یکی از متداول‌ترین سوخت‌های زیستی اتانول است که تاکنون نسل‌های مختلفی از آن ایجاد شده است. بین این نسل‌ها، به‌طور ویژه‌ای به نسل دوم اتانول زیستی توجه شده است؛ زیرا مشکلات نسل اول ازجمله رقابت با غذای انسان را ندارد و قابلیت صنعتی‌شدن آن بیشتر از نسل سوم و چهارم است؛ درنتیجه، مطالعهٔ دقیق فرایند تولید اتانول زیستی نسل دوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که درواقع تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی است. شناخت درست اجزای ترکیبات لیگنوسلولزی، بهینه‌سازی روش‌های پیش‌تیمار و یافتن روش هیدرولیز و تخمیر با بازده بالا ازجمله مواردی‌اند که باید به دقت بررسی شوند تا این فرایند را از لحاظ صنعتی مقرون‌به‌صرفه کنند. باوجود پژوهش‌های گسترده‌ای که برای انتخاب مناسب‌ترین میکروارگانیسم در مرحلهٔ تخمیر انجام شده است، همچنان *ساکارومایسس سرویزیه* و *زایموموناس موبیلیس* در صدر بررسی‌ها قرار دارند. باکتری *زایموموناس* موبیلیس بازدهی خوبی را در تولید اتانول نشان می‌دهد؛ اما حساسیت آن به برخی مهارکننده‌ها چالش‌برانگیز است. اصلی‌ترین ایراد واردشده به مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* نیز عدم توانایی آن در مصرف قندهای پنج کربنه است؛ البته سویه‌های باکتریایی و قارچی دیگری نیز با توانایی تولید اتانول شناسایی شده‌اند که هریک ویژگی‌های منحصربه‌فرد و مفیدی دارند و می‌توان با روش‌های نوین به جایگزین‌های بهتری برای سویه‌های فعلی رسید.

References

(1) Ghaffari MH, Khajavi S. Investigation of production, evolution, advantages and disadvantages and scope of biofiols usage. The first bioenergy conference in Iran Eslamshahr; 2010.

(2) Taylor MP, Eley KL, Martin S, Tuffin MI, Burton SG, Cowan DA. Thermophilic ethanologenesis: future prospects for second-generation bioethanol production. *Trends in biotechnology*. 2009; 27(7): 398-405.

(3) Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied microbiology and biotechnology*. 2001; 56(1): 17-34.

(4) Bioenergy Production 2021 [Available from: https: //www.iea.org/fuels-and-technologies/bioenergy.

(5) Itskos G, Nikolopoulos N, Kourkoumpas DS, Koutsianos A, Violidakis I, Drosatos P, et al. Chapter 6 - Energy and the Environment. In: Poulopoulos SG, Inglezakis VJ, editors. Environment and Development. Amsterdam: Elsevier; 2016. p. 363-452.

(6) Magda R, Szlovák S, Tóth J. Chapter 7 - The role of using bioalcohol fuels in sustainable development. *In: Bochtis D, Achillas C, Banias G, Lampridi M, editors. Bio-Economy and Agri-production.* Academic Press; 2021. p. 133-46.

(7) Paye JM, Guseva A, Hammer SK, Gjersing E, Davis MF, Davison BH, et al. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnology for biofuels*. 2016; 9(1): 1-13.

(8) Datta A, Hossain A, Roy S. *An overview on biofuels and their advantages and disadvantages*; 2019.

(9) Naeini MA, Zandieh M, Najafi SE, Sajadi SM. Analyzing the development of the third-generation biodiesel production from microalgae by a novel hybrid decision-making method: The case of Iran. *Energy*. 2020; 195: 116895.

(10) Streimikiene D, Simionescu M, Bilan Y. The impact of biodiesel consumption by transport on economic growth in the European Union. *Engineering Economics*. 2019; 30(1): 50-8.

(11) Abo BO, Gao M, Wang Y, Wu C, Ma H, Wang Q. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on environmental health*. 2019; 34(1): 57-68.

(12) Nahak S, Nahak G, Pradhan I, Sahu R. Bioethanol from marine algae: a solution to global warming problem. *J Appl Environ Biol Sci*. 2011; 1(4): 74-80.

(13) Mukherjee V, Radecka D, Aerts G, Verstrepen KJ, Lievens B, Thevelein JM. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnology for biofuels*. 2017; 10(1): 1-19.

(14) Saha S, Sharma A, Purkayastha S, Pandey K, Dhingra S. 14 - Bio-plastics and Biofuel: Is it the Way in Future Development for End Users? *In: Al-Salem SM, editor. Plastics to Energy: William Andrew Publishing*; 2019. p. 365-76.

(15) Niphadkar S, Bagade P, Ahmed S. Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. *Biofuels*. 2018; 9(2): 229-38.

(16) Welker CM, Balasubramanian VK, Petti C, Rai KM, DeBolt S, Mendu V. Engineering plant biomass lignin content and composition for biofuels and bioproducts. *Energies*. 2015; 8(8): 7654-76.

(17) Fatma S, Hameed A, Noman M, Ahmed T, Shahid M, Tariq M, et al. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. *Protein and peptide letters*. 2018; 25(2): 148-63.

(18) Mirzadeh M. Using bioethanol as energy resource and decreasing the pollution of

environment. *Journal-of-Biosafety*. 2017; 10(2): 53-72.

(19) Lynd LR, Parisi F. *Lignocellulosic Materials*. Springer-Verlag; 1989.

(20) Stang GD, Macdonald DG, Hill GA. Mass Transfer and Bioethanol Production in an External-Loop Liquid-Lift Bioreactor. I*ndustrial & Engineering Chemistry Research*. 2001; 40(23): 5074-80.

(21) van Zyl WH, Chimphango AFA, den Haan R, Görgens JF, Chirwa PWC. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. *Interface Focus*. 2011; 1(2): 196-211.

(22) Rana V, Rana D. *Renewable Biofuels: Bioconversion of Lignocellulosic Biomass by Microbial Community*. Springer International Publishing; 2016.

(23) Scheller H.V., Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 2010; 61(1): 263-89.

(24) Acharya S, Chaudhary A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Braz J Microbiol*. 2012; 43(3): 844-56.

(25) Liao JC, Mi L, Pontrelli S, Luo S. Fuelling the future: microbial engineering for the production of sustainable biofuels. *Nat Rev Microbiol*. 2016; 14(5): 288-304.

(26) Klinke HB, Thomsen A, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied microbiology and biotechnology*. 2004; 66(1): 10-26.

(27) Taherzadeh MJ, & Karimi K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*. 2007; 2(4): 707-738.

(28) Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, et al. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. *Frontiers in Energy Research*. 2018; 6(141).

(29) Saadati A, Pourtahmasi K. The ability of bioenergy production from hemp biomass. The first national conference on natural resource management Gonbad Kavous: Gonbad Kavous University; 2014.

(30) Crespo CF, Badshah M, Alvarez MT, Mattiasson B. Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe Caloramator boliviensis. *Bioresource technology*. 2012; 103(1): 186-91.

(31) Decker SR, Adney WS, Jennings E, Vinzant TB, Himmel ME. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003; 107(1): 689-703.

(32) Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(3): 506-77.

(33) Maki M, Leung KT, Qin W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International journal of biological sciences*. 2009; 5(5): 500.

(34) Baltz RH, Demain AL, Davies JE. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. ASM Press; 2010.

(35) Tuncer Mr, Ball AS, Rob A, Wilson MT. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete Thermomonospora fusca BD25. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999; 25(1): 38-47.

(36) Kulkarni N, Shendye A, Rao M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*. 1999; 23(4): 411-56.

(37) Zabed H, Sahu JN, Suely A, Boyce AN, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017; 71: 475-501.

(38) De Maayer P, Brumm PJ, Mead DA,

Cowan DA. Comparative analysis of the Geobacillus hemicellulose utilization locus reveals a highly variable target for improved hemicellulolysis. *BMC Genomics*. 2014; 15(1): 836.

(39) Robak K, Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food technology and biotechnology*. 2018; 56(2): 174-87.

(40) Kang Q, Appels L, Tan T, Dewil R. Bioethanol from lignocellulosic biomass: current findings determine research priorities. *The Scientific World Journal*. 2014; 2014.

(41) Blumer-Schuette SE, Brown SD, Sander KB, Bayer EA, Kataeva I, Zurawski JV, et al. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014; 38(3): 393-448.

(42) Hendriks A, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*. 2009; 100(1): 10-8.

(43) Silveira MHL, Morais ARC, da Costa Lopes AM, Olekszyszen DN, Bogel-Łukasik R, Andreaus J, et al. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *ChemSusChem*. 2015; 8(20): 3366-90.

(44) Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M. Bioethanol Production by Enzymatic Hydrolysis from Different Lignocellulosic Sources. *Molecules*. 2021; 26(3): 753.

(45) Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2002; 66(3): 506-77.

(46) Yang S-T, El-Ensashy H, Thongchul N. *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*; 2013.

(47) energy and biorefinery: feedstock, biotechnological conversion, and products. *Biotechnology journal*. 2019; 14(6): 1800494.

(48) Kahani S, Shafiei M, Abdolmaleki A, Karimi K. Enhancement of ethanol production by novel morpholinium ionic liquids. *Journal of Cleaner Production*. 2017; 168: 952-62.

(49) Zabed H, Sahu J, Suely A, Boyce A, Faruq G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017; 71: 475-501.

(50) Rezania S, Oryani B, Cho J, Talaiekhozani A, Sabbagh F, Hashemi B, et al. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*. 2020; 199: 117457.

(51) Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review. *BioResources*. 2007; 2(4): 707-38.

(52) Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*. 2008; 9(9): 1621-51.

(53) Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, et al. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*. 2018; 6: 141.

(54) Dey P, Pal P, Kevin JD, Das DB. Lignocellulosic bioethanol production: prospects of emerging membrane technologies to improve the process–a critical review. *Reviews in Chemical Engineering*. 2020; 36(3): 333-67.

(55) Kumar AK, Sharma S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresources and bioprocessing*. 2017; 4(1): 1-19.

(56) Muktham R, Bhargava SK, Bankupalli S, Ball AS. A review on 1st and 2nd generation bioethanol production-recent progress.

Journal of Sustainable Bioenergy Systems. 2016; 6(3): 72-92.

(57) Su T, Zhao D, Khodadadi M, Len C. Lignocellulosic biomass for bioethanol: Recent advances, technology trends, and barriers to industrial development. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2020; 24: 56-60.

(58) Sharma B, Larroche C, Dussap C-G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. *Bioresource technology*. 2020; 313: 123630.

(59) Purwadi R, Brandberg T, Taherzadeh MJ. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *International Journal of Molecular Sciences*. 2007; 8(9): 920-32.

(60) Hashemi SS, Karimi K, Sabzalian MR. Improvement of Biogas and Ethanol Production from Safflower Straw Using Sodium Hydroxide Pretreatment. *Biological Journal of Microorganism*. 2017; 6(22): 27-43.

(61) Decker SR, Adney WS, Jennings E, Vinzant TB, Himmel ME. Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*: Springer; 2003. p. 689-703.

(62) Singh N, Devi A, Bishnoi MB, Jaryal R, Dahiya A, Tashyrev O, et al. Overview of the process of enzymatic transformation of biomass. *Elements of Bioeconomy*. 2019.

(63) Méndez J, de França Passos D, Wischral D, Modesto LF, Pereira Jr N. Second-generation ethanol production by separate hydrolysis and fermentation from sugarcane bagasse with cellulose hydrolysis using a customized enzyme cocktail. *Biofuels*. 2019.

(64) Zhuang X, Wang W, Yu Q, Qi W, Wang Q, Tan X, et al. Liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource technology*. 2016; 199: 68-75.

(65) Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and bioenergy*. 2008; 32(5): 422-30.

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

(67) Balan V, Chiaramonti D, Kumar S. Review of US and EU initiatives toward development, demonstration, and commercialization of lignocellulosic biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2013; 7(6): 732-59.

(68) Méndez Arias J, Modesto LFA, Polikarpov I, Pereira Jr N. Design of an enzyme cocktail consisting of different fungal platforms for efficient hydrolysis of sugarcane bagasse: optimization and synergism studies. *Biotechnology progress*. 2016; 32(5): 1222-9.

(69) Acharya S, Chaudhary A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012; 43: 844-56.

(70) Zinoviev S, Müller-Langer F, Das P, Bertero Ns, Fornasiero P, Kaltschmitt M, et al. Next-generation biofuels: survey of emerging technologies and sustainability issues. *ChemSusChem*. 2010; 3(10): 1106-33.

(71) Tuncer Mr, Ball AS, Rob A, Wilson MT. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a thermophilic actinomycete Thermomonospora fusca BD25. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999; 25(1-2): 38-47.

(72) Wang S-L, Yen Y-H, Shih L, Chang AC, Chang W-T, Wu W-C, et al. Production of xylanases from rice bran by Streptomyces actuosus A-151. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003; 33(7): 917-25.

(73) Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy conversion and*

management. 2011; 52(2): 858-75.

(74) Van Zyl WH, Chimphango A, Den Haan R, Görgens J, Chirwa P. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. *Interface Focus*. 2011; 1(2): 196-211.

(75) Zhao X, Xiong L, Zhang M, Bai F. Towards efficient bioethanol production from agricultural and forestry residues: exploration of unique natural microorganisms in combination with advanced strain engineering. *Bioresource technology*. 2016; 215: 84-91.

(76) Lin C-W, Wu C-H, Tran D-T, Shih M-C, Li W-H, Wu C-F. Mixed culture fermentation from lignocellulosic materials using thermophilic lignocellulose-degrading anaerobes. *Process Biochemistry*. 2011; 46(2): 489-93.

(77) Schiraldi C, De Rosa M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in biotechnology*. 2002; 20(12): 515-21.

(78) Bušić A, Marđetko N, Kundas S, Morzak G, Belskaya H, Ivančić Šantek M, et al. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review. *Food technology and biotechnology*. 2018; 56(3): 289-311.

(79) Harnos S, Onyestyák G, Valyon J. A study of the catalytic hydroconversion of biocarboxylic acids to bioalcohols using octanoic acid as model reactant. *Applied Catalysis A: General*. 2012; 439: 31-40.

(80) Vane LM, Alvarez FR, Rosenblum L, Govindaswamy S. Efficient ethanol recovery from yeast fermentation broth with integrated distillation–membrane process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013; 52(3): 1033-41.

(81) Motamedi H, Hedayatkhah A, Amopour Bahnamiry M. A review on Bioethanol production through biomass biorefinery. *Journal of Environmental Science and Technology*. 2015.

(82) Krishna SH, Reddy TJ, Chowdary G. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology*. 2001; 77(2): 193-6.

(83) Yudianto D, NAINGGOLAN EA, Millati R, Hidayat C, Lennartsson P, Taherzadeh MJ, et al. Bioconversion of pretreated wheat straw to ethanol by monascus purpureus CBS 109.07 and fusarium venenatum ATCC 20334 using simultaneous saccharification and fermentation. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*. 2019; 20(8).

(84) Ishola MM, Babapour AB, Gavitar MN, Brandberg T, Taherzadeh MJ. Effect of high solids loading on bacterial contamination in lignocellulosic ethanol production. *Bioresources*. 2013; 8(3): 4429-39.

(85) Larsen J, Haven MØ, Thirup L. Inbicon makes lignocellulosic ethanol a commercial reality. *Biomass and Bioenergy*. 2012; 46: 36-45.

(86) Crespo C, Pozzo T, Karlsson EN, Alvarez MT, Mattiasson B. Caloramator boliviensis sp. nov., a thermophilic, ethanol-producing bacterium isolated from a hot spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2012; 62(Pt_7): 1679-86.

(87) Branco RH, Serafim LS, Xavier AM. Second generation bioethanol production: on the use of pulp and paper industry wastes as feedstock. *Fermentation*. 2019; 5(1): 4.

(88) Devarapalli M, Atiyeh HK. A review of conversion processes for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. *Biofuel Research Journal*. 2015; 2(3): 268-80.

(89) Chang T, Yao S. Thermophilic, lignocellulolytic bacteria for ethanol production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011; 92(1): 13-27.

(90) Svetlitchnyi VA, Kensch O, Falkenhan DA, Korseska SG, Lippert N, Prinz M, et al. Single-step ethanol production from

lignocellulose using novel extremely thermophilic bacteria. *Biotechnology for Biofuels*. 2013; 6(1): 31.

(91) Brethauer S, Studer MH. Consolidated bioprocessing of lignocellulose by a microbial consortium. *Energy & Environmental Science*. 2014; 7(4): 1446-53.

(92) Paye JMD, Guseva A, Hammer SK, Gjersing E, Davis MF, Davison BH, et al. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2016; 9(1): 8.

(93) Blumer-Schuette SE, Brown SD, Sander KB, Bayer EA, Kataeva I, Zurawski JV, et al. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS microbiology reviews*. 2014; 38(3): 393-448.

(94) Mohseni M, Ebrahimi H. Isolation, identification and optimization of ethanol producing bacteria from Saccharomyces-based fermentation process of alcohol industries in Iran. *Biological Journal of Microorganism*. 2013; 2(7): 15-28.

(95) Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by Mucor indicus. *Process Biochemistry*. 2006; 41(3): 653-8.

(96) Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with Mucor indicus, Rhizopus oryzae, and Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 40(1): 138-44.

(97) Cripps R, Eley K, Leak DJ, Rudd B, Taylor M, Todd M, et al. Metabolic engineering of Geobacillus thermoglucosidasius for high yield ethanol production. *Metabolic engineering*. 2009; 11(6): 398-408.

(98) Karsch T, Stahl U, Esser K. Ethanol production by Zymomonas and Saccharomyces, advantages and disadvantages. *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 1983; 18(6): 387-91.

(99) Mohd Azhar SH, Abdulla R, Jambo SA, Marbawi H, Gansau JA, Mohd Faik AA, et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017; 10: 52-61.

(100) Loira I, Morata A, Palomero F, González C, Suárez-Lepe JA. Schizosaccharomyces pombe: A promising biotechnology for modulating wine composition. *Fermentation*. 2018; 4(3): 70.

(101) Ha-Tran DM, Nguyen TTM, Huang C-C. Kluyveromyces marxianus: Current state of Omics studies, strain improvement strategy and potential industrial implementation. *Fermentation*. 2020; 6(4): 124.

(102) Maningat CC, Bassi SD. FUEL ALCOHOL PRODUCTION. *In: Wrigley C, editor. Encyclopedia of Grain Science*. Oxford: Elsevier; 2004. p. 405-14.

(103) Ward OP, Singh A. Bioethanol Technology: Developments and Perspectives. In: Laskin AI, Bennett JW, Gadd GM, editors. *Advances in Applied Microbiology. 51*: Academic Press; 2002. p. 53-80.

(104) Ishizaki H, Hasumi K. Chapter 10 - Ethanol Production from Biomass. In: Tojo S, Hirasawa T, editors. *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*. Boston: Academic Press; 2014. p. 243-58.

(105) Ahi M, Azin M, Shojaosadati SA, Vasheghani Farahani E, Nosrati M. Optimization of media for bioethanol production by Pichia stipitis from sugarcane bagasse pretreated by dilute acid. *Biological Journal of Microorganism*. 2014; 3(9): 11-20.

(106) Dombek K, Ingram L. Ethanol production during batch fermentation with Saccharomyces cerevisiae: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Applied and environmental microbiology*. 1987;

53(6): 1286-91.

(107) Moysés DN, Reis VCB, Almeida JRMd, Moraes LMPd, Torres FAG. Xylose fermentation by Saccharomyces cerevisiae: challenges and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17(3): 207.

(108) Dombek KM, Ingram LO. Ethanol production during batch fermentation with Saccharomyces cerevisiae: changes in glycolytic enzymes and internal pH. *Appl Environ Microbiol*. 1987; 53(6): 1286-91.

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

(110) Hatami Manesh M, Younesi H, Bahramifar N. Survey of the inhibitory effect on growth and ethanol yield in the fermentation process of baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 4(13): 11-24.

(111) Imani H, Jeihanipour A, Asadollahi MA. Application of activated sludge as a complementary in bioethanol production. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 4(13): 83-92.

(112) Robatjazi R, Azin M, Sohraby N. Optimization of a Culture Medium for the Production of Saccharomyces cerevisiae using Glucose Syrup and Corn Steep Liquor. *Biological Journal of Microorganism*. 2020; 9(35): 29-39.

(113) Liu ZL. *Microbial Stress Tolerance for Biofuels: Systems Biology*. Springer Berlin Heidelberg; 2011.

(114) Azizi S, Tarinejad A, Pazhang M. Isolation, cloning and analysis of the hexose transporter 6 gene (HXT6) in a native strain of Saccharomyces cerevisiae IBRC-M30069. *Biological Journal of Microorganism*. 2016; 5(18): 29-40.

(115) Saye LM, Navaratna TA, Chong JP, O'Malley MA, Theodorou MK, Reilly M. The anaerobic fungi: challenges and opportunities for industrial lignocellulosic biofuel production. *Microorganisms*. 2021; 9(4): 694.

(116) Brahmachari G. *Biotechnology of microbial enzymes: production, biocatalysis and Industrial applications*. Academic Press; 2016.

(117) Gupta VK, Tuohy MG, O'Donovan A, Lohani M. *Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications*. John Wiley & Sons; 2015.

(118) Liu ZL. *Microbial stress tolerance for biofuels: systems biology*. Springer Science & Business Media; 2011.

(119) Olson DG, Sparling R, Lynd LR. Ethanol production by engineered thermophiles. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015; 33: 130-41.

(120) Herring CD, Kenealy WR, Joe Shaw A, Covalla SF, Olson DG, Zhang J, et al. Strain and bioprocess improvement of a thermophilic anaerobe for the production of ethanol from wood. *Biotechnology for Biofuels*. 2016; 9(1): 125.

(121) Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y. Thermophilic microbes in environmental and industrial biotechnology. *Biotechnol Thermophiles*. 2013; 3.

(122) Shaw AJ, Podkaminer KK, Desai SG, Bardsley JS, Rogers SR, Thorne PG, et al. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008; 105(37): 13769-74.

(123) Zeinali M, Hosseini B, Jahanbakhsh S, Rezazadeh bari M, Tabatabaee M. Cloning of affecting pyruvate decarboxylase gene in the production bioethanol of agricultural waste in the E.coli bacteria. *Biological Journal of Microorganism*. 2016; 5(18): 11-28.

(124) Mihajlovski K, Buntić A, Milić M, Rajilić-Stojanović M, Dimitrijević-

Branković S. From agricultural waste to biofuel: enzymatic potential of a bacterial isolate Streptomyces fulvissimus CKS7 for bioethanol production. *Waste and Biomass Valorization*. 2021; 12(1): 165-74.

[1]- International Energy Agency (IEA)
[2]- Datta
[3]- Streimikiene
[4]- Bioethanol
[5]- Nahak
[6]- *Enteromorpha*
[7]- *Escherichia coli*
[8]- *Larch Dahurian*
[9]- Elsevier
[10]- Springer
[11]- Taylor & Francis
[12]- Multidisciplinary Digital Publishing Institute
[13]- Hindawi
[14]- Biomass-derived alcohols
[15]- Biodiesels
[16]- Biohydrogen
[17]- Syngas
[18]- Pectin
[19]- Resin
[20]- Terpene
[21]- Phenol
[22]- Quinone
[23] Tannin
[24]- Bagasse
[25]- Homopolymer
[26]- Protofibril
[27]- Microfibril
[28]- Matrix
[29]- Crystallinity
[30]- Pretreatment
[31]- Amorphous
[32]- Heterogeneous
[33]- Guar
[34]- Esprato grass
[35]- Dicotyledonous plants
[36]- Commelinid monocots
[37]- Woody angiosperms
[38]- Gymnosperms
[39]- Polymerization
[40]- Monomer
[41]- Lingol
[42]- *p*-Cinnamic acid
[43]- *trans-p*-Coumaryl alcohol
[44]- *trans-p*-Coniferyl alcohol
[45]- *trans-p*-Sinapyl alcohol
[46]- *p*-Hydroxycinnamic acids
[47]- *p*-Coumaric acid
[48]- Ferulic acid
[49]- Sinapic acids
[50]- Combined heat and power unit (CHP)
[51]- Milling
[52]- Grinding, Hacking
[53]- Rolling
[54]- High pressure homogenization
[55]- Electron beam irradiation
[56]- Hot compression
[57]- Surfactants
[58]- Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)
[59]- Cocktail
[60]- Single Cell Protein (SCP)
[61]- Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)
[62]- Partial Saccharification and Co-Fermentation (PSCF)
[63]- Semi-Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSSF)
[64]- Consolidated Bioprocessing (CBP)
[65]- Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF)
[66]- Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation (NSSF)
[67]- Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF)
[68]- Batch culture
[69]- Continuous culture
[70]- Immobilized cells
[71]- Metal nanoparticles
[72]- Nanofibers
[73]- Nanotubes
[74]- Nanosheets
[75]- *Saccharomyces cerevisiae*
[76]- Mesophile
[77]- *Fusarium*
[78]- *Monascus*
[79]- *Consortium*
[80]- *Clostridium thermocellum*
[81]- *Mucor indicus*
[82] *Neurospora intermedia*
[83]- *Rhizopus oryzae*
[84]- *Peniophora cinereal*
[85]- *Trametes suaveolens*
[86]- *Schizosaccharomyces pombe*
[87]- *Kluyveromyces marxianus*
[88]- *Pachysolen tannophilus*
[89]- *Candida shehatae*
[90]- *Pichia stipitis*
[91]- *Neocallimastigomycota*
[92]- *Zymomonas mobilis*
[93]- *Streptomyces fulvissimus* CKS7