

KHẢO SÁT ĐẶC TÍNH CỦA MỘT SỐ NẤM MEN NHẪM PHỤC VỤ SẢN XUẤT ETHANOL THẾ HỆ HAI

Phan Thị Phầm*, Đỗ Đăng Thuận, Bùi Trường Đạt, Lê Ngọc Phong, Đoàn Hương Giang
Trường Đại học Lạc Hồng, Số 10 Huỳnh Văn Nghệ, Bửu Long, Biên Hòa, Đồng Nai, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: phampt@lhu.edu.vn

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Received: 03/04/2023	<p>Việc sàng lọc, lựa chọn những vi sinh vật có hiệu suất sản xuất ethanol và sức chống chịu với các tác nhân gây ức chế là một trong những yếu tố quan trọng trong sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai. Trong môi trường có sự hiện diện của glucose, xylose và furfural ở các mức nồng độ khác nhau, ba (3) nấm men gồm <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4125, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH 499 và <i>Candida shehatae</i> NBRC 1983 được lựa chọn khảo sát khả năng chống chịu furfural và sản sinh ethanol. Thí nghiệm cho thấy, các nấm men trước tiên phân hủy furfural, sau đó mới chuyển các đường thành ethanol. Sự hiện diện của furfural và các đường ở nồng độ cao có ảnh hưởng đến khả năng sản xuất ethanol của nấm men. Ở nồng độ cấy ban đầu là 107 CFU/mL, nấm men <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 cho nồng độ ethanol cao nhất là 29,54 g/L sau 30 h khi cấy vào môi trường gồm 2g/L furfural; 70g/L glucose and 35g/L xylose. Ngoài ra, <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 còn tạo ra xylitol, là sản phẩm phụ của quá trình lên men từ đường xylose. Như vậy, <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 là nấm men thích hợp trong số 3 nấm men cho sản xuất ethanol sinh học thế hệ hai.</p>
Revised: 16/5/2023	
Accepted: 6/6/2023	
Published: 25/9/2023	
TỪ KHÓA	
Tăng huyết áp; Bệnh tiểu đường; Thuốc.	

SURVEY OF SCREENING ACTIVITY OF SOME YEASTS FOR SECOND GENERATION BIOETHANOL PRODUCTION

Pham Phan Thi*, Thuan Do Dang, Dat Bui Truong, Phong Le Ngoc, Giang Doan Huong
Lac Hong University, No. 10 Huynh Van Nghe, Bui Long Ward, Bien Hoa, Dong Nai, Vietnam

* Corresponding Author: phampt@lhu.edu.vn

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: Apr 3 rd , 2023	<p>Screening and selecting microorganisms with high yield and resistance is one of the most important tasks for second generation bioethanol production. In medium that presented glucose, xylose and furfural, three yeasts including <i>Saccharomyces cerevisiae</i> IAM 4125, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YPH 499 and <i>Candida shehatae</i> NBRC 1983 were picked to find out the resistance of furfural and ethanol production. The study shows the yeasts firstly degraded, then converted sugar to ethanol. The presence of furfural and high initial sugar concentration significantly effected ethanol production of yeasts. At 107 CFU/mL of inoculated yeast concentration, <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 produced highest ethanol concentration (29.54 g/L) after 30 h from medium that contains 2 g/L furfural; 70 g/L glucose and 35 g/L xylose. In addition, <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 also produced xylitol, a by-product of xylose-fermenting. Hence, among three yeasts, <i>C. shehatae</i> NBRC 1983 was the most appropriate one for second generation bioethanol production.</p>
Revised: May 16 th , 2023	
Accepted: Jun 6 th , 2023	
Published: Sep 25 th , 2023	
KEYWORDS	
Hypertension; Diabetes; Drug.	

Available online at: <https://js.lhu.edu.vn/index.php/lachong>

1. Giới thiệu

Sự phát triển của dân số, sản xuất và giao thông vận tải làm cho nhu cầu tiêu thụ nhiên liệu ngày càng tăng. Tuy nhiên, với tốc độ sử dụng hiện tại, nhiên liệu hóa thạch hữu hạn được dự đoán rằng nó sẽ cạn kiệt vào cuối thế kỷ này [1, 2]. Do đó, nghiên cứu nhiên liệu thay thế như các nguồn nhiên liệu sinh học như cồn sinh học, hydro sinh học,... là mục tiêu của nhiều nghiên cứu. Tuy nhiên, sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ đầu tiên từ tinh bột đang mâu thuẫn với an ninh lương thực [2, 3]. Do đó, sản xuất nhiên liệu sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải sinh khối là một nguồn nhiên liệu thay thế đầy hứa hẹn để giảm gánh nặng về lượng nhiên liệu hóa thạch đang bị cạn kiệt và giải quyết chất thải sinh khối được thải ra sau khi thu hoạch các vụ mùa.

Ethanol sinh học là một hợp chất được quan tâm vì nó có thể được sử dụng trong nhiều lĩnh vực: y học, thực phẩm, nhiên liệu,... Là một nhiên liệu thay thế cho xăng từ nhiên liệu hóa thạch, xăng sinh học đã được chú ý cao do nó thải ra ít CO₂ hơn so với xăng từ nhiên liệu hóa thạch [4, 5]. Do những bất lợi của sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ nhất như đã đề cập, việc sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải nông nghiệp giàu lignocellulose đã được quan tâm trong thời gian gần đây. Quá trình sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai bao gồm các bước chính là thủy phân và lên men. Quá trình thủy phân (đường hóa) có thể thu được đường glucose và xylose cùng với các chất ức chế vi sinh vật không mong muốn [6-9]. Một số phương pháp đã được tiến hành để loại bỏ các chất độc hại này như sử dụng than hoạt tính hoặc vô hiệu hóa (kiềm hóa) [3, 7]. Tuy nhiên, những cách này không chỉ gây tốn kém mà còn làm mất đường do các cơ chế hấp phụ và/hoặc kết tủa. Do đó, để chuyển hóa đường có thể lên men thành ethanol một cách hiệu quả, việc lựa chọn vi sinh vật có năng suất ethanol cao (cho cả glucose và xylose) và có sức chống chịu với chất ức chế là rất quan trọng.

Trên thực tế, có nhiều loại nấm men có thể chuyển hóa glucose thành ethanol với năng suất cao như chủng nấm men *Saccharomyces cerevisiae*; tuy nhiên, nấm men lên men cả xylose và glucose rất hiếm và hiệu suất ethanol thấp [3, 7, 10]. Hơn nữa, khả năng chống chịu các chất ức chế của mỗi vi sinh vật là khác nhau. Khả năng chống chịu các chất ức chế của mỗi vi sinh vật khác nhau giữa các vi sinh vật. Trong số các chất ức chế được tạo ra trong quá trình thủy phân thông qua chất đường hóa lignocellulosic, furfural được coi là đại diện [3, 7, 11]. Do đó, bài báo này sẽ khảo sát khả năng tạo ethanol của ba loại nấm men *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4125, *Saccharomyces cerevisiae* YPH 499 và *Candida shehatae* NBRC 1983, trong môi trường hỗn hợp của xylose và glucose và xylose, glucose và furfural.

2. Nội dung

2.1 Vật liệu và phương pháp

Nấm men và hóa chất

Ba loại nấm men được lựa chọn: *Saccharomyces cerevisiae* IAM 4125 (được chọn trong số một số chủng *S. cerevisiae* IAM, dữ liệu không được hiển thị trong bài báo này), *Saccharomyces cerevisiae* YPH 499 (được chọn trong một số giống *S. cerevisiae* YPH, dữ liệu không được hiển thị trong bài báo này) và nấm men thương mại lên men cả đường xylose và glucose, *Candida shehatae* NBRC 1983, được duy trì trên môi trường YM rắn bao gồm 10 g/L glucose, 5 g/L peptone, 3 g/L, yeast extract, 3 g/L malt extract và 15 g/L agar trong 2 ngày ở 30°C. Nhân giống nấm men được chuẩn

bị bằng cách lấy một vòng đầy đầu que cấy nấm men từ đĩa thạch cho vào bình 100ml có môi trường lỏng YM 50ml. Môi trường YM lỏng có cùng thành phần với môi trường YM rắn, ngoại trừ thạch. Nút silicon được dùng để đậy bình nuôi cấy và sau đó đưa bình vào tủ ấm lắc ở 30°C, 120 vòng/phút. Nồng độ nấm men là khoảng 10⁸ CFU/ml sau 36 giờ trước khi nuôi cấy (hình 1).

Các hóa chất dùng trong nghiên cứu được cung cấp bởi hãng hóa chất Wako, Nhật Bản.

Lên men ethanol

Trong lignocellulose, cellulose là chủ yếu và hemicellulose chiếm khoảng một nửa của cellulose về khối lượng [2, 3]. Do đó, người ta coi rằng trong quá trình thủy phân, glucose thu được thường gấp đôi xylose về khối lượng. Khả năng sản xuất ethanol ở nồng độ cao và sức chống chịu chất ức chế là điểm cần quan tâm trong sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai. Chi tiết thí nghiệm về khả năng tạo ethanol nồng độ cao và sức chống chịu furfural của các loại nấm men được chọn được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm

STT	Thành phần môi trường	Nấm men	Môi trường nhân giống (sau 36 h)
F1	Glucose: 20 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	1
		IAM 4125	
F2	Xylose: 10 g/L Peptone: 5g/L	<i>S. cerevisiae</i>	1
		YPH 499	
F3	Yeast extract: 3 g/L	<i>C. shehatae</i> NBRC 1983	1
F4	Glucose: 70 g/L Xylose: 35 g/L	<i>S. cerevisiae</i>	10
		IAM 4125	
F5	Furfural: 2 g/L Peptone: 5g/L	<i>S. cerevisiae</i>	10
		YPH 499	
F6	Yeast extract: 3 g/L	<i>C. shehatae</i> NBRC 1983	10

PH của môi trường lên men được điều chỉnh đến khoảng 5. Bình có thể tích 100ml được cho vào 50ml môi trường sản xuất ethanol. Sau khi loại bỏ phần nổi phía trên từ quá trình ly tâm một thể tích nhất định môi trường nhân giống, phần rắn lắng có chứa nấm men được cấy vào môi trường lên men. Thể tích môi trường trước khi nuôi cấy có chứa nấm men được trình bày trong bảng 1. Quá trình lên men được tiến hành ở 30°C và lắc với tốc độ 120 vòng/phút trong tủ ấm. Quá trình sản xuất etanol được minh họa như hình 1.



Hình 1. Quy trình sản xuất ethanol

Phân tích và tính toán

Các thông số thí nghiệm của glucose, xylose, xylitol, ethanol và furfural được đo bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với cột Shodex sugar SH1011, đầu dò chiết suất RI (refractive index).

Phương pháp đếm khuẩn lạc được sử dụng để xác định sự phát triển của nấm men. Thí nghiệm được thực hiện lặp lại.

Hiệu suất lý thuyết của ethanol là 0,51g ethanol/g xylose hoặc glucose tiêu thụ được áp dụng để đánh giá hiệu quả của quá trình lên men ethanol, theo phản ứng của xylose hoặc

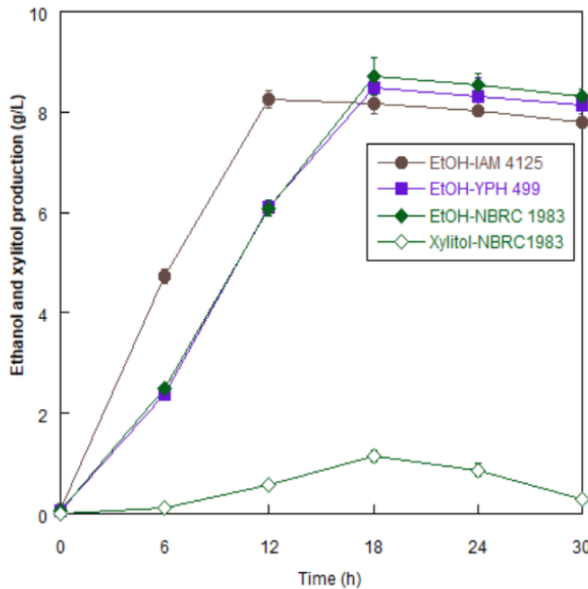
glucose với ethanol. Hiệu suất thực tế của ethanol là lượng (g) ethanol được tạo ra trên một g xylose và/hoặc glucose được tiêu thụ (g/g) [3].

Năng suất ethanol được xác định bằng nồng độ ethanol sản xuất (g/L) trong 1 giờ (h) [3].

2.2 Kết quả và thảo luận

Sự tạo thành ethanol của các nấm men

Hoạt động sản xuất ethanol trên môi trường hỗn hợp glucose và xylose của *S. cerevisiae* IAM 4125, *S. cerevisiae* YPH 499 và *C. shehatae* NBRC 1983 (thí nghiệm từ F1 đến F3) được biểu diễn trong hình 2.



Hình 2. Sự tạo thành ethanol và xylitol của các nấm men

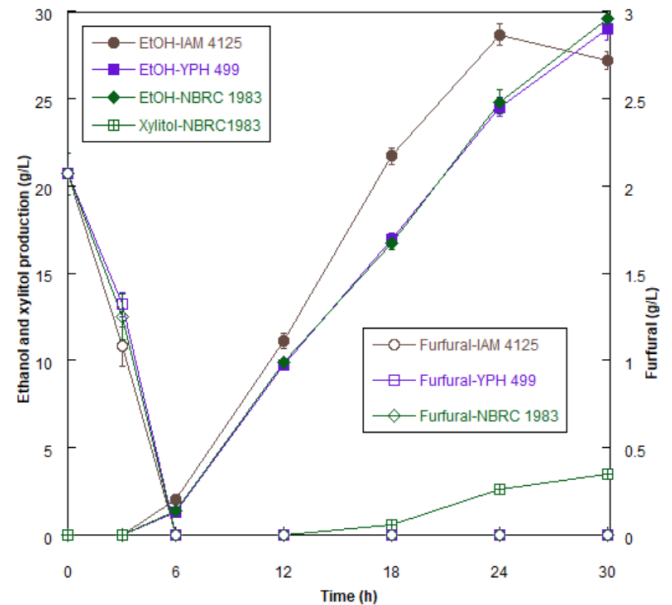
Trong số ba loại nấm men, *S. cerevisiae* IAM 4125 có năng suất ethanol cao nhất (nồng độ cao nhất 8,26 g/L sau 12 giờ), tiếp theo là *C. shehatae* NBRC 1983 (nồng độ cao nhất 8,72 g/L sau 18 giờ) và năng suất thấp nhất là *S. cerevisiae* YPH 499 (nồng độ cao nhất 8,47 g/L sau 18 giờ). Về hiệu suất ethanol từ glucose, *S. cerevisiae* YPH 499 có hiệu suất ethanol cao nhất (83%) và sau đó là *S. cerevisiae* IAM 4125 (81%). Tuy nhiên, xét đến hiệu suất ethanol từ tổng số đường có thể lên men của glucose và xylose, *C. shehatae* NBRC 1983 thu được sản lượng ethanol cao nhất (57%) so với *S. cerevisiae* YPH 499 (55%) và *S. cerevisiae* IAM 4125 (54%). Sự khác biệt về hiệu suất trong trường hợp này có thể giải thích rằng loài *S. cerevisiae* được gọi là nấm men lên men glucose, trong khi loài *C. shehatae* có thể sản xuất ethanol từ cả glucose và xylose [12-15]. Do đó, hiệu suất ethanol tính toán của các loài *S. cerevisiae* chỉ dựa trên glucose cho giá trị cao. Tuy nhiên, nếu hiệu suất ethanol tính cho cả glucose và xylose, *C. shehatae* có hiệu suất cao hơn. Ngoài ra, xylitol là sản phẩm phụ của quá trình lên men ethanol bởi *C. shehatae* NBRC 1983. Xylitol là sản phẩm trung gian của con đường chuyển hóa xylose thành ethanol [3, 7]. Sản phẩm phụ này rất được quan tâm trong dược phẩm.

Sau khi đạt đến nồng độ ethanol cao nhất (12 giờ đối với *S. cerevisiae* IAM 4125; 18 giờ đối với *S. cerevisiae* YPH 499 và *C. shehatae* NBRC 1983), nồng độ ethanol đã giảm xuống (hình 2). Hiện tượng này có thể được giải thích rằng sau khi nấm men tiêu hóa tất cả các loại đường tiêu thụ để tạo ra ethanol, chúng cần cơ chất khác làm thức ăn để phát triển. Trong trường hợp này, nấm men đã tiêu thụ ethanol. Do đó, mật độ tế bào của nấm men được giữ ổn định sau khi

thí nghiệm đạt được nồng độ ethanol cao nhất (hình 4). Đây là điểm cần lưu ý vì kéo dài thời gian thí nghiệm gây lãng phí thời gian và làm giảm đi ethanol được tạo ra.

Khả năng sản xuất ethanol thế hệ hai của nấm men

Trong sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải giàu lignocellulose bằng con đường đường hóa, cần quan tâm đến tính kháng lại chất ức chế. Furfural là một sản phẩm phụ thủy phân không mong muốn. Nó thường được hình thành từ quá trình phân hủy xylose trong điều kiện nhiệt độ cao và môi trường axit hoặc kiềm. Nồng độ furfural được tạo ra phụ thuộc vào nồng độ xylose và điều kiện thủy phân; tuy nhiên, nó thường nhỏ hơn 2 g/L [7]. Như đã biết, hầu hết các vi sinh vật đều nhạy cảm với furfural. Furfural có thể ảnh hưởng đến các enzyme trong chuyển hóa carbon trung tâm hoặc làm hỏng DNA của vi sinh vật. Những chất này gây ra ảnh hưởng đến hoạt động của vi sinh vật, ví dụ, lên men ethanol trong nghiên cứu này. Khả năng chống chịu của vi sinh vật đối với furfural khác nhau giữa các vi sinh vật khác nhau [3]. Sức đề kháng của vi sinh vật đối với furfural cũng khác nhau. Trong môi trường hỗn hợp của thí nghiệm F4 đến F6 (bảng 1), khả năng chịu đựng furfural của cả ba loại nấm men là hơn 2 g/L (hình 3).



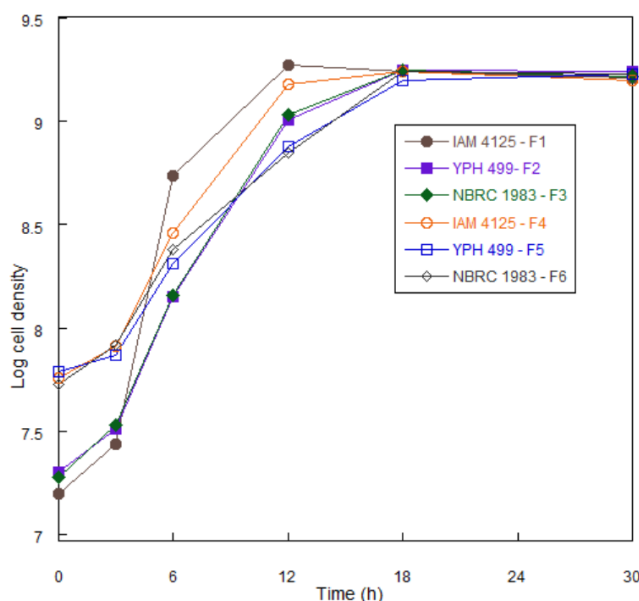
Hình 3. Sản xuất ethanol và xylitol của ba loại nấm men trong môi trường có furfural

Khi có furfural (2 g/L) trong môi trường lên men ethanol, trước hết nấm men sẽ phân hủy furfural trong vòng 6 giờ. Do sự hiện diện của furfural và nồng độ cơ chất cao, quá trình sản xuất ethanol bị chậm lại (hình 2 và hình 3) mặc dù mật độ nấm men ban đầu đã tăng từ 10^6 CFU/mL lên 10^7 CFU/mL (bảng 1 và hình 4). Năng suất ethanol bị giảm nhưng không đáng kể. Nấm men *S. cerevisiae* IAM 4125 cho năng suất cao 1,19 g/L/h sau 24 giờ. *C. shehatae* NBRC 1983 thu được nồng độ ethanol cao nhất (29,54 g/L) sau 30 giờ khi cấy vào môi trường chứa 2 g/L furfural, 70 g/L glucose và 35 g/L xylose. Mặc dù nồng độ ethanol tạo ra bởi *C. shehatae* NBRC 1983 chưa đạt kỳ vọng về quá trình sản xuất ethanol hiệu quả (khoảng 40 g/L) [7], nhưng so với 2 nấm men còn lại, *C. shehatae* NBRC 1983 cho nồng độ ethanol cao hơn. Ngoài ra, xylitol là sản phẩm phụ từ quá trình sản xuất ethanol của *C. shehatae* NBRC 1983 (3,53 g/L) như đã trình bày ở trên. Do đó, để sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải giàu lignocellulose, trong số ba loại nấm men được chọn, *C. shehatae* NBRC 1983 có nhiều ưu điểm hơn

so với hai loại nấm men còn lại. Một lần nữa, việc suy giảm ethanol sau khi đạt đến nồng độ cao nhất được thể hiện (thí nghiệm F4 - *S. cerevisiae* IAM 4125). Vì lý do này, thời gian sản xuất ethanol (thời gian phản ứng hoặc thời gian lưu) là một điểm quan trọng cần lưu ý để thu được nồng độ ethanol cao nhất.

Sự sinh trưởng của nấm men

Khi môi trường sản xuất ethanol có chứa furfural ở mức có thể chịu được, sự phân hủy furfural trước là cách chống lại và/hoặc vượt qua các chất ức chế của vi sinh vật sản xuất ethanol [3, 7]. Axit furoic và furfuryl lần lượt là các sản phẩm chuyển hóa của quá trình lên men furfural của quá trình lên men hiếu khí và lên men kỵ khí [3]. Trong trường hợp này, furfural đóng vai trò chất nền cho sự phát triển và trao đổi chất của nấm men. Điều này được thể hiện bằng sự gia tăng mật độ tế bào nấm men trong những giờ đầu tiên đối với quá trình lên men phân hủy furfural. Tuy nhiên, tốc độ phát triển của nấm men thấp hơn so với trường hợp không có furfural trong môi trường lên men (hình 4).



Hình 4. Sự phát triển của nấm men trong môi trường sản xuất ethanol

Trong môi trường không có thêm furfural, sự phát triển của nấm men rất nhanh. Mật độ tế bào của các loại nấm men này gần như đạt giá trị cao nhất trong vòng 12 giờ. Trong số đó, *S. cerevisiae* IAM 4125 có mật độ tế bào cao nhất (Log mật độ tế bào vào khoảng 9,27). Trong trường hợp môi trường bổ sung furfural, như đã biết, furfural là một chất độc đối với vi sinh vật, mặc dù cả ba loại nấm men đều có thể phân hủy để vượt qua sự ức chế furfural, tốc độ phát triển của nấm men đã giảm so với trường hợp không thêm furfural vào môi trường. Phải mất 18 giờ để ba loại nấm men chạm đến mật độ tế bào cao nhất (hình 4). Do đó, quá trình sản xuất ethanol của ba loại men bị chậm lại. Cụ thể, ba nấm men tạo ra nồng độ ethanol cao nhất sau 24 giờ (*S. cerevisiae* IAM 4125) và 30 giờ (*C. shehatae* NBRC 1983 và *S. cerevisiae* YPH 499). Nó dài hơn khoảng 12 giờ (hình 2 và 3). Như vậy, nồng độ cao của furfural và các đường lên men có ảnh hưởng đến thời gian chuyển hóa các đường thành ethanol.

3. Kết luận

Tìm kiếm các vi sinh vật có triển vọng là một nhiệm vụ quan trọng đối với sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải giàu lignocellulose. Khảo sát hoạt tính tạo ethanol và khả năng chống chịu chất ức chế của ba loại nấm

men: *S. cerevisiae* IAM 4125, *S. cerevisiae* YPH 499 và *C. shehatae* NBRC 1983, *C. shehatae* NBRC 1983 cho thấy rằng tất cả các loại nấm men trên cây đều có khả năng kháng furfural cao (2 g/L). *S. cerevisiae* IAM 4125 có năng suất cao nhất. Tuy nhiên, *C. shehatae* NBRC 1983 lại thu được nồng độ ethanol cao nhất (29,54 g/L) sau 30 giờ từ môi trường chứa 2 g/L furfural, 70 g/L glucose và 35 g/L xylose. Mặt khác, xylitol là sản phẩm trung gian thu được từ quá trình sản xuất ethanol của *C. shehatae* NBRC 1983. Những ưu điểm này của *C. shehatae* NBRC 1983 đã cho thấy đây là nấm men tiềm năng trong 3 nấm men được khảo sát cho sản xuất ethanol sinh học thế hệ thứ hai từ chất thải giàu lignocellulose.

4. Cảm ơn

Nhóm tác giả xin cảm ơn Viện Công nghệ Tokyo, Nhật Bản đã hỗ trợ về giống nấm men và thiết bị kỹ thuật để thực hiện nghiên cứu này. Nhóm tác giả cũng xin cảm ơn Trường Đại học Lạc Hồng đã tạo điều kiện về tài chính để nhóm tác giả có thể hoàn thành nghiên cứu.

5. Tài liệu tham khảo

- [1] D. Welsby, J. Price, S. Pye, and P. Ekins, "Unextractable fossil fuels in a 1.5 °C world". *Nature*, 597, 230-234, 2021.
- [2] P. T. Pham, B.-S. Nguyen, T.-A. Nguyen, A. Kumar, and V.-H. Nguyen, "Lignocellulose-derived monosugars: a review of biomass pre-treating techniques and post-methods to produce sustainable biohydrogen". *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15, 2020.
- [3] P. Pham, D. Tuyet-Le, L. Thu-Huong, and N. Trong-Anh, "Recycling cassava stem to bioethanol by inoculating a novel xylose-glucose fermenting yeast at high initial concentration". *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 39, 13286, 2020.
- [4] A. Elfasakhany, "Exhaust emissions and performance of ternary iso-butanol-bio-methanol-gasoline and n-butanol-bio-ethanol-gasoline fuel blends in spark-ignition engines: Assessment and comparison". *Energy*, 158, 830-844, 2018.
- [5] V. R. Roso, N. D. S. A. Santos, C. E. C. Alvarez, F. A. Rodrigues Filho, F. J. P. Pujatti, and R. M. Valle, "Effects of mixture enleanment in combustion and emission parameters using a flex-fuel engine with ethanol and gasoline". *Applied Thermal Engineering*, 153, 463-472, 2019.
- [6] R. Agrawal, A. Verma, R. R. Singhanian, S. Varjani, C. Di Dong and A. K. J. B. T. Patel, "Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis". *Bioresource Technology*, 332, 125042, 2021.
- [7] K. Tanaka, M. Koyama, P. T. Pham, A. P. Rollon, H. Habaki, R. Egashira and K. Nakasaki, "Production of high-concentration bioethanol from cassava stem by repeated hydrolysis and intermittent yeast inoculation". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 138, 1-7, 2019
- [8] J. Zhang, Y. Wang, X. Du, and Y. Qu, "Selective removal of lignin to enhance the process of preparing fermentable sugars and platform chemicals from lignocellulosic biomass". *Bioresource Technology*, 303, 122846 (2020)
- [9] C. Zhao, X. Qiao, Q. Shao, M. Hassan and Z. Ma, "Evolution of the lignin chemical structure during the

bioethanol production process and its inhibition to enzymatic hydrolysis". *Energy Fuels*, 34, 5938-5947, 2020.

[10] H. C. T. Veras, N. S. Parachin and J. R. M. Almeida, "Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts". *Microbial Cell Factories*, 16, 1-8, (2017).

[11] Y. Fan, D. Zhang, A. Zheng, Z. Zhao, H. Li, and T. Yang, "Selective production of anhydrosugars and furfural from fast pyrolysis of corncobs using sulfuric acid as an inhibitor and catalyst". *Chemical Engineering Journal*, 358, 743-751, 2019.

[12] C. Bideaux, J. Montheard, X. Cameleyre, C. Kangboonruang, Molina-Jouve, and S. Alfenore, "Metabolic flux analysis model for optimizing xylose conversion into ethanol by the natural C5-fermenting yeast *Candida shehatae*". *Applied microbiology biotechnology for Biofuels*, 100, 1489-1499, 2016.

[13] T. Burphan, S. Tatip, T. Limcharoensuk, K., Boonchird, and C. Auesukaree, "Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Scientific reports*, 8, 1-11, 2018.

[14] D. Guan, Y. Li, R. Shiroma, M. Ike, and K. Tokuyasu, "Sequential incubation of *Candida shehatae* and ethanol-tolerant yeast cells for efficient ethanol production from a mixture of glucose, xylose and cellobiose". *Bioresource technology*, 132, 419-422, 2013

[15] J. Ruchala, O. O. Kurylenko, K. V. Dmytruk and A. A. Sibirny, "Construction of advanced producers of first-and second-generation ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* and selected species of non-conventional yeasts (*Scheffersomyces stipitis*, *Ogataea polymorpha*)". *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology for Biofuels* 47, 109-132. 2020.