

Fermentačná produkcia etanolu

MILAN VALACH - ERNEST ŠTURDÍK

SÚHRN. Článok je zameraný na širší opis fermentačnej produkcie etanolu. Uvedené sú základné používané suroviny spolu s ich charakterizáciou a tiež technologickými operáciami spojenými s ich predprípravou (hydrolyza škrobových a lignocelulóзовých materiálov). Stručným spôsobom je spracovaný aj prehľad najpoužívanejších mikrobiálnych kmeňov produkujúcich etanol s ich fermentačnými charakteristikami. V záverečnej časti je rozobraná problematika výberu typu bioreaktora, pri prezentovaných usporiadaniach sú uvedené aj špecifické výťažky.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: bioreaktory; etanol; fermentácia; mikrobiálne produkčné kmene; suroviny

Etanol predstavuje výzvu pre komplexné riešenie viacerých problémov týkajúcich sa nielen potravinárstva, ale aj poľnohospodárstva, energetiky a životného prostredia. Táto skutočnosť je zvlášť významná v súvislosti s jeho využívaním ako energetického nosiča. V porovnaní s fosílnymi palivami má etanol výhodu obnoviteľnosti jeho zdrojov, pritom pri jeho spaľovaní nedochádza k zaťažovaniu atmosféry produkciou nadbytočného množstva plynov spôsobujúcich skleníkový efekt, pretože sa uvoľní len ten CO_2 , ktorý bol z ovzdušia fixovaný pri tvorbe rastlinnej biomasy [1]. Etanol tiež v neposlednej miere predstavuje cestu zhodnotenia mnohých odpadov organického pôvodu z poľnohospodárskeho [2], lesníckeho [3], papierenského [4], či potravinárskeho [5] priemyslu. Preto má opodstatnenie zaoberať sa maximálnou intenzifikáciou jeho produkcie. Dôležitá je pritom aj samotná ekonomika výroby, preto sa vynakladá snaha na kontinualizáciu nielen fermentačného procesu, ale aj izolácie produktu. Takéto usporiadanie výrobného procesu si vyžaduje navrhovanie nových typov reaktorov. Ďalším inovačným trendom je využitie imobilizátových technológií.

Ing. Milan VALACH, Doc. Ing. Ernest ŠTURDÍK, CSc., Katedra biochemickej technológie, Fakulty chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Korešpondujúci autor: Ing. Milan VALACH, e-mail: valachm@chtf.stuba.sk

1. Suroviny

Podľa materiálov Ministerstva pôdohospodárstva SR je v súčasnosti na Slovensku registrovaných 26 poľnohospodárskych liehovarov vyrábajúcich surový lieh (koniec roka 2002). Z toho len jediný liehovar v Leopoldove využíva ako surovinu melasu. To znamená, že drvivá väčšina spracováva škrobové substráty, čo je pomerne náročné, pretože suroviny obsahujúce škrob, celulózu alebo iné oligo- a polysacharidy je potrebné ešte pred fermentáciou hydrolyzovať a tak z nich získať požadované fermentačné substráty. Z ekonomického aj ekologického hľadiska je výhodné tiež zužitkovanie niektorých „odpadov“ z iných výrobní. Ide hlavne o srvátku a lignocelulózové materiály.

1.1 Melasa

Repná melasa bola donedávna v našich oblastiach jedným z najdôležitejších substrátov pre liehovarnícky priemysel. V poslednej dobe však jej význam v súvislosti s liehovarníctvom klesá (tab. 1), čo je zapríčinené vysokou koncentráciou inhibítorov spomaľujúcich fermentačný proces. Prítomnosť týchto inhibítorov v melase je pravdepodobne zodpovedná za nižšiu fermentačnú schopnosť laboratórnych kmeňov v porovnaní s produkčnými kmeňmi

TAB. 1. Bilancia produkcie surového liehu v Slovenskej republike
kumulatívne od 1.1.2002 do 31.12.2002.

TAB. 1. Balance sheet of the production of crude spirit in Slovakia
accumulative from 1.1.2002 till 31.12.2002.

Ukazovateľ ¹	Absolútny alkohol ² [l]
Stav zásob k 1.1.2002 ³	891 784
Výroba ⁴	7 742 971
Spotreba surovín na výrobu spolu ⁵	4 303 599
v tom: obilie (najmä pšenica, raž, jačmeň, kukurica) ⁶	46 886
zemiaky ⁷	0
melasa repná ⁸	18 892
melasa z cukrovej trstiny ⁹	0
iné (škrob a pod.) ¹⁰	4 237 821

1 - parameter, 2 - absolute alcohol, 3 - level of supplies till 1.1.2002, 4 - production, 5 - consumption of raw materials, 6 - incl.: grains, 7 - potatoes, 8 - beet molasses, 9 - sugar-cane molasses, 10 - others (starch etc.).

TAB. 2. Objem výroby melasy v Slovenskej republike (zdroj: Slovenský cukrovarnícky spolok).
 TAB. 2. Mass production of molasses in Slovak republic (source: Slovak sugar association).

Melasa ¹	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Výroba ² [t]	87 120	86 836	66 103	65 009	43 005	55 894
Medziročný rozdiel ³	x	-284	-20 733	-1 094	-22 004	12 889
Medziročný index vývoja ⁴	x	99,7	76,1	98,3	66,2	130,0

1 - melasse, 2 - production, 3 - interyear difference, 4 - index of interyear progress.

[6]. Ďalšou jej nevýhodou je, že ide o sezónnu surovinu, ktorá je produkováaná v limitovanom množstve (tab. 2) a okrem toho sa uplatňuje aj pri výrobe droždia, kyseliny citrónovej a pri príprave krmných zmesí.

Na druhej strane je v prípade melasy výhodou, že sacharidy sa tu už vyskytujú priamo v kvasiteľnej forme a tým odpadajú ďalšie náročné predúpravy suroviny. V prípade prípravy kvasnej zápsy dochádza k jej okysleniu na pH 4,5–5,0 a k riedeniu, tak aby výsledná koncentrácia sacharózy bola 10–20 hmotnostných % na začiatku fermentácie a 30–40 % na prítokovanie. V prípade kontinuálne pracujúcich prietokových systémov s recykláciou buniek je možné dosiahnuť produktivitu etanolu až 40 g.l⁻¹h⁻¹.

Relatívne nižšia hladina dusíka a fosforu sa kompenzuje prídavkami výluhu z obilných klíčkov alebo z kukuričného škrobu, z ekonomických dôvodov sa používajú tiež anorganické živiny (napr. (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄), prípadne kvasničný autolyzát z odpadových kvasníc.

1.2 Škrobnaté suroviny

Z hľadiska procesu skladovania majú obilniny pred zemiakmi výhodu, pretože obsahujú podstatne menej vlhkosti a tak ťažšie podliehajú skaze.

Zemiaky (*Solanum tuberosum*) predstavujú najčastejšie používanú škrobnatú surovinu pre výrobu etanolu v Nemecku a východnej Európe. Približná analýza zloženia zemiakov je uvedená v (tab. 3). Najdôležitejším kritériom pre produkciu etanolu je samozrejme množstvo škrobu a tiež sacharidov (najčastejšie sacharóza, glukóza a fruktóza), ktoré obsahujú zemiaky v malom množstve. Zemiakový škrob pritom obsahuje 21–30 % amylozy a 79–70 % amylopektínu. Keďže v zemiakoch sa nachádza aj určité množstvo pektínových látok (tab. 3), môžu sa v produkovanom alkohole nachádzať aj stopy metanolu.

Kukurica pre svoj vysoký obsah škrobu, nízky obsah proteínov (tab. 4) a relatívne nízku cenu je výbornou surovinou pre výrobu etanolu. Kukuričný škrob tvorí približne dve tretiny celkového škrobu vyrobeného v USA. V niektorých krajinách s nepriaznivými klimatickými podmienkami na dozrievanie kukurice sa ako surovina okrem zŕn využíva aj kukuričná siláž.

Pšenica a jačmeň obsahujú o 10–15 % menej škrobu ako kukurica, čo má za následok nižšie výťažky etanolu na kg obilia a teda aj vyššiu výrobnú cenu. Zvýšenie obsahu škrobu v zápare sa dá dosiahnuť napríklad oddeľovaním

TAB. 3. Približné percentuálne zastúpenie jednotlivých zložiek v zemiakoch [16].

TAB. 3. Average percentage ratio of components in potatoes [16].

Zložka ¹	Množstvo [% hm.] ²
voda ³	72,0–80,0
škrob ⁴	12,0–21,0
sacharidy (redukujúce) ⁵	0,07–1,5
dextrín a pektín ⁶	0,2–1,6
pentózany ⁷	0,75–1,0
dusíkaté zložky ⁸	1,2–3,2
tuky ⁹	0,1–0,3
vláknina ¹⁰	0,5–1,5
popol ¹¹	0,5–1,5

1 - component, 2 - weight percentage, 3 - water, 4 - starch, 5 - reducing sugars, 6 - dextrin and pectin, 7 - pentosans, 8 - nitrogenous compounds, 9 - fats, 10 - crude fiber, 11 - ash.

TAB. 4. Percentuálne zastúpenie jednotlivých zložiek v kukuričnom zrne.

TAB. 4. Percentage ratio of components in corn.

Zložka ¹	Množstvo [% hm.] ²
škrob ³	72,0
voda ⁴	15,0
hemicelulóza, celulóza ⁵	10,5
proteíny ⁶	9,5
tuky ⁷	4,5
sacharidy ⁸	2,0
popol ⁹	1,5

1 - component, 2 - weight percentage, 3 - starch, 4 - water, 5 - hemicellulose, cellulose, 6 - proteins, 7 - fats, 8 - sugars, 9 - ash.

klíčkov a pliev od endospermu v špeciálnych šrotovníkoch a následne použitím iba vysokoškrobnatých frakcií šrotu. Problém však nastane, ak obilniny obsahujú viac ako 13 % proteínov, pretože potom dochádza k tvorbe veľkého množstva peny počas fermentácie. Ďalší problém sa vyskytuje pri použití jačmeňa, pretože jeho zápars majú vyššiu viskozitu ako pšeničné. Je to zapríčinené vyšším obsahom β -glukánov v jačmeni.

Kyslá hydrolyza

Prvé glukózové sirupy boli pripravené nemeckým chemikom Kirchhoffom v roku 1811 varom škrobu so zriedenou kyselinou sírovou [7].

V homogénnych roztokoch prebieha hydrolyza v zriedených kyselinách staticky. V koncentrovanejších roztokoch kyselín vznikajú fragmenty nerovnomernej veľkosti a prednostne sa odštiepujú koncové jednotky. Účinkom pôsobenia kyselín (HCl, H₂SO₄) však okrem glukózy vznikajú aj iné vedľajšie degradačné produkty sacharidov (5-hydroxymetylfurfural, kyselina mravčia, kyselina levulová...). Kľúčovými faktormi sú pritom koncentrácia kyseliny, teplotný režim a koncentrácia substrátu. Dodnes sa kyslá hydrolyza využíva pri príprave glukózových sirupov. Jej negatívom je však vysoká korozivita v kombinácii s vysokou teplotou a taktiež zvyšovanie obsahu anorganických solí v produkte.

Enzymová hydrolyza

Enzymy na rozdiel od kyselín pôsobia na škrob špecificky. Pri hydrolyze vznikajú nové produkty s kratším reťazcom, dextríny, oligo-, di- a monosacharidy. Prvé glukózové sirupy, pripravené enzymovou hydrolyzou, boli vyprodukované v 50-tych rokoch 19. storočia pôsobením amyloglukozidázy na kyselinou stekutený škrobový hydrolyzát. Touto technológiou bolo možné pri miernych teplotných podmienkach vyprodukovať sirupy so stupňom scukornenia (DE) väčším ako 90 (DE - dextrinálny ekvivalent predstavuje percentuálny obsah voľnej glukózy, pre škrob DE = 0, pre dokonalý hydrolyzát DE = 100, t. j. čistá glukóza). Odvtedy sa v oblasti enzymej hydrolyzy škrobu urobili obrovské pokroky v príprave hydrolyzátov definovaného stupňa hydrolyzy.

Stekutenie

Teplotný režim počas stekucovania škrobu závisí od použitej technológie a typu použitej α -amylázy. Bakteriálna α -amyláza produkovaná kmeňom *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* má pri pH 5–6 teplotné optimum 65–70 °C. Naproti tomu α -amyláza produkovaná kmeňom *Bacillus licheniformis* má pH optimum 5,6–6,5 a optimálnu teplotu v širokom rozmedzí

TAB. 5. Amylytické enzymy bežne používané v liehovarníctve [8].
 TAB. 5. Amylolytic enzymes commonly used in alcohol industry [8].

Druh enzymu ¹	Druh štiepenej väzby ²	Endo/exo enzym ³	Zdroj enzymu ⁴	Optimálna teplota ⁵ [°C]	Optimálne pH ⁶	Produkty enzymovej reakcie ⁷
α -amylázy ⁸	α -(1,4)	endo	<i>Aspergillus oryzae</i>	50–55	5–6	α -maltóza
			<i>Aspergillus niger</i>	50–55	5–6	α -maltóza
			<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	85–90	6–6,5	dextríny a maltodextríny
			<i>Bacillus licheniformis</i>	95–105	6–6,5	dextríny a maltodextríny
			<i>Aspergillus subtilis</i> cereálie	85–90 55	6–6,5 5–6	dextríny a maltodextríny maltóza
β -amylázy ⁹	α -(1,4)	exo	<i>Bacillus circulans</i>	50	5,5	β -maltóza
			<i>Bacillus polymyxa</i>	45	5,5	β -maltóza
			cereálie	55	5,5	β -maltóza
glukoamylázy ¹⁰	α -(1,4) α -(1,6)	exo	<i>Aspergillus niger</i>	60	4–5	β -glukóza
			<i>Aspergillus oryzae</i>	60	4–5	β -glukóza
			<i>Rhizopus delamar</i>	55	3–5	β -glukóza
			<i>Rhizopus oryzae</i>	55	3–5	β -glukóza
pululanázy ¹¹	α -(1,6)	endo	<i>Bacillus acidopullulyticum</i>	65	5	hydrolyzované dextríny
			<i>Klebsiella aerogenes</i>	60	5,5	hydrolyzované dextríny

1 - type of enzyme, 2 - type of the splitted bonding, 3 - endo/exoenzyme, 4 - source of enzyme, 5 - optimal temperature, 6 - optimal pH, 7 - products of the enzymatic reaction, 8 - α -amylases, 9 - β -amylases, 10 - glucoamylases, 11 - pullulanases.

75–105 °C (tab. 5) [8]. Tento enzým indukuje rapídnu redukciu viskozity škrobu a vedie k jeho rýchlej degradácii za produkcie vodorozpustných dextrínov (penta- až heptaoligosacharidov). V priemysle prebieha stekutenie pri pomerne vysokých teplotách (85–95 °C) počas 1–2 hodín [9].

Scukornenie

Druhým významným krokom enzýmovej hydrolýzy je scukornenie škrobu, keďže po stekutení sa v roztoku nachádza viac ako 90 % neskvasiteľnej formy dextrínov. V minulosti sa na scukornenie zápar používal zelený slad. Po zmazovatení škrobu vo varákových kolónach pri teplote 57–58 °C pokračovala hydrolýza vďaka aktívnej sladovej α - a β -amyláze [10]. Takto pripravený hydrolyzátny obsahoval väčšinové zastúpenie maltózy, ale aj vysoký podiel neskvasiteľných limitných dextrínov, pretože neprebehla hydrolýza α -1,6-glykozidických väzieb amylopektínu.

Jednou z možností degradovania limitných dextrínov je použitie fungálnej α -amylázy (tab. 5), ktorá náhodne štiepi väzby vo vnútri dextrínového reťazca. Pracovné optimum fungálnej α -amylázy je v rozmedzí pH 5–6 a teploty 50–55 °C. Doba pôsobenia závisí od množstva použitého enzýmu (8–24 hodín). Výslednými produktami hydrolýzy sú hlavne maltóza, maltotrióza a maltotetróza.

Použitím sladovej β -amylázy (exoenzým) spolu s pululanázou, ktorá štiepi α -1,6-väzby, môžeme pripraviť produkt s vysokým stupňom skvasiteľnosti dosahujúcim až 90 % zastúpených glukózových jednotiek. Pululanáza zvyšuje zastúpenie maltotriózy a tým aj mieru skvasiteľnosti zápar. Ďalšou možnosťou scukornenia je použitie enzýmu amyloglukozidázy, ktorá prednostne štiepi α -1,4-väzby pred α -1,6 a α -1,3-väzbami. Vďaka svojej kinetike nepotrebuje spoluúčasť odvetvovacích enzýmov. Dosahuje sa ňou 98–99%-ná využiteľnosť substrátu pre fermentačné účely [9].

Pri enzýmovom spracovaní škrobových surovín sa priamo kombinuje hydrolýza s fermentačným procesom, pritom možno postupovať viacerými technikami:

1. Súbežné scukornenie a fermentácia - SSF (simultaneous saccharification and fermentation) s využitím zmiešanej kultúry amylolytických a etanol produkujúcich mikroorganizmov [11, 12]. Dôležité je pri tomto spôsobe nájsť kompromisné riešenie optimálnych fyziologických podmienok vyhovujúcich všetkým použitým kmeňom.
2. Aplikácia bakteriálnych alebo fungálnych amylolytických enzýmov na scukornenie škrobu spolu s fermentačným kmeňom [13]. Pri tejto technológii sa dosahujú vyššie výťažky etanolu, pretože nedochádza k strátam škrobu jeho spotrebovávaním na rast amylolytických kultúr.

3. Použitie geneticky manipulovaných producentov umožňujúcich ako fermentáciu, tak aj amylolýzu škrobu. Bolo dokonca dokázané, že použitím rekombinantnej kvasinky s glukamylázovou aktivitou môže byť etanol produkovaný zo škrobu rýchlejšie a efektívnejšie ako zmesnou kultúrou amylolytického a etanolproduktujúceho mikroorganizmu [14].

1.3 Srvátka

Srvátka predstavuje vedľajší produkt mliekarského priemyslu. Je to zriedený roztok laktózy (4–5 %), proteínov (0,7–1 %), tuku, soli a vitamínov vo vode. Vo svete existujú dva majoritné druhy srvátky - sladká a kyslá. Minoritná slaná srvátka sa vyskytuje iba v niektorých arabských štátoch. Sladká srvátka vzniká pri koagulácii mliečnych proteínov pôsobením enzýmu

TAB. 6. Porovnanie zloženia kyslej a sladkej srvátky [16].

TAB. 6. Comparison of sweet and acid whey composition [16].

Zložka ¹	Množstvo [% hm.] ²	
	sladká srvátka ³	kyslá srvátka ⁴
sušina ⁵	6–7	5–7
popol ⁶	0,5–0,7	0,7–0,8
laktóza ⁷	4,5–5,0	3,8–4,2
kyselina mliečna ⁸	stopy	do 0,8
kyselina citrónová ⁹	0,1	0,1
pH	4,5–6,7	3,9–4,5
hrubý proteín ¹⁰	0,8–1,0	0,8–1,0
Zastúpenie dusíkatých zlúčenín v hrubom proteíne v percentách celkového dusíka ¹¹ :		
čistý proteín ¹²	52,5	43,9
peptidy ¹³	31,3	33,1
aminokyseliny ¹⁴	2,5	6,1
kreatín ¹⁵	2,6	2,5
amoniak ¹⁶	1,0	2,3
močovina ¹⁷	9,1	10,3
puríny ¹⁸	1,0	1,8

1 - component, 2 - weight percentage, 3 - sweet whey, 4 - acid whey, 5 - dry matter, 6 - ash, 7 - lactose, 8 - lactic acid, 9 - citric acid, 10 - crude protein, 11 - nitrogenous compounds as % of total nitrogen in crude protein, 12 - pure protein, 13 - peptides, 14 - amino acids, 15 - creatine, 16 - ammonia, 17 - urea, 18 - purines.

renilázy, kým pri kyslej srvátke proces zrážania prebieha účinkom kyseliny mliečnej. Porovnanie zloženia kyslej a sladkej srvátky je uvedené v (tab. 6).

Srvátka sa na prvý pohľad javí ako atraktívna biotechnologická surovina vzhľadom na jej zápornú cenu a priaznivé minerálno-vitamínové zloženie. Pred vlastným biotechnologickým spracovaním srvátky sa okrem klasických úkonov (sterilizácia, inokulácia) môžeme stretnúť s ďalšími operáciami: deproteinizácia a zahustenie laktózy (používajú sa nanofiltre na skoncentrovanie laktózy, ako i dialyzačné reaktory a zatiaľ laboratórne testované dvojfázové systémy použité na hydrolýzu laktózy).

Na produkciu etanolu už bolo v priemyselnej prevádzke testované použitie špeciálneho membránového prietokového reaktora s dutými vláknami, na ktorých boli imobilizované kvasinky *Kluyveromyces fragilis*. Fermentácnym substrátom bol v tomto prípade srvátkový permeát s koncentráciou laktózy 45 g.l^{-1} [15].

Americký mliekarský gigant Golden Cheese Company of California produkuje z deproteinovanej srvátky ročne 13,25 milióna litrov palivového etanolu.

1.4 Lignocelulózové materiály

Lignocelulózový substrát sa priamo biologicky spracovať nedá, najprv je potrebné z materiálu odstrániť lignín, potom celulózu rozložiť na redukujúce sacharidy, až tak sa získa fermentovateľná surovina. Pri spracovávaní lignocelulózového materiálu pre alkoholovú fermentáciu sa začína najskôr s predúpravou pomletého materiálu pôsobením horúcej pary ($180\text{--}240^\circ\text{C}$). Pri tejto operácii v dreve dochádza k vzniku vo vode rozpustných látok, ktoré inhibujú enzýmovú hydrolýzu a fermentáciu, ide najmä o kyselinu octovú, deriváty sacharidov a degradačné produkty lignínu. Odstránenie týchto látok podstatne urýchľuje priebeh hydrolýzy celulózy.

Kyslá hydrolýza celulózy sa z technologického hľadiska môže vykonávať dvoma postupmi. Pri použití koncentrovanej kyseliny (72% H_2SO_4 alebo 42% HCl) sa uplatňujú nižšie teploty (100°C) a pri zriedenej (2% H_2SO_4) vyššie (190°C) [16]. Vyššia koncentrácia kyseliny sice urýchli priebeh hydrolýzy, ale výťažok skvasiteľných cukrov je nižší, pretože časť sacharidov sa mení na degradačné produkty. Pritom cena kyslej hydrolýzy lignocelulózového materiálu predstavuje 0,053 \$ za liter vyprodukovaného etanolu [17]. Takto pripravené hydrolyzáty je nutné pred fermentáciou odsoľovať.

Laboratórne experimenty ukázali, že bunky kvasiniek sa rýchlejšie adaptujú na teplotný stres a na prítomnosť inhibítorov (kyselina octová, furfural,

hydroxymetylfurfural, kyselina hydroxybenzoová a hydroxybenzaldehyd), ak sa pred fermentáciou pridá do média malé množstvo etanolu. Tento prídavok rapídne skracuje lag-fázu na začiatku fermentácie na lignocelulóзовých hydrolyzátoch [18].

Pri využití enzýmovej hydrolyzy nedochádza ku vzniku žiadnych cudzorodých produktov (inhibítory a pod.), ktoré by bolo nutné odstraňovať, pretože celulózy (endo-, exo- β -(1,4)-glukanázy a β -(1,4)-glukozidázy) špecificky štiepia celulózu na glukózové podjednotky. Nevýhodou použitia týchto enzýmov je ich silná katabolická represia produktom, z čoho vyplýva nutnosť rýchleho spotrebovania vzniknutej glukózy. S výhodou sa pritom využívajú techniky SSF, t. j. naprodukováná glukóza sa hneď spotrebováva v súbežnom fermentačnom procese.

Priemyselne najpoužívanejším kmeňom na produkciu celulóz je *Trichoderma reesei*, pretože nie je patogénom pre človeka. Dokonca pri podmienkach využívaných na produkciu enzýmov neprodukuje ani fungálne toxíny a antibiotiká [19].

Cena v súčasnosti produkovaných celulóz je relatívne vysoká (0,12 \$/liter vyprodukovaného etanolu). Experti však vyhlasujú, že uplatnením nových techník využívaných pri produkcii enzýmov možno zredukovať cenu až pod 0,026 \$/liter etanolu [20].

2. Produkčné mikroorganizmy a ich fermentačné vlastnosti

V nasledujúcej časti sú uvedené najvyužívanejšie mikrobiálne kmene produkujúce etanol kvasinkového, ako aj bakteriálneho pôvodu (v praxi sa uplatňuje hlavne *Zymomonas mobilis* ako najväčší konkurent klasických liehovarníckych kvasiniek). Opísané sú tiež ich charakteristiky, ktoré bezprostredne súvisia s technológiou vlastného fermentačného procesu s ohľadom na intenzifikáciu nadprodukcie etanolu.

2.1 Kvasinky

Hlavnou výhodou použitia kvasiniek je ich schopnosť utilizovať relatívne širokú paletu substrátov. Okrem najpoužívanejších *Saccharomyces cerevisiae* sa intenzívne študuje aj využitie amylolytických kvasiniek (napríklad *Saccharomyces diastaticus*, *Schwaniomyces castelli*, *Saccharomycopsis fibuligera*), ktoré by sa dali použiť v „ko-kultúre“ s kvasinkami produkujúcimi etanol [21].

Vo všeobecnosti kvasinky rastú a produkujú etanol v rozmedzí pH 3,5–6,0. Riziko kontaminácie však klesá pri nižšom pH prostredia. Počas priebehu fermentácie je potrebné esenciálne množstvo kyslíka pre syntézu bunkových stien a lipidických štruktúr (rast a rozmnožovanie). Optimálna aerácia pri kontinuálnej produkcii etanolu na melase pomocou flokulujúcich *S. cerevisiae* je 0,1 vvm (vvm = objem vzduchu na objem média za minútu) [22].

S aeráciou je priamo spätý Pasteurov efekt: kvasenie sa značne obmedzí, t. j. produkcia etanolu rapídne klesá. Príčinou tohto javu je zmena metabolizmu kvasiniek z fermentačného na respiračný, rapídne vzrastie energetický zisk (pri anaeróbnej glykolýze vznikajú z jednej molekuly glukózy 2 molekuly ATP v procese substrátovej fosforylácie, naproti tomu pri aeróbnej glykolýze v spojení s oxidačnou fosforyláciou v dýchacom reťazci sa získa z jednej molekuly glukózy 28 molekúl ATP), v dôsledku čoho narastie (5 až 10-krát) množstvo vytvorenej biomasy. Rôzne kmene kvasiniek za aeróbnych podmienok však vykazujú rôznu aktivitu dýchania. U liehovarníckych a vínnych kvasiniek prevláda anaeróbný metabolizmus a dýchanie tvorí len asi 10 %, t. j. Pasteurov efekt sa prakticky neprejaví. Dokonca dôkaz Pasteurovho efektu v prevádzkovej kultúre pivovarníckych kvasiniek sa považuje za poruchu v technológii. Naproti tomu u pekárskych kvasiniek je tento pomer približne 50:50 [23].

Vyššia koncentrácia glukózy alebo iných ľahko skvasiteľných sacharidov inhibuje syntézu mitochondriových zložiek a aeróbnym rastom v týchto podmienkach sa produkujú bunky, ktoré prejavujú fermentatívne znaky metabolizmu. Oslabenie dýchania zapríčinené katabolickou represiou sa nazýva Crabtreeov efekt alebo tiež negatívny Pasteurov efekt. V *Saccharomyces carlsbergensis* nastáva represia respiračných enzýmov pri koncentrácii glukózy vyššej ako 10 až 70 mmol.l⁻¹. Bunky kvasiniek majú pritom redukovaný obsah cytochrómov a zníženú hladinu enzýmov cyklu trikarboxylových kyselín.

V praxi sa tiež objavuje ďalší fenomén, pri veľmi vysokej koncentrácii glukózy (už od koncentrácie 100 g.l⁻¹) sa začína prejavovať inhibícia rastu kvasiniek a fermentácie, ktorá je dôsledkom vysokého osmotického tlaku a nízkej aktivity vody. S nárastom osmotického tlaku v médiu klesá viabilita buniek a ich fermentačná aktivita. Úplná inhibícia fermentácie substrátom nastáva pri koncentrácii glukózy nad 400 g.l⁻¹ v závislosti od podmienok fermentácie (koncentrácie naprodukovateľného etanolu, teploty, atď.).

Aj keď počiatočná rýchlosť produkcie etanolu pri vyšších teplotách (napr. 40 °C) narastá, celkový výťažok fermentácie klesá kvôli zosilnenej inhibícii etanolom. To znamená, že s narastajúcou teplotou klesá výťažok. Práve toto je nevýhodou kvasiniek [24].

Praktický výťažok pri fermentácii však dosahuje približne iba 90–95 % teoretického. Je to zapríčinené tým, že časť sacharidov sa spotrebuje na udržanie základného metabolizmu buniek a tiež pre nárast novej biomasy. Okrem toho prebiehajú aj bočné reakcie (tvorba vedľajších produktov, hlavne glycerolu), ktoré môžu spotrebovať 4–5 % z celkového množstva substrátu. Ak sa dokážu tieto reakcie eliminovať, dosiahne sa nárast výťažku etanolu o 2,7 %.

Optimálna konverzia sacharidu na etanol si vyžaduje kmeň tolerantný na etanol, pretože etanol inhibuje nielen rast buniek (vyššie koncentrácie - autolýza), ale aj rýchlosť fermentácie, čo je pravdepodobne spôsobené zvýšenou akumuláciou intracelulárneho etanolu. Etanoltolerancia jednotlivých kmeňov závisí od zloženia mastných kyselín zabudovaných v ich plazmatických membránach. Základným trendom spojeným s etanoltoleranciou v kvasinkách (pokiaľ ide o intracelulárny etanol) je nárast dĺžky reťazcov acylov mastných kyselín a zvýšenie obsahu nenasýtených mastných kyselín a sterolov v membránach. Proces adaptácie na etanolvý stres je spojený s nárastom obsahu mononenasýtených kyselín, najmä kyseliny olejovej (18:1), a tomu zodpovedajúcim poklesom obsahu nasýtených kyselín, najmä kyseliny palmitovej (16:0), v membránových fosfolipidoch. Po takejto úprave membrány vzniknutý etanol podstatne rýchlejšie difunduje von z bunky. KRISCH a SZAJÁNI zaznamenali zvýšenie etanoltolerancie a tolerancie na kyselinu octovú v prípade imobilizovaných buniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Acetobacter aceti* [25]. Tiež zistili, že bunky uvoľnené z imobilizačnej matrice vykazovali vyššiu toleranciu na produkt v porovnaní s voľnými bunkami.

Produkčné médium musí okrem sacharidov obsahovať aj ďalšie nutrienty, ktoré sú potrebné pre tvorbu komponentov kvasničnej bunky a ich správnu funkciu. Ide hlavne o malé množstvá fosforu, síry, niektorých minerálov (K, Mg, Mn, Co, Cu, Zn) a tiež organické látky (aminokyseliny, nukleové kyseliny a vitamíny) v stopových množstvách. Najdôležitejšie rastové faktory potrebné pre kvasinky sú biotín, kyselina pantoténová, inozitol, tiamín, kyselina nikotínová a kyselina listová.

2.2 Baktérie

Okrem kvasiniek sú schopné produkovať etanol vo významných množstvách (minimálne 1 mol etanolu na 1 mol utilizovanej glukózy) aj mnohé baktérie (tab. 7). Etanol pritom nie je jediným koncovým produktom ich metabolizmu. Produkujú tiež iné alkoholy (butanol, izopropylalkohol,

2,3–butándiol), organické kyseliny (octová, maslová, mravčia, mliečna), polyoly (arabitol, glycerol, xylitol), ketóny (acetón), alebo aj rôzne plyny (metán, oxid uhličitý, vodík). Niektoré baktérie (napr. *Enterobacteriaceae*, *Spirochaeta*, *Bacteroides* atď.) využívajú glukózu podobne ako kvasinky Embden-Meyerhofovou metabolickou dráhou. Pri baktériách sa tiež pozoroval osobitný spôsob odbúrania glukózy, ktorým je degradácia podľa Entnera-Doudoroffa (napr. *Zymomonas*), kde na jednu molekulu glukózy pripadá vznik dvoch molekúl etanolu.

Zymomonas mobilis je baktéria využívaná na priemyselnú produkciu etanolu, pretože vlastnosti niektorých kmeňov sa vyrovnávajú, a miestami aj predčia, kvasinkové kultúry. Významné je, že rast kultúry prebieha za anaeróbných podmienok, čiže nie je potrebná kontrolovaná aerácia počas fermentácie. Ďalej je dôležité, že rýchlosť rastu je vyššia ako u kvasiniek, okrem toho produktivita etanolu je dokonca vyššia. Množstvo biomasy potrebné na vyprodukovanie 1 dl 100% etanolu s narastajúcou koncentráciou

TAB. 7. Významné baktérie produkujúce etanol ako hlavný produkt fermentácie [27].

TAB. 7. Important Bacteria sp. producing ethanol as the main fermentation product [27].

Mezofilné organizmy ¹		Etanol* ² [mmol]
<i>Clostridium sporogenes</i>		viac ako 4,15 ^a
<i>Clostridium indolis</i> (patogén)		1,96 ^a
<i>Zymomonas mobilis</i> (syn. <i>anaerobica</i>)		1,9 (anaerób)
<i>Spirochaeta aurantia</i>		1,5
<i>Erwinia amylovora</i>		1,2
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		1,1
<i>Streptococcus lactis</i>		1,0
<i>Sarcina ventriculi</i> (syn. <i>Zymosarcina</i>)		1,0
Termofilné organizmy ³	T _{max} [°C]	Etanol* [mmol]
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	78	1,9
<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	78	1,6
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	78	1,0
<i>Thermoanaerobium brockii</i>	78	0,95
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i> (syn. <i>tartarivorum</i>)	68	1,1
<i>Clostridium thermocellum</i> (<i>thermocellulaseum</i>)	68	1,0

* - množstvo etanolu produkovaného na 1 mmol metabolizovanej glukózy, a - v prítomnosti veľkého množstva kvasničného extraktu.

* - ethanol produced per 1 mmol metabolized glucose, a - in the presence of high amounts of yeast extract. 1 - mesophilic organisms, 2 - ethanol, 3 - thermophilic organisms.

glukózy v médiu klesá aj u *Saccharomyces* aj u *Zymomonas*. Pri baktériách je však potrebné 2-krát (pri koncentráciách glukózy nižších ako 85 g.l⁻¹), resp. 3 až 4-krát (pri koncentráciách glukózy vyšších ako 240 g.l⁻¹) menšie množstvo biomasy na vyprodukovanie rovnakého množstva etanolu ako pri kvasinkách [26].

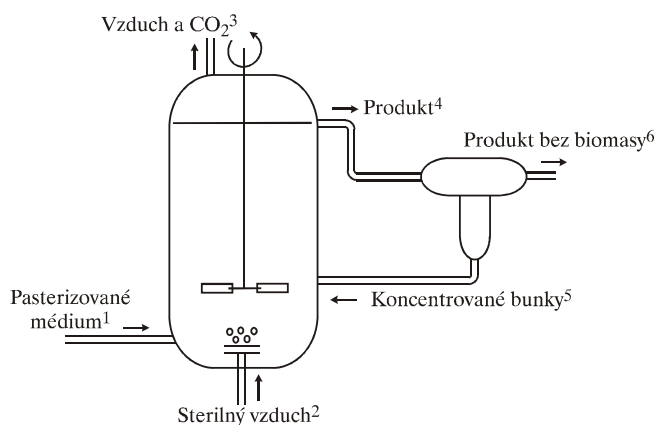
Na druhej strane pri bakteriálnej fermentácii sa popri etanole do média produkujú aj organické kyseliny (octová, mliečna), ktorých prítomnosť môže komplikovať získavanie etanolu počas destilácie.

Prednosťou použitia termofilných kmeňov baktérií (tab. 7) [27] je možnosť fermentácie pri zvýšenej teplote, ktorá prináša so sebou viaceré výhody. Predovšetkým termofily nevykazujú vysokú katabolickú aktivitu v okolí teplôt optimálnych pre ich rast. Významné je, že rozpustnosť kyslíka a ostatných plynov s narastajúcou teplotou klesá (anaerobióza). Optimálna teplota pre extrémne termofily sa pohybuje okolo 66–69 °C a pri tejto teplote má kyslík o 80 % nižšiu rozpustnosť v médiu ako pri 30 °C. Pri vyšších teplotách už nie je problémom rozpustnosť ťažko rozpustných substrátov. S rastúcou teplotou klesá tiež viskozita fermentačného média, preto sa znižuje spotreba energie na miešanie. Pri zvýšenej teplote je uľahčené kontinuálne odparovanie etanolu, čiže na jeho získavanie už nie je potrebné vysoké vákuum. Keďže po sterilizácii ostávajú fermentačné nádoby vyhriate a mikroorganizmy produkujú tiež značné množstvo tepla, nie sú potrebné až také nároky na energiu pri chladení [16].

Otázka použitia baktérií alebo kvasiniek na komerčnú produkciu etanolu je zodpovedaná až po kalkulácii a porovnaní všetkých nákladov, investičných aj prevádzkových. Inou možnosťou, perspektívnou aj v budúcnosti, je použitie geneticky modifikovaných produkčných kmeňov. Pre tieto účely sa využívajú predovšetkým baktérie (napr. *Zymomonas* sp., *E. coli*), pretože príprava ich mutantov resp. rekombinantných kmeňov je najjednoduchšia. Na inkorporáciu sa využívajú gény z kvasiniek, húb resp. iných mikroorganizmov. Cieľom je rozšíriť schopnosť využitia surovín obsahujúcich zložitejšie sacharidy, bez predchádzajúcej hydrolýzy.

3. Bioreaktory

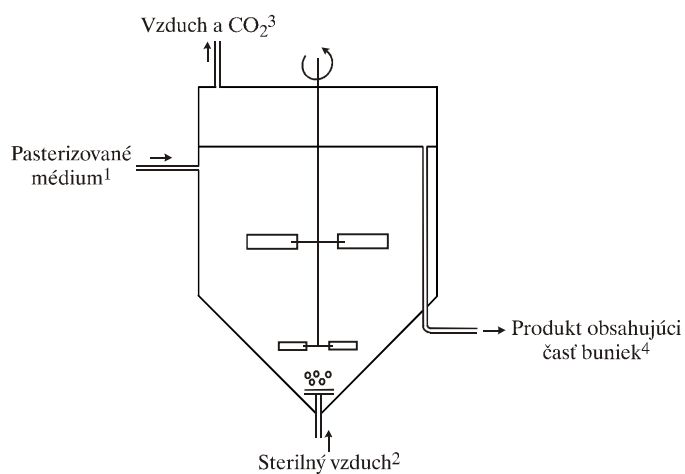
V súčasnosti je najaktuálnejším trendom v priemyselnej produkcii etanolu využívanie kontinuálnych prietokových systémov. V porovnaní so vsádzkovým usporiadaním odpadajú dlhé mŕtve časy potrebné na častú sterilizáciu po každej várke, predlžuje sa tým tiež životnosť meracej techniky. S výhodou sa pritom používa recirkulácia produkčnej biomasy alebo imobi-



OBR. 1. Miešaný reaktor s kontinuálnou recykláciou biomasy.

FIG. 1. Stirred reactor with continual recycling of biomass.

1 - pasteurized medium, 2 - sterile air, 3 - air and CO₂, 4 - product, 5 - concentrated biomass, 6 - product without the biomass.



OBR. 2. Reaktor s parciálnou recykláciou biomasy.

FIG. 2. Reactor with partial recycling of biomass.

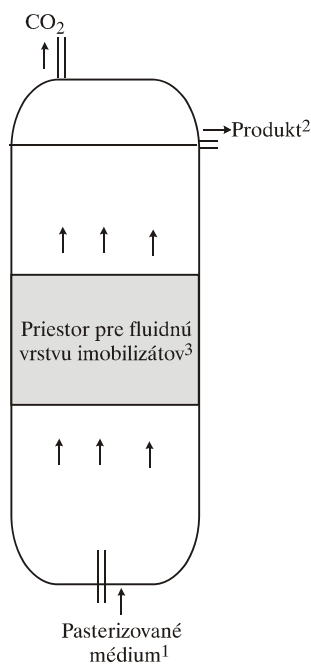
1- pasteurized medium, 2 - sterile air, 3 - air and CO₂, 4 - product containing a portion of the biomass.

lizátové technológie. Pomocou týchto systémov sa v reaktorovej nádobe pracuje s extrémne vysokými koncentráciami buniek, pričom sa výrazne zvýši celková produktivita.

3.1 Fermentory s recykláciou buniek

Na obr. 1 je znázornená schéma reaktora s kontinuálnou recykláciou buniek. K separácii biomasy od vyfermentovaného média dochádza v prietokovej centrifúge. Okrem centrifúgy sa veľmi často ako separátor biomasy používa aj membránový filter s krížovým tokom (cross-flow filter). Membránová filtrácia umožňuje sterilnú, vysoko efektívnu separáciu buniek. Publikované práce uvádzajú, že v podobnom kontinuálnom systéme s recykláciou buniek (cross-flow) pri koncentrácii biomasy 120 g.l^{-1} sa dosiahla produktivita etanolu až $70 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ [28].

Inou možnosťou je použitie reaktora s parciálnou recykláciou biomasy, kde sa konštrukcia líši tvarom fermentačnej nádoby. V tomto prípade nie je potrebné ďalšie separačné zariadenie (obr. 2), na druhej strane však odchádzajúci produkt obsahuje ešte značné množstvo buniek.

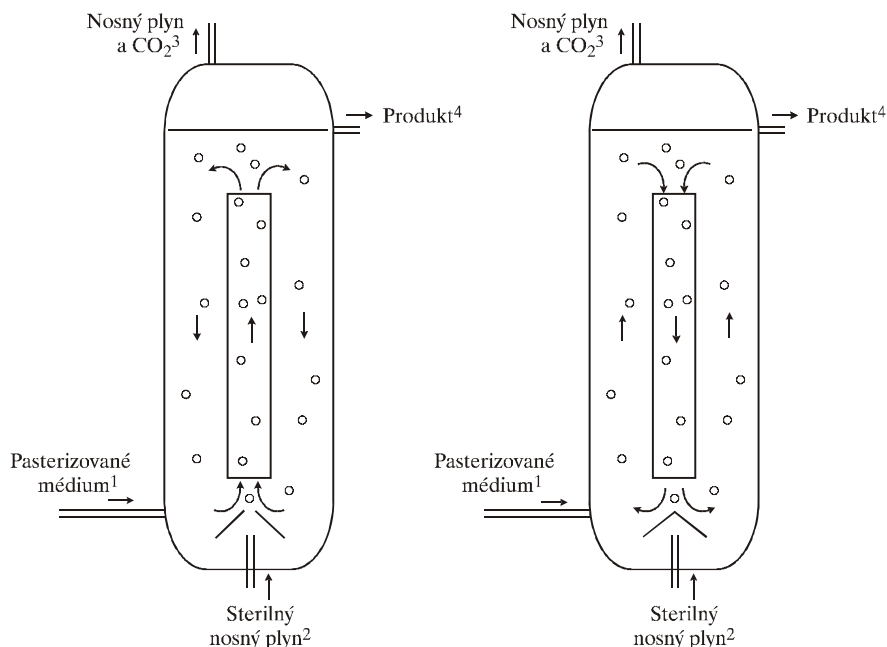


OBR. 3. Reaktor „fluidized-bed“ s fluidnou vrstvou imobilizátov.

FIG. 3. Fluidized-bed reactor.
1 - pasteurized medium, 2 - product,
3 - space containing a fluidized layer of immobilizates.

3.2 Reaktory s imobilizovanými bunkami

Úplne iný typ reaktora sa výhodne používa v kombinácii s imobilizačnými technológiami. V porovnaní s klasickými procesmi využívajúcimi voľné bunky má imobilizácia množstvo výhod: zabezpečenie vysokej koncentrácie buniek, eliminácia vymývania buniek v prietokových systémoch pri vysokých zriedňovacích rýchlostiach, odpadá potreba nákladných zariadení na separáciu a recykláciu biomasy [29]. Reaktor s fluidnou vrst-



OBR. 4. „Gas-lift“ reaktor s vnútorným a vonkajším tokom nosného plynu.

FIG. 4. Gas-lift reactor with inner and outer flow of the carrier gas.

1 - pasteurized medium, 2 - sterile carrier gas, 3 - carrier gas with CO₂, 4 - product.

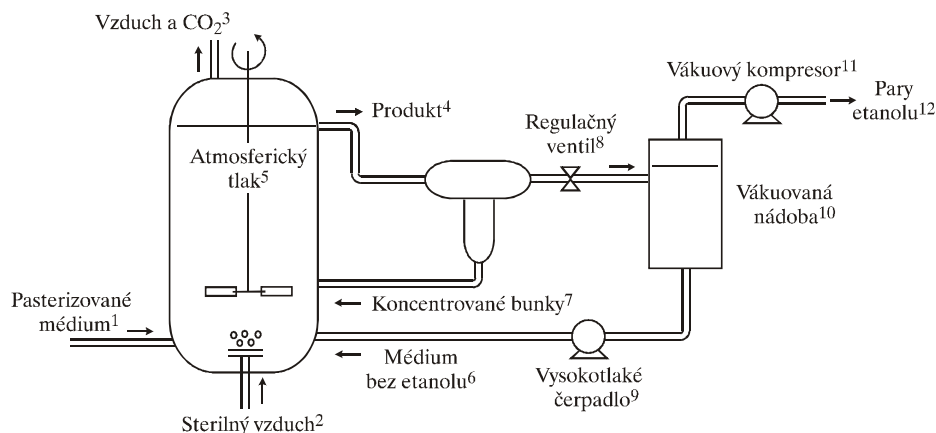
vou imobilizovaného biokatalyzátora (fluidized-bed, obr. 3) umožňuje pracovať s vysokou koncentráciou buniek, ktoré sú pevne ukotvené na (v) nosiči, čiže nie sú vymývané do fermentačného média. Pozostáva z kolóny, v ktorej sú imobilizáty udržiavané v pohybe kontinuálnym vtekaním rozpusteného substrátu. Dobrý charakter fluidizácie sa dosiahne tak, že sa zabezpečí čo najväčší rozdiel hustoty medzi biokatalyzátormi a rozpusteným substrátom. Výhodou použitia reaktora s fluidnou vrstvou sú krátke zdržné časy média v reaktore, čím sa znižuje riziko kontaminácie. Ďalej vplyvom toku média cez fluidnú vrstvu dochádza k značným turbulentciám na rozhraní tuhej a kvapalnej fázy, čo má za následok intenzifikáciu koeficientov prestupu látky aj tepla. Preto je obzvlášť výhodné používať tento reaktor pri exotermických procesoch. Produktivita etanolu v tomto systéme dosahuje 25–44 g.l⁻¹h⁻¹ [30], čo je 10-krát viac v porovnaní s jednoduchým vsádzkovým procesom (1,8–2,5 g.l⁻¹h⁻¹).

Pri práci s imobilizátovými systémami sa tiež veľmi často používa „gas-lift“ reaktor. Ide o kolónový prietokový reaktor, ktorý obsahuje kon-

centricky vloženú vnútornú rúru. Na dne je umiestnený prívod nosného plynu (ak je nosným plynom vzduch ide o „air-lift“). Schéma je uvedená na obr. 4. Výhodou tohto systému je nižšie mechanické opotrebenie imobilizátov, pretože k miešaniu dochádza účinkom stúpajúceho nosného plynu.

4.3 Vákuové usporiadanie

Efektívnejší spôsob, ktorým možno ešte zvýšiť produktivitu fermentácie sa zakladá na selektívnom kontinuálnom odstraňovaní produktu. Pri využití kontinuálnej vákuovej metódy dochádza k odparovaniu etanolu z média na základe jeho vysokej prchavosti. Udržiavaním nízkej hladiny etanolu v médiu nedochádza k inhibícii fermentačnej aktivity, ani ku strate viability kvasiniek, ktoré si takto zachovávajú vysokú metabolickú aktivitu. Kombináciou vákuovej fermentácie (pri tlaku 7,3 kPa) a recyklácie buniek (zabezpečovanej centrifugáciou) pri produkcii etanolu z melasy kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* sa dosiahla produktivita $82 \text{ g.l}^{-1}\text{h}^{-1}$ (obr. 5) [31].



OBR. 5. Kombinácia fermentácie s recykláciou buniek a kontinuálnym vákuovým odstraňovaním etanolu z média.

FIG. 5. Combination of the fermentation with recycling of the biomass and continual vacuum removing of ethanol from the medium.

1 - pasteurized medium, 2 - sterile air, 3 - air and CO₂, 4 - product, 5 - atmospheric pressure, 6 - medium without ethanol, 7 - concentrated biomass, 8 - regulation valve, 9 - high-pressure pump, 10 - vacuum vessel, 11 - vacuum compressor, 12 - vapour of ethanol.

Záver

Dnešným trendom v etanolovej fermentácii, hlavne čo sa týka produkcie palivového etanolu, je zužitkovanie odpadov ako surovín. Ide pritom predovšetkým o lignocelulóзовé materiály a srvátku. Momentálne najintenzívnejšie využívanou surovinou na Slovensku sú však škrobové substráty (hydrolyzáty). Vo svete prežívajú v súčasnosti veľký „boom“ aplikácie imobilizačných technológií, ktorých hlavnou výhodou je jednoduchšia kontinualizácia samotného fermentačného procesu a tiež aj kontinuálna izolácia produktu. Práve aplikácia týchto systémov otvára nové možnosti v navrhovaní samotných fermentačných nádob, ako aj izolačných techník produktu. Výber optimálneho technologického riešenia si vyžaduje dostatočne poznať vlastnosti použitých surovín, výťažnosť procesu, produktivitu výrobných zariadení, ale aj výšku potrebných investícií a prevádzkových nákladov.

Literatúra

1. ALTINTAŞ, M. M. - ÜLGEN, K. Ö. - KIRDAR, B. - ÖNSAN, Z. I. - OLIVER, S. G.: Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 2002, s. 640-647.
2. ZAYED, G. - MEYER, O.: The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 1996, s. 551-555.
3. DEKKER R. F.: Enzymatic hydrolysis of plant polysaccharides: substrates for fermentation. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 22, 1989, s. 1441-1456.
4. KATZEN, R. - FOWLER, D. E.: Ethanol from lignocellulosic wastes with utilization of recombinant bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45-46, 1994, s. 697-707.
5. ATHANASIADIS, I. - BOSKOU, D. - KANELAKI, M. - KIOSSEOGLOU, V. - KOUTINAS, A. A.: Whey liquid waste of the dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, s. 7231-7234.
6. TAKESHIGE, K. - OUCHI, K.: Reconstruction of ethanol fermentation in permeabilized cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79, 1995, s. 11-16.
7. HOWLING, D.: Glucose syrup - past, present and future. In: DZIEDZIC, S. Z. - KEARSLEY, M. W.: Glucose syrup: science and technology. London : Elsevier Science Publishers Ltd, 1994, s. 1-2.
8. LÉVEQUE, E.: Clonage d'ungane codant pour une α -amylase a partir de l'archaebacterie thermophile *Thermococcus hydrothermalis* AL 622. Etude des parente's phylogenetiques avec les autres α -amylases. Dizertačná práca. Champagne-ardene, Francúzsko : Universite de Reims Champagne-ardene, 1998. 253 s.
9. FULLBROOK, P. D.: The enzymatic production of glucose syrups. In: DZIDZIC, S. Z. - KEARSLEY, M. W.: Glucose syrup: science and technology. London : Elsevier Science Publishers Ltd, 1994, s. 65-116.

10. CASEY, G. P. - INGLEDEW, W. M.: Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews In Microbiology*, 13, 1986, s. 219-280.
11. VERMA, G. - NIGAM, P. - SINGH, D. - CHAUDHARY, K.: Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 72, 2000, s. 261-266.
12. TANAKA, H. - KUROSAWA, H. - MURAKAMI, H.: Ethanol production from starch by a co-immobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1986, s. 1761-1768.
13. HOSHINO, K. - TANIKUCHI, M. - MARUMOTO, H. - FUJII, M.: Continuous ethanol production from raw starch using a reversibly soluble-autoprecipitating amylase and flocculating yeast cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69, 1990, s. 228-233.
14. NAKAMURA, Y. - KOBAYASHI, F. - OHNAGA, M. - SAWADA, T.: Alcohol fermentation of starch by genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 1997, s. 21-25.
15. MEHAIA, M. A. - CHERYAN, M.: Hollow fibre bioreactor for ethanol production: Application to the conversion of lactose by *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 6, 1984, s. 117-120.
16. ROEHR, M. - KOSARIC, N. - PIEPER, H. J. - VARDAN-SUKAN, F.: The biotechnology of ethanol, classical and future applications. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 266 s.
17. SHEEHAN, J. S. - HIMMEL, M. E.: Outlook for bioethanol production from lignocellulosic feedstocks: technology hurdles. *Agro Food Industry Hi-tech*, 12, 2001, s. 54-58.
18. STANLEY, G. A. - HOBLEY, T. J. - PAMMENT, N. B.: Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnology and Bioengineering*, 53, 1997, s. 71-78.
19. NEVALAINEN, H. - SUOMINEN, P. - TAIMISTO, K.: On the safety of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 37, 1994, s. 193-200.
20. Bioethanol from the corn industry: from corn to cellulose - building the bridge to bioethanol production. Chicago : U.S. Department of Energy, 1998.
http://www.ott.doe.gov/biofuels/pdfs/bioethanol_from_corn.pdf
21. CIESAROVÁ, Z. - ŠMOGROVIČOVÁ, D.: Možnosti použitia amylolytických kvasiniek pri fermentácii škrobu. *Chemické listy*, 90, 1996, s. 497-501.
22. KIDA, K. - MORIMURA, S. - ZHONG, Y. L.: Production of ethanol from molasses by flocculating yeast for use as an alternative energy source. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83, 1997, s. 216.
23. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava : Alfa, 1982. 530 s.
24. KOSARIK, S.: Characterization of yeasts as ethanol producing microorganisms. Diplomová práca. Ontario, Canada : University of Western Ontario, 1984. 112 s.
25. KRISCH, J. - SZAJANI, B.: Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. *Biotechnology Letters*, 19, 1997, s. 525-528.
26. NOWAK, J.: Ethanol yield and productivity of *Zymomonas mobilis* in various fermentation methods. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities - Food Science and Technology*, 3, 2000, č. 2.
27. LJUNGDAHL, L. G. - BRYANT, F. - CARREIRA, L. - SAIKI, T. - WIEGEL, J.: Some aspects of thermophilic and extreme thermophilic anaerobic microorganisms. *Basic Life Sciences*, 18, 1981, s. 397-419.
28. WARREN, R. K. - MACDONALD, D. G. - HILL, G. A.: The design and costing of a continuous ethanol process using wheat and cell recycle fermentation. *Bioresource Technology*, 47, 1996, s. 121-129.

29. BITTAR, E. E. - DANIELSSON, B. - BULLOW, L.: Advances in molecular and cell biology. Vol. 15A. Greenwich : JAI Press, 1996. 284 s.
30. SUN, M. Y. - BIENKOWSKI, P. R. - DAVISON, B. H. - SPURRIER, M. A. - WEBB, O. F.: Performance of coimmobilized yeast and amyloglucosidase in a fluidized bed reactor for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 63-65, 1997, s. 483-493.
31. CYSEWSKI, G. R. - WILKE, C. R.: Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 1977, s. 1125-1143.

Do redakcie došlo 19.8.2003.

Fermentation production of ethanol

VALACH, M. - ŠTURDÍK, E.: *Bull. potrav. Výsk.*, 42, 2003, p. 151-171.

SUMMARY. The article is focused to general description of the fermentation production of ethanol. Used basic raw materials with their properties as well as technological operations necessarily connected with their preparation (hydrolysis of starch and lignocellulosis materials) are presented. The mostly used ethanol-producing microbial strains are briefly described together with their fermentation characteristics. At last, the problem of the selection of a bioreactor type is analysed with specific yields being given at individual configurations.

KEYWORDS: bioreactors; ethanol; fermentation; microbial production strains; raw materials