

INOVAČNÉ TRENDY PRI VÝROBE ETANOLU

PETRA BAFRNCOVÁ a DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

Katedra biochemickej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: bafrn@chtf.stuba.sk

Došlo dňa 16.IX.1998

Kľúčové slová: etanol, fermentácia škrobu, VHG-fermentácia, imobilizované kvasinky, kontinuálna fermentácia

Obsah

1. Úvod
2. Simultánna sacharifikácia a fermentácia škrobu
3. VHG-fermentácia
4. Fermentácia imobilizovanými kvasinkami
5. Kontinuálna fermentácia s recyklom buniek
6. Vákuová fermentácia
7. Extraktívna fermentácia
8. Záver

1. Úvod

S etanolom sa stretávame prakticky každý deň a na každom kroku. Je prítomný v kvasených a destilovaných nápojoch, v koncentrovanej podobe sa používa ako antiseptické a dezinfekčné činidlo, respektíve ako povrchovoaktívna látka v rôznych emulziách. Vďaka svojej neutrálnej chuti a vôni slúži ako jedno z univerzálnych rozpúšťadiel v kozmetike a farmácii. Čoraz častejšie sa etanol používa aj ako prímies do pohonných zmesí, čo prispieva k zvýšeniu podielu obnoviteľných zdrojov v palivách. K jeho výhodám patria hlavne dostupnosť surovín pre jeho výrobu, pomerne dobre zvládnuté procesy jeho prípravy a purifikácie, malá ekologická záťaž prostredia samotnou výrobou, a v porovnaní s inými náhradami fosílnych palív, jeho nízka toxicita voči človeku a ostatnej biosfére. Použitie etanolu ako paliva znižuje tvorbu oxidov dusíka a prchavých organických látok, tvorbu ozónu a smogu, a taktiež neprispieva ku vzniku skleníkového efektu.

Za klasickú technológiu výroby kvasného liehu považujeme vsádzkový spôsob fermentácie a následnú destiláciu prekvasenej zárapy. Vsádzková fermentácia bola vyvinutá asi pred sto rokmi a ešte aj v súčasnosti je jednou z najrozšírenejších výrobných etanolu. Ako surovina sa donedávna najčastejšie používala melasa, aj keď v súčasnosti sa viac presadzujú škrobnaté suroviny. Melasa sa pred fermentáciou najprv nariedi na koncentráciu sušiny od 20 do 40 % hmot. podľa použitej technológie, doživí zdroj om dusíka, prípadne inými živinami a okyslí na pH 4,5. Pripravená zápara sa inokuluje čistou kultúrou kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Teplota počas fermentácie sa udržiava okolo 30 °C. Jacqueminov spôsob

vsádzkovej fermentácie, tzv. klasický spôsob, je založený na prítokovaní zárapy počas fermentácie, čím sa zabráni inhibícií fermentácie vysokou koncentráciou substrátu a dosiahne sa vysoký stupeň prekvasenia. Na zakvášanie fermentorov sa používa zriedenejšia zápara (okolo 20 % hmot. sušiny, čo pri melase predstavuje približne 150 g.l⁻¹ sacharózy). Následne sa koncentrovanejšiou záparou (30–40% hmot. sušiny, prípadne aj viac) doplní objem fermentorov tak, aby koncentrácia a sušiny neklesla pod hodnotu 10 % hmot. Aby sa zabezpečila nepretržitá prevádzka destilačného zariadenia, batéria fermentorov sa zakváša v pravidelných intervaloch. Hlavné kvasenie trvá 36 až 48 hodín, pričom koncentrácia etanolu v prekvasenej zápare je 10 až 12 % obj. Produktivita takéhoto systému je 1,8–2,5 g.l⁻¹.h⁻¹. Výťažok etanolu zo skvasiteľných sacharidov predstavuje 90 až 95 % zo stechiometrického množstva. Nevýhodou klasickej vsádzkovej fermentácie je nižšia využitelnosť kvasného priestoru spôsobená fázou prípravy, plnenia a rozkvášania^{1,2}. Pri Melleovom-Boinotovom spôsobe vsádzkovej fermentácie sa kvasinky z predchádzajúcej fermentácie po odseparovaní preperu v 2 % kyseliny sírovej na usmrtenie bakteriálnej infekcie a použijú na zakvasenie nasledujúcej fermentácie. Týmto spôsobom sa ušetrí substrát potrebný na biosyntézu nových buniek, teda sa zvýši výťažok etanolu na spotrebovaný sacharid a zrýchli sa kvasný proces, čím sa zvýši produktivita³. Nevýhodou je nutnosť inštalácie drahých odstrediviek.

Vsádzková fermentácia je síce veľmi jednoduchý proces, ale investične aj prevádzkové náklady sú značné. V súčasnosti, keď vo svete stúpa spotreba liehu a budujú sa nové liehovary na palivový etanol, sa intenzívne vyvíjajú rôzne modernizácie klasickej technológie, ktoré znížia investičné náklady a zvýšia efektívnosť výroby. Súčasný svetový inovačný trend sa zakladá hlavne na kontinualizácii výroby, využívaní najnovších poznatkov biotechnológií a aplikácií nových postupov pri získavaní etanolu z prekvasenej zárapy.

2. Simultánna sacharifikácia a fermentácia škrobu

Jednou z perspektívnych inovácií klasickej technológie je priama utilizácia škrobových surovín, keď dochádza k simultánnej sacharifikácii škrobu vplyvom amyláz a jeho fermentácii na etanol. Ako zdroj amyláz sa využívajú predovšetkým mikroorganizmy, najmä vláknité huby a baktérie, a to pre ekonomickú výhodnosť a regulovateľnosť produkčného procesu enzýmov³. Komerčne vyrábané enzýmové preparáty na stekutenie a sacharifikáciu škrobu sa pridávajú priamo do fermentačného média a používajú sa jednorázovo, alebo sú imobilizované na vhodnom nosiči, čím sa značne predĺži ich životnosť. Stekutenie škrobu pomocou endoamylázy (α -amylázy) a následná sacharifikácia enzýmovou hydrolyzou (glukoamylázou) na nízkomolekulové sacharidy a až na glukózu prebiehajú ako predstupne fermentácie. Súčasným priebehom týchto procesov v jednom výrobnom stupni by sa znížila inhibícia fermentácie vysokou koncentráciou glukózy a zvý-

šila výrobná kapacita liehovarov. Problémom býva nájsť optimálne podmienky pre aktivitu enzýmov a pre fermentačnú aktivitu kvasiniek.

Nemalá pozornosť sa v poslednej dobe venuje aj štúdiu kvasiniek s amylolytickou aktivitou, schopných rozkladať škrob a jeho degradačné produkty skvasovať na etanol (napr. *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces diastaticus*, *Schwaniomyces castellii*). Nevýhodou kvasiniek s vysokou amylolytickou aktivitou je ich nižšia etanoltolerancia v porovnaní s liehovárnickými kmeňmi.

Autori Reddy a Basapa⁴ sa venovali štúdiu priamej produkcie etanolu zo škrobu z manioku. Spomedzi 230 testovaných kmeňov vybrali kmeň *Saccharomycopsis fibuligera* (*Endomycopsis fibuligera* NRRL 76), ktorý vykazoval najvyššiu produkciu α -amylázy a glukooamylázy, aj etanolu. Tento kmeň, v porovnaní s ostatnými, bol schopný tolerovať najvyššie koncentrácie etanolu a konvertovať najväčšie množstvo škrobu na etanol, pričom produkoval najmenej biomasy. Maximálne výťažky etanolu, až 73,5 a 92,0 g.l⁻¹ v médiách obsahujúcich 200 a 300 g.l⁻¹ škrobu boli dosiahnuté pri pH 6,0 a teplote 30 °C po 4 dňoch fermentácie, pričom prvý deň prebiehala fermentácia za aeróbných podmienok a následne 3 dni anaeróbne.

Pri priamej produkcii etanolu z dextrínu v kontinuálne pracujúcom reaktore De Mot a Verachtert⁵ použili kmeň *Saccharomyces diastaticus* imobilizovaný v polyuretanových maticiach. V médiu obsahujúcom 200 g.l⁻¹ dextrínu bola dosiahnutá finálna koncentrácia etanolu až 69 g.l⁻¹, pričom produktivita takéhoto zariadenia bola 7,6 g.l⁻¹.h⁻¹. Použitím série dvoch kontinuálne pracujúcich reaktorov, kde v prvom reaktore bol imobilizovaný kmeň *S. diastaticus* a v druhom *Saccharomycopsis fibuligera*, sa zvýšila produktivita na 12,7 g.l⁻¹.h⁻¹. Výťažok etanolu zo substrátu sa však v takomto systéme nezmenil, 70 g.l⁻¹ etanolu získaných v médiu s počiatočnou koncentráciou dextrínu 200 g.l⁻¹ predstavovalo 70 % z teoretického množstva.

Intenzívne sa študuje aj využitie „ko-kultúry“ kvasiniek s amylolytickou aktivitou a etanol produkujúcich kvasiniek. V práci autorov Abouzied a Reddy⁶ bola použitá zmesná kultúra kvasiniek *Saccharomycopsis fibuligera* a *Saccharomyces cerevisiae*. Po 4 dňoch fermentácie bolo v médiu s pôvodným obsahom škrobu 100 g.l⁻¹ stanovených takmer 48 g.l⁻¹ etanolu. So zvyšujúcou sa koncentráciou inokula *S. cerevisiae* stúpal výťažok etanolu. Piršelová a kol.⁷ pri fermentáciách škrobu zmesnou kultúrou tvorenou kvasinkami tých istých druhov, ale bez prídavku kvasničného autolyzátu, pozorovali zvýšenie výťažku etanolu pri zvyšujúcej sa koncentrácii buniek *S. fibuligera* v inokule. Vplyv počiatočného pH sa prejavil pri koncentráciách škrobu vyšších ako 40 g.l⁻¹, kedy so zvyšujúcim sa pH stúpal výťažok etanolu. Najvyššie koncentrácie etanolu (13,74 g.l⁻¹ z 55 g.l⁻¹ škrobu) boli dosiahnuté pri pH 5,8 a 6,0.

Pri simultánnej sacharifikácii a fermentácii škrobu sa môžu využiť aj etanol produkujúce kmene kvasiniek s amylázovou aktivitou, ktoré boli získané fúziami alebo technikami rekombinantnej DNA. Pre produkciu etanolu zo škrobu bol testovaný geneticky manipulovaný liehovárnický kmeň *Saccharomyces cerevisiae*, schopný expresie génu z *Aspergillus awamori* kódujúceho glukooamylázu⁸. Pri vsádzkových fermentáciách bol ako zdroj uhlíka použitý škrob (100 g.l⁻¹) a pre porovnanie aj glukóza (100 g.l⁻¹). Po 48 hodinách fermentácie zostalo v médiu iba 7 g.l⁻¹ zvyškového škrobu a až 44,8 g.l⁻¹

naprodukovaného etanolu. Pri fermentáciách na škrabe bola pozorovaná nižšia tvorba glycerolu (1,62 g.l⁻¹) ako pri fermentáciách na glukóze (6,47 g.l⁻¹).

3. VHG-fermentácia

Very-high-gravity (VHG) fermentácia je novou technológiou produkcie etanolu, ktorá je založená na fermentácii vysoko koncentrovaných zápar. Táto technológia je určená najmä pre spracovanie rôznych škrobnatých surovín, ktoré sú pre výrobu etanolu vo svete veľmi rozšírené. V súčasnosti najčastejšie používanými obilninami sú kukurica, pšenica, jačmeň alebo raž. V priemysle sa používajú zápar s koncentráciou 200 až 240 g extraktu na 1 kg zápar. VHG-technológia je definovaná ako fermentácia zápar obsahujúcich viac ako 270 g extraktu na 1 kg zápar, čo predstavuje koncentráciu extraktu 300 g.l⁻¹. Najvyššia možná koncentrácia zápar, pri ktorej fermentácia ešte býva ukončená, je 390 g extraktu/l (cit.⁹). Takto vysoko koncentrované zápar sa pripravujú v dvoch krokoch. Najprv sa pripraví zápara s koncentráciou extraktu 200 až 240 g.l⁻¹. Po odstránení nerozpustných častíc sa roztok zmieša potrebným množstvom škrobnej suroviny a pripraví sa druhá zápara. Týmto spôsobom sa dosiahne koncentrácia extraktu vo výslednej zápare až 390-400 g.l⁻¹.

VHG-technológia umožňuje podstatné zvýšenie finálnej koncentrácie etanolu v prekvasenej zápare. Pri teplote 20 °C a zvýšenom obsahu dusíkatého zdroja je pri tejto koncentrácii extraktu v zápare možné dosiahnuť finálnu koncentráciu etanolu až 21-23 % obj. Pri koncentrácii extraktu 400 g.l⁻¹ sa fermentácia zastaví, aj keď v médiu je ešte veľký podiel nespotrebovaného extraktu¹⁰. Na dosiahnutie uvedených vysokých koncentrácií etanolu neboli použité špeciálne pripravené alebo geneticky manipulované kmene kvasiniek.

Pri procese prípravy zápar sa z obilných zŕn uvoľňujú všetky látky potrebné pre rast kvasiniek. Limitujúcim môže byť iba zdroj dusíka¹¹. Hladina asimilovateľného dusíka (FAN) v záparách býva príliš nízka pre zabezpečenie potrebnej rýchlosti fermentácie, a to najmä pri záparách s vysokými koncentraciami skvasiteľných sacharidov. Prídavok dusíkatého zdroja v rôznych formách stimuluje rast kvasiniek a zvyšuje rýchlosť fermentácie¹¹⁻¹³. Najčastejšie používanými zdrojmi dusíka sú kvasničný autolyzát, kazeínový hydrolyzát, voľné aminokyseliny alebo močovina. Thomas a kol.¹⁰ pozorovali, že prídavok kvasničného autolyzátu (2 % hmot.) k zápare s obsahom 380 g extraktu/l skrátil čas potrebný na úplné prekvasenie. Po 130 hodinách bola výsledná koncentrácia etanolu 23,8 % obj., zatiaľ čo zápara bez prídavku kvasničného autolyzátu bola prekvasená až po 230 hodinách s podobným výťažkom etanolu. Kvasničný autolyzát je pre priemyslennú prax ekonomicky neprijateľný¹². Najlacnejším, a aj jedným z najúčinnějších zdrojov dusíka je močovina, avšak močovinu nie je možné používať pri výrobe etanolu pre potravinárske účely. Na zvýšenie obsahu asimilovateľného dusíka môžu byť použité aj komerčne dostupné proteázy, ktoré hydrolyzou proteínov uvoľňujú do média voľné aminokyseliny¹⁴. Lacným zdrojom dusíka sú aj použité liehovárnické kvasinky. Po skončení fermentácie sa kvasinky môžu nechať autolyzovať a extrakt môže byť použitý ako zdroj dusíka pre nasledujúcu fermentáciu¹³.

Vysoká koncentrácia extraktu v zápare spôsobuje zvýšenie osmotického tlaku, ktorý má za následok zníženie fermentácie.

tačnej aktivity a stratu viability buniek. Prídavok osmoprotektantov, ako sú glycin, betaín a proflín, zvyšuje viabilitu buniek počas fermentácie vysoko koncentrovanej zápary¹⁵.

V priemyselnej praxi sa fermentácie pri nižších koncentráciách zápar vedli pri teplotách 30 až 35 °C. Pri takýchto teplotách by fermentácie zápar obsahujúcich 370-380 g extraktu/l, v dôsledku kombinovaného negatívneho účinku vysokého osmotického tlaku a zvýšenej teploty na bunky, neviedli k úplnému prekvaseniu využiteľných sacharidov. Na úplné prekvasenie vysoko koncentrovaných zápar je preto potrebné znížiť fermentačnú teplotu na približne 20 °C. Bolo pozorované, že prídavok kvasničného autolyzátu stimuluje fermentácie pri 20 °C, avšak neovplyvňuje rýchlosť fermentácie pri 30 a 35 °C (cit.¹⁰). Jones a Ingledew¹⁶ študovali vplyv teploty na fermentáciu zápar s obsahom 365 g extraktu/l. Zvýšením teploty (zo 17 na 33 °C) sa síce znížil výťažok etanolu, ale skrátil sa čas potrebný na úplné prekvasenie. Prídavok močoviny (16 mmol.l⁻¹) mal za následok zvýšenie výťažku etanolu aj ďalšie skrátenie fermentácie. Optimálna teplota fermentácie závisí od koncentrácie extraktu v zápare a od koncentrácie pridaného zdroja dusíka. Pre záparu s obsahom 365 g extraktu/l a prídavkom 16 mmol.l⁻¹ močoviny bola ako optimálna stanovená teplota 27 °C.

Vedenie fermentácie pri vyšších teplotách sa pozitívne odrazí na ekonomike procesu, pretože sa zvýši fermentačná rýchlosť, ale aj znížia náklady na chladenie.

Nevýhodou VHG technológie je vysoká viskozita zápar, a z toho vyplývajúce problémy pri prečerpávaní a miešaní zápar, ktoré majú za následok zvýšenú spotrebu energie. Nutnou podmienkou úspešnej aplikácie VHG technológie v priemysle je príprava zápar s nižšou viskozitou. Zvýšená viskozita je spôsobená zvýšeným obsahom P-glukánov a pentózanov v koncentrovaných záparách. Počas fermentácie viskozita zápary pomaly klesá, čo je pravdepodobne zapríčinené enzymatickou konverziou dextrínov na sacharidy a ich okamžitou fermentáciou na etanol, čiastočnou hydrolýzou proteínov, vyžrážaním proteínov a P-glukánov pôsobením etanolu a enzymatickým pôsobením kvasiniek na β -glukány¹⁷. Podstatné, až 10-násobné zníženie viskozity zápary v krátkom čase sa dá dosiahnuť prídavkom β -glukanázy¹⁷⁻¹⁹. Určité zníženie viskozity bolo pozorované aj po prídavku komerčne dostupných proteáz¹⁴.

Oxid uhličitý rozpustený v médiu má silný inhibičný účinok na fermentačnú aktivitu kvasiniek. Zníženie viskozity zápar napomáha rýchlejšiemu uvoľňovaniu CO₂ z média¹⁴. Pozitívny vplyv koloidných častíc (ako centier pre tvorbu bublín CO₂) na uvoľňovanie CO₂ z média nebol dokázaný¹¹. Nežiaduce problémy môže spôsobovať nadmerné penenie vysoko koncentrovaných zápar.

Pre fermentáciu vysoko koncentrovaných zápar sú potrebné liehovarnícke kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sa vyznačujú dobrou etanol- a osmotoleranciou. Aby bola zabezpečená potrebná rýchlosť fermentácie je dôležité nájsť optimálny stupeň inokulácie, ako aj zabezpečiť nároky kvasiniek na živiny.

Použitím VHG technológie sa zvýši kapacita a efektívnosť zariadení, a taktiež sa zmenší spotreba vody na prípravu zápar⁹. Možno konštatovať, že použitím koncentrovanejších zápar sa zväčšuje výkon jednotkového objemu fermentačných zariadení. Ďalším prínosom VHG technológie je zvýšenie koncentrácie etanolu v prekvasenej zápare, čo súčasne znižuje spotrebu tepla pri destilácii.

4. Fermentácia imobilizovanými kvasinkami

Jednou z veľmi perspektívnych modernizácií je produkcia etanolu imobilizovanými mikroorganizmami v kontinuálnom systéme. V porovnaní s inými kontinuálnymi systémami má technológia imobilizovaných buniek viaceré výhody. V prvom rade je to zabránenie vyplavovaniu biomasy z fermentora, ďalej možnosť pracovať pri vysokých zriedovacích rýchlostiach a s vysokou koncentráciou biomasy. Fermentácie imobilizovanými bunkami umožňujú dosiahnuť vysokých výťažkov etanolu a znižujú inhibičný účinok etanolu na bunky, znižujú riziko kontaminácie oproti kontinuálnym systémom s voľnými bunkami, a takisto umožňujú jednoduchú kontrolu systému²⁰⁻²¹.

Kvasinkové bunky je možné imobilizovať viacerými technikami, ako napríklad adsorpciou na povrch interného nosiča, zachytením na membránu alebo do vnútra polyméru. Na imobilizáciu buniek zachytením do gélu sa používa široká paleta materiálov slúžiacich ako nosiče, najčastejšie to sú gél alginátu vápenatého, karagenanu alebo pektátu vápenatého, ale používajú sa aj polyakrylamidový gél, gél agaru alebo kremičitý gél. Pre fermentáciu imobilizovanými kvasinkami sa používajú rôzne typy bioreaktorov, ale najjednoduchšími a najčastejšie používanými sú náplňové „packed-bed“ bioreaktory. Pri fermentácii s bunkami imobilizovanými na mikronosičoch Celite-R633 v náplňovom bioreaktore pri prítoku substrátu s obsahom glukózy 150 g.l⁻¹ bola dosiahnutá takmer úplná utillizácia glukózy (1 g.l⁻¹ glukózy vo výstupnom prúde)²². Výstupná koncentrácia etanolu bola 73 g.l⁻¹, čo predstavovalo až 94 % z teoretického výťažku. Mikroskopickým pozorovaním sa zistilo, že imobilizované bunky boli sústredené najmä v póroch mikronosičov, a nie na povrchu.

Pri kontinuálnej fermentácii v náplňovom bioreaktore kvasinkami imobilizovanými v Ca-algináte bola pri koncentrácii substrátu 200 g.l⁻¹ a zriedovacej rýchlosti 0,5 h⁻¹ dosiahnutá maximálna produktivita etanolu 25 g.l⁻¹.h⁻¹, čo predstavovalo 58,8 % z teoretického výťažku²¹. Ani po 30-tich dňoch fermentácie nebola pozorovaná strata viability imobilizovaných buniek alebo poškodenie Ca-alginátových nosičov. Zlepšenie parametrov fermentácie v systéme s imobilizovanými kvasinkami v náplňovom bioreaktore sa dá dosiahnuť ak je prítok substrátu pulzačný. Pulzačný tok tekutiny vstupujúcej do bioreaktora zabraňuje tvorbe zhlukov nosiča s bunkami, ktoré sa po určitom čase začínajú vytvárať v systémoch s nepulzačným tokom. V takomto systéme bola dosiahnutá celková produktivita etanolu až 36 g.l⁻¹.h⁻¹, čo oproti nepulzačnému systému predstavovalo zvýšenie o 18 % (cit.²³). Imobilizované bunky kvasiniek sa dajú použiť aj pri vsádzkovej fermentácii s prítokom. Po skončení fermentácie je oddelenie kvasiniek veľmi jednoduché a imobilizované kvasinky sa okamžite môžu použiť pre ďalšiu fermentáciu, pričom si dlhšiu dobu zachovávajú svoju aktivitu²⁴.

Vážnym problémom pri používaní imobilizovaných kvasiniek býva deštrukcia géloveho nosiča uvoľňujúcim sa oxidom uhličitým. Nevýhodou systémov s imobilizovanými kvasinkami býva limitácia buniek vo vnútri nosiča substrátom, v dôsledku pomalej difúzie substrátu cez gél a vysokej fermentačnej aktivity buniek. Z tohto dôvodu je dôležité nájsť optimálnu veľkosť guľčiek nosiča, ktorá závisí od druhu použitého nosiča, imobilizovaného mikroorganizmu, ale aj od technologických vlastností fermentora²⁵. Na štúdium kinetiky difúzie

a procesov prebiehajúcich v strede nosiča bol použitý reaktor s gélovou membránou obsahujúcou imobilizované bunky²⁶. Autori pozorovali, že bunky v strede Ca-alginátových nosičov boli limitované nedostatkom substrátu, na druhej strane bunky vo vrstvách pri povrchu intenzívnejšie rástli a rozmnožovali sa.

Imobilizácia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v určitom nosiči ovplyvňuje špecifickú metabolickú aktivitu buniek²⁷. V imobilizovaných bunkách sa zvýši rýchlosť enzymatických reakcií viacerých krokov Embdenovej-Meyerhofovej dráhy, v dôsledku čoho je špecifická rýchlosť produkcie etanolu a súčasne aj rýchlosť utíľizácie substrátu vyššia o 40 až 50 % oproti voľným bunkám. Imobilizované bunky obsahujú viac zásobných látok a štrukturálnych polysacharidov, a takisto majú v porovnaní s voľnými bunkami vyššiu ploiditu.

Na etanoltoleranciu buniek má vplyv obsah mastných kyselín a sterolov v bunkách. Mierne okysličovanie média počas fermentácie indukuje zvýšenie tvorby mastných kyselín a sterolov, čím sa zvyšuje tolerancia buniek voči etanolu, a tým aj výťažky etanolu. Prídavkom mastných kyselín a sterolov vo forme sójovej múčky do fermentačného média namiesto okysličovania média bolo v systéme s imobilizovanými bunkami dosiahnuté skrátenie fermentačného času až o 50 % (cit.²⁸).

5. Kontinuálna fermentácia s recyklom buniek

Vysoká koncentrácia kvasiniek má pozitívny vplyv na produktivitu etanolu, čo sa už dávno využíva pri vsádzkovej fermentácii s recyklom buniek. V kontinuálne pracujúcich bioreaktoroch sa zabezpečuje recykus buniek tromi rôznymi spôsobmi: centrifugáciou, flokuláciou buniek alebo membránovou filtráciou.

Technológie s recyklom buniek zabezpečeným centrifugáciou potrebujú drahé droždianske centrifúgy s vysokou spotrebou energie, čím sa zvyšujú náklady na jednotku vyrobeného etanolu. Z uvedených dôvodov sú do budúcnosti perspektívne technológie využívajúce iné, lacnejšie spôsoby separácie a recyklácie buniek.

Využitie flokulácie ako prirodzenej vlastnosti niektorých kmeňov *Saccharomyces cerevisiae* umožní udržiavanie vysokej koncentrácie buniek v bioreaktore bez nákladov na spotrebu energie. Pre kontinuálne fermentácie flokulujúcimi bunkami sa používajú vežové bioreaktory s kónickým dnom a rozšírenou hornou časťou so zarážkami. Paiva a kol.²⁹ použili vežový bioreaktor bez rozšírenej hornej časti, ale s externou usadzovacou nádržou. Maximálna produktivita etanolu ($18 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) zodpovedajúca 90 g.l^{-1} etanolu v médiu) bola dosiahnutá pri koncentrácii biomasy 100 g.l^{-1} , zriedovacej rýchlosti $0,2 \text{ h}^{-1}$ a prítoku substrátu s koncentraciou 200 g.l^{-1} .

Jednou z perspektívnych technológií výroby etanolu je kontinuálna fermentácia s recyklom buniek zabezpečeným membránovým filtrom s krížovým tokom. Membránová filtrácia umožňuje sterilnú, vysoko efektívnu separáciu buniek. Melzoch a kol.³⁰ pracovali v opísanom systéme s koncentraciou biomasy v rozsahu od 10 do 60 g.l^{-1} . Maximálna produktivita etanolu ($15 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) bola získaná pri koncentrácii biomasy 46 g.l^{-1} . So zvyšujúcou sa koncentraciou buniek v bioreaktore klesali nároky buniek na energiu na udržiavanie fyziologického stavu, čím sa zvyšoval výťažok etanolu. Pri koncentrácii biomasy 120 g.l^{-1} bola v podobnom kontinuál-

nom systéme s recyklom buniek dosiahnutá produktivita etanolu až $70 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (cit.³¹). Vysoká koncentrácia buniek (nad 120 g.l^{-1}) však spôsobovala problémy s nadmerným penením. Podľa ekonomickej analýzy je 50 až 100 g.l^{-1} optimálna koncentrácia buniek v kontinuálnom fermentore s membránovou filtráciou³². Prídavok malého množstva odpeňovacieho činidla pri tejto koncentrácii buniek zabráni nadmernému peneniu. V štúdiu autorov Warrena a kol.³³ sa uvádza cenový odhad výstavby závodu na 1 milión hl etanolu za rok s technológiou kontinuálnej fermentácie s použitím mikrofiltrácie s krížovým tokom pre dosiahnutie recyklu buniek.

Kontinuálne systémy s recyklom buniek s externým membránovým modulom majú určité nevýhody. Substráty používané v priemysle obsahujú častice rôznych veľkostí, ktoré môžu spôsobovať zanášanie membrán. Problémy sa môžu objaviť aj pri sterilizácii externých membrán. Recirkuláciou fermentačného média cez membránový modul sa zvyšuje spotreba energie, a tiež sa môže objaviť inhibícia buniek vo vonkajšom okruhu vytvárajúcim sa oxidom uhličitým. Etanolová fermentácia v kontinuálnom systéme s filtračným modulom zabudovaným vo vnútri fermentora sa zdá byť pre priemyselné využitie výhodnejšia ako systém s externým filtrom³⁴. Optimálne koncentrácie biomasy boli stanovené, podobne ako pri systémoch s externým filtrom, v rozsahu od 90 do 150 g.l^{-1} , pričom produktivita etanolu pri zriedovacej rýchlosti $0,41 \text{ h}^{-1}$ bola v uvedenom systéme $20 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

6. Vákuová fermentácia

Vákuová fermentácia etanolu je známa už dlhú dobu. Pôsobením vákua sa etanol odstraňuje z fermentačného média kontinuálne alebo v cykloch. Udržiavaním nízkej hladiny etanolu v médiu nedochádza k inhibícii fermentačnej aktivity a ani ku strate viability kvasiniek, ktoré si takto zachovávajú vysokú metabolickú aktivitu.

Cysewski a Wilke^{35,36} sa vo svojich prácach zaoberali kombináciou vákuovej fermentácie (pri tlaku 7,3 kPa) a recyklu buniek (zabezpečeného centrifugáciou) pri produkcii etanolu z melasy kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*. Produktivita etanolu v takomto systéme bola $82 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, čo v porovnaní s kontinuálnym systémom pracujúcim pri atmosférickom tlaku predstavuje 12-násobné zvýšenie. Okysličovaním média čistým kyslíkom boli zabezpečené nároky buniek na kyslík. V prítomnosti potrebného množstva kyslíka nebol zaznamenaný pokles viability buniek. Koncentrácia biomasy na konci vákuovej fermentácie (124 g.l^{-1}) bola o 50 % nižšia ako pri fermentácii pri atmosférickom tlaku. Autori predpokladajú, že nižší nárast biomasy bol priamym dôsledkom vyšších nárokov buniek na udržiavanie fyziologického stavu vo vákuu. Nižší nárast biomasy mohol byť spôsobený aj nedostatkom kyslíka v médiu, vzhľadom na jeho nižšiu rozpustnosť vo vákuu.

Vákuová fermentácia sa študovala najmä v súvislosti so simultánnou sacharifikáciou a fermentáciou (SSF) lignocelulózových materiálov na etanol kvasinkami druhu *Candida acidothermophilum*. Pretože na vákuovanie systému je potrebná značná energia, Ghose a kol.³⁷ navrhli odstraňovanie etanolu z fermentačného média vákuom v cykloch. Z fermentora pracujúceho pri normálnom tlaku bolo fermentačné médium po dosiahnutí koncentrácie etanolu nad 20 g.l^{-1} po dobu jednej

hodiny prečerpávané do plochej nádoby s tlakom 10,7 kPa. Pary etanolu a vody sa z vákuovanej nádoby viedli cez chladič a vzniknutý kondenzát bol zachytávaný v zbernej nádobe. V uvedenom systéme sa študovali tri rôzne spôsoby vedenia SSF fermentácie: bez a s cyklickým vákuovým odstraňovaním etanolu a s cyklickým vákuovým odstraňovaním etanolu a prítokovaním substrátu. Fermentáciou bez vákuového odstraňovania etanolu sa dosiahla produktivita $1,25 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pričom výťažok etanolu bol $0,32 \text{ g.g}^{-1}$. Zaradením cyklického vákuového odstraňovania etanolu sa dosiahla 1,4-krát vyššia produktivita etanolu ($1,8 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) a výťažok etanolu $0,49 \text{ g.g}^{-1}$. Prítokovaním substrátu počas fermentácie s vákuovými cyklami sa produktivita zvýšila až na $4,5 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, s výťažkom etanolu $0,52 \text{ g.g}^{-1}$. Maximálna koncentrácia etanolu v kondenzáte (136 g.l^{-1}) bola získaná po 15 minútach pôsobenia vákua, priemerná koncentrácia etanolu v kondenzáte po 1 hodinovom vákuovom cykle bola $121,5 \text{ g.l}^{-1}$.

V rovnakom vákuovom systéme bolo v kondenzáte po 26 cykloch zachytených až 92 % z celkového vyprodukovaného etanolu³⁸. Straty etanolu počas pôsobenia vákua predstavovali 5,3 % z celkového vyprodukovaného množstva, 1,5 % zostalo v prekvasenom médiu vo fermentore a 0,9 % v premývacej vode. Skrátением doby trvania jednotlivých vákuových cyklov sa môže zvýšiť obsah etanolu v kondenzáte, avšak treba mať na zreteli koncentráciu etanolu vo fermentore. Skrátением vákuového cyklu zo 60 na 15 minút sa zvýšila koncentrácia etanolu v kondenzáte zo 122 na 139 g.l^{-1} a energia potrebná na vákuovanie systému klesla o 70 % (z 0,02 na $0,006 \text{ MJ/mol}$ etanolu).

Nevýhodou vákuovej fermentácie je, že v priebehu fermentácie sa môžu vytvárať určité neprchavé inhibitory, ktoré znižujú výslednú produktivitu. Počas vákuovej SSF fermentácie lignocelulóзовých materiálov sa vo fermentačnom médiu akumulujú popol tvoriace látky³⁴. Počas fermentácie sa zvýši koncentrácia uvedených látok v médiu z $11,8$ na 39 g.l^{-1} a tým poklesne rýchlosť tvorby etanolu z $2,6$ na $1,9 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Vysoká produktivita vákuovej fermentácie (až vyše $80 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) v porovnaní so vsádzkovou fermentáciou (okolo $2 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$) umožňuje podstatné zníženie investičných nákladov³², pretože pre zabezpečenie rovnakej produkcie etanolu je namiesto 26 fermentorov pracujúcich vo vsádzkovom režime potrebný len jeden fermentor, z ktorého je etanol odstraňovaný periodicky pôsobením vákua. Spotreba energie sa pri vákuovej fermentácii podstatne zníži použitím fermentora so zabudovaným boilerom na rekomprimovanú paru, kedy sa využíva výparné teplo rekomprimovanej pary na vyhrievanie fermentora, čím para zároveň kondenzuje. Nároky na spotrebu energie sú teda v takomto systéme v porovnaní s klasickou technológiou približne rovnaké alebo iba nepatrne vyššie³⁹.

7. Extraktívna fermentácia

Pri extraktívnej fermentácii sa etanol vhodným rozpúšťadlom postupne extrahuje z fermentačného média. Rozpúšťadlo nesmie byť miešateľné s vodou a toxické voči kvasinkám a musí mať vysokú afinitu k etanolu. Najčastejšie testovaným je 1-dodekanol, použité boli aj dibutylftalát a 1-tetradekanol. Takisto ako aj iné fermentácie s kontinuálnym odstraňovaním etanolu z média, aj extraktívna fermentácia umožňuje použitie vysoko koncentrovaných zápar, bez následnej inhibície vyso-

kou koncentráciou produktu, avšak môže sa objaviť inhibícia vedľajšími produktami neextrahovateľnými do použitého rozpúšťadla.

Pri kontinuálnej fermentácii sa použitím priamej extrakcie etanolu dibutylftalátom zvýši produktivita z $8,2$ na $20 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (cit.⁴⁰). Ak sa v takomto systéme použije aj recykus buniek produktivita etanolu stúpe až na $45 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$, pričom až 70 % vytvoreného etanolu sa extrahuje do použitého rozpúšťadla.

Gyamerah a Glover⁴¹ pri štúdiu extraktívnej fermentácie použili koncentráciu glukózy v prítoku od 100 do 458 g.l^{-1} . Stupeň konverzie glukózy stúpal so stúpajúcou koncentráciou glukózy a dosiahol hodnoty 88,0 až 97,6 %. Najvyšší výťažok etanolu (91,9 % z teoretického výťažku) bol získaný pri koncentrácii 272 g.l^{-1} glukózy v prítoku.

Prítomnosť voľných buniek vo fermentačnom médiu môže spôsobiť emulzifikáciu rozpúšťadla. Tomuto problému sa dá zabrániť použitím imobilizovaných buniek⁴¹.

Výhodou extraktívnej fermentácie je zníženie nákladov na získavanie produktu z fermentačného média v porovnaní s klasickou destiláciou, avšak výber vhodného, pre mikroorganizmy netoxického, rozpúšťadla zostáva problémom.

8. Záver

Prirodzeným dôsledkom zvyšujúcej sa spotreby etanolu je rozvoj liehovarníckeho výskumu, zameraný na modernizáciu klasickej fermentácie i zavádzanie nových technologických postupov, ktoré umožňujú zvýšenie efektívnosti výroby. Jednou z inováčných technológií je simultánna sacharifikácia a fermentácia škrobu vplyvom amyláz alebo kvasiniek s amylolytickou aktivitou v kombinácii s etanol produkujúcimi kvasinkami. Perspektívnymi sú VHG-fermentácie, založené na skvasovaní vysoko koncentrovaných zápar s podstatne vyššou finálnou koncentráciou etanolu v zápare, a tiež fermentácie imobilizovanými kvasinkami. Imobilizované kvasinky umožňujú pracovať s vysokými koncentraciami biomasy bez rizika jej vyplavenia z fermentora a sú odolnejšie voči toxickým účinkom etanolu. Súčasné inováčné trendy sú založené najmä na kontinualizácii výroby. Vysoká produktivita zariadenia sa dá dosiahnuť kontinuálnou fermentáciou s recykrom buniek, ktorý môže byť zabezpečený centrifugáciou, flokuláciou, ale aj membránovou filtráciou. Intenzívne sa študujú aj fermentácie s priebežným odstraňovaním etanolu z média, ako sú vákuová a extraktívna fermentácia.

LITERATÚRA

1. Augustin J.: *Liehovarníctvo a výroba mikrobiálnej biomasy*. Slovenská technická univerzita, Bratislava 1991.
2. Rychtera M., Uher J., Páca J.: *Lihovarství, drožďářství a vinařství*. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha 1987.
3. Ciesarová Z., Šmogrovičová D.: Chem. Listy 90, 497 (1996).
4. Reddy O. V. S., Basappa S. C: Starch 45, 187 (1993).
5. De Mot R., Verachtert H.: Crit. Rev. Biotechnol. 5, 259 (1987).
6. Abouzied M. M., Reddy C. A.: Biotechnol. Lett. 9, 59 (1987).

7. Piřselová K., Šmogrovičová D., Baláž Š.: World J. Microb. Biotechnol. 9, 338 (1993).
8. Inlow D., McRae J., Ben-Bassat A.: Biotechnol. Bioeng. 32, 227 (1988).
9. Thomas K. C., Hynes S. H., Ingledew W. M.: Process Biochem. 57,321 (1996).
10. Thomas K. C., Hynes S. H., Jones A. M., Ingledew W. M.: Appl. Biochem. Biotechnol. 43, 211 (1993).
11. Thomas K. C., Ingledew W. M.: Appl. Environ. Microbiol. 5(5), 2046(1990).
12. Jones A. M., Ingledew W. M.: Process Biochem. 29, 483 (1994).
13. Jones A. M., Ingledew W. M.: Bioresour. Technol. 50, 97 (1994).
14. Jones A. M., Ingledew W. M.: Enzyme Microb. Technol. 16, 683 (1994).
15. Thomas K. C., Hynes S. H., Ingledew W. M.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 1519 (1994).
16. Jones A. M., Ingledew W. M.: Appl. Environ. Microbiol. 60, 1048 (1994).
17. Ingledew W. M., Jones A. M., Bhatti R. S., Rossnagel B. G.: Cereal Chem. 72, 147 (1995).
18. Thomas K. C., Ingledew W. M.: J. Ind. Microbiol. 15, 125 (1995).
19. Thomas K. C., Dhas A., Rossnagel B. G., Ingledew W. M.: Cereal Chem. 72, 360 (1995).
20. Khan E., Yang P. Y., Kinoshita C. M.: *International summer meeting of the American Society of Agricultural Engineers. Charlotte, North Carolina, June 1992.*
21. Roukas T.: J. Chem. Technol. Biotechnol. 59, 387 (1994).
22. Melin E., Shieh W. K.: Chem. Eng. J. 50, B17 (1992).
23. Roca E., Flores J., Núñez M. J., Lema J. M.: Enzyme Microb. Technol. 19, 132 (1996).
24. Roukas T.: Biotechnol. Bioeng. 43, 189 (1994).
25. Norton S., D'Amore T.: Enzyme Microb. Technol. 16, 365 (1994).
26. De Backer L., Devleminick S., Willaert R., Baron G.: Biotechnol. Bioeng. 40, 322 (1992).
27. Doran P. M., Bailey J. E.: Biotechnol. Bioeng. 28, 73 (1986).
28. Bajpai P., Sharma A., Raghuram N., Bajpai P. K.: Biotechnol. Lett. 70,217(1988).
29. Paiva T. C. B., Sato S., Visconti A. E. S., Castro L. A. B.: Appl. Biochem. Biotechnol. 57/58, 535 (1996).
30. Melzoch K., Rychtera M., Markvichov N. S., Pospíchalová V., Basařová G., Manakov M. N.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 34, 469(1991).
31. Warren R. K., Hill G., Macdonald D. G.: Trans Inst. Chem. Eng. 72, 149(1994).
32. Warren R. K., Hill G., Macdonald D. G.: Appl. Biochem. Biotechnol. 34/35, 585 (1992).
33. Warren R. K., Macdonald D. G., Hill G.: Bioresour. Technol. 47, 121 (1994).
34. Chang H. N., Lee W. G., Kim B. S.: Biotechnol. Bioeng. 47,677(1993).
35. Cysewski G. R., Wilke C. R.: Biotechnol. Bioeng. 19, 1125(1977).
36. Cysewski G. R., Wilke C. R.: Biotechnol. Bioeng. 20, 1421 (1978).
37. Ghose T. K., Roychoudhury P. K., Ghosh P.: Biotechnol. Bioeng. 26, 371 (1984).
38. Roychoudhury P. K., Ghose T. K., Ghosh P.: Enzyme Microb. Technol. 14, 581 (1992).
39. Maiorella B. L., Wilke C. R.: Biotechnol. Bioeng. 22, 1749 (1980).
40. Chang H. N., Yang J. W., Park Y. S., Kim D. J., Han K. C.: J. Biotechnol. 24, 329 (1992).
41. Gyamerah M., Glover J.: J. Chem. Tech. Biotechnol. 66, 145 (1996).

P. Bařrcová and D. Šmogrovičová (*Department of Biochemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*): **Innovation Trends in the Production of Ethanol**

The review deals with contemporary and perspective trends in modern technological procedures of the ethanol production and the innovation trends in large-scale production. From the point of view of possible contributions and drawbacks the following techniques are discussed: simultaneous saccharification and fermentation of starch, VHG-fermentation, fermentation by immobilized yeasts, continuous fermentation with cell recycle, vacuum and extractive fermentation.