

## **Biotechnologie v potravinářském průmyslu**

### **Ústav biotechnologie**

**prof. Ing. M. Rychtera, CSc., Doc. Dr. Ing. P. Patáková, Prof. Ing. K. Melzoch, CSc.**

#### **Anotace:**

1. Obecné technologické schéma. Suroviny a media pro fermentační výroby
2. Teoretické základy kultivace mikroorganismů.
3. Mikroorganismy pro technologické použití - produkty jejich metabolismu
4. Průmyslová výroba ethanolu. I. Fermentace
5. Průmyslová výroba ethanolu. II. Izolace ethanolu ze zápar a další jeho úpravy. Bioethanol. Biopaliva
6. Výroba lihovin.
7. Výroba glycerolu, butanolu a acetonu
8. Biotechnologie organických kyselin
9. Biotechnologie aminokyselin
10. Výroba mikrobiální biomasy I. Pekařské droždí
11. Výroba mikrobiální biomasy II. Biomasa pro krmné a jiné účely
12. Zpracování odpadů potravinářského průmyslu - výroba bioplynu

#### **Literatura**

1. Kadlec P. a kol.: Přehled tradičních potravinářských výrob, Key Publishing, Ostrava 2012,
2. Kadlec P. a kol.: Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích, Key Publishing, Ostrava 2013
3. Rychtera M., Páca J. : Bioinženýrství kvasných procesů, SNTL, Praha 1985
4. Exnar P. a kol.: Lihovarnická příručka, Agrospoj, Praha 1998
5. Grégr V, Uher J.: Výroba lihovin, SNTL, Praha 1974
6. Malík F.: Dobré víno. Polygrafia SAV, Bratislava 1996
7. Rychtera M., Uher J., Páca J.: Lihovarství, droždářství a vinařství, VŠCHT Praha, 1991
8. Masák J., Pelechová J., Plachý J.: Speciální mikrobiální technologie, VŠCHT Praha, 1992
9. Sikyta B., Dušek J.: Biotechnologie pro farmaceuty, UK Praha, 1992

# 1 OBECNÉ TECHNOLOGICKÉ SCHÉMA. SUROVINY A MÉDIA PRO FERMENTAČNÍ VÝROBY

## 1.1 Principy fermentačních technologií

Fermentační (kvasné) technologie jsou zařazovány mezi mikrobiální technologie a jako takové jsou součástí biotechnologií. Společným jmenovatelem těchto technologií je optimální využití biologických, chemických a inženýrských disciplín při transformaci substrátu. Fermentační technologie patří mezi „klasické“ technologie, které se především vyvíjely v oblasti potravinářských výrob. Je třeba podotknout, že dnes jsou tyto technologie založeny na nejmodernějších technikách a zařízeních. Pouze hrubý princip zůstává stejný. Kromě výroby fermentovaných nápojů (pivo, víno a nápoje získané destilací prokvašených cukerných roztoků) patří do této kategorie výrob i ethanol, jehož použití přesahuje rámec potravinářského průmyslu. Do mikrobiálních a pro potravinářský průmysl významných technologií patří i technologie založené na submersních aerobních procesech jako je výroba pekařského droždí, octa a několika dalších organických kyselin, které našly uplatnění v potravinářském průmyslu (kyselina citronová, mléčná, glukonová aj.). Také **intracelulární a extracelulární produkty** a vlastní biomasa mnohých mikroorganismů poskytuje možnosti využití v potravinářském průmyslu (např. výroba enzymů, lipidů, provitaminů a vitaminů apod.) a řady dalších látek, např. biofaktorů důležitých pro výživu člověka a zvířat, léčiva, meziproductů chemických syntéz, výchozích produktů pro mnohá průmyslová odvětví.

**Kvasný proces** se týká především takových mikrobiálních pochodů, při kterých probíhá kvašení, tj. anaerobní (za nepřístupu vzduchu) odbourání cukrů za vzniku oxidu uhličitého a některého metabolitu. Hlavním představitelem tohoto kvašení je lihové kvašení, ale může sem patřit i mléčné kvašení nebo máselné kvašení. Ostatní procesy, zvláště ty, kdy mikroorganismy využívají kyslík a uhlíkatý zdroj nebudeme nazývat kvašením. Je možné zde použít termín fermentace, i když pouhým překladem znamená fermentace totéž co kvašení. Vznikající produkty jsou většinou primární, což znamená, že se vytvářejí současně s růstem mikroorganismu a při základním energetickém metabolismu mikroorganismu.

Obecné schéma mikrobiálního procesu zahrnuje:

- přípravu média,
- přípravu inokula (zákvasu),
- vlastní fermentaci (mikrobiologický pochod, růst buněk a tvorba produktů),
- oddělení buněk a jejich případné zpracování,
- izolaci produktu.

Fermentační proces nemusí mít všechny uvedené operace, protože jejich volba závisí na použité surovině, ze které se připravuje fermentační médium a na vlastním produktu. Pokud jsou produktem nápoje jako je pivo a víno, nebo ocet, pak nám odpadá většina izolačních a purifikačních operací (je nutné však oddělit kvasinky, v případě octa bakterie, od kvasu). Na druhé straně přibudou operace spojené se zušlechťením produktu (dokvašení, zrání, staření aj.). V případě výroby ethanolu nebo destilátů je produktem rafinovaný alkohol nebo koncentrovaný lihový roztok, pak je třeba věnovat veškeré úsilí izolaci a zkoncentrování produktu (destilace, rafinace) a v případě destilátů jde potom ještě o důležité zrání. Zvláštní postavení při výrobě má surovina, která určuje podstatnou měrou (spolu s energií) výrobní cenu produktu. U produktů, které se musí z média nebo z buněk izolovat (enzymy, vitaminy, antibiotika, aj.) jsou vedle suroviny rozhodující právě konečné operace (izolace a purifikace produktu). Velmi závažným faktorem, který může značně ovlivnit proces fermentace je mikrobiální kontaminace surovin používaných pro přípravu fermentačních médií. Některé procesy proto používají operace vedoucí ke značné redukci počtu nežádoucích mikroorganismů. Tepelná sterilace nebo pasterace media je jednou z možností vedoucí

k redukci počtu nežádoucí mikroflóry. Složky media citlivé na působení vysoké teploty se však destruuji a v těchto případech se místo tepelné sterilace využívá filtrace např. s použitím speciálních filtrů. Vlastní fermentační proces probíhá obvykle ve speciálních nádobách – bioreaktorech nebo fermentorech. Jsou to nádoby různého objemu (od objemů kolem 0,5 l až do objemů 1000 m<sup>3</sup> a více), ve kterých probíhá mikrobiální proces. Jsou opatřeny vnitřním nebo vnějším chlazením, ohříváním, míchacím zařízením, přívodem vzduchu, odvodem výdechových plynů, mechanickým nebo chemickým odpěňováním, zařízením na odběr vzorků, měřením a regulací teploty, pH, měřením koncentrace rozpuštěného kyslíku, oxidu uhličitého, redox-potenciálu, obsahu kyslíku a oxidu uhličitého v odcházejícím plynu, koncentrace biomasy, substrátu aj. Produkty, které jsou hlavně předmětem tradičních technologií patří do skupiny extracelulárních metabolitů. Biomasa je však často cenným produktem biotechnologické výroby. Některé procesy jsou zaměřeny v první řadě na její produkci (krmivářská a potravinářská biomasa, pekařské droždí). Mikrobiální biomasa se vyznačuje vysokým obsahem stravitelných bílkovin a může být zdrojem vitaminů, lipidů (fosfolipidů), enzymů, sterolů aj.

## 1.2 Suroviny a příprava kultivačního média

Většina surovin pro fermentační výroby popisované v této kapitole obsahují sacharidy jako základní uhlíkatý a energetický zdroj potřebný pro činnost kvasinek. V případě octa je však hlavním substrátem ethanol, i když malé množství sacharidu je výhodné pro růst octových bakterií. Mikrobiální výroby však představují mnohem širší odvětví než jen výrobu nápojů obsahující alkohol a to nejen co do rozsahu produktů, ale i spektra surovin a tím i uhlíkatých zdrojů.

Suroviny, jejich úprava a příprava média se liší podle druhu technologie. I když řada technologií např. využívají škrobnaté suroviny, postup úpravy je však rozdílný. O úpravě surovin se hovoří v jednotlivých kapitolách.

### 1.2.1 Suroviny pro výrobu lihu, organických kyselin, aminokyselin, biomasy

Většina technologií, o kterých pojednává tento předmět jsou založeny na kvašení a tudíž vyžadují jako substrát cukr (jednoduchý nebo složitý). Výjimku tvoří aerobní pochody, u kterých můžeme nebo často i musíme použít jiné uhlíkaté zdroje. Příkladem může být výroba octa (substrátem je ethanol) nebo produkce biomasy, kdy můžeme použít různé zdroje uhlíku (např. alkoholy, kyseliny, alkány aj.).

Nejčastějšími substráty bývá glukosa, sacharosa, laktosa (např. k výrobě kyseliny mléčné) a škrob. Tyto substráty mohou tvořit součást syntetických nebo polysyntetických médií, nebo jsou obsaženy v některých surovinách, které se potom upravují na fermentační médium. Pro technické účely se většinou nepoužívají čisté cukry, nýbrž cukry technické. Mezi významné suroviny, které obsahují sacharosu patří **melasa**. Ta je odpadním produktem cukrovarnické výroby. Podle suroviny použité k výrobě rozlišujeme melasu řepnou a melasu třtinovou. Řepná melasa obsahuje kolem 20 % vody, 50 % sacharosy, řadu živin, vitaminů a stopových prvků. Obvykle se při přípravě fermentačních médií ještě musí doplnit o chybějící živiny. Další, často používanou kategorií surovin používaných k výrobě lihu a organických kyselin jsou **suroviny obsahující škrob** (kukuřice, žito, pšenice, ječmen). Obsah škrobu v sušině bývá 60 – 70 %. V každém případě je nutno pro lihovarské kvasinky provést konverzi škrobu na jednoduché cukry ještě před fermentací. Podrobněji bude o surovinách pojednáno při jednotlivých technologiích. **Ligno-celulosové materiály** zahrnují dřevo a jeho odpady, slámu, kukuřičné palice, bagasu (zbytek po vylisování cukerné šťávy z cukrové třtiny). I když jde o levný substrát, je jeho zpracování zatím velmi nákladné. Mikroorganismy samy většinou nedovedou tyto materiály rozštěpit a proto přistupují chemické metody, které

však svými odpady zatěžují silně životní prostředí. I přes tyto nedostatky se na problematice využití ligno-celulosových odpadů intenzivně pracuje.

## **1.2.2 Suroviny pro výrobu lihovin**

Suroviny pro výrobu ovocných kvašených nápojů jsou velmi rozmanité a jejich výběr se řídí zejména podle toho, zda získaný nápoj má výrazné a příjemné aroma. Obsah cukru je samozřejmě důležitý, ale není zcela rozhodující. Stejně tak i obsah kyselin. Pro výrobu hroznového vína, je nutno použít vybrané a zavedené typy hroznů, které mají jemné aroma. Pěstování kvalitní vinné révy je nutným předpokladem pro výrobu jakostního vína.

### **1.2.2.1 Hroznové víno**

Z hroznu jsou pro výrobu nejdůležitější bobule a to nejen jejich dužnina, ale i slupky (polyfenoly tvořící barevné složky bobule, aromatické látky). Obsah monosacharidů v dužnině se pohybuje od 10 do 30 % hm. Charakter vína je určen nejen celkovým obsahem kyselin (0,2 – 0,3 % hm. v dužnině jako kyselina vinná), ale i jejich spektrem. Hlavními organickými kyselinami je kyselina vinná, jablečná a citronová.

### **1.2.2.2 Lihoviny vyráběné z ovoce**

Pro výrobu ovocného vína a ovocných destilátů a dalších lihovin lze použít téměř všech druhů ovoce (nesmí obsahovat látky jedovaté), ale přednost je dáována takovému ovoci, které se vyznačuje výrazným aroma a samozřejmě i vyšším obsahem zkvasitelného sacharidu. Pro výrobu rmutu (k výrobě destilátů) se nejčastěji používají: hrušky, jablka, švestky, meruňky, višně, kdoule, vinné hrozny, banány, černý bez, jalovčinky, jahody, jeřabiny, mango, mišpule, nektarinky, rybíz, trnky, různé druhy ořechů a jiné další. Obsah celkového cukru v ovoci je značně variabilní. Tak např. u meruněk to může být rozpětí od 3 do 16 %. Z toho většina cukrů je tvořena monosacharidy, hlavně fruktosou. Koncentrace cukru v ovoci určuje pak i koncentraci ethanolu v kvasu. U švestek mohou kvasy obsahovat i 10 % obj. alkoholu, u jablek v průměru 5 – 6 % obj. Při výrobě ovocných vín je přislažování možné, kdežto u výroby destilátů je naším zákonem přislažování zakázáno. Obsah živin potřebných pro činnost kvasinek se také dost mění. U některého ovoce proto musíme živiny přidávat. Jde hlavně o anorganické zdroje dusíku a fosforu.

### **1.2.2.3 Lihoviny vyráběné z jiných surovin**

Mezi další suroviny používané pro výrobu destilátů a lihovin obecně lze zařadit třtinovou melasu (výroba pravých rumů), kořen hořce (výroba destilátu nebo lihoviny z hořce), ovocné nebo vinné matoliny (zbytky po vylisování vína), brambory, kukuřice, obilí (po převedení škrobu na zkvasitelné cukry; výroba obilné whisky), slad (výroba sladové whisky), med (výroba medoviny s navazující destilací) aj. Vyrábíme-li lihoviny studenou cestou (macerace ovoce nebo bylin v alkoholu) nebo i extrakcí ovoce či jiných rostlinných materiálů parami ethanolu, můžeme podle druhu lihoviny použít např. pelyněk, meduňku, ibišek, šalvěj, muškát, citrony, chmel, kávu, smrkové výhonky, anýz, kmín, skořici, listy modré agáve aj.

## **1.2.3 Fermentační a produkční média**

Fermentačním či kultivačním médiem rozumíme již roztok substrátů, živin, růstových látek (vitaminy, stopové prvky aj.) ve vodě. Některá média nemusíme již doplňovat živinami, je třeba je často jen fyzikálně-chemicky upravit (filtrace, čiření, deproteinace aj.), aby při fermentaci nezpůsobovaly nežádoucí průběh. Příkladem může být syrovátka. Složení média

musí být optimalizováno na základě požadavků mikroorganismu a procesu. „Tradiční“ nebo „klasické“ technologie mají obvykle předem dané fermentační médium, jde např. o mladinu při výrobě piva, o vinný mošt, o rmut z ovoce aj. Některé další výroby zařazené do tohoto předmětu však již vyžadují složky média vybrat a optimalizovat. To se týká i surovin velmi proměnlivého složení (např. melasa). Jde o poměrně dlouhodobý proces, kdy se návrh průmyslového kultivačního média postupně upravuje podle typu mikroorganismu a daného procesu. Důležité přitom je vybilancovat obsah dusíkatých látek (močovina,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , aminokyseliny, bílkoviny) obsažených např. v kukuřičném extraktu („corn steep liquor“, CSL) nebo různých hydrolyzátech aminokyselin (soja, kasein), kvasničný extrakt, autolyzát, hydrolyzát, plasmolyzát. Dalšími komponentami jsou lipidy (např. pro syntézu lipolytických enzymů). Velký význam pro mikroorganismy a zvláště jejich růst mají různé zdroje růstových látek (hlavně vitaminů, aminokyselin). Velmi obtížné je určit požadavky mikroorganismů na anorganický podíl kultivačních médií. Sem patří jak makroelementy, tak i mikroelementy. Důležité postavení při sestavování kultivačního média mají i aditiva (prekurzory, detergenty, pevné komponenty, enzymy). Po zjištění základní představy o látkách ovlivňující proces a které by měly být obsaženy v médiu přistoupíme k optimalizaci složení média. Existuje několik metod založených na matematické teorii plánování experimentů. Pro optimalizace kultivačních médií byly rozpracovány metody podle Box-Wilsona a podle Rosenbrocka.

## 2 TEORETICKÉ ZÁKLADY KULTIVACE MIKROORGANISMŮ

### 2.1 Mikroorganismy a jejich kultivace

Potřebné základy týkající se kultivace mikroorganismů byly již obsaženy v přednáškách z bioinženýrství. Jejich praktické aplikace jsou pak předmětem přednášek v tomto předmětu.

Fermentační proces je jednou z výrobních operací tvořících fermentační výrobu. První část výroby je tvořena **přípravnými („up-stream“) operacemi**, následuje vlastní **fermentační proces** a závěr tvoří **finální, dokončovací („down-stream“) operace**. Pro růst mikroorganismů a pro tvorbu jimi vytvářených produktů je třeba zajistit **vhodné podmínky** (složení média, pH, teplota, oxidačně-redukční potenciál, určitý parciální tlak kyslíku v médiu a jiné). Mikroorganismy musí mít pro svou činnost k dispozici kromě uhlíku též zdroje dusíku, fosforu a dalších biogenních prvků, specifické růstové faktory jako jsou např. vitaminy, aminokyseliny, minerální látky apod., které si mikroorganismus nemůže sám syntetizovat. Mikroorganismy přijímají z prostředí živiny a využívají je pro svůj růst. Pro biosyntetické pochody musí mít mikroorganismy zajištěn dostatečný **přívod živin a energie**, což se zabezpečí vhodným dávkováním energetických substrátů, které jsou většinou i zdroji uhlíku pro výstavbu energeticky bohatých sloučenin a živin. Energetika a látková výměna spolu úzce souvisejí. Fermentační procesy, které jsou nedílnou a můžeme říci, že i klíčovou součástí celé výrobní technologie jsou děleny podle určitých kritérií.

Z **průmyslového hlediska** se mikrobiální procesy dělí na :

**1. Procesy, které probíhají buď v „homogenním“ nebo v heterogenním prostředí.** Ve skutečnosti však nikdy o ideální homogenní prostředí nemůže jít, protože už i přítomnost mikroorganismů to vylučuje. Kultivace vyznačující se dobrým promícháváním kapalného média jsou ve fermentační technologii nazývány **submerzní kultivace**. V průmyslu se velmi často setkáváme právě se systémy submerzními, které by se měly řešit jako systémy s neideálním mícháním. I homogenní fermentace neprobíhají obvykle jen v jedné fázi, protože plynná fáze je většinou přítomna (vzduch, oxid uhličitý, methan, někdy vodík). **Fermentace**

ve dvou- až třífázovém systému, kde převládají tuhé - větší částice je příkladem **heterogenní soustavy**, která je častá v ekologických jednotkách (komposty, biologické filtry apod.) a při aplikaci imobilizovaných biologických systémů (např. klasická ocetnice). Tento typ kultivace se může vyskytnout i jako tzv. **kultivace povrchová**, při čemž mikroorganismus může růst i na povrchu kapalného média (povrchový způsob výroby kyseliny citronové).

**2. Procesy, které buď vyžadují dodávku kyslíku (nazývají se aerobní) a nebo je dodávka kyslíku nežádoucí ( tyto procesy se nazývají anaerobní).** Ne všechny pochody jsou přísně aerobní nebo přísně anaerobní. Řada anaerobních pochodů se musí vést i s občasným mírným provětráváním. To vše je vlastně určováno mikroorganismem a jeho metabolismem. Typickým příkladem je nejznámější mikroorganismus, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, od které se odvozují kmeny pivovarských, lihovarských a vinařských kvasinek. Je známo, že tyto kvasinky provádějí lihové kvašení i při nízkém parciálním tlaku kyslíku. S kultivací těchto kvasinek za aerobních podmínek a v limitu sacharidu se setkáváme při výrobě pekařského droždí.

**3. Procesy, kde rozlišujícím znakem je morfologická charakteristika používaného mikroorganismu.** Nejde jen o záležitost mikrobiologickou a tedy i technologickou, ale morfologie mikroorganismu ovlivní celou řadu jednotkových operací založených na velikost a tvaru mikroorganismu. Velikost mikrobiálních buněk se liší podle typu mikroorganismu. Rozměr bakteriálních buněk se pohybuje kolem 1  $\mu\text{m}$ , u kvasinek může být nejdělsí rozměr kolem 20  $\mu\text{m}$ , plísně tvořící často dlouhá a rozvětvená vlákna mohou dosáhnout délky i několik milimetrů. Kultivační zařízení a i vlastní kultivace u jednobuněčných mikroorganismů se v zásadě neliší a tak bakterie a kvasinky se kultivují podobným způsobem; rozdíl bude určen pouze metabolismem a tedy druhem produktu. Vlákňité mikroorganismy (plísně a aktinomycey) se musí kultivovat dosti šetrně, aby při použití mechanického míchání nedošlo k porušení vláken a tím i ke změně metabolismu. Podstatné rozdíly ve tvaru a velikosti mikroorganismů jsou však určujícími faktory pro procesy separační.

**4. Všechny fermentační procesy lze dále členit na kontinuální a diskontinuální.** Správné použití jednoho nebo druhého způsobu může rozhodnout značně o ekonomice procesu (produktivita kontinuálních systémů bývá vyšší, naopak kontinuální procesy však vyžadují značné náklady na sterilaci zařízení a všech médií).

### **3 MIKROORGANISMY PRO TECHNOLOGICKÉ POUŽITÍ - PRODUKTY JEJICH METABOLISMU**

Kvasinky našly široké uplatnění v technologické praxi. Nejstarší jejich aplikací je lihové kvašení. To je především založeno na využití kvasinek rodu *Saccharomyces*. Kvasinky patří do skupiny *Eukaryontů*. Netvoří samostatnou taxonomickou skupinu. Při kultivaci se rozmnožují nepohlavním (vegetativním) způsobem. Tvar buněk je různý. Kulturní kvasinky pivovarské, vinařské, lihovarské a drožděnské mají tvar kulovitý až vejčitý. Velikost se pohybuje kolem 6 x 8  $\mu\text{m}$  (tj. šířka x délka) a závisí na složení média a způsobu kultivace.

Mimořádnou důležitost při alkoholickém kvašení různých sacharidických surovin má druh *Saccharomyces cerevisiae*. K němu jsou zařazovány i různé další poddruhy známé např. jako spodní pivovarské kvasinky (známé též jako *Saccharomyces carlsbergensis*, později jako *Saccharomyces uvarum*), vinné kvasinky apod. K výrobě piva se ve světě používají jak **kvasinky spodního kvašení**, tak i **kvasinky svrchního kvašení**. Kvasinky spodního kvašení se vyznačují spíš hydrofobním povrchem a jsou vynášeny při kvašení vznikajícím  $\text{CO}_2$

k hladině, kdežto kvasinky spodního kvašení mají povrch buněk spíš hydrofilního charakteru a snadno sedimentují. Další odlišností je zkvašování disacharidu melibiosy. Ta je hydrolyzována na glukosu a galaktosu a pak zkvašována jen spodními pivovarskými kvasinkami. Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, což znamená, že jejich primární činností je fermentace (kvašení), ale jsou schopny růst a využít sacharidy (případně i jiné uhlíkaté substráty) i za aerobních podmínek. Hlavním jejich metabolitem je ethanol tvořený v buňce z monosacharidů, které byly transportovány z média do buňky a následně řadou enzymových reakcí jsou přeměněny na konečný produkt ethanol a oxid uhličitý. Přitom vznikají i některé další produkty, jako je např. glycerol, acetaldehyd, diacetyl, kyselina octová aj. Kvasinky i při tomto pochodu pomalu rostou. Vzhledem k tomu, že k tvorbě ethanolu je třeba i jen slabý nárůst kvasinek, je třeba, aby kvasné médium obsahovalo určité malé množství rozpuštěného kyslíku. Stačí, když je médium provětráno na počátku kvašení. Aerobního způsobu kultivace se využívá při výrobě pekařského droždí. I zde však vzniká větší, či menší množství ethanolu, což je závislé na koncentraci kyslíku a substrátu v médiu. Rychlost štěpení sacharidu je větší při anaerobním pochodu než při aerobním. Kvasinky vykazují jen omezenou snášenlivost k ethanolu. To se projevuje tím, že se rychlost produkce ethanolu výrazně snižuje při koncentraci kolem 10 – 12 % obj. v médiu. Prodloužením doby kvašení je však možné dosáhnout koncentrací vyšších (při výrobě japonského piva *saké* lze dosáhnout koncentrací kolem 20 % obj. ethanolu). Pro metabolismus kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* jsou důležité dvě intracelulární regulace, které se nazývají podle autorů **Pasterův a Crabtree efekt**.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patří mezi nejlépe prostudované mikroorganismy (je u nich podrobně poznán i genom) a jsou využívány jako modelové mikroorganismy pro řadu výzkumných projektů.

Z dalších kvasinek jsou důležité kvasinky rodu *Candida*, u kterých převládá oxidativní metabolismus. Vyznačují se výrazně vyšší rychlostí růstu a širokým asimilačním spektrem. Tyto jejich vlastnosti se využily při výrobě mikrobiální biomasy kultivované na médiích obsahujících různé zdroje uhlíku. Jako příklad lze uvést *Candida boidinii* a *C. methanolica* (kultivace na methanolu), *Candida lipolytica* (po dlouholetém studiu zařazena do druhu *Yarrowia lipolytica*) se používala při kultivaci na n-alkanech (vyznačuje se tvorbou lipolytických enzymů), *Candida tropicalis* se vyznačuje dobrým růstem na organických kyselinách, alkoholech, alkanech, *C. ethanolica* (užití ethanolu) aj. Nejvíce používanou kandidou je však *Candida utilis*, která byla použita k výrobě biomasy ze sulfidových výluhů. Další kvasinky oxidativního typu jsou např. *Hansenula*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* aj. Je důležité si uvědomit, že tyto kvasinky doprovázejí mikrofloru ovoce a vinných hroznů a mohou značně ovlivnit charakter vzniklého kvasu.

Významnými producenty řady látek jsou plísně. Do oblasti tradičních biotechnologií spadá rod *Aspergillus*, z tohoto rodu je nejznámější druh *Aspergillus niger*, plíseň vyznačující se tvorbou řady organických kyselin (hlavně kyselina citronová a kyselina glukonová), enzymů (proteolytické, amylolytické, pektolytické enzymy, glukosaoxidasa).

Mezi další producenty, jejichž produkty budou dále popsány patří bakterie rodu *Acetobacter* využívající ethanol k produkci kyseliny octové (ocet) a bakterie rodu *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, které po působení mutagenních látek nebo při aplikaci genových manipulací produkují některé aminokyseliny.

Při fermentační výrobě citronové kyseliny se využívá plíseň *Aspergillus niger*. Tento mikroorganismus lze použít i k výrobě glukonové kyseliny, zde lze použít i bakterie *Gluconobacter oxidans*. Při výrobě mléčné kyseliny se nejvíce používají homofermentativní druhy rodu *Lactobacillus*. K výrobě jantarové kyseliny se začíná používat anaerobní bakterie

*Actinobacillus succinogenes*. K organickým kyselinám můžeme zařadit i askorbovou kyselinu, při její výrobě se může podílet postupně i několik mikroorganismů od bakterií *Acetobacter* nebo *Pseudomonas* až k bakteriím *Corynebacterium* sp. a *Erwinia herbicola*. Při mikrobiální výrobě glycerolu se vývoj přiklonil k používání aerobních osmofilních kvasinek např. *Pichia farinosa*, *Candida glycerinogenes* aj. Při biosyntéze butanolu a etanolu (ABE fermentace) se používají rody anaerobní bakterie *Clostridium*, např. *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, *C. beijerinckii* v závislosti na použitém uhlíkatém zdroji.

Zvláštní a velmi užitečnou kategorií bakterií jsou methanogenní bakterie, které využívají produkty hydrolýzy organických látek k anaerobní tvorbě bioplynu (směs převážně methanu a oxidu uhličitého). Sem patří např. *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanogenium*, *Methanobacterium*, *Zeikusella*, *Methanospirillum*.

## 4 PRŮMYSLOVÁ VÝROBA ETHANOLU. FERMENTACE

Na území dnešní České republiky vznikly první lihovary již v 16. století. Lih se vyráběl především z obilí, zejména však ze žita (odtud název "režná"). Brambory se pro výrobu začaly ve větším měřítku používat až koncem 18. století. Výroba se proto začala přesouvat z měst na venkov - k surovinovému zdroji. Byla to výroba značně primitivní, k rychlejšímu rozvoji přispělo zavádění destilačních aparátů vyhřívaných parou a zavedení paření brambor pod tlakem v pařácích. Po první světové válce se využilo i nadprodukce cukrovky, při této výrobě byl však pařákový způsob nahrazován způsobem difúzním, protože řepné výpalky se těžko prodávaly, zatímco řízky šly dobře na odbyt. Po obilí a cukrovce se objevuje melasa. Zvýšená poptávka po ethanolu jako přísady do benzínu vedla k výstavbě velkých závodů a na druhé straně však ke zvyšování cen některých zemědělských surovin a tím i potravinářských produktů z nich vyráběných. Proto se znovu výzkum vrátil k surovinám, které nejsou určeny pro výrobu potravin a krmiv, např. různé druhy slámy, odpady z dřevozpracujícího průmyslu, rychle rostoucí dřeviny aj. Tyto suroviny jsou zařazovány do skupiny surovin 2. generace

### 4.1 Suroviny a pomocné látky při výrobě lihu

Pro výrobu kvasného ethanolu přicházejí v úvahu následující sacharidy:

**Monosacharidy** - glukosa, fruktosa, manna, galaktosa ( $C_6H_{12}O_6$ )

**Disacharidy**, které kvasinky mohou z větší části převést na monosacharidy (díky působení svých vlastních enzymů):

sacharosa, maltosa, laktosa, celobiosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )

**Trisacharidy**, které mohou být působením některých enzymů kvasinek rozštěpeny na jednotlivé monosacharidy, resp. na mono- a di-sacharid. Nejběžnějším trisacharidem je rafinosa ( $C_{18}H_{32}O_{16}$ ). Ne všechny kvasinky mají enzym melibiasu a proto často zůstává melibiosa neprokvašena.

**Polysacharidy** nemohou být přímo lihovarskými kvasinkami zkvašovány, protože nemají k dispozici odpovídající enzymy štěpící tyto substráty na jednoduché, zkvasitelné cukry.



## Škrobnaté suroviny

Mezi tyto suroviny patří rostliny poskytující jak zrno, tak i hlízy. První skupina se vyznačuje nižším obsahem vody a tím i lepšími vlastnostmi pro skladování. **Brambory** jsou hlavním představitelem druhé skupiny. Z nich lze vyrobit kvalitní neutrální alkohol. Hlíza brambor obsahuje průměrně 18 % škrobu (závisí na odrůdě). Hektarový výnos brambor se pohybuje kolem 30 t, což by mohlo vést k výrobě asi 35 hl ethanolu. **Obiloviny** jsou v řadě států hlavní lihovarskou surovinou. Nejvíce se zpracovává kukuřice a žito. Pro zpracování obilí na líh je nejdůležitější obsah bezdusíkatých zkvasitelných látek, tj. škrobu. Se stoupající hektolitrovou hmotností a absolutní hmotností 1000 zrn se zvyšuje zpravidla i obsah škrobu a tím i alkoholové výtěžky. V Polsku, Rusku a i v jiných státech převažuje jako škrobnatá surovina **žito**. Zápary jsou však oproti pšenici viskóznější. Je to způsobeno vyšším obsahem pentosanů (kolem 10%). Pro rozšíření surovinové základny v naší republice se jeví nejlépe **pšenice** (technické odrůdy -Trane, Astella, Rexia), která obsahuje v závislosti na kultivačních podmínkách kolem 65 - 71 % škrobu, 14 % bílkovin, 1,8 % tuku, 68 % extraktivních bezdusíkatých látek. **Ječmen** se rovněž někdy používá k výrobě lihu. Při jeho zpracování však v zápaře obsažené pluchy způsobují tvorbu silných dek na povrchu kvasu. V posledních letech se s úspěchem vyzkoušel a dále používá kříženec žita a pšenice - **tritikale**. Jeho odrůdy jsou snadněji zpracovatelné lihovarským způsobem a dávají dobré výtěžky lihu.

## Suroviny obsahující inulin

Inulin je polysacharid obsahující fruktosu. Tato látka se vyskytuje v **topinamburech** a v **čekance**. Hlízy topinamburů obsahují v průměru kolem 16 % inulinu, dále pak menší množství D-fruktosy a levulinu. Hektarový výnos hlíz může dosáhnout až 30 t. Štěpení inulinu je snazší než štěpení škrobu. Enzym inulinasa je obsaženo v hlízách a její aktivita se postupně zvyšuje, v jarním období dosahuje maxima.

## Suroviny obsahující sacharosu

Nejdůležitější surovinou obsahující sacharosu je **melasa**. **Cukrovka** nebyla dlouho pro výrobu u nás využívána. S rozvojem výroby palivového etanolu se dnes u nás největší množství bioethanolu právě vyrábí z lehké šťávy a některých sirobů. Průměrný obsah cukru v cukrovce je kolem 16 %, hektarové výnosy jsou průměrně 47 tun, to znamená že produkce lihu z 1 ha by mohla být až 47 hl, což je z hlediska celkové produktivity vysoký údaj, porovnáme-li hodnoty s ostatními surovinami. Nevýhodou jsou vyšší náklady na agrotechniku.

**Melasa** je hustá sirupovitá tekutina, která vzniká jako odpad cukrovarnického průmyslu po vykrystalování hlavního podílu cukru. V naší republice se setkáme prakticky pouze s melasou řepnou. S omezením výroby cukru u nás pokleslo i množství produkované melasy. Mnohé státy využívají k výrobě lihu třtinovou melasu. Surovárenská melasa (produkt po první krystalizaci cukru) je bohatší na živiny (růstové látky) než melasa rafinérská a proto se přednostně využívá při výrobě pekařského droždí. Pro lihovarskou výrobu je rafinérská melasa stejně vhodná jako melasa surovárenská. Vliv růstových látek na kvašení se projeví hlavně při kontinuálních fermentačních postupech.

*Chemické složení melasy.* **Vody** v melase bývá 18 - 22 %. Cukrů bývá v melase zhruba 50 %. **Necukerných látek** je v melase kolem 30 %. Jsou tvořeny jednak organickými látkami (20 %), jednak látkami anorganické povahy (do 10 %). Organické látky jsou zastoupeny v první řadě **bezdusíkatými sloučeninami**, které lze rozdělit na **organické kyseliny a jejich soli, slizovité látky, bezdusíkatá barviva** a některé další látky (např. aromatické látky). Celkový obsah dusíku je v řepné melase 1 - 1,6 % a z toho kvasinky využívají zhruba jen asi polovinu. Nejdůležitější dusíkaté látky v melase jsou aminokyseliny.

100 kg sacharosy má teoreticky poskytnout 67,77 l ethanolu, ale v praxi se dosahuje nižších výsledků. U řepné melasy s 50 % cukru lze ze 100 kg dosáhnout až 32 l ethanolu. Většinou se však výtěžnosti pohybují mezi 30 a 31 litry.

**Surový cukr** lze též dobře zpracovávat na líc.

### **Ovoce jako surovina pro výrobu lihu**

Jako lihovarská surovina přichází ovoce v úvahu jen ve výjimečných případech. Pro výrobu surového ovocného lihu přicházejí v úvahu většinou jen havarované plody (jablka a hrušky), nebo ojediněle některé tropické, většinou vysušené plody (datle). V některých státech se vyrábí ethanol z vína a to i pro technické účely.

### **Lignocelulosové materiály – surovina 2. generace**

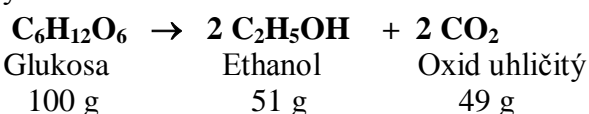
Lignocelulosové materiály zahrnují celou škálu nejen přírodních, ale i odpadních materiálů. Společné mají tu vlastnost, že jsou rostlinného původu, i když mohou obsahovat i nepřírodní složky, které se tam dostaly chemickým zpracováním těchto materiálů. Hlavními komponentami lignocelulosity jsou: **celulosa, hemicelulosa a lignin**. Struktura hemicelulosity je poměrně složitá a určuje velkou odolnost vůči působení vnějších podmínek. Proces její destrukce v přírodě pokračuje velmi pomalu. K tomu, aby tyto materiály mohly být průmyslově použity pro biotechnologické procesy, je třeba uvolnit jednotlivé složky. Ligninová složka lignocelulosové biomasy je patrně největší mírou zodpovědná za odolnost celulosity vůči hydrolyze. Lignin je makromolekula fenolické povahy a vzniká dehydratací tří monomerních fenolových alkoholů, *trans*-p-kumaryl alkoholu, *trans*-koniferyl alkoholu a *trans*-sinapyl alkoholu. Jeho relativní zastoupení v materiálu se liší podle zdroje. Ligninová hmota tvoří ochrannou schránku obalující celulosové mikrofibry. Tato obálka však není jediným důvodem, proč je celulosa tak obtížně hydrolyzovatelná. Značný vliv na efektivitu hydrolyzy má rovněž konformace nativní celulosity. Velké množství odpadní lignocelulosity je produkováno při zpracování dřeva, zemědělských plodin, papírenského průmyslu a dalších odvětví. Využití lignocelulosoých materiálů bez předchozí předúpravy není efektivní. V dnešní době se neřeší totální hydrolyza tohoto materiálu nýbrž jen frakcionace materiálu za mírných podmínek. Pozornost je soustředěna jednak na hemicelulosový podíl (kde převažují jednoduché cukry a rozpustná frakce ligninu) a na pevnou frakci, kde převažuje celulosa. Celulosa je pak většinou hydrolyzována pomocí celulolytických enzymů. Předúprava LCM může být prováděna následujícími metodami, resp. jejich kombinacemi např.:

- a) Ve vodní páře pod tlakem, popř. s přidávkem některých látek impregnujících materiál (SO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, zředěné anorganické kyseliny). Po tlakové fázi se materiál rychle expanduje a dochází k narušení vazeb a tím zlepšení vlastností k dalšímu zpracování.
- b) Řízená hydrotermolýza (působení vody za vyšší teplota a tlaku)
- c) Chemické metody:
  - Extrakce pomocí rozpouštědel,
  - Alkalická předúprava,
  - Kyselá předúprava
- d) Biologické metody (enzymy, mikroorganismy) – většinou se používají po fyzikálně-chemických předpravách.

## **4.2 Alkoholové kvašení (fermentace)**

Průběh kvašení byl znám již i pradávným národům naší planety. O přeměnách, ke kterým dochází v průběhu kvašení, o jeho příčinách a původu neexistovaly až do 19. století jasné představy. Před zhruba 130 lety byl objeven původ kvašení a tím i jeho nositelé - kvasinky.

**Lihové kvašení** je proces, který probíhá převážně bez přístupu vzduchu (anaerobně), i když nejde v případě kvasinek o striktně anaerobní podmínky. Mírné provzdušnění kvasného média, hlavně na začátku fermentace, je příznivé pro potřebný nárůst buněk a jejich aktivitu. Kvasinky jsou stále nejpoužívanějšími producenty ethanolu. Nejlepší kmeny se dnes dostávají na trh jako čisté kvasinkové kultury. Pro účely výroby lihu se výhradně používají kvasinky s vysokou schopností tvorby ethanolu (vysoká rychlost tvorby a vysoká tolerance k ethanolu, nízká produkce vedlejších metabolitů). V poslední době se testují i některé bakterie k produkci ethanolu. Za zmínku stojí dobré výsledky některých termofilních klostridií a hlavně bakterie *Zymomonas mobilis*. Pro hodnocení kvasných produktů je důležité vždy zjistit konečný výtěžek produktu a jeho výtěžnost (obvykle se udává v litrech ethanolu na 100 kg C-zdroje nebo suroviny), toto číslo se pak porovná s teoreticky možným výtěžkem. Zde se vychází z rovnice lihového kvašení:



Obecně lze říci, že činnost kvasinek ustává při koncentraci ethanolu mezi 14 až 15 % obj.; se speciálními rasami kvasinek lze dosáhnout i koncentrace 18 - 20 % obj. Nad koncentrací ethanolu 10 - 11 % obj. dochází však k silné inhibici a tím i ke značnému zpomalování rychlosti lihového kvašení. Proto se při výrobě ethanolu vede proces jen k této hranici. Je to zvláště důležité při recirkulaci kvasinek, protože vyšší obsah alkoholu značně zhoršuje jejich fyziologický stav a tím se snižuje i aktivita jejich enzymů. Doba fermentace je závislá na mnoha faktorech. Především ji ovlivní samy kvasinky, tj. jejich množství a aktivita, dále složení media (obsah cukru, aktivátorů a inhibitorů kvašení), pH, teplota a koncentrace rozpuštěného kyslíku v mediu. K dosažení 10 - 11 % obj. je třeba při teplotě 30 °C, pH 4 - 6 24 - 36 hodin. Rychlost kvašení (produktivita) se dá zvýšit velmi podstatně koncentrací buněk, což se prakticky využívá při recirkulaci buněk.

#### 4.2.1 Produkty fermentace

- Ethanol
- Glycerol
- Oxid uhličitý
- Acetaldehyd (přirozený produkt kvašení; jeho obsah se zvyšuje při špatném kvašení. Bod varu acetaldehydu leží kolem 20 °C a proto při destilaci přechází do úkapu)
- Přiboudlina (vyšší alkoholy o bodu varu mezi 80 až 160 °C, které jsou proto při vhodném oddestilování dokapu snadno oddělitelné. Přiboudlina vzniká převážně enzymovými pochody z aminokyselin přítomných v zápaře)
- Methanol (vzniká hydrolyzou estericky vázaného methanolu v pektinu. Proto surový líh z některých surovin (hlavně z ovoce) obsahuje větší množství methanolu. Destilací za normálního tlaku není možné jej uspokojivě oddělit a proto jej nacházíme v úkapu, ve střední frakci a v dokapu)
- Vonné a aromatické látky (Tyto složky jsou důležité při výrobě destilátů)

#### 4.2.2 Faktory ovlivňující kvašení

Mezi hlavní faktory ovlivňující kvašení patří **teplota** (27 – 32 °C), **hodnota pH** (4 - 6), **obsah růstových látek**, **koncentrace rozpuštěného kyslíku**, **koncentrace a aktivita kvasinek**, **přítomnost kontaminace aj.**

#### 4.3 Lihovarská technologie

Lihovarská technologie se liší v mnoha směrech podle používané suroviny (rozdílná její úprava), zda je proces vsádkový, kontinuální s recyklem buněk či bez recyklu, zda se odděluje část ethanolu apod.

##### 4.3.1 Výroba ethanolu ze škrobnatých surovin

U nás se škrobnaté suroviny k výrobě lihu používaly dříve výhradně v malých zemědělských lihovarech. V současné době však byly postaveny dva velké závody na výrobu bioethanolu (palivového ethanolu) na zpracování obilí a kukuřice. Denní kapacita těchto lihovarů je kolem 200 m<sup>3</sup> ethanolu. Došlo proto i ke změně v technologii a ve strojním vybavení závodů. Tabulka 1 ukazuje hektarové výnosy plodin a výtěžnost lihu z 1 ha. Uváděné údaje jsou již staršího data, novější údaje jsou uvedeny v závorce.

*Tabulka 1 Hektarové výnosy plodin a výtěžnost ethanolu z 1 ha zemědělské půdy*

Plodina	Výnos [ t / (ha . rok ) ]	Spotřeba biomasy na 10 hl ethanolu (t)	Výtěžnost ethanolu [ hl / (ha . rok ) ]

Cukrová třtina	80	15,1	53
Maniok	20	5,3	38
Sladké brambory	27	5,5	50
Brambory	25,4 (40)	8,7 (8)	36,2 (40)
Cukrová řepa	47,7 (60)	10,2 (9)	47 (60) (nové hybridy)
Kukuřice	4,5 (7)	2,5 (2)	23 (26)
Pšenice	6 (8-10)	2,7 (2,1 - 1,85 )	22 (38 - 54)

Zpracování škrobnatých surovin doznalo ve světě značných změn v technologii. Ty se týkají zejména snížení energetických nákladů na výrobu a to hlavně s ohledem na využití vysoko aktivních enzymových preparátů. Přitom je důležitá i otázka mechanického rozmělnění suroviny a zpřístupnění zrn škrobu působení enzymů. Paření pod tlakem se značně omezuje a využívá se termostabilních ztekucujících  $\alpha$ -amylas. Enzymové preparáty obsahují i další hydrolytické enzymy, které výtěžnost sacharidů zvyšují. Některé technologie preferují využití recirkulace kvasinek a proto je nutné připravit záparu bez suspendovaných částic. Znamená to buď využít jen endospermové části zrna ( upravené mletí zrna) nebo po působení enzymů oddělit pevný podíl a dále pak pracovat s kapalným podílem. Při tomto způsobu bude nižší výtěžnost lihu, protože část škrobu mizí s pevným podílem. Tento materiál lze použít pro přípravu krmiv. Jiné technologie předepisují oddělení pevného podílu po zkvašení a následnou destilaci kapalného podílu. Pevný podíl se použije k přípravě krmiv a kapalný podíl po destilaci (výpalky) je využit k přípravě nové zápary. Recirkulace kapalného podílu je zvláště důležitá u větších lihovarů, protože zde je nutno výpalky expedovat v zahuštěné, nebo ještě lépe v suché formě.

#### 4.3.1. 1 Příprava zápar

Při přípravě zápar ze škrobnatých surovin rozlišujeme dva způsoby: a) tlakový (pařákový) způsob a b) beztlakový způsob. V posledních letech se však druhý způsob používá častěji. Tuto změnu umožnila výroba termostabilních  $\alpha$ -amylas bakteriálního původu. Tento enzym je krátkodobě aktivní i při teplotách nad 100 °C (v praxi se používají teploty kolem 90 °C), což je výhodné, protože může působit i během zmazovatění škrobu. Odolnost vůči teplotě se zvýší ionty vápníku ( u nové generace enzymů i to však již není nutné). Optimální pH pro působení při uvedené teplotě je 6,5 až 7.

##### A. Tlakový způsob

Při tomto způsobu se zpracovávají celá zrna nebo hlízy. Proces uvolnění a zmazovatění škrobu vyžaduje teploty nad 100 °C. Toho se dosáhne působením vodní páry o vyšším tlaku. Nejpoužívanějším pařákem u nás je Henzeův pařák. Velkou výhodou paření je, že se zápara současně vysteriluje. Náklady na paření jsou však vyšší než při beztlakovém způsobu. Paření má tři fáze: *propařování, paření pod tlakem a vyhánění díla.*

##### B. Beztlakový způsob

Při beztlakovém způsobu musí být obilí namleté na částice odpovídající velikosti. Mletí může být realizováno za sucha (šrotovníky) nebo za mokra (např. dispergátory nebo kladívkové mlýny). Co se týče velikosti částic zrna jsou zkušenosti z lihovarů různé, ale většinou se odborníci shodují v tom, že velikost částic by neměla být menší než 0,4 mm a větší než 1,6

mm. Po této části předpravy suroviny se přistoupí k použití enzymů. Jejich hlavním cílem je postupně převést škrob uložený ve škrobových zrnech až na zkvasitelný sacharid, převážně glukosu. Přitom nejde o jeden enzym, ale o komplex tzv. amylolytických enzymů. Z nich jsou důležité  $\alpha$ -,  $\beta$ - amylasy a amyloglukosidasy. Kromě těchto enzymů lze použít i další hydrolytické enzymy jako např. hemicelulasy (např. xylanasy,  $\beta$ -glukanasy), proteasy a celulasy. Jejich působením lze zvýšit výtěžnost lihu a současně i snížit viskozitu média (především jsou v tomto směru důležité hemicelulasy a celulasy). Technické enzymy většinou obsahují i tyto enzymové aktivity. Lihovarské enzymy jsou vyráběny v kapalné fázi a jejich dávkování je snadné. Je třeba však dodržovat pokyny výrobce. *Rozluštění a zcukření suroviny se zkouší přidávkem jodu a mikroskopicky.*

#### 4.3.1. 2 Příprava zákvasu

Účelem přípravy zákvasu je připravit nebo přizpůsobit potřebné množství kvasinek pro vlastní kvasný proces. Zákvasem se rozumí alikvotní část (6 - 8 %) sladké zápary, která obsahuje zkvasitelné cukry, živiny a kvasinky. Pro přípravu zákvasu bychom měli použít surovinu, která obsahuje dostatek živin pro kvasinky. Nejlépe se osvědčují kvasinky adaptované na škrobnaté zápary získané z čistých lihovarských kultur. Je možné též použít pekařské droždí, které lze před použitím preparovat v kyselé lázni. V některých zemích se používají i sušené aktivní lihovarské kvasinky. Množství lisovaného pekařského droždí se pohybuje kolem 0,3 - 0,5 kg na 1 hl zákvasu. Zákvas běžně kvasí asi 24 hodin, vhodnější kritérium pro ukončení kvašení je prokvas kolem 1/3 původní sacharizace.

#### 4.3.1. 3 Průběh kvašení a práce v kvasírně

Působením enzymů vzniklé zkvasitelné sacharidy jsou kvasinkami zkvašovány na ethanol a oxid uhličitý. Přitom dochází i k mírnému nárůstu kvasinek a k tvorbě vedlejších produktů. Doba kvašení bude záviset jak na množství a aktivitě kvasinek a enzymů a velmi podstatně na teplotě. Obvykle kvašení trvá 48 až 72 hodin.

V malých lihovarech se obvykle pracuje **periodickým - vsádkovým způsobem**. Pro tento způsob je typické fázování procesu na stadium rozkvašování, hlavního kvašení a dokvašení.

Kvašení probíhá v kvasných kádích, které jsou obvykle uzavřené a dosahují objemu od 15 do několika set m<sup>3</sup>. Koncentrace ethanolu v prokvašených obilných záparách se běžně pohybuje kolem 7 - 8 % obj.

Většina lihovarů vyrábějících ethanol ze škrobnatých surovin využívají periodický způsob kvašení. Periodické způsoby se vyznačují tím, že probíhají v jedné nádobě po celou dobu fermentace. Lze to realizovat jako *systém vsádkový*, bez přítoku média, nebo jako *přítokový*. Další možností je aplikovat semikontinuální a kontinuální způsoby kvašení. Tyto způsoby se zavedly především u kvašení melasových zápar. Charakteristické pro ně je, že zápara se přivádí téměř neustále a stejně tak se i odvádí. V zápare se však musí udržovat potřebná koncentrace kvasinek, protože při jejím snižování by docházelo ke zhoršení kvasného procesu. Protože je však růstová rychlost kvasinek nízká aplikuje se kvašení ne v jednom, ale ve více reaktorech, kterými kvasící zápara protéká.

### 4.3. 2 Výroba lihu ze surovin obsahujících sacharosu

#### 4.3.2. 1 Cukrovka

Cukrovku i polocukrovku lze zpracovat v lihovaru buď difúzním nebo pařákovým způsobem. První způsob je energeticky výhodnější a kromě toho pracujeme bez pevné fáze. Řízky lze dále využít jako sorbentu pro výpalky. Vzhledem k tomu, že obsah sacharosy v cukrovce je kolem 17 % hm. nemůžeme ani pouhým jejím zpracováním bez přidavku vody získat víc než

8,5 % hm. ethanolu. Surová šťáva obsahuje kolem 13 % hm. sacharosy a proto pro zpracování bude důležité výchozí cukerné šťávy ještě zahustit.

#### 4.3.2. 2 Výroba lihu z řepné melasy

Z hlediska zpracování je melasa jednodušší surovinou než obilí. Její předností je jednoduchá úprava (ředění vodou), nízká viskozita roztoku a fakt, že obsahuje přímo zkvasitelný cukr (sacharosu). Možnost recyklace kvasinek zkrátí fermentaci na 8 – 24 h při stejné výsledné koncentraci ethanolu (10 – 12 % obj.). Produktivita kontinuálních systémů se značně zvýšila (doba zdržení v reaktorech dosáhla hodnot až 14 - 16 hodin). V období těsně před 2.světovou válkou a v průběhu války se objevil v několika státech současně způsob, který využívá recirkulace kvasinek. Tento způsob se dříve nazýval **způsob se vratnou separací kvasnic**. Myšlenka využití již jednou vzniklých kvasinek byla skutečně pro další rozvoj lihovarského průmyslu převratná. Předpokládá však už určitou technickou úroveň separace buněk (centrifugy nebo speciální filtry). Při denní produkci ethanolu 100 m<sup>3</sup> se musí zpracovat kolem 1000 m<sup>3</sup> zápar (přibližně 600 t melasy). Melasa se skladuje v melasnicích. Pro zpracování je lepší melasa uleželá několik měsíců než melasa čerstvá. Melasa se zde ředí na koncentraci kolem 60 °Bg, aby ji bylo možno dobře čerpat a rozvádět po lihovaru. Při zředování se současně provádí i úprava pH přidávkem kyseliny sírové. Pro kontinuální proces se musí zředěná melasa sterilovat. Obvykle se pro kvašení připravují dva typy zápar: slabší pro zahájení fermentace (např. 10 - 20 °Bg) a silnější pro doplňování kádí během kvašení (30 - 40 °Bg). Optimální rozmezí pro okyselování zápar leží mezi pH 4,5 - 5,0. V rozmezí pH mezi 3,8 - 4,2 lze v krajním případě, při silnější kontaminaci bakteriemi udržet kvašení bez problémů. Rychlost procesu se však zřetelně sníží. Pro výpočet živin (především fosforu) je třeba provést bilanci složek. V případě řepné melasy není třeba dusíkaté živiny přidávat. Fosfor je však naopak v nedostatku a je nutno jej do média přidat.

Velké lihovary většinou vycházejí z vlastní kultury kvasinek, kterou si postupně napropagují v laboratoři a potom v provozní propagační stanici. U závodů, které používají recirkulaci kvasinek se kvasinky propagují jen občas (většinou jednou v lihovarské kampani). V případě kontinuálního kvašení lze provádět i kontinuální propagaci zákvasu nebo provádět kontinuální vracení kvasinek po jejich separaci (mikrofiltrace, odstředování).

#### ***Způsoby kvašení a jeho průběh***

V patentové literatuře existuje velké množství různých způsobů kvašení. Zde si uvedeme jen zásady těch hlavních. Fermentory nejsou konstrukčně nijak složité. Obvykle nejsou opatřeny vzdušením. Dnes se používají již jen fermentory uzavřené z nerezavějící oceli. **Klasický vsádkový (“batch”) proces** je velmi jednoduchý, ale dosahuje jen nízkou produktivitu a delší dobu kvašení. Charakteristické je, že probíhá při stejném objemu zápar od začátku do konce.

##### ***a) Přítokované způsoby***

Tímto způsobem se vyrábí v celosvětovém měřítku ještě nejvíc alkoholu. Limitujícím faktorem je výsledná koncentrace ethanolu, která se pohybuje od 10 do 12 % obj. Při dobrém vedení procesu může být produktivita systému kolem 5 kg ethanolu/m<sup>3</sup>.h. Vsádkový proces bez přítoků má ještě nižší produktivitu. Jedna šarže trvá 17 - 18 hodin. Tento způsob se snadno převede na semikontinuální. Kvašení se začíná s poměrně vysokou koncentrací buněk (kolem 30 · 10<sup>6</sup> buněk v 1 ml) na melasovém mediu o koncentraci sušiny 35 - 38 °Bg. Další přítoky se realizují tak, aby zdánlivá koncentrace zápar nebyla vyšší než 12 - 13 °Bg. Čím větší bude koncentrace kvasinek, tím kratší bude doba fermentace.

##### ***b) Způsob s recyklací kvasinek (s vratnou separací buněk)***

Tento způsob patří mezi nejrozšířenější v melasovém lihovarství. Byl prakticky ve stejné době v několika zemích. U nás je znám pod jménem **Melle - Boinot**. Princip spočívá v tom, že kvasnice oddělené z prokvašené zápary se přenesou do nové zápary a tím se ušetří cukr potřebný k syntéze biomasy. Protože se může pracovat od začátku s vyšší koncentrací buněk, zrychlí se celkově kvašení. Zápara se odstřeďuje na konci fermentace, ne však celý objem, nýbrž jen část obsahující lepší kvasinky. Svrchní a spodní část zápary se neodstřeďuje a vede se na destilaci. Neseparuje se 5 - 10 % obsahu kádě. Kvasničné mléko se okyseluje sírovou kyselinou na pH od 2 do 4, to závisí na stupni kontaminace kvasničného mléka. Účinek preparační lázně se řídí dobou praní a hodnotou pH. Kromě dekontaminačního účinku se projeví u kvasinek i celkově čistící a aktivační účinek. K promíchávání kvasničného mléka se používá kvasný oxid uhličitý. Po skončení preparace se přidá k suspensi kvasinek tolik melasového roztoku, aby jeho koncentrace byla 12 - 14 <sup>0</sup>Bg. Vlastní proces fermentace je veden přítokově. V poslední době se místo odstředivek začínají užívat mikrofiltrační jednotky (obvykle jde o tubulární keramické systémy), které zadržují buňky a tak jejich koncentrace prudce vzrůstá. Produktivita se výrazně zvyšuje. Kromě toho se značně sníží nebezpečí kontaminace, protože jde vlastně o uzavřenou smyčku.

### **c) Kontinuální způsoby kvašení**

Hlavní charakteristikou kontinuálních způsobů je nepřetržitý přítok a odtok média z fermentoru. Existuje mnoho variant uspořádání a také i konstrukce nádob. Nejstarší jsou systémy o jedné a více nádobách (kaskáda reaktorů), kde kapalina proudí z jedné nádoby do druhé bez jakékoliv zpětné cirkulace kvasinek. Rychlost průtoku je u těchto jednoduchých systémů dána rychlostí růstu buněk (překročením této hodnoty by docházelo k vyplavování buněk z reaktoru). Ta je však v anaerobním prostředí malá a proto i průtok nemůže být velký. Aby se však mohla rychlost zvýšit, byly postupně připojovány další stupně. Kaskáda 10 i více reaktorů nebyla výjimkou. Společnou nevýhodou všech kontinuálních postupů je velké riziko kontaminace. Nové technologie dnes kontinuální způsoby preferují. Vzhledem k revizi názorů o roli kyslíku v lihovém kvašení je celkem výhodné první reaktor opatřit vzdušněním. Tím se kontinuálně propaguje biomasa s dobrými vlastnostmi. Byly konstruovány a prověřeny i věžové kontinuální fermentory, ve kterých přítok média byl umístěn na spodní části kolony. Dobře se osvědčily systémy pracující s recyklací buněk, protože se tak zvýší koncentrace buněk a tím i produktivita procesu. Provozně účinné jsou i systémy dvoustupňové, kde je první stupeň provětráván (dochází k většímu růstu buněk). Ten pak funguje jako propagační stupeň kontinuálně pracující.

### **4.3.2.3 Nové způsoby kvašení melasových zápar**

S perspektivou rozvoje lihovarského průmyslu se v posledních deseti až patnácti letech objevilo mnoho nových technologických variant, které využívají nových technik. Velké lihovary jsou řízeny počítači a vyznačují se jen velmi malým počtem pracovníků. Z inovačních trendů je možno uvést:

- a) Využívá se recyklace výpalků, kterými se ředí melasa. Snižuje se tak spotřeba vody a současně se zvyšuje koncentrace sušiny výpalků.
- b) Využívá se odpadního tepla především u destilace a odparek.
- c) Jsou zaváděny flokulující kvasinky nebo kvasinky imobilizované na levných nosičích, aby nedocházelo při kontinuálních procesech k jejich vyplavování.
- d) Je snaha zvýšit toleranci kvasinek k ethanolu, aby se koncentrace ethanolu ve zralé zápaře mohla zvýšit
- e) Využívá se vysoké koncentrace buněk v reaktorech (mikrofiltrační moduly)



f) Řeší se možnosti odseparovat ethanol z média (pervaporace, reaktory pracující ve vakuu, pertrakce aj.), aby se snížil jeho inhibiční účinek a zvýšila se rychlost kvašení.

### 4.3.3 Ztráty v kvasné části lihovaru

Ztrátám lze zabránit dodržováním předepsaných postupů a důslednou kontrolou všech operací (GMP). Značné ztráty vznikají nadměrným nárůstem biomasy, tvorbou vedlejších produktů kvašení (glycerol, octová kyselina), silným rozvojem kontaminujících mikroorganismů, ztrátou ethanolu v kvasném plynu, špatným skladováním melasy (nevyužité zbytky melasy v melasnicích) aj. Při zpracování obilí přichází navíc vliv škůdců, ztráty prodáváním v silech, špatným zcukřením apod.

### 4.3.4 Využití oxidu uhličitého

Oxid uhličitý, který vzniká ve velkém množství při fermentaci lze použít k několika účelům, např. k míchání zápar, k přípravě uhličitánů, nebo k přípravě zkapalněného, popř. pevného oxidu uhličitého. K míchání se využije tam, kde by míchání vzduchem vadilo. Oxid uhličitý musí být zbaven části zápar, ethanolu a následně se komprimuje ve třístupňovém systému.

## 5 PRŮMYSLOVÁ VÝROBA ETHANOLU. II. IZOLACE ETHANOLU ZE ZÁPAR A DALŠÍ JEHO ÚPRAVY. BIOETHANOL

Destilace je jediná separační metoda, která se používá v průmyslovém měřítku k oddělení ethanolu ze zápar a dále pak i jeho čištění. Ethanol je kapalina, která tvoří s vodou azeotropickou směs s bodem varu nižším než obě čisté látky. Při destilaci až do koncentrace 95,5 % hm. ethanolu za atmosférického tlaku obsahují páry víc těkavější složky (ethanol). Při složení azeotropické směsi ( b.v. 78,15 °C) je složení par a kapaliny stejné a takovou směs nelze rozdělit destilací za normálního tlaku. Toto je problém, který se musí řešit při odvodňování lihu.

### 5.1 Destilační přístroje

Ke zkoncentrování ethanolu (rektifikaci) se ponejvíce používá **opakovaná rovnovážná destilace (destilace kontinuální)**, v pálenicích pak jde o **nerovnovážnou (periodickou) destilaci**. Při prvním způsobu se v první koloně oddělí ethanol od prokvašené zápary a přitom dochází k jeho zkoncentrování (surový líh), vedlejším produktem jsou výpalky. **Záparová kolona** je mohutnější než ostatní kolony. Bývá jedno- nebo dvoukolonová. Ve dvoukolonovém systému dochází již částečně k rafinaci lihu. Ke zkoncentrování a i částečné purifikaci dochází při průchodu jednotlivými patry (dny). Tam dochází ke styku par s kapalinou jdoucí opačným směrem. **Patra** mají různou konstrukci, většinou jsou kloboučková, síťová, ventilová nebo i náplňová. Pro chod kolony je důležitý tlak v koloně a správná funkce **deflegmátoru, kondenzátoru a chladiče**. V deflegmátoru dochází k frakční kondenzaci parní směsi. Ochlazením par zkapalní nejdříve složka méně těkavá (vodní pára) a tím se koncentruje lihový podíl v parách. **Zpětný tok** je tvořen zkondenzovanými parami a obsahuje víc výše vroucí kapaliny. Deflegmátor u záparové kolony zastává funkci předehříváče zápary. Ohřev záparové kolony může být přímý nebo nepřímý. Při přímém ohřevu však dochází ke zředování výpalků. Kolony jsou opatřeny epruvetami (měřidly průtoku), regulátory přítoku vody a páry aj. Ve výpalcích se nesmí objevit větší množství alkoholu (max. 0,015 % obj.).

**Surový líh** přicházející ze záparové kolony se před rafinací naředuje vodou na koncentraci kolem 40 % obj., aby se zvýšila účinnost dělení do frakcí: **úkap, jádro a dokap**. Rafinace probíhá dohromady s rektifikací. Pro správnou funkci rektifikační kolony má význam

správné nastavení koeficientu zpětného toku. Velké závody mají rafinační systémy, které vycházejí přímo ze zápary.

**Vedlejšími výrobky při rafinaci lihu** jsou úkap, dokap a přiboudlina. Úkap s dokapem se při rafinaci jímají společně. Lze z nich novou rafinací získat další podíl rafinovaného lihu. Jinak se používají jako technický, již denaturovaný líh. Přiboudlina se pere a po oddělení v dekantéru se horní část odebírá do skladiště přiboudliny a spodní se vrací do destilace. Přiboudlina obsahuje nejvíce tzv. opticky aktivní pentanol.

## 5.2 Lihovarské výpalky a jejich zpracování

Výpalky (destilační zbytek po oddestilování ethanolu ze zápary) patří k jedněm z nejvýznamnějších odpadů lihovarského průmyslu a to nejen kvůli jejich množství, ale i dost vysokému obsahu organických a anorganických látek. Výpalky se liší podle druhu surovin, ze kterých byl alkohol vyroben. **Výpalky ze škrobnatých surovin** se využívají pro přípravu krmných směsí či pelet. Je třeba je však zahustit a sušit. Kvasinky, které zůstaly ve výpalkách nám zvyšují obsah bílkovin a zlepšují tak aminokyselinové složení. Obsah sušiny není velký (kolem 6 - 8 %). **Melasové výpalky** mají jiné složení než výpalky obilné. Obsah solí je značně vyšší a nehodí se proto k přímému zkrmování. Po odstranění solí, hlavně draselných by bylo možné je jako krmivo použít. Řídké výpalky mají 7,5 - 11,6 % sušiny. Dříve se využívaly na výrobu potaše, případně kyanidů. Dnes se u nás používají po zahuštění jako kapalné draselné nebo po úpravě jako N-P-K hnojivo. Lze je velmi dobře přidávat do methanizačních komor, kde zvyšují obsah methanu. V řídkém stavu je nelze dlouho skladovat a musí se zahušťovat na 30 - 40 % sušiny.

## 5.3 Odvodňování lihu

Destilací směsi ethanol-voda za normálního tlaku se dostaneme maximálně na koncentraci ethanolu 95,5 % hm., což představuje složení v tzv. **azeotropickém bodu** (b.v. 78,15 °C). Pro některé účely (v chemickém, petrochemickém průmyslu) je třeba získat alkohol bezvodý. Ten bude zvláště nutný pro přípravu aditiva ETBE do benzinů nebo pro přímé míchání ethanolu s benzinem. Způsobů výroby je mnoho a jejich výběr závisí na množství a jakosti vyráběného lihu.

### Metody odvodňování alkoholu:

- I. Odvodňování tuhými látkami
- II. Odvodňování pomocí kapalin
- III. Odvodňování destilací
- IV. Odvodňování molekulárními sítí
- V. Využití membránových procesů při odvodňování alkoholu.

### 5.3.1 Odvodňování tuhými látkami

Metoda patří mezi nejstarší odvodňovací metody. Hodí se jen pro výrobu menšího množství. Používá se např. páleného vápna, chloridu vápenatého, sádry, octanu sodno-draselného a jiných látek, které na sebe váží vodu.

### 5.3.2 Odvodňování pomocí kapalin

Sem patří několik různých metod. Předně se jedná o **metody s přidáním další složky** (nazývané též **azeotropická destilace**). Principem metody je vytvoření ternární směsi voda - ethanol - třetí složka, která destiluje při teplotě nižší než je bod varu ethanolu. Veškerá voda se váže do ternáru. Ethanol zůstane na dně kolony. Příkladem je klasický způsob s benzenem,

trichlorethylenem, cyklohexanem. Obsah vody v bezvodém alkoholu je jen několik desetin %. Další metodou s přidáním třetí složky je **extraktivní destilace**. Existuje několik hygroskopických kapalin (váží vodu), jako je např. glycerol a ethylenglykol, které po přidání do destilační kolony naváží vodu a alkohol destiluje při svém bodu varu (78,3 °C). Po oddestilování ethanolu se zvýší teplota a destiluje voda a zbude glycerol. Do této skupiny metod můžeme zařadit i **extrakci organickými rozpouštědly**. Za zmínky stojí uvést použití benzínu při výrobě bioethanolu. Benzinem se vyextrahuje část alkoholu bez vody a tato fáze se použije přímo jako palivo. Benzin s vodou jde pak do kolony, kde se oddělí benzin.

### **5.3.3 Odvodňování destilací**

Sníží-li se tlak v koloně na 9,3 kPa dochází k posunu ve složení azeotropické směsi až na skoro 100 % ethanolu. Ekonomicky však tento způsob není příliš výhodný. Čím nižší tlak, tím musí být větší průměr kolony, silnější stěny, spotřebuje se hodně elektrické energie a je třeba mít uzavřený obvod chladící vody, aby došlo k ochlazení par o nízké teplotě. Na druhé straně lze však k vytápění využít páru o nižší teplotě.

### **5.3.4 Odvodňování molekulárními sítí**

Syntetické nebo přirozené látky nazývané zeolity adsorbují selektivně molekuly menší než je určitá hraniční velikost. Pro naši dvojici vstupuje do pórů zeolitu voda, ale ne alkohol. Zařízení pracuje v sestavě dvou zeolitových kolon. Azeotropický ethanol (ca. 5 % vody) vstupuje do kolony, část alkoholu a veškerá voda zůstane na koloně a po nasycení kolony je nutno přepnout odvodňování na druhou kolonu. První kolona se regeneruje propařováním parou. Po ochlazení se lihová kapalina vrací do výroby. Jeden cyklus na koloně trvá jen několik minut. Zeolity mají životnost kolem 1 roku.

### **5.3.5 Využití membránových procesů při odvodňování alkoholu**

Z membránových technologií můžeme uvést **metodu pervaporace** a **metodu pertrakce**. Metoda pertrakční založená na extrakci přes kapalnou membránu není zatím vyráběna pro provozní účely.

## **5.4 Fyzikálně chemické vlastnosti ethanolu**

Pro manipulaci s ethanolem je nutno si uvědomit, že jde o hořlavinu I. Třídy. Uvádíme proto i některé jeho fyzikálně chemické parametry:

Molekulová hmotnost: 46,05

Měrná hmotnost: 789,4 kg/m<sup>3</sup> (20 °C)

Bod varu: 78,3 °C

Výparné teplo (40 °C): 915,6 kJ/kg

Bod vzplanutí (atmosférický tlak): 12 °C

Dolní výhřevnost: 26,63 MJ/kg (benzin 41,9 MJ/kg)

Dolní mez zápalnosti par se vzduchem: 3,95 %

Horní mez zápalnosti par se vzduchem: 13,65

Kontrakce: 50 obj. dílů ethanolu + 50 obj. dílů vody dá 96,4 obj. dílů směsi o lihovitosti 51,87 % obj. Maximální kontrakce je 3 - 4 % při 55 % obj. alkoholu.

## **5.5 Bioethanol - energetický zdroj**

Bioethanolem označujeme ethanol získaný fermentací a určený pro výrobu paliv. Přídavek ethanolu do benzínu se prováděl u nás již před druhou světovou válkou, tehdy se jednalo o povinné přídavky alkoholu do benzínu. Pro aplikaci ethanolu je nejznámější "Brazilský lihový program", který ukázal na výhody a nevýhody jeho zavádění ve velkém měřítku. V USA, Francii a dalších zemích se navázalo na tyto zkušenosti. Současná doba se vyznačuje

nutností revidovat všechny technologie způsobující znečištění životního prostředí. Spalování fosilních paliv ke znečištění ovzduší přispívá hlavní měrou. V případě spalování nafty a benzinů v motorech nejde jen o emise oxidu uhličitého, ale i o znečišťování zplodinami hoření. Proto se hledají alternativní zdroje paliv, které by zajistily v rámci možností naší planety svou regeneraci, ale též využití vznikajícího oxidu uhličitého. Tyto látky však nesmí podstatně zhoršovat kvalitu paliv a mají vnést do směsi určité množství kyslíku (tzv. oxygenátů). Tak zvaná biopaliva jsou kyslíkaté sloučeniny, které přidáním do klasických pohonných hmot zlepšují jejich oktanové číslo a spalování, což vede ke snížení obsahu některých škodlivých látek ve výfukových plynech. Ethanol je určen pro motory benzinové, ale i použití ethanolu pro naftové motory se úplně nevylučuje. Ethanol lze přímo přidávat do benzínu ( USA - 10 %, Brazílie - 22 %, Polsko - 5 %). Oxygenáty (mezi ně patří i ethanol a aditivum připravené z ethanolu, ETBE: ethyl-terciární butyl-ether) snižují obsah oxidu uhelnatého (snížení o 10 - 30 %) ve spalínách. Ethanol snižuje i celkový tlak par benzínu a zvyšuje oktanové číslo paliva. Na druhé straně se však snižuje výkon motoru a zvyšuje se proto i spotřeba paliva. ETBE má proti MTBE (methyl-terciární butyl-ether) řadu výhod, hlavně též proto, že methanol pochází z fosilních paliv a při spalování vzniká nebezpečí tvorby formaldehydu (karcinogen). Další výhodou ethanolu je snížení teploty hoření paliva a tím se snižuje i množství vznikajících oxidů dusíku. Vzhledem k nižší těkavosti směsi ethanol - benzin, je nutné přidavkem jiných látek odstranit problém studených startů ( pro zimní období je výhodnější ETBE). Z hlediska výroby bioethanolu není třeba zásadně měnit kvasnou část výroby. Je však třeba provést všechna opatření, aby výrobní cena ethanolu byla co nejnižší.

## 6 VÝROBA LIHOVIN

**Lihoviny** jsou alkoholické nápoje, které obsahují nejméně 15 % obj. ethanolu vyjma vína a piva. Pro jejich výrobu se musí použít pouze ethanol vyrobený kvasným způsobem (pokud to výrobek vyžaduje). Synteticky vyrobený ethanol je pro tento účel zakázán.

**Rozdělení lihovin** je možno udělat podle několika kritérií (např. podle původu, podle obsahu sensorických látek, podle charakteru, podle způsobu výroby).

**Podle původu** je dělíme na:

- Lihoviny vyráběné kvasným způsobem (destiláty),
- Lihoviny připravené „ studenou cestou“ (bez kvašení, mícháním komponent s lihem, vodou aj.).

**Podle složení** (obsahu cukru):

Neslazené lihoviny (vodka, destiláty)

Slazené lihoviny

Likéry s obsahem cukru min. 100 g/l lihoviny (Praděd, Becherovka ...)

Krémy s obsahem cukru min. 250 g/ l lihoviny (kávový krém)

Krystalické likéry obsahující část cukru ve formě nerozpuštěných krystalků

Emulzní lihoviny (vaječný likér)

### 6.1 Suroviny pro výrobu lihovin

**Ovoce** obsahuje jednoduché sacharidy v proměnlivém množství a většinou vysoký obsah vody. Mezi žádané druhy patří to ovoce, které je bohaté na určité typické aroma, které uděluje destilátu nebo jinému typu lihoviny specifický charakter. Prakticky lze pro výrobu lihovin použít jakýkoliv druh ovoce. Výtěžnost ethanolu závisí hlavně na cukernatosti a při její průměrné hodnotě 6 – 15 % je výtěžnost v rozmezí 2,5 – 8,3 l ethanolu ze 100 kg suroviny.

**Škrobnaté suroviny.** Mezi ně patří např. slad pro výrobu sladové whisky, žito (výroba např. Starorežné), kukuřice (výroba americké whiskey), rýže (výroba araku). Brambory se používají na výrobu lihu, který je pak použit např. pro výrobu vodky.

**Ostatní suroviny.** Sem patří např. třtinová melasa (výroba pravých rumů), med (výjimečně se destiluje víno vyrobené z medu), víno na pálení (výroba vínovice, brandy, koňaku)

**Pro výrobu lihovin vyráběných studenou cestou** se používají další suroviny:

Rafinovaný líh ( nutno dodržovat kvalitativní ukazatele),

Voda (pitná voda se musí speciálně upravovat, hlavně demineralizovat, změkčovat),

Cukr (ve formě sirupu, převážně sacharosa, výjimečně i glukosa či laktosa)

Drogy ( oddenky, cibule, hlízy, kořeny, stonky, listy, květy, semena a plody, určité druhy dřev a kůry dřevin)

Silice a tresti (vodné a lihové roztoky), bonifikátory

Přírodní a výjimečně i syntetická barviva

## 6.2 Výroba destilátů

Kvalitní destilát je možno vyrobit pouze z kvalitního, vyzrálého, čistého a mikroorganismy nekontaminovaného ovoce. Destilací kvasu již není možno ztráty vzniklé špatným ovocem a kvašením zcela kompenzovat. Při přípravě rmutu, při kvašení a destilaci je třeba se neustále snažit uchovat všechny potřebné aromatické látky. Některé ovoce je třeba drtit (např. peckoviny), při tom je však nutné se vyhnout k drcení pecek. V jádrech je obsažen heteroglykosid amygdalin, ze kterého enzymatickým štěpením vzniká kyanovodík a benzaldehyd a dalšími reakcemi vzniká ethylkarbamát (zdravotně risiková látka). Z ovoce se připravuje rmut, nekvasí se celé ovoce. V některých případech (jablka) se připraví mošt, který se zkvašuje. Tímto způsobem se odstraní většina pektinových látek, ze kterých působením odpovídajících enzymů vzniká methanol. Ten je opět z hlediska zdravotního látkou nežádoucí. Škrobnaté látky se musí před kvašením upravit podobným způsobem, který byl zmíněn při výrobě průmyslového lihu.

**Kvašení.** Při výrobě destilátů není důraz kladen jen na produkci alkoholu, ale především na tvorbu a zachování sensoricky významných látek. Kvašení může být **spontánní** ( mikroflorou ovoce) nebo **řízené** (použitím čistých kultur kvasinek jako je tomu i ve vinařství). Kvasné nádoby mohou u malých závodů být i otevřené a proto je nutno tzv. matolinový klobouk, který se při kvašení objevuje na povrchu kvasu potápnět (jalové víko), aby nedošlo k oxidativním pochodům a ke kontaminaci aerobními mikroorganismy. Teplota kvašení by neměla překročit předepsané hranice, lépe je kvasit za snížených teplot, kdy vzniká méně nežádoucích produktů.

**Destilace a rektifikace.** Rozdíl od destilace a rektifikace průmyslového lihu je v tom, že při výrobě destilátů se nesnažíme o vysokou koncentraci a vysokou čistotu destilátu. Proto i konstrukce destilačních zařízení je jiná (méně pater v kolonách, nižší deflegmace). Kromě velmi používané periodické destilace („pot-still“) se ve větších závodech používá i kontinuální způsob destilace („patent still“). Destilační zařízení se obvykle skládá z: destilačního kotle s míchadlem, přestupníku, chladiče, sběrné nádoby na lutr (surový destilát), rektifikačního kotle s deflegmátorem, přestupníku, chladiče, sběrné nádoby na jádro a na spojený podíl úkapů a dokapů, kontrolní měřidlo. Způsob ohřevu dost významně ovlivňuje i kvalitu destilátu. Při **první destilaci** se surový produkt nejímá úplně, protože by se porušila jeho kvalita. Když poklesne okamžitá koncentrace destilátu k 2 % obj., jímání lutru se zastaví. Průměrná lihovitost lutru je 20 – 30 % obj. Lutr se přepaluje při **druhé destilaci**, kdy dojde k rozdělení na úkap, prokap (jádro) a dokap. Rozdělit správně destilát na tyto tři frakce patří mezi nejobtížnější úkony. Obsah ethanolu je nejvyšší v prvních podílech (70 – 80 % obj. při lihovitosti lutru 20 – 30 % obj.), tomu odpovídají teploty do 80 °C. Od 80 do 91 °C můžeme

očekávat prokap. U kvalitních destilátů se jádro může přestat odebírat již i při lihovitosti 25 % obj. Průměrná lihovitost prokapu je 50 – 65 % obj. Dokap se často používá znovu do destilace, látky v něm přítomné jsou důležité pro sensorické vlastnosti destilátu (např. brandy, whisky).

**Skladování a zrání destilátů.** Destilací výroba destilátu nekončí. Podle typu destilátu je nutno pokračovat ve vytváření jeho sensorického profilu při zrání. Některé destiláty nelze hned po destilaci vůbec požit. Destilát zraje nejčastěji v dubových sudech, často i upravených např. vypálením (whisky). Doba zrání u řady destilátů je značná (5 – 15 let). Z destilátů bude v přednáškách podrobněji pojednáno o výrobě slivovice, calvadosu, pravého rumu, borovičky (kvašené), whisky (sladové, obilné), koňaku, brandy aj.

### 6.3 Výroba lihovin studenou cestou

V této kategorii lihovin existuje množství různých postupů, které jsou výrobcem utajovány. Principiálně se jednotlivé suroviny a polotovary smíchají s lihem různé koncentrace (obvykle se nepoužívá koncentrovaný alkohol). Pořadí přidávaných látek je pro konečný výrobek důležité. U vyrobené lihoviny je třeba nakonec upravit barvu a koncentraci alkoholu. U některých takto připravených lihovin se provádí ještě destilace. Tím se odstraní látky netěkavé s nepříjemnou chutí (např. gin, některé vodky, borovička aj.). Do této kategorie lihovin patří již dříve zmíněná vodka, gin, borovička, dále i hořké a bylinné likéry a u nás proslavený „tuzemák“.

Konečná fáze výroby lihovin zahrnuje **úpravu lihoviny** (úprava lihovitosti, obsahu extraktivních látek aj.), **balení a hodnocení výrobku** (stanovení běžných jakostních ukazatelů, typických látek pro charakter lihoviny, obsah cizorodých látek).

## 7 VÝROBA GLYCEROLU, BUTANOLU A ACETONU

Mikrobiální produkce těchto látek je známa poměrně dlouho. Průmyslově se vyráběly v dobách, kdy chemická výroba byla nevýhodná a nákladnější. V současné době se tyto látky průmyslově biotechnologickým způsobem nevyrábějí, ale studují se všechny možnosti tyto výroby optimalizovat, protože většina chemických výrob vychází z petrochemických surovin, jejich zásoby se snižují a kromě toho tyto výroby značnou měrou přispívají ke znečišťování životního prostředí.

### 7.1 Glycerol

Při lihovém vzniká malé množství glycerolu. V současné době se glycerol získává z louhů po zmýdelnění tuků a po výrobě methyl esteru řepkového oleje. Mikrobiologická výroba pomocí kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* je založena na zablokování redukce acetaldehydu a to buď pomocí siřičitanu (2. Neubergovo schéma lihového kvašení) nebo slabě alkalickou reakcí (3. Neubergovo schéma lihového kvašení). Novější způsoby využívají jiných druhů kvasinek a jiného způsobu regulace biosyntézy.

#### 7.1.1 Siřičitanový způsob

Koncentrace siřičitanu je velká (až 40 % na vnesený cukr) a proto mikroorganismy nejsou v dobrém fyziologickém stavu. Nelze vést kultivace kontinuálně a ani vsádkově s použitím odseparované biomasy. Acetaldehyd tvoří se siřičitanem adiční sloučeninu, která je při kultivaci stálá, ale při destilaci uvolní acetaldehyd. Fermentace trvá asi 30 hodin. Kvasinky musí být důkladně adaptovány na prostředí se siřičitanem. Koncentrace cukru bývá kolem 15 – 20 % hm. Tímto způsobem však nezabráníme tvorbě ethanolu. Koncentrace glycerolu

v médiu může tak být až 8 % hm. Melasa není vhodnou surovinou, protože způsobuje potíže při rafinaci produktu. Pro každou šarži je nutno připravovat inokulum v dostatečném množství.

### 7.1.2 Alkalický způsob

Acetaldehyd se v neutrálním až mírně alkalickém prostředí rozkládá neenzymaticky na ethanol a kyselinu octovou. NADH se oxiduje na  $\text{NAD}^+$  v reakci dihydroxyacetonfosfát  $\rightarrow$  glycerolfosfát. Fermentace trvá 4 – 5 dní při podobných koncentracích cukru jako u siričitanového způsobu. Alkalita se s výhodou udržuje pomocí  $\text{CaCO}_3$  nebo  $\text{MgCO}_3$ . Vedlejším produktem je opět ethanol.

Izolace produktu je náročná. V první řadě se musí oddestilovat ethanol a výpalky jsou destilovány za silného vakua (tlak až 2kPa). Surový glycerol se musí rafinovat.

### 7.1.3 Biosyntéza glycerolu osmotolerantními kvasinkami

Proces probíhá za fyziologicky příznivějších podmínek (bez  $\text{SO}_3^{2-}$  a ve slabě kyselém prostředí). Osmotolerantní kvasinky např. *Zygosaccharomyces acidificiens*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis*, *Pichia miso*, *Debaryomyces mogii*, *Torulopsis magnoliae*, *Pichia farinosa* aj. snášejí vysoké koncentrace NaCl a produkují glycerol jako osmoprotektant. Glycerol vytváří i *Aspergillus niger* při produkci kyseliny citronové, ale v malém množství. Limitace fosforem je pro tento proces výhodná. Konverze cukru na polyoly (glycerol, erythritol, arabitol aj.) je až 60 %. Koncentrace cukru v médiu bývá 20 – 40 %.

## 7.2 Aceton-butanolová fermentace

Průmyslová výroba acetonu a butanolu byla zaváděna v mnoha státech (i v Československu) již před 60 lety. Byla však vytlačena výrobou chemickou. Butanol však lze využít díky dobré mísitelnosti s naftou jako přídavek do paliva pro vznětové motory. Proto se výzkum zaměřuje na optimalizaci procesu (genové manipulace, snížení inhibice butanolem, způsoby izolace). Výchozím mikroorganismem je anaerobní bakterie *Clostridium acetobutylicum*. Růst této bakterie je zcela inhibován přítomností kyslíku v médiu. Po ukončení kvašení dochází ke sporulaci mikroorganismu. V laboratoři se ze sporulující kultury připraví inokulum tepelným šokem (var na vodní lázni asi 5 min.) a tím se synchronizuje jejich klíčení, které nastartuje v živném médiu. Inokulum se pak pomnožuje v nádobách o rostoucím objemu (1 : 100). Oxidem uhličitým se vytváří vhodné startovací podmínky (vyloučení vlivu kyslíku), koncentrace sacharidického zdroje se pohybuje kolem 5 – 6 %. Je to dáno koncentrací butanolu, který je nejtoxičtějším produktem. Jako zdroje C lze použít i škrobnaté materiály po předchozím jeho zmazování (klostridie produkují amylytické enzymy). Proces trvá 3 a více dní. Produkce rozpouštědel je dána jejich poměrem butanol : aceton : ethanol = 6 : 3 : 1. Metabolické dráhy vedoucí k produkci butanolu, acetonu a ethanolu jsou podstatně složitější než u kvasinek. Významnou roli plní opět  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  dehydrogenasy. Při reakcích vzniká vodík, který je nutno z prostředí bezpečně odvádět. Při metabolismu vzniká z pyruvátu acetyl-CoA. Při reakcích vznikají nejprve kyseliny („kyselinotvorná fáze“), které se hromadí v médiu. Tato fáze souvisí s růstovou fází a je třeba ji limitovat některými růstovými faktory. Po ní následuje fáze, kdy dochází k poklesu pH a ke vzrůstu koncentrace rozpouštědel. Proces byl prověřen i kontinuálně jako jednostupňový a dvoustupňový. Nadějně jsou výsledky získané s imobilizovanými klostridii. Po ukončení kvašení se zápara filtruje a destiluje. Uspořádání kolon je vzhledem k produktům složitější než při destilaci ethanolu ze zápar. Ve vývoji jsou procesy, kdy by bylo možno rozpouštědla z média průběžně odstraňovat (např. metodou pertrakce na kapalných membránách) a tím zvýšit i efektivitu procesu. Z dalších produktů, které je možno zařadit do skupiny rozpouštědel je možno jmenovat **2,3-butandiol** a **1,3-propandiol**.

## 8 BIOTECHNOLOGIE ORGANICKÝCH KYSELIN

Mikroorganismy jsou schopny vytvářet značné množství různých organických kyselin jako extracelulárních produktů. Průmyslově se však využívá této jejich schopnosti jen v malém počtu případů pro vlastní výrobu (ocet, kyselina citronová, kyselina mléčná, kyselina glukonová). Často se však kyseliny produkují při kvašení potravin (mléčné bakterie) s cílem jejich konzervace.

### 8.1 OCET (OCTOVÁ KYSELINA)

Mikrobní produkce octové kyseliny je oxidativní proces, při kterém je ethanol oxidován na kyselinu octovou a vodu. Oxidace probíhá podle následující rovnice:



Součet koncentrací ethanolu (% vol.) a kyseliny octové (% hm.) určuje koncentraci tzv. **řediny (nálevu)**. Teoreticky je možno při této reakci dosáhnout výtěžnosti nad 100 %, neboť nedochází k produkci oxidu uhličitého a molekulová hmotnost kyseliny octové je vyšší než ethanolu. Praktický výtěžek však bude nižší, protože část ethanolu bude využita při respiraci a růstu bakterií.

**Suroviny k výrobě octa.** Média pro produkci kyseliny octové musí obsahovat ethanol a vodu a pro octové bakterie se musí přidat potřebné živiny. Hlavním substrátem (zdrojem uhlíku) pro výrobu octa je **ethanol**. Ten je obsažen v celé řadě alkoholických produktů (hroznové víno, vína ovocná, prokvašená sladina, pivo) nebo se z denaturátu (rafinovaný alkohol + denaturační činidlo) připraví ředina. Podle zvyklostí a dostupnosti surovin se vyrábějí:

- vinné octy (Francie, Itálie),
- ovocné octy (Velká Británie, Německo, USA, Francie); nejznámější z této kategorie octů je jablečný ocet, který se vyrábí z jablečného vína (cider)
- obilné octy sladové (Velká Británie); jde o produkt vzniklý bakteriální oxidací ethanolu v prokvašené sladové zápaře (ta vzniká infúzním rmutováním ze sladu)
- lihové octy (ČR, Polsko, Německo, Rusko)
- rýžové octy (Japonsko) se vyrábějí ze zcukřeného škrobu rýže

U nás se k výrobě octa používá rafinovaný líh (je možno použít i líh surový) vyrobený ze surového lihu melasového, bramborového nebo obilného. **Voda** používaná k výrobě octa musí odpovídat normě pro pitnou vodu. Z hlediska tvrdosti má jít o měkkou vodu s obsahem Ca do 70 mg v 1 litru (tj. do  $10^{-3} \text{N} = 1,8 \text{ mmol/L}$ ). Většina přírodních zdrojů použitých jako suroviny nepotřebuje přídavek živin. Např. cider však trpí nedostatkem dusíkatých látek a proto se doporučuje přídavek fosforečnanu amonného. Totéž platí pro některá hroznová vína, biosyntéza octa pak probíhá mnohem lépe. Při výrobě octa z lihových roztoků však jednoznačně platí, že se živiny musí dávkovat. Pro vyšší koncentrace kyseliny octové je třeba nutně přidávat trochu glukosy a soli K, Na, Mg, Ca a  $\text{NH}_4^+$  jako fosfáty, sulfáty nebo chloridy. Kromě toho vyžadují bakterie stopy Fe, Mn, Co, Cu, Mo, V a Zn. Obchodní preparáty živných solí obsahují ještě další přídavky jako např. kvasničný extrakt, výtazek ze sladových klíčků, sladinu. Tyto látky přispívají k rychlému nastartování oxidace ethanolu a měly by být dávkovány šetrně během kultivace bakterií.

**Mikroorganismy.** Mikroorganismy oxidující ethanol na kyselinu octovou se obecně nazývají **octové bakterie**. Produkce kyseliny octové probíhá při nízkém pH. Některé produkují pigmenty, jiné tvoří celulosu. Ty kmeny, které tvoří vysokou koncentraci kyseliny octové



patří do rodu *Acetobacter*. Žádané jsou takové druhy, které vykazují vysokou odolnost vůči kyselině octové, mají nízké požadavky na živiny, nevykazují vlastnost přeoxidace kyseliny octové a vyznačují se vysokými rychlostmi produkce. Nežádoucí vlastností je schopnost přeoxidovat vlastní produkt – kyselinu octovou. Většina kmenů toto provádí až po té, co je vyčerpán prakticky veškerý ethanol z média.

### **Významné druhy octových bakterií**

Mezi nejčastěji používané druhy patří:

- *Acetobacter aceti* s poddruhy *A.aceti subspecies aceti*, *A.aceti subsp. orleanensis*,
- *Acetobacter rancens*,
- *Acetobacter pasteurianus*
- *Acetobacter schützenbachii*,
- *Acetobacter suboxidans*

Druh *Acetobacter aceti* oxiduje kromě alifatických alkoholů i řadu cukrů na příslušné kyseliny s kaboxylovou skupinou na uhlíku C1. Za určitých podmínek dochází často při oxidaci glukosy na kyselinu glukonovou i k její následné oxidaci na kyselinu 5-oxo-glukonovou, glycerol se může oxidovat na dihydroxyaceton a sorbitol se oxiduje na sorbosu. Pro průmyslovou aplikaci mají význam ty druhy, které neoxidují kyselinu octovou při nízké koncentraci ethanolu. Za kontaminanty jsou považovány takové druhy, které oxidují kyselinu octovou i za přítomnosti ethanolu. Jde např. o druh *Acetobacter peroxidans*. Bylo prokázáno, že *Acetobacter* potřebuje ke svému růstu CO<sub>2</sub>. Část uhlíku vznikajícího oxidu uhličitého při dýchání je zabudováno do biomasy bakterií.

**Požadavek na kyslík.** Na rozdíl od mnoha jiných aerobních mikroorganismů jsou octové bakterie silně závislé na koncentraci kyslíku rozpuštěného v médiu. Zvláště při submerzní kultivaci dochází k poškození buněk a jejich úhynu i při krátkodobém přerušení dodávky vzduchu.

**Vyčerpání ethanolu z média.** Nepřítomnost ethanolu v média může vést ke stejnému účinku jako nedostatek kyslíku v médiu.

**Přeoxidace kyseliny octové.** Důležitou podmínkou úspěšné výroby octa je zajistit na konci procesu nízkou koncentraci ethanolu (nad 0,3 % obj.).

**Teplota** je důležitým faktorem ovlivňujícím proces. Pro různé technologické postupy se optimální teplota pohybuje v rozmezí od 28 do 35 °C. Vlastní oxidace ethanolu na octovou kyselinu je exotermní reakce. Z tohoto důvodu musí všechny technologické postupy řešit otázku chlazení systému.

#### **8.1.1 Technologické schéma výroby**

Ocet lze vyrábět třemi různými způsoby. Každý z nich se vyznačuje trochu rozdílnými podmínkami a zařízením a je vhodný pro určité druhy surovin. Nejčastěji se používá způsob upoutané kvašení (v očetnicích) a způsob submerzní. Povrchový způsob se používá již výjimečně.

**Povrchový způsob výroby octa.** Způsob známý pod názvem **orleánský** patří mezi nejstarší průmyslové způsoby výroby octa. Víno v soudku o obsahu kolem 200 litrů naplněné asi do poloviny se nechalo 1 – 3 měsíce octovatět. Důležité je, aby soudky byly otevřené, aby měl vzduch co největší přístup k vínu. Na konci se dosáhne v octu asi 6 % hm. kyseliny octové a 0,5 % obj. ethanolu. Tento způsob se také někdy zařazuje do skupiny „**pomalého octařství**“.

**Metody rychlého octařství.** Tato metoda se vyznačuje výrobou v očetnicích - reaktorech s imobilizovanými octovými bakteriemi, které dnes zařazujeme do skupiny filmových

reaktorů. Metodu zavedl v první polovině 19. století Schützenbach. Malé očetnice byly později nahrazeny **acetogenerátory**, známé jako **Fringsovy velkoocetnice**. Acetogenerátor dosahující i objemu 100 m<sup>3</sup> je rozdělen na 3 části. Střední – hlavní část představuje vlastní reakční prostor, kde jsou bakterie imobilizovány na povrch nějakého sorbentu, nejčastěji to bývají bukové hobliny. Nehomogenní charakter náplně se projeví v nestejném průběhu reakce a tudíž i k rozdílným teplotám v jednotlivých částech očetnice. Bakterie, které se v očetnicích používají musí mít schopnost dobré adheze k danému materiálu. Tato vlastnost je doprovázena tvorbou slizu (mázdry) jejíž chemickou podstatou jsou převážně polysacharidy. Nesmí však docházet k ucpání náplně. Horní prostor (sběrný, nivelizační) je oddělen od středního děrovaným víkem. Sem se přivádí čerpadlem ředina ze spodního sběrného prostoru a rozděluje se tak do oxidačního prostoru. Očetnice je nahoře uzavřena, aby se snížily ztráty odparem. Těsně pod roštem jsou ve stěně očetnice otvory pro vstup vzduchu. Velkoocetnice je vybavena odstředivým čerpadlem k přečerpávání řediny ze sběrného prostoru do rozstřikovacího zařízení. Průtok se automaticky reguluje na základě monitorování teploty (často jsou instalovány tři regulační teploměry, teplota na spodním teploměru je např. 34 °C a na horním 29 °C). Při tom prochází ředina chladičem do nivelizační (rozstřikovací) nádrže. Cirkulace probíhá tak dlouho, dokud nebude dosaženo předepsané koncentrace ethanolu (asi 0,3 % obj.). Jednou z nevýhod očetnice je, že očetnice musí běžet neustále. Při každém odstavení by se musela náplň regenerovat a zakotvení bakterií je rovněž dlouhodobý proces. Nálev tedy např. obsahuje 8-8,5 % hm. kyseliny octové a 3 – 2,5 % obj. ethanolu. Jeden cyklus výroby trvá 7 – 8 dní. Maximální rychlosti oxidace se dosahuje mezi 3. až 5. dnem. **Výhody metody rychlého octařství:** spolehlivá metoda, bez velkých výkyvů v chodu, získaný ocet je nezakalený, velká výkonnost zařízení, dobrá výtěžnost, chod není ekonomicky příliš náročný, výměna náplně se v průměru provádí jednou za 10 – 15 let, snadno se proces automatizuje. **Nevýhody metody:** očetnice se obtížně uvádí do provozu, plného výkonu se dosáhne až po několika týdnech, zvyšování výtěžnosti v období spotřební špičky je obtížné.

**Submerzní metoda výroby octa.** Oxidace ethanolu probíhá v nádobách z nerezavějící oceli vybavených míchadly, účinným chlazením a účinným aeračním zařízením. Taková zařízení umožňují pracovat s vyšší koncentrací ethanolu na vstupu (min. 6 %) a mají asi 3 krát vyšší výkonnost ve srovnání s velkoocetnicí. Submerzní výroba octa se může realizovat jako vsádkový, přítokovaný diskontinuální nebo kontinuální proces (jednostupňový nebo dvoustupňový). Rozdíl proti výrobě v očetnici je v tom, že bakterie nejsou zakotveny, nýbrž jsou volně a homogenně rozptýleny v celém objemu řediny. Zavedení této výroby bylo obtížné hlavně proto, že acetobaktery jsou silně závislé na obsahu kyslíku v médiu a i při krátkém přerušení provzdušňování dochází k jejich uhynutí. **Nálev** pro vsádkovou výrobu lihového octa nejčastěji obsahuje 11 až 12 % obj. ethanolu a je přiřiven (kolem 0,2 % živin jako je např. glukosa, močovina, glycerol, hydrolyzát droždí nebo kaseinu, kukuřičný výluh, fosfáty, soli hořčíku, draslíku a řada stopových prvků). **Konec** vsádkového procesu je dán poklesem koncentrace ethanolu na 0,3 % obj. a zvýšením kyselosti na 11 – 12 % kyseliny octové. **Doba jednoho cyklu** submerzního procesu je v průměru 48 – 72 hodin. S vývojem nové generace senzorů, počítačové techniky a softwarového inženýrství se dnes možnosti automatizace fermentačních procesů, a to i těch klasických jako je výroba octa, podstatně rozšířily. Zmíněný rozvoj měřicí a řídicí techniky umožní v blízké budoucnosti realizaci kontinuálních nebo semikontinuálních výrob octa s recyklem buněk octových bakterií. Produktivita (množství produkované kyseliny za hodinu) se tímto způsobem několikanásobně zvýší.

**Výhody submerzního způsobu výroby octa:** uvedení do chodu je proti očetnici velmi rychlé a jednoduché, celý proces je rychlejší, u očetnice bývá denní přírůstek kyseliny asi 1,1 %, kdežto u submerzního způsobu je to 3 až 4 %, umožňuje lépe zpracovávat vinné i ovocné

zápary, výtěžnost kyseliny octové je vyšší. Je-li submerzní proces spojen s očetnicí, je doba potřebná pro zahájení nového provozu kratší než při zahajování pouze submerzní výroby, uspoří se i fermentační prostor, protože se na 1 m<sup>3</sup> fermentačního prostoru vyrobí víc octa.

**Nevýhody submerzního procesu:** ocet je silně zakalen bakteriemi, musí být důkladně vyčeřen, filtrován a případně i pasterován, při poruše provzdušňování je znehodnocen celý obsah acetátoru.

**Vady octa.** Kvalitu octa mohou podstatně snížit některé ionty kovů, např. železa, mědi a cínu. Zinek tvoří jedovatý octan zinečnatý. Železo a měď způsobují tmavnutí a zákaly, což je nežádoucí pro nakládání zeleniny. Vady octa mohou vznikat i působením škůdců mezi které patří háďátka octové, octový roztoč a octová muška.

**Úprava a skladování octa.** Surový ocet se dále zpracovává. Provádí se čiření za účelem snížení obsahu látek, které mohou způsobovat zákaly (bílkoviny, pektiny, melanoidní látky, komplexy kovů apod.). Vyrobený ocet jako surový produkt obsahuje 10 – 12 % kyseliny octové. V posledních letech se v zahraničí tato koncentrace i zvyšuje. Do prodeje se však tyto produkty ředí vodou a různě ještě upravují. Nízké koncentrace octa nejsou příliš vhodné, protože jsou méně stabilní a to i z hlediska mikrobiologického. Po účinné filtraci se ocet plní do dubových kádí, kde se nechává asi 3 měsíce zrát. Často se ocet i v této fázi pasteruje. Po dosažení požadovaných senzorických vlastností se provedou konečné úpravy (čiření, filtrace, barvení, pasterace) a ocet se plní do lahví. Kromě kyseliny octové obsahuje ocet i malá množství kyseliny propionové, mléčné, šťavelové, glukonové a některé oxokyseliny. Ethanolu obsahuje od 0,2 do 0,4 % obj. Ocet obsahuje též vyšší alkoholy (pocházející z výchozího lihu, vína), jejich estery, dusíkaté sloučeniny, anorganické látky, extraktivní látky pocházející např. z bukových hoblin aj. Vinné octy nebo octy vyrobené z ovocných vín, prokvašených sladů obsahují ještě např. glycerol, kyselinu jantarovou, kyselinu vinnou, jablečnou aj. Často se octy uměle aromatizují, což lze provést i extrakcí aromatických plodů a bylin přímo octem. Z plodů se používají např. maliny, ostružiny, jahody, kdoule aj. Z bylin se nejčastěji extrahují listy estragonu, pelyňku estragonového. Běžněji však se octy aromatizují přísadami příslušné esence (extrakty kmínu, kopru, petržele aj.).

## 8.2 CITRONOVÁ KYSELINA

Od začátku 19. století se kyselina citronová vyráběla ze šťávy z citrusů a teprve začátkem 20. století se vyrábí biosynteticky. Je třeba se zmínit o tom, že jedna z prvních výrob kyseliny citronové v Evropě byla realizována v Kaznějově u Plzně. Všechny aerobní mikroorganismy, u kterých je aktivní citrátový cyklus produkují kyselinu citronovou. Pro průmyslovou výrobu však tyto mikroorganismy musí tvořit tento produkt extracelulárně ve velkých koncentracích a s vysokým stupněm konverze cukru. Základem metabolických drah je glykolýza, na kterou navazuje citrátový cyklus. Možnost jejich regulace je předpokladem úspěšnosti použitého kmene. Fixace oxidu uhličitého je pro proces velmi důležitá, neboť přispívá značnou měrou k vysokým výtěžnostem produktu z cukru (tato výtěžnost může být i 90 % počítáno na cukru).

**Mikroorganismy používané při provozních výrobě kyseliny citronové.** Produkční kmeny plísně *Aspergillus niger* se nejvíce průmyslově využívají (mají vysokou aktivitu glykolytické dráhy, citrátového a pentosového cyklu). Kromě tohoto mikroorganismu je popsána aplikace kvasinek *Yarrowia lipolytica* využívající jako uhlíkatý zdroj n-alkany. Nevýhodou je však vysoká produkce isocitronové kyseliny. Jedním ze základních předpokladů úspěšné výroby kyseliny citronové je příprava vysokoprodukčního kmene (mutanty, kmeny získané genovým inženýrstvím).

Produkční kmen *Aspergillus niger* se průmyslově uchovává ve formě spor, které také slouží k přípravě vegetativního inokula (submerzní kultivace) nebo se jimi přímo očkuje médium

(povrchová kultivace). Biosyntéza kyseliny citronové se podobá jak biosyntéze primárních metabolitů, tak částečně i biosyntéze sekundárních metabolitů (odtud označení pseudosekundární metabolismus). V první fázi kultura roste za současné produkce kyseliny citronové (produkce kyseliny je pomalejší než ve druhé fázi) až do vyčerpání některých pro růst důležitých živin (N, P). Ve druhé fázi, kdy již kultura neroste se tvoří největší množství produktu.

**Faktory ovlivňující biosyntézu kyseliny citronové. Zdrojem uhlíku** bývá sacharosa nebo glukosa v koncentracích kolem 15 % hm. Z pohledu regulace procesu je důležité, aby koncentrace cukru byla hned z počátku vysoká (represe syntézy některých důležitých enzymů citrátového cyklu, čímž dochází k hromadění produktu v buňce a následně i k jeho transportu z buňky). Pro produkci jsou dále nutné suboptimální koncentrace některých **stopových prvků** (Fe, Zn, Mn a Cu), naproti tomu však vyšší koncentrace některých těžkých kovů podporuje sporulaci, což snižuje produkci zvláště u povrchového způsobu. Mezi další významné faktory patří **pH**. Na začátku procesu je pH optimální pro růst kultury (kolem pH 5), tvorbou kyseliny se pH snižuje a jeho hodnota se nesmí regulovat. Regulací pH na hodnotě kolem 5 bychom podpořili činnost glukosaoxidasu a tak i tvorbu kyseliny glukonové. Při pH kolem 3 nastává přibližně druhá (produkční) fáze. Konečné pH se pohybuje kolem pH 1,7. **Teplota** by měla být udržována kolem 30 °C (závisí na kmenu). **Vliv kyslíku (aerace)**. Patří mezi důležité faktory procesu. Vzhledem k využívání produkovaného oxidu uhličitého by neměl být průtok vzduchu příliš velký (hlavně u povrchového způsobu, používá se částečného vracení vzduchu z komor). Vzhledem k rychlosti procesu není spotřeba vzduchu v růstové a ani v produkční fázi velká. Potíže se mohou vyskytnout s mícháním a to v případech, kdy je kultura vláknitá (negativní vliv smykového napětí na mikroorganismus, použití reaktorů s pneumatickým mícháním je výhodnější). **Vliv inokula**. Povrchový způsob používá výhradně k zaočkování spor, kdežto submerzní preferuje vegetativní inokulum ve formě pelet (kuliček).

## 8.2.1 Technologické schéma výroby

**Povrchový způsob výroby.** Nejstarším způsobem výroby je povrchový způsob. V úplných prvopočátcích byl realizován na pevné fázi (např. na škrobnatém materiálu dostatečně zvlhčeném, produkt se po fermentaci vyextrahoval vodou). Jako surovina se používá melasa a z ní se připravuje melasové médium (značné nároky na kvalitu melasy). Médium nalité do nerezových mís umístěných v kvasných komorách se očkuje sporamai zavedenými do proudu vzduchu nad fermentační médium. První fáze je představena nárůstem mycelu. Proces je ukončen za 7 – 10 dní. Mycel musí mít správnou světlou barvu, nesmí se tvořit spory a nesmí se potápět.

**Submerzní způsob výroby.** Základními podmínkami úspěšné výroby je limitace růstu koncentrací fosfátu nebo dusíku (začátek druhé fáze), optimalizací koncentrace stopových prvků a vývojem vysokoprodukčního kmene (nelze úspěšně použít vysokoprodukční kmeny z povrchového způsobu). Očkuje se většinou již připraveným vegetativním inokulem. Doba kultivace je 4 – 6 dní.

**Izolace.** Produkt se izoluje po oddělení mikrobiálního producenta zatím většinou jako vápenatá sůl. Musí se rafinovat a konečným produktem je buď bezvodá kyselina citronová nebo monohydrát, případně i některé sole.

**Použití:** Okyselující prostředek v nápojovém průmyslu, ve farmacii spolu s bikarbonátem pro přípravu efervescentních prášků, místo fosfátů do pracích prášků aj.

Plíseň *Aspergillus niger* může být použita i pro výrobu **glukonové kyseliny**. Na rozdíl od kyseliny citronové jde o kratší výrobu, protože se v podstatě jedná jen o dvě reakce: glukosa je oxidována nejprve na glukonolakton a ten se dále hydrolyzuje na kyselinu. Jak bylo již zmíněno je přitom třeba udržovat pH na hodnotě optimální pro glukosaoxidasu a za druhé je

třeba od začátku limitovat růst kultury. Proces můžeme přirovnat k transformaci. Kyselinu glukonovou mohou tvořit i bakterie *Acetobacter* a *Gluconobacter*. Kyselina glukonová se na rozdíl od kyseliny citronové však snadno vyrobí chemicky oxidací glukosy.

### 8.3 MLÉČNÁ KYSELINA

Kyselina je bezesporu potravinářsky nejvýznamnější organickou kyselinou. Fermentačním způsobem se vyrábí od konce 19. století, ale do 80. let minulého století se téměř polovina světové produkce vyrobila chemickým způsobem. V ČR republice se kyselina mléčná nevyrábí. Výroba byla v Československu ukončena v 60. letech minulého století.

Kyselina mléčná se vyskytuje ve dvou optických isomérech, L(+) isomér je fyziologicky významný a proto se zájem producentů soustřeďuje v posledních letech právě na přípravu mikroorganismů produkujících tohoto isoméru. Obsah D(-) isoméru je omezen především v dětské výživě. Nevýhodou kyseliny mléčné při výrobě je její schopnost tvořit polyméry. Proto se produkt připravuje ve vodných roztocích (např. 50 a 80 %tní). Na druhé straně se této schopnosti začalo značně využívat při výrobě biodegradovatelných plastů (polylaktátů a jejich kopolymerů). Světová produkce se v poslední době několikrát zvýšila.

**Biosyntéza.** Kyselina mléčná vzniká u mléčných bakterií buď homofermentativní nebo heterofermentativní fermentací. Homofermentativní vznik se vyznačuje jen vznikem kyseliny mléčné to znamená, že výtěžnost produktu ze sacharidu by teoreticky měla být 100 %. Ve skutečnosti vzniká malé množství ethanolu, kyseliny octové a oxid uhličitý. Homofermentativní bakterie mohou dosáhnout prakticky 80 – 90 %tní výtěžnost na cukr. Heterofermentativní mléčné bakterie se vyznačují větším spektrem produktů a pro průmyslovou výrobu kyseliny mléčné nejsou zajímavé. Vznik kyseliny mléčné probíhá glykolytickou drahou. Za optické isoméry odpovídá D-laktátdehydrogenasa, L-laktátdehydrogenasa a laktátracemasa.

**Mikroorganismy.** Nejvýznamnější producenti kyseliny mléčné patří do rodů: *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Z výživářského hlediska jsou i heterofermentativní bakterie důležité (např. rod *Bifidobacterium*). Z technologického hlediska je důležité, že mléčné bakterie jsou velmi náročné na složení média, nejlepšími zdroji uhlíku je glukosa a laktosa, huře je u některých druhů zkvašována sacharosa. Vysoké nároky jsou kladeny na živiny dusíkaté (především na aminokyseliny) a vitaminy skupiny B a na stopové prvky. Podle požadavků na teplotu se mléčné bakterie dělí na mesofilní a termofilní. Do skupiny termofilních bakterií patří: *Lactobacillus delbrückii subsp. delbrückii*, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus thermophilus*. Mezi mesofilní bakterie patří *Lactobacillus plantarum*, *L. arabinosus* aj. Z požadavků mikroorganismu na podmínky kultivace je důležité, že hodnotu pH je třeba udržovat v rozmezí 5 – 5,5. Kyselina je tedy téměř zcela ve formě laktátu. Způsob úpravy pH je určen způsobem izolace produktu. Aktuální koncentrace sacharidu není tak rozhodující, výhodnější je fermentovat způsobem „fed-batch“. Konečná koncentrace kyseliny mléčné v médiu je určena mikroorganismem a složením média. Může být nízká např. jen 3 % hm. nebo vysoká, např. nad 10 % hm.

#### 8.3.1 Technologické schéma výroby

Technologické schéma se liší podle toho, zda je proces vsádkový, přítokovaný, kontinuální s recyklem buněk nebo bez recyklu. Fermentace v prostředí s vysokou koncentrací buněk je výhodná, neboť značně zvýší produktivitu procesu. Pro dobu zdržení či celkovou dobu fermentace je rozhodující konečná koncentrace laktátu. U vsádkového procesu může být doba fermentace od 24 hodin do 3 dnů. Výsledky výzkumu posledních let ukázaly, že imobilizace bakterií významně zvýší rychlost biosyntézy při kontinuálních procesech. Vzhledem k podobným vlastnostem laktobacilů a sacharomycet je možné fermentaci vést obdobnými způsoby.

**Izolace.** Izolace je z ekonomického hlediska nejnákladnějším procesem. Proto tato část výroby do jisté míry ovlivňuje i fermentační proces. Je snaha při některých postupech celý proces integrovat např. tím, že se z izolační části vrací některé podíly zpět do fermentace, aby se ušetřily některé cenné složky média. Z izolačních metod si uvedme bez další diskuze následující:

- Izolace přes laktát vápenatý. Jeho rozpustnost je z jeho solí téměř nejnižší a pro potravinářské využití jsou stopy vápníků přijatelné,
- Izolace pomocí ionexů,
- Extrakcí,
- Pertrakcí na kapalných membránách
- Elektrodialýzou
- Destilací methylesterů

Po izolaci je nutno kyselinu mléčnou rafinovat. Ztráty při těchto dvou procesech mohou být dosti vysoké. Proto je nutné se tzv. „down-stream“ operacím věnovat.

Kyselina mléčná má značné použití v potravinářském průmyslu, v malém měřítku se používá v kožedělném průmyslu, ve farmacii k výrobě solí Ca a Fe, v poslední době největší část produkce směřuje do výroby plastů.

### **Organické kyseliny menšího významu produkované mikroorganismy**

**Kyselina itakonová.** Tato kyselina se snadno vyrábí organickou syntézou. Z mikroorganismů ji produkují některé druhy aspergilů, např. *Aspergillus terreus*. Její výroba je obdobná výrobě kyseliny citronové

**Kyselina D(+)-vinná.** Existuje řada patentovaných postupů, které vycházejí z různých substrátů. Např. mutanty bakterií *Acetobacter* a *Gluconobacter* mohou z glukosy přes kyselinu 5-oxoglukonovou produkovat do média několik gramů kyseliny v 1 litru.

**Kyselina L(-)-jablečná.** Se dá výhodně vyrobit z kyseliny fumarové pomocí imobilizované fumarasy. Výrobu však určuje cena kyseliny fumarové.

**Kyselina fumarová.** Je produkována plísněmi *Mucor* a hlavně *Rhizopus*. Vzhledem k tomu, že chemická výroba je rychlejší a zatím efektivnější nejsou biotechnologické výroby řešeny s takovou intenzitou jako biosyntéza kyseliny citronové či mléčné.

## **10 BIOTECHNOLOGIE AMINOKYSELIN**

Aminokyseliny byly původně vyráběny z hydrolyzátů bílkovin. Největší produkce se týkala kyseliny glutamové, resp. MSG (monosodium glutamate), která tvoří velkou část koření směsí. Mikrobiologickým způsobem jsou vyráběny lysin, kyselina glutamová, threonin a tryptofan. Postupuje se podobně jako při výrobě antibiotik. Produkční mikroorganismy, kultivované na vhodných živných médiích a za vhodných kultivačních podmínek jsou schopny z relativně jednoduchých a laciných zdrojů uhlíku syntetizovat aminokyseliny ve zvýšeném množství. Často se do médií přidávají prekurzory. Uhlíkatým zdrojem bývá obvykle glukosa. Některé aminokyseliny lze připravit i enzymovou metodou.

**Mikroorganismy při přípravě aminokyselin.** Aminokyseliny jsou v různém množství produkovány všemi mikroorganismy. Největší část je však využita k syntéze bílkovin. Pro průmyslovou výrobu však potřebujeme nadprodukcí volných aminokyselin jako extracelulárního produktu. Z tohoto pohledu jsou nejvhodnější bakterie, které se musí pro produkci připravit, např. jako mutanty či rekombinantní mikroorganismy. Jako produkční

mikroorganismy se nejvíc připravují mutanty auxotrofní, regulační nebo auxotrofně-regulační. Důležité je též, aby mikroorganismy měly zvýšenou permeabilitu pro produkované aminokyseliny. Za tímto účelem se připravují např. termosensitivní mutanty, u kterých exkrece probíhá při nerůstové teplotě. Vztah mezi dependencí auxotrofních mutantů a produkcí aminokyselin je velmi důležitý. Tak např. pro produkci lysinu jsou kmeny dependentní na homoserin, podobně je to i u kyseliny glutamové. Regulační mutanty jsou selektovány jako mutanty rezistentní k analogům aminokyselin, tj. látkám strukturně podobným aminokyselinám, které inhibují růst citlivých výchozích kmenů.

## Fermentační příprava aminokyselin

Fermentační příprava aminokyselin sestává z kultivace produkčních kmenů a izolace produktu.

**Kyselina L-glutamová.** K biosyntéze se nejčastěji používají mutanty *Corynebacterium glutamicum*. Proces je značně ovlivněn koncentrací rozpuštěného kyslíku, obzvláště v první fázi, kdy je třeba k reoxidaci NADH a NADPH. Medium obsahuje ca 10 % glukosu nebo lze s výhodou využít místo toho kyselinu octovou, ethanol, uhlovodíky (*Corynebacterium hydrocarboclastus*), biotin, 30 °C, pH 7-8, NH<sup>+</sup><sub>4</sub>, močovina, fosfáty, Fe, Mn.....

### Klíčové faktory:

- \* Kyslík. Nedostatek kyslíku podporuje vznik kys. mléčná, jantarové. NADPH → NADP<sup>+</sup>
- \* Biotin.

Z hlediska metabolismu jsou důležité transaminační reakce a všechny dráhy vedoucí k pyruvátu a z pyruvátu do cyklu TCA (EMP, HMP). Klíčovým bodem syntézy je kyselina 2-oxoglutarová.

Růstová fáze trvá asi 10 h a produkční fáze 20 h. Finální koncentrace produktu se mohou pohybovat kolem 5 – 7 % hm.

**L-lysin.** Biosyntéza této aminokyseliny není výrazně ovlivněna kyslíkem. Samozřejmě jde o aerobní proces, ale kyslík neslouží k regeneraci NADPH. Lysin je esenciální aminokyselina a její výroba je důležitá pro přípravu krmných směsí. Proto se často nevyrábí čistá látka, ale suší se výsledné médium po oddělení mikrobiálního producenta. U auxotrofních mutantů dochází často k hromadění aldehydu kys. asparagové jako meziproductu. Aspartát se u bakterií mění na 4-aspartylfosfát dále na 4-asparaldehyd (+ pyruvát) a ke konci vzniká: 2,3-dihydrodipikolinát, potom 2,6-diaminopimelát a konečně L-lysin. K výrobě L-lysinu se nejčastěji používají auxotrofní mutanty z rodu *Brevibacterium* vyžadující homoserin (specifický genetický znak producentů lysinu)

### Faktory ovlivňující syntézu lysinu:

- ! přebytek Fe<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup> → L - valin
- růstové látky – biotin
- aminokyseliny (u dependentních kmenů)
- větrání (ve druhé fázi není tak důležité)

Před několika lety se podařilo spojit obě biosyntézy dohromady. Pomocí vyvinutého auxotrofně regulačního mutantu *Brevibacterium lactofermentatum* se souběžně produkuje kyselina glutamová, lysin a asparagová kyselina: 162 g/l kys. asparagová, 105 g/l lysin, 57 g/l kys. glutamová. Doba fermentace 40 – 60 h.

**Izolace aminokyselin.** Spočívá v první řadě na odstranění buněk producenta a pak se odstraňují některé nečistoty, které by mohly vadit další izolaci. Obecnou metodou na izolaci je sloupcová chromatografie na měničích iontů, které se též využívá k purifikaci. Někdy je výhodné upravit pH na hodnotu isoelektrického bodu kyseliny a potom aminokyselinu nechat

vykrytalizovat. Izolace je tedy silně závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech aminokyseliny.

#### **Z dalších aminokyseliny syntetizované MO:**

**L-tryptofan:** antidepresivum (metabolismus nervové tkáně), zemědělství - výživa drůbeže

#### **Mikrobiální produkce:**

- přímá fermentace (kmeny rezistentní k analogu L-threoninu)
- prekurzor - kys. anthranilová - *Candida parapsilosis* - do 0,2 %
- prekurzor - indol

**L- threonin:** z asparagové kyseliny - *E. coli*

Aminokyseliny mají široké uplatnění. Glutamová kyselina je vhodným ochucovadlem. Kyselina asparagová se využívá spolu s fenylalaninem k výrobě umělého sladidla „Aspartamu“. Velké použití mají aminokyseliny i v medicíně, např. tryptofan jako antidepresivum, 3,4-dihydrofenylalanin (DOPA) při léčbě Parkinsonovy nemoci.

## **11 VÝROBA MIKROBNÍ BIOMASY - PEKAŘSKÉ DROŽDÍ**

Pekařské droždí se používá ke kynutí těsta při výrobě některých druhů bílého pečiva, příp. i chleba. Vyrábí se ve dvou formách: lisované droždí a aktivní sušené droždí. Cílem výroby je získat produkt, který by odpovídal požadavkům pekárenské výroby (vysoká mohutnost kynutí v těstě, trvanlivost, mikrobiologická čistota).

**Mikroorganismus.** Pro výrobu pekařského droždí se používají v droždárnách výlučně jen kmeny kvasinek odvozených od rodu *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, které byly vyšlechtěny tak, aby v provozu poskytovaly maximální výtěžnost s optimálními vlastnostmi pro pekařské účely.

### **10.1 Suroviny**

U nás se používá k výrobě pekařského droždí výlučně řepná **melasa** (vyjíměčně se zpracuje i melasa třtinová, ale jen v kombinaci s řepnou melasou). Kromě výroby lihu a pekařského droždí nachází melasa použití v zemědělství (přídavek do krmiv) a pro mikrobiální výrobu kyseliny citrónové. Hlavními složkami řepné melasy, která má průměrně sušinu 75 až 80 %hm, jsou sacharosa (zpravidla 48 až 50 %hm.), dále necukry a voda. Obsah veškerého dusíku v melase se pohybuje v mezích 1,2 až 1,6 %hm.

### **10.2 Technologické schéma výroby droždí**

Melasa se skladuje v melasnicích, ze kterých je přečerpávána do nádrží, kde se připravuje **melasová zápara**. Po smíchání s vodou a částí živin je třeba melasové medium **vyčeřit** (vysrážení nežádoucích koloidních látek, které by zhoršovaly růst kvasinek). Vzhledem k tomu, že melasa má nedostatek dusíku a fosforu, musíme oba prvky přidat, a to většinou ve formě amoniaku a fosforečné kyseliny. Pro první fáze výroby je nutno přidávat též růstové látky obsažené např. v corn-steepu (kukuřičný extrakt - vzniká jako odpad při výrobě škrobu z kukuřice), kvasničném autolyzátu aj. Kvasinky se připravují v laboratoři (**laboratorní propagace**) v několika stupních (propagační poměr je 1:5) až do objemu asi 20 litrů. Odtud se



asepticky převedou do prvního stupně **provozní propagace**. Vlastní kultivace v provozním měřítku se provádí v několika stupních tzv. **násadních generacích** kvasinek. Kromě adaptací na podmínky je dalším důvodem pro přípravu jednotlivých generací i příprava neustále většího množství zákvasu pro další stupeň. Zásadní změnu ve složení sušiny generací a konečného výrobku (expedičního droždí) ukazuje tabulka.

### Tabulka

#### Obsah bílkovin a fosforu v sušině droždí

Druh droždí	Bílkoviny (% hm. suš.)	Fosfor * (% hm. suš.)
Násadní droždí		
1. generace	55	4,0
2. generace	50	3,6
Expediční droždí	40	2,8

\* jako oxid fosforečný

Z růstových faktorů se nejčastěji přidává **biotin**. Mezi jednotlivými generacemi je vždy zařazeno **odstředování a propírání čistou vodou**. Výsledkem je **kvasničné mléko** o obsahu 15 - 19 % hm. sušiny. Kvasinky se v podobě kvasničného mléka skladují i několik dní při teplotě 5 °C. Čiré medium (ředění – melasa : voda = 1:1,5) je připraveno v přítokových nádržích pro dávkování do jednotlivých provozních stupňů (včetně propagace). Kultivace kvasinek v jednotlivých stádiích probíhá za větrání zředěných melasových zápar, přičemž jejich koncentrace se určí podle účinnosti použitého aeračního systému. Kultivace expedičního droždí probíhá již prakticky bez tvorby ethanolu. Fermentační postup je diskontinuální - přítokový. Teplota kultivace u nás bývá kolem 30 až 34 °C. Doba fermentace je ovlivněna koncentrací melasy a pohybuje se od 10 do 18 hodin. Proces je značně náročný na dodávku kyslíku. Poslední 1 až 2 hodiny kultivace expedičního droždí se nepřidává již žádný přítok. Po skončení kultivace se musí kvasinky rychle oddělit od zápar, což se děje odstředěním na kontinuálních talířových odstředivkách. Kvasničné mléko se několikrát propírá vodou, aby se z produktu vytěsnila co nejvíce melasa; její přítomnost snižuje významně trvanlivost droždí. **Filtraci** (kalolisy nebo vakuovými rotačními filtry) kvasničného mléka se získá biomasa o koncentraci kolem 26 až 30 % hm. sušiny. Při konečné operaci se upravuje koncentrace vody a na liberkovacím stroji vznikají kvádry (liberky) o hmotnosti 0,5 kg a 1 kg. V poslední době se vyrábí i menší balení o hmotnosti 21 a 42 g.

**Hodnocení jakosti droždí.** Vyrobené lisované droždí má z hlediska analytického i z hlediska jeho použití pro výrobu bílého pečiva či chleba splňovat požadované parametry, např. minimální obsah sušiny 26 % hm., obsah popele nejvýše 9 % hm., obsah hrubé bílkoviny v sušině 36 až 40 % hm., mohutnost kynutí v těstě nejvýše 90 minut a trvanlivost při teplotě skladování 35 °C nejméně 72 hodin.

Vedle lisovaného pekařského droždí se vyrábí ještě **aktivní sušené droždí** (3 – 7 % hm. vody). Jeho výhodou je vysoká trvanlivost (až 1 rok) s pouze malou ztrátou aktivity. Pro jeho výrobu je třeba používat nejen pozměněné technologie, ale i jiných kmenů kvasinek. Z hlediska inženýrského se v technologickém procesu liší pouze výrobní koncovka. Odfiltrované droždí se granuluje (nudličky, kuličky) a suší (např. fluidně).

Značný problém, který však nelze přehlížet, představují v droždářenském průmyslu **odpadní vody**. Na 1 t zpracované melasy, což představuje výrobu asi 0,75 t lisovaného droždí, se musí počítat s více než 20 m<sup>3</sup> odpadních vod. Zatížení droždářských odpadních vod organickými látkami je sice celkem nízké, ale při velkém množství odpadních vod to znamená, že droždárna musí být vždy napojena na čistírnu odpadních vod s dostatečně velkou kapacitou. Jakýkoliv únik odpadních droždářských vod do veřejných recipientů vždy znamená značné porušení ochrany životního prostředí vzhledem k jejich chemickému a mikrobiologickému složení.

## 12 VÝROBA MIKROBNÍ BIOMASY BIOMASA PRO KRMNÉ A JINÉ ÚČELY

Mikrobní biomasa má sloužit v první řadě jako zdroj bílkovin, dále pak i jako bohatý zdroj biofaktorů, především vitaminů skupiny B, ergosterolu (provitaminu D<sub>2</sub>), fosfolipidů aj. Její výroba byla dříve prosazována v zemích, které nemají dostatek rostlinných bílkovin. Sojová bílkovina je však nejlevnějším materiálem a mikrobní biomasa pouze jako bílkovinný zdroj se nemůže v této konkurenci uplatnit. Budeme-li však uvažovat o komplexním využití buněk mikroorganismů, pak může být výroba ekonomicky schůdná. Produkty mohou nalézt uplatnění ve výživě, ve zdravotnictví a zbytek i pro přípravu krmiv.

**Cílem výroby** je získat produkt s vysokým obsahem žádané složky (většinou bílkovin). Kvasinky takto vyrobené lze za určitých podmínek používat jak pro krmné účely, tak pro účely lidské výživy. V druhém případě použití je třeba věnovat pozornost sterilaci media, jeho složení, dodržování aseptických podmínek, testování produkčních mikroorganismů apod. Obvykle je zařazen i stupeň úpravy vlastní biomasy (např. redukce obsahu nukleových kyselin, izolace čistých bílkovin aj.).

### 11. 1 Mikroorganismy

Klasickým mikroorganismem, který se používal pro potravinářské účely je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (pekařské droždí), jejíž biomasa se vyrábí z potravinářské suroviny standardním způsobem. Kvasniční mléko se zahustí na odparkách a potom suší v rozprašovacích sušárnách. Teplota sušení je vyšší než v případě výroby aktivního sušeného droždí a produkt není biologicky aktivní. Sušená biomasa se uplatní jako přídavek v řadě potravinářských oborů (příprava omáček, polévek, masné výrobky aj.). Pro krmivářské použití se kvasinky *Saccharomyces* využívají jen ojediněle. Vyjíměčně se můžeme setkat s výrobou krmného droždí v droždárně a to v případě, že došlo k produkci nekvalitního droždí. V tomto případě se výrobek denaturuje např. karborafinem, aby nedošlo k záměně pekařského droždí. Jako krmné kvasinky lze dobře použít odpadní kvasnice z pivovarů a lihovarů. Průmysl vyrábějící mikrobní biomasu však používá řadu rychle rostoucích mikroorganismů se širokým asimilačním spektrem. Jako nejvhodnější produkční kmeny se osvědčily kvasinkové mikroorganismy z rodu *Candida*. Z jeho jednotlivých druhů byly postupně vyšlechtěny rasy a kmeny, které se vyznačují tím, že vytvářejí v sušině biomasy minimálně 50 % hrubých bílkovin, nejsou citlivé ke kontaminaci, nemají vysoké nároky na růstové faktory a jsou schopny růst i v mediích s vyšším obsahem solí. Z druhů používaných v různých státech k výrobě krmného droždí na klasických i neklasických surovinách jsou používány především druhy: *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis* (imperfektní forma *Kluyveromyces fragilis*), *Candida robusta*, *Candida scottii*, *Candida ingens*, *Yarrowia lipolytica* (syn. *Candida lipolytica*), *Candida krusei*, *Candida mogii*, *Candida boidinii* aj. Kromě kvasinek rodu *Candida* se často používají ještě rody *Hansenula* (druhy *H. anomala*, *H. polymorfa*, *H. capsulata*), *Pichia* aj. Pro některé zvláštní případy se používají i bakterie

(např. pro výrobu biomasy ze zemního plynu byly vybrány bakterie *Methanomonas methanica*, *Pseudomonas methanica*) a některé plísně.

## 11. 2 Suroviny

Použití melasy pro výrobu mikrobiální biomasy je nyní již ojedinělé. Z "odpadu" zpracování melasy se využívají lihovarské výpalky. Hlavními surovinami jsou sulfítové výluhy, méně často hydrolyzáty dřeva, "citrolouhy" (matečné louhy po srážení citrátu vápenatého při mikrobiální výrobě citrónové kyseliny), syrovátka a jiné "odpady" z potravinářského průmyslu a zemědělství. Z chemických surovin se používaly n-alkány, ethanol, methanol, octová kyselina aj. U nás se vyrábí biomasa ze sulfítových výluhů (odpady po výrobě celulosy ze dřeva obsahující monosacharidy) a ze syntetického ethanolu.

V bývalé NDR a v bývalém SSSR byla zavedena velkovýroba biomasy z n-alkánů. Při této výrobě mohou však vzniknout komplikace jako např. ukládání některých karcinogenních látek v buňce aj. Proto byl tlak veřejnosti na vlády států tak silný, že výroba byla v dalších státech zastavena. Kromě toho je i výroba bílkoviny méně ekonomická než v případě sojové bílkoviny.

Ethanol a methanol jsou výborné substráty pro kultivaci mikroorganismů. Mohou být připraveny velmi čisté a biomasa z nich připravená snese i ta nejpřísnější kritéria. Výroba však opět není ekonomická.

Použití bakterií pro výrobu SCP (single cell proteins, tj. biomasa jednobuněčných mikroorganismů) má výhodu v tom, že bakterie rychleji rostou a rovněž i obsah bílkovin je vyšší (až 70 % hm. v sušině).

Z celkového obsahu dusíkatých látek (vyjádřený jako bílkoviny) je 70 až 80 % hm. čistých bílkovin. Kvasinky a bakterie se obecně vyznačují nižším obsahem sirných aminokyselin cystinu a methioninu ve srovnání s bílkovinami živočišného původu. Vzhledem k tomu, že se jako surovin pro výrobu mikrobiální biomasy často používají odpadní media nebo na druhé straně naopak jde o téměř chemická individua, je třeba vždy provádět optimalizaci složení media. Stejně důležité je eliminovat i inhibiční účinky substrátu, popř. látek přítomných v surovině. Mikrobiální biomasa se vyznačuje proměnlivým a dosti vysokým obsahem nukleových kyselin (především RNA). Jejich obsah je v korelaci s obsahem bílkovin a pohybuje se v rozmezí 8 až 15 % sušiny u kvasinek. S rostoucí růstovou rychlostí se tento obsah zvyšuje. Maximální denní dávka pro člověka činí 2 g nukleových kyselin, což odpovídá asi 20 g sušiny mikrobiální biomasy. Pro hodnocení krmné hodnoty biomasy se používá řada chemických metod odvozených z jejího chemického složení a biologických metod založených na posuzování vlivu strávené mikrobiální biomasy na přírůstky a zdravotní stav zvířat.

## 11. 3 Obecné technologické schéma

Biomasa se většinou vyrábí kontinuálně ve velkých objemech. Otázka regulace, měření a řízení procesu má přitom mimořádnou důležitost. Jádrem výroby je bioreaktor a jeho míchací a větrací systém. Technologické schéma je jednodušší než v případě výroby pekařského droždí. Obtížnější bývá často příprava fermentačního media (závisí na druhu suroviny).

Při výrobě mikrobiální biomasy kontinuálním způsobem odpadá příprava násadních generací, kultivace probíhá v jednom stupni a celý režim je podřízen požadavkům na výsledný produkt. Pro zlepšení stravitelnosti biomasy se provádí nejprve **termolýza** kvasinek ve formě kvasničného mléka (probíhají enzymové pochody částečně štěpící bílkoviny). Proces probíhá při teplotě kolem 70 °C. Tento materiál se dále zahušťuje na vakuové odpařovací stanici na sušinu 20 až 22 % hm. Takto zahuštěný produkt je v poslední fázi sušen v rozprašovací sušárně na koncentraci 90 až 95 % hm. sušiny.

V ČR se vyrábí kvasničná biomasa ze **sulfitových výluhů**. Ty obsahují značné množství oxidu siřičitého, který se musí odstraňovat, aby nepůsobil toxicky na mikroorganismy. Výluh částečně zbavený oxidu siřičitého se zahušťuje a neutralizuje.

V případě použití alkoholů, např. **methanolu a ethanolu** se koncentrované látky přidávají do media čerpadlem řízeným regulátorem spojeným s měřením vhodné regulované veličiny, např. koncentrace substrátu. Průtok media u kontinuálního způsobu nesmí překročit předem stanovenou hodnotu, aby nedošlo k vyplavení mikroorganismů. Z ekologického hlediska jsou důležité ty systémy, kdy se využívá recirkulace media. Zvláštní charakter má kultivace mikroorganismů na n-alkánech (kapalné uhlovodíky mají délku řetězce 8 až 18 uhlíků), které jsou ve vodném mediu nerozpustné. Značnou pozornost je třeba věnovat vznikajícím odpadním vodám a jejich likvidaci, resp. jejich využití.

### 13 VÝROBA BIOPLYNU Z ODPADŮ BIOTECHNOLOGICKÉHO PRŮMYSLU

**Anaerobní odbourání organických látek** patří mezi velmi staré procesy, které byly z počátku vedeny spontánně a teprve s rozvojem znalostí o mikroorganismech, které tvoří konsorcium v určitém odpadu, a o jejich vztazích se přistoupilo k řízenému procesu.

**Metanizace** je pouze poslední stupeň anaerobního procesu. Často je to stupeň nejpomalejší. Anaerobní odbourání může být jednak součástí čistírenského dvoustupňového procesu anebo jej můžeme vést s jiným cílem, tj. výrobou energetického produktu – bioplynu. K tomu můžeme využít např. prasečí kejdu doplněnou některými odpady z rostlinné výroby. Složení odpadů je různé :

- odpadní vody (150 – 200 l/d čl.) – odpady z městských aglomerací,
- průmyslové odpadní vody obsahují většinou hůře odbouratelné látky
- pevné odpady (150 – 400 kg/čl.rok)
- plynné odpady – těkavé látky

Mikroorganismy (mesofilní a termofilní) tvoří v přírodě směsné kultury. Mesofilní kultura často obsahuje i pathogenní mikroorganismy. Striktní požadavky na jejich odstranění - hygienizace kalu. Jednou možností je využití termofilních mikroorganismů ( do 85 °C), výhodou je řízení procesu udržováním přítoku. Výdrž při 60 °C po dobu několika hodin zajistí odstranění patogenů z konečného produktu. Potom vzniklý kal může být použit jako hnojivo. Obvykle následuje po anaerobní procesu ještě aerobní dočištění, popř. s následující oxidací (např. ozonem).

Zdroje pro anaerobiosu slouží všechny přírodní organické látky, které se díky přítomné mikroflóře degradují různou rychlostí na jednoduché a pro metanizaci důležité látky. 90 % energetické hodnoty substrátu přejde tak do methanu. Proces z hlediska metabolických drah můžeme chápat buď jako dvoustupňový nebo i třístupňový:

1. Hydrolýza biopolymérů a fermentace
2. Tvorba vodíku, aktivita obligátních vodíků syntetizujících bakterií, degradace delších řetězců organických kyselin a alkoholů
3. Methanogenní fáze: využití vodíku

70 % methanu je produkováno z methyl skupin acetátu

Při anaerobním procesu vznikne z 1 jednotky C substrátu → 0,95 jednotky C v bioplynu (CO<sub>2</sub> + CH<sub>4</sub>) + 0,05 jednotky je obsaženo v buněčném C, kdežto při aerobním procese, kdy je 1 mol glukosy degradován v aerobním systému v aktivovaném kalu při vysoké zátěži (tj. ≥ 0,6 kg/m<sup>3</sup> d) se přemění:

- ❖ 0,5 mol → CO<sub>2</sub> + voda + 19 mol ATP
- ❖ 0,5 mol → na pyruvát nebo kyseliny (+ 0,5 – 1 mol ATP), na růst

- ❖ Celkem 20 mol ATP na růst a maintenance
- ❖ Použije-li se ke stabilizaci kalu čistý kyslík, může dojít k přehřátí systému a produkuje se víc tepla.

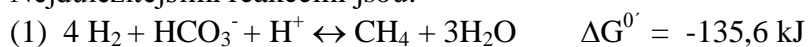
### Je-li 1 mol glukosu degradován v anaerobním systému připadá :

95 % na bioplyn, tj. 171 g a 9 g (5%) na biomasu, jen 131 kJ tepla se uvolňuje  
Hydraulická doba zdržení bývá kolem 10 dnů.

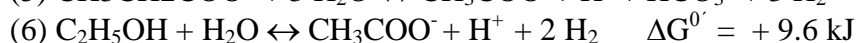
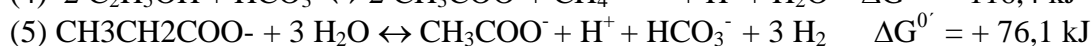
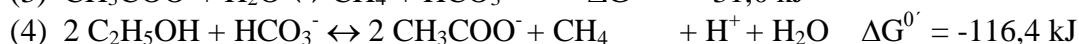
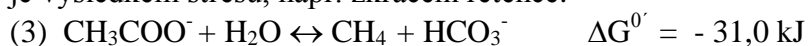
## 12.1 Methanogeny

Jsou to jedny z nejstarších mikroorganismů, které v přirozeném prostředí se podílejí na odbourání organických látek (jsou např. přítomny v anaerobní zóně kompostů). Nejdůležitějšími **rody methanobakterií** jsou: *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanogenium*, *Methanobacterium*, *Zeikusella*, *Methanospirillum*, *Clostridium*, *Plectridium*, *Methanobrevibacter*. Bezprostředním substrátem u nich bývá vodík, formát a acetát. Za nízkého parciálního tlaku vodíku vzniká víc acetátu a formiátu, méně butyrátu, ethanolu, laktátu, sukcinátu aj. Mastné kyseliny se odbourávají  $\beta$ -oxidací. **Parciální tlak vodíku je regulátorem v ekosystému anaerobního odbourávání**. Biosyntéza methanu je výsledkem vysoké metabolické součinnosti mikroorganismů všech 3 stadií. Methanogeny jsou striktně anaerobní mikroorganismy, ale začátek však patří fakultativně anaerobním mikroorganismům fermentačního typu (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*). Jako substráty přicházejí v úvahu přirozené organické látky - sacharidy, lipidy, bílkoviny. Akceptorem elektronů může být i sulfát a nitrát. Striktní anaerobní podmínky nastávají při redoxním potenciálu pod 300 mV. Methanogenní mikroorganismy vyžadují ke své činnosti určitá množství růstových faktorů k tvorbě koenzymů. To je typické pro méně vyvinuté a vývojově staré mikroorganismy.

Nejdůležitějšími reakcemi jsou:



Aby byla reakce obrácena ve prospěch methanu, je třeba udržovat nízkou hodnotu  $\text{pH}_2$ , tzn. je-li vodík dobře a rychle metabolizován methanogeny. Zvýšení  $\text{pH}_2$  vede ke změně produktů, je výsledkem stresu, např. zkrácení retence.



## 12.2 Technologické schéma

V praxi je **regulačním faktorem procesu doba zdržení (RT)**  $\text{RT} = 1/\text{D}$ . Je třeba znát minimální hodnotu RT. Nejpomalejší reakcí bývá degradace mastných kyselin. Vlastní proces probíhá v jednom nebo dvou uzavřených reaktorech (digestorech). Asi 2/3 methanu se odvozuje od acetátu a 1/3 od  $\text{CO}_2$ . V komplexním systému se tvoří formiát, když je akumulován hodně vodík. Methanol vzniká z ligninu, pektinů, methylaminu aj.

**Molekulárního vodíku** vzniká během několika stupňů anaerobní degradace (od fermentace) a musí být spotřebován methanogeny. Je třeba udržet nízký  $\text{pH}_2$  : kooperace konsorcia acetogenních,  $\text{H}_2$  – produkujících a methanogenních a  $\text{H}_2$  – využívajících bakterií je nutná. Parciální tlak vodíku  $< 10^{-5} - 10^{-6}$  MPa. Vodík zabrání  $\beta$ -oxidaci MK. Fermentativní metabolismus acidogenních bakterií je exergonický i při vyšším  $\text{pH}_2$ . Při  $\text{pH} < 6,5$  končí methanogeneze. Lignocelulosevé materiály se štěpí postupně, jejich hydrolýza je limitujícím

krokem procesu. V mechanizačním reaktoru je limitující krok obvykle  $\beta$ -oxidace MK, u dvoustupňového procesu musí být druhý reaktor proto větší.

Optimální poměr C/N pro produkci methanu 15 - 30 : 1

**Vzniklý bioplyn obsahuje:** 55 - 75 % methanu, 25 - 40 % oxidu uhličitého, 1 - 3 % vodíku, dále dusík, sulfan, čpavek.

Výhřevnost: 21 - 26 MJ/ m<sup>3</sup> (zemní plyn - 33 MJ/ m<sup>3</sup>).

1 kg biologicky rozložitelných látek poskytne kolem 0,7 - 1 m<sup>3</sup> bioplynu

Jako odpad vzniká vyhnílý kal, který je možno použít jako hnojivo. Koncovka procesu by však měla zajistit hygienizaci kalu (např. použitím termofilních aerobních mikroorganismů).

Proces je obvykle realizován jako kontinuální, vsádkový nebo přítokovaný systém. Očkovací materiál se používá v množství asi 1/5 celkového objemu.

Teplota je pro rychlost procesu důležitá.

Doba zdržení se podle zatížení a složení látek mění (při teplotě 38-40 °C) od několika dní do 3 týdnů.

Provozu vadí vyšší koncentrace těžkých kovů, ropa, oleje, pesticidy aj. Termofilní mikroorganismy zkracují RT na polovinu ( 55 - 60 °C). Po fermentaci se odděluje tuhá a kapalná fáze. Tuhá fáze se dofermentuje (kompost), kapalná jde na závlahy - aerobní dočištění. V praxi jsou methanogenní bakterie imobilizovány. Zvýšený obsah NH<sub>3</sub> nad 150 mg/L působí toxicky, stejně tak i sulfan nad 200 mg/L. 350 ml methanu představuje redukcí 1 g CHSK.

Provoz reaktorů lze zajistit buď jako **CSTR** nebo jako heterogenní systém (PFR). CSTR se používá s výhodou pro kaly do 10 % sušiny, míchání je zajištěno recirkulací kapaliny a recirkulací plynu, RT je minimálně 10 dnů (platí hlavně pro methanogeny), aktuální koncentraci sušiny je třeba držet pod 10 % , produktivita se pohybuje od 1 m<sup>3</sup>/ m<sup>3</sup>.d do 3(4) m<sup>3</sup>/ m<sup>3</sup>.d. Pro odpady o koncentraci sušina pod 1 % , nemůže methanizace dobře probíhat bez recyklu, k tomu se používají tzv. **kontraktory**, **RT je** – 0,5 až 5 dní, 2 – 4 kg/m<sup>3</sup>.den CHSK. „**Up-flow**“ **systémy jsou** založeny na dobré flokulaci bakterií (granulované MO), voda vstupuje zdola přes „flocs“ , často uměle imobilizovanými, bioplyn se jímá nad střední částí, horní část je záchytná pro vnesenou aktivní biomasu (lamely a síta na jejich zachycení), RT je 6 až 12 h. **Systémy s upoutanými mikroorganismy** pracují velmi efektivně. Používají se porézní materiály, analogie s biologickými filtry, přítok shora nebo zdola, často hrozí ucpání filtru, RT i kolem 1 dne, 10 kg/m<sup>3</sup>.d CHSK, objemy i 14000 m<sup>3</sup>.

Dále je možno použít **dvou- a vícestupňové systémy, fluidní bioreaktory a hybridní reaktory (fix-bed + UASB).**