

## BIOETANOL: SÚČASNÉ TRENDY VO VÝSKUME A V PRAXI

MARTIN ŠULÁK a DANIELA ŠMOGROVIČOVÁ

*Oddelenie biochemickej technológie Ústav biotechnológie a potravinárstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1, Slovenská republika*

*martin.sulak@stuba.sk, daniela.smogrovicova@stuba.sk*

Došlo 2.4.07, prepracované 9.7.07, prijaté 18.7.07.

Kľúčové slová: etanol, kvasinky, baktérie, biomasa

### Obsah

1. Úvod
2. Produkčné mikroorganizmy
  - 2.1. Baktérie
  - 2.2. Kvasinky
3. Substráty
  - 3.1. Substráty s vysokým obsahom škrobu
  - 3.2. Substráty s vysokým obsahom sacharózy
  - 3.3. Lignocelulóзовé materiály
4. Záver

### 1. Úvod

Etanol je produktom mikrobiálnej fermentácie, ktorý ľudstvo sprevádza už tisícky rokov. Okrem tradičného využitia v priemysle výroby alkoholických nápojov sa etanol stáva najrýchlejšie rastúcim energetickým zdrojom súčasnosti<sup>1</sup>. Jedným z dôvodov je jednoduchý fakt, že zdroje konvenčných palív sú vyčerpatelné a predpokladá sa, že v priebehu nasledujúcich rokov dôjde k stonásobeniu spotreby kvapalných palív<sup>2</sup>. Tento nárast nebude ropný priemysel schopný pokryť a hoci je pri súčasnej spotrebe ropy nereálna čo len predstava, že by tieto zdroje boli nahradené v tak krátkom čase iným palivom, je potrebné čo najskôr začať s masovou produkciou náhradných palív<sup>3</sup>. Jedným z týchto palív je aj bioetanol, čiže etanol produkovaný z biomasy a používaný ako biopalivo<sup>4</sup>. Biomasa je na rozdiel od konvenčných zdrojov fosílnych palív, zdroj obnoviteľný, a teda teoreticky nevyčerpatelný. Okrem toho, použitie palív na báze obnoviteľných zdrojov nemá negatívny vplyv na bilanciu oxidu uhličitého v atmosfére. Tento faktor nadobúda čím ďalej, tým väčšiu dôležitosť, pretože neustále stúpajúce množstvo emisií oxidu uhličitého, z pohľadu množstva najdôležitejšieho skleníkového plynu, vedú ku globálnemu otepľovaniu, ktoré sa práve v tomto čase stáva predmetom

záujmu už aj širokej verejnosti pre badateľné klimatické zmeny. Prechod z konvenčných na obnoviteľné zdroje energie je nevyhnutnosťou pre trvalo udržateľný rozvoj na Zemi.

Smernica Európskeho parlamentu a Rady č. 2003/20/ES (cit.<sup>4</sup>) z 8. mája 2003 o podpore používania biopalív alebo iných obnoviteľných zdrojov v doprave, stanovuje referenčnú hodnotu minimálneho trhového podielu biopalív na 2 % do 31. decembra 2005 a 5,75 % do 31. decembra 2010. Prvý cieľ nebol v rámci krajín Európskej únie splnený (priemerne 1,4 %), dosiahnutie druhého je zatiaľ otáznе. Jedným z biopalív uvedených v tejto smernici je práve bioetanol a v záujme splnenia záväzkov by mala jeho produkcia v najbližších rokoch aj v Slovenskej a Českej republike prudko stúpať. Pre tunajší liehovarský priemysel to znamená nové príležitosti, no súčasne bude potrebné zabezpečiť nevyhnutnú rekonštrukciu jestvujúcich zariadení a inováciu technológií, resp. nákup nových.

Hoci je bioetanol jednoznačným prínosom pre trvalo udržateľný rozvoj, zrejme nie je konečným riešením, pretože podľa kritických štúdií je výroba bioetanolu zo škrobnatých substrátov v súčasnosti energeticky nevýhodná a výroba je možná len na základe daňových úľav a štátnych dotácií. Ani kapacita zdrojov biomasy pre nahradenie fosílnych palív nie je dostatočná. Napr. USA v roku 2005 vyrobili 17 mil. m<sup>3</sup> bioetanolu z kukurice, čo predstavuje len 1 % spotreby pohonných hmôt. Na výrobu tohto množstva bioetanolu však bolo spotrebované množstvo kukurice, ktoré bolo vypestované na 18 % celkovej plochy osiatej kukuricou v USA (cit.<sup>3</sup>). Súčasným trendom je produkcia bioetanolu z lignocelulóзовých hydrolyzátov a aj keď je ich spracovanie zatiaľ energeticky veľmi náročné, intenzívny výskum a vývoj v tejto oblasti smeruje k zníženiu ekonomickej náročnosti a zvýšeniu efektivity tohto procesu.

### 2. Produkčné mikroorganizmy

Jedným z tradičných dôvodov, ktoré sa uvádzajú ako prekážka v rozvoji priemyselnej výroby bioetanolu, je nedostatok vhodných produkčných mikroorganizmov na konverziu biomasy na palivový etanol. Nedostatok mikroorganizmov súvisí s ekonomicky efektívnym využitím potenciálnych substrátov<sup>5</sup>. V súčasnosti sa bioetanol produkuje najmä zo škrobnatých substrátov a substrátov s vysokým obsahom sacharózy, kým výhľadovo je predmetom záujmu konverzia lignocelulóзовých materiálov a najmä D-xylózy<sup>6</sup>. Žiaľ, žiadny mikroorganizmus voľne sa vyskytujúci v prírode nie je schopný efektívne fermentovať zmes hexózy a pentózy na etanol. Preto sa metódami génového inžinierstva pripravujú rekombinanty schopné

efektívne konvertovať lignocelulóзовé hydrolyzáty na etanol. V zásade sú možné dve cesty, a to vloženie génov pre konverziu pentóz do natívneho hexózy fermentujúceho mikroorganizmu, ako je napr. *Zymomonas mobilis* alebo *Saccharomyces cerevisiae*. Druhou možnosťou je naopak vnášanie génov pre produkciu etanolu do organizmov schopných konvertovať široké spektrum sacharidov, napr. *Klebsiella oxytoca*, *Erwinia chrysanthemi* alebo *Escherichia coli*<sup>2</sup>. Pre špecifické vlastnosti a rôzne výhody jednotlivých typov mikroorganizmov prebieha intenzívny výskum v oblasti prípravy vhodných rekombinantných kmeňov nielen kvasiniek, ale aj baktérií<sup>7</sup>. Doposiaľ však nie je známe, či niektorý producent bude z ekonomického hľadiska natoľko zaujímavý, že zaujme miesto preferovaného produkčného mikroorganizmu v technológii výroby palivového etanolu z lignocelulóзовých hydrolyzáto. Asi viac pravdepodobným variantom bude nasadenie rôznych mikrobiálnych producentov „šitých na mieru“ podľa charakteru konkrétnej prevádzky.

Tradičným mikroorganizmom liehovarského priemyslu je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Experimenty s využitím baktérií ako napr. *Zymomonas mobilis* v potravinárskom priemysle neboli úspešné z dôvodu prítomnosti nežiaducich sírnych a hnilobných pachov a príchuť v konečných produktoch. Je však zaujímavé, že sa práve táto baktéria popri iných baktériách rodu *Lactobacillus* a *Leuconostoc* spolu s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* podieľa na vzniku „pulque“ – tradičného mexického alkoholického nápoja pripravovaného fermentáciou agávovej šťavy. S rozmachom produkcie palivového etanolu však došlo k zvýšeniu popularity bakteriálnych producentov a k zintenzívneniu výskumu v tejto oblasti<sup>1</sup>.

## 2.1. Baktérie

Baktérie majú oproti kvasinkám niektoré nesporné výhody. Ako prokaryotické organizmy sú podstatne menšie a nemajú diferencované organely. Rastú preto rýchlejšie a majú menšiu spotrebu živých látok na produkciu vlastnej biomasy, rýchlosť produkcie etanolu aj jeho výťažnosť je v porovnaní s kvasinkami vyššia. Výťažnosť etanolu  $Y_{EtOH}$  je definovaná takto:  $Y_{EtOH} = (E_k - E_0) / (S_0 - S_k)$ , pričom  $E_k$  a  $E_0$  je koncentrácia etanolu na konci, resp. na začiatku fermentácie a  $S_0$  a  $S_k$  je koncentrácia substrátu na začiatku, resp. na konci fermentácie. Napr. baktéria *Zymomonas mobilis* vykazuje troj- až päťnásobne vyššiu rýchlosť produkcie etanolu a výťažnosť až 97 % teoretického maxima vychádzajúceho zo stechiometrie reakcie oproti *Saccharomyces cerevisiae* s výťažnosťou 90–92 % (cit.<sup>1</sup>). Na druhej strane však majú baktérie výrazne nižšiu toleranciu voči etanolu, kyselinám a ostatným inhibítorm, a preto je ťažšie uchrániť systém od kontaminácie ako pri použití kvasiniek. Ďalšou hrozbou pre prevádzky využívajúce baktérie sú bakteriofágy<sup>8</sup>.

Esenciálnym faktorom pre produkciu etanolu je prítomnosť pyruvátdekarboxylázy (EC 4.1.1.1) – enzýmu, ktorý katalyzuje neoxidatívnu dekarboxyláciu pyruvátu na acetaldehyd, pričom sa uvoľňuje oxid uhličitý

a alkoholdehydrogenázy (EC 1.1.1.1), ktorá katalyzuje redukciu acetaldehydu na etanol. Pyruvátdekarboxyláza z rôznych organizmov má rôzne kinetické vlastnosti, termálnu stabilitu, a teda aj inú pôvodnú sekvenciu DNA<sup>9</sup>. Medzi baktérie produkujúce etanol, ktoré majú vlastnú pyruvátdekarboxylázu a alkoholdehydrogenázu patrí *Zymomonas mobilis*. Pre potenciálne využitie v priemysle biopalív sa ukazujú ako sľubné aj ďalšie gramnegatívne baktérie: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* a niektoré druhy rodu *Erwinia*, ktoré majú prirodzenú schopnosť využívať široké spektrum sacharidov, no nemajú vlastné enzýmy pre biosyntézu etanolu. Produkčné kmene týchto druhov sa pripravujú metódami génového inžinierstva vložением tzv. PET (portable ethanol production cassette) operónu<sup>10</sup>. Počíta sa aj s využitím termofilných baktérií, no momentálne je metabolické inžinierstvo v tejto oblasti ešte len v začiatkoch a s väčším rozvojom sa počíta až v budúcnosti<sup>5</sup>. Medzi prvé úspešné experimenty v tejto oblasti patrí príprava rekombinantného kmeňa druhu *Bacillus megaterium*, pričom bol obohatený o gény kódujúce pyruvátdekarboxylázu z baktérie *Sarcina ventriculi* a alkoholdehydrogenázu z *Geobacillus stearothermophilus*<sup>9</sup>. Ďalším z potenciálne perspektívnych bakteriálnych producentov etanolu, ktorý je predmetom súčasného výskumu, je aj obligátne anaeróbna baktéria *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, ktorú sa metódami génového inžinierstva podarilo upraviť na efektívny etanol produkujúci mikroorganizmus<sup>11</sup>.

*Zymomonas mobilis* je fakultatívne anaeróbna gramnegatívna palička, popísaná mikrobiológom Lindnerom v roku 1928 (preto je známa aj pod názvom *Zymomonas lindneri* resp. *Pseudomonas lindneri*). Vyznačuje sa medzi baktériami dosť unikátnou vlastnosťou, ktorou je tolerancia relatívne vysokých koncentrácií etanolu. Na rozdiel od kvasiniek však *Zymomonas mobilis* konvertuje glukózu na etanol Entner-Doudoroffovou metabolickou dráhou. Vzhľadom na energetický výťažok len 1 mol ATP z jedného molu glukózy z tejto metabolickej dráhy, je nárast bunkovej hmoty malý a produkčná rýchlosť vysoká. Z toho vyplýva vysoká výťažnosť etanolu<sup>1</sup>. Prekážkou širšieho rozšírenia tejto baktérie najmä pre výrobu bioetanolu z biomasy je výrazne obmedzené spektrum fermentovateľných sacharidov. *Zymomonas mobilis* skvasuje len glukózu, fruktózu a sacharózu. Pri fermentácii sacharózy sa však môže fruktóza hromadiť v médiu alebo dochádza k tvorbe levánu, čo vedie k zníženiu výťažnosti etanolu. Boli pripravené rekombinanty s vloženými génmi pre konverziu xylózy z *Escherichia coli* (1995), no efektívnosť tejto konverzie sa doposiaľ nepodarilo zvýšiť na úroveň, ktorá by bola z ekonomického hľadiska akceptovateľná<sup>11</sup>. *Zymomonas mobilis* vstupuje na súčasnú scénu priemyselnej výroby etanolu spolu so zverejnením kompletne osekvenovaného genómu (2 056 416 bp). Genóm *Zymomonas mobilis* priniesol vysvetlenie mnohých vlastností, ktoré táto baktéria vykazuje. Neprítomnosť väčšiny enzýmov pentóza-fosfátového cyklu, 6-fosfofruktokinázy (EC 2.7.1.11) a ďalších dvoch enzýmov cyklu trikarboxylových kyselín síce nezasahuje do biosyntézy aminokyselín, no výrazne

limituje využívanie iných sacharidov a získavanie energie respiráciou<sup>12</sup>. Tieto poznatky vytvárajú nové možnosti pre génových inžinierov na prípravu kmeňov, ktoré budú schopné okrem glukózy dostatočne efektívne fermentovať aj D-xylózu (ďalej len xylóza) a L-arabínózu (ďalej len arabínóza) prítomnú v lignocelulóзовých hydrolyzátoch, ktoré majú veľký potenciál pre využitie v priemysle výroby bioetanolu v blízkej budúcnosti.

*Escherichia coli* je fakultatívne anaeróbná gramnegatívna paličkovitá baktéria tvoriaca čiastočne kokoidné paličky a systematicky je zaradená do čeľade *Enterobacteriaceae*. Prirodzene sa vyskytuje v ľudskom a zvieracom tráviacom trakte. Sekundárne sa nachádza aj vo vonkajšom prostredí, pričom sa využíva ako indikátor fekálneho znečistenia. Väčšinou sa správa saprofyticko, no je potenciálnym patogénom spôsobujúcim črevné ochorenia najmä u ľudí s oslabenou imunitou<sup>13</sup>. Vzhľadom na to, že *Escherichia coli* nie je obligátnou etanol produkujúcou baktériou, bolo potrebné tieto vlastnosti dodať metódami génového inžinierstva. Prvé rekombinantné kmene *Escherichia coli* boli pripravené už v osemdesiatych rokoch minulého storočia. Napr. v roku 1987 pripravili Ingram a spol.<sup>14</sup> rekombinantný kmeň *Escherichia coli* vnesením PET operónu s génmi pyruvátdekarboxylázy (EC 4.1.1.1) s veľkosťou 1,7 kbp a génom alkoholdehydrogenázy II (EC 1.1.1.1) – 1,1 kbp z baktérie *Zymomonas mobilis*. Tieto prvé kmene však mali nízku efektívnosť konverzie a navyše neboli geneticky stabilné, pretože bunky sa inkorporovaného plazmidu zbavovali a s ním strácali aj želané vlastnosti. V roku 1991 bol pripravený kmeň KO11, ktorý má plazmid integrovaný do chromozómu a je teda dostatočne geneticky stabilný. Tento kmeň produkuje etanol zo všetkých hemicelulóзовých sacharidov s výťažnosťou viac ako 95 % teoretického maxima<sup>15</sup>. V súčasnosti sa pracuje na ekonomickej optimalizácii kultivačného média pre tento kmeň a na zvýšení jeho tolerancie voči inhibičným vplyvom. *Escherichia coli* má množstvo vlastností, ktoré z nej robia skutočne výhodný mikroorganizmus pre využitie v priemyselnej výrobe bioetanolu. Patrí medzi ne široké spektrum využiteľných sacharidov, prakticky žiadne nároky na komplexné rastové faktory a množstvo poznatkov a skúseností z už prebiehajúcich priemyselných výrobných využívaných rekombinantné kmene tohto druhu. Medzi hlavné nevýhody použitia patrí úzke spektrum optimálneho pH (6,0–8,0), menšia robustnosť bakteriálnych buniek v porovnaní s kvasinkami a možný odpor verejnosti voči prevádzkam vzhľadom na potenciálnu patogenitu<sup>5</sup>.

Aj *Klebsiella oxytoca* je fakultatívne anaeróbná gramnegatívna paličkovitá enterobaktéria, ktorá sa prirodzene vyskytuje v črevnom trakte ľudí a zvierat<sup>13</sup>, v odpadových vodách z výroby papiera a buničiny a v okolí iných zdrojov drevnej hmoty. Je schopná rásť pri pH do hodnoty 5,0 a teplotách až 35 °C na širokom spektre pentóz a hexóz, aj na celobióze a celotrióze. Práve tieto vlastnosti z nej robia druh zaujímavý pre fermentácie na lignocelulóзовých hydrolyzátoch<sup>5</sup>. V roku 1991 Ohta a spol.<sup>16</sup> pripravili rekombinantný kmeň M5A1 vnesením PET operónu s génmi *Zymomonas mobilis*, pričom dosiahli výťažnosť

etanolu 94–98 %. Rýchlosť premeny xylózy na etanol je rovnaká ako glukózy (2 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> v prvých 24 h) a oproti *Escherichia coli* KO11 je dvojnásobná. Neskôr došlo ku genetickej stabilizácii kmeňa inkorporáciou vektora do chromozómu, no zároveň aj k zníženiu produkčných charakteristík kmeňa. Selekciami transformantov sa izoloval mutant *Klebsiella oxytoca* P2, ktorý vykazuje produkciu 44–45 g l<sup>-1</sup> etanolu zo 100 g l<sup>-1</sup> glukózy alebo celobiózy v priebehu 48 hodín, čo je na úrovni pôvodného kmeňa M5A1. Tento kmeň je schopný produkovať etanol okrem tradičných substrátov aj z kaše pripravenej rozomletím kancelárskeho papiera s vodou. Cieľom génových inžinierov je pripraviť variant kmeňa P2 s vlastným celulytickým aparátom v snahe znížiť náklady na prípravu substrátu pred vlastnou fermentáciou. V roku 2000 bol pripravený kmeň SZ21 vnesením génov pre extracelulárne endoglukanázy do chromozómovej DNA kmeňa P2 z baktérie *Erwinia chrysanthemi*, no produkovaná celulóзовá aktivita bola len na úrovni 1 % vyžadovanej aktivity dosahovanej prídavkom komerčných celulytických preparátov<sup>5</sup>.

Rod *Erwinia* takisto patrí medzi enterobaktérie. Druhy tohto rodu sa vyskytujú na rastlinách, kde pôsobia ako patogény spôsobujúce blokádu vodného systému. Majú schopnosť štiepiť pektín<sup>13</sup>. Niektoré kmene druhov *Erwinia chrysanthemi* a *Erwinia carotovora* boli predmetom záujmu pre svoju prirodzenú schopnosť metabolizovať celobiózu a väčšinu sacharidov vzniknutých rozkladom hemicelulózy a vysokú rýchlosť premeny substrátu na etanol (až 2 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Aj v tomto prípade boli pripravené rekombinanty s PET operónom. Tieto druhy disponujú endoglukanázou (EC 3.2.1.4), pektátlyázou (EC 4.2.2.2) a komplexom hemicelulolytických enzýmov, ktoré umožňujú rásť na väčšom množstve substrátov, bez nákladnej enzymatickej predúpravy<sup>15</sup>.

## 2.2. Kvasinky

Kvasinky ako eukaryotické organizmy s diferencovanými organelami pomalšie rastú a majú teda nižšiu produkčnú rýchlosť a nižší stupeň konverzie substrátu na etanol. No ich väčšie a robustnejšie bunky, hrubšie bunkové steny, rast pri nízkom pH, menšie nároky na živiny a väčšia odolnosť voči kontaminácii a inhibítorom im dávajú výhodné postavenie pri komerčnom využití v kvasnom priemysle<sup>7</sup>. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je tradičným mikroorganizmom výroby alkoholických nápojov a ako taká je najpreskúmanejšou kvasinkou vôbec. Preto je aj modelovým jednobunkovým eukaryotickým organizmom v základnom výskume. Súčasný trend smerujúci k produkcii palivového etanolu z lignocelulóзовých materiálov vyžadujú schopnosť produkčného mikroorganizmu efektívne skvasovať xylózu a arabínózu vznikajúcu rozkladom hemicelulózy. *Saccharomyces cerevisiae* však prirodzene neskvásovať pentózy, preto je príprava kmeňov s týmito vlastnosťami predmetom génového inžinierstva. Medzi najlepšie kvasinky fermentujúce xylózu priamo na etanol, patria kmene druhov *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* a *Pachysolen*

*tannophilus*<sup>17</sup>, avšak tieto kvasinky majú limitovanú toleranciu voči etanolu a inhibítorom vznikajúcim pri predúprave substrátu a vyžadujú prísne dodržiavanú kontrolovanú aeráciu, preto sa vhodnejším riešením ukazuje príprava a následné použitie rekombinantných kmeňov *Saccharomyces cerevisiae*<sup>18</sup>. Ako zdroj genetického materiálu pre tento účel sa uplatňuje najmä *Pichia stipitis*, ktorá produkuje etanol z glukózy, galaktózy, manózy, xylózy a celobiózy. Dosahuje vysoké výťažky etanolu a v bunkách akumuluje len malé množstvo xylitolu<sup>19</sup>. Za zmienku stoja aj kvasinky skvasujúce laktózu, ako sú *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*, *Kluyveromyces fragilis* a *Candida curvata*, ktoré by mohli byť potenciálne využité pre produkciu etanolu zo srvátky, ktorá je odpadovým produktom mliekarenských výrobov.

*Saccharomyces cerevisiae* je zástupca rádu *Endomycetales*. Rozmnožuje sa vegetatívne multilaterálnym pučaním, pričom netvorí pravé mycélium a generatívne vytváraním askov. Fermentuje glukózu, galaktózu, sacharózu, maltózu a rafinózu (liehovarské kmene skvasujú rafinózu iba do jednej tretiny, disacharid melibióza sa hromadí v médiu). Neasimiluje dusičnanový dusík a laktózu. Tvar buniek je guľovitý až oválny, rozmer 6–7 µm × 7,5–8,5 µm (cit.<sup>13</sup>). Ako už bolo spomenuté, postavenie tejto kvasinky je v priemysle výroby konzumného etanolu a alkoholických nápojov neotrasiteľné, podobne aj pri výrobe palivového etanolu zo škrobových hydrolyzátoov a sacharózy je tento producent preferovaný, no na príprave vhodných kmeňov pre masívne nasadenie v produkcii etanolu z biomasy sa stále pracuje. Príprava optimálneho rekombinantného kmeňa druhu *Saccharomyces cerevisiae* pre efektívnu fermentáciu lignocelulózových hydrolyzátoov zahŕňa množstvo faktorov. Prvým z nich je vlastná inicializácia metabolickej dráhy pre asimiláciu xylózy a arabinózy. Preto je potrebné do buniek vniesť gény kódujúce enzýmy umožňujúce vstup týchto sacharidov do pentózového cyklu, ktorý sa uskutočňuje prostredníctvom xylulóza-5-fosfátu. Túto premenu zabezpečuje bakteriálna xylózaizomeráza (EC 5.3.1.5), katalyzujúca premenu D-xylózy na D-xylulózu, alebo kvasničné enzýmy xylózareduktáza (EC 1.1.1.21) a xylitoldehydrogenáza (EC 1.1.1.9), ktoré zabezpečujú tú istú konverziu avšak cez medziprodukt xylitol. D-Xylulóza je následne aktivovaná xylulokinázou (EC 2.7.1.17) na D-xylulóza-5-fosfát. Premena L-arabinózy sa uskutočňuje trojkrokovým prostredníctvom bakteriálnej L-arabinózaizomerázy (EC 5.3.1.4), pričom vzniká L-ribulóza, ktorá sa ribulózakinázou (EC 2.7.1.16) fosforyluje na L-ribulóza-5-fosfát. Ten sa v treťom kroku účinkom enzýmu L-ribulóza-5-fosfát-4-epimerázy (EC 5.1.3.4) konvertuje na konečný D-xylulóza-5-fosfát. Vzhľadom na to, že prvé rekombinanty s bakteriálnou xylózaizomerázou (EC 5.3.1.5) sa neosvedčili<sup>17</sup>, bol pripravený rekombinantný kmeň, do ktorého boli vložené gény pre xylózareduktázu (EC 1.1.1.21) a xylitoldehydrogenázu (EC 1.1.1.9) z kvasinky *Pichia stipitis*. Tento kmeň však vykazoval veľmi nízke hodnoty rastu a fermentácie na xylóze a takmer vôbec ju neasimiloval v prítomnosti glukózy. Zistilo sa, že je to zapríčinené vyš-

šou afinitou xylózareduktázy (EC 1.1.1.21) pre NADPH ako pre NADH, kým v ďalšom kroku xylitoldehydrogenáza (EC 1.1.1.9) vyžaduje výlučne NAD<sup>+</sup>. To vedie k nadmernej akumulácii NADPH, ktorý v anaeróbných podmienkach bunka nedokáže recyklovať. V štandardných podmienkach sa nadbytok NADPH kompenzuje tvorbou glycerolu, no pre rast na xylóze je uvedený mechanizmus nedostačujúci a dochádza k nadmernému hromadeniu xylitolu. Tento negatívny jav je možné potlačiť riadeným prevzdušňovaním, no bol už pripravený aj mutantný kmeň, ktorý vykazuje vyššiu afinitu xylózareduktázy pre NADH ako pôvodný<sup>16</sup>. Druhou príčinou je fakt, že *Saccharomyces cerevisiae* nemá špecifický transportný mechanizmus pre xylózu. Jej vstup do kvasničnej bunky sa uskutočňuje uľahčenou difúziou cez nešpecifický glukózový transportér, no jeho afinita pre xylózu je veľmi nízka. Preto boli pripravené kmene s mechanizmom uľahčenej difúzie, s využitím transportných proteínov z *Debaryomyces hansenii* a neskôr aj z *Candida intermedia*. Rekombinanty s vloženou xylózaizomerázou (EC 5.3.1.5) z anaeróbných húb rodu *Piromyces* a v druhom prípade z baktérie *Thermus thermophilus*, ktoré sú výsledkom nedávnych experimentov, vykazujú zaujímavé hodnoty produkcie etanolu v anaeróbných podmienkach<sup>16</sup>. Z hľadiska zlepšenia ekonomiky prevádzky sú zaujímavé a konkurenčne výhodné kmene, ktoré majú schopnosť skvasovať súčasne xylózu aj arabinózu. Je pravda, že obsah xylózy v lignocelulózových hydrolyzátooch je vyšší ako obsah arabinózy, avšak napr. kým v slame je priemerný obsah arabinózy len 3 % a v kukuričných šúľkoch 5 % a xylózy 16 % a 19 %, tak v prípade pšeničných otrúb to môže byť až 15 % arabinózy a 19 % xylózy. Prvý takýto rekombinant pripravili len nedávno v roku 2006 Karhumaa a spol.<sup>20</sup> Pri jeho príprave využili bakteriálnu metabolickú cestu pre arabinózu a gény pre xylózareduktázu (EC 1.1.1.21) a xylitoldehydrogenázu (EC 1.1.1.9) z *Pichia stipitis*. Rekombinant síce fermentoval obidve pentózy, no väčšina arabinózy sa konvertovala na arabitól, ktorý sa v bunkách akumuloval.

### 3. Substráty

Pre produkciu etanolu sa používajú rôzne substráty v závislosti od toho, na aké účely bude vyrobený etanol použitý. Kvalita vstupnej suroviny pre potravinársky priemysel musí samozrejme spĺňať iné kritériá ako substráty pre palivový etanol. Avšak náklady na substrát pre produkciu palivového etanolu tvoria asi tretinu celkových nákladov, preto je potrebné zosúladiť vstupný substrát s produkčným mikroorganizmom tak, aby boli výťažky etanolu maximálne, čo predpokladá maximálne využitie zložiek substrátu pri minimálnej produkcii vedľajších produktov<sup>5</sup>. Voľba substrátu výrazne závisí od použitého produkčného mikroorganizmu, pričom vo všeobecnosti platí, že pre bežné kmene kvasiniek sa používajú najmä substráty s obsahom sacharózy a jednoduchých hexóz. Tieto substráty sú zvyčajne produktom hydrolýzy škrobnatých substrátov, alebo medziprodukty a odpadové produk-

ty z výroby cukru. V súčasnosti drvivá väčšina komerčných liehovarov produkujúcich palivový etanol používa ako surovinu práve takéto substráty a *Saccharomyces cerevisiae* ako produkčný mikroorganizmus<sup>6</sup>. Najväčším svetovým producentom bioetanolu z kukurice sú USA, kým vo využití sacharózových substrátov pre tento účel je na čele Brazília<sup>2</sup>.

Fermentačný proces v liehovare môže prebiehať vsádzkovo alebo kontinuálne. Hoci má kontinuálny proces svoje prednosti, v súčasnosti je viac rozšírená vsádzková fermentácia<sup>21,22</sup>. Na rozdiel od produkcie alkoholických nápojov a konzumného etanolu nepracujú výrobné zariadenia na výrobu etanolu pre palivové účely v takých podmienkach, v ktorých by bolo možné dodržať sterilitu vo všetkých výrobných krokoch. Pri výrobe sa s chronickými kontamináciami počíta a sú tolerované. Veľkým problémom sú však akútne kontaminácie, kedy dochádza k prerasteniu produkčného mikroorganizmu a dochádza k významným ekonomickým stratám spojených s odstávkou výroby. Medzi najrozšírenejšie bakteriálne kontaminanty patria druhy rodu *Lactobacillus*<sup>23</sup>.

### 3.1. Substráty s vysokým obsahom škrobu

Škrob je zásobný homopolysacharid zložený z  $\alpha$ -1,4- a  $\alpha$ -1,6- rozvetvených reťazcov molekúl glukózy pospájaných glykozidovými väzbami. Hlavnou surovinou s vysokým obsahom škrobu pre liehovarský priemysel je najmä zásluhou USA kukurica, ďalej sú to ostatné obilniny a zemiaky. V USA sa palivový etanol z kukurice sietej (*Zea mays*) vyrába už od počiatku 20. storočia. Už vtedy Fordova automobilka vyrábala vozidlá (Ford Model T), ktoré boli schopné jazdiť popri benzíne aj na farmármi produkovaný etanol. Kukuričné zrná obsahujú 70–72 % škrobu v sušine a použitím moderných technológií sa dosahuje výťažok až 300 litrov bioetanolu z 1 m<sup>3</sup> suchej kukurice. V roku 2004 bolo v USA v prevádzke 76 liehovarov s celkovou kapacitou viac ako 11·10<sup>9</sup> litrov kukuričného bioetanolu. Predpokladá sa, že v dôsledku zvýšeného dopytu sa do roku 2012 produkcia zdvojnásobí<sup>22</sup>.

Úprava škrobnatých substrátov pred fermentáciou je dostatočne prepracovaný proces zahŕňajúci enzymatické stekutenie a sacharifikáciu, pričom vzniká relatívne čisté fermentačné médium s vysokým obsahom glukózy. Takto pripravené médium je vhodné na produkciu etanolu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. V poslednom období došlo k výraznému zlepšeniu ekonomiky a efektivity výroby bioetanolu z týchto substrátov, napr. prípravou enzýmov, ktoré nevyžadujú tepelnú úpravu suroviny pred aplikáciou alebo použitím  $\alpha$ -amyláz s optimom v nízkej oblasti pH (cit.<sup>6</sup>). Pri výrobe bioetanolu z kukurice sú najrozšírenejšie dva spôsoby: suchý a mokrý. Pre ekonomiku obidvoch procesov je extrémne dôležité využitie odpadových produktov vznikajúcich pri príprave suroviny. Kukurica je relatívne drahá surovina, no obsahuje množstvo cenných výživových látok, a preto sú všetky vedľajšie produkty

využiteľné ako kvalitné krmoviny. Kým suchý proces je optimalizovaný na najnižšie možné náklady na liter vyrobeného bioetanolu a rýchlu návratnosť investície, mokrý proces je investične aj energeticky náročnejší, no takáto „biorafinéria“ využívajúca túto technológiu produkuje popri palivovom etanole aj množstvo iných hodnotných látok. V suchom procese vznikajú suché liehovarské výpalky, vedľajším produktom mokrého procesu je kukuričný olej a preparáty s vysokým obsahom kukuričného lepku. Ekonomika prevádzky sa vylepšuje spracovaním oxidu uhličitého, ktorý vzniká v priebehu fermentačného procesu, pre využitie v nápojovom priemysle alebo na výrobu suchého ľadu. Prvým krokom suchého procesu je zošrotovanie suroviny na hrubú múku, ktorá sa následne rozmieša vo vode a pH suspenzie sa upraví na hodnotu 6,0. Pri teplote 80–90 °C dochádza v priebehu najmenej 30 min k enzymatickému stekuteniu škrobu jeho rozložením na dextríny účinkom pridanej termostabilnej  $\alpha$ -amylázy (EC 3.2.1.1). Zmes sa ochladí a po úprave pH na hodnotu 4,5 sa prítomné dextríny prídavkom glukoamylázy (EC 3.2.1.3) rozložia až na glukózu. Glukoamyláza sa pridáva v takom množstve, aby k scukorneniu dochádzalo postupne v priebehu fermentačného procesu, no tak, aby nedošlo k negatívnemu ovplyvneniu špecifickej rýchlosti tvorby etanolu. Potom sa zápara prečerpá do fermentačných tanokov a zakvasí sa. Častý je prídavok amónnych solí alebo močoviny ako zdroja dusíka, prípadne je možné pri príprave zápary pridať proteolytické enzýmy, ktoré zabezpečia dostatok dusíka rozkladom kukuričných bielkovín. Štandardná fermentácia trvá 48–72 hodín a konečná koncentrácia etanolu sa dosahuje na úrovni 10–12 obj.%. Z prekvasenej zápary sa oddestiluje etanol a azeotropickou destiláciou alebo použitím molekulových sít sa oddelí zvyšná voda a v ďalšom kroku sa denaturuje. Mokrý proces je adaptáciou procesov z výroby škrobu. Do procesu prípravy suroviny sú integrované kroky namáčania suroviny, separácie klíčkov a extrakcie klíčkového oleja, izolácie gluténu, prípadne aj separácia škrobu. Pri použití pšenice sa najprv suchým spôsobom oddelia otruby a klíčky, až potom nasleduje namáčanie. Zvyšky po izolácii hodnotných vedľajších produktov vstupujú do procesu predúpravy oxidom siričitým, potom nasleduje enzymatické stekutenie a scukornenie škrobu podobne ako v suchom procese<sup>22</sup>.

### 3.2. Substráty s vysokým obsahom sacharózy

Sacharóza [ $\alpha$ -D-glukopyranozyl-(1→2)- $\beta$ -D-fruktofuranóza], je kvasinkami priamo kvasiteľná, a teda v procese prípravy zápary nie je potrebný krok hydrolyzy substrátu na zmes jednoduchých sacharidov. Najviac palivového etanolu zo sacharózy sa vyprodukuje v Brazílii, kde bol už v roku 1975 spustený program s názvom ProAlcool, čo bol prvý veľký projekt na výrobu bioetanolu na svete. Ako surovina sa používa sirup z cukrovej trstiny a melasa<sup>21</sup>, kým v Európe je zdrojom týchto substrátov cukrová repa a odpady z výroby repného cukru.

V súčasnosti viac ako polovica na svete vyprodukovaného palivového etanolu pochádza zo sacharózy<sup>24</sup>. Vzhľadom na klimatické a ekonomické podmienky v Brazílii je táto krajina najväčším producentom palivového etanolu z cukrovej trstiny na svete. Cukrová trstina (*Saccharum officinarum*) obsahuje 12–17 % sacharidov v biomase, pričom asi 90 % tvorí sacharóza a zvyšok zmes glukózy a fruktózy. Priemerná efektívna extrakcie sacharidov po rozdrvení v procese prípravy záparsy dosahuje 95 %. V liehovaroch, ktoré produkujú len etanol, sa takto pripravený cukrový sirup zahreje na 110 °C, čím sa eliminuje mikrobiálna kontaminácia, v niektorých prípadoch sa ešte odparovaním koncentruje a následne fermentuje. V prípade kombinovaných cukro-liehovarov, sa najprv cukorný roztok zahusťuje, po ochladení sa odstredia vylúčené kryštály sacharózy a takto získaný matečný lúh s obsahom až 65 % rozpustených sacharidov (melasa) je vstupom do výroby etanolu. Aj cukrový sirup aj melasa zvyčajne obsahujú dostatok minerálnych látok a živín pre priamu fermentáciu klasickými liehovarskými kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*. Po ukončení fermentácie sa etanol oddestiluje a finalizuje obdobne ako pri výrobe zo škrobu. Vedľajším produktom pri výrobe etanolu z cukrovej trstiny je bagassa, čo je trstinová vlákna po extrakcii cukrovej zložky a liehovarské výpalky v objeme 10 až 15-násobku vyprodukovaného etanolu, ktoré sú využiteľné v poľnohospodárstve na hnojenie<sup>21</sup>. Technológia výroby etanolu z cukru je na pomerne dobrej úrovni, možnosti zefektívnenia sa ukazujú v použití tzv. VHG (Very High Gravity) technológií, tzn. technológií, pri ktorých sa fermentujú vysoko koncentrované substráty, a následných energetických úsporách. Najnovšie trendy na druhej strane smerujú k príprave rekombinantných kultivarov cukrovej trstiny, v ktorých by vďaka prítomnosti príslušnej izomerázy dochádzalo ku konverzii sacharózy na rastlinou neutilizovateľný sacharid izomaltulózu a k jeho následnej akumulácii. Takto by bolo možné dosiahnuť až zdvojnásobenie celkového obsahu sacharidov v sirupe z pozbieranej úrody cukrovej trstiny<sup>24</sup>.

### 3.3. Lignocelulózové materiály

Na rozdiel od vyššie uvedených substrátov je zloženie biomasy ako substrátu pre produkciu bioetanolu výrazne rozdielne. Podstatnú zložku tvorí celulóza (40–50 %), nasleduje hemicelulóza (20–25 %) a lignín (15–20 %). Okrem toho obsahuje malé množstvo minerálnych látok, tukov, rozpustných sacharidov a ostatných látok<sup>25</sup>. Lacným a potenciálne zaujímavým zdrojom lignocelulózy je slama, kukuričné šúľky, bagassa, mäkké drevo či použitý kancelársky papier s obsahom 60–80 % sacharidovej zložky v sušine<sup>26</sup>.

Celulóza je štruktúrny polysacharid tvorený exkluzívne reťazcami molekúl glukózy pospájanými  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykozidovými väzbami. Hoci má celulóza rovnaké chemické zloženie ako škrob, vzhľadom na rozdielne väzby medzi molekulami glukózy je jej štruktúra rozdielna, glukozové reťazce sú pevne späté, vytvárajúc vysoko kryšta-

lickú a kompaktnú látku. Celulóza je vo vode nerozpustná a je výrazne odolná voči depolymerizácii. Hemicelulóza sa na celulózové mikrofibrily viaže vodíkovými väzbami, pričom vzniká sieť, ktorá je základom bunkovej steny rastlinných buniek. Molekuly hemicelulózy majú xylánovú resp. glukánovú kostru s množstvom postranných reťazcov substituovaných rôznymi minoritnými sacharidmi, napr. manózou, fukózou, arabinózou, galaktózou, kyselinou glukurónovou apod. Stupeň vetvenia a zastúpenie jednotlivých sacharidov je závislé na rastline, z ktorej daný materiál pochádza. Prítomnosť lignínu zvyšuje pevnosť bunkovej steny a zvyšuje odolnosť bunky voči chorobám a škodcom<sup>26</sup>. Lignín sa kovalentne viaže na postranné reťazce hemicelulózy esterovými väzbami cez kyselinu ferulovú. Lignocelulóza je kompaktný materiál, ktorý svojou komplexnosťou a odolnosťou výrazne zvyšuje náklady na hydrolýzu v porovnaní so škrobom. To je dôvod, prečo je v súčasnosti bioetanol z biomasy stále drahší, ako etanol pripravený zo škrobu<sup>6</sup>. Prvým štádiom celého procesu je predúprava vstupnej suroviny, cieľom ktorej je rozrušenie lignínu a uvoľnenie kryštalickej štruktúry celulózy pre rýchlejšiu hydrolýzu a s tým súvisiace efektívnejšie využitie celulólytických enzýmov. Predúprava je z pohľadu ekonomiky jeden z najdrahších článkov celého výrobného procesu<sup>26</sup>. V tejto fáze sa používajú rôzne chemické látky, veľmi kyslé až veľmi alkalické prostredie s rôznym konečným efektom na surovinu. Účinok termochemickej predúpravy sa prejavuje nielen na cieľovej cukrovej zložke lignocelulózy, ale vznikajú aj látky nežiaduce s potenciálnym inhibičným vplyvom na produkčné mikroorganizmy, napr. vznik furfuralov v kyslom prostredí a ferulátov a acetátov v prostredí zásaditom<sup>6</sup>. Nasleduje vlastná hydrolýza, pri ktorej sa celulóza štiepi na jednotlivé molekuly glukózy, a to buď enzymaticky použitím celulózového preparátu, alebo chemickou cestou účinkom sírovej alebo inej kyseliny. Súčasne dochádza aj k rozkladu hemicelulózy na zmes štruktúrnych monosacharidov. Hydrolýzou získaná zmes sacharidov je následne fermentovaná a posledným krokom je izolácia etanolu z média, ktorá sa realizuje destiláciou, príp. kombináciou destilácie a adsorpcie<sup>26</sup>. Pred samotnú fermentáciu sa často zaraďuje ešte proces detoxikácie inhibitorov vznikajúcich v procese predúpravy a hydrolýzy, ako sú slabé organické kyseliny, deriváty furánu a fenolické látky. Tento krok sa realizuje použitím chemických činidiel, ako je vápno, alebo fyzikálnymi metódami, napr. iónová výmena a zefektívňuje fermentačný proces. Na druhej strane však zvyšuje náklady prevádzky. V prípade kvasiniek je možná aj *in situ* biologická detoxikácia inhibitorov, pri ktorej sa nadexpresiou génu pre alkoholdehydrogenázu (EC 1.1.1.1) dosahuje redukcia prítomných inhibičných karbonylových zlúčenín na príslušné alkoholy<sup>11</sup>.

Hydrolýza substrátu v samostatnom kroku pred vlastným zakvasením záparsy sa nazýva oddelená hydrolýza a fermentácia (Separate Hydrolysis and Fermentation – SHF). Spojením týchto dvoch krokov, tzn. hydrolýzou celulózy v prítomnosti fermentujúceho mikroorganizmu dochádza k tzv. simultánnej sacharifikácii a fermentácii

(Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF). Ak prebieha hydrolyza celulózy aj hemicelulózy súčasne s kofermentáciou glukózy a pentózy vo fermentačnej zmesi v jednom kroku, ide o simultánnu sacharifikáciu a kofermentáciu (Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation – SSCF). SSF a SSCF znižujú prevádzkové náklady, pretože obidva kroky prebiehajú súčasne a nie sú potrebné dva fermentačné tanky<sup>26</sup>. V prípade SSF a SSCF je možné ušetriť čas hydrolyzy aj množstvo hydrolytických enzýmov, pretože v dôsledku simultánnej fermentácie vznikajúcich produktov hydrolyzy nedochádza k inhibícii celulóзовých preparátov, ktoré sú vznikajúcou glukózou a celobiózou spätnoväzobne inhibované. Táto výhoda sa pravdaže výraznejšie prejavuje pri použití mikroorganizmov schopných priamo fermentovať celobiózu<sup>5</sup>. Do budúcnosti sa predpokladá integrácia všetkých krokov do jedného, ktorý si bude vyžadovať len jeden reaktor s použitím jedného alebo zmesi mikroorganizmov vybavených príslušným enzymatickým aparátom na hydrolyzu a fermentáciu substrátu. Pre tento koncept bol zvolený názov „konsolidovaná bioprodukcia“ – CBP (Consolidated BioProcessing). Zatiaľ preň neexistujú vyhovujúce mikroorganizmy, no z dôvodu vysokého ekonomického prínosu takejto integrácie je výskum mikrobiálnych producentov orientovaný týmto smerom<sup>11</sup>.

#### 4. Záver

V súčasnosti je technológia výroby bioetanolu zo substrátov s vysokým obsahom sacharózy a škrobu dobre zvládnutá a bioetanol na palivové účely produkujú stovky takýchto prevádzok po celom svete. Výroba bioetanolu z lignocelulóзовých hydrolyzátoov je naproti tomu ešte len v začiatkoch a prevádzok využívajúcich túto technológiu je zatiaľ len niekoľko. Medzi prvé lastovičky patrí kanadská spoločnosť Iogen Corporation<sup>27</sup> a švédská spoločnosť SEKAB<sup>28</sup>. Pre väčšie rozšírenie výroby bioetanolu z biomasy je potrebné najmä znížiť náklady na úpravu substrátu, tzn. znížiť cenu a zvýšiť efektívnosť procesov predúpravy<sup>26</sup>. Jednou z ciest je napr. využitie geneticky modifikovaných rastlín s disrupciou v géne syntézy lignínu, ktoré majú znížený obsah lignínu v biomase<sup>2</sup>, ale aj zníženie ceny enzymatických preparátov. Ďalej je to príprava mikroorganizmov schopných efektívne konvertovať na etanol popri hexózach aj pentózy, v ideálnom prípade aj s vlastnou schopnosťou hydrolyzovať substrát<sup>2,6</sup>. Nevyhnutné je aj ekonomické zhodnotenie vedľajších a odpadových produktov procesu ako je napr. lignín, ktorý môže byť využitý na zabezpečenie energetických potrieb prevádzky a zvyšok predávaný ako bezpopolové tuhé palivo. V súčasnosti prebieha výskum na využitie lignínu, na základe ktorého by sa táto látka mohla stať hodnotnou surovinou pre využitie v novom odvetví chemického priemyslu<sup>11</sup>.

Ďalšie možnosti pre zefektívnenie výroby palivového etanolu, či už z tradičných substrátov alebo z lignocelulóзовých hydrolyzátoov, prinášajú technológie

znižujúce prevádzkové náklady, ako sú VHG technológie využívajúce vysoko koncentrované substráty, SSF – simultánna sacharifikácia a fermentácia príp. až „konsolidovaná bioprodukcia“ CBP a kontinualizácia výrobného procesu.

VHG sú technológie používajúce fermentačné médiá s obsahom 27 g a viac rozpustených látok (extraktu) v 100 g média. Ich výhodou je potreba menšieho množstva procesovej vody a celkovej energie, zvýšená produktivita a vyššia koncentrácia etanolu v zápore na konci fermentácie. Problémom je však vysoké zaťaženie buniek osmotickým tlakom a v priebehu fermentácie aj vyššími koncentraciami etanolu ako v prípade štandardných technológií<sup>29</sup>. Zistilo sa, že prídavok látok, ako  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  kationov<sup>30</sup>, kvasničného extraktu<sup>31</sup>, peptónu, glycinu, biotínu a iných<sup>29,32</sup> a riadená mikroaerácia<sup>33</sup> majú ochranný účinok na bunky kvasiniek v priebehu VHG fermentácií, pozitívne ovplyvňujú ich rast a viabilitu, znižujú tvorbu vedľajších produktov (glycerol), a teda v konečnom dôsledku výtazok etanolu.

SSF technológie prinášajú ekonomický efekt v tom, že eliminujú potrebu zariadení na hydrolyzu substrátu, pretože scukornenie substrátu prebieha priamo vo fermentačnom tanku. Okrem toho je pri tomto procese výrazne znížené zaťaženie buniek osmotickým tlakom zo strany substrátu, k scukorneniu dochádza postupne v priebehu procesu a vznikajúci substrát je priebežne fermentovaný. V súčasnosti mnoho liehovarov prechádza na SSF, pretože okrem vyššie uvedeného znižuje riziko kontaminácie, zvyšuje výtazok etanolu na jednotku substrátu a celkovo je menej energeticky náročná<sup>22</sup>.

Kontinualizácia fermentačného procesu prináša významné ekonomické výhody, ktoré prichádzajú s vyššou výtaznosťou etanolu, zníženými stratami produktu a environmentálnymi výhodami. Prínosom je aj vysoká efektívnosť na jednotku objemu výrobného priestoru, pretože koncentrácia bunkovej hmoty v reaktore je v porovnaní so vsádzkovým systémom podstatne vyššia, najmä ak sa kontinualizácia kombinuje s recyklom buniek alebo s ich imobilizáciou. Recykus buniek sa môže dosiahnuť centrifugáciou, sedimentáciou flokulujúcich kvasiniek alebo membránovou filtráciou. Odseparované kvasinky sa vracajú do fermentačného procesu. Pri imobilizácii sa bunky produkčného kmeňa viažu na povrch inertného nosiča, do vnútra pórovitého materiálu alebo uzatvárajú do mikrokapsúl príp. iných útvarov oddelených mikropórovitou membránou. Medzi najčastejšie používané imobilizačné materiály patria prírodné a syntetické polymérne hydrogély, ako sú alginát vápenatý, agar,  $\kappa$ -karagénan, polyuretán, polystyrén a polyvinylalkohol, pričom imobilizáty mávajú sférický alebo šošovkovitý tvar s priemerom 0,3–3,0 mm. Hoci majú kontinuálne systémy množstvo výhod, ich rozšírenie v praxi je zatiaľ veľmi malé. Problémom sú vysoké investičné náklady na vybudovanie systému a niektoré zatiaľ nevyriešené prevádzkové problémy. Najväčšou prekážkou je však stále cena nosiča, ktorý je zrejme determinujúcim faktorom pre rozšírenie týchto systémov<sup>34</sup>.

## LITERATÚRA

1. Jeffries T. W.: *Nat. Biotechnol.* 23, 40 (2005).
2. Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B. H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C. A., Frederick W.-J. Jr., Hallett J. P., Leak D. J., Liotta C. L., Mielenz J. R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T.: *Science* 311, 484 (2006).
3. Pimentel D., Patzek T., Cecil G.: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 189, 25 (2007).
4. Smernica 2003/30/EC o podpore využitia biopalív a iných obnoviteľných zdrojov energie. <http://europe.eu>, staženo dne 15.3.2007.
5. Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 258 (2003).
6. Gray K. A., Zhao L., Emptage M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141 (2006).
7. Jeffries T. W.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 320 (2006).
8. van Maris A. J., Abbott D. A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M. A., Wisselink H. W., Scheffers W. A., van Dijken J. P., Pronk J. T.: *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 391 (2006).
9. Talarico L. A., Gil M. A., Yomano L. P., Ingram L. O., Maupin-Furlow J. A.: *Microbiology* 151, 4023 (2005).
10. Ingram L. O., Aldrich H. C., Borges A. C., Causey T. B., Martinez A., Morales F., Saleh A., Underwood S. A., Yomano L. P., York S. W., Zaldivar J., Zhou S.: *Biotechnol. Prog.* 15, 855 (1999).
11. Hahn-Hagerdal B., Galbe M., Gorwa-Grauslund M. F., Liden G., Zacchi G.: *Trends Biotechnol.* 24, 549 (2006).
12. Seo J. S., Chong H., Park H. S., Yoon K. O., Jung C., Kim J. J., Hong J. H., Kim H., Kim J. H., Kil J. I., Park C. J., Oh H. M., Lee J. S., Jin S. J., Um H. W., Lee H. J., Oh S. J., Kim J. Y., Kang H. L., Lee S. Y., Lee K. J., Kang H. S.: *Nat. Biotechnol.* 23, 63 (2005).
13. Görner F., Valík L.: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Malé Centrum, Bratislava 2004.
14. Ingram L. O., Conway T., Clark D. P., Sewell G. W., Preston J. F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2420 (1987).
15. Ingram L. O., Gomez P. F., Lai X., Moniruzzaman M., Wood B. E., Yomano L. P., York S. W.: *Biotechnol. Bioeng.* 58, 204 (1998).
16. Ohta K., Beall D. S., Mejia J. P., Shanmugam K. T., Ingram L. O.: *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2810 (1991).
17. Jeffries T. W., Jin Y.-S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 495 (2004).
18. Hahn-Hagerdal B., Linden T., Senac T., Skoog K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28-29, 131 (1991).
19. Karhumaa K., Fromanger R., Hahn-Hägerdal B., Gorwa-Grauslund M. F.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1039 (2007).
20. Karhumaa K., Wiedemann B., Hahn-Hägerdal B., Boles E., Gorwa-Grauslund M. F.: *Microb. Cell. Fact.* 5, 18 (2006).
21. Wheals A. E., Basso L. C., Alvez D. M. G., Amorim H. V.: *Trends Biotechnol.* 17, 482 (1999).
22. Bothast R. J., Schlicher M. A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 19 (2005).
23. Skinner K. A., Leathers T. D.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 401 (2004).
24. Wu L., Birch R. G.: *Plant Biotechnol. J.* 5, 109 (2007).
25. Wyman C. E., Dale B. E., Elander R. T., Holtzapple M., Ladisch M. R., Lee Y. Y.: *Bioresour. Technol.* 96, 1959 (2005).
26. Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladisch M.: *Bioresour. Technol.* 96, 673 (2005).
27. <http://www.iogen.ca>, staženo dne 15.3.2007.
28. <http://www.sekab.com>, staženo dne 15.3.2007.
29. Wang F. Q., Gao C. J., Yang C. Y., Xu P.: *Biotechnol. Lett.* 29, 233 (2007).
30. Ciesarová Z., Šmogrovičová D., Dömény Z.: *Folia Microbiol. (Praha)* 41, 485 (1996).
31. Bafrcnová P., Šmogrovičová D., Sláviková I., Pátková J., Dömény Z.: *Biotechnol. Lett.* 21, 337 (1999).
32. Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S. E., Uribelarrea J. L., Goma G., Benbadis L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 67 (2002).
33. Alfenore S., Cameleyre X., Benbadis L., Bideaux C., Uribelarrea J. L., Goma G., Molina-Jouve C., Guillouet S. E.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 537 (2004).
34. Verbelen P. J., De Schutter D. P., Delvaux F., Verstrepen K. J., Delvaux F. R.: *Biotechnol. Lett.* 28, 1515 (2006).

**M. Šulák and D. Šmogrovičová** (Department of Biochemical Technology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak Technical University, Bratislava): **Bioethanol: Current Trends in Research and Practice**

The present and future trends in the applied research and industrial production of bioethanol are reviewed. The production is expected to rise quickly in the near future due to the biofuel strategy of the EU. Bacteria and yeast commonly used in the production development of specific microbes that could be useful for its large-scale production from biomass are described. The most popular substrates and current technologies in modern bioethanol plants are discussed.