

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Problematika provádění kvasného procesu v
přítomnosti organických rozpouštědel omezeně
mísitelných s vodou**

Bc. Iva Rychlíková

Diplomová práce

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iva Rychlíková**
Osobní číslo: **C16480**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Problematika provádění kvasného procesu v přítomnosti organických rozpouštědel omezeně mísitelných s vodou**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši na oblast využití kvasných procesů pro získávání chemických komodit z obnovitelných zdrojů. Pozornost zaměřte především na faktory ovlivňující průběh a výkonnost kvasného procesu a na možnosti intenzifikace tohoto procesu.
2. Vyberte vhodné modelové rozpouštědlové systémy potenciálně použitelné pro extrakci ethanolu z kvasného média a experimentálně ověřte možnosti jejich použití pro kontinuální extrakci kvasných produktů v průběhu kvasného procesu.
3. Výsledky experimentů vhodným způsobem zpracujte a proveďte jejich diskusi a navrhněte možnosti případného použití vybraných extrakčních činidel.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Tomáš Weidlich, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce:

doc. Ing. Vladimír Pejchal, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Ostatní konzultanti:

Ing. Marcela Pejchalová, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd


Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Iva Rychlíková

Poděkování

Tímto bych velmi ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Tomášovi Weidlichovi, Ph.D. za nesmírnou ochotu, odbornou pomoc, cenné rady, umožnění realizace celého experimentu, a především trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Marcele Pejchalové, Ph.D. za to, že mi poskytla laboratorní zázemí a pomáhala mi řešit problémy spojené s touto diplomovou prací, paní prof. Ing. Jaromíře Chýlkové, CSc. a panu Ing. Alešovi Eisnerovi, Ph.D. za analytická měření. Poděkování patří i mému příteli a rodině za velkou podporu během celého studia.

ANOTACE

Teoretická část diplomové práce se zabývá přehledem kvasných procesů vhodných pro získávání organických chemikálií z obnovitelných zdrojů. Obsahuje výčet stresových faktorů, které mohou ovlivnit průběh a výkonnost fermentace a porovnání separačních metod vhodných pro extrakci alkoholů z kvasného média. Experimentální část diplomové práce je zaměřená na vhodné modelové rozpouštědlové systémy potenciálně použitelné pro extrakci ethanolu z kvasného média a ověření možnosti jejich použití pro kontinuální extrakci kvasných produktů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Ethanol, organická rozpouštědla, extraktivní fermentace, *Saccharomyces cerevisiae*, stresové faktory

TITLE

Study of fermentation process in the presence of water-immiscible organic solvents

ANNOTATION

The theoretical part of this thesis deals with the overview of suitable fermentation processes for the production of organic chemicals from renewable sources. It contains some stress factors that can influence the course and efficiency of the fermentation process and separation technologies for the recovery of alcohols from fermentation broths. The experimental part of the thesis is focused on suitable model solvent systems potentially usable for the extraction of ethanol from fermentation medium, and also verification of possibilities of their use for the continuous extraction.

KEYWORDS

Ethanol, organic solvents, extractive fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, stress factors

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Seznam tabulek..... | 9 |
| Seznam obrázků | 10 |
| Seznam zkratk..... | 11 |
| Úvod..... | 12 |
| 1 Organické sloučeniny získávané kvasnými procesy | 13 |
| 1.1 Ethanol | 13 |
| 1.2 Butanol | 14 |
| 1.3 Aceton | 15 |
| 2 Mikroorganismy využívané při kvasných procesech | 16 |
| 2.1 Rod <i>Clostridia</i> | 16 |
| 2.1.1 Aceton–butanol–ethanolové kvašení rodem <i>Clostridia</i> | 16 |
| 2.2 Rod <i>Saccharomyces</i> | 17 |
| 2.2.1 Alkoholové kvašení | 17 |
| 2.2.1.1 Vhodné substráty pro alkoholové kvašení..... | 18 |
| 2.2.1.2 Živná média pro alkoholové kvašení..... | 21 |
| 2.2.1.3 Podmínky pro kultivaci kvasinek a vlastní kvasný proces..... | 21 |
| 2.2.2 Alternativní cesty produkce alkoholů..... | 23 |
| 2.2.2.1 Přeměna aminokyselin na isobutanol, 1–butanol..... | 23 |
| 2.2.2.2 Aceton–butanol–ethanolové kvašení u <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 24 |
| 2.3 Stresové faktory ovlivňující produkci alkoholů | 26 |
| 2.3.1 Teplotní stres | 26 |
| 2.3.2 Vliv ethanolu | 27 |
| 2.3.3 Vliv pH | 28 |
| 2.3.4 Oxidační stres | 28 |
| 3 Metody separace organických rozpouštědel z fermentačního média | 30 |
| 3.1 Destilace | 30 |
| 3.2 Stripování plynem | 31 |
| 3.3 Pervaporace | 32 |
| 3.4 Kapalinová extrakce..... | 33 |
| 3.4.1 Extrakční činidla..... | 33 |
| 3.4.2 Pertrakce..... | 34 |
| 3.4.3 Extraktivní fermentace | 34 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4.4 | Kapalinová extrakce iontovými kapalinami..... | 35 |
| 3.5 | Adsorpce | 36 |
| 4 | Experimentální část..... | 37 |
| 4.1 | Chemikálie a přístroje | 37 |
| 4.1.1 | Použité chemikálie | 37 |
| 4.1.2 | YPD bujón..... | 38 |
| 4.1.3 | Methylenová modř ve fosfátovém pufru pH 4,6 | 38 |
| 4.1.4 | Přístroje | 38 |
| 4.2 | Testování toxicity extrakčních činidel..... | 39 |
| 4.2.1 | Příprava kultivačního média..... | 39 |
| 4.2.2 | Přídavky jednotlivých činidel..... | 39 |
| 4.2.3 | Vitální barvení kvasinek..... | 40 |
| 4.2.4 | Barvení dle Grama..... | 40 |
| 4.3 | Extraktivní fermentace | 41 |
| 4.3.1 | Extraktivní fermentace tritolylfosfátem s recyklací kvasinek..... | 41 |
| 4.3.2 | Extraktivní fermentace pomocí směsí | 42 |
| 4.4 | Produkce maximálního množství ethanolu | 42 |
| 4.5 | Kontinuální proces | 43 |
| 4.6 | Extrakce ethanolu z vína | 43 |
| 4.7 | Stanovení glukózy dle Schoorla..... | 43 |
| 4.8 | Kvantitativní analýza ethanolu..... | 45 |
| 5 | Výsledky a diskuze | 46 |
| 5.1 | Toxicita extrakčních činidel | 46 |
| 5.2 | Výsledky extraktivní fermentace | 49 |
| 5.2.1 | Stanovení glukózy dle Schoorla | 51 |
| 5.3 | Výsledky produkce maximálního množství ethanolu | 52 |
| 5.4 | Výsledky kontinuálního procesu..... | 55 |
| 5.5 | Výsledky extrakce ethanolu z vína | 57 |
| 6 | Závěr..... | 59 |
| | Použitá literatura..... | 61 |
| 7 | Přílohy | 69 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tab. 1: Množství glukózy ve vzorku v závislosti na rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného při slepém pokusu a stanovením vzorku podle Schoorlovy metody | 44 |
| Tab. 2: Naměřené plochy píků jednotlivých vzorků a standardů potřebné pro vyhodnocení obsahu ethanolu | 45 |
| Tab. 3: Toxicita vybraných extrakčních činidel vůči kvasinkovým buňkám po 72 h..... | 48 |
| Tab. 4: Porovnání počtu mrtvých a živých buněk pomocí vitálního barvení v baňkách se směsí organických rozpouštědel a blanku | 50 |
| Tab. 5: Vyhodnocení obsahu nezreagované glukózy ve vzorcích dle Schoorla | 51 |
| Tab. 6: Vyhodnocení zbytkového obsahu glukózy v blanku a ve vzorku s neutralizovaným hydrolyzátem papíroviny | 53 |
| Tab. 7: Vyhodnocení zbytkového obsahu glukózy ve vzorcích se směsí extraktantů | 55 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obr. 1: Příklady technik imobilizace buněk..... | 23 |
| Obr. 2: Biosyntéza valinu a Ehrlichova dráha..... | 24 |
| Obr. 3: ABE kvašení u <i>S. cerevisiae</i> | 25 |
| Obr. 4: Princip extraktivní destilace..... | 31 |
| Obr. 5: Příklady struktur vybraných iontových kapalin..... | 35 |
| Obr. 6: Ukázka vitálního barvení buněk <i>S. cerevisiae</i> | 46 |
| Obr. 7: Vitální barvení kvasinkových buněk a barvení dle Grama.. .. | 54 |

Seznam zkratek

| | |
|---|---|
| ABE | aceton–butanol–ethanolové kvašení |
| ADH | alkoholdehydrogenáza (<i>Adh1p, Adh2p, Adh3p, Adh4p, Adh5p, Adh6p, Adh7p</i>) |
| ALS | acetolaktát syntáza |
| ATP | adenosintrifosfát |
| <i>BAT1, BAT2</i> | geny kódující mitochondriální aminotransferázy |
| [BMIM] ⁺ [Cl] ⁻ | 1–butyl–3–methylimidazolium chlorid |
| [BMIM] ⁺ [PF ₆] ⁻ | 1–butyl–3–methylimidazoliumhexafluorofosfát |
| <i>C.</i> | <i>Clostridium</i> |
| CAB | celulóza–acetát–butyrát |
| CO ₂ | oxid uhličitý |
| CoA | koenzym A |
| DHAD | dihydroxyacid dehydrogenáza |
| HPS | proteiny tepelného šoku |
| IL | iontová kapalina |
| <i>ILV2</i> | gen kódující acetolaktátsyntázu |
| KARI | ketoacid redukoizomeráza |
| KIVD | ketoisovalerát dekarboxyláza |
| kPA | kilopascal |
| NADH | redukována forma nikotinamidadenindinukleotidu |
| NADPH | redukována forma nikotinamidadenindinukleotid fosfátu |
| Obj. % | objemová procenta |
| PDMS | polydimethylsiloxan |
| PTMSP | poly(1–trimethylsilyl–1–propyn) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| <i>S.</i> | <i>Saccharomyces</i> |
| SSF | simultánní sacharifikace a fermentace |

Úvod

Rychlý růst celosvětové populace vede ke zvyšující se poptávce po pohonných hmotách a jejich nedostatek se stává vážným globálním problémem. Proto jsou v současné době mimo jiné předmětem zájmu kapalná biopaliva uplatňovaná v dopravě, která jsou vyráběná z obnovitelných rostlinných surovin – fytomasy. Podle toho, jestli výchozí fytomasou pro produkci biopaliv byly rostliny obsahující sacharózu, škrob či celulózu jako zásobní zdroj energie, rozdělujeme výchozí rostlinnou biomasu na energetické plodiny první generace (rostliny produkující škrob nebo jednoduché cukry) a plodiny druhé generace (rostliny produkující celulózu) a třetí generace (zelené řasy). Výchozím obnovitelným zdrojem pro výrobu biopaliv první generace jsou především potravinářské cukernaté a škrobnaté suroviny jako je například obilí, cukrová řepa, cukrová třtina, ovoce, brambory, kukuřice, ze kterých se získává kvasným procesem bioethanol, ale i brukev řepka, ze které se získávají methylestery řepkového oleje. Surovinou pro biopaliva druhé generace jsou tzv. nepotravinářské rostlinné odpady, jako jsou dřevěné štěpky a piliny, kukuřičná a třtinová sláma, seno, starý papír. Velkou nadějí do budoucna je výroba biopaliv třetí generace z mořských řas.

Bioethanol představuje jednu z nejvýznamnějších surovin pro chemický průmysl a také slouží jako alternativní obnovitelné biopalivo. Celkové náklady na jeho výrobu výrazně ovlivňuje volba výchozí suroviny a její předúprava, produkční mikroorganismus, metoda pro separaci ethanolu z fermentačního média aj. Uvádí se, že 85 % světové produkce bioethanolu je soustředěno v Brazílii a Spojených státech (Azhar et al. 2017), avšak tento údaj se může každým rokem lišit. V současné době je pozornost také věnována fermentační výrobě butanolu. Butanol má jako motorové palivo mnohem lepší chemické vlastnosti a poskytuje vyšší výhřevnost než ethanol, a proto spalovací motory dosahují většího výkonu.

Cílem teoretické části diplomové práce je vytvoření literární rešerše, která zahrnuje přehled o možnostech fermentační výroby průmyslově využívaného ethanolu a butanolu a výčet separačních metod, které lze potenciálně použít pro získávání těchto alkoholů z kultivačního média. Experimentální část diplomové práce, je zaměřena na testování různých potenciálních extrakčních činidel vhodných pro extrakci vznikajícího ethanolu z kvasného média, pozorování vlivu těchto vybraných činidel na růst, rozmnožování, životaschopnost a fermentační schopnost kvasinek druhu *Saccharomyces cerevisiae*, ověření jejich použitelnosti pro kontinuální proces kvašení a kvantitativní analýzu zbytkové glukózy a vznikajícího ethanolu dostupnými analytickými metodami.

1 Organické sloučeniny získávané kvasnými procesy

Biopaliva produkovaná mikrobiální fermentací sacharidů z obnovitelných zdrojů představují velmi významnou náhradu fosilních paliv. Nejvýznamnějším biopalivem je v současné době ethanol. Kromě ethanolu je kvasnými procesy produkována i celá řada dalších organických sloučenin jako jsou například vyšší alkoholy (isopropylalkohol, 1-butanol), estery (ethylacetát) či ketony (aceton). V současné době je věnována pozornost také fermentační výrobě butanolu, který by v budoucnu mohl kvůli svým lepším atributům nahradit ethanol (Schadeweg, Boles 2016).

1.1 Ethanol

Ethanol může být vyráběn čistě chemicky, například hydratací ethylenu za vysokých teplot a kyselé katalýzy kyselinou fosforečnou či hydrogenací acetaldehydu. V posledních desetiletích je 90 % ethanolu vyráběno z rostlinné biomasy prostřednictvím mikrobiálního anaerobního fermentačního procesu (alkoholovým kvašením) (Thenmozhi, Victoria 2013, Wu et al. 2016). Nejčastěji je ethanol využíván jako biopalivo ve spalovacích motorech, ve farmacii a medicíně jako organické rozpouštědlo, precipitační činidlo, antiseptikum a antidotum při otravě metanolem. Uplatňuje se také při výrobě čistících prostředků, deodorantů, nemrznoucích kapalin či různých druhů lihovin. V chemickém průmyslu je ethanol důležitou výchozí surovinou pro výrobu dalších organických sloučenin, jako jsou například ethylestery, diethyl ether nebo ethylaminy, apod. (Maier et al. 2015, Kosaric et al. 2011).

Jak již bylo zmíněno, bioethanol je jedno z ekologicky šetrných alternativních paliv. V porovnání s benzínem poskytuje řadu výhod. Jednou z nich je to, že potenciálně snižuje skleníkový efekt. Ethanol obsahuje přibližně 35 % kyslíku, což vede k úplnému spalování paliva, a proto se tvoří mnohem méně škodlivých plynů (oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a uhlovodíků). Obrovskou nevýhodou fermentační výroby bioethanolu je vysoký podíl vody a nízká koncentrace ethanolu ve fermentačním médiu. Vodu je nutno od vzniklého ethanolu odstranit, neboť by její vyšší koncentrace v bioethanolu používaném jako motorové palivo způsobovala rychlejší korozi kovových součástí motoru a způsobovala nemísitelnost s ostatními uhlovodíky tvořícími součást motorového benzínu. Možnou alternativou, kterou je možné proces koroze zpomalit je přidání různých aditiv do paliva (Thenmozhi, Victoria 2013).

1.2 Butanol

Butanol je jedním ze základních alkoholů se čtyř uhlíkatým řetězcem a má čtyři izomery: *n*-butanol, *sec*-butanol, *terc*-butanol a isobutanol. Tyto izomery mají kvůli své odlišné struktuře rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti (Huang et al. 2014). Butanol našel perspektivní využití jako palivo či příměs do motorové nafty a benzínu. Je prekursorem pro výrobu bioplastů (akrylátů, metakrylátů), barev a maziv. V mnoha průmyslových odvětvích je také používán jako organické rozpouštědlo (Mayank, Ranjan, Moholkar 2013). Butanol oproti ethanolu nabízí řadu výhod. Je mnohem méně hygroskopický (váže vodu v malé míře), a proto způsobuje mnohem pomalejší korozi některých součástí motoru. Má také vyšší oktanové číslo, menší těkavost a poskytuje až o 30 % vyšší výhřevnost než ethanol, avšak stále nižší výhřevnost než benzín (Becerra et al. 2015, Nielsen et al. 2009).

Butanol lze chemicky syntetizovat především hydroformylační reakcí (oxosyntézou) propylenu v přítomnosti vhodného katalyzátoru (nejčastěji komplexy rhodia či kobaltu) a oxonačního plynu (směs oxidu uhelnatého s vodíkem). Vzniklý butanal je následně redukován na 1-butanol nebo 2-butanol. Hydroformylace prováděná za sníženého tlaku s modifikovaným rhodiovým katalyzátorem může vést ke vzniku 95 % *n*-butanolu a 5 % vedlejšího produktu 2-methyl-1-propanolu (Brito, Martins 2017). Biobutanol může být ve velkých koncentracích produkován několika druhy bakterií rodu *Clostridium* v aceton-butanol-ethanolovém fermentačním procesu (více informací kapitola č. 2.1.1) (Tashiro, Sonomoto 2010). Mezi alternativní mikroorganismy, které jsou schopné svým metabolismem generovat butanol a isobutanol, patří například *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Koncentrace butanolu produkovaného těmito dvěma druhy je v porovnání s klostridiemi zanedbatelná, proto se pro jeho výrobu v praxi téměř nepoužívají. Pokud bychom chtěli tyto výtěžky kvasného butanolu zvýšit, je možné k úpravě daného produkčního druhu využít genového inženýrství (Kolek, Patáková 2015). Při vyšších koncentracích je butanol rovněž jako ethanol pro bakteriální i kvasinkové buňky silně toxický. To je jeden z největších problémů, které se vyskytují při jeho výrobě, proto by separování vzniklého butanolu ze směsi mělo probíhat kontinuálně (Swidah et al. 2015).

1.3 Aceton

Aceton je polární, bezbarvý, vysoce hořlavý, s vodou neomezeně mísitelný keton. Dnes je 90 % acetonu přednostně vyráběno oxidací kumenu. Tento způsob zahrnuje alkylaci benzenu s propylenem v přítomnosti kyslíku a zeolitového katalyzátoru. Vzniklý isopropylbenzen je oxidován na aceton a fenol. Může být také syntetizován se oxidací isopropylalkoholu vhodným oxidačním činidlem nebo v procesu aceton–butanol–ethanolového kvašení (Wu et al. 2016).

Aceton se používá především jako organické rozpouštědlo nebo technická kapalina na čištění předmětů a našel uplatnění jako prekursor pro různé organické syntézy, je to výchozí surovina při výrobě plexiskla či gumových materiálů (Wu et al. 2016).

2 Mikroorganismy využívané při kvasných procesech

Mezi nejvíce využívané mikroorganismy, které se celosvětově používají při kvasných procesech, patří zejména kvasinky z rodu *Saccharomyces* a *Kluyveromyces* či některé bakterie rodu *Clostridium* a *Zymomonas* schopné fermentace sacharidů (Rebroš et al. 2005). Vlákňité patogenní houby druhu *Fusarium oxysporum* napadající rostliny a jsou rovněž schopné za anaerobních nebo mikroaerobních podmínek produkovat bioethanol, avšak v současné době nejsou pro jeho výrobu kvůli nízké fermentační rychlosti využívány (Anasontzis, Christakopoulos 2014).

2.1 Rod *Clostridia*

Některé druhy klostridií jsou považovány za významné přirozené producenty *n*-butanolu, acetonu, ethanolu, acetátu i butyrátu (Ghiaci et al. 2013). Pro tvorbu těchto rozpouštědel jsou klostridie schopné přímo konvertovat nejrůznější sacharidy, jako jsou například glukóza, fruktóza, xylóza, sacharóza, laktóza či škrob (Jones, Woods 1986). Tyto grampozitivní, striktně anaerobní, tyčinkovité bakterie se vyznačují tvorbou bakteriálních spor. Endospory vznikají uvnitř mateřské buňky a slouží především k dlouhodobému přežívání bakterií za různých vnějších nepříznivých podmínek (Jones, Woods 1986, Tashiro, Sonomoto 2010). Nejvýznamnější druhy klostridií, které jsou schopné svým metabolismem generovat ve vyšších koncentracích zmíněná organická rozpouštědla, jsou *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharoperbutylacetonicum*, *C. saccharobutylicum*. Klostridie se taxonomicky řadí do říše *Bacteria*, třídy *Clostridia*, řádu *Clostridiales*, čeledě *Clostridiaceae* a rodu *Clostridium*. (Brito, Martins 2017, Tashiro, Sonomoto 2010).

2.1.1 Aceton–butanol–ethanolové kvašení rodem *Clostridia*

Butanol, ethanol a aceton lze získávat mechanismem, který nazýváme aceton–butanol–ethanolové kvašení (ABE) (Laurin 2015). Klasické ABE kvašení probíhá dvoufázově čili ve dvou krocích. Během první fáze dochází ke snížení pH v kulturačním médiu kvůli tvorbě a hromadění nedisociovaných forem organických kyselin (kyseliny máselné a kyseliny octové) z butyryl–CoA a acetyl–CoA. Tento krok je velmi důležitý, neboť dochází k pomnožení klostridií a označuje se jako acidogenní fáze. Ve druhé fázi, kterou označujeme za solventogenní, nastává reutilizace vytvořených organických kyselin a jejich přeměna na

požadovaná rozpouštědla (kyselina máselná je redukována na *n*-butanol; kyselina acetoctová je dekarboxylována na aceton) a pH kultivačního média se zvyšuje (podrobnější popis mechanismu ABE kvašení kapitola č.2.2.2.2) (Tashiro, Sonomoto 2010, Kolek, Patáková 2015). Novější, efektivnější postupy využívají kokultivace druhů *C. acetobutylicum* a *C. tyrobutyricum* v médiu. První mikroorganismus maximalizuje přeměnu glukózy na kyselinu máselnou a druhý mikroorganismus poté z této kyseliny syntetizuje butanol. Přidání kyseliny máselné a octové do kultivačního média na počátku druhé fáze zvyšuje výtěžky butanolu i acetonu (Laurin 2015).

Problémem při ABE kvašení pomocí klostridií může být produkce dalších vedlejších produktů a organických kyselin (kyselina octová, máselná, jantarová). Tyto nežádoucí produkty je nutné oddestilovat. Musí se pracovat s velkým množstvím vstupního substrátu (zdrojem sacharidů) a velkým objemem fermentačního média, což není ekonomicky výhodné (Tashiro, Sonomoto 2010). Další problém může být pomalý růst klostridií, jejich sporulace, bakteriální kontaminace média a nedodržení striktně anaerobních podmínek při kultivaci klostridií (Schadeweg, Boles 2016).

2.2 Rod *Saccharomyces*

Jedním z nejznámějších a nejvyužívanějších producentů kvasného ethanolu na světě je nepatogenní kvasinka druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Mimo ethanol a CO₂ je tento druh schopný při lihovém kvašení v malém množství přirozeně produkovat i vedlejší produkty, jako jsou organické kyseliny (mléčná, octová, mravenčí, jantarová), estery a sulfidy (Hazelwood et al. 2008). *S. cerevisiae* taxonomicky řadíme do říše *Fungi*, dále do kmene *Ascomycota* (houby vřeckovýtrusné), třídy *Saccharomycetes*, řádu *Saccharomycetales*, čeledě *Saccharomycetaceae* a rodu *Saccharomyces* (Reece et al. 2014). *S. cerevisiae* je prvním eukaryotickým mikroorganismem, jehož genom byl roku 1996 kompletně osekvenován (Dujon 2006).

2.2.1 Alkoholové kvašení

Alkoholové kvašení je mikrobiální fermentační proces, pomocí kterého lze získávat alkoholy. Kvasinky, které žijí v anaerobním prostředí jsou schopné dekarboxylovat pyruvát a následně ho redukovat až na ethanol. Tento proces je charakterizován vysokou rychlostí fermentace, poměrně dobrou tolerancí mikroorganismů vůči zvýšené koncentraci kvasného

ethanolu a vedlejších produktů v médiu i vysokými výtěžky ethanolu (Kosaric et al. 2011). Obecně lze alkoholové kvašení popsat chemickou rovnicí, kdy podle stechiometrie z jedné šestiuhlíkaté molekuly, jako je například glukóza vznikají dvě molekuly ethanolu a dvě molekuly oxidu uhličitého:



Kvasný proces probíhá bez přístupu vzduchu působením specifických enzymů a navazuje na glykolýzu. Glykolýza je vícekrokový metabolický proces sloužící k enzymatické přeměně sacharidů na dvě molekuly pyruvátu za čistého výtěžku dvou adenosintrifosfátů, jež jsou důležitým energetickým zdrojem pro aktivitu buněk. Samotná fermentace začíná dekarboxylací pyruvátu (anion kyseliny pyrohroznové), kdy vzniká acetaldehyd a oxid uhličitý. Tento krok je katalyzován enzymem pyruvátdekarboxylázou. Acetaldehyd je redukován alkoholdehydrogenázou v reverzibilní reakci až na ethanol. U *S. cerevisiae* bylo sekvenováno 7 typů alkoholdehydrogenáz. V mitochondriální matrix jsou lokalizovány alkoholdehydrogenázy Adh3p, Adh4p a Adh1p, Adh2p, Adh5p jsou v cytosolu. V současné době zatím není známo, kde se nacházejí Adh6p a Adh7p. Každá tato alkoholdehydrogenáza má v procesu alkoholového kvašení jinou funkci. Nejvýznamnější je Adh1p, která společně s Adh5p katalyzuje redukcí acetaldehydu na ethanol. Adh2p je schopná katalyzovat reverzní přeměnu ethanolu na acetaldehyd. Adh3p se podílí na přenosu a reoxidaci mitochondriálního NADH do cytosolu. Adh6p a Adh7p jsou NADPH alkoholdehydrogenázy s podobnou substrátovou specifikou podílející se na NADPH homeostáze (De Smidt et al. 2008, Azhar et al. 2017, dostupné prostřednictvím elektronické databáze *Saccharomyces* Genome Database).

2.2.1.1 Vhodné substráty pro alkoholové kvašení

Saccharomyces cerevisiae má schopnost přirozeně zkvašovat různé monosacharidy, a to především hexózy (hlavně glukózu, fruktózu, manózu, méně galaktózu) a disacharidy (sacharóza, maltosa, méně laktóza). Glukóza a fruktóza je pro tyto účely získávána hydrolýzou sacharózy obsažené ve vysokém množství především v cukrové třtině a cukrové řepě (Kumar, Shankar, Anandapandian 2011). Za normálních podmínek jsou pentózy (cukry s pěti uhlíky – xylóza, ribóza, aj.) druhem *S. cerevisiae* nezkvasitelné. Neschopnost jejich fermentace souvisí nejen s nedostatkem potřebných enzymů pro tento proces, ale i s nízkou účinností metabolických drah (Li et al. 2015, Singh et al. 2014). Xylóza může být využívána hybridními kmeny kvasinek druhu *S. cerevisiae* schopnými současně fermentovat jak pentózy, tak hexózy

nebo geneticky modifikovanými kmeny, které jsou schopné exprimovat geny kódující enzymy NAD(P)H–dependentní xylózoreduktázu, xylitol–dehydrogenázu či xylózoizomerázu. Tyto enzymy jsou nezbytně důležité pro konverzi xylózy pomocí oxidačně–redukční dráhy (vznik xylitolu z xylózy a následná přeměna na xylulózu jež fosforyluje enzymem xylulokinázou na xylulózu–5–fosfát, který je součástí pentózového cyklu) nebo izomerací (Zhang et al. 2016, Azhar et al. 2017, Kosaric et al. 2011). Oligosacharidy a polysacharidy (například škrob, inulin, celulóza) lze fermentovat po vhodné předúpravě, která je rozloží na jednoduché cukry (Kumar, Shankar, Anandapandian 2011). Ethanol lze také produkovat z kyseliny mléčné, avšak tento substrát je pro průmyslovou výrobu tohoto alkoholu velmi drahý (Tesfaw, Assefa 2014).

Lignocelulóзовые hydrolyzáty mohou být významný levný a obnovitelný zdroj cukrů pro výrobu bioethanolu a biobutanolu (Jouzani, Taherzadeh 2015). Jedná se v podstatě o nevyužitelnou zemědělskou odpadní biomasu – zbytky cukrové třtiny, kukuřičná sláma, bramborové a rýžové slupky, piliny, dřevěné štěpky, ale i starý odpadní papír (Tesfaw a Assefa 2014). Lignocelulóza je polymer, který vytváří základní stavební jednotku rostlin. Skládá se z celulózy, hemicelulózy a ligninu. Xylóza je druhým nejvíce zastoupeným cukrem v lignocelulóze a jeho fermentace by zefektivnila celý proces výroby bioethanolu. Nevýhodou je, že xylóza není kvasinkami druhu *S. cerevisiae* přirozeně využívána (Li et al. 2015, Singh et al. 2014).

Pro získání monosacharidů je nutné tyto lignocelulóзовые materiály vhodně předupravit. První kroky předúpravy spočívají v narušení vazeb a rozložení komplexní struktury lignocelulózy na jednotlivé, oddělené složky (celulózu, hemicelulózu a lignin). Metody, které se pro tuto předúpravu používají, lze rozdělit na fyzikální, chemické a fyzikálně–chemické (Singh et al. 2014). Fyzikální předúprava mletím napomáhá ke zmenšení a rozmělnění částic lignocelulóзовého materiálu, který je poté přístupnější dalším chemickým nebo chemicko – fyzikálním zásahům. Chemická předúprava spočívá v kyselé nebo zásadité hydrolyze. Kyselé hydrolyza probíhá za zvýšené teploty zředěnými minerálními kyselinami například kyselinou sírovou, chlorovodíkovou. K alkalické hydrolyze se používají vhodné alkalické roztoky například amoniak, hydroxid sodný, hydroxid vápenatý (Gonçalves et al. 2016). Fyzikálně chemická předúprava zahrnuje například parní explozi, ozonolýzu, explozi za přítomnosti amoniaku či SO₂. Zvolení vhodné metody je závislé na její efektivitě, ceně činidla, množství a typu výchozí suroviny a dalších parametrech. Podle typu lignocelulóзовého materiálu je vhodné optimalizovat výchozí navážku a koncentraci použitých hydrolytických činidel. Bez

této předúpravy není možné rozložit celulózu a hemicelulózu specifickými celulolytickými enzymy (exo- β -(1,4)-glukanázou, endo- β -(1,4)-glukanázou a β -(1,4)-glukosidázou) na požadované redukující cukry, které jsou poté přeměněny kvašením na požadovaný alkohol (Xue et al. 2016, Jouzani, Taherzadeh 2015, Singh et al. 2014).

Předúpravy však generují řadu inhibitorů, které mají vliv na vlastní kvasný proces, hydrolyzu a růst kvasinek. Tyto inhibitory jsou obvykle děleny do tří skupin. Zařazujeme sem slabé organické kyseliny (kyselina octová, kyselina levulová, kyselina mravenčí), deriváty furanu (furfural, 5-hydroxymethylfurfural) a fenolické sloučeniny (fenol, vanilin, kyselina 4-hydroxybenzoová, 1,2-dihydroxybenzen) (Tesfaw, Assefa 2014, Huang et al. 2008). Slabé kyseliny mohou difundovat přes plasmatickou membránu kvasinek druhu *S. cerevisiae* a narušit iontové prostředí uvnitř buňky, což negativně ovlivňuje metabolické procesy uvnitř buňky. Deriváty furanu ovlivňují rychlost růstu buněk, jejich velikost a snižují výtěžky ethanolu při kvašení. Jsou uvolňovány při degradaci redukujících cukrů za nízkého pH média. Fenolické sloučeniny jsou pravděpodobně uvolňovány kyselou hydrolyzou z ligninu a narušují celistvost plasmatické membrány kvasinkových buněk (Li et al. 2015, Cardona, Sánchez 2007). Strategie, kterou lze zlepšit odolnost kvasinek vůči těmto inhibitorům je kultivace kvasinek v přítomnosti těchto činidel (Narayanan et al. 2016, Wohlbach et al. 2014). Další možností je odstranění nežádoucích inhibitorů z média sorpcí na aktivní uhlí nebo jiné sorpční látky (Jouzani, Taherzadeh 2015). Pro detoxikaci derivátů furanu a fenolických sloučenin se také využívají metody membránové extrakce a kapalinové extrakce pomocí organických rozpouštědel. Odstranění organických kyselin se často provádí iontovou výměnou, neutralizací či evaporací (Huang et al. 2008). Kokultivace kvasinek s vhodným mikroorganismem, který je schopný metabolizovat nežádoucí inhibitory, je jednou z využitelných biologických metod. Jako příklad je možné uvést termofilní bakterii druhu *Thermoanaerobacter pentosaceus* a kvasinky druhu *Pichia stipitis*, které mohou efektivně metabolizovat furfural a 5-hydroxymethylfurfural (Tesfaw, Assefa 2014).

V současné době se uplatňuje spojení procesu sacharifikace (enzymatické hydrolyzy) a fermentace (z angl. „simultaneous saccharification and fermentation“ – SSF). Maximální množství glukózy vzniklé enzymatickou hydrolyzou je okamžitě spotřebováno na fermentaci alkoholu dříve, než dojde k inhibici celulolytických enzymů. SSF také zrychluje celkovou konverzi celulózy na bioethanol. Velkou nevýhodou SSF metody je, že optimální teplota pro

aktivitu hydrolytických enzymů je vyšší (45–60 °C), než optimální teplota pro vlastní kvasný proces (25–30 °C) (Jouzani, Taherzadeh 2015, Cardona, Sánchez 2007).

2.2.1.2 Živná média pro alkoholové kvašení

Pro úspěšnou intenzivní propagaci a růst kvasinek je nutné volit vhodná kultivační média. Substrát musí být bohatý na aminokyseliny, vitaminy i další potřebné složky, jako jsou například sírany, fosforečnany a chloridy (Kosaric et al. 2011). Velmi často používaným médiem pro kultivaci *S. cerevisiae* a dalších druhů kvasinek je YPD bujón (z angl. „yeast extract–peptone–dextrose“). Pepton je hydrolyzát proteinů a slouží jako důležitý exogenní zdroj uhlíku, dusíku, vitamínů a minerálů. Kvasničný extrakt je získáván vysušením autolyzovaných kvasnic a poskytuje zejména vitaminy skupiny B (B–komplex), které stimulují růst kvasinek. Kvasinky dokážou růst i na minimálních půdách, které obsahují pouze soli a dextrózu, avšak přidáním proteinů a kvasničného extraktu dochází k rychlejšímu růstu kvasinek (dostupné prostřednictvím BD Diagnostics © 2018, Kumar, Shankar, Anandapandian 2011).

2.2.1.3 Podmínky pro kultivaci kvasinek a vlastní kvasný proces

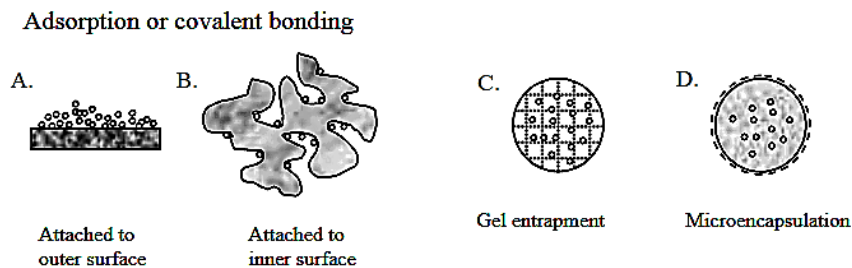
Pro maximální výtěžky ethanolu je nezbytně důležité kvasinkám zajistit nejen vhodné složení kultivačního média, ale také optimální podmínky, za kterých bude růst mikroorganismů a vlastní kvasný proces probíhat. Optimální teplota pro kultivaci kvasinek a správnou enzymovou aktivitu se pohybuje v rozmezí 25–30 °C v závislosti na kmeni druhu *S. cerevisiae* (Šilhánková 2002, Azhar et al. 2017). Qun et al. také prokázali, že kvasinky jsou obecně schopné lépe tolerovat působení organických chemikálií při teplotě, která je optimální pro jejich růst (tzn. při 30 °C) (Qun, Shanjing, Lehe, 2002). Příliš vysoká teplota může denaturovat celou řadu enzymů a ovlivnit tak jejich funkci nebo je inaktivovat. Reprodukční schopnost a růst buněk prudce klesá se zvyšující se teplotou, než je teplotní optimum, což souvisí s vlivem teploty na enzymy kvasinek (Šilhánková 2002, Azhar et al. 2017). Výjimku tvoří termostabilní, geneticky upravené kmeny a kmeny, které byly vystaveny teplotnímu šoku, a proto jsou schopné snášet i vyšší teploty (více jak 40 °C) (Kitichantaropas et al. 2016). Vyšším teplotám také odolávají imobilizované buňky, protože mohou nadbytek tepla regulovat přenášením tepla mezi povrchem na kterém jsou imobilizovány a kvasinkovou buňku (Azhar et al. 2017). Alkoholové kvašení za vyšších teplot přináší řadu výhod. Slouží jako prevence proti bakteriální kontaminaci média a umožňuje metodu SSF (Kitichantaropas et al. 2016).

Produkce ethanolu je rovněž ovlivňována hodnotou pH kvasného média. Ideální hodnota pH pro konverzi sacharidů na ethanol druhem *S. cerevisiae* se pohybuje v rozmezí pH 4,0–5,0. V prostředí, kde je pH nižší než 4 dochází k prodlužování doby potřebné k ethanolovému kvašení. Při naopak vyšším pH než 5 je výrazně redukována koncentrace vzniklého kvasného ethanolu (Šilhánková 2002, Azhar et al. 2017).

V poslední době se v průmyslové výrobě využívají technologie pro imobilizaci buněk, při kterých je omezen pohyb buněk, avšak jejich metabolická aktivita zůstává nezměněna. Imobilizované buňky jsou v porovnání s volnými buňkami schopné lépe přeměňovat substrát na ethanol, dochází k nižší inhibici buněk produktem a vyšší produktivitě, snižuje se reakční čas konverze a ethanol je snadněji separován od kultivačního média. Produktivita imobilizovaných buněk je ovlivňována několika faktory, jako je například povrchový charakter nosiče, porozita, hydrofilnost či hydrofobnost povrchu. Buňky mohou být imobilizovány různými způsoby – například adsorpcí, mikroenkapsulací či zachycováním (entrapment) kvasinkových buněk v polymeru (obr. 1).

Entrapment se provádí polymerací roztoku monomerů, ve kterém jsou suspendovány živé buňky a dochází tak k uzavření buněk do pevných polymerních sítí. Tato metoda je velmi jednoduchá a levná. Nejčastěji se pro entrapment využívají vhodné přírodní i syntetické polymery s dobrou mechanickou odolností, jako je například alginát, polyakrylamid či polyvinylalkohol (Azhar et al. 2017, Zhu 2007). Vznikající ethanol i CO₂ se mohou během fermentace v polymerní síti hromadit a kvůli zvyšujícímu se tlaku uvnitř nosiče může dojít k jeho mechanickému poškození (Rebroš et al. 2005).

Adsorpční metody spočívají ve spontánní interakci velkého množství buněk z roztoku s aktivním povrchem nerozpustných materiálů pomocí Van der Waalsových, iontových, vodíkových nebo kovalentních vazeb. Mikroenkapsulace se provádí zachycením nebo obalením buněk přírodní či syntetickou, tenkou, semipermeabilní, polymerní membránou (Azhar et al. 2017, Kuncová, Trögl 2011, Zhu 2007).



Obr. 1 Příklady technik imobilizace buněk. Na obrázku (A), (B) jsou zobrazeny metody, kde dochází k vazbě buněk fyzikální adsorpcí nebo iontovými a kovalentními vazbami na ve vodě nerozpustné nosiče. (C) Entrapment zahrnuje uzavření buněk v polymerní matici. (D) Mikroenkapsulace buněk membránou. Převzato a upraveno z (Zhu 2007)

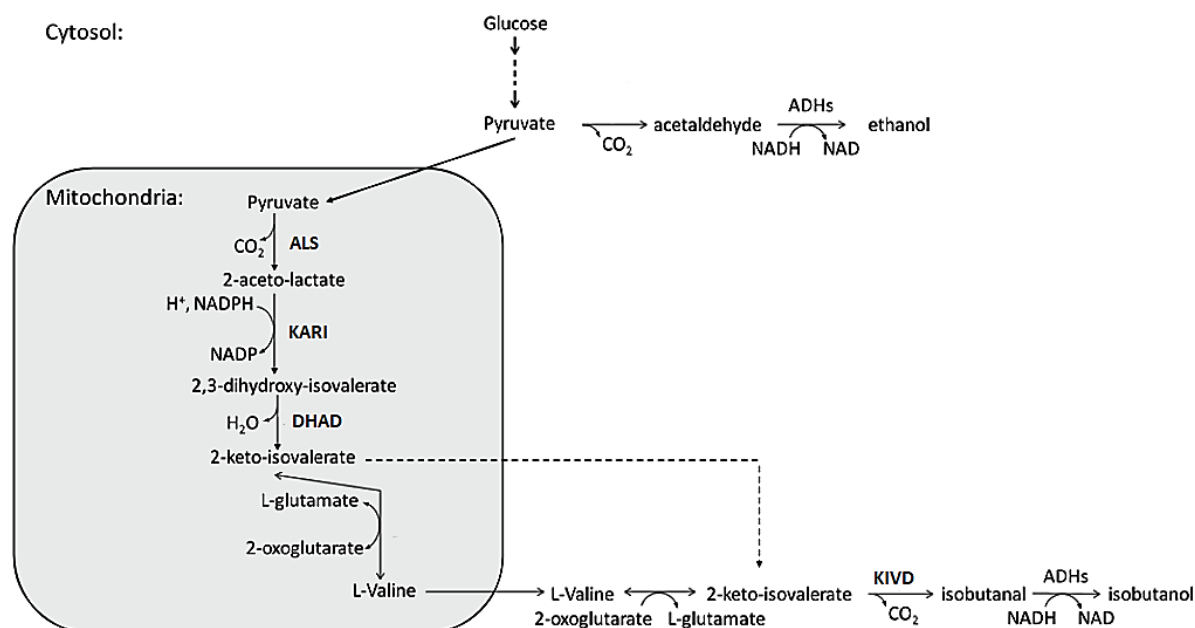
2.2.2 Alternativní cesty produkce alkoholů

2.2.2.1 Přeměna aminokyselin na isobutanol, 1–butanol

Aminokyseliny jsou důležitým zdrojem dusíku a uhlíku, jež podporují růst kvasinek v anaerobním prostředí (Dickinson et al. 1998). Je známo, že *S. cerevisiae* je schopna přeměnit aminokyseliny nejen na isobutanol, ale i pentanol, fenylalkohol či isopentanol. Tyto alkoholy vznikají deaminací aromatických aminokyselin (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) nebo aminokyselin s rozvětveným řetězcem (valin, leucin, izoleucin). Tento tříkrokový mechanismus se nazývá Ehrlichova dráha (z *angl.* „Ehrlich pathway“). Na obr. 2 je popsána syntéza valinu a následná přeměna valinu na isobutanol.

Ehrlichova dráha zahrnuje 3 dílčí kroky – transaminaci, dekarboxylaci a dehydrogenaci. V prvním kroku této reakce probíhá transaminace L–valinu na 2–ketoisovalerát (2–methyl–2–oxo–butanoát), která je katalyzována enzymem aminotransferázou (Nielsen et al. 2009). Následuje dekarboxylace 2–ketoisovalerátu na isobutanal (2–methylpropanal) enzymem 2–ketoisovalerát dekarboxylázou. V posledním kroku Ehrlichovy dráhy probíhá redukce isobutanalu na isobutanol enzymem alkoholdehydrogenázou. Dekarboxylace i dehydrogenace probíhá v cytosolu buněk (Nazem–Bokae, Senger 2015, Chen et al. 2011). Obdobně probíhá i degradace isoleucinu na *n*–propanol (Dickinson et al. 1998). Bylo prokázáno, že zvýšená exprese některých genů, které kódují enzymy potřebné při biosyntéze valinu a jeho následné přeměně na isobutanol, může vést ke zvýšení produkce isobutanolu. Mezi tyto významné geny patří například *BAT1*, *BAT2* kódující aminotransferázy či *ILV2* kódující acetolaktátsyntázu (katalyzuje první krok biosyntézy valinu a isoleucinu v mitochondriích). Zvýšenou expresí

těchto genů bylo získáno o 80 % více isobutanolu, než byla jeho původní koncentrace (Chen et al. 2011, Nielsen et al. 2009).



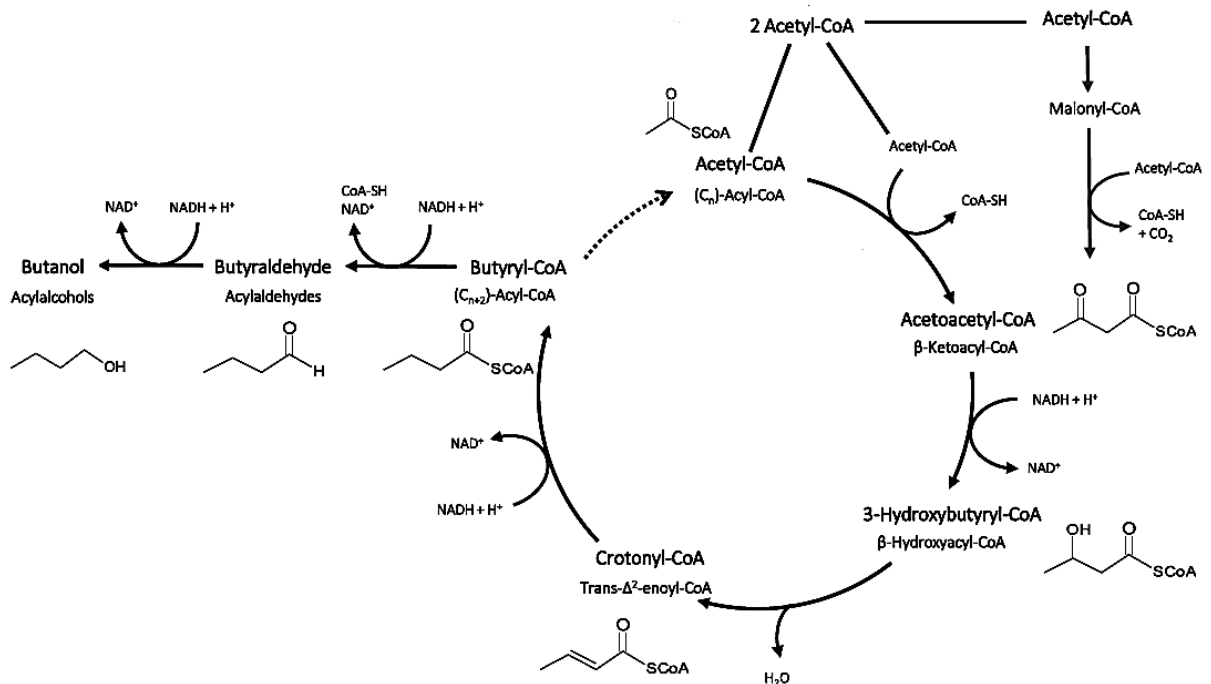
Obr. 2 Biosyntéza valinu a Ehrlichova dráha. Biosyntéza valinu probíhá v mitochondriích (šedé pole) a dekarboxylace 2–ketoisovalerátu na isobutanal a redukce na isobutanol probíhá v cytosolu. ALS – acetolaktát syntáza; KARI – ketoacid reduktoizomeráza; DHAD – dihydroxyacid dehydrogenáza; KIVD – ketoisovalerát dekarboxyláza; ADH – alkoholdehydrogenáza. Převzato a upraveno z (Chen et al. 2011)

Branduardi et al. navrhli alternativní cestu současné produkce *n*–butanolu a isobutanolu přidáním 15 g/l glycinu do kultivačního média s geneticky upraveným druhem *S. cerevisiae*. Glycin může být po transportu do cytosolu katabolizován různými cestami v závislosti na nutričních požadavcích buňky (Branduardi et al. 2013).

2.2.2.2 Aceton–butanol–ethanolové kvašení u *Saccharomyces cerevisiae*

Geneticky upravené kmeny *S. cerevisiae* jsou schopné produkovat *n*–butanol cestou aceton–butanol–ethanolové kvašení, avšak výtěžky *n*–butanolu získané touto cestou jsou v porovnání s výtěžky koncentrací produkovaných druhem *C. acetobutylicum* velmi malé. Důvodem by mohla být vzájemná kompetice enzymů, které se podílejí na ABE kvašení s jinými buněčnými enzymy zajišťujícími hlavní metabolismus buňky *S. cerevisiae* či nepřítomnost transportních drah pro butanol (Matsuda et al. 2011). Pokud těmto kmenům chybí gen *ADHI* kódující alkoholdehydrogenázu, začne se hromadit acetaldehyd, protože nemůže být

metabolizován na ethanol. Proto se acetaldehyd oxiduje na acetát, který je následně přeměněn na acetyl-CoA (Swidah et al. 2015). První krok samotné ABE reakce katalyzovaný thiolázou začíná kondenzací dvou molekul acetyl-CoA na acetoacetyl-CoA, který je redukován na 3-hydroxybutyryl-CoA a dále dehydratován na krotonyl-CoA. Na přeměně se podílejí enzymy 3-hydroxybutyryl-CoA-dehydrogenáza a krotonáza. V posledních krocích probíhá redukce krotonylu-CoA na butyryl-CoA, butyraldehyd a *n*-butanol. Reakcí se účastní enzymy butyryl-CoA-dehydrogenáza, aldehyddehydrogenáza a alkoholdehydrogenáza (obr. 3). ABE kvašení je mimo posledních dvou kroků totožné s kvašením máselným (Schadeweg, Boles 2016).



Obr. 3 ABE kvašení u *S. cerevisiae*. Oxidativní dekarboxylací pyruvátu vzniká acetyl-CoA. Následuje konjugace dvou molekul acetyl-CoA a vzniká acetoacetyl-CoA. Acetoacetyl-CoA je enzymem hydroxybutyryl-CoA dehydrogenáza redukován na 3-hydroxybutyryl-CoA. Poté nastává dehydratace enzymem krotonáza na krotonyl-CoA a redukce butyryl-CoA dehydrogenázou na butyryl-CoA. Aldehyddehydrogenázou a alkoholdehydrogenázou vzniká butyraldehyd a následně butanol. Převzato a upraveno z (Schadeweg, Boles 2016).

Výhodou ABE kvašení druhem *S. cerevisiae* je, že při reakci nemusí být dodrženy striktně anaerobní podmínky jako u klostridií (Kolek, Patáková 2015). Uvádí se, že nejvyšší dosažené koncentrace butanolu získané cestou ABE kvašení se pohybují okolo 240 mg/l a isobutanolu 1,5 g/l (Schadeweg, Boles 2016).

Největším problémem reakce je vysoká toxicita *n*-butanolu vůči kvasinkovým buňkám, kdy maximální tolerovatelná koncentrace je přibližně 2 % obj. Tolerovatelná koncentrace

2–butanolu je v porovnání s 1–butanolem vyšší a pohybuje se okolo 3 % obj. Důvodem vyšší toxicity 1–butanolu oproti ostatním izomerům je hydrofobicita molekuly, která souvisí se silnější schopností interakce tohoto alkoholu s membránou kvasinkových buněk (Knoshaug, Zhang 2009, Ghiaci et al. 2013).

2.3 Stresové faktory ovlivňující produkci alkoholů

Životaschopnost a metabolismus kvasinek mohou být v průmyslových fermentačních procesech ovlivněny řadou stresových faktorů, které narušují specifické vnitřní prostředí buněk, správnou funkci buněčných systémů i růst kvasinek (Gasch 2003). Příkladem těchto faktorů mohou být změny teploty, pH, osmotického tlaku, přechodů z aerobního do anaerobního prostředí či chemický stres způsobený vysokou koncentrací alkoholů a hromaděním vedlejších produktů fermentačního procesu v médiu (Ramos et al. 2013). Kvasinky jsou schopné poměrně snadné a rychlé adaptace na nepříznivé podmínky prostředí. Základním obranným mechanismem buňky vůči těmto faktorům je odpověď organismu zvýšením genové exprese specifických stresových proteinů nebo naopak potlačení transkripce některých proteinů. U kvasinky druhu *S. cerevisiae* je známo okolo 900 genů kódujících tyto stresové proteiny (Gasch 2003). Teplotní šok je další možný způsob, jak lze u kvasinkových buněk druhu *S. cerevisiae* efektivně zvýšit odolnost k teplotním změnám (Cavicchioli, Watson 1986). Zvýšení odolnosti kvasinek vůči nežádoucím organickým rozpouštědlům může být provedeno snížením koncentrace těchto rozpouštědel v kultivačním médiu. Toho lze dosáhnout vhodnou separační technikou. Tímto způsobem dochází k omezení přímého toxického působení rozpouštědel na buňky a tento postup by mohl vést ke zlepšení produktivity celého procesu (Lee et al. 2008). Mechanismy toxicity organických rozpouštědel spočívají například ve změně gradientu pH buňky a následného narušení jak membránových, tak transportních procesů v buňce. Hydrofobní vlastnosti butanolu mají vliv na funkci enzymu ATPázy a také rozrušují fosfolipidovou dvojvrstvu cytoplazmatické membrány a ovlivňují tak její fluiditu. Fluidita je tekutost membrány, díky které se mohou látky ve vrstvě membrány relativně pohybovat (Millat et al. 2013, Fribert et al. 2013, Ghiaci et al. 2013).

2.3.1 Teplotní stres

Řada experimentů prokázala, že kvasinky jsou schopné poměrně rychlé adaptace na změny teplot vnějšího prostředí. Teplotní stres je vyvolán v případě, jestliže se kvasinková

buňka nachází v prostředí s teplotou vyšší, než je schopná tolerovat. Stresovou odpovědí na teplotní stres je tvorba specifických proteinů teplotního šoku (z *angl.* „heat shock proteins“ – HSP). HSP je skupina proteinů, které chrání ostatní proteiny před denaturací, zajišťují jejich správnou prostorovou strukturu a pomáhají tak buňce v nepříznivém prostředí přežít (Stanley et al. 2010, Estruch 2000).

Bylo prokázáno, že ethanolové kvašení při vyšší teplotě zabraňuje mikrobiální kontaminaci kvasného média, ale na druhou stranu to může být podnět pro vznik teplotního stresu (Cavicchioli, Watson 1986).

2.3.2 Vliv ethanolu

Nízká tolerance kvasinek k ethanolu a extrakčním činidlům představuje v současné době největší problém fermentačních procesů. I přes to, že nám doba nabízí čím dál větší možnosti genového inženýrství, stále se vědcům nepodařilo tento problém pro efektivní průmyslovou výrobu alkoholů spolehlivě vyřešit. Udržení podmínek pro kultivaci producentů a fermentaci alkoholů těmito geneticky upravenými kmeny kvasinek jsou většinou velmi náročné. Proto je výzkum zaměřen na jiné metody, kterými by byly nežádoucí účinky ethanolu na kvasinky potlačeny (Ivanova et al. 1989).

Nadměrná koncentrace ethanolu v médiu může inhibovat buněčné dělení kvasinek, ale i růst a samotnou životaschopnost kvasinkových buněk. Nejvíce je postižena cytoplazmatická membrána a endoplazmatické retikulum. Cytoplazmatická membrána ztrácí svoji integritu v důsledku porušení hydrofobních a Van der Waalsových vazeb lipidových složek membrány a stává se tak více fluidní. Zvyšuje se její celková permeabilita a dochází k porušení transportu sacharidů a dusíkatých látek do buňky. V endoplazmatickém retikulu je ovlivněna biosyntéza důležitých proteinů, zvyšuje se denaturace intracelulárních proteinů a vyskytují se různé mutace. Dochází k inhibici glykolytických enzymů v cytosolu a utlumení aktivity ATPasy (Stanley et al. 2010). V posledních letech se porovnávaly letální dávky ethanolu u druhů *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum* a *Saccharomyces cerevisiae*. Druh *S. cerevisiae* je v porovnání s ostatními druhy kvasinek a některých bakterií schopen tolerovat mnohem vyšší koncentrace ethanolu, letální dávka představuje zhruba 12–14 % obj. alkoholu (Chen et al. 2011, Branduardi et al. 2013).

Ukázalo se, že aktivace genů kódujících HSP nastává nejen při teplotním stresu, ale některé HSP jsou tvořeny jako odpověď i na jiné stresové faktory, jako je právě působení ethanolu na kvasinkovou buňku. Jedny z nejdůležitějších HSP tvořících se při ethanolovém stresu jsou Hsp104 a Hsp12. Hsp104 pomáhá opětovně skládat a reaktivovat denaturované proteiny a Hsp12 je protein chránící cytoplazmatickou membránu kvasinek před vysušením a porušením v důsledku působení ethanolu (Stanley et al. 2010, Estruch 2000).

2.3.3 Vliv pH

Při kultivaci kvasinek nebo během celého fermentačního procesu může být kvasné médium kontaminováno bakteriemi. Bakterie využívají cukry k tvorbě kyseliny octové a mléčné. Pokles cukrů v médiu využívaných bakteriemi vede k poklesu produkce ethanolu kvasinkami. K zabránění kontaminace můžeme provést fermentaci za nízkého pH (méně než pH 4). Při tomto pH mohou růst jen některé druhy bakterií, avšak nízké pH může negativně ovlivnit i kvasinky. Další možností je přidání antibiotik nebo bakteriofágů do média, ale tato opatření se v důsledku vysoké ceny využívají pouze při velkovýrobě ethanolu především z lignocelulózové biomasy (Kádár et al. 2007, Narayanan et al. 2016). V průmyslové výrobě jsou do kultivačního média přidávány organické i anorganické kyseliny, které zabráňují výskytu kontaminace. Nízkým pH je negativně ovlivněna jak výtěžnost ethanolu, tak i životaschopnost kvasinek. Proto je snahou vědců objevení vhodných kmenů *S. cerevisiae*, které by tolerovaly nízké pH a zároveň produkovaly takové množství ethanolu, jako za optimálních podmínek (Narayanan et al. 2016).

2.3.4 Oxidační stres

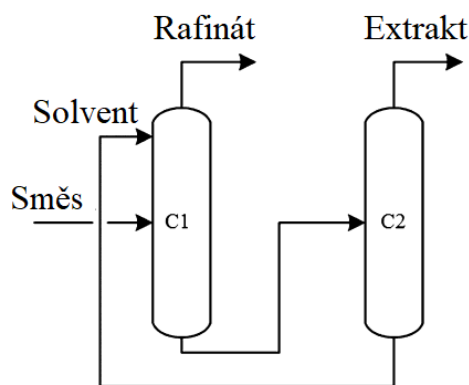
Kyslík je jeden z významnějších biogenních prvků, ale zároveň má několik reaktivních forem (z angl. „reactive oxygen species“ – ROS), které mohou být ve vyšších koncentracích pro kvasinkové buňky toxické a mohou poškozovat některé buněčné struktury, jako jsou proteiny, lipidy či nukleové kyseliny. V mnoha buňkách jsou tyto aktivní reaktivní formy kyslíku tvořeny v důsledku metabolických pochodů (buněčná respirace, imunitní reakce, aj.), ale i po expozici buněk ionizačnímu záření či specifickým chemikáliím a těžkým kovům. ROS zahrnují jak volné radikály – hydroxylový radikál, superoxid, peroxy, hydroperoxy, tak peroxid vodíku. (Farrugia, Balzan 2012, Jamieson 1998). K vychytávání a eliminaci ROS mají buňky specifické, ochranné, enzymové a neenzymové antioxidační mechanismy. Mezi důležité

antioxidační enzymy patří například superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza či kataláza. Superoxid dismutáza katalyzuje přeměnu superoxidového radikálu na kyslík a peroxid vodíku. Glutathion peroxidáza je enzym, který přeměňuje peroxid vodíku na vodu. Kataláza rozkládá peroxid vodíku na kyslík a vodu. *S. cerevisiae* má dva typy tohoto důležitého enzymu – katalázu A a katalázu T (Jamieson 1998).

3 Metody separace organických rozpouštědel z fermentačního média

3.1 Destilace

Destilace je velmi často využívaná metoda pro oddělení dvou a více složek roztoku založená na odlišných bodech varu složek – rozdílech těkavosti (Huang et al. 2008). Roztok ve složení 55,5 % butanolu a 44,5 % vody tvoří azeotrop, jehož teplota varu 93 °C je nižší než teplota varu každé jednotlivé složky (117 °C butanol; 100 °C voda) a proto je téměř nemožné úplně oddělit obě složky prostou destilací a je nutné zvolit jinou, efektivnější metodu destilace či kombinaci dvou separačních metod. Azeotrop je směs dvou kapalin, která je za určitého tlaku a teploty v rovnováze s parami stejného složení. Obdobným případem je směs ethanol–voda, která za tlaku 101,3 kPa tvoří azeotrop s 96 % ethanolu a bodem varu 78 °C (Offeman et al. 2006, Huang et al. 2014, Outram et al. 2017). Často se prostá destilace kombinuje s nějakou další separační metodou. V prvním kroku je ze směsi prostou destilací obvykle oddělena větší část ethanolu a poté se pro separaci zbylého množství využívá například extraktivní destilace, azeotropní destilace, kapalinová extrakce, membránová pervaporace či adsorpce (Ramey, Yang 2004). Azeotropní destilace zahrnuje přidání specifické látky do směsi. Tato látka je schopná ovlivnit molekulární interakce a eliminovat azeotrop změnou relativní těkavosti a distribučního koeficientu některé ze složek směsi. Nejčastěji se pro směs ethanol–voda využívá benzen, toluen nebo cyklohexan. Benzen je také tradiční přidávanou látkou při odvodňování ethanolu. Dalším druhem destilace je extraktivní destilace, kde jsou využívány extrakční činidla s vysokou selektivitou pro danou látku a vysoký bodem varu. Jedním z nejpoužívanějších extraktantů pro ethanol v extrakční destilaci je ethylen glykol (Kosaric et al. 2011, Huang et al. 2008). Potenciálními solventy pro extrakční destilaci mohou být i nejrůznější iontové kapaliny (více v kapitole 3.4.1) (Neves et al. 2011). Do extrakční kolony je přiváděna směs ethanol–voda v podobě páry a do horní části kolony extrakční činidlo. Ethanol je ze směsi extrahován a odváděn do spodní části kolony a rafinát prochází dál kolonou (obr. 4). (Huang et al. 2008).



Obr. 4 Princip extraktivní destilace. Do první kolony (C1) je přiváděna směs ethanol–voda a zároveň extrakční činidlo. Rozpouštědlo s ethanolem je přiváděno do druhé destilační kolony (C2), kde dochází k oddělení složek a recyklaci extrahovačla. Převzato a upraveno z (Huang et al. 2008).

Destilace je metoda poměrně energeticky náročná a oddělení jednotlivých komponent může být složitější (z důvodu výskytu zmíněných azeotropů a dalších nestabilních komponent, podobných bodů varu složek ve směsi, nízkých koncentrací produktů, aj.). Proto se hledají vhodnější separační metody, které by byly levné a také efektivní. Pro provádění kontinuální fermentace je potřebné najít takovou metodu, která nijak negativně neovlivní vitalitu produkčních mikroorganismů (Marszalek et al. 2012).

3.2 Stripování plynem

Stripování plynem je jednoduchá separační technika, kterou můžeme v průběhu kvasného procesu odstraňovat těkavé produkty z kultivačního média prostřednictvím stripovacího plynu. Stripování lze provádět *in situ* za běžné fermentační teploty, nevyžaduje žádné drahé chemikálie ani membrány a díky kontinuálnímu odstraňování ethanolu můžeme pracovat s vysokou koncentrací cukrů (Ponce et al. 2015, Cardona, Sánchez 2007, Outram et al. 2017). Proces je založen na probublávání stripovacího (inertního) plynu kvasným médiem, kterým jsou zachycovány těkavé produkty (ethanol, butanol, aceton) a odváděny z fermentoru do kondenzátoru. Zde dochází ke kondenzaci a následnému rozdělení směsi na jednotlivé složky. Stripovací plyn může být recyklován a využit pro další separační cyklus (Lodi, Pellegrini 2016, Ponce et al. 2015). Jako stripovací plyn se nejčastěji používá dusík. Jako další plyny je možno využít i oxid uhličitý či vodík, které jsou produkovány přímo mikrobiálními producenty během kvašení. Tyto plyny nazýváme jako tzv. fermentační plyny. Oxid uhličitý pomáhá při ethanolovém kvašení snižovat koncentraci ethanolu v kultivačním médiu.

Stripovací plyn nepoškozuje buňky, ale způsobovat napětí média. Další parametry, které mohou ovlivňovat účinnost stripovací techniky, jsou například teplota v průběhu procesu, velikost vytvářených bublin, rychlost průtoku stripovacího plynu médiem či koncentrace jednotlivých složek směsi (Lee et al. 2008, Ponce et al. 2015). Nejlepší selektivita procesu je dosaženo při teplotě 67 °C (Qureshi, Maddox 1991). Tato technika není vhodná pro separaci butanolu, protože odstraňuje ze směsi velké množství jak vody, tak butanolu a kvůli snížené selektivitě vyžaduje vyšší spotřebu energie (Lodi, Pellegrini 2016).

3.3 Pervaporace

Pervaporace je jednou z membránových separačních technik, při které dochází k molekulární interakci mezi selektivní membránou a složkami kapalné organické směsi. Hybnou silou pro dělení směsi je tlakový, resp. koncentrační gradient na obou stranách membrány. Nejprve probíhá předehřátí směsi na 60 °C a sorpce látky na povrch membrány a difúzi přes vstupní stranu polymerní/anorganické membrány. Na opačné straně membrány je permeát odpařován a odsáván za využití vakua proudem nosného plynu. Získaná rozpouštědla poté v chladicí části zařízení kondenzují. Zbylé fermentující buňky, které zůstaly zachycené na vstupní straně membrány jsou recyklovány zpět do fermentoru pro další fermentační a následně separační proces (Huang et al. 2014, García-Ríos et al. 2016). Pervaporace se využívá nejen při separaci dvou a více organických komponent ze směsi, ale i při dehydrataci organických kapalin, a naopak jejich odstranění z vody (Marszalek et al. 2012, Outram et al. 2017).

Ethanol i butanol jsou poměrně snadno mísitelné s vodou, a proto je obtížné najít takovou membránu, jež by byla pro specifickou složku vysoce selektivní a nepropouštěla velké množství vody. Pro tyto účely jsou vhodné hydrofobní typy membrán. Selektivita membrány je dána jejím složením a koncentrací rozpouštědla v médiu. Většina publikovaných studií využívá ploché nebo tubulární organické polymerní polydimethylsiloxanové (PDMS) a celulóza–acetát–butyrátové (CAB) membrány. PDMS membrány jsou vysoce permeabilní, selektivní a vhodnou modifikací můžeme měnit jejich separační vlastnosti. Polyvinylidenfluoridové a polypropylenové membrány jsou v porovnání s poly(1–trimethylsilyl–1–propyn) (PTMSP) a PDMS membránami mnohem méně selektivní a mechanicky odolné (Huang et al. 2014, García-Ríos et al. 2016, Outram et al. 2017). Dalším hojně používaným typem membrán pro separaci butanolu jsou kapalné membrány. Výhodou kapalných membrán je nízká toxicita vůči produkčním mikroorganismům, neboť je extrakční

činidlo (například vysoce selektivní trioktylamin) zakotveno v pórech nosné přepážky a nedochází tak k přímému kontaktu činidla s mikroorganismem (Hasal et al. 2007, García-Ríos et al. 2016). V poslední řadě nesmíme zapomenout na anorganické termostabilní a mechanicky odolné zeolitové tubulární membrány, které vykazují nejlepší separační faktor (Huang et al. 2008).

3.4 Kapalinová extrakce

Kapalinová extrakce je vysoce selektivní, separační proces, kdy můžeme požadovaným solventem extrahovat jednu nebo více rozpuštěných látek ze směsi. Je založena na rozdílech distribučních koeficientů vzájemně nemísitelné vodné a organické fáze. V našem případě tvoří vodnou fázi kultivační médium a organickou fázi extrakční činidlo s organickými rozpouštědly. Distribuční (rozdělovací) koeficient je poměr rovnovážných koncentrací rozpuštěné látky ve dvoufázovém systému dvou omezeně mísitelných kapalin. (Huang et al. 2014, Outram et al. 2017).

3.4.1 Extrakční činidla

Kritéria pro výběr extrakčního solventu, která jsou nutná brát v potaz, jsou například cena, chemická stabilita, viskozita, rozpustnost ve vodě, separační faktor či distribuční koeficient, mísitelnost s jednotlivými fázemi, biokompatibilita s produkčními mikroorganismy, toxicita, bod varu či zdravotní rizika a rizika pro životní prostředí (Huang et al. 2008). Žádné z dostupných činidel nesplňuje všechny požadavky dle představ, a proto je nutné jednotlivé solventy porovnat a nalézt vhodný kompromis. Munson a King seřadili jednotlivé třídy organických sloučenin podle rostoucího distribučního koeficientu pro ethanol: uhlovodíky < ethery < ketony < aminy < estery < alkoholy < karboxylové kyseliny (Offeman et al. 2006, Munson, King 1984). Velikost distribučního koeficientu rozpouštědel pro ethanol vyjadřuje separační účinnost. Jestliže máme činidlo s nízkým distribučním koeficientem pro ethanol, koncentrace vyextrahovaného ethanolu z fermentačního média bude v extraktantu nízká, a proto bude nutné použít mnohem větší objemy daného extrakčního činidla. Dalším problémem při výběru extrakčního činidla je jeho toxicita vůči kvasinkám. Možným řešením tohoto problému je použití netoxických, přírodních organických sloučenin, jako jsou mastné kyseliny získané z rostlinných a živočišných tuků, avšak mastné kyseliny mají pro ethanol nízký distribuční koeficient (Boudreau, Hill 2006).

Qun et al. prokázali, že metabolická aktivita kvasinek souvisí i s počtem uhlíků v řetězci dané extrakční organické sloučeniny čili s její molekulovou hmotností. Testovali několik uhlovodíkových rozpouštědel a zjistili, že kvasinky jsou schopné mnohem lépe tolerovat dodekan oproti hexanu. Dále zjistili, že kvasinky jsou více odolné vůči hydrofobním rozpouštědlům. Hydrofilní organická rozpouštědla mnohem více vážou vodu z kvasinkových buněk, která je pro správnou funkci enzymů nezbytná. Při nedostatku vody dochází k inhibici enzymů a dehydrataci buňky (Qun, Shanjing, Lehe 2002, Huang et al. 2014).

Potenciálními extrakčními činidly pro butanol jsou například, *n*-dodekanol, chemicky modifikované rostlinné oleje, glyceryl tributyrát, isopropylmyristát a ethylstearát. Tyto látky mají výrazně vyšší body varu než butanol, což příznivě ovlivňuje separaci butanolu pomocí destilace (Groot et al. 1990, Huang et al. 2014). Vhodným extraktantem je rovněž oleyl alkohol (oktadec-9-en-1-ol), protože má skvělý distribuční koeficient pro butanol a vůči mikroorganismům vykazuje velmi nízkou toxicitu (Outram et al. 2017).

3.4.2 Pertrakce

Největším problémem extrakce kapalina–kapalina je inhibiční až letální charakter jednotlivých použitých extrakčních činidel vůči produkčnímu mikroorganismu (viz kapitola 2.3) či tvorba emulzí. Tyto problémy mohou být odstraněny použitím membrány, kterou umístíme mezi kultivační médium a organickou fází. Toto „vylepšení“ extrakce se označuje jako pertrakce. Extrakční činidlo je odděleno od fermentačního média, butanol difunduje skrz membránu a poté dochází k extrakci. Pertrakce zabraňuje přímému toxickému působení extraktantu na buňky, a proto může být použito i toxické činidlo s vysokým distribučním koeficientem a selektivitou pro požadovaný alkohol (Huang et al. 2014). Podmínkou úspěšné separace je použití takového typu membrány, který by byl vysoce selektivní pro ethanol nebo *n*-butanol (musí docházet k difúzi těchto alkoholů membránou přednostně v porovnání s ostatními složkami). Jedním z nejvhodnějších typů membrán pro separaci jsou silikátové či polypropylenové membrány (Lee et al. 2008, Friber et al. 2013, Outram et al. 2017).

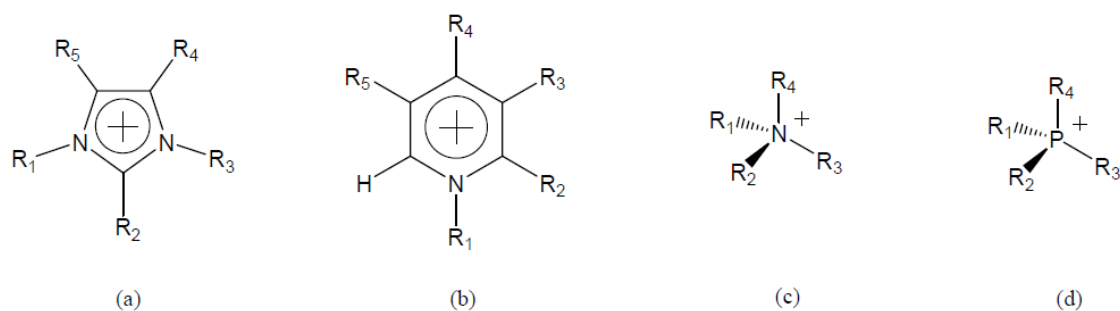
3.4.3 Extraktivní fermentace

Kombinace extrakce kapalina–kapalina a fermentačního procesu je tzv. extraktivní fermentace. Principem extraktivní fermentace je částečné odstraňování vzniklého kvasného

ethanolu nebo butanolu vhodným s vodou omezeně mísitelným organickým rozpouštědlem *in situ* během fermentace. Inhibice buněk produktem kvašení je zde výrazně snížena a tím se zvyšuje produktivita daného mikroorganismu (Huang et al. 2014).

3.4.4 Kapalinová extrakce iontovými kapalinami

V současné době je předmětem zájmu také kapalinová extrakce pomocí iontových kapalin (z angl. „ionic liquids“ ILs). ILs jsou sloučeniny organických kationtů a anorganických či organických aniontů s často nižším bodem tání, než je 100 °C. Podle struktury je dělíme do několika skupin. Jsou to především sloučeniny, které obsahují kvartérní dusík, fosfor nebo síru čili kvartérní amoniové, imidazoliové, pyridiniové, kvartérní fosfoniové a sulfoniové soli (obr. 5). Existují i speciální ILs s teplotu tání nižší, než je laboratorní teplota (pod 25 °C). Obecně ILs disponují celou řadou fyzikálně–chemických výhod – jsou vysoce termostabilní, relativně málo toxické a těkavé, nehořlavé, mají skvělé solvatační vlastnosti, vysokou separační schopnost a vyšší hustotu než některá organická rozpouštědla a voda. Fosfoniové soli jsou v porovnání s imidazoliovými solemi levnější a stabilnější, ale vykazují nižší hustotu, než má voda. Vůči mikroorganismům jsou také méně toxické, protože imidazoliové soli mají mimo jiné ve farmaceutickém průmyslu široké antibiotické účinky (Neves et al. 2011). Konkrétním příkladem nejčastěji testovaných a zároveň komerčně dostupných ILs jsou například 1–butyl–3–methylimidazolium chlorid ($[\text{BMIM}]^+[\text{Cl}]^-$), 1–butyl–3–methylimidazoliumhexafluorofosfát ($[\text{BMIM}]^+[\text{PF}_6]^-$), Aliquat 336 (trioktylmethylammoniumchlorid). ILs lze kromě separačních metod využít i ve farmaceutickém průmyslu, jako reakční prostředí pro rozpouštění plynů, katalyzátory v syntetických reakcích či elektrolyty (Wang et al. 2010, Huang et al. 2014).



Obr. 5 Příklady struktur vybraných iontových kapalin. (a) imidazolové, (b) pyridinové, (c) kvartérní amoniové, (d) kvartérní fosfoniové soli. Převzato a upraveno z (Wang et al. 2010).

3.5 Adsorpce

Adsorpce je metoda, kterou lze účinně odstranit ethanol či butanol z média za výrazně menší spotřeby energie. Adsorpce je charakterizována tzv. adsorpční rovnováhou, která vyjadřuje závislost koncentrace adsorbované látky na teplotě a tlaku. Principem metody je nekovalentní vazba složek plynné nebo kapalně směsi na povrch pevné látky (adsorbentu) (Huang et al. 2014).

Vhodnými anorganickými adsorbenty jsou například hlinitokřemičitá – zeolitová molekulární síta s velikostí pórů 0,30 nm, která jsou vhodná pro zachycení polárních rozpouštědel. Velikost molekul ethanolu se pohybuje okolo 0,44 nm, zatímco molekuly vody jsou menší, než je samotná velikost pórů. Při vyšších teplotách dochází k velmi silné adsorbci vody na zeolit, což je jeden z problémů při použití těchto adsorbentů (Huang et al. 2008). Další hojně využívané adsorbenty jsou silikalit, chlorid lithný, polyvinylpyridin či aktivní uhlí. Silikalit (molekulové síto na bázi křemičitanů) lze snadno zregenerovat zahřátím na teplotu 200 °C (Qureshi et al. 2005, Outram et al. 2017).

Qureshi et al. experimentálně prokázali, že adsorpční technika vyžaduje k separaci butanolu energii okolo 8,1524 kJ/kg butanolu, což je přibližně 3x méně energie než u metody stripování plynem (24,2270 kJ/kg butanolu) a cca 2x méně energie než u pervaporace (13,7896 kJ/kg butanolu) (Qureshi et al. 2005).

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a přístroje

4.1.1 Použité chemikálie

- D–glukóza monohydrát – p.a, Penta s. r. o., $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$
- Tris(2–ethylhexyl)amin >93 % – Tokyo Chemical Industry Co., $C_{24}H_{51}N$
- Tri–n–oktylamin 95 % – ThermoFisher Scientific s. r. o., $[CH_3(CH_2)_7]_3N$
- Tritolylfosfát 90 % – Sigma–Aldrich Co., $C_{21}H_{21}O_4P$
- Tributylfosfát ≥ 99 % – Lach–Ner s. r. o., $C_{12}H_{27}O_4P$
- Rostlinný olej Sunol (slunečnicový) – Gold–Plus Company s. r. o
- Methylester rostlinného oleje – produkt reesterifikace rostlinného oleje Sunol methanolem získaný při provádění úlohy „ZÍSKÁVÁNÍ ESTERŮ MASTNÝCH KYSELIN A GLYCEROLU Z ODPADNÍHO FRITOVACÍHO OLEJE“ v rámci laboratorních cvičení z předmětu Laboratoř z chemických technologií C090, ÚEnviChI, UPa
- Tricaprylmethylammonium chlorid (Aliquat 336) – Sigma–Aldrich Co., $C_{25}H_{48}ClN$
- Rewoquat WE 18 – Brenntag CR spol. s. r. o.
- Kyselina olejová 90 % – Sigma–Aldrich Co., $C_{17}H_{33}COOH$
- Parafínový olej – Sigma–Aldrich Co., C_nH_{2n+2} $n=16\sim 24$
- Cyklooktan ≥ 99 % – Sigma–Aldrich Co., C_8H_{16}
- 1–oktanol – ≥ 99 % – Sigma–Aldrich Co., $C_8H_{18}O$
- Hydroxid sodný – PENTA s. r. o., NaOH
- Jodid draselný – PENTA s. r. o., KI
- Síran měďnatý pentahydrát – LACHEMA a. s., $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- Vinan sodno–draselný – Lach–Ner s. r. o., $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$
- Škrob (rozpuštěný) – LACHEMA s. s., $(C_6H_{10}O_5)_n$
- Kyselina sírová 96 % – Lach–Ner s. r. o., H_2SO_4
- Demineralizovaná voda – H_2O
- Ovocné víno Moje biele/bílé – Wajda a. s.
- Fyziologický roztok – 0,9 % vodný roztok chloridu sodného (připraveno v laboratořích KBBV, UPa) – Penta s. r. o., NaCl
- Karbofuchsin – Sigma–Aldrich co.

- Lugolův roztok – ředěný roztok jódu a jodidu draselného (připraveno v laboratořích KBBV, UPa)
- Violet' krystalová – PENTA s. r. o.

4.1.2 YPD bujón

- Pekařské droždí (*Saccharomyces cerevisiae*) – Uniferm GmbH & Co. KG
- Yeast extract – HiMedia Laboratories
- Pepton – HiMedia Laboratories

YPD bujón obsahuje 10 g kvasničného extraktu, 20 g peptonu, 20 g glukózy na 1 litr destilované vody. Pro přípravu pevné půdy se obvykle přidává 15 g agaru. Pro zabránění kontaminace je nutné připravené médium sterilizovat v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu minimálně 20 minut.

4.1.3 Methylenová modř ve fosfátovém pufru pH 4,6

- Prášková modř methylenová – Lach–Ner s. r. o.; $C_{16}H_{18}ClN_3S.aq$
- 0,2 M Dihydrogenfosforečnan draselný – Penta s. r. o., KH_2PO_4
- 1 M kyselina chlorovodíková – Lach–Ner s. r. o., HCl

Pro přípravu 200 ml vodného roztoku methylenové modři 1:5000 bylo 0,02 g práškové methylenové modři rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. Dále bylo naváženo 2,72 g 0,2 M KH_2PO_4 a rozpuštěno v 100 ml destilované vody. Takto připravený roztok KH_2PO_4 byl upraven 1 M HCl na pH 4,6 a smíchán s vodným roztokem připravené methylenové modři (Demnerová 2001).

4.1.4 Přístroje

- Elektromagnetické míchadlo se StarFish nástavcem Heidolph – Fisher Scientific s.r.o.
- Plynový chromatograf GC-2025, Shimadzu
- Laboratorní váhy – Kern & Sohn GmbH
- Mikropipeta 2–20 μ l – Fisher Scientific s.r.o.
- Světelný mikroskop Nikon Eclipse E200-LED – Nikon Instruments Europe B.V.

- Autokláv – BMT Medical Technology s.r.o.
- Běžné laboratorní sklo a plastové pomůcky

4.2 Testování toxicity extrakčních činidel

Cílem testů bylo experimentální ověření toxicity vybraných extrakčních činidel omezeně mísitelných s vodou vůči kvasinkovým buňkám. Tento krok je důležitý pro zúžení výběru extrakčních činidel, které by bylo možné využít k extrakci produkovaného bioethanolu z fermentačního média. V připravených vzorcích byl určen pomocí tzv. vitálního barvení poměr živých a mrtvých buněk v procentech (Trögl 2008). Jestliže budou kvasinkové buňky schopné tolerovat činidlo a přežijí, vybraný extraktant bude využit pro kontinuální proces kvašení a další experimenty.

4.2.1 Příprava kultivačního média

Do 5 sterilních baněk umístěných na elektromagnetickém míchadle se StarFish bylo přidáno vždy 2 g čerstvých pekařských kvasnic (*Saccharomyces cerevisiae*), 4 g monohydrátu D–glukózy a 200 ml destilované vody. Kultivace kvasinek a alkoholové kvašení probíhaly 24 h za teploty 25 °C a otáčkách 280 rpm.

4.2.2 Přídavky jednotlivých činidel

Do 4 připravených baněk s živnou půdou a kvasinkami bylo po 24 h přidáno 4 g monohydrátu D–glukózy a vytárovaným odměrným válečkem přesně 10 ml kapalných extrakčních činidel s velmi malou viskozitou (tris(2–ethylhexyl)amin, tri–n–oktylamin, tritolylfosfát, tributylfosfát). Po každém přídavku požadovaného činidla byl odměrný váleček vypláchnut ethanolem. Do páté baňky bylo přidáno pouze odpovídající množství glukózy a tato baňka sloužila jako blank č. 1 (tzn. že baňka neobsahovala žádné extrakční činidlo). Z každé baňky byly po 72 h odebrány vzorky pro vitální barvení.

Následující týden proběhla série pokusů s dalšími vybranými organickými rozpouštědly. Začátek experimentu probíhal stejně jako u předchozích. První dvě činidla – rostlinný olej a methylester rostlinného oleje byly do baněk přidány po 10 ml vytárovaným

odměrným válečkem. Do třetí baňky bylo přidáno 10,08 g Aliquatu 336 a do čtvrté 10,03 g Rewoquatu WE 18. Oproti předchozím činidlům nebylo možné tyto dvě přidávat odměrným válečkem, protože Aliquat 336 je velmi viskózní kapalina a Rewoquat WE 18 je viskózní tuhá látka, a proto byly pro přesné změření hmotnosti přísadků využity laboratorní váhy. Z každé baňky byly po 72 h opět odebrány vzorky pro vitální barvení.

Třetí týden byla testována poslední čtveřice extrakčních činidel a blank č. 2. Po přidavku 4 g glukózy bylo do jednotlivých baněk přidáno 10 ml kyseliny olejové, parafinového oleje, cyklooktanu a 1-oktanolu. Poslední baňka byl blank č. 2, který obsahoval optimální množství glukózy, vitaminů a dalších živin potřebných pro fermentační proces (baňka s YPD bujónem) (Demnerová 2001).

4.2.3 Vitální barvení kvasinek

Vitální barvení je používáno pro určení počtu živých a mrtvých buněk. Zvolené barvivo obarví pouze mrtvé buňky, protože jejich cytoplazmatická membrána je po smrti pro barvivo více propustná. K barvení se nejčastěji využívá methylenová modř ve vhodném pufru o pH 4,6 (fosfátový pufr) (Trögl 2008).

Každý vzorek byl před vlastním barvením 5x zředěn fyziologickým roztokem. Na podložní mikroskopické sklíčko byla nanášena kapka suspenze kvasinek. K tomu byla přikápnuta kapka předem připravené methylenové modři ve fosfátovém pufru o pH 4,6 a suspenze se přiklopila krycím sklíčkem. Roztok methylenové modři je sám o sobě pro kvasinky toxický, a proto je nutné počítání buněk provést ihned. Kvasinky byly pozorovány pod optickým mikroskopem při zvětšení 400x ve světlém poli. V 10 zorných polích se spočítaly živé (neobarvené) a mrtvé (obarvené) buňky a dále byl vypočítán jejich průměrný procentuální obsah (tab. 3).

4.2.4 Barvení dle Grama

Gramovo barvení je využíváno pro odlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií. Tyto bakterie se liší strukturou buněčné stěny. Buněčná stěna grampozitivních bakterií obsahuje velké množství peptidoglykanu a kyseliny teichoové a proto je zabráněno vymývání roztoku krystalové violeti a jódu, které procházejí do buňky a uvnitř spolu tvoří modrý komplex. Proto se grampozitivní bakterie zbarví dle Grama modře. Buněčná stěna gramnegativních

bakterií obsahuje pouze malé množství peptidoglykanu a také postrádá kyselinu teichoovou. Při promývání preparátu alkoholem dochází k vymytí komplexu krystalové violeti s jódem a odbarvení gramnegativních bakterií. Pro vizualizaci se tyto bakterie dobarvují karbolfuchsinem. Gramnegativní bakterie mají červené zbarvení.

Na podložní mikroskopické sklíčko byla nanесena kapka fyziologického roztoku, ve kterém byla rozetřena kvasinková suspenze. Po vysušení byl vzorek fixován protažením v plameni. Na fixovaný preparát bylo nanесeno několik kapek krystalové violeti a barvivo se nechalo působit 30 sekund. Poté byl na 30 sekund přidán Lugolův roztok. Po odlití směsi roztoků byl preparát opláchnut alkoholem, vodou, a nakonec byl dobarven několika kapkami karbolfuchsinu po dobu 1 minuty. Preparát byl pozorován pro imerzním olejem při zvětšení 1000x (Trögl 2008).

4.3 Extraktivní fermentace

Principem extraktivní fermentace je částečné odstraňování vzniklého kvasného ethanolu vhodným s vodou omezeně mísitelným organickým rozpouštědlem během kvašení. Produktivitu procesu životaschopnost kvasinek lze ovlivnit kontinuálním přidáváním glukózy a živin do média v průběhu kvašení. Velkou nevýhodou extraktivní fermentace je riziko bakteriální kontaminace média. Tyto bakterie mohou negativně ovlivňovat vitalitu kvasinek a celý fermentační proces. (Kadlec 2002, Kosaric et al. 2011).

4.3.1 Extraktivní fermentace tritolylfosfátem s recyklací kvasinek

Na základě výsledků z vitálního barvení (tab. 3) byla pro tento pokus využita baňka s tritolylfosfátem. Kvasinky, které byly použity v původním kvasném procesu, kde byla testována toxicita činidel, byly odseparovány a společně s vodnou fází znovu použity pro extraktivní fermentaci tritolylfosfátem. Vodná vrstva s kvasinkami byla přenesena do nové baňky, do které bylo současně přidáno 8 g glukózy. Bylo sledováno, zda fermentační proces bude s recyklovanými kvasinkami opět probíhat.

4.3.2 Extraktivní fermentace pomocí směsí

Do 5 baněk bylo připraveno 200 ml sterilního YPD bujónu. Do každé baňky byly přidány 2 g pekařských kvasnic a kultivace probíhala za laboratorní teploty po dobu 24 h při otáčkách 160 rpm. Po 24 h bylo do čtyřech baněk přidáno 56 g glukózy, 2 g pekařského droždí a 50 ml směsi činidel v poměru 1:1 (tritolylfosfát/ slunečnicový olej; tritolylfosfát/ methylester rostlinného oleje; tritolylfosfát/ kyselina olejová; tritolylfosfát/ parafinový olej). Poslední baňka sloužila jako blank. Po 48 h byla v děličce v prvních dvou baňkách oddělena vodná fáze od organické fáze. Vodná fáze byla použita pro stanovení zbytkového množství glukózy dle Schoorla (kap 4.7).

V baňkách, které obsahovaly směs tritolylfosfát/kyselina olejová a tritolylfosfát/parafinový olej byla provedena opakovaná extrakce s přidavkem 10 g glukózy a 50 ml směsi činidel do vodné fáze. Po 96 h byla v děličce znovu oddělena vodná fáze pro stanovení zbylého množství glukózy dle Schoorla. Zároveň bylo provedeno i vitální barvení kvasinkových buněk pro zhodnocení jejich mortality.

4.4 Produkce maximálního množství ethanolu

Cílem testu bylo dosažení maximální možné koncentrace kvasného ethanolu v médiu a separace vzniklého kvasného ethanolu směsí extrakčních činidel. Je však nutno uvážit fakt, že s vyšším obsahem glukózy v médiu vzrůstají i objemová procenta ethanolu. Konečná koncentrace ethanolu, která může být maximálně okolo 13 % obj., je pro celý kvasný proces limitujícím faktorem. Zároveň byla sledována mortalita kvasinkových buněk.

Fermentace začínala s poměrně vysokou koncentrací sacharidů v médiu. Do dvou baněk bylo přidáno po 100 ml YPD bujónu, 48 g glukózy, 3 g pekařského droždí, 25 ml tritolylfosfátu a 25 ml daného činidla (parafinový olej, kyselina olejová). Třetí baňka sloužila jako blank. Do čtvrté baňky bylo místo kultivačního média přidáno 100 ml neutralizovaného hydrolyzátu papíroviny, 50 g glukózy a 3 g kvasnic. Po 48 hodinách bylo do každé baňky přidáno 25 g glukózy i odpovídající množství živin a provedlo se vitální barvení pro průběžnou kontrolu mortality kvasinek. Po týdnu bylo přidáno dalších 25 g glukózy a fermentace probíhala dalších několik dní až do doby, kdy došlo k vymření celé populace kvasinek. Poté byla oddělena organická fáze obsahující směs použitých organických rozpouštědel od vodné fáze. Titrace byl vyhodnocen zbytek nezreagované glukózy.

Experiment byl rovněž proveden v baňce, která jako extrakční činidlo obsahovala čistý tritolylfosfát. Do baňky bylo přidáno 100 ml YPD bujónu, 25 g glukózy, 3 g pekařských kvasnic a 20 ml tritolylfosfátu. Stejně jako u předchozích experimentů bylo do baňky přidáváno požadované množství glukózy a živin a sledovala se maximální možná doba fermentace.

4.5 Kontinuální proces

Kontinuální proces fermentace je založen na kontinuálním přidávání glukózy, peptonu a kvasničného extraktu do kultivačního média a zároveň snižování obsahu kvasného ethanolu extrakcí pomocí vybraných rozpouštědel. Přiživování média by mohlo umožnit snadnější propagaci kvasinek a prodloužení doby fermentace a částečná separace ethanolu by pomohla zlepšit jejich vitalitu a eventuálně snížit negativní efekt působících vzniklých vedlejších produktů i ethanolového stresu na kvasinky.

Do speciální baňky s bočním vývodem bylo přidáno 250 ml YPD bujónu, 100 g glukózy, 6 g kvasinek a 60 ml předem připravené směsi tritolylfosfátu s parafinovým olejem v poměru 1:1. Kontinuálně byla přidávána glukóza, kvasničný extrakt a pepton. Po několika dnech fermentace byla také oddělována organická fáze směsi extrakčních činidel a přidána nová. Byla stanovena objemová procenta kvasného ethanolu ve vzorku a zároveň byla sledována celková doba kvašení a životaschopnost kvasinek v porovnání s blankem.

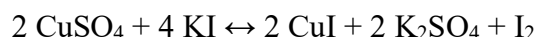
4.6 Extrakce ethanolu z vína

Byla provedena extrakce ethanolu z ovocného vína čistým tritolylfosfátem, a také směsí tritolylfosfátu s parafinovým olejem. Do dělicí nálevky bylo přidáno 100 ml vína a 30 ml směsi tritolylfosfátu s parafinovým olejem. Třepáním byl po dobu 5 minut extrahován ethanol. Stejný pokus byl proveden s 30 ml tritolylfosfátu. Poté byly organické a vodné fáze odděleny pro kvantitativní analýzu extrahovaného ethanolu. Pro ověření uvedeného množství ethanolu ve víně, které bylo cca 10 %, byl rovněž analyzován vzorek čistého ovocného vína před extrakcí.

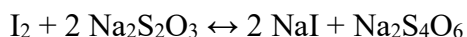
4.7 Stanovení glukózy dle Schoorla

Pomocí aldehydických skupin redukujících sacharidů je redukována dvojmocná měď obsažená ve Fehlingově roztoku na oxid měďný. Jestliže je roztok okyselen kyselinou sírovou,

jsou z komplexu uvolněny nadbytečné měďnaté ionty, které můžeme stanovit jodometricky podle rovnice:



Uvolněný elementární jód je titrován roztokem thiosíranu sodného:



Nejdříve byl rozpuštěním 6,93 g krystalického pentahydrátu síranu měďnatého ve 100 ml destilované vody připraven Fehlingův roztok I a Fehlingův roztok II rozpuštěním 36,4 g vinanu sodno-draselného a 10 g hydroxidu sodného ve 100 ml vody. Do titrační baňky bylo napipetováno 10 ml Fehlingova roztoku I, II, 5 ml přesně odměřeného vzorku vodné fáze se sacharidem a směs byla doplněna na celkový objem 50 ml odpovídajícím množstvím vody. Roztok byl krátce povařen ve vodní lázni a poté byl ochlazen pod tekoucí vodou na laboratorní teplotu. K ochlazenému roztoku bylo přidáno 3 g jodidu draselného rozpuštěného v 10 ml vody, 10 ml zředěné kyseliny sírové (1:4) a vzniklý tmavě hnědozelený roztok byl titrován 0,05 M thiosíranem sodným do světlejšího odstínu. Poté bylo přidáno několik kapek 1 % roztoku škrobu v nasyceném roztoku NaCl a směs byla dotitrována dalším přídatkem thiosíranu sodného do světle růžového až mléčného zbarvení. Za stejných podmínek se provedl slepý pokus, kdy místo vzorku byla do titrační baňky přidána voda a zjišťovalo se celkové množství mědi. Titrace byly pro každý vzorek i slepý pokus provedeny dvakrát. Podle rozdílů spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného u slepého pokusu a vzorku byl stanoven objem spotřebovaného thiosíranu sodného, který odpovídá koncentraci daného sacharidu dle Schoorlovy tab. 1 (Káš et al. 2005).

Tab. 1: Množství glukózy ve vzorku v závislosti na rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného při slepém pokusu a stanovením vzorku podle Schoorlovy metody

| 0,05 M Na ₂ S ₂ O ₃ [ml] | Glukosa [mg] | 0,05 M Na ₂ S ₂ O ₃ [ml] | Glukosa [mg] | 0,05 M Na ₂ S ₂ O ₃ [ml] | Glukosa [mg] |
|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| 1 | 3,2 | 8 | 25,6 | 15 | 49,3 |
| 2 | 6,3 | 9 | 28,9 | 16 | 52,8 |
| 3 | 9,4 | 10 | 32,3 | 17 | 56,3 |
| 4 | 12,6 | 11 | 35,7 | 18 | 59,8 |
| 5 | 15,9 | 12 | 39,0 | 19 | 63,3 |
| 6 | 19,2 | 13 | 42,4 | 20 | 66,9 |
| 7 | 22,4 | 14 | 45,8 | 21 | 70,25 |

4.8 Kvantitativní analýza ethanolu

Pro kvantitativní stanovení ethanolu v organické fázi byla využita plynová chromatografie s přímým nástřikem vzorků a pro analýzu vodných fází metoda statické headspace. Obecně je plynová chromatografie jednou ze separačních metod, které se používají k separaci složek vzorku mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze – stacionární a mobilní. Vzorek je unášen mobilní fází a jeho složky interagují se stacionární fází a rozdělují se na základě rozdílné afinity ke stacionární fází. Metoda headspace je založena na rozdílné těkavosti jednotlivých složek vzorku. Vzorek je nadávkován do vialek, které jsou uzavřeny kovovým víčkem s pryžovým septem. Lahvička je temperována a po ustálení rovnováhy mezi kapalnou a plynou fází, která se nachází v tzv. „hlavovém“ prostoru, je pro analýzu na plynovém chromatografu pomocí autosampleru odebráno přesně definované množství plynné fáze.

Pro stanovení obsahu ethanolu ve vodných a organických fázích byly do odměrných baněk připraveny série kalibračních roztoků ethanolu ve vodě a ethanolu v tritolylfosfátu. Analýza vzorků byla provedena na plynovém chromatografu GC-2025 s autosamplerm AOC-5000 plus. Z naměřených hodnot pro standardy byla sestavena kalibrační přímka a dopočítaly se hmotnostní procenta ethanolu obsaženého ve vzorcích (tab. 2).

Tab. 2: Naměřené plochy píků jednotlivých vzorků a standardů potřebné pro vyhodnocení obsahu ethanolu

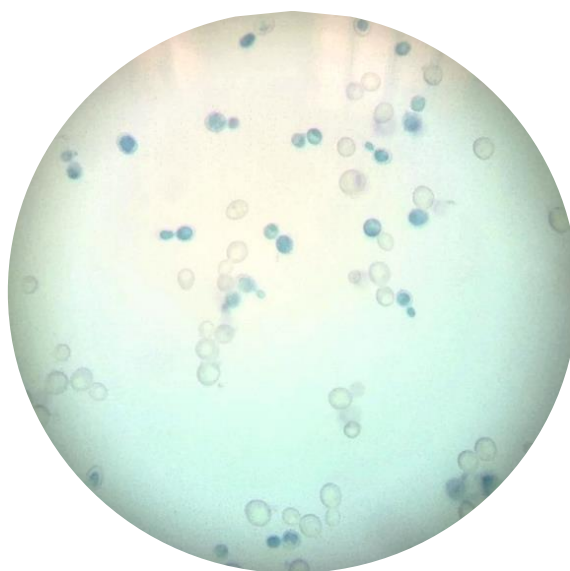
| Vzorek číslo | Průměr | 1. měření | 2. měření | 3. měření | 1. měření | 2. měření | 3. měření |
|--------------|--------------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|
| 1 | 15,01 | 15 | 13,68 | 16,34 | 5 262 945 | 4 762 681 | 5 767 111 |
| 2 | 16,82 | 17,86 | 15,52 | 17,09 | 6 337 353 | 5 455 761 | 6 047 788 |
| 3 | 14,92 | 15,12 | 14,75 | 14,88 | 5 308 401 | 5 165 827 | 5 214 684 |
| 4 | 9,61 | 9,66 | 9,42 | 9,74 | 3 249 760 | 3 157 500 | 3 280 303 |
| 5 | 10,54 | 9,75 | 10,51 | 11,35 | 3 282 600 | 3 571 004 | 3 887 077 |
| 6 | 16,88 | 18,42 | 15,71 | 16,5 | 6 549 259 | 5 527 554 | 5 827 585 |
| 7 | 18,74 | 18,12 | 19,27 | 18,84 | 6 436 173 | 6 870 485 | 6 708 319 |
| Ovocné víno | 10,43 | 11,41 | 9,36 | 10,51 | 3 909 558 | 3 134 363 | 3 570 666 |
| Standard 1 | 2,66 | - | 2,8 | 2,52 | ^a 1 538 843 | 664 270 | 559 677 |
| Standard 2 | 5,62 | 5,53 | 6,13 | 5,2 | 1 692 589 | 1 920 189 | 1 567 715 |
| Standard 3 | 8,92 | 8,5 | 9,51 | 8,77 | 2 812 021 | 3 192 642 | 2 912 028 |
| Standard 4 | 11,28 | 10,68 | 12,06 | 11,1 | 3 632 961 | 4 153 132 | 3 792 335 |
| Standard 5 | 16,07 | 16,07 | 16,31 | 15,82 | 5 666 061 | 5 756 168 | 5 570 019 |

^a Červená hodnota je odlehlá a pro vyhodnocení obsahu ethanolu nebyla použita

5 Výsledky a diskuze

5.1 Toxicita extrakčních činidel

Zvolení vhodného rozpouštědla s minimální toxicitou a maximální extrakční kapacitou (vysokým distribučním koeficientem) je klíčovým krokem pro provedení extraktivní fermentace. Distribuční koeficienty získané z literatury různých solventů pro vybrané produkty fermentačních procesů jsou uvedeny v přílohách (příloha 1). Pomocí vitálního barvení byla určena toxicita vybraných extrakčních činidel vůči kvasinkovým buňkám (obr. 6). Výsledky jsou shrnuty v tab. 3. Veškeré výsledky je nutno brát pouze orientačně, protože určitá část mrtvých buněk ve vzorcích je dána absencí potřebných živin a vitamínů v kultivačním médiu (příkladem jsou výsledky v blank č. 1). Přesné počty veškerých mrtvých a živých buněk ve vzorcích napočítaných v 10 zorných polích jsou uvedeny v přílohách.



Obr. 6 Ukázka vitálního barvení buněk *S. cerevisiae*. Modře jsou obarveny mrtvé kvasinkové buňky, živé zůstávají neobarveny. Pozorováno optickým mikroskopem při zvětšení 400x ve světlém poli. Laboratoře KBBV, UPa.

Jako první skupina rozpouštědel byly vybrány látky, které se využívají při výrobě plastů, nátěrů, laků, barev. Tributylfosfát a tritolylfosfát slouží jako plastifikátory v nitrocelulóze a akrylátových lacích. Tris(2-ethylhexyl)amin a trioktylamin jsou významné aditiva nátěrových barviv a laků. S výjimkou tris(2-ethylhexyl)aminu mají všechny vysoký bod varu (tributylfosfát b. v. 289 °C; tritolylfosfát b. v. 265 °C; trioktylamin b. v. 365 °C; tris(2-ethylhexyl)amin b. v. 163 °C). Společnou vlastností těchto činidel je velmi malá rozpustnost ve vodě. Jsou také vysoce toxické a zdraví škodlivé při požití (veškeré informace dostupné

prostřednictvím elektronických databází ChemicalBook © 2016, Sigma–Aldrich Co. © 2017). Vysoká toxicita tří činidel byla potvrzena, avšak překvapivý výsledek poskytl tritolylfosfát, kdy podíl mrtvých buněk ve vzorku byl 68,4 %. Tritolylfosfát je tedy prvním vybraným extrakčním činidlem, které bylo v dalších experimentech využíváno.

1–oktanol je omezeně mísitelný s vodou a má vysoký distribuční koeficient pro ethanol, avšak stejně jako tři z výše uvedených činidel je pro kvasinky vysoce toxický (Kim et al. 1999). Je obecně známým rozpouštědlem využívaným především jako modelový systém pro určení chování organických sloučenin ve dvoufázovém systému – stanovování rozdělovacího koeficientu oktanol/voda chemické látky. Bod varu tohoto alkoholu je 196 °C (dostupné prostřednictvím elektronické databáze PubChem). Tanaka et al. testovali odolnost imobilizovaných kvasinek na alginát vápenatém gelu v kombinaci s ricinovým oleje vůči oktanolu. Ve svém pokusu prokázali, že kombinace vhodného oleje a adsorbentu má v malé míře nejen protektivní charakter vůči nejen toxickému působení oktanolu, ale i antimikrobiální aktivitu (Tanaka et al. 1987). Cyklooktan je opět s vodou téměř nemísitelná kapalina s bodem varu 151 °C. Využívá se především v syntetické chemii (dostupné prostřednictvím ChemicalBook © 2016). Pro extraktivní fermentaci se jeví jako nejméně vhodné činidlo ze všech testovaných, a to nejen kvůli svému letálnímu účinku na kvasinkové buňky, ale také kvůli nejvyšší schopnosti tvořit s fermentačním médiem emulze.

Další dvě testované látky byly iontového charakteru. První z nich je kvartérní amoniová sůl tricapyrylylmethylammonium chlorid (Aliquat 336) s b. p. 225 °C. Aliquat 336 se používá především jako adsorbent a katalyzátor fázových přenosů. Playne a Smith ve svém výzkumu uvedli, že Aliquat 336 není toxický pro některé anaerobní bakterie (Playne a Smith 1983). Tolerance Aliquatu kvasinkami byla velmi malá a ve fermentačním médiu bylo nalezeno 79,2 % mrtvých buněk. Druhá látka vazelinového charakteru byl Rewoquat WE 18, který se mimo jiné používá jako moderní, biologicky odbouratelný avivážní prostředek (dostupné prostřednictvím Evonik Industries AG, © 2017). Kvůli svému využití nebyla předpokládána vysoká toxicita vůči kvasinkám. Tento předpoklad byl vyvrácen a kvasinky nebyly schopné v prostředí Rewoquatu WE 18 přežít.

Rostlinné oleje a methylester rostlinného oleje jsou zdraví neškodné, netoxické kapaliny, avšak jejich nevýhodou je v porovnání s ostatními rozpouštědly horší schopnost extrakce ethanolu z kvasného média (Offeman et al. 2006, Kim et al. 1999). Tolerance rostlinného oleje je velmi podobná s methylesterem rostlinného oleje. Procentuální podíl

mrtvých buněk ve vzorku s rostlinným olejem byl 33,2 % mrtvých buněk a ve vzorku s methylesterem rostlinného oleje byl 31,5 % mrtvých buněk. Kyselina olejová je ve vodě nerozpustná, vyšší nenasyčená karboxylová kyselina, která je součástí živočišných a rostlinných tuků i olejů. Bod varu této kyseliny je 194–195 °C (dostupné prostřednictvím PubChem). Čtvrtým testovaným činidlem ze skupiny olejů byl parafinový olej využívaný pro farmaceutické a kosmetické účely. Stejně jako řepkový olej a jeho methylester měly kyselina olejová i parafinový olej podobné procentuální zastoupení mrtvých buněk (kyselina olejová 34,6 %; 31,9 % parafinový olej). Kyselina olejová i parafinový olej tvořily s kultivačním médiem emulze, které byly pod mikroskopem viditelné ve formě olejových kapiček, kolem kterých byl viditelný shluk kvasinkových buněk.

Jako blank bylo použito čisté fermentační médium bez přídavku činidla. Blank č. 1 obsahoval optimální množství glukózy. Blank č. 2 obsahoval nejen optimální množství glukózy pro fermentační proces, ale i pepton a kvasničný extrakt. V porovnání s blankem č. 1 bylo prokázáno, že vitalitu kvasinek lze zlepšit obohacením média o potřebné složky, které poskytují potřebný uhlík, dusík, vitamíny a minerálů. V blanku č. 1 bylo nalezeno 9,8 % mrtvých buněk, kdežto blank č. 2 obsahoval pouze 9,1 % mrtvých buněk.

Tab. 3: Toxicita vybraných extrakčních činidel vůči kvasinkovým buňkám po 72 h

| Vzorek č. | Činidlo | Průměrný podíl mrtvých buněk | Toxicita |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|----------|
| 1. | Blank č. 1 | 9,8 % | N |
| 2. | Tris(2-ethylhexyl)amin | 100 % | +++ |
| 3. | Trioktylamin | 100 % | +++ |
| 4. | Tritolylfosfát | 68,4 % | ++ |
| 5. | Tributylfosfát | 100 % | +++ |
| 6. | Rostlinný olej Sunol | 31,5 % | + |
| 7. | Methylester rostlinného oleje | 33,2 % | + |
| 8. | Aliquat 336 | 79,2 % | +++ |

| | | | |
|-----|------------------|--------|----------|
| 9. | Rewoquat we 18 | 100 % | +++ |
| 10. | Blank č. 2 | 9,1 % | N |
| 11. | Kyselina olejová | 34,6 % | + |
| 12. | Parafinový olej | 31,9 % | + |
| 13. | Cyklooktan | 100 % | +++ |
| 14. | 1-oktanol | 100 % | +++ |

+++ Vysoká toxicita (≤ 100 %), ++ Střední toxicita (< 70 %), + Malá toxicita (< 35 %),
 – Netoxické (< 5 %), **N** bez činidla

5.2 Výsledky extraktivní fermentace

Při extraktivní fermentaci byl z média ethanol extrahován pomocí čistého tritolylfosfátu tak, aby bylo zabráněno letálním účinkům ethanolu na kvasinkové buňky. Tritolylfosfát s vyextrahovaným ethanolem byl oddělen od vodné vrstvy, která obsahovala zbylé živé kvasinky. Po přidavku glukózy do vodné fáze fermentační proces opět probíhal a podíl mrtvých buněk z celkového počtu zbylých živých buněk byl 59,6 %. Předpokládá se, že by zbylé kvasinky mohly být odolnější vůči toxickému působení tritolylfosfátu a geny pro rezistenci na toto činidlo by mohly být po přidavku čerstvých kvasinek přeneseny na další generace.

Při separaci organických fází směsi tritolylfosfátu s rostlinným olejem a tritolylfosfátu s methylesterem rostlinného oleje od vodné fáze byly tvořeny emulze a oddělení fází bylo velmi obtížné. Nejsnazší separace obou fází byla u směsi tritolylfosfátu s parafinovým olejem. Oddělení směsi tritolylfosfátu s kyselinou olejovou od vodné fáze byla také poměrně snadná a kvůli tomu byly pro opakovanou extrakci využity zbylé vodné fáze pouze těchto dvou extrakčních směsí. Celkový objem přidávaných extrakčních činidel byl 50 ml (1:1) na 200 ml kultivačního média.

Vitálním barvením kvasinkových buněk, které se nacházely ve vodné fázi, bylo zjištěno procentuální zastoupení mrtvých buněk ve vzorcích. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4. Nejlepší výsledek poskytly baňky se směsí tritolylfosfátu s řepkovým olejem a s methylesterem rostlinného oleje, kdy počet mrtvých buněk ve vzorcích byl 14,4 % a 19,7 %. Počet mrtvých buněk ve vzorcích tritolylfosfátu s kyselinou olejovou a s parafinovým olejem byl téměř shodný

– 24,6 % a 24,4 %. Po druhé a třetí opakované extrakci pomocí vybraných směsí byly kvasinky schopné stále poměrně dobře v prostředí činidel přežít. Z hodnot pro blank vyplývá, že letální koncentrace ethanolu ani po dalších přídavcích glukózy nebylo dosaženo a smrt kvasinek byla pravděpodobně způsobena vyčerpáním živin v médiu. Proto je nutné v dalších experimentech tyto živiny společně s glukózou dodávat.

Tab. 4: Porovnání počtu mrtvých a živých buněk pomocí vitálního barvení v baňkách se směsí organických rozpouštědel a blanku

| Počet mrtvých buněk ve vzorku v procentech | | | |
|---|--|--|--|
| Činidlo | 1. EXTRAKCE Celkový obsah glukózy 60 g /200 ml kultivačního média | 2. EXTRAKCE Celkový obsah glukózy 70 g /200 ml kultivačního média | 3. EXTRAKCE Celkový obsah glukózy 80 g /200 ml kultivačního média |
| Tritolylfosfát + řepkový olej | 14,4 % | – | – |
| Tritolylfosfát + Methylester rostlinného oleje | 19,7 % | – | – |
| Tritolylfosfát + Kyselina olejová | 24,6 % | 39,5 % | 45,7 % |
| Tritolylfosfát + Parafinový olej | 24,4 % | 32 % | 39,8 % |

| Počet mrtvých buněk v blanku po přídavku glukózy | |
|--|--------|
| Blank s celkovým obsahem glukózy 60 g /200 ml kultivačního média | 12,1 % |
| Blank s celkovým obsahem glukózy 70 g /200 ml kultivačního média | 54,3 % |
| Blank s celkovým obsahem glukózy 80 g /200 ml kultivačního média | 62,5 % |

5.2.1 Stanovení glukózy dle Schoorla

Ve vodné fázi jednotlivých vzorků bylo titrační metodou dle Schoorla stanoveno zbytkové množství glukózy, která nebyla při fermentaci spotřebována pro přeměnu na bioethanol. Pomocí Schoorlovy tabulky bylo z rozdílů spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného při slepém pokusu a vzorků po zaokrouhlení určeno množství glukózy v 5 ml vzorku. Výsledky jsou shrnuty v tab. 5.

Tab. 5: Vyhodnocení obsahu nezreagované glukózy ve vzorcích dle Schoorla

| 1. EXTRAKCE | | | | | |
|--|----------------------------------|------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| (Celkový obsah glukózy 60 g / 200 ml kultivačního média) | | | | | |
| Činidlo | Spotřeba thiosíranu sodného [ml] | | Rozdíl spotřeb thiosíranu sodného vzorku a slepého pokusu [ml] | Množství glukózy v 5 ml vzorku [mg] | Množství glukózy v 200 ml vzorku [g] |
| Tritolylfosfát + řepkový olej | 44,2 | 44,6 | 8,45 | 28,9 | 1,156 |
| Tritolylfosfát + methylester rostlinného oleje | 33,9 | 34,6 | 18,6 | 63,3 | 2,532 |
| Tritolylfosfát + kyselina olejová | 48,5 | 48,8 | 4,2 | 12,6 | 0,504 |
| Tritolylfosfát + parafínový olej | 51 | 50,4 | 2,15 | 6,3 | 0,252 |
| Blank | 51,5 | 50,9 | 1,65 | 6,3 | 0,252 |
| Slepý pokus | 52,5 | 53,2 | | | |

| 2. EXTRAKCE | | | | | |
|--|----------------------------------|------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| + přídavek 10 g glukózy (celkový obsah glukózy 70 g / 200 ml kultivačního média) | | | | | |
| Činidlo | Spotřeba thiosíranu sodného [ml] | | Rozdíl spotřeb thiosíranu sodného vzorku a slepého pokusu [ml] | Množství glukózy v 5 ml vzorku [mg] | Množství glukózy v 200 ml vzorku [g] |
| Tritolylfosfát + kyselina olejová | 42,8 | 43,6 | 9,65 | 32,3 | 1,292 |
| Tritolylfosfát + parafínový olej | 44,1 | 47,8 | 6,9 | 22,4 | 0,896 |
| Blank | 48,6 | 49,1 | 3,9 | 12,6 | 0,504 |
| 3. EXTRAKCE | | | | | |
| + přídavek 10 g glukózy (celkový obsah glukózy 80 g / 200 ml kultivačního média) | | | | | |
| Činidlo | Spotřeba thiosíranu sodného [ml] | | Rozdíl spotřeb thiosíranu sodného vzorku a slepého pokusu [ml] | Množství glukózy v 5 ml vzorku [mg] | Množství glukózy v 200 ml vzorku [g] |
| Tritolylfosfát + kyselina olejová | 39,2 | 37,3 | 14,6 | 49,3 | 1,972 |
| Tritolylfosfát + parafínový olej | 43,9 | 39,5 | 11,15 | 35,7 | 1,428 |
| Blank | 42,5 | 40,8 | 11,2 | 35,7 | 1,428 |

5.3 Výsledky produkce maximálního množství ethanolu

Byl proveden experiment pro zjištění maximálního množství vyprodukovaného kvasného ethanolu. Kvasný proces probíhal u blanku celkem 18 dní, což je o 4 dny déle než u baňky, která místo YPD živného média obsahovala pouze vodný filtrát po hydrolyze celulózy. Důvodem zkrácení doby fermentace u vzorku hydrolyzátu byla pravděpodobně absence peptonu a kvasničného extraktu, které jsou důležitým exogenním zdrojem uhlíku, dusíku, vitamínů a minerálů. Kvasinky se zároveň nacházely ve stresovém prostředí způsobeném zvýšenou koncentrací ethanolu v médiu, a to mělo za následek rychlejší inhibiči propagace, zastavení růstu a ovlivnění životaschopnosti kvasinkových buněk než ve vzorcích s extrakčními

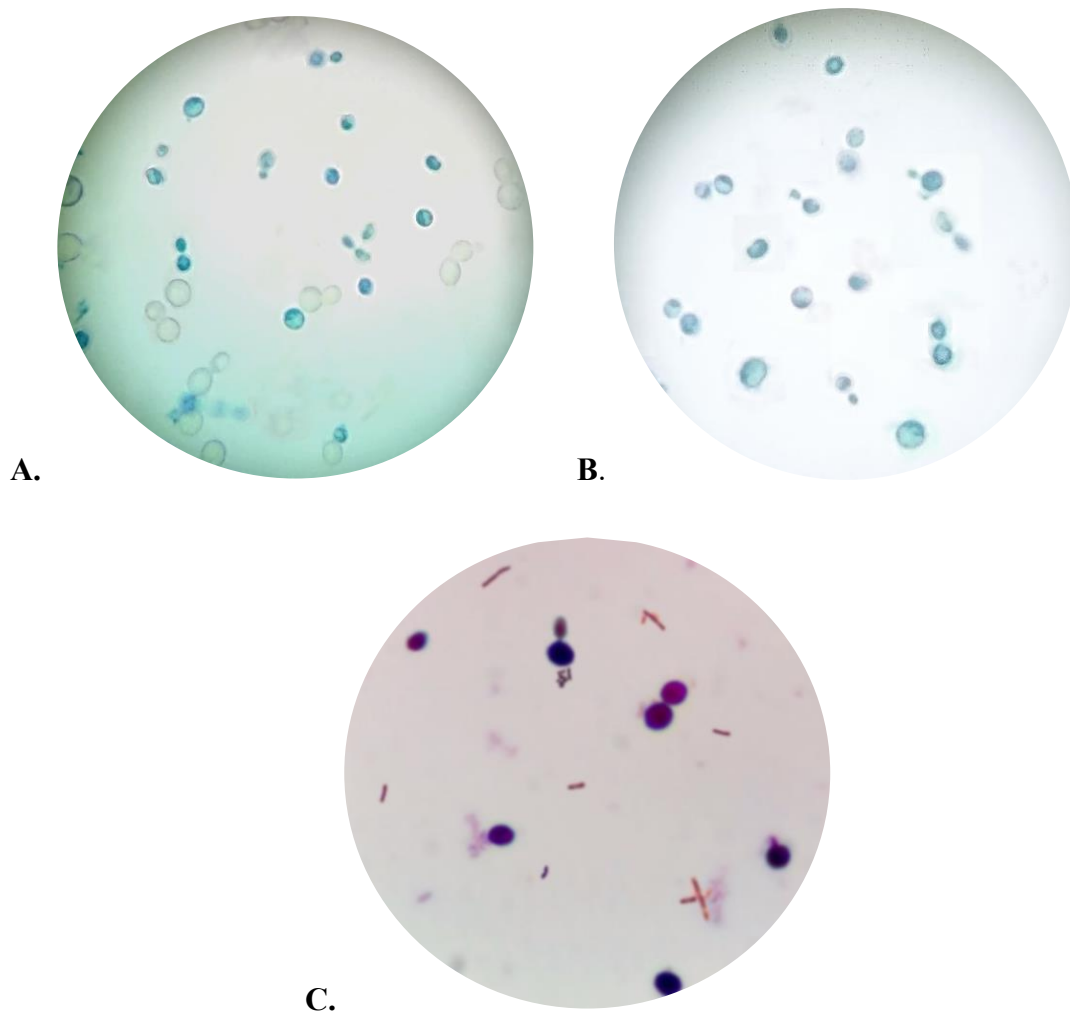
činidly. Celkové množství přidaného cukru u vzorku hydrolyzátu bylo 100 g na 100 ml média, což dle kvantitativní analýzy odpovídalo 15,01 % obsahu ethanolu a 25,57 % vypočítaného teoretického hmotnostního množství ethanolu. Celkové přidané množství glukózy u blanku bylo 125 g/100 ml média a to odpovídá 28,41 % teoretického hmotnostního obsahu ethanolu ve vzorku. V tab. 6 jsou uvedeny obsahy zbylé nezreagované glukózy v obou vzorcích. Na obr. 7 (A);(B) je rovněž na základě vitálního barvení vyobrazeno srovnání obou vzorků po 14 dnech kvašení. V blanku jsou viditelné živé kvasinkové buňky v porovnání se vzorkem hydrolyzátu, kde došlo k úplnému vymření populace kvasinek. Na obr. 7 (C) je zachycena ukázka bakteriální kontaminace, jež byla přítomna v obou vzorcích. Gramnegativní kontaminující bakterie jsou obarveny červeně, kvasinky jsou grampozitivní – fialové. Kontaminace média je jedním z faktorů, které mohou mírně ovlivňovat výsledky celé experimentální části diplomové práce. Za daných laboratorních podmínek nebylo možné této bakteriální kontaminaci zabránit.

Tab. 6: Vyhodnocení zbytkového obsahu glukózy v blanku a ve vzorku s neutralizovaným hydrolyzátem papíroviny

| | Spotřeba thiosíranu sodného [ml] | | Rozdíl spotřeb thiosíranu sodného vzorku a slepého pokusu [ml] | Množství glukózy v 5 ml vzorku [mg] | Množství glukózy v 200 ml vzorku [g] |
|------------------------------------|----------------------------------|------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| | 43,1 | 42,4 | | | |
| ^a Blank | 43,1 | 42,4 | 10,1 | 0,0323 | 1,292 |
| ^b Hydrolyzát papíroviny | 39,8 | 40,5 | 12,7 | 0,0424 | 1,696 |

^a Obsah glukózy v blanku – 125 g glukózy na 100 ml kultivačního média

^b Obsah glukózy v hydrolyzátu – 100 g glukózy na 100 ml kultivačního média



Obr. 7 Vitální barvení kvasinkových buněk a barvení dle Grama. Srovnání mrtvých (modré) a živých (neobarvě) kvasinkových buněk v blanku (A) a hydrolyzátu papíroviny (B) po 14 dnech kvašení obarvených vitálním barvením. Pozorováno optickým mikroskopem při zvětšení 400x ve světlém poli. Laboratoře KBBV, UPa. Ukázka bakteriální kontaminace v blanku (C) po 14 dnech kvašení. V médiu jsou přítomné gramnegativní (červené) tyčinkovité bakterie. Pozorováno optickým mikroskopem pod imerzním olejem při zvětšení 1000 x. Laboratoře KBBV, UPa.

Fermentace v baňce obsahující 130 g glukózy na 100 ml kultivačního média a 20 ml samotného tritolylfosfátu probíhala celkem 15. dní. Celková doba kvašení v baňkách, které obsahovaly 50 ml směsi extrakčních činidel (tritolylfosfátu s parafinovým olejem; tritolylfosfátu s kyselinou olejovou) v poměru 1:1 byla 25 a 22 dní. Míra toxicity parafinového oleje a kyseliny olejové vůči kvasinkovým buňkám je téměř shodná. Obě baňky se směsí extrakčních činidel obsahovaly 150 g glukózy na 100 ml kultivačního média. Z tohoto množství glukózy bylo teoreticky fermentováno 30,68 % vypočítaného hmotnostního obsahu ethanolu. Kvůli nejsnazšímu oddělení fází byla pro kvantitativní analýzu využita baňka se směsí tritolylfosfátu a parafinového oleje. Veškerá analytická měření pomocí plynového chromatografu pro zjištění obsahu ethanolu byla prováděna externě na katedře KALCH a

neodpovídají předpokládané skutečnosti, výsledky je proto nutno brát pouze orientačně. Naměřený obsah ethanolu ve vodné fázi byl 16,88 % ethanolu a do tritolylfosfátové organické fáze bylo vyextrahováno 0,5 % ethanolu. Parafinový olej a tritolylfosfát jsou vzájemně omezeně mísitelné kapaliny. Bylo zjištěno, že parafinový olej sloužil jako jakási kapalná membrána, která ochránila kvasinky před přímým toxickým působením tritolylfosfátu, ale zároveň snižoval separační účinnost tritolylfosfátu. V porovnání se samotným tritolylfosfátem byly kvasinky schopné přežít delší dobu a také, než došlo k vymření celé jejich populace, využít větší množství přidané glukózy. Předpokládá se, že prodloužení doby kvašení a zlepšení separace ethanolu by mohlo být realizováno pomocí kontinuálního procesu. V tab. 7 jsou uvedeny obsahy nezreagovaného množství glukózy ve vzorcích.

Tab. 7: Vyhodnocení zbytkového obsahu glukózy ve vzorcích se směsí extraktantů

| Celkový obsah glukózy 150 g / 100 ml kultivačního média | | | | | |
|---|----------------------------------|------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Činidlo | Spotřeba thiosíranu sodného [ml] | | Rozdíl spotřeb thiosíranu sodného vzorku a slepého pokusu [ml] | Množství glukózy v 5 ml vzorku [mg] | Množství glukózy v 200 ml vzorku [g] |
| Tritolylfosfát + kyselina olejová | 40,9 | 42 | 11,4 | 0,0357 | 1,428 |
| Tritolylfosfát + parafinový olej | 45,7 | 47,1 | 6,45 | 0,0224 | 0,896 |

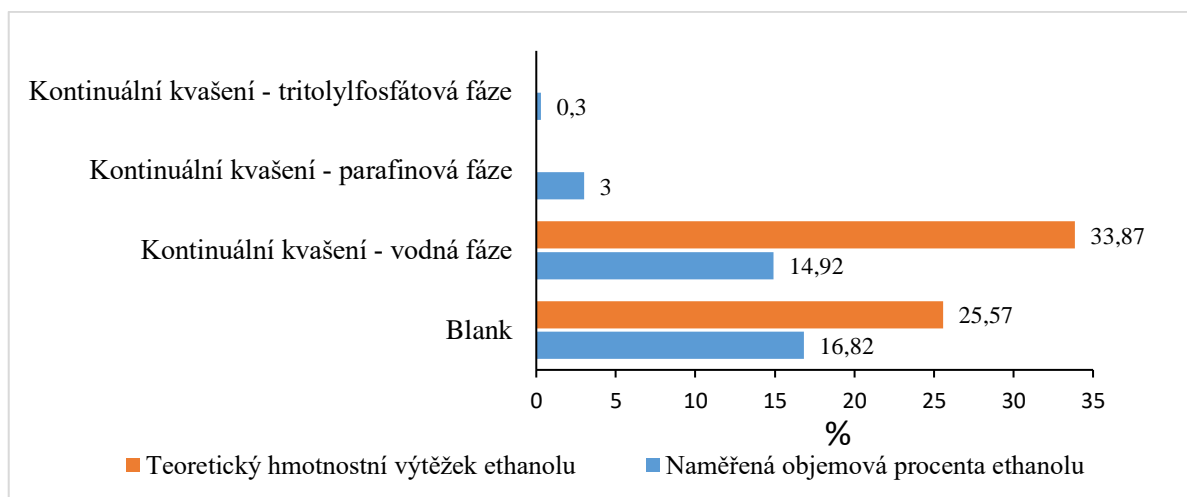
5.4 Výsledky kontinuálního procesu

Kontinuální proces kvašení byl realizován se směsí tritolylfosfátu a parafinového oleje. Do speciální baňky s bočním vývodem bylo na 250 ml kultivačního média přidáváno vždy 40 ml směsi extrakčních činidel (1:1). Celková doba kvašení byla 62 dní a celkový obsah přidané glukózy byl 630 g na 250 ml kultivačního média. V porovnání s experimentem „Produkce maximálního množství ethanolu“ došlo pomocí kontinuálního kvašení k více než dvojnásobnému prodloužení doby fermentace a kvasinky byly schopné konvertovat větší množství přidané glukózy na ethanol. Bylo prokázáno, že kontinuální separaci ethanolu dochází ke zmenšení ethanolového stresu působícího na kvasinky a zároveň jsou z média částečně odstraňovány i vedlejší produkty vznikající při kvašení (například isoamylalkohol, propanol,

methanol, acetoin, ethylacetát, aj.), které mohou mít rovněž negativní vliv na životaschopnost kvasinek. Blank pro kontinuální proces musel být znovu zopakován kvůli chybnému dávkování glukózy. Celková doba fermentace blanku není dobrou výpovědní hodnotou pro porovnání doby kvašení vzorku obsahujícím směs činidel, protože opakování neproběhlo za striktně stejných laboratorních podmínek. Na konci měření blank obsahoval shodné množství přidané glukózy a živin, a proto bylo možné porovnat životaschopnost kvasinek pomocí vitálního barvení. Obě baňky obsahovaly teoreticky stejné množství kvasného ethanolu. Vitálním barvením byly provedeny dvě kontroly mortality kvasinek. Procentuální podíl mrtvých buněk ve vzorku, který obsahoval směs extraktantů a 490 g glukózy na 250 ml bujónu byl 30,8 %. Podíl mrtvých buněk v blanku (245 g glukózy na 125 ml média) činil 37,9 %. Obsah glukózy ve vzorku na konci měření odpovídal 630 g na 250 ml média a v blanku 315 g na 125 ml média. Ve vzorku bylo z celkového počtu kvasinkových buněk nalezeno 31,94 % a v blanku 40,2 % mrtvých buněk.

Průběžná kvantitativní analýza produkovaného ethanolu byla ve vzorku s danými činidly provedena 34. den kvašení a u blanku 18. den kvašení. Vzorek s extrakčními činidly obsahoval 490 g glukózy na 250 ml bujónu a blank 245 g glukózy na 125 ml média. Výsledky měření jsou shrnuty v graf 1. Modře jsou vyznačená naměřená objemová procenta ethanolu a oranžově teoretický výtěžek ethanolu vypočtený z násady glukosy ve vzorcích. Jak již bylo zmíněno, parafinový olej zabraňuje přímému toxickému působení tritolylfosfátu na kvasinky, ale zároveň je snížena separační účinnost tritolylfosfátu, protože byly směsi činidel přidávány vždy v poměru 1:1. Proto je nutné objemy přidávaných jednotlivých extrakčních činidel optimalizovat tak, aby parafinová fáze byla pouze tenká vrstva a ethanol se tak mohl lépe extrahovat až do tritolylfosfátové fáze. Parafinová fáze není čistý parafin, ale tato vrstva je zároveň nasycená tritolylfosfátem z tritolylfosfátové fáze, vodou a extrahovaným ethanolem.

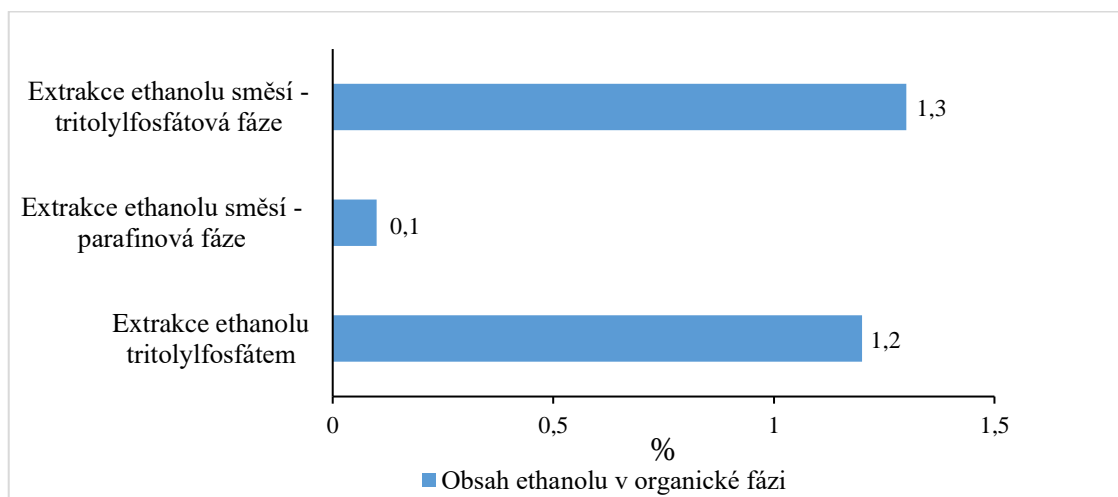
Graf 1: Procentuální obsah ethanolu ve vzorcích



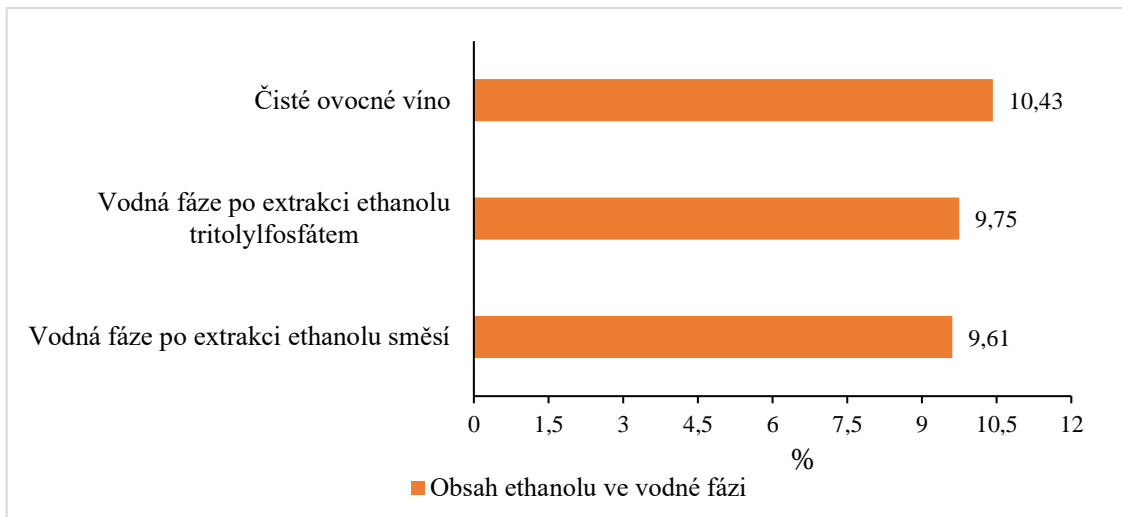
5.5 Výsledky extrakce ethanolu z vína

Z ovocného vína byl čistým tritolylfosfátem, ale i směsí tritolylfosfátu s parafinovým olejem extrahován ethanol. Čistého tritolylfosfátu bylo přidáno 30 ml na 100 ml krabicového vína. Ve druhé dělicí nálevce byl ze stejného množství vína 30 ml (1:1) směsi extrakčních činidel separován ethanol. Pomocí plynového chromatografu byly analyzovány jednotlivé fáze. Výsledky procentuálního obsahu ethanolu jsou zobrazeny na graf 2 a graf 3.

Graf 2: Analýza organických fází po extrakci ethanolu z vína



Graf 3: Analýza čistého ovocného vína a vodných fází po extrakci ethanolu z vína



6 Závěr

V posledních několika desetiletích je efektivní výroba biopaliv především kvůli ubývajícím zásobám fosilních paliv předmětem zájmu. Hledají se alternativní obnovitelné zdroje použitelné pro jejich výrobu. Zkoumají a rozvíjí se vhodné separační metody, které by mohly nahradit tradičně využívanou destilaci, byly by méně energeticky nákladné, zajistily by vyšší produktivitu celého procesu a případně odstranily některé nežádoucí problémy (jako je především toxicita produktů, rozpouštědel, ...) a technologické stresy působící na kvasinky v průběhu fermentace. Teoretická část diplomové práce zahrnuje literární rešerši, která popisuje současný stav využití kvasinek rodu *Saccharomyces* ve fermentačních procesech. Obsahuje také přehled a vzájemné srovnání dostupných separačních metod používaných pro získávání organických chemikálií.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena na ověření použitelnosti vybraných modelových rozpouštědlových systémů v kontinuálním procesu kvašení. Vhodných se jevílo několik extrakčních rozpouštědel omezeně mísitelných s vodou ze skupiny olejů – methylester rostlinného oleje, rostlinný olej, parafinový olej a kyselina olejová. Tyto oleje nejevily vůči kvasinkám vysokou toxicitu, avšak v porovnání s ostatními testovanými rozpouštědly byly kromě parafinového oleje a kyseliny olejové špatně oddělitelné od vodné fáze, a proto byly v dalších experimentech vyřazeny. Kvasinky byly ve velmi omezené míře schopné přežít v prostředí kvartérní amoniové soli Aliquatu 336, však díky jeho vysoké toxicitě byl rovněž z dalších experimentů vyřazen. Překvapivý výsledek poskytl tritolylfosfát, jež je využíván při výrobě plastů a průmyslových barev a je známý svou vysokou toxicitou a negativními účinky na živé organismy. Kvasinkové buňky byly schopné toto činidlo do určité míry tolerovat.

Vybraná extrakční činidla byla využita pro extraktivní fermentaci, což je metoda, jejíž principem je částečné odstraňování kvasného ethanolu z kultivačního média. Bylo sledováno, jaký vliv na životaschopnost kvasinek bude mít čistý tritolylfosfát a dále směsi tritolylfosfátu s příslušnými oleji. Nejlépe se jevila směs tritolylfosfátu s parafinovým olejem. Směs byla použita pro zjištění maximální možné dosažitelné koncentrace ethanolu a také pro kontinuální proces kvašení. Bylo zjištěno, že směs tritolylfosfátu s parafinovým olejem má vůči kvasinkám protektivní charakter. Parafinový olej chránil kvasinky před přímým toxickým působením tritolylfosfátu. Nevýhodou využití této směsi je snížení separační účinnosti tritolylfosfátu parafinovým olejem, a proto musí být v dalších experimentech přidávané objemy těchto jednotlivých extrakčních činidel optimalizovány. Zároveň se musí pracovat za takových

podmínek, při kterých by bylo zabráněno bakteriální kontaminaci vzorků. Bakteriální kontaminace, která byla přítomna ve všech vzorcích se podílela na mírném ovlivnění všech dosažených hodnot.

Klíčovou částí experimentální práce bylo ověření použitelnosti a sledování efektivity vybraných extrakčních rozpouštědel pro kontinuální proces kvašení. Průběžným přidáváním potřebných živin i glukózy do kultivačního média a kontinuální extrakcí vzniklého kvasného ethanolu došlo ke dvojnásobnému prodloužení celkové doby fermentace a zlepšení vitality kvasinek. Separován byl nejen kvasný ethanol, ale i vedlejší produkty vznikající při kvašení. Tritolylfosfát je v kombinaci s dalšími méně toxickými rozpouštědly vhodným kandidátem pro výzkum v oblasti extrakce bioethanolu.

Použitá literatura

1. ANASONTZIS, G. E., CHRISTAKOPOULOS, P. (2014). Challenges in ethanol production with *Fusarium oxysporum* through consolidated bioprocessing. *Bioengineered*, 5(6), 393–395.
2. AZHAR, S. H. M., ABDULLA, R., JAMBO, S. A., MARBAWI, H., GANSAU, J. A., MOHD FAIK, A. A., RODRIGUES, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10(November 2016), 52–61.
3. BECERRA, M., CERDÁN, M. E., GONZÁLEZ-SISO, M.-I. (2015). Biobutanol from cheese whey. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 27.
4. BOUDREAU, T. M., HILL, G. A. (2006). Improved ethanol–water separation using fatty acids. *Process Biochemistry*, 41(4), 980–983.
5. BRANDUARDI, P., LONGO, V., BERTERAME, N. M., ROSSI, G., PORRO, D. (2013). A novel pathway to produce butanol and isobutanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1), 68.
6. BRITO, M., MARTINS, F. (2017). Life cycle assessment of butanol production. *Fuel*, 208, 476–482.
7. CARDONA, C. A., SÁNCHEZ O. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415–2457.
8. CAVICCHIOLI, R., WATSON, K. (1986). Loss of heat–shock acquisition of thermotolerance in yeast is not correlated with loss of heat–shock proteins. *FEBS Letters*, 207(1), 149–152.
9. DE SMIDT, O., DU PREEZ, J. C., & ALBERTYN, J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 967–978.
10. DEMNEROVÁ, K. (2001). *Laboratorní cvičení z mikrobiologie*. Vyd. 3., přepřac. Praha: Vysoká škola chemicko – technologická. ISBN 80–7080–415–7.
11. DICKINSON, J. R., HARRISON, S. J., HEWLINS, M. J. E., DICKINSON, J. R., HARRISON, S. J., HEWLINS, M. J. E. (1998). CELL BIOLOGY AND METABOLISM: An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 273(40), 25751–25756.
12. DUJON, B. (2006). Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends Genet* 22(7): 375–387.

13. ESTRUCH, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 469–486.
14. FARRUGIA, G., BALZAN, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology*, 2(June), 1–21.
15. FLAGFELDT, D. B., SIEWERS, V., HUANG, L., NIELSEN, J. (2009). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 26(10), 545–551.
16. FRIBERT, P., PAULOVÁ, L., PATÁKOVÁ, P., RYCHTERA, M., MELZUCH, K. (2013). Alternativní metody separace kapalných biopaliv z média při fermentaci. *Chemické listy*, 107, 843–847.
17. GARCÍA-RÍOS, E., RAMOS-ALONSO, L., GUILLAMÓN, J. M. (2016). Correlation between low temperature adaptation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 7(AUG), 1–11.
18. GASCH, A. P. (2003). The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses. *Topics in Current Genetics*, 1, 11–70.
19. GHIACI, P., NORBECK, J., & LARSSON, C. (2013). Physiological adaptations of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for improved butanol tolerance. *Biotechnology for Biofuels*, 6(1).
20. GONÇALVES, F. A., RUIZ, H. A., SILVINO DOS SANTOS, E., TEIXEIRA, J. A., DE MACEDO, G. R. (2016). Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignin extraction according to biorefinery concept. *Renewable Energy*, 94, 353–365.
21. GROOT, W. J., SOEDJAK, H. S., DONCK, P. B., LANS, R. G. J. M. VAN, LUYBEN, K. C. A. M., TIMMER, J. M. K. (1990). Butanol recovery from fermentations by liquid–liquid extraction and membrane solvent extraction. *Bioprocess Engineering*, 5, 203–216.
22. HASAL P., SCHREIBER I., ŠNITA D., et al. *Chemické inženýrství I*. 2nd ed. Praha: VŠCHT Praha, 2007. ISBN 978–80–7080–002–7.
23. HAZELWOOD, L. H., DARAN, J.–M. G., VAN MARIS, A. J. A., PRONK, J. T., DICKINSON, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259–2266.

24. HUANG, H. J., RAMASWAMY, S., LIU, Y. (2014). Separation and purification of biobutanol during bioconversion of biomass. *Separation and Purification Technology*, 132(August), 513–540.
25. HUANG, H. J., RAMASWAMY, S., TSCHIRNER, U. W., RAMARAO, B. V. (2008). A review of separation technologies in current and future biorefineries. *Separation and Purification Technology*, 62(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>
26. CHEN, X., NIELSEN, K. F., BORODINA, I., KIELLAND-BRANDT, M. C., KARHUMAA, K. (2011). Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 21.
27. IVANOVA, V., RICHTERA, M., BASAŘOVÁ, G. (1989). Využití imobilizovaných buněk kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ke kontinuální výrobě ethanolu. *Kvasný Průmysl*, 35(2), 41–44.
28. JAMIESON, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511–1527.
29. JAMIESON, D. J. (1998). Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511–1527.
30. JIANJI, W., YONG, Z., SUOJIANG, Z. (2010). The application of ionic liquids in dissolution and separation of lignocellulose, *Clean energy systems and experiences*, Kei Eguchi (Ed.), ISBN: 978–953–307–147–3.
31. JONES, D. T., WOODS, D. R. (1986). Acetone–butanol fermentation revisited. *Microbiological Reviews*, 50(4), 484–524.
32. JOUZANI, G. S., TAHERZADEH, M. J. (2015). Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, 5(3), 152–195.
33. KÁDÁR, Z., MALTHA, S. F., SZENGYEL, Z., RÉCZEY, K., DE LAAT, W. (2007). Ethanol fermentation of various pretreated and hydrolyzed substrates at low initial pH. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140(1–12), 847–858.
34. KADLEC, P. (2002). *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Firma–JK, s.159–164. ISBN: 80–7080–510–2
35. KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. (2005). *Laboratorní techniky biochemie*. 1.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko – technologická. ISBN 80–7080–586–2.
36. KIM, J. K., IANNOTTI, E. L., BAJPAI, R. (1999). Extractive recovery of products from fermentation broths. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4(1), 1–11.

37. KITICHANTAROPAS, Y., BOONCHIRD, C., SUGIYAMA, M., KANEKO, Y., HARASHIMA, S., AUESUKAREE, C. (2016). Cellular mechanisms contributing to multiple stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential use in high-temperature ethanol fermentation. *AMB Express*, 6(1), 107.
38. KNOSHAUG, E. P., ZHANG, M. (2009). Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 153(1–3), 13–20.
39. KOLEK, J., PATÁKOVÁ, P. (2015). Využití genového inženýrství pro zlepšení procesu fermentační výroby butanolu. *Chemické listy*, 109, 830–835 .
40. KOSARIC, N., DUVNJAK, Z., FARKAS, A., SAHM, H., BRINGER-MEYER, S., GOEBEL, O. AND MAYER, D. (2011). Ethanol. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 1–72. ISBN: 978-3-527-30673-2
41. KUMAR, R. S., SHANKAR, T., ANANDAPANDIAN, K. T. K. (2011). Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2(November), 399–405.
42. KUNCOVÁ, G., TRÖGL, J. (2011). Mikroorganismy imobilizované uvnitř anorganických nosičů. *Chemické Listy*, 105(11), 830–838.
43. LAURIN, J. (2015). Biobutanol – motorové palivo druhé generace. *Energie 21*, 8(5), 46–47. Praha: Profi Press s. r. o. ISSN 1803-0394.
44. LEE, S. Y., PARK, J. H., JANG, S. H., NIELSEN, L. K., KIM, J., JUNG, K. S. (2008). Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnology and Bioengineering*, 101(2), 209–228.
45. LI, H., WU, M., XU, L., HOU, J., GUO, T., BAO, X., SHEN, Y. (2015). Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 266–274.
46. LODI, G., PELLEGRINI, L. A. (2016). Recovery of butanol from abe fermentation broth by gas stripping. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 13–18.
47. MAIER, A., OVESEN, J. L., ALLEN, C. L., YORK, R. G., GADAGBUI, B. K., KIRMAN, C. R., QUIÑONES-RIVERA, A. (2015). Safety assessment for ethanol-based topical antiseptic use by health care workers: Evaluation of developmental toxicity potential. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(1), 248–264.
48. MARSZALEK, J., KAMINSKI, W. L. (2012). Efficiency of acetone-butanol-ethanol-water system separation by pervaporation. *Chemical and Process Engineering – Inżynieria Chemiczna I Procesowa*, 33(1), 131–140.

49. MATSUDA, F., FURUSAWA, C., KONDO, T., ISHII, J., SHIMIZU, H., KONDO, A. (2011). Engineering strategy of yeast metabolism for higher alcohol production. *Microbial Cell Factories*, 10(1), 70.
50. MAYANK, R., RANJAN, A., MOHOLKAR, V. S. (2013). Mathematical models of ABE fermentation: Review and analysis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 419–447.
51. MILLAT, T., JANSSEN, H., BAHL, H., FISCHER, R., WOLKENHAUER, O. (2013). Integrative modelling of pH-dependent enzyme activity and transcriptomic regulation of the acetone – butanol – ethanol fermentation of *Clostridium acetobutylicum* in continuous culture. *Microbial Biotechnology*, 6, 526–539.
52. MUNSON, C.L., KING, C.J. (1984). Factors influencing solvent selection for extraction of ethanol from aqueous solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 23(1),109–115.
53. NARAYANAN, V., SÀNCHEZ I NOGUÉ, V., VAN NIEL, E. W. J., GORWA–GRAUSLUND, M. F. (2016). Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 6(1), 59.
54. NAZEM–BOKAEE, H., SENGER, R. S. (2015). ToMI–FBA: A genome–scale metabolic flux based algorithm to select optimum hosts and media formulations for expressing pathways of interest, *AIMS Bioengineering*, 2(4), 335–374.
55. NEVES, C. M. S. S., GRANJO, J. F. O., FREIRE, M. G., ROBERTSON, A., OLIVEIRA, N. M. C., COUTINHO, J. A. P. (2011). Separation of ethanol–water mixtures by liquid–liquid extraction using phosphonium–based ionic liquids. *Green Chemistry*, 13(6), 1517.
56. OFFEMAN, R. D., STEPHENSON, S. K., ROBERTSON, G. H., ORTS, W. J. (2006). Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions using biobased oils, alcohols, and esters. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(2), 153–157.
57. OUTRAM, V., LALANDER, C. A., LEE, J. G. M., DAVIES, E. T., & HARVEY, A. P. (2017). Applied in situ product recovery in ABE fermentation. *Biotechnology Progress*, 33(3), 563–579.
58. PLAYNE, M. J., SMITH, B. R. (1983). Toxicity of organic extraction reagents to anaerobic bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(5), 1251–1265.

59. PONCE, G. H. S. F., ALVES, M., ANDRADE, R. R., MIRANDA, J. C. C., MACIELF, M. R. W., & MACIELF, R. (2015). Simulation, analysis and evaluation of fermentation temperature in an in situ gas. *Blucher Chemical Engineering*, 1(2), 2647–2654.
60. QUN, J., SHANJING, Y., LEHE, M. (2002). Tolerance of immobilized baker's yeast in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 721–725.
61. QURESHI, N., HUGHES, S., MADDOX, I. S., COTTA, M. A. (2005). Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption. *Bioprocess Biosyst Eng*, 27(4), 215–222.
62. QURESHI, N., MADDOX, I.S. (1991). Integration of continuous production and recovery of solvents from whey permeate: use of immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* in a fluidized bed reactor coupled with gas stripping. *Bioprocess Engineering* 6, 63–9.
63. RAMEY, D., YANG S–T. (2004). Production of butyric acid and butanol from biomass. Final report of work performed under contract No.:DE–F–G02–00ER86106 for U.S. Department of Energy, Ohio, USA.
64. RAMOS, C. L., DUARTE, W. F., FREIRE, A. L., DIAS, D. R., ELEUTHERIO, E. C. A., SCHWAN, R. F. (2013). Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(3), 935–944.
65. REBROŠ, M., ROSENBERG, M., KRIŠTOFÍKOVÁ, L., STLOUKAL, R. (2005). Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: Baktérie alebo kvasinky? *Chemické Listy*, 99(6), 402–409.
66. REECE, J. B., WASSERMAN, A. S., URRY, A. L., CAIN, L. M., MINORSKY, V. P., JACKSON, R. (2014). *Campbell biology*. Tenth edition. Boston: Pearson. ISBN 978–0–321–77565–8.
67. SCHADEWEG, V., BOLES, E. (2016). N–butanol production in *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the availability of coenzyme A and cytosolic acetyl–CoA. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 44.
68. SINGH, R., SHUKLA, A., TIWARI, S., & SRIVASTAVA, M. (2014). A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 32, 713–728.
69. STANLEY, D., BANDARA, A., FRASER, S., CHAMBERS, P. J., STANLEY, G. A. (2010). The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 13–24.

70. SWIDAH, R., WANG, H., REID, P. J., AHMED, H. Z., PISANELLI, A. M., PERSAUD, K. C., ASHE, M. P. (2015). Butanol production in *S. cerevisiae* via a synthetic ABE pathway is enhanced by specific metabolic engineering and butanol resistance. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 97.
71. ŠILHÁNKOVÁ, L. (2002). *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80–200–1024–6.
72. TANAKA, H., HARADA, S., KUROSAWA, H., YAJIMA, M. (1987). A new immobilized cell system with protection against toxic solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1), 22–30.
73. TASHIRO, Y., SONOMOTO, K. (2010). Advances in butanol production by clostridia. *Technology and Education Topics in Applied*, 1383–1394.
74. TESFAW, A., ASSEFA, F. (2014). Current trends in bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*: substrate, inhibitor reduction, growth variables, coculture, and immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1–11.
75. THENMOZHI, R., VICTORIA, J. (2013). Optimization and improvement of ethanol production by the incorporation of organic wastes. *Advances in Applied Science Research*, 4(5), 119–123.
76. WOHLBACH, D. J., ROVINSKIY, N., LEWIS, J. A., SARDI, M., SCHACKWITZ, W. S., MARTIN, J. A., GASCH, A. P. (2014). Comparative Genomics of *Saccharomyces cerevisiae* Natural Isolates for Bioenergy Production. *Genome Biol. Evol.*, 6(9), 2557–2566.
77. WU, L., MOTEKI, T., GOKHALE, A. A., FLAHERTY, D. W., TOSTE, F. D. (2016). Production of Fuels and Chemicals from Biomass: Condensation Reactions and Beyond. *Chem*, 1(1), 32–58.
78. XUE, C., WANG, Z., WANG, S., ZHANG, X., CHEN, L., MU, Y., BAI, F. (2016). The vital role of citrate buffer in acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation using corn stover and high–efficient product recovery by vapor stripping–vapor permeation (VSVP) process. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 146
79. ZHANG, G. C., KONG, I. I., WEI, N., PENG, D., TURNER, T. L., SUNG, B. H., JIN, Y. S. (2016). Optimization of an acetate reduction pathway for producing cellulosic ethanol by engineered yeast. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(12), 2587–2596.
80. ZHU, Y. (2007). Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. *Bioprocessing for Value–Added Products from Renewable Resources*. (373–396). Elsevier. ISBN: 978–0–444–52114–9

Internetové zdroje:

1. *National Center for Biotechnology Information* [online]. PubChem BioAssay Database: [cit. 24.10.2017]. Dostupné z:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
2. TRÖGL, J. (2008). NÁVODY PRO CVIČENÍ Z MIKROBIOLOGIE. Skriptum. UJEP [online]. 30. 9. 2008 [cit. 14.10.2017] Dostupné z:
<http://fzp.ujep.cz/~trogl/NavodyMikrobiologie.pdf>
3. *Saccharomyces Genome Database* [online]. © Stanford University, Stanford, CA 94305 [cit. 2018–02–11]. Dostupné z:
<https://www.yeastgenome.org>
4. *Sigma–Aldrich Co.* [online]. Merck KGaA © 2017 [cit. 7. 10. 2017]. Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com>
5. *ChemicalBook* [online]. © 2016 [cit. 14. 10. 2017]. Dostupné z:
<https://www.chemicalbook.com>
6. *Evonik Industries AG* [online]. Evonik © 2017 [cit. 24. 10. 2017]. Dostupné z:
<https://household–care.evonik.com/product/household–care/en/application–areas/laundry–care/fabric–softeners/pages/product–details.aspx?pid=16887&csm=1&pfc=1805>
7. *BD Diagnostics* [online]. © 2018 [cit. 7. 2. 2018]. Dostupné z:
http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/Difco_BBL/242820.pdf

7 Přílohy

Příloha 1: Distribuční koeficienty různých solventů pro ethanol a butanol

| Product | Solvent | k_d | Product | Solvent | k_d | |
|-------------------------------|-----------------------------------|--|---|--|----------------|--------------------|
| Ethanol | Heptane | 0.056 | Ethanol | Methyl acetate | 0.91 | |
| | n-Dodecane | 0.045 | | Ethyl acetate | 0.70 | |
| | Decane | 0.02 | | Vinyl acetate | 0.21 | |
| | n-Tridecane | 0.04 | | Butyl acetate | 0.26-0.34 | |
| | Tetradecane | 0.10 | | Isobutyl acetate | 0.21 | |
| | Hexadecane | 0.02 | | tert-Butyl acetate | 0.24 | |
| | Hexane | 0.07 | | n-Propyl acetate | 0.30 | |
| | Hexanes mix | 0.05 | | Ethyl formate | 0.23 | |
| | Cyclohexane | 0.0066-0.066 | | Ethyl butyrate | 0.39 | |
| | Phenylcyclo-hexane | 0.0078 | | Ethyl propionate | 2.53 | |
| | Cyclooctane | 0.02 | | n-Butyl phthalate | 0.10 | |
| | Isopentane | 0.20 | | Dibutyl phthalate | 0.651 | |
| | 2,2,4-trimethyl-pentane | 0.02 | | n-Hexyl ether | 0.037 | |
| | 1-Heptene | 0.04 | | | | |
| | Ethanol | Benzene | | 0.046-0.092 | Ethanol | Methylene chloride |
| Ethylbenzene | | 0.029 | Carbon tetra-chloride | 0.021 | | |
| Diethylbenzene | | 0.022 | Dichloromethane | 0.28 | | |
| Cumene | | 0.028-0.18 | Tetrachloro-methane | 0.038 | | |
| Toluene | | 0.034-0.085 | 1,2-Dichloro-ethane | 0.074-0.12 | | |
| o-Xylene | | 0.02-0.03 | 1,1,1-Trichloro-ethane | 0.09-0.12 | | |
| m-Xylene | | 0.06 | Freon 11 | 0.011-0.21 | | |
| p-Xylene | | 0.06 | Freon E | 0.21 | | |
| 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene | | 0.0029-0.05 | Freon 113 | 0.094 | | |
| | | | Freon 214 | 0.0087 | | |
| | | | n-Decylbromide | 0.0099 | | |
| | | | Chloroform | 0.12 | | |
| Ethanol | 1-Pentanol | 0.078 | Ethanol | Castor oil | 0.08-0.22 | |
| | 1-Hexanol | 1.0-1.2 | | Olive oil | 0.04 | |
| | 1-Octanol | 0.50-0.64 | | Tung oil | 0.01 | |
| | 2-Octanol | 0.60 | | Tempura oil | 0.02 | |
| | 1-Heptanol | 0.75 | Ethanol | PPG P-1200 | 0.58 | |
| | 1-Nonanol | 0.71-0.73 | | PPG 1000 | 0.51 | |
| | 1-Decanol | 0.39-0.57 | Ethanol | 1,2,4-Trichloro benzene | 0.06 | |
| | 1-Tridecanol | 0.22 | | Nitrobenzene | 0.091-0.092 | |
| | 4-Decanol | 0.32 | | Octadecafluoro-decalin | 0.74 | |
| | 1-Dodecanol | 0.21-0.59 | Ethanol | Tributyl phosphate | 0.54-0.886 | |
| | 3-Methylcyclo-hexanol | 0.93 | | Triisobutyl phosphate | 0.65 | |
| | 3-Methyl-3-pentanol | 1.3 | | Tris(2-methylbutyl) phosphate | 0.44 | |
| | 4-Methyl-2-pentanol | 1.1 | | Tri-2-ethylhexyl-phosphate | 0.23 | |
| | 2,2-Dimethyl-3-octanol | 0.31 | | Diamyl amyl phosphate | 0.56 | |
| | 2,4-Dimethyl-3-pentanol | 0.59 | | Ethanol | Amberlite XLA3 | 0.0044 |
| | 2,4-Dimethyl-3-heptanol | 0.38 | Adogen 364 | | 0.017 | |
| | 2,6-Dimethyl-4-heptanol | 0.53 | Adogen 368 | | 0.04 | |
| | 3,7-Dimethyl-3-octanol | 0.40 | Ethanol | 52% Toluene (w/w) + 48% ethylhexanoic acid | 0.39 | |
| | 2,3,4-trimethyl-3-pentanol | 0.82 | | 85% Hexan-1-ol + 15% toluene (w/w) | 0.87 | |
| | 2-Ethyl-1-butanol | 0.69-1.03 | | 75% Hexan-1-ol + 25% toluene (w/w) | 0.72 | |
| 2-Ethyl-1-heptanol | 0.48 | 85% 2-Ethyl-1-butanol (w/w) + 15% 2-ethylhexanoic acid | | 0.88 | | |
| 3-Ethyl-3-pentanol | 1.1 | 50% Hexan-1-ol + 50% 2-ethyl-1-butanol(w/w) | | 1.03 | | |
| 3-Ethyl-3-heptanol | 0.44 | 85% Hexan-1-ol + 15% 2-ethylhexanoic acid (w/w) | | 0.83 | | |
| 3-Phenyl-1-propanol | 0.64-0.77 | 85% 2-Ethyl-1-butanol + 15% toluene (w/w) | | 0.89 | | |
| Texanol | 0.36 | Ethanol | | 62% (w/w) 2-Ethyl-hexanoic acid in methylisobutyl ketone | 0.81 | |
| Fine Oxacol | 0.034-0.16 | | | 42.9% (w/w) 2-Ethyl-hexanoic acid in methylisobutyl ketone | 0.76 | |
| Oxacol | 0.022-0.20 | | | 48% (w/w) 2-Ethyl-hexanoic acid in toluene | 0.27 | |
| Oleyl alcohol | 0.22-0.24 | | 50% (w/w) 2-Ethyl-hexanoic acid in diisobutyl ketone | 0.41 | | |
| C-20 Guerbet alcohol | 0.15-0.17 | | 50% (w/w) Neo-decanoic acid in isobutyl heptyl ketone | 0.30 | | |
| Ethanol | Phenol | 2.15 | | 50% (w/w) Neo-decanoic acid in toluene | 0.16 | |
| | o-Isopropylphenol | 1.4 | | 50% (w.w) Adogen 368 in diisobutyl ketone | 0.13 | |
| | 0-tert-Butylphenol | 1.4 | | 50% (w.w) Adogen 368 in tetrachloroethane | 0.30 | |
| Ethanol | 2-Butanone | 0.93 | | 25% (w.w) Adogen 368 in diisobutyl ketone | 0.21 | |
| | 4-Methyl-2-pentanone | 0.34 | | | | |
| | 3-Pentanone | 0.34 | | | | |
| | 3-Heptanone | 0.23 | | | | |
| | 2,6-Dimethyl-4-heptanone | 0.088 | | | | |
| | Methylisobutylketone | 0.5 | | | | |
| | Diisobutylketone | 0.18-0.20 | | | | |
| | Isobutylheptyl ketone | 0.12-0.14 | | | | |
| | Isophorone | 0.79 | | | | |
| Ethanol | Valeric acid | 1.13 | | | | |
| | Hexanoic acid | 0.944-1.1 | | | | |
| | Octanoic acid | 0.525-0.65 | | | | |
| | Oleic acid | 0.047-0.171 | | | | |
| | Isostearic acid | 0.06 | | | | |
| | Ricinoleic acid | 0.17 | | | | |
| | Nonaic acid | 0.464 | | | | |
| | Neodecanoic acid | 0.23 | | | | |
| | 2-Ethyl hexanoic acid | 0.51-0.55 | | | | |
| | 2-Ethyl-4-Methyl-n-pentanoic acid | 0.49 | | | | |

| Product | Solvent | k_d | | | |
|-------------------------------|-------------------------|-----------------------------|----------|------------------------|------------|
| Isopropanol | Oleyl alcohol | 0.90 | Butanol | Phenol | 24.0 |
| | C-20 Guerbe alcohol | 0.88 | | 2-Butanone | 3.50 |
| | Castor oil | 0.61 | | 4-methyl-2-pentanone | 4.02 |
| Butanol | Heptane | 0.21 | | 3-Pentanone | 4.50 |
| | n-Dodecane | 0.13 | | 3-Heptanone | 3.22 |
| | Decane | 0.16 | Butanol | Oleic acid | 1.61- 3.0 |
| | n-Tridecane | 0.14 | | Isostearic acid | 2.2 |
| | Tetradecane | 0.12 | Butanol | Methyl acetate | 3.37 |
| | Hexadecane | 0.11-0.148 | | Ethyl acetate | 4.62 |
| | Hexane | 0.02 | | Vinyl acetate | 2.40 |
| | Hexanes mix | 0.14 | | Butyl acetate | 3.58 |
| | Cyclohexane | 0.27 | | n-Propyl acetate | 4.34 |
| | Cyclooctane | 0.56 | | Ethyl formate | 1.75 |
| | Isopentane | 0.13 | | Ethyl butyrate | 2.86 |
| | 2-Methylpentane | 0.30 | | Ethyl propionate | 3.48 |
| | 2,2,4-Trimethyl-pentane | 0.20 | | n-Butyl phthalate | 1.36 |
| | 1-Heptane | 0.40 | | | |
| | Butanol | Benzene | 0.70 | Butanol | Castor oil |
| Cumene | | 1.70 | Corn oil | | 0.653 |
| Toluene | | 0.93 | Butanol | 1,2,4-Trichlorobenzene | 0.46 |
| o-Xylene | | 0.54 | | Nitrobenzene | 0.93 |
| m-Xylene | | 0.57 | | | |
| p-Xylene | | 0.74 | Butanol | Dichloromethane | 2.14 |
| 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalene | | 0.51 | | Tetrachloromethane | 0.40 |
| | | | | 1,2-Dichloroethane | 1.07 |
| | | 1,1,1-Trichloro- methane | | 0.61 | |
| | | Monofluorotri-chloromethane | | 0.23 | |
| Butanol | 1-Octanol | 5.6-7.33 | | Freon E | 0.31 |
| | 1-Heptanol | 6.62 | | | |
| | 1-Pentanol | 7.48 | | | |
| | 2-Ethyl-1-hexanol | 6.09 | | | |
| | Hexanol | 9.91 | | | |
| | Decanol | 6.20 | | | |
| | Undecanol | 5.55 | | | |
| | Dodecanol | 5.14 | | | |
| | Fine oxocol | 3.0 | | | |
| | Oxocol | 4.7 | | | |
| | Oleyl alcohol | 3.21-4.3 | | | |
| | C-16 Guerbet alcohol | 4.5 | | | |
| C-20 Guerbet alcohol | 3.5 | | | | |

^a Převzato a upraveno z Kim et al 1999

^b Data uváděné v literatuře se mírně mohou lišit v důsledku rozdílného pH, zvolené metody, čistoty rozpouštědel, teploty

Příloha 2: Vitální barvení kvasinkových buněk – Testování toxicity vybraných činidel

| Zorné pole č. | Blank č. 1 | | Tritolylfosfát | | Rostlinný olej | |
|---------------|-------------------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---|--------------------|
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 10 | 52 | 40 | 10 | 16 | 28 |
| 2. | 5 | 36 | 42 | 15 | 19 | 35 |
| 3. | 6 | 48 | 33 | 22 | 31 | 21 |
| 4. | 8 | 55 | 31 | 6 | 18 | 46 |
| 5. | 2 | 65 | 54 | 8 | 2 | 22 |
| 6. | 8 | 57 | 15 | 24 | 6 | 16 |
| 7. | 3 | 81 | 39 | 4 | 10 | 18 |
| 8. | 3 | 61 | 25 | 18 | 7 | 20 |
| 9. | 10 | 79 | 31 | 21 | 8 | 27 |
| 10. | 0 | 57 | 18 | 15 | 17 | 31 |
| Zorné pole č. | Methylester rostlinného oleje | | Aliquat 336 | | Blank č. 2 | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 15 | 33 | 7 | 20 | 14 | 160 |
| 2. | 14 | 34 | 40 | 2 | 28 | 98 |
| 3. | 8 | 35 | 15 | 3 | 9 | 97 |
| 4. | 10 | 18 | 27 | 5 | 16 | 134 |
| 5. | 12 | 20 | 21 | 3 | 13 | 125 |
| 6. | 27 | 17 | 32 | 9 | 4 | 103 |
| 7. | 5 | 26 | 20 | 0 | 19 | 128 |
| 8. | 17 | 20 | 36 | 11 | 6 | 127 |
| 9. | 12 | 40 | 18 | 5 | 18 | 138 |
| 10. | 20 | 39 | 39 | 8 | 0 | 180 |
| Zorné pole č. | Kyselina olejová | | Parafinový olej | | Tritolylfosfát (extraktivní fermentace) | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 41 | 53 | 14 | 17 | 23 | 12 |
| 2. | 39 | 68 | 8 | 19 | 19 | 20 |
| 3. | 23 | 45 | 6 | 24 | 28 | 18 |
| 4. | 11 | 23 | 14 | 31 | 14 | 20 |
| 5. | 43 | 50 | 5 | 15 | 11 | 22 |
| 6. | 4 | 13 | 9 | 17 | 48 | 6 |
| 7. | 38 | 63 | 28 | 37 | 12 | 8 |
| 8. | 12 | 75 | 26 | 48 | 35 | 13 |
| 9. | 39 | 49 | 35 | 62 | 31 | 21 |
| 10. | 41 | 53 | 12 | 51 | 23 | 12 |
| | 39 | 68 | 14 | 17 | 19 | 20 |

Příloha 3: Vitální barvení kvasinkových buněk – Extraktivní fermentace pomocí směsí

| 1. EXTRAKCE | | | | | | |
|---------------|---|--------------------|--|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Zorné pole č. | Tritolylfosfát + řepkový olej | | Tritolylfosfát + methylester rostlinného oleje | | Tritolylfosfát + kyselina olejová | |
| | (celkový obsah glukózy 60 g /200 ml kultivačního média) | | | | | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 11 | 61 | 8 | 21 | 20 | 32 |
| 2. | 2 | 58 | 2 | 18 | 10 | 45 |
| 3. | 9 | 65 | 17 | 39 | 19 | 67 |
| 4. | 17 | 70 | 10 | 57 | 3 | 19 |
| 5. | 3 | 42 | 7 | 40 | 18 | 27 |
| 6. | 5 | 29 | 12 | 29 | 16 | 59 |
| 7. | 2 | 31 | 3 | 46 | 2 | 23 |
| 8. | 13 | 83 | 19 | 48 | 29 | 62 |
| 9. | 8 | 54 | 11 | 51 | 14 | 34 |
| 10. | 15 | 23 | 5 | 23 | 27 | 89 |

| 1. EXTRAKCE | | |
|---------------|---|--------------------|
| Zorné pole č. | Tritolylfosfát + parafinový olej | |
| | (celkový obsah glukózy 60 g /200 ml kultivačního média) | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 14 | 27 |
| 2. | 5 | 35 |
| 3. | 4 | 61 |
| 4. | 28 | 37 |
| 5. | 9 | 22 |
| 6. | 26 | 58 |
| 7. | 11 | 43 |
| 8. | 12 | 64 |
| 9. | 24 | 78 |
| 10. | 31 | 79 |

| Zorné pole č. | 2. EXTRAKCE | | | |
|---------------|--|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Tritolylfosfát + parafínový olej | | Tritolylfosfát + kyselina olejová | |
| | (celkový obsah glukózy 70 g/200 ml kultivačného média) | | | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 58 | 84 | 23 | 57 |
| 2. | 34 | 91 | 57 | 42 |
| 3. | 60 | 67 | 35 | 76 |
| 4. | 52 | 102 | 21 | 25 |
| 5. | 24 | 76 | 31 | 83 |
| 6. | 17 | 28 | 20 | 59 |
| 7. | 12 | 36 | 42 | 61 |
| 8. | 28 | 42 | 49 | 77 |
| 9. | 31 | 79 | 27 | 65 |
| 10. | 11 | 59 | 39 | 17 |

| Zorné pole č. | 3. EXTRAKCE | | | |
|---------------|--|--------------------|-----------------------------------|--------------------|
| | Tritolylfosfát + parafínový olej | | Tritolylfosfát + kyselina olejová | |
| | (celkový obsah glukózy 80 g/200 ml kultivačného média) | | | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 57 | 64 | 55 | 97 |
| 2. | 36 | 12 | 53 | 56 |
| 3. | 67 | 91 | 39 | 75 |
| 4. | 29 | 34 | 54 | 61 |
| 5. | 19 | 41 | 69 | 92 |
| 6. | 9 | 27 | 61 | 59 |
| 7. | 36 | 44 | 69 | 67 |
| 8. | 21 | 40 | 41 | 62 |
| 9. | 15 | 31 | 46 | 71 |
| 10. | 9 | 38 | 43 | 21 |

| Zorné pole č. | Blank (celkový obsah glukózy 60 g /200 ml kultivačného média) | | Blank (celkový obsah glukózy 70 g /200 ml kultivačného média) | | Blank (celkový obsah glukózy 80 g /200 ml kultivačného média) | |
|---------------|---|--------------------|---|--------------------|---|--------------------|
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| | 10 | 78 | 64 | 32 | 16 | 52 |
| 1. | 18 | 49 | 5 | 17 | 25 | 18 |
| 2. | 4 | 61 | 14 | 34 | 29 | 42 |
| 3. | 9 | 32 | 29 | 42 | 14 | 36 |
| 4. | 10 | 47 | 20 | 26 | 21 | 16 |
| 5. | 2 | 40 | 31 | 40 | 11 | 43 |
| 6. | 5 | 43 | 54 | 23 | 8 | 24 |
| 7. | 1 | 22 | 33 | 18 | 61 | 53 |
| 9. | 1 | 17 | 40 | 39 | 23 | 54 |
| 10. | 5 | 38 | 13 | 39 | 11 | 16 |

Příloha 4: Vitální barvení kvasinkových buněk – Kontinuální proces kvašení

| Zorné pole č. | Blank | | Parafínový olej + Tritolylfosfát | |
|------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|
| | 245 g glukózy/125 ml kultivačního média | | 490 g glukózy/250 ml kultivačního média | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 20 | 14 | 30 | 87 |
| 2. | 16 | 12 | 15 | 26 |
| 3. | 10 | 35 | 17 | 23 |
| 4. | 19 | 48 | 12 | 19 |
| 5. | 15 | 23 | 13 | 22 |
| 6. | 12 | 17 | 20 | 68 |
| 7. | 7 | 30 | 25 | 64 |
| 8. | 23 | 43 | 12 | 37 |
| 9. | 27 | 52 | 8 | 26 |
| 10. | 21 | 28 | 34 | 85 |

| Zorné pole č. | Blank | | Parafínový olej + Tritolylfosfát | |
|------------------|--|--------------------------|--|--------------------------|
| | 315 g glukózy/125 ml kultivačního média | | 630 g glukózy/250 ml kultivačního média | |
| | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk | Počet mrtvých buněk | Počet živých buněk |
| 1. | 20 | 61 | 41 | 77 |
| 2. | 34 | 12 | 24 | 37 |
| 3. | 37 | 20 | 13 | 23 |
| 4. | 21 | 51 | 17 | 31 |
| 5. | 7 | 27 | 10 | 22 |
| 6. | 24 | 33 | 7 | 32 |
| 7. | 32 | 47 | 28 | 60 |
| 8. | 17 | 36 | 23 | 44 |
| 9. | 19 | 29 | 30 | 87 |
| 10. | 20 | 38 | 19 | 39 |

Příloha 5: Aparatura pro extraktivní fermentaci



Příloha 6: Aparatura pro kontinuální proces kvašení

