

## MIKROBIÁLNA PRODUKCIA PALIVOVÉHO ETANOLU: BAKTÉRIE ALEBO KVASINKY?

MARTIN REBROŠ<sup>a</sup>, MICHAL ROSENBERG<sup>a</sup>,  
ĽUDMILA KRIŠTOFÍKOVÁ<sup>a</sup> a RADEK  
STLOUKAL<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Katedra biochemickej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, <sup>b</sup> MEGA a.s., Pod Vinicí 83, 470 01 Stráž pod Ralskem, Česká republika  
mrebros@hotmail.com

Došlo 30.1.04, prepracované 6.12.04, prijaté 17.12.04.

Kľúčové slová: etanol, *Saccharomyces cerevisiae*, kvasinky

### Obsah

1. Úvod
2. Mikrobiálni producenti etanolu
  - 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*
  - 2.2. *Zymomonas mobilis*
  - 2.3. Geneticky modifikované mikroorganizmy
3. Fermentácie
  - 3.1. Vsádzkové fermentácie
  - 3.2. Prítokované a semikontinuálne fermentácie
  - 3.3. Kontinuálne fermentácie
  - 3.4. Simultánna sacharifikácia a fermentácia (SSF), kofermentácia
  - 3.5. Extraktívna a vákuová fermentácia
  - 3.6. Fermentácia pomocou imobilizovaných mikroorganizmov
4. Záver

### 1. Úvod

Etanol je pravdepodobne jeden z najstarších a najobľúbenejších mikrobiálnych produktov. Podľa spôsobu výroby by sme ho mohli rozdeliť na dve skupiny: syntetický etanol a etanol pripravený biologicky. V celosvetovom meradle sa 93 % etanolu získava fermentačne<sup>1</sup>, pričom v roku 1998 dosiahla svetová produkcia etanolu 31,2 milióna m<sup>3</sup>. Je zaujímavé, že približne 2/3 tejto produkcie sa využilo ako palivový etanol. V Európskej únii z toho bolo vyprodukovaných „len“ 2 milióny m<sup>3</sup>, z ktorých však len 5 % bol palivový etanol.

Zvýšené využitie biopalív v doprave je jedným z nástrojov, ktorými Európske spoločenstvo chce znížiť svoju závislosť na trhu s pohonnými hmotami a zároveň znížiť

zdroje emisií oxidu uhličitého<sup>2</sup>. Využitím etanolu na palivové účely sa zaoberá aj vláda Českej republiky, ktorá svojím uznesením zo 6. augusta 2003 schválila „Program pre podporu výroby bioetanolu pre jeho primiešavanie do automobilových benzínov a motorovej nafty“<sup>3</sup>.

Používanie etanolu na palivové účely malo počiatok na konci 19. storočia. V roku 1880 Henry Ford navrhol auto pod označením Ts, ktorého motor pracoval na tzv. „farmový etanol“, ktorý bol získaný fermentáciou kukurice. Začiatkom dvadsiateho storočia však na trh prišli fosílné palivá, ktoré sa vďaka nízkej cene veľmi rýchlo usadili na trhu. Až ropná kríza v roku 1970 značne zmenila ceny benzínu a nafty. Vyčerpávanie zásob fosílnych palív vzbudzuje takisto veľké obavy. American Institute of Petroleum odhadol, že zásoby ropy budú vyčerpané niekedy v 21. storočí s výrazným negatívnym dopadom samotnej ťažby uhlia a ropy na životné prostredie<sup>4</sup>. Tieto skutočnosti, spoločne so strategicko-politickým pozadím problematiky energetickej nezávislosti štátov, spôsobili intenzívny záujem o alternatívne zdroje energie, medzi ktoré nepochybne patrí aj etanol. Dali podnet na vznik napr. „National Alcohol Program“ v Brazílii a „Gasohol Program“ v USA<sup>5</sup>.

Používanie etanolu ako paliva má v porovnaní s benzínom niekoľko odlišností i nesporných výhod:

- Etanol má vyššie oktánové číslo, čo umožňuje spaľovanie pri vyšších tlakoch a tým o 15 % lepší celkový výkon v porovnaní s benzínom<sup>6</sup>. Navyše tlak vyparovania a vyparovacie teplo etanolu je vyššie ako benzínu, čo má za následok zvýšenie výstupnej energie pri použití etanolu<sup>7</sup>.
- Pri používaní etanolu dochádza k zmenšeniu obsahu CO a nespálených uhlíkovodíkov – hlavných zložiek smogu v emisiách. Dochádza aj k redukcii vznikajúceho CO<sub>2</sub> (hlavný plyn skleníkového efektu) až o 60–90 %. CO<sub>2</sub> uvoľnený pri spaľovaní etanolu vzniká z obnoviteľných surovín. Je recyklovaný v procese fotosyntézy rastlín a na rozdiel od CO<sub>2</sub> vzniknutého spaľovaním fosílnych palív, nezvyšuje podiel CO<sub>2</sub> v atmosfére<sup>8</sup>. Množstvo NO<sub>x</sub> a fotochemických polutantov vo výfukových plynoch je takisto menšie v porovnaní s obsahom v spalinách benzínu<sup>6,9</sup>.
- Ďalšou výhodou tohoto paliva je, že ide o obnoviteľný zdroj energie, získaný z poľnohospodárskych plodín pestovaných na území krajiny výroby. Na jednej strane teda podporuje regionálny rozvoj krajiny a na strane druhej znižuje závislosť krajiny na dovoze ropy zo zahraničia<sup>9</sup>.

Čo sa týka ceny etanolu ako paliva, môžeme sledovať trvalý pokles voči benzínu. V máji 2000 bola cena za 1 l benzínu v USA 0,337 \$ a paliva etanol E85 (zmes 85 % etanol a 15 % benzín) 0,32 \$ za 1 liter. V októbri 2002 to bolo 0,32 \$/l benzínu a 0,296 \$/l E85 (cit.<sup>9</sup>).

Používanie etanolu ako paliva má však aj svoje nevýhody. Nevýhodou pri spaľovaní etanolu je vznik aldehydov, hlavne acetaldehydu. Jeho obsah v emisiách je 2 až 4× vyšší ako pri spaľovaní benzínu<sup>10</sup>. Kvôli obsahu kyslíka v etanole má 1 l čistého etanolu približne o 1/3 menšiu energiu ako benzín<sup>11</sup> a objemová spotreba etanolu motorom je o 10 % vyššia ako spotreba benzínu<sup>9</sup>.

Do roku 2003 bolo v USA predaných 2 milióny FFV automobilov (flexible fuel vehicles), ktoré ako palivo používajú E85 (cit.<sup>9</sup>). Aj tento fakt svedčí o nezastaviteľnom trende v používaní etanolu na palivové účely.

## 2. Mikrobiálni producenti etanolu

Schopnosť produkovať zvýšené množstvá etanolu zo sacharidických substrátov je popisovaná u širokej palety mikroorganizmov, predovšetkým baktérií a kvasiniek. Z bakteriálnych producentov zbierka ATCC uvádza mikroorganizmy z rodov: *Zymomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Zymobacter* a *Leuconostoc*. Z kvasiniek a vláknitých húb je popisovaná schopnosť produkovať etanol u rodov: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Monascus*, *Zygoascus*, *Aureobasidium*, *Torulasporea*, *Chrysosporium*, *Pichia* a ďalších<sup>12</sup>.

Z vyššie spomenutých mikroorganizmov najlepšie produkujú etanol kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, ktoré sa používajú v liehovarníckom priemysle a baktérie *Zymomonas mobilis*. V tejto práci sa zaoberáme porovnaním fyziologických vlastností a fermentačných charakteristík u oboch typov producentov.

### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Rod *Saccharomyces* patrí do triedy Ascomycetes (Endomycetes), rozmnožuje sa vegetatívne multilaterálnym pučaním. Druh *Saccharomyces cerevisiae* má elipsoidné aj guľovité bunky, štatistické rozpätie dĺžok je 3,7–9,7 µm a širok 2,6–6,4 µm. Vytvára rudimentárne alebo stromčekovité, bohato vetvené pseudomycélium. Články mycélia môžu presiahnuť aj 30 µm, ale pravé hýfy nevytvára<sup>13,14</sup>.

Substrátom pre etanolovú fermentáciu sú väčšinou hexózy. *Saccharomyces cerevisiae* metabolizuje glukózu cez Embdenovu-Meyerhofovu-Parnasovu dráhu (EMP), tiež označovanú ako hexózodifosfátová dráha. Sumárne je možné túto dráhu vyjadriť reakciou:



Energetická bilancia etanolového kvasenia vztiahnutá na 1 mol glukózy je zisk 2 molov adenosín-5'-trifosfátu.

Za aeróbných podmienok, keď je koncentrácia substrátu v médiu nižšia ako 5 mM, bunka odbúrava glukózu menšou rýchlosťou než v anaeróbných podmienkach, čo označujeme ako Pasteurov efekt. Je to následok základných regulačných mechanizmov, ktoré sa týkajú rôznych

kľúčových enzýmov metabolizmu glukózy. Anaeróbne dehydrogenačné pochody prejdú na aeróbný proces, ktorý je sprevádzaný zvýšenou tvorbou biomasy za súčasného zníženia spotreby substrátu. Súčasne sa zastavuje tvorba produktov kvasenia, lebo substrát je oxidovaný až na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (cit.<sup>15</sup>). Tento fakt má v biotechnológii veľký význam pri produkcii kvasničnej biomasy.

Pri koncentrácii glukózy vyššej ako 5mM za aeróbných podmienok je respirácia potlačená a nastáva klasický fermentačný proces<sup>15</sup>. Tento fenomén sa označuje ako Crabtree efekt (resp. glukózový efekt, alebo kontra-Pasteur efekt). Predpokladá sa, že glukóza inhibuje syntézu enzýmov dýchacieho reťazca a/alebo ich inaktívuje a inaktívuje aj transport cukru do bunky<sup>16,17</sup>. Tento efekt spôsobuje problémy v kontinuálnych fermentáciách pri zmene zriedovacej rýchlosti z menšej na väčšiu. Pri menšej zriedovacej rýchlosti je metabolizmus oxidatívny (kvasinky majú tendenciu skvasovať glukózu na CO<sub>2</sub> a biomasu, bez výťažku etanolu) a pri vyšších je fermentačný (etanolová produkcia je vyššia, ale s nižším výťažkom biomasy)<sup>18,19</sup>.

Ako ďalší regulačný mechanizmus sa u *S. cerevisiae* uplatňuje katabolická represia. Glukóza, alebo iniciálny produkt glukózového metabolizmu (resp. signály odvodené od nej), inhibuje syntézu rôznych dýchacích a glukoneogenických enzýmov<sup>20</sup>. Glukózová represia má u *S. cerevisiae* za následok dlhodobú adaptáciu na degradáciu glukózy výhradne na etanol a CO<sub>2</sub>. V aeróbnej vsádzkovej kultúre môžu byť bunky po utilizácii glukózy dereprimované a dôjde k indukcii enzýmov dýchacieho reťazca. Bunka prejde do druhej fázy rastu, známej pod názvom diauxia. Má to za následok reutilizáciu vytvoreného etanolu, čím sa zníži jeho obsah vo vyfermentovanom médiu.

U *S. cerevisiae* sa uplatňuje aj katabolická inaktívacia. Je rýchlejšia ako katabolická represia. Zdá sa, že nastáva glukózou indukovanou deaktiváciou niektorých kľúčových enzýmov, ako je napríklad fruktóza-1,6-bisfosfatáza<sup>21</sup>. Pri glukóza-senzitívnych (Crabtree-senzitívnych) kvasinkách, akou je aj *S. cerevisiae*, sa môže vyskytovať aj limitovaná oxidácia, keď bunka rastie na sacharidickom substráte a pyruvát je v nadbytku. V prítomnosti kyslíka by sme preto mohli metabolizmus označiť za respiračne-fermentatívny<sup>22</sup>. U *S. cerevisiae* je teda optimalizácia respirácie dôležitá pri produkcii biomasy, zatiaľ čo optimalizácia fermentácie je dôležitá v nápojárskom a liehovarníckom priemysle<sup>15</sup>.

### 2.2. *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* je gramnegatívny, chemoorganotrofný, fakultatívne anaeróbný prokaryotický mikroorganizmus. Bunky majú tvar paličiek so zaoblenými koncami. Vyskytujú sa obvykle v dvojiciach, uprostred zúžených, zriedka tvoria aj krátke reťazky. Optimálna teplota rastu je 30 °C. Rod *Zymomonas* bol prvý raz izolovaný z alkoholických nápojov ako napríklad africké „palmové víno“, mexický „pulque z agáve“ a taktiež ako kontaminant v niektorých európskych pivách. Je veľmi tolerantný voči polyolom, avšak neobľubuje vyššie koncentrácie ió-

nov. Táto vlastnosť spôsobuje problémy pri fermentácii melasy<sup>23,24</sup>.

*Zymomonas mobilis* metabolizuje glukózu cez glykolytickú Entnerovu-Doudoroffovu (ED) cestu, ktorá je zvyčajne prítomná u aeróbných mikroorganizmov<sup>25</sup>. Za účasti enzýmov pyruvát dekarboxylázy a alkoholdehydrogenázy sa sacharidy fermentujú na etanol a CO<sub>2</sub>. Sumárna reakcia Entnerovej – Doudoroffovej dráhy je zhodná so sumárnou reakciou EMP dráhy. Mikroorganizmus je však „odmenený“ ziskom len 1 mol ATP z 1 mol glukózy. Koncentrované roztoky glukózy neinhibujú enzýmy ED dráhy, pretože konverzia glukózy na etanol v organizme prebieha veľmi rýchlo<sup>26</sup>. Extracelulárny osmotický tlak roztoku glukózy je vďaka uľahčenej difúzii rýchlo vyvážený jej príslušnou intracelulárnou koncentráciou. Každú minútu je totiž do *Z. mobilis* transportované množstvo glukózy rovné 1/3 hmotnosti bunky<sup>27</sup>. Enzýmy ED dráhy sú navyše vysoko tolerantné voči etanolu, čo bolo potvrdené aj na bezbunkových extraktoch<sup>28</sup>. Vysoká etanolová tolerancia *Z. mobilis* je spájaná s obsahom mastných kyselín v plazmatickej membráne mikroorganizmu. Hlavnými mastnými kyselinami sú myristová, palmitová a *cis*-vákénová kyselina. V plazmatickej membráne sa nachádzajú aj hopanoidy (pentacyklické triterpénové lipidy), ktoré sú pravdepodobne s kyselinou *cis*-vákénovou zodpovedné za vysokú etanolovú toleranciu baktérie<sup>29</sup>.

Rozdiel medzi Entnerovou-Doudoroffovou a Embdenovou-Mayerhofovou-Parnasovou dráhou je v tom, že glukóza-6-fosfát prechádza v ED dráhe účinkom glukózo-P-dehydrogenázy na kyselinu 6-P-glukónovú, ktorá je dehydrovaná na kyselinu 2-keto-3-deoxy-6-P-glukónovú. Tá je účinkom aldolázy štiepená na glyceraldehyd-3-fosfát a kyselinu pyrohroznovú. Obe zlúčeniny sú následne premenené na etanol a CO<sub>2</sub>. Pri tvorbe etanolu z pyruvátu sú kľúčové enzýmy pyruvátdekarboxyláza a alkoholdehydrogenáza (cit.<sup>30</sup>).

Rovnakým spôsobom ako glukózu *Zymomonas mobilis* degraduje aj fruktózu. Okrem týchto dvoch hexóz, ako zdroj uhlíka môže využívať aj disacharid sacharózu. Rýchlosť hydrolýzy, ako aj transfruktozylácie je vyššia ako samotný transport do mikroorganizmu. U *Z. mobilis* sú tri rôzne typy sacharolytických enzýmov: endocelulárna sacharáza, exocelulárna sacharáza a exocelulárna levansacharáza. Tieto enzýmy sú  $\beta$ -D-fruktofuranozyl-transferázy a preto sú schopné hydrolyzovať sacharózu<sup>31</sup>.

NADH- a NADPH-oxidázy, ktoré katalyzujú oxidáciu NAD(P)H, sú prítomné v bunkovej membráne. Prenos elektrónov v dýchacom reťazci však nie je spojený s oxidatívnou fosforyláciou. V prítomnosti kyslíka je aktivita NADH-oxidázy zvýšená, čo sa prejaví poklesom NADH v bunke a následnou limitáciou redukcie acetaldehydu na etanol pomocou alkoholdehydrogenázy (cit.<sup>32</sup>).

Z hľadiska fyziológie a metabolizmu sú pre produkciu etanolu výhodnejšie *Zymomonas mobilis*. Rastú totiž oveľa rýchlejšie ako kvasinky, majú nižšiu produkciu biomasy, sú veľmi etanoltolerantné a osmotolerantné, majú vyššiu špecifickú rýchlosť prijímania substrátu, vyššiu špecifickú produkčnú rýchlosť a majú menšiu produkciu

vedľajších metabolitov<sup>23,27,29</sup>.

### 2.3. Geneticky modifikované mikroorganizmy

Lignocelulózový materiál je najväčší zdroj obnoviteľnej energie na zemi a produkcia palivového etanolu z neho sa stáva cieľom viacerých vedeckých i komerčných skupín. Navyše na produkciu etanolu by sa dali použiť aj odpadové materiály zo spracovania dreva, rôzne poľnohospodárske odpady (obilky, stebľa), odpadový papier atď. Úprava lignocelulózového materiálu na fermentáciu sa skladá z troch častí- odstránenie nespracovateľného lignínu, depolymerizácia celulózy a hemicelulózy, a samotná fermentácia. Problematickým zostáva spracovanie zložiek hemicelulózy po hydrolýze, hlavne pentóz (xylóza a arabinóza). Pre produkciu palivového etanolu z lignocelulózových materiálov je teda vhodný mikroorganizmus, ktorý dokáže využívať okrem hexóz aj pentózy, má vysokú produktivitu etanolu, vysokú etanolovú toleranciu a vysokú toleranciu voči inhibítorom, ktoré sú prítomné v hydrolyzátoch. Preto je snahou pomocou génových manipulácií konštruovať mikrobiálnych producentov, ktorí tieto požiadavky spĺňajú<sup>33,34</sup>.

Jedným zo spôsobov je do klasických producentov etanolu ako je *Z. mobilis* a *S. cerevisiae* vnieť gény, ktoré kódujú schopnosť konvertovať pentózy na metabolity prítomné v ED resp. EMP dráhe. Technikami rekombinantných DNA boli do *Z. mobilis* aj *S. cerevisiae* vnesené gény, ktoré dali mikroorganizmom schopnosť využívať xylózu a arabinózu, a konvertovať ich na etanol s 86–98% teoretickým výťažkom<sup>35,36</sup>.

Iným prístupom je do heterofermentatívnych mikroorganizmov, ktoré sú prirodzene schopné využívať široké spektrum sacharidov, vnieť gény, ktoré upravujú metabolizmus na selektívnu produkciu etanolu. To sa podarilo po vnesení génov pyruvát dekarboxylázy a alkohol dehydrogenázy do *Escherichia coli* a *Klebsiella oxytoca*. Fermentačné charakteristiky geneticky upravených mikroorganizmov sú zhrnuté v tab. I. Nevýhodou týchto mikroorganizmov však je, že pH optimum fermentácie pre *E. coli* je v rozmedzí 6,0 až 8,0 a maximálna etanolová tolerancia *K. oxytoca* je iba 37 g.dm<sup>-3</sup> (cit.<sup>37,38</sup>).

Keďže v Európskej únii je používanie geneticky modifikovaných mikroorganizmov značne obmedzené, i keď výskum v tejto oblasti v poslednom období urobil značné pokroky, podrobnejšie sa touto témou v práci nezaobráme.

## 3. Fermentácie

### 3.1. Vsádzkové fermentácie

Vsádzková kultúra je uzatvorený systém kultúry, ktorý obsahuje začiatkové, limitujúce množstvo živín. Vsádzková fermentácia môže byť použitá na produkciu biomasy, primárnych i sekundárnych metabolitov. Pre produkciu primárnych metabolitov musia byť navodené podmienky, ktoré predlžujú exponenciálnu fázu rastu spre-

Tabuľka I  
Porovnanie parametrov jednotlivých typov fermentácií

Typ fermentácie	MO <sup>a</sup>	Substrát [g.dm <sup>-3</sup> ]	Produktivita [g.dm <sup>-3</sup> .h <sup>-1</sup> ]	Výtťažok [%]	Podmienky	Poznámky	Lit.
Vsádzková fermentácia	<i>Z. mobilis</i>	G	5,1	94–98			47,64
	<i>S. cerevisiae</i>	G	2,4	88–92			47,64
	<i>E. coli</i> (GMO)	A:X:G = 15:30:30	0,92	90	t = 30 °C, pH 6–8		37
	<i>K. oxytoca</i> (GMO)	A:X:G = 20:40:20	0,35	84	t = 35 °C	Max. tolerancia <i>K. oxytoca</i> voči etanolu len 37 g.dm <sup>-3</sup> .	38
Prítokovaná fermentácia	<i>S. cerevisiae</i>		9,5			Proces trval 45 h	48
Kontinuálne fermentácie	<i>Z. mobilis</i>	G = 135	11,05		t = 30 °C	Zried'ovacia rýchlosť 0,2 h <sup>-1</sup>	54
	<i>S. cerevisiae</i>	G = 135	5,68		t = 30 °C	Zried'ovacia rýchlosť 0,2 h <sup>-1</sup>	54
SSF	<i>Z. mobilis</i>	Palmový škrob 10–20 %	3,57	93–97		Ko-imobilizácia s amyloglukozidázou do karagénanu	23
Kofermentácia	<i>Z. mobilis</i> , <i>K. fragilis</i>	L = 200–250	0,92			Kofermentáciou sa zvýšila produktivita	55
Extraktívna fermentácia	<i>Z. mobilis</i>	G		90		Extraktívna fáza : polyetylén-glykol (6 %hm.), dextrans (2 %) 9:1; 90 % etanolu sa nachádzalo v rozpúšťadle	57
Imobilizované systémy	<i>Z. mobilis</i>	G = 136	25,5		t = 30 °C	Nosič Ca-alginát, zried'ovacia rýchlosť 0,5 h <sup>-1</sup>	54
	<i>S. cerevisiae</i>	G = 136	14,5		t = 30 °C	Nosič Ca-alginát, zried'ovacia rýchlosť 0,5 h <sup>-1</sup>	54

<sup>a</sup> Použitý mikroorganizmus; GMO – geneticky modifikovaný mikroorganizmus; A – arabinóza; X – xylóza; G – glukóza; L – laktóza;

vádzanú exkréciou produktu<sup>39</sup>.

Medzi jeden z dôležitých parametrov fermentácie patrí teplota kultivácie. Pri vyššej teplote v počiatoch fermentácie so *S. cerevisiae* dochádza k rýchlejšiemu narástaniu biomasy, spojenú s rýchlejšou produkciou etanolu, avšak v neskorších častiach fermentácie je rast biomasy inhibovaný naakumulovaným množstvom etanolu. Na rozdiel od kvasiniek, *Z. mobilis* je k vysokým koncentráciám etanolu oveľa viac tolerantnejšia a tento fenomén sa u nej nevyskytuje<sup>40</sup>. Pri nižších teplotách je teda u *S. cerevisiae* vyššia koncentrácia etanolu dosahovaná až po značne predĺženom čase fermentácie, ako je to aj pri príprave „saké“ (kultivačná teplota 10–15 °C) (cit.<sup>41</sup>). Maximálna špecifická rýchlosť tvorby etanolu je pre kvasinky najvyššia v teplotnom rozpätí 32–36 °C (cit.<sup>42</sup>). Sú však známe aj termotolerantné kmene *S. cerevisiae* s optimálnou teplotou produkcie v rozmedzí 35–38 °C (cit.<sup>43</sup>) (Všetky porovnávané experimenty so *S. cerevisiae* aj *Z. mobilis* uvedené v článku prebiehali pri teplote 30–32 °C.

Tento údaj opakovane neuvádzame). Výhodou pri použití kvasiniek je, že fermentácia môže prebiehať pri pH v rozmedzí 3 až 6. Fermentácia pri nižšom pH totiž výrazne eliminuje rast kontaminujúcej mikroflóry<sup>44</sup>. U *Z. mobilis* je pri pH 3,5 fermentácia prakticky zastavená<sup>23</sup>.

Klasické fermentačné postupy sú v posledných rokoch značne inovované. Medzi jednu z modernizovaných technológií používaných vo vsádzkových procesoch patrí aj fermentácia s recyklom buniek, označovaná aj ako Melleova-Boinotova metóda. V Brazílii sa až 70 % vyprodukovaného množstva etanolu získava práve týmto spôsobom. Po fermentácii dochádza k separácii kvasiniek, jej premytiu v roztoku kyseliny sírovej a následnému použitiu v ďalšej fermentácii. Celý proces je skrátene na 6–10 h pri koncentrácii buniek 8–17 % v/v, s výtťažkom etanolu 90–92 %, pričom bunky vydržia nepretržitú prevádzku 200 dní (cit.<sup>45</sup>).

Pri optimálnych podmienkach fermentácie so *Z. mobilis* (pH 5, t = 30 °C) sa glukóza na 95–98 % kon-

vertuje na etanol a len zvyšných 2–5 % na biomasu<sup>46</sup>. Ďalšou výhodou baktérie je, že produkuje 5× menej vedľajších produktov v porovnaní so *S. cerevisiae*<sup>23</sup>.

Porovnanie parametrov fermentácií prehľadne uvádzame v tab. I.

### 3.2. Prítokovaná a semikontinuálna fermentácia

Fed-batch (prítokovaná) fermentácia súvisí s dávkovacou stratégiou. Jej cieľom je kontrolovať koncentráciu živín a predĺžovať produktívnu fázu vsádzkového procesu.

Fed-batch proces u *S. cerevisiae* prebieha v dvoch fázach. V prvej dochádza k rastu aj produkcii etanolu, v druhej je rast zastavený, avšak bunky etanol produkujú ďalej<sup>48</sup>. Špecifická rastová aj produkčná rýchlosť sa so zvyšujúcou koncentráciou etanolu znižuje. Viabilita buniek je závislá od koncentrácie etanolu, ako aj množstva živín v médiu. Kritická koncentrácia etanolu je v rozmedzí 90–110 g.dm<sup>-3</sup>. Po dosiahnutí tejto koncentrácie dochádza k rýchlej strate viability buniek. Pomocou tohto typu fermentácie bola u kvasiniek dosiahnutá maximálna produktivita zariadenia 9,5 g.dm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup>, pričom proces trval 45 hodín<sup>48</sup>.

Na semikontinuálne fermentácie so *Z. mobilis* sa používajú hlavne flokulujúce kmene, ktoré majú schopnosť vytvárať zhluky minimálne 100 buniek. Výhodou takéhoto mikroorganizmu je, že zhluky buniek pri fermentácii klesajú na dno nádoby a 2/3 média môže byť z vrchnej časti fermentora odsaté bez straty biomasy. Mikroorganizmy sa získavajú mutačným šľachtením, pričom pri selekcii vhodného mikroorganizmu rozhoduje rýchlosť sedimentácie buniek. Pri tomto type zariadenia bola dosiahnutá objemová produktivita 50 g.dm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup> a koncentrácia etanolu 80 g.dm<sup>-3</sup> (cit.<sup>49</sup>).

Semikontinuálne fermentácie sa používajú aj na testovanie stability rekombinantných kmeňov počas fermentácie. Kmeň *Z. mobilis*, do ktorého boli technikami rekombinantných DNA vnesené gény  $\alpha$ -amylázy a glukoamylázy, vykazoval konverziu 0,46 g etanolu/g škrobu a objemovú produktivitu 0,204 g.dm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup> (cit.<sup>50</sup>).

### 3.3. Kontinuálna fermentácia

Exponenciálny rast vsádzkovej kultúry môže byť predĺžený prídavkom čerstvého média do nádoby. Ak je čerstvé médium kontinuálne pridávané k takejto kultúre vhodnou rýchlosťou a vyfermentované kontinuálne odobrané, po čase je dosiahnutý ustálený stav, kedy tvorba novej biomasy kultúrou je rovná strate buniek z nádoby. Pre proces, pri ktorom dochádza k produkcii primárnych metabolitov, je volená zriedovacia rýchlosť, ktorá udržiava kultúru v maximálnej produkčnej fáze<sup>39</sup>. V porovnaní so vsádzkovými fermentáciami majú kontinuálne viaceré výhody: zníženie vstupných nákladov vďaka zvýšenej objemovej efektívnosti procesu, jednoduchosť kontrolovania procesu v ustálenom stave, zvýšená výťažnosť procesu, konštantné zloženie produktov, zvýšená odolnosť voči kontaminácii vďaka vysokej koncentrácii etanolu v médiu<sup>51</sup>.

Medzi kontinuálne fermentácie zaraďujeme aj fermentáciu pod označením Biostil<sup>®</sup>. Vlastníkom licencie na toto zariadenie je Švédská spoločnosť Chematur. Jedná sa o jednostupňovú fermentáciu s krátkou dobou zdrž (10 h). Vyfermentované médium je pomocou centrifugácie rozdelené na dve časti – prúd s vysokou koncentráciou kvasiniek, ktoré sú vracané späť do fermentora a prúd, ktorý je určený na destiláciu. Navyše dochádza k recyklu výpalkov, ktoré slúžia ako zriedovacia tekutina na udržiavanie optimálnej koncentrácie cukrov a etanolu v zápare počas fermentácie. Nedochádza tak k inhibícii metabolizmu kvasiniek etanolom<sup>52</sup>.

Problémy počas kontinuálnej fermentácie kvasiniek pri prístupe kyslíka a pri zmene zriedovacej rýchlosti z menšej na väčšiu, môže spôsobiť Crabtree efekt. Pri menšej zriedovacej rýchlosti (0,08 h<sup>-1</sup>) je metabolizmus oxidatívny a pri vyšších zriedovacích rýchlostiach (0,2 h<sup>-1</sup>) je fermentačný<sup>18</sup>. Pri nižších zriedovacích rýchlostiach majú preto kvasinky tendenciu predýchať glukózu na CO<sub>2</sub> a biomasu, bez výťažku etanolu. Naopak pri vyšších zriedovacích rýchlostiach dochádza k vyššej produkcii etanolu, ale nižším výťažkom biomasy<sup>19</sup>. Pri stredných zriedovacích rýchlostiach (0,08–0,20 h<sup>-1</sup>) kvasinky „prepinajú“ medzi oxidatívnym a fermentačným mechanizmom v závislosti na prístupe rozpusteného kyslíka. Tento fenomén je veľmi komplexný a zahŕňa množstvo regulačných mechanizmov enzýmovej inhibície a represie viacerých metabolických dráh, v práci sa mu preto detailne nevenujeme.

Na kontinuálnu produkciu etanolu boli použité aj vysokoflokulentné kmene kvasiniek. Pri takomto type mikroorganizmu nedochádza k nadmernému vymývaniu biomasy zo zariadenia ako pri bunkách normálnych. Výťažok etanolu bol 83 % v porovnaní s teoretickým výťažkom, koncentrácia etanolu 75 g.dm<sup>-3</sup> a produktivita 50 g.dm<sup>-3</sup>.h<sup>-1</sup> (cit.<sup>53</sup>).

Nowak (cit.<sup>54</sup>) uskutočnil niekoľko experimentov v rovnakom režime fermentácie, s rovnakými koncentraciami substrátu, pre *Z. mobilis* aj *S. cerevisiae* používaných v liehovarníctve (tab. I). Získané výsledky takisto svedčia o lepšej produktivite *Z. mobilis* v porovnaní so *S. cerevisiae*. Zaujímavé takisto je, že na produkciu rovnakého množstva etanolu je pri nižších koncentraciách substrátu potrebná 2×, pri vyšších 3–4× menšia koncentrácia bakteriálnej biomasy ako biomasy kvasničnej<sup>54</sup>.

### 3.4. Simultánna sacharifikácia a fermentácia (SSF), kofermentácia

V procese simultánnej sacharifikácie a fermentácie sa okrem mikroorganizmu produkujúceho etanol použije aj mikroorganizmus, alebo enzým schopný konvertovať polymérne sacharidy na využiteľný substrát. Produkty sacharifikácie sú simultánne využívané *S. cerevisiae*, alebo *Z. mobilis* a premieňané na etanol. Uplatňuje sa tu aj ko-immobilizácia etanolového producenta a hlavne amylolytických enzýmov (tab. I).

Kofermentácia je typ fermentácie, kde sa v procese

využíva zmes mikroorganizmov. Takýto typ fermentácie bol napríklad využitý na fermentáciu laktózového média so *Zymomonas mobilis* a *Kluyveromyces fragilis*. Pri použití zmesnej kultúry *Z. mobilis* a *S. cerevisiae* sa sledovalo zvýšenie špecifickej etanolovej produktivity a objemovej produktivity zariadenia (cit.<sup>23</sup>) (tab I).

### 3.5. Extraktívna a vákuová fermentácia

Pri extraktívnej fermentácii sa etanol vhodným rozpúšťadlom postupne extrahuje z fermentačného média. Rozpúšťadlo nesmie byť miešateľné s vodou, toxické voči mikroorganizmu a musí mať vysokú afinitu k etanolu. Výhodou je zníženie nákladov na získavanie produktu z fermentačného média v porovnaní s klasickou fermentáciou, je v podstate odstránená inhibícia koncovým produktom, avšak výber vhodného, pre organizmy netoxického rozpúšťadla je problematický<sup>56</sup>.

Pri vákuovom type fermentácie dochádza k odstráneniu etanolu z fermentačného média pôsobením vákua a to buď kontinuálne, alebo v cykloch. Ako aj v predchádzajúcom type procesu, udržiavaním nízkej hladiny etanolu v médiu nedochádza k inhibícii fermentačnej aktivity ani k strate viability buniek, ktoré si zachovávajú vysokú metabolickú aktivitu. Pri kvasinkách však môžeme sledovať nižší nárast biomasy. Predpokladá sa, že by to mohlo byť spôsobené vyššími nárokmi buniek na udržanie fyziologického stavu, ako aj nedostatkom kyslíka v médiu, vzhľadom na jeho nižšiu rozpustnosť vo vákuu. Nevýhodou vákuovej fermentácie je, že v priebehu fermentácie sa môžu hromadiť neprechavé inhibítory, ktoré znižujú výslednú produktivitu<sup>56</sup>. Kombináciou vákuovej fermentácie (tlak 7,3 kPa) a recyklácie kvasiniek (zabezpečované centrifugáciou) sa pri produkcii etanolu z melasy dosiahla produktivita  $82 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ , čo predstavuje 12 násobné zvýšenie v porovnaní s kontinuálnym systémom pri atmosferickom tlaku<sup>58</sup>.

### 3.6. Fermentácia pomocou imobilizovaných mikroorganizmov

Fermentačné technológie v posledných rokoch zaznamenali obrovský rozvoj a modernizáciu. Tento trend možno sledovať aj pri výrobe etanolu. Jedným z inovačných trendov používaných v tomto procese je aj používanie imobilizovaných mikroorganizmov.

Imobilizáciu možno definovať ako techniku, ktorá zadržuje katabolicky aktívne bunky v reaktore a zabraňuje tak ich pohybu v mobilnej fáze, ktorá nesie substrát a produkt.

Jednou z hlavných výhod tejto technológie je možnosť použitia opakovaných vsádzkových konverzií resp. kontinuálneho režimu pri zachovaní vysokej koncentrácie biomasy v systéme. Nevýhodou tejto techniky môže byť problém s difúziou medzi mikroorganizmom imobilizovaným v matici a okolitým prostredím. Imobilizácia kvasiniek alebo baktérií pre produkciu etanolu sa uskutoč-

ňuje predovšetkým dvoma metódami: adsorpciou a entrapmentom.

*Adsorpcia* je najjednoduchšia technika imobilizácie veľkého množstva buniek<sup>59</sup>. Je zvyčajne uskutočňovaná na aktívnom povrchu pórovitého materiálu, akými sú napr. pórovité sklo, drevené uhlie alebo drevené hobliny. Táto technika je pomerne jednoduchá. Bunková suspenzia sa nechá v kontakte s nosičom a adhéznymi silami dôjde k naviazaniu buniek na maticu nosiča. Tomuto kroku niekedy predchádza „ošetrenie“ buniek pomocou  $\text{Al}^{3+}$ , čím sa neutralizuje náboj na povrchu buniek<sup>58</sup>. Z dôkladných štúdií o adsorpcii, v ktorých sa testovalo veľkého množstva nosičov, sa dospelo k záveru, že drevené hobliny zachytávajú 6–120x viac buniek ako ostatné nosiče<sup>58</sup>. Nevýhodou tejto techniky je, že môže dôjsť k desorpcii mikroorganizmu zmenou iónovej sily alebo pH. Uvedená technika preto nemá v praxi uplatnenie.

Druhou imobilizačnou technikou, oveľa obľúbenejšou ako adsorpcia, je *entrapment*. Táto technika spočíva v uzatvorení buniek do kapsúl prírodných alebo syntetických gélov. Bunky musia byť väčšie ako póry nosičov, aby nedošlo k ich vymývaniu, ale aby bola zaistená voľná difúzia substrátu a produktov. Medzi najviac využívané gély patria: agaróza, agar, polyakrylamidový gél,  $\kappa$ -karagénan, alginát, polyvinylalkohol, atď.<sup>56,58,60</sup>. Princíp entrapmentu spočíva v zmiešaní bunkovej suspenzie s tekutou formou gélu. Zmes sa potom kvapká do vytvrdzovacieho roztoku a tvoria sa kapsule guľovitého tvaru<sup>58</sup>. Počas fermentácie sa vznikajúci etanol a  $\text{CO}_2$  môžu hromadiť v géli, čím môže dôjsť k mechanickému poškodeniu matrice zvyšujúcim sa tlakom vo vnútri nosiča. Navyše pri guľovitom tvare imobilizátu sa zistilo, že produkčný mikroorganizmus rastie len tesne pod povrchom imobilizátu a nie v jeho celom objeme<sup>61</sup>. Z tohto dôvodu je veľmi dôležitá veľkosť a tvar kapsule. Ako veľmi výhodné riešenie tohoto problému sa zdá byť použitie tzv. LentiKats<sup>®</sup>. Jedná sa o polyvinylalkoholové imobilizáty šošovkového tvaru, ktoré sú 3–4 mm dlhé a sú 200–400  $\mu\text{m}$  hrubé. Mikroorganizmus rastie v celom objeme imobilizátu a nedochádza k difúznym problémom medzi ním a okolitým médiom<sup>62,63</sup>. Najviac používanými gémi pri imobilizačných štúdiách sú prírodné polyméry algináty a karagénany, pri ktorých imobilizačná procedúra je jednoduchá a šetrná. Hlavným problémom pri alginátových géloch je mechanická krehkosť a chemická nestabilita v prítomnosti vysokej koncentrácie fosfátov a kvasničného extraktu, ktoré sú neoddeliteľnými zložkami média pri raste mikroorganizmov. Navyše sú citlivé na chelatujúce činidlá, relatívne nepriepustné pre väčšie molekuly a málo odolné voči tlaku vznikajúceho tvorbou  $\text{CO}_2$  počas fermentácie. Z porovnania s inými typmi fermentácií, imobilizované systémy majú vysokú produktivitu a vďaka svojim výhodám sú dobre využiteľné v produkcii etanolu na laboratórnej úrovni, aj v priemyselnom meradle (tab. I).

#### 4. Záver

S vyčerpávaním svetových zásob fosílnych palív sa v posledných rokoch zvyšuje záujem o alternatívne zdroje energie, medzi ktoré nepochybne patrí aj etanol. V priemyselnom meradle sa na produkciu etanolu používa *Saccharomyces cerevisiae*. Z hľadiska fyziológie, metabolizmu, aj fermentačných vlastností mikroorganizmu je pre produkciu palivového etanolu výhodnejšie používanie *Zymomonas mobilis*. Baktérie rastú oveľa rýchlejšie ako kvasinky, majú nižšiu produkciu biomasy, vyššiu špecifickú rýchlosť prijímania substrátu a tvorby produktu, nepotrebujú kontrolovaný prívod kyslíka, produkujú menej vedľajších metabolitov, sú veľmi etanoltolerantné a osmotolerantné. U jednotlivých typov porovnávaných fermentácií navyše vykazujú takmer dvojnásobnú produktivitu v zhodných fermentačných podmienkach. Výskum v liehovarníctve je v poslednom období zameraný na modernizáciu klasických fermentácií, ako aj zavádzanie nových technologických postupov s cieľom zefektívniť celú výrobu. Ako veľmi vhodná metóda zvyšujúca výťažky procesu je imobilizácia produkčného mikroorganizmu enkapsuláciou do vhodného nosiča. Jej hlavnou výhodou je, že nedochádza k vymývaniu koncentrovanej biomasy z reaktora. Ďalšími riešeniami procesu sú kofermentácia, simultánna sacharifikácia a fermentácia, ktoré kombinujú vlastnosti viacerých biologických systémov. Zavádzanie nových technologických postupov, ako je extraktívna fermentácia a vákuová fermentácia, sa takisto javí byť perspektívne.

*Práca bola uskutočnená s príspevom grandov VEGA 1/2391/05 a 1/2390/05 a spoločnosti MEGA a.s.(ČR).*

#### LITERATÚRA

- Berg C.: *World Ethanol Production 2001*. FO Licht, Ratzeburg 2001.
- Smernica 2003/30/EC. *o podpore využitia biopalív a iných obnoviteľných zdrojov energie*. (2003).
- Usnesení Vlády České Republiky č. 833/2003 *k Programu Podpora výroby bioetanolu pro jeho přimíchávání do automobilových benzínů a motorové nafty, pro záměnu metanolu při výrobě metylesteru řepkového oleje a metyltercbutylesteru a jako alternativního paliva s podporou jeho uplatnění na tuzemském trhu* (2003).
- Glazer A. N., Nikaido H.: *Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology*. Freeman, New York 1995.
- Zaldivar J., Nielsen J., Olsson L.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 17 (2001).
- Wheals A. E., Basso L. C., Alves D. M. G., Amorim H. V.: *Trends Biotechnol.* **17**, 482 (1999).
- Wyman C. E. (ed.): *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor and Francis, Washington DC 1996.
- Brown M. A., Levine M. D., Romm J. P. R. A. H., Koomey J. G.: *Annu. Rev. Energ. Environ.* **23**, 31 (1998).
- U. S. Department of Energy, Energy Efficiency and Renewable Energy, [www.ccities.doe.gov](http://www.ccities.doe.gov)
- Wagner T. D.: *Society of Automotive Engineers* **19**, 1 (1980).
- Rehm H.-J., Reed G. (ed.): *Biotechnology*. VCH, Weinheim 1983.
- American Type Culture Collection, [www.atcc.org](http://www.atcc.org)
- Kocková-Kratochvílová A.: *Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov*. Alfa, Bratislava 1990.
- Špirek M., Sulo P.: *Biol. Listy* **66**, 305 (2001).
- Walker G. M.: *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley, Chichester 1998.
- Wills C.: *Res. Microbiol.* **147**, 556 (1996).
- Lagunas R.: *FEMS Microbiol. Rev.* **104**, 229 (1993).
- Jones K. D., Kompala D. S.: *J. Biotechnol.* **71**, 105 (1999).
- Kompala D. S.: *J. Biotechnol.* **71**, 267 (1999).
- Gancedo C.: *Eur. J. Biochem.* **206**, 297 (1992).
- Holzer H.: *Trends Biochem. Sci.* **1**, 178 (1976).
- Käppeli O., Sonnleitner B.: *Crit. Rev. Biotechnol.* **4**, 299 (1986).
- Gunasekaran P., Raj Ch. K.: *Curr. Sci.* **77**, 1 (1999).
- Rosypal S., Hoďák K., Martinec T., Kocur M.: *Obecná bakteriologie*. SPN, Praha 1981.
- Montenecourt B. S.: *Biology of Industrial Organisms*, Benjamin-Cummings Publishing Co., California 1985.
- Scopes R. K., Griffiths S.: *Biotechnol. Lett.* **8**, 653 (1986).
- Parker C., Peekhaus N., Zhang X., Conwaz T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3519 (1997).
- Algar E. M., Scopes R. K.: *J. Bacteriol.* **2**, 275 (1985).
- Buchholz S. E., Dooley M. M., Eveleigh D. E.: *Trends Biotechnol.* **5**, 199 (1987).
- Wills C., Kratochvíl P., Londo D., Martin T.: *Arch. Biochem. Biophys.* **210**, 775 (1981).
- O'Mullen P., Szakacs-Dobogi M., Eveleigh D. E.: *Biotechnol. Lett.* **13**, 137 (1991).
- Viikari L., Korhola M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 471 (1986).
- Aristidou A., Penttilä M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 187 (2000).
- Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 258 (2003).
- Mohagheghi A., Evans K., Chou Y. C., Zhang M.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98**, 885 (2002).
- Ho N. W., Chen Z., Brainard A. P.: *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1852 (1998).
- Dien B. S., Nichols N. N., O'Bryan P. J., Bothast R. J.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84**, 181 (2000).
- Bothast R. J., Saha B. C., Flossenzier V. A., Ingram L. O.: *Biotechnol. Lett.* **16**, 401 (1994).
- Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S. J.: *Principles of*

- Fermentation Technology*, BH, Oxford 2000.
40. Zigová J.: *Biologické listy* 64, 33 (1999).
  41. Nanba A., Nishizawa Y., Tsuchiya Y., Nagai S.: *J. Ferment. Technol.* 65, 277 (1987).
  42. Richter K., Becker U.: *Acta Biotechnol.* 7, 87 (1987).
  43. Laluece C., Palmieri M. C., Cruz R. C. L.: *Biotechnol. Bioeng.* 37, 528 (1991).
  44. Wasungu M. K., Simard R. E.: *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1125 (1982).
  45. Boinot F. (Les Usines de Melle): GB 483363 (C12P7/06).
  46. Silveira M. M., Jonas R.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 400 (2002).
  47. Cheryan M., Mehaia M. A.: *Process Biochem.* 19, 204 (1984).
  48. Alfenore S., Molina-Jouve C., Guillouet S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 67 (2002).
  49. Rogers P. L., Tribe E.: U. S. Patent 4,443,543 (1984).
  50. Altýntas M. M., Ülgen K. Ö., Kýrdar B., Önsan Z. I., Oliver S. G.: *Enzyme Microb. Technol.* 31, 640 (2002).
  51. Toma M. M., Kalnenieks U., Berzins A., Vigants A., Rikmanis M., Viesturs U.: *Process Biochem.* 38, 1347 (2003).
  52. Chematur Engineering: *Biostil*<sup>®</sup>, [http://www.chematur.se/sok/ethanol\\_popup1.htm](http://www.chematur.se/sok/ethanol_popup1.htm), stiahnuté 10.7.2004.
  53. Bu'Lock J. D., Comberbach D. M., Ghommidh C.: *Biochem. Eng. J.* 29, B9 (1984).
  54. Nowak J.: *Electron. J. Polish Agricultural Universities* 4-2, (2001).
  55. Kamini N. R., Gunasekaran P.: *Curr. Microbiol.* 16, 153 (1987).
  56. Bafmcová P., Šmogrovičová D.: *Chem. Listy* 93, 512 (1999).
  57. Sinha J., Dey P. K., Panda T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 476 (2000).
  58. Núñez M. J., Lema J. M.: *Enzyme Microb. Technol.* 9, 642 (1987).
  59. Godia F., Casas C., Sola C.: *Process Biochem.* 22, 43 (1987).
  60. Lozinsky V. I., Plieva F. M.: *Enzyme Microb. Technol.* 23, 227 (1998).
  61. Divies C., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 135 (1994).
  62. Durieux A., Nicolay X., Simon J.-P.: *Biotechnol. Lett.* 22, 1679 (2000).
  63. Jekel M., Buhr A., Willke T., Vorlop K.-D.: *Chem. Eng. Technol.* 21, 275 (1998).
  64. Karsch H., Esser K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 387 (1983).

**M. Rebroš<sup>a</sup>, M. Rosenberg<sup>a</sup>, E. Krištofiková<sup>a</sup>, and R. Stloukal<sup>b</sup>** (<sup>a</sup> *Department of Biochemical Technology, Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic*, <sup>b</sup> *MEGA Co., Stráž pod Ralskem, Czech Republic*): **Microbial Production of Fuel Ethanol: Bacteria or Yeasts?**

The advantages of using fuel ethanol are discussed. The physiology and metabolism of two main ethanol producers, *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*, are compared. The review also includes description and comparison of different kinds of fermentation processes using these microorganisms.