

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH  
BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

---

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Všeobecné zemědělství

Katedra: Agroekologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
ALKOHOLOVÁ VÝTĚŽNOST Z HYDROLYZÁTŮ  
OVSA, JEČMENE A PŠENICE

Autor diplomové práce:  
Miroslav Píkl

Vedoucí diplomové práce:  
Ing. Josef Maroušek, Ph.D.

2011

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
Zemědělská fakulta  
Katedra agroekologie  
Akademický rok: 2008/2009

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Miroslav PIKL**  
Studijní program: **M4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Všeobecné zemědělství**  
  
Název tématu: **Alkoholová výtěžnost z hydrolyzátů ovsa, ječmene  
a pšenice**

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

Student zpracuje literární rešerši na téma zcukřování škrobnatých plodin v rámci procesu výroby alkoholových biopaliv. Formou laborování se seznámí s problematikou hydrolyzátů z vybraných lokálních zemědělských plodin a principy technologie výroby alkoholových biopaliv.

Cílem práce je posuzování vhodnosti hydrolyzátu z ovesného, pšeničného a ječného zrna v návaznosti na alkoholovou výtěžnost u zvolené technologie (tlaková, kyselá, zásaditá, enzymatická) a optimalizace těchto postupů základními ekonomickými ukazateli pomocí matematických nástrojů.

Vlastní postup bude probíhat dle metodiky pro alkoholovou výtěžnost a konzultací s vedoucím práce s přihlédnutím k aktuálně dosaženým výsledkům.

Ke zpracování budou použita skripta Technika zpracování bakalářských a diplomových prací (Kareš, J., Vaněček, D., Burešová, M., 2007) a Práce s VTI (Milota, J., Nýdl, V., 1996).

Rozsah grafických prací: dle potřeby  
Rozsah pracovní zprávy: 65 stran  
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

**DRAPCHO, Caye, NGHIEM, John, WALKER, Terry.** Biofuels Engineering Process Technology. /s.l./ : /s.n./, 2008. 351 s. ISBN 978-0-07-148749-8.

**The Worldwatch Institute.** Biofuels for Transport: Global Potential and Implications for Energy and Agriculture. /s.l./ : /s.n./, 2007. 444 s. ISBN 978-1-84407-422-8.

**MOUSDALE, David M.** Biofuels: Biotechnology, Chemistry, and Sustainable Development. /s.l./ : /s.n./, 2008. 385 s. ISBN 978-1-4200-5124-7.

**BROWN, Robert C.** Biorenewable Resources: Engineering New Products from Agriculture. /s.l./ : /s.n./, 2003. 269 s. ISBN 0-8138-2263-7.

**NAG, Ahindra.** Biofuels Refining and Performance. /s.l./ : /s.n./, 2008. 297 s. ISBN 978-0-07-148970-3.

Související zákony Sbírký zákonů České republiky.

Další dle potřeby.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Josef Maroušek**  
Katedra agroekologie  
Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.**  
Katedra agroekologie  
Ostatní konzultanti: **prof. Ing. Ladislav Kolář, DrSc.**  
Katedra agroekologie

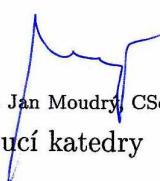
Datum zadání diplomové práce: **16. února 2009**  
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2011**



prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentská 13 ④  
370 05 České Budějovice

L.S.

  
prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.  
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 16. února 2009

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne: 28. 4. 2011

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval všem, kteří mi byli nápomocni při řešení mé diplomové práce. Zejména bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Josefu Marouškovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále bych rád poděkoval konzultantům prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. a prof. Ing. Ladislavu Kolářovi, DrSc. a také všem pracovníkům Katedry aplikovaných rostlinných biotechnologií.

# Obsah

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod	8
3. Cíl	9
4. Rešerše problematiky	10
4.1. Alkohol	10
4.2. Historie výroby a užívání	10
4.3. Alkoholová paliva	11
4.4. Složení zrna	12
4.4.1. Stavba škrobových zrn	14
4.5. Vliv druhu, odrůdy na složení zrna a výtěžek ethanolu	14
4.5.1. Pšenice	14
4.5.2. Ječmen	16
4.6. Distribuce škrobových zrn	16
4.6.1. Oves	16
4.7. Metody zpracování zrna	18
4.7.1. Mletí za sucha	18
4.7.1.1. GSHE Granular starch hydrolyzing enzymes – Enzymy hydrolyzující granulární škrob	23
4.7.2. Mletí za mokra	24
4.7.2.1. Zpracování škrobu	25
4.7.2.2. Vedlejší produkty	25
4.7.3. Solid state fermentation	26
4.8. Vlivy na hydrolýzu	26
4.8.1. Teplota	27
4.8.2. Enzymy degradující škrob	29
4.8.2.1. $\alpha$ -amyláza	29
4.8.2.2. Glukoamyláza	32
4.8.2.3. Enzymy ječného sladu	33
4.8.2.4. Enzymatická aktivita semen obilovin	34
4.9. Hydrolýza a ultrastruktura ječného škrobu	34
4.9.1. Škrobová zrna	37
4.10. Fermentace	39
4.10.1. Vlivy na kvasný proces	39
4.10.1.1. Koncentrace etanolu	39
4.10.1.2. Složení vstupující směsi a výživa	42
4.10.1.3. Poměr glukózy a FAN	44
4.10.1.4. Teplota	44
4.11. Přímá produkce etanolu	44
5. Metodika	46
5.1. Úprava surovin	46
5.2. Hydrolýza	46
5.2.1. Kyselá hydrolýza	46
5.2.2. Zásaditá hydrolýza	46
5.2.3. Enzymatická hydrolýza	46
5.3. Dávkování SEA (Maroušek, 2009)	47
5.4. Sladové mléko	48
5.5. Stanovení glukózové ekvivalentu (GE)	49
5.6. Stanovení alkoholové výtěžnosti	50
6. Výsledky	51

6.1. Pšenice .....	51
6.2. Oves .....	54
6.3. Ječmen.....	56
7. Diskuse.....	60
8. Závěr .....	64
9. Souhrn .....	65
10. Abstract .....	65
11. Seznam literatury .....	66

# 1. Seznam zkratek

AA –  $\alpha$ -amyláza

AAG – amyloglucosidase *Aspergillus niger* – amyloglukosidáza *Aspergillus niger*

AAU- Alpha-Amylase Units – jednotky  $\alpha$ -amylázy

AFAU – Acid Fungal Amylase Units – jednotky acidotolerantní fungální amylázy

AGU – Glucoamylase Unit – jednotky glucoamylázy

BAA – *Bacillus sp.* amylase –  $\alpha$ -amyláza *Bacillus sp.*

DS- Dry Solid – sušina pevné látky

PPA – Pork Pancreatic Amylase – amyláza vepřové slinivky

SDS – Sodium Dodecyl Sulphat – dodecylsulfát sodný

LAM - lipid-complexed amylose – amylolipidový komplex

FAM - lipid-free amylose – lipidů prostá amyulóza

% w/v - % hmotnostní vztažená na objem

SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation



## 2. Úvod

S rozvojem a stoupající životní úrovní stoupají i energetické nároky. Uchování energie je však jednou z mála oblastí elektroniky, která za poslední roky vysloveně přešlapuje na místě. Rostliny ukládají disponibilní energii efektivněji do náročných vazeb například ve formě krystalů celulózy, či různých struktur škrobu. O uvolnění této energie se lidstvo snaží dlouhé roky, avšak málokdy je vložená energie úměrná energii získané.

Energii získanou prostřednictvím fotosyntézy transformují rostliny na komplexnější sloučeniny, které procházejí řadou procesů a v rostlinách jsou ukládány ve formě makroergických zásobních látek. U rostlin je jich rozeznáváno několik druhů. Ze základních jsou to lipidy a polysacharidy. Z olejů lze vyrábět jejich estery, které lze využít v dieselových motorech. Sacharidy je možné převést na etanol, který je použitelný v motorech zážehových. Proces výroby etanolu je lidstvu známý již celá staletí, ale pro jeho masové využití je třeba tento proces zdokonalovat tak, aby výsledná energetická bilance byla co možná nejpříznivější. Proto jsou v současnosti intenzivně studovány postupy pro výrobu etanolu z lignocelulóзовých i škrobnatých surovin.

Škrob pěstovaných hospodářských plodin představuje jeden z nejsnáze dostupných zdrojů energie. V současnosti je jedním z největších zdrojů škrobu kukuřice (zejména v USA), ale zvyšuje se i zájem o ostatní plodiny, jako je např. pšenice nebo ječmen a další (Crabb a Mitchinson, 1997).

Etanol může mít potenciál do určité míry zmírnit rychlost nárůstu spotřeby fosilních paliv, ale jejich úplné nahrazení těmito produkty je z komplexního hlediska náročné. Vystává celá řada otázek technologických, ekonomických, ale v souvislosti s růstem populace i otázek morálních, na které je třeba hledat odpovědi.

### 3. Cíl

Cílem této práce je porovnat provozně aplikovatelnými testy alkoholovou výtěžnost hydrolyzátů obilovin (pšenice, ječmene a ovesa) připravených užitím termotlaké přípravy.

Pro hydrolyzu byla použita různá hydrolytická činidla v různých koncentracích – kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ ) a amylolytické enzymatické preparáty

## 4. Rešerše problematiky

### 4.1. Alkohol

Jako alkoholy jsou označovány nearomatické hydroxylové deriváty uhlovodíků. Základními hledisky dělení jsou:

#### počet hydroxylových skupin

- jednosytné alkoholy
- dioly
- trioly
- polyoly

#### uhlovodíkový zbytek

- alifatické (acyklické)
- alicyklické (cyklické)

Etanol –  $C_2H_5OH$  se řadí mezi jednosytné, acyklické alkoholy. Je tvořen etylovým uhlíkatým řetězcem, na který je navázána hydroxylová skupina. Etanol je bezbarvá tekutina s hustotou  $0,789 \text{ g.m}^{-3}$ . Bod tání  $-114,4 \text{ }^\circ\text{C}$  a bod varu  $78,3^\circ\text{C}$ . Je neomezeně rozpustný ve vodě. Etanol je středně polární rozpouštědlo. Pro živé organismy je toxický, což má svůj význam i při jeho výrobě. LD50 při orálním požití je  $7060 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

### 4.2. Historie výroby a užívání

Ethanol je bezesporu nejznámějším a nejdéle známým alkoholem. Vyrábí se kvasnou cestou z různých produktů, jako jsou obiloviny, cukry, ovoce. Výroba etanolu z rostlinných surovin je proces, který člověk objevil již ve starověku. Byly nalezeny důkazy o výrobě piva v egyptě, v Řecku i jinde bylo vyráběno víno. V současné době jsou intenzivně zkoumány možnosti jak efektivně získat ethanol z celulózy.

Další surovinou pro výrobu mohou být zbytky mlynářského průmyslu, které tvoří asi 26 % původního zrna (Neves et al., 2006). Díky výkyvům počasí je každoročně pro potravinářské využití znehodnoceno velké množství obilovin, které tak ztrácí na hodnotě, ale jsou použitelné jako surovina pro výrobu etanolu. Tyto poškozené obiloviny mohou být až 10x levnější než suroviny potravinářské kvality. Při obsahu škrobu 25 % je z takto poškozených zrn pšenice možno získat 4,4% obj

oproti 5,6 % obj u škrobu dobré kvality o stejné koncentraci (Suresh et al., 1999). Také Schenberg, Pinto da Costa a Oliver (1987) uvádějí možnost využití zrna obsahujícího mykotoxiny pro výrobu etanolu.

### **4.3. Alkoholová paliva**

Paliva na bázi alkoholů lze použít jako zdroj energie pro spalovací motory nebo „palivové články“. Běžně jsou pro tyto účely využívány první čtyři sloučeniny z alkoholové řady. Jsou to methanol, ethanol, propanol a butanol. Nejvíce rozšířeným alkoholovým palivem je ethanol. Lze to přičíst jeho snadné dostupnosti a také jeho nižší toxicitě.

Využívání různých alkoholů jako paliv začalo přibližně někdy na přelomu 18. a 19. století. Jedny z prvních doložených případů použití ethanolu jako paliva jsou z roku 1894 z Francie a Německa, kde byl ethanol využíván pro pohon strojů. Další podpory se ethanolu dostalo ve dvacátých letech 20. století od osobností jako Henry Ford, Alexandr Graham Bell nebo Thomas Edison. Poté použití alkoholových paliv ustoupilo do pozadí před palivy získávanými z ropy. K dalšímu využívání alkoholů jako paliv docházelo spíše nárazově. Lze zmínit např. 2. světovou válku, nebo krizi v 70. letech 20. století. Dosud se využití alkoholových paliv až na několik zemí ve světě příliš neujalo.

Ačkoli je v současné době v řadě zemí zvyšován obsah obnovitelné složky v palivech se záměrem snížit produkci emisí a udržitelnosti jejich výroba a tudíž snížení závislosti na fosilních palivech, hovoří některé skutečnosti proti jejich využití. Niven (2005) uvádí, že u paliva E10 (10 % objemových alkoholu) bylo prokázáno snížení celkových výfukových emisí uhlovodíků a oxidu uhelnatého. Zároveň však bylo pozorováno zvýšení některých jiných složek. V případě použití paliva E10 byl prokázán signifikantní nárůst produkce emisí acetaldehydu o 100 – 200 % (v některých případech až 700 %). Podobně se rovněž projevovala paliva E15 a E20. Rovněž produkce oxidů dusíku je sporná. Byl pozorován zajímavý efekt mírného snížení produkce NO<sub>x</sub> o 0,5 % u vozidel starších 1986 a naopak nárůst o 5 % mladších 1986. Produkce NO<sub>x</sub> je však silně závislá na nastavení motoru. Naopak dochází k výraznému snížení produkce prachových částic. Rovněž při použití paliva E85 dochází ke zvýšení produkce acetaldehydu a formaldehydu. Paliva obohacená

o etanol (zejména paliva s vyšším obsahem) mohou ohrozit půdní prostředí. Díky své reaktivnosti s materiály používanými v objektech pro jejich skladování mohou způsobit úniky. Takováto směs vykazuje odlišnosti od paliv bez přídavku etanolu. Směs je elektricky vodivá, snáze proniká kapilárními póry a lépe prochází hladinou podzemní vody. Rovněž dochází ke zvýšení rozpustnosti některých složek benzínu jako benzenu, toluenu, etylbenzenu a dalších. Rovněž celková energetická bilance těchto paliv je diskutabilní. Také udržitelná produkce je problematická. V současné době jsou ve všech zemích tato paliva subvencována. Při zvyšování podílu biopaliv budou kladeny vyšší nároky na plochy zemědělské půdy, na které budou pěstovány suroviny pro jejich výrobu. To povede k ovlivnění biodiverzity.

#### **4.4. Složení zrna**

Chemické složení zrna různých odrůd je výrazněji ovlivněno hnojením než genetickými rozdíly mezi odrůdami. Rovněž tak i alkoholová výtěžnost je ovlivněna aplikací hnojiv. S větší dávkou dusíkatých hnojiv klesá alkoholová výtěžnost. Škrob je přirozená zásobní látka obilovin, která je zdrojem cukrů pro fermentaci. Odrůdy s vyšším obsahem škrobu a nízkým obsahem dusíkatých látek by tedy měly poskytovat vyšší výtěžek etanolu. Většina dnes pěstovaných odrůd je ale pěstována pro potravinářské použití, kde je naopak kladně hodnocen vysoký obsah bílkovin. Nicméně obsah dusíkatých látek je velmi dobrý nepřímý ukazatel alkoholové výtěžnosti. Predikování výtěžku alkoholu na základě obsahu bílkovin v znu pšenice se jeví vhodnější než na základě obsahu škrobu (Kindred et al., 2008).

Škrobová makromolekula je složena z  $\alpha$ -D-glukózy. V případě obilovin se vyskytuje ve formě nerozpustných zrn, ve kterých se vyskytují 2 škrobové polymery – amyulóza a amylopektin. Typický poměr těchto frakcí je u obilovin 70 % amylopektinu a 30 % amylózy. Amyulóza se vyskytuje ve formě řetězce, kde je glukóza spojena  $\alpha$ -1-4 vazbami. Tato molekula vytváří v prostoru strukturu dvojité šroubovice. Šroubovice obsahuje 6 molekul D-glukózy na jeden závit. Amylopektin je naproti tomu silně větvená molekula. V řetězci amylopektinu se kromě vazeb 1-4 vyskytují i  $\alpha$ -1-6 vazby. Ty tvoří asi 4 – 6 % vazeb. Délka jednotlivých řetězců se pohybuje mezi 20 - 25 glukózovými jednotkami. Amylopektin je se svou vysokou molekulovou hmotností jednou z největších molekul v přírodě (Nigam a Singh, 1995). Byly vypěstovány zvláštní odrůdy (tzv. waxy odrůdy) hospodářských plodin, včetně obilovin, které neobsahují amyulózu. Tyto odrůdy vykazují při zpracování

některé specifické vlastnosti, např. nižší viskozitu (Frigard, Andersson, Aman, 2002). U waxy odrůd, které obsahují jen asi 1 % hm. amylozy, byla pozorována typická vrstevnatá struktura škrobových zrn (Reddy, Reddy, Basappa, 2009).

Škroby z různých zdrojů se liší složením škrobových zrn. Rozlišují se škroby s bimodálním složením škrobových zrn, které jsou typické pro pšenici, ječmen nebo žito. U takovýchto škrobů se rozlišuje frakce větší než 10  $\mu\text{m}$ , označovaná také jako frakce A. Druhou skupinu pak tvoří malá škrobová zrna typu B menší 10  $\mu\text{m}$ . Vzájemný poměr těchto frakcí se liší podle genotypu. V případě pšenice je rovněž někdy uváděno trimodální rozdělení škrobových zrn (Raeker et al., 1998).

Jiné zdroje Ao a Jane (2007) uvádějí, že pšenice obsahuje většinou pouze dvě frakce, přičemž frakce A obsahuje většinu škrobu, ale tvoří asi jen 10 % počtu všech škrobových zrn. Právě poměr a velikost jednotlivých frakcí ovlivňují vlastnosti škrobu jako bobtnání, gelatinizaci, krystaličnost nebo přístupnost pro enzymy. Intenzita bobtnání je však podle jiných spojena spíše s vnitřní strukturou škrobových zrn, než s jejich velikostí (Bogracheva et al., 2002). Debet a Gidley (2006) uvádějí, že lipidové a proteinové povrchové složky škrobových zrn působí redukčně na bobtnavost škrobu pšenice a kukuřice. Povrchové struktury se výrazně liší od vnitřních. Povrchové proteinové struktury mají především charakter zásobních látek. Rovněž byly nalezeny struktury, které se nacházejí jak na povrchu, tak uvnitř škrobových zrn. Soudí se, že většina těchto neutrálních struktur je na povrch škrobových zrn pouze adsorbována. Rovněž obsah lipidů škrobu hraje významnou roli. Ten je u obilovin vyšší (0,6 – 1 %) než např. u brambor (0,05 %). Bylo prokázáno, že různý obsah fosfolipidů při zachování ostatních vlastností má výrazný vliv na snížení bobtnavosti (Lin a Czuchjowska, 1998). FAM tuková frakce koreluje s bobtnavostí pozitivně, zatímco LAM má silný inhibiční efekt. Neierle et al. (1990) prokázali, že úpravou s dodecylsulfátem sodným (SDS) lze výrazně zvýšit bobtnavost pšeničného škrobu i při nižších teplotách. Podobný jev, ale v menší míře, byl pozorován při použití roztoku etanolu. Debet a Gidley (2006) ale upozorňují na to, že viskozita dosažená po extrakci pomocí SDS je silně závislá na původu škrobu. Pomocí SDS extrakce tak lze výrazně zvýšit bobtnavost pšeničného škrobu, ale např. u škrobu brambor je efekt minimální.

Přítomnost amylo-lipidových komplexů ve škrobových zrnech hraje klíčovou roli v redukci pronikání vody do vnitřních struktur, bobtnavosti a rozpouštění ve studené vodě (Becker, Hill a Mitchell, 2001).

Autoři dále zmiňují 3 způsoby vzniku těchto komplexů:

1. amyulóza tvoří komplexy s endogenními lipidy
2. amylo-lipidové komplexy jsou již přítomny,
3. vznikají za účasti vnějších lipidů.

Debet a Gidley (2007) uvádějí během procesu gelatinizace vznik částic (jakési obdoby škrobových zrn), které se nerozpouští. Nazývají je „ghosts“. Integrita těchto částic je pravděpodobně spojena s působením povrchových proteinů a lipidů, protože větší množství těchto částic s vyšší integritou může být připraveno např. z ječmene nebo pšenice, u kterých lze pozorovat relativně velký podíl proteinů a lipidů. Naproti tomu u brambor, jejichž obsah tuku a proteinů je nízký, převládá gelatinizace s rozpadem struktur škrobového zrna.

#### **4.4.1. Stavba škrobových zrn**

Škrobová zrna různých velikostních kategorií se liší nejen velikostí, tvarem a obsahem amylózy, ale i vnitřní strukturou. Tato rozdílná struktura vzniká jako důsledek různé syntézy škrobu. Ao a Jane (2007) ve své práci uvádějí, že diskovitá škrobová zrna typu A u pšenice, tritikale a ječmene mají jednotlivé molekuly amylopektinu orientované paralelně kolmo na ekvatoriální rovinu. Paralelní uspořádání je dáno počtem jednotlivých řetězců, které tvoří molekulu amylopektinu. Škrobová zrna typu A jsou tak tvořena větším počtem dlouhých řetězců. Naproti tomu zrna, kde je molekula amylopektinu tvořena větším počtem krátkých řetězců, je rozeznáván cylindrický tvar.

Uspořádání molekul amylopektinu tak při tvorbě škrobového zrna vytváří růstové vrstvy.

Kromě těchto struktur a pórů jsou uvnitř zrna přítomny ještě kanálky. Ty jsou buď prázdné, nebo většinou vyplněné proteiny (Han et al., 2005).

#### **4.5. Vliv druhu, odrůdy na složení zrna a výtěžek ethanolu**

Úprava zrna před výrobou ethanolu sestává zejména z mletí. Hlavním požadavkem na vzniklou směs je vysoký obsah škrobu (Wang et al., 2007).

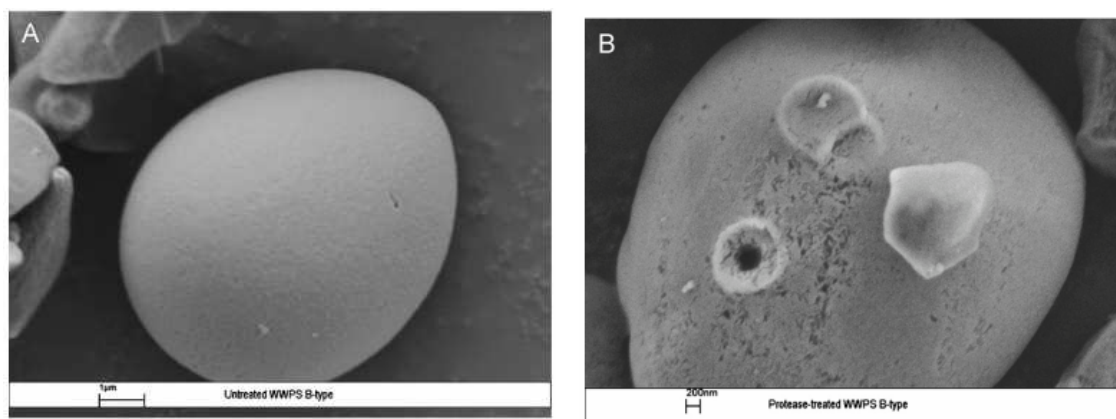
##### **4.5.1. Pšenice**

Pšenice je v ČR a většině evropských zemí plodinou, která je nejvíce zastoupena ve většině osevních postupů. Díky vysoké prošlechtěnosti poskytuje

vysoké výnosy. Pro výrobu etanolu jsou vhodné zejména odrůdy s vyšším obsahem škrobu. Jako příklad lze uvést odrůdy Rapsodia nebo Florett. Šnobl et al. (2005) uvádí složení zrna pšenice: voda 13,5 %, bezdusíkaté extraktivní látky 68 %, dusíkaté látky 12,5 %, vláknina 2,2 %, lipidy 2 %, popeloviny 1,8%.

Pšeničný endosperm obsahuje dva typy škrobových granulí. Větší typ A o velikosti 10 – 30  $\mu\text{m}$  a menší formu – typ B s velikostí 1 – 10  $\mu\text{m}$ . Velká škrobová zrna tvoří u pšenice asi 3 – 5 % z celkového počtu škrobových zrn. Obsah škrobu v nich ale představuje až 70 % veškerého škrobu. Zbytek je tvořen škrobovými zrny typu B, která mají tendenci se shlukovat (Chiotelli a Le Meste, 2002). Rovněž u pšenice lze rozeznávat waxy a non-waxy odrůdy. U waxy odrůd pšenice uvádí Sasaki, Yasui a Matsuki (2000) obsah amylózy 0,8 – 0,9 %, u non-waxy odrůd potom 18,3 – 20,3 %. U kříženců F1 potom 7,5 % respektive 14,5 %. Kim a Huber (2008) uvádí velikost A-zrn pro normální  $22,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$  a waxy  $22,5 \pm 0,4 \mu\text{m}$  pšeničný škrob. Pro B-typ škrobových zrn  $6,8 \pm 0,1 \mu\text{m}$  a  $6,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Dále uvádí na povrchu zrn četné póry a rýhy, které jsou četnější u waxy škrobů, než u škrobů normálních. Také u zrn typu B lze pozorovat póry, i když jejich počet je oproti zrnům typu A výrazně menší. Po ošetření škrobu pomocí proteolytických enzymů lze pozorovat větší počet těchto povrchových struktur (obr. 1). Také u škrobových zrn byly pozorovány vnitřní struktury podobné kanálkům zrn typu A. Tyto vnitřní struktury škrobových zrn působí jako cesty pronikání chemických reagentů do škrobové matrice. Bylo prokázáno, že toto působení je výrazně větší v podmínkách bobtnání škrobových zrn. Pokud škrobová zrna neprojdou bobtnáním, dochází k průniku reagentů pouze do povrchových vrstev škrobových zrn (Kim a Huber, 2008).

Obr. 1: Zrna typu B a – neošetřené, b- ošetřené proteázou



Zdroj: Kim a Huber, 2008



#### **4.5.2. Ječmen**

Ječmen se jeví jako další vhodná surovina pro výrobu etanolu. Se zpracování ječmene jsou již značné zkušenosti s oblasti pivovarnictví. Jeho výtěžky etanolu jsou porovnatelné s výtěžností z pšenice avšak jsou nižší oproti výtěžku z kukuřice. Šnobl et al. (2005) uvádí složení zrna jarního ječmene 13,7 % voda, bezdusíkaté extraktivní látky 67,8 %, dusíkaté látky 10,2 %, vláknina 4 %, tuky 2,1 % a popeloviny 2,2 %. V případě využití celulólytických enzymů může být pro výrobu lihu využita i plucha obilky. Vznikají rovněž vedlejší produkty, jako jsou: bílkoviny, vláknina, mastné kyseliny a tokoferoly (Gibreel et al., 2009). Zajímavé je chemické složení těchto škrobových zrn. U škrobových zrn typu B je až dvakrát vyšší obsah bílkovin oproti velkým škrobovým zrnům. Tento jev lze vysvětlit dvěma způsoby. Bílkoviny mohou u těchto zrn tvořit větší podíl vnitřních struktur. Jejich vyšší obsah může být rovněž způsoben velkým specifickým povrchem, na který se bílkoviny adsorbují (MacGregor a Ballance, 1980).

#### **4.6. Distribuce škrobových zrn**

Byl prokázán různý poměr velikostních kategorií škrobu v různých částech obilky ječmene. Škrobová zrna lze rozdělit do 3 velikostních kategorií podle průměrné velikosti: malá 2  $\mu\text{m}$ , střední 10  $\mu\text{m}$  a velká 12 – 19  $\mu\text{m}$ . Podíl velkých zrn se směrem od povrchu (72 %) snižuje na 19 % ve středu obilky. Naopak podíl malých a středních zrn se zvyšuje z 24 a 4 % na okraji obilky na 70 a 11 % ve středu. Rovněž byl v tomto směru pozorován pokles průměrné velikosti velkých zrn z 19 na 11,2  $\mu\text{m}$ . U malých a středních škrobových zrn se projevuje opačná tendence (Tang et al., 2000).

##### **4.6.1. Oves**

Obilka ovesa vykazuje vyšší obsah tuku oproti ostatním obilovinám. Na chemické složení má výrazný vliv pluchatost odrůdy. Zatímco u pluchatých odrůd je základní složení N-látky 12,4 %, škrob 39,6 %, hrubá celulóza 11,8 %, tuk 3,5 %, tak u nahých odrůd lze pozorovat výrazně vyšší obsah složek: N-látky 16,5 %, škrob 56,3 %, hrubá celulóza 1,4 % a tuk 8,3 % (Šnobl et al., 2005). Tester a Karkalas (1996) poukazují na fakt, že různé formy výskytu tuku mají vliv na bobtnání škrobových zrn. Zejména se zabývají komplexy lipidů a amylozy - LAM (lipid-complexed amylose) a volné amylozy - FAM (lipid-free amylose). Kdy LAM potlačuje bobtnavost, zatímco FAM ji podporuje. Další odlišností škrobových zrn je,

že při teplotě 80°C se uvolňuje především amylopektin, zatímco u ostatních obilovin je to především amyulóza. Tento velký podíl amylopektinových frakcí přičítají větší náchylnosti gelatinizovaných škrobových zrn ovsa k dezintegraci. Doublier, Paton a Llamas (1987) poukazují na to, že při určitých podmínkách lze u ovesného škrobu pozorovat větší bobtnavost než u škrobu jiných obilovin. To potvrzují i Hoover a Vasanthan (1992), kteří pozorovali větší bobtnavost u škrobu ovsa než u škrobu pšenice. Rovněž zmiňují větší citlivost ovesného škrobu ke kyselé hydrolyze než k  $\alpha$ -amyláze. Tester a Karkalas (1996) uvádějí u nahého ovsa nižší obsah lipidů 0,66 mg.100mg<sup>-1</sup> škrobu oproti vyššímu obsahu u běžných pluchatých odrůd 0,75 – 0,78 mg.100mg<sup>-1</sup>. Jiní autoři se často liší v obsahu lipidů. Tyto rozdíly lze ale vysvětlit i variabilitou jednotlivých odrůd a prostředí. U nahého ovsa lze pozorovat větší bobtnavost oproti pluchatým odrůdám. Tester a Karkalas (1996) tento jev přisuzují vyššímu obsahu amylopektinu a nižšímu obsahu tuku.

Oves obsahuje oproti pšenici nebo kukuřici větší podíl tuku v komplexu s amyložou (Zhou et al., 1999). Rovněž byla pozorována pozitivní korelace mezi obsahem lipidů a amyložou v izolovaném ovesném škrobu. Morison (1981) rozlišuje lipidy, které se uvnitř škrobových zrn vyskytují uvnitř šroubovice amyložou a lipidy vyskytující se mezi amyložou a amylopektinem. Právě toto uložení uvnitř šroubovice brání autooxidaci této části lipidů. Vnitřní lipidy škrobu jsou tvořeny výhradně monoacyl lipidy (volné mastné kyseliny nebo lysofosfolipidy). Poměr lysofosfolipidů vůči volným mastným kyselinám se liší podle druhu, ale u ovsa je tvořeno 30 % volnými mastnými kyselinami.

Wang a White (1994) uvádějí, že obsah lipidů v obilce ovsa je různý (6,2 – 11,2 %) a 1,08 – 1,18 % ve škrobu ovsa. To je více než u škrobu kukuřice (0,56 – 0,66). Obsah amyložou je uváděn v rozsahu 16 – 29 %. Dále uvádějí, že velikost škrobových zrn ovsa negativně koreluje s obsahem amyložou a amylo-lipidových komplexů. S nárůstem obsahu amyložou zároveň dochází ke zkracování řetězců škrobu u ovsa. Sowa a White (1992) uvádějí, že k rozkladu amylo-lipidových komplexů dochází zhruba při teplotě 100 °C.

Copeland et al. (2009) uvádějí, že povrchové lipidové struktury škrobových zrn jsou tvořeny především tri-acyl-glyceroly, zatímco tuky obsažené uvnitř jsou mono-acyl-lipidy.

Wang a White (1994) uvádějí, že škrobová zrna ovsa mají nepravidelný tvar s rozměry 2,7 – 9,5  $\mu\text{m}$ . Šrobová zrna ovsa jsou tedy velmi podobná škrobovým

zrnům rýže, a to jak ve tvaru, tak i velikosti. Molekulová hmotnost škrobu ovsa je menší než kukuřice nebo pšenice.

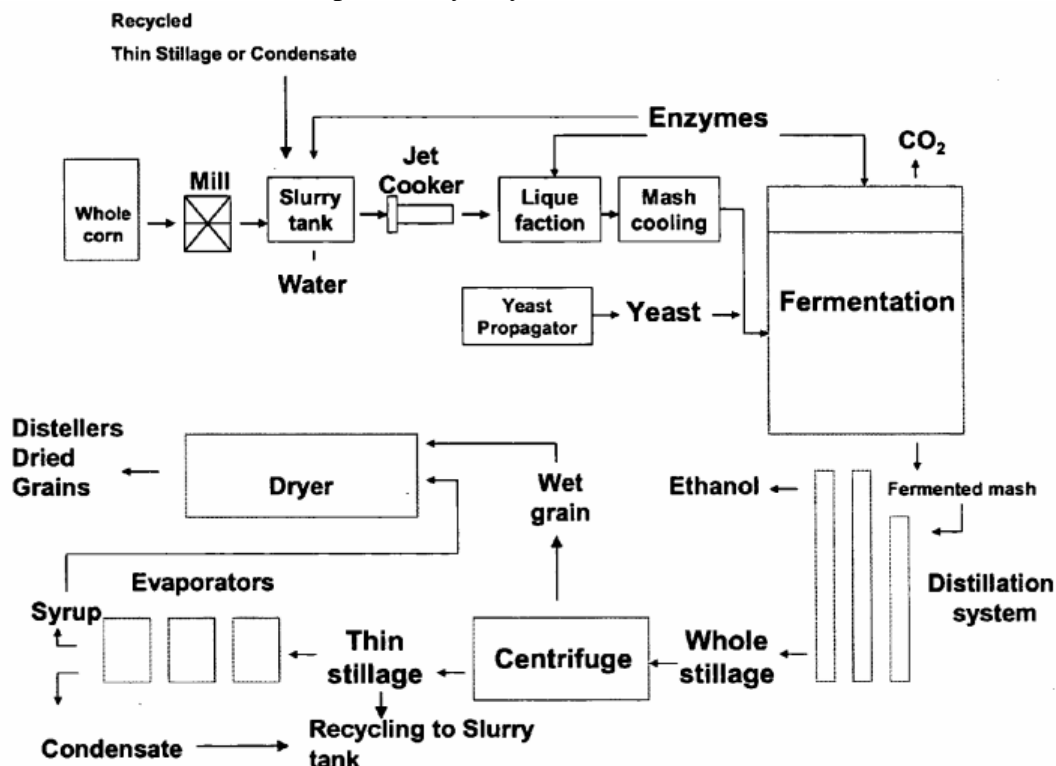
#### **4.7. Metody zpracování zrna**

Proces výroby etanolu sestává v prvním kroku z mechanického zpracování surové organické hmoty. Jsou rozeznávány 2 způsoby: mokré a suché zpracování. Suché metody jsou většinou založeny na mechanické dezintegraci surového materiálu. Mokré metody zahrnují řadu kroků, které mají za cíl změkčení zrna a separace jeho jednotlivých složek pro následné využití. Suché procesy jsou pro výrobu etanolu využívány častěji (Forrester et al., US 2011/0033907 A1). Při klasickém způsobu výroby etanolu jsou dnes podle Adhikari et al. (US2010/0099156A1) suroviny nejprve mechanicky připraveny, dále je smíšením s vodou vytvořena kašovitá směs. Někdy je směs upravena ještě zahříváním, aby došlo ke gelatinizaci škrobových zrn.

##### **4.7.1. Mletí za sucha**

První fází je odstranit od obilek plevy. Poté je zrna mletu na hrubou mouku. Správné umletí je důležité pro zvětšení kontaktního povrchu, na kterém může docházet k hydrolytickému štěpení škrobových molekul (obr. 3). Poté je mouka smíchána s vodou a upravuje se reakce na hodnotu přibližně  $\text{pH} = 6$ . Poté je směs zahřívána na  $110^\circ\text{C}$ . Zahřívání způsobuje dezintegraci škrobových zrn, což má za následek další zvětšení plochy, na které může následně působit enzym. Do takto upravené směsi se přidává termostabilní alfa-amyláza (E.C.3.2.1.1). Využitím termostabilních enzymů pro hydrolyzu škrobu se zabýval už Krebs et al., (US3185633). Zmiňuje využití enzymů při teplotách  $60 - 90^\circ\text{C}$ , přičemž bakteriálním enzymům přisuzuje vyšší termostabilitu. Nigam a Singh, (1995) uvádí enzymatickou hydrolyzu škrobu jako první krok výroby etanolu. Výhodou amylolytických enzymů stabilních i při teplotách vyšších  $60^\circ\text{C}$  je minimalizace mikrobiální kontaminace, dochází ke zkrácení reakčního času a zároveň je omezena polymerace D-glukózy na iso-maltózu (Nigam a Singh, 1995).

Obr. 2: Schéma klasického způsobu výroby etanolu



Zdroj: Otto et al., US2005/0026261A1

Směs je následně udržována při atmosférickém tlaku při teplotě 80 – 90 °C. Gibreel et al., (2009) uvádí teploty 100 – 120°C s přímým ohřevem párou (jet-cooking). V těchto podmínkách dochází k hydrolýze škrobových molekul na kratší partikule - dextriny. Jejich délka je mezi 5 až 10 glukózovými molekulami. Tato směs je poté ochlazená asi na 32°C a reakce je upravena na hodnotu pH = 4,5 – 5. Pro úpravu reakce lze využít kyselinu fosforečnou (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) nebo kaly z destilačních nádrží. Další fází je zcukření a samotný kvasný proces. Kvasinky jsou převedeny do kapalného stavu a spolu s glukó-amilázou jsou přidány do směsi. Glukó-amiláza působí na 1-4 glykosidické vazby dextrinů a uvolňuje tak molekuly glukózy a maltózy. Ty mohou být následně využity kvasinkami pro vlastní tvorbu lihu. Tento souběžný proces zcukření a kvašení - SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) je důležitý ze dvou důvodů. Prvním je, že vznikající monosacharidy jsou téměř ihned spotřebovány kvasinkami. Takto lze redukovat riziko mikrobiální kontaminace. Druhým důvodem je osmotické působení jednoduchých cukrů. Tím, že jsou rychle spotřebovány je udržováno vhodné prostředí pro růst kvasinkové kultury. V procesu SSF jsou použity enzymy provádějící sacharifikaci v podmínkách fermentace tedy 30 °C oproti 40 – 60 °C. Avšak i při SSF jsou stále vysoké

energetické nároky na likvifikaci (95 °C) a destilaci (75 – 78 °C). Adhikari et al. (US2010/0099156A1) proto přichází s metodou získávání etanolu pomocí termofilních mikroorganismů. Konkrétně *Geobacillus sp.* (MTCC 5319) a *Kluyoveromyces sp.* (MTCC 5314). Použití termofilních organismů vede k vypuštění 1 procesu zchlazování a opětovného zahřevu směsi.

Celý proces výroby lihu metodou suchého mletí trvá od 48 do 72 hodin. Výtěžek ethanolu při tomto způsobu zpracování je asi 0,281 l.l<sup>-1</sup> při obsahu ethanolu ve směsi kolem 10 %.

Pro metodu SSF mohou být rovněž využity pšeničné mlynářské zbytky. Ty vykazují při obsahu škrobu cca 25 % vyšší produkci ethanolu (38,6 g/l) oproti produkci z poškozené pšeničné mouky (34,1 g/l). Dosažený výtěžek tak představuje 87 % výtěžku z kvalitní pšeničné mouky. Zajímavé je rovněž srovnání s výtěžností cukrové třtiny, kdy výtěžnost z mlynářských zbytků (0,49 L-etanolu / kg – mouky) je skoro stejně vysoká jako výtěžnost z cukrové třtiny (0,5 l.kg<sup>-1</sup> – suché biomasy) (Neves et al., 2006).

Yoshizumi et al. (US4514496) vyvinul postup založený na starých japonských postupech výroby alkoholických nápojů. Při určité koncentraci zápary lze získat bez výrazného zahřívání a opakovaných úprav pH v případě použití vhodných enzymů vysoký fermentační výtěžek a asi o 40 % vyšší koncentraci alkoholu ve fermentované směsi. Autoři uvádějí poměr ředění surového škrobnatého materiálu : ředidlu 1:3,4 – 1:1,8. Jako ředidlo lze využít vodu nebo vodu ve směsi s tekutinou výpalků. Jako velmi vhodné označuje výpalky získané při vakuovém získávání ethanolu. Výhodou nízkého stupně zahřívání směsi je kromě úspory energie i nízká viskozita. Ta umožňuje využití výpalků i v podílu větším než 50 % vůči vodě. Lewis et al. (US2010/0041116A1) uvádí, že pokud jsou ve směsi využity výpalky, dochází k dotaci média volným amino dusíkem (FAN), který je významným faktorem ovlivňujícím rozvoj kvasinkové kultury. Podobně jako Yoshizumi uvádí i Lewis (US2005/0239181A1) nízké teploty pro proces sacharifikace. Důvodem jsou Mailardovy reakce, které probíhají při vyšších teplotách a částečně tak dochází k vyvázání využitelného dusíku ze zápary.

Autoři Yoshizumi et al. (US4514496) uvádějí vhodnost preparátu získaného z rodu *Rhizopus*. Jedním z důvodů je optimální reakční pH tohoto enzymu 4,6, které je shodné s podmínkami této metody (pH 4 – 5). V těchto podmínkách vykazují enzymy *Rhizopus sp.* větší účinnost než enzymy *Aspergillus sp.* Po 90 – 120 hod

fermentace při teplotě 25 – 35 °C, dávce zcukřujícího enzymu 3,5 jednotky na gram původní suroviny a dávce kvasinek  $2 \times 10^7$  buněk.ml<sup>-1</sup> uvádí autoři obsah alkoholu 12,2 -17,1 % obj. Naproti tomu Lewis et al. (US2010/0041116A1) uvádí možnost využití i jiných zdrojů amyláz stabilních v kyselém prostředí. Jako příklady uvádí další rody jako *Mucor*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia* a mnohé další. Dávkování enzymu je uváděno v množství 0,1 – 10 acidostabilní amylázy (AFAU) na gram vstupní suroviny. Dále uvádí, že je možné podpořit sacharifikaci přidáním glukoamylázy v množství 0,1 – 6 jednotek glukoamylázy (AGU) na gram suché vstupní suroviny. Lewis uvádí při podobných podmínkách jako Youshizumi obsah etanolu 18 – 23 % obj. po 45 – 96 hod. Dále uvádí, že většina tohoto alkoholu (až 80 %) je vyprodukováno v prvních 45 hodinách. Bylo rovněž porovnáno jaké změny ve výtěžnosti vyvolá změna dávky enzymu v konvenčním procesu a procesu přímého zcukřování škrobu. Pro porovnání byla použita acidotolerantní fungální amyláza SP288. Jsou uváděny hodnoty 21,3 % obj. etanolu u přímého zcukřování oproti 20,6 % obj. u klasického procesu.

Lantero et al. (US2007/0281344A1) také uvádí metodu hydrolyzy granulí škrobu při nízké teplotě. Do škrobové suspenze je předána  $\alpha$ -amyláza při teplotách pod bodem gelatinizace. Nejvhodnější pH pro tuto fázi doporučované autory je 4,5 – 5,5. Teploty, při kterých by směs měla být udržována se různí. Rozmezí teplot je silně závislé na druh škrobu, ale obecně lze uvést rozmezí teplot 45 – 80 °C. Pro jednotlivé druhy škrobu uvádí autoři tato rozmezí teplot: ječmen 52 – 59 °C, pšenice 58 – 64 °C, ale vysokoobsahová kukuřice 67 – 80 °C. Doba trvání této první fáze s exogenními amylázami je uváděna mezi 15 min – 48 hod. Rovněž dávka  $\alpha$ -amylázy se různí podle druhu škrobu a podmínek. Pohybuje se v širokém rozmezí 0,001 – 50 AAU.gDS<sup>-1</sup> Tyto teploty umožňují endogenním hydrolytickým enzymům štěpení oligosacharidů. Cílem tohoto procesu je získat suspenzi obsahující alespoň 10 % glukózy. Jako navazující proces autor uvádí fermentaci při teplotách 10 – 40 °C po dobu 10 – 250 hod. Pro takovéto zpracování jsou vhodné zejména bakteriální  $\alpha$ -amylázy stabilní v kyselém prostředí. Zejména se jedná o  $\alpha$ -amylázy získávané z druhů *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans* a *B. amyloliquefaciens*.

V roce 1976 zavedl Ehnstrom (US3940492) do procesu SSF opatření, která eliminovala nutnost fermentaci přerušovat. Problém je řešen centrifugací již fermentované zápary. Při centrifugami jsou získávány 3 podíly: čistý zákvas,

kvasinky a nečistoty. Získané kvasinky jsou poté vráceny do fermentoru. Přebytek kvasinek je z okruhu odebírán. Vzniklý etanol pak lze snadno získávat destilací, aniž by docházelo k usmrcení kvasinek.

Lewis et al., (US2005/0239181A1) uvádí proces SSF při teplotách v rozmezí 25 – 40 °C nebo 30 – 35 °C. Proces ale rozděluje do dvou fází, kdy v první fázi je směs zahřívána a pak se nechá poklesnout na spodní hranici, tedy 25 resp. 30 °C. Při této teplotě je pak směs udržována v průběhu druhé fáze sacharifikace. Toto rozdělení je zdůvodněno v návaznosti na obsah alkoholu ve směsi. Na začátku SSF, kdy je ve směsi jen málo alkoholu mohou vyšší teploty podpořit vznik zkvasitelných cukrů a naopak v 2. fázi, kdy je inhibiční působení etanolu vysoké nejsou kvasinky stresovány další faktorem. Takovéto diferenciování podmínek v průběhu procesu SSF může zvýšit výtěžek etanolu. Inhibičním působením etanolu a jeho omezením se zabýval již Boeckeler et al., (US2440925), který uvádí jako jednu z možností při dosažení určité koncentrace etanolu uvnitř fermentoru odejmout část tekutiny. Z ní potom odstranit etanol pomocí sníženého tlaku a mírného ohřevu, tak aby nedocházelo k usmrcení kvasinek. Podobně jako v dřívější práci uvádí Lewis 2 teplotní fáze sacharifikace, tak v pozdější práci (US2010/0041116A1) uvádí 2 fáze s různými hodnotami pH. V první fázi, kdy dochází k plnění zařízení, jsou uváděny nízké hodnoty pH (3 – 4,5), které omezují riziko bakteriální kontaminace. V druhé polovině sacharifikace lze zvýšit hodnotu pH (4,5 – 6). Tyto hodnoty jsou vhodnější pro růst kvasinkové kultury.

Otto et al., (US2005/0026261A1) prokázali, že pro mnoho kvasných přípravků použitelných pro výrobu etanolu je při procesu SSF optimální teplota 32 °C. S nárůstem teploty roste podíl zbytkové glukózy a klesá výtěžek alkoholu.

Adhikari et al. (US2010/0099156A1) přichází s odlišným způsobem hydrolýzy a fermentace škrobu. Uvádí oba způsoby získávání etanolu, tedy oddělenou hydrolýzu a fermentaci, ale i proces SSF. U 2 fázového způsobu uvádí sacharifikaci a likvifikaci škrobu s použitím extracelulárních enzymů bakterií *Geobacillus* sp. (MTCC 5319) při teplotách v intervalu 40 – 80 °C a pH 5 – 7. Následným procesem je fermentace termofilními druhy *Kluyveromyces* sp. (MTCC 5314) při 40 – 100 °C a pH 4,5 – 5,5 s následnou konvenční destilací. Ve variantě SSF uvádí použití stejných mikroorganismů. Liší se však podmínky prostředí: teplota 40 – 60 °C a pH 4,5 – 5,5. V případě oddělených procesů sacharifikace a fermentace byla koncentrace etanolu 1,8 % v zápaře získána

nejrychleji (během 30 hod) při teplotě 55 °C. V případě SSF lze stejné koncentrace dosáhnout během 22 hodin při teplotě 60 °C. Pro k dosažení stejné koncentrace během 30 hodin je třeba teplota pouze 50 °C.

Enzymy používané ve většině provozů jsou vysoce nákladnou položkou výroby. Systémy do kterých je třeba dodávat velká množství nového enzymu jsou ekonomicky neefektivní. Životnost enzymů v procesech SSF je většinou delší než je doba zdržení směsi v reaktoru. Při zpracování škrobu metodou SSF je tedy výhodné na konci procesu z reakční směsi odstraňovat enzymy. Toho lze dosáhnout prostřednictvím magneticky citlivých nanočástic. Tyto částice musí mít takové vlastnosti, aby se na jejich povrch byl příslušný enzym schopný adsorbovat. Enzym je přichycen k povrchu nosiče tak, aby byla zajištěna možnost správné orientace vůči substrátu. Příslušný enzym je pak z reakční směsi odstraňován prostřednictvím magnetického pole (Ingraham et al., US 2011/0020894 A1).

#### **4.7.1.1. GSHE Granular starch hydrolyzing enzymes – Enzymy hydrolyzující granulární škrob**

Konvenční metody suchého zpracování zrna vyžadují zahřívání směsi současně s přidáním termostabilní  $\alpha$ -amylázy nad teplotu gelatinizace, která je asi 60 °C a liší se podle jednotlivých typů škrobu. Sodhi et al., (2005) uvádí teplotu náhřevu až na 100 °C, při níž dojde v procesu gelatinizace ke zvýšení viskozity. Proces je pak nutno spojit přidáním termostabilní  $\alpha$ -amylázy s procesem likvifikace a snížit tak viskozitu.

Dále jsou přidány glukoamylázy pro tvorbu glukózy. GSHE je směs  $\alpha$ -amylázy a glukoamylázy, která je schopná hydrolyzovat surový škrob při teplotách nižších než 60°C. Příkladem může být enzymatický přípravek Startem 001, který je schopný hydrolyzovat škrob na fermentovatelné cukry při teplotách do 48 °C. Tento přípravek tak dokáže nahradit procesy likvifikace a sacharifikace a přímo uvolňuje zkvasitelné cukry. Další výhodou je, že nedochází k tak velkému poškození proteinů, které jsou lépe zhodnotitelné jako vedlejší produkty (Gibreel et al., 2009). To má za následek nejen zjednodušení celého procesu (vynechání likvifikace), ale i podstatné snížení nákladů. Dalším přínosem tohoto způsobu zpracování je kromě snížení nákladů na ohřev nižší viskozita záparů, takže je možné ji snadněji čerpat a zvýšit tak kapacitu zařízení (Robertson et al., 2006). Nižší viskozita rovněž umožňuje efektivnější hydrolyzu glukózových polymerů (Neves et al., 2006)



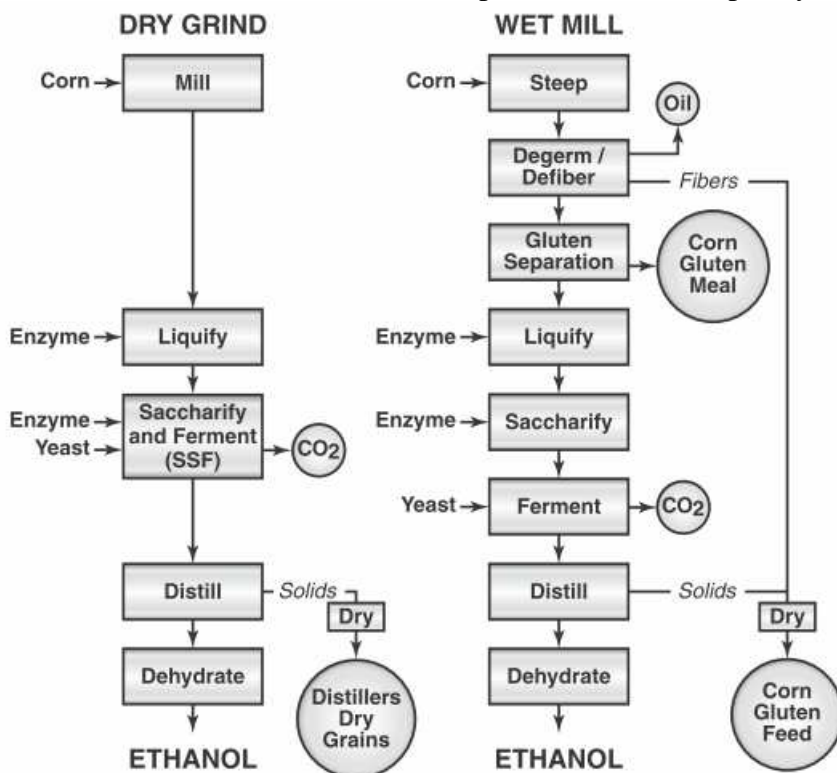
GSHE lze využít i při takzvaném „enzymatickém mletí“. To spočívá v 2 – 3 hodinové inkubaci zrn s GSHE během níž dojde k uvolnění fermentovatelných cukrů z klíčku a vlákninové frakce. Během tohoto procesu dojde k nárůstu specifické hmotnosti škrobových látek, takže klíček a vlákninová frakce mohou být odstraněny na základě rozdílné hmotnosti (Vidal et al., 2009).

#### **4.7.2. Mletí za mokra**

Tato metoda zpracování zrna je založena na myšlence odstranění částí zrna, které obsahují látky, které nejsou vhodné pro výrobu ethanolu a jejich následném zpracování pro jiné účely (obr. 3). Do oddělovaných částí patří zejména klíček a osemení. Tyto části zrna mají nízký obsah škrobových látek, naproti tomu vykazují vysoký obsah bílkovin, tuků a vlákniny. Prvním krokem při zpracování zrna touto cestou je macerace. Při ní se zrno po 30 – 36 hodin máčí při teplotě 52°C v ředěné kyselině fosforečné. Ve směsi dochází k rozvoji bakterií rodu *Lactobacillus*. Tyto bakterie produkují zejména kyselinu mléčnou, což vede k dalšímu okyselení směs (Nichols et al. 2006), . Během tohoto procesu dochází vlivem kyselého prostředí k změknutí a bobtnání zrna, přerušení disulfidických vazeb mezi bílkovinami a škrobem v endospermu a uvolnění škrobových zrn, čímž je zrno připraveno rozdělení na jednotlivé frakce (Johnson a May, 2003).

Po procesu máčení je nejprve ze zrna vytlačen klíček. Z klíčku jsou následně odstraňovány jednotlivé frakce. Nejprve je odstraněn olej, následně škrob a bílkovina. Bílkovina je od škrobu odstraňována centrifugací a následně je vysušena. Vlákna je opakovaně promývána tak, aby byl odstraněn všechen škrob.

Obr. 3. Schéma suchého a mokrého zpracování obilovin pro výrobu etanolu



Zdroj: Nichols et al., 2006,

#### 4.7.2.1. Zpracování škrobu

Takto získaný škrob je ještě několikrát promýván, aby byly odstraněny všechny bílkoviny. Následně je škrob převáděn na zkvasitelné cukry. Další postup je podobný mletí za sucha. Do získaného škrobu, který je v roztoku je přidána alfa-amyláza a směs je zahřata na 90°C. Tato metoda se liší tím, že všechna alfa-amyláza je přidána už před zahříváním. Po dekompozici škrobu na dextriny je přidána glukoamyláza a pulanasa (Nichols et al.2006), . Pulanáza je přidávána pro dobré oddělování isomaltosy, která se nachází na místech větvení škrobových molekul. Po zcukření jsou monosacharidy využity pro vlastní tvorbu ethanolu. Produkce ethanolu je přibližně 0,260 l.l<sup>-1</sup>.

#### 4.7.2.2. Vedlejší produkty

Procesem mletí za mokra je získávána řada vedlejších produktů. Extrahovaný olej může být využit například do kuchyňských olejů. Vznikající oxid uhličitý může být jímán, stlačován a následně prodáván k dalšímu využití. Získanou bílkovinu je možné využít jako komponent krmných směsí pro hospodářská zvířata. Lze získávat i některé další produkty jako enzymy nebo barviva. Další produkty lze získat

převedením části získaného škrobu na jiné zpracování. Zejména se jedná o výrobu biologicky odbouratelných polymerů. Proces mletí za mokra je tak pružnější a dokáže lépe reagovat na požadavky trhu.

#### **4.7.3. Solid state fermentation**

Tato metoda představuje další možnost výroby alkoholu. Bylo již provedeno mnoho pokusů, které odhalily vhodné druhy mikroorganismů i reakčních podmínek. Tento způsob zpracování, který se v současné době používá především pro získávání mikrobiálních produktů, zejména enzymů, ale lze ho použít i pro výrobu etanolu, Pandey (2003) definuje jako fermentaci bez (nebo téměř bez) volné vody. Substrát ale musí obsahovat dostatek vody pro růst mikroorganismů. Jako hlavní výhody procesu autoři uvádějí menší energetickou náročnost, méně vyprodukované odpadní vody, takže nedochází k vysokému zatížení životního prostředí. Další podstatnou výhodou je, že díky nízké aktivitě vody není substrát infikován nežádoucími mikroorganismy, které se vyskytují v běžných technologiích. Aktivita vody je tedy jedním ze základních kritérií výběru vhodného mikroorganismu. Pokud jsou zajištěny vhodné podmínky, tak jsou získávány i vysoké výtěžky produktů (Pandey, Soccol a Mitchell, 2000). Sree et al. (1999) uvádějí rozdíly ve výtěžku etanolu při použití termotolerantních kmenů *S. cerevisiae* v procesu Solid State Fermentation a klasickém procesu získávání etanolu. Při procesu Solid State Fermentation uvádějí výtěžek 6 g ze 100g substrátu při 37 °C a 96 hod. inkubace. Při klasickém způsobu uvádějí výtěžek pouze 3,5 g.100g<sup>-1</sup>. Při zvýšení teploty na 42 °C pak dochází k poklesu výtěžku na 3,2 g, respektive 1,5 g u klasického procesu.

#### **4.8. Vlivy na hydrolýzu**

Zlepšování strukturální stability enzymů má velký význam pro jejich použití v různých odvětvích průmyslu (Yadav a Prakash, 2009).

První metodou hydrolýzy škrobu byla kyselá hydrolýza, která byla v průmyslovém měřítku použita již 19. století a preferována byla až do 70. let 20. století. Její rozšíření bylo způsobeno především jednoduchostí a univerzálností. V roce 1940 přichází Fetzer et al. (US2210659) s vylepšením metody tak, aby bylo dosahováno takového výtěžku dextrózy, který by se blížil teoretickému výtěžku. Další vylepšení kyselé hydrolýzy zavádí Stephenson (US3607395). Ten přidává škrob do okyseleného a zahřátého média. Pro okyselení využívá 1 – 5 % hm. kyseliny chlorovodíkové (HCl) z hmotnosti hydrolyzovaného škrobu. Uvádí, že

dochází k omezení spotřeby o 8 – 12 % oproti klasické kyselé hydrolyze. Pro kyselou hydrolyzu jsou využívány ředěné roztoky kyselin. Proces probíhá při teplotě 102 – 150 °C. Tyto podmínky vedou ke korozi zařízení, vzniku nežádoucích produktů, omezení výtěžku a v neposlední řadě jsou vysoce ekonomicky náročné (Robertson et al., 2006). Metody chemické hydrolyzy jsou v současnosti nahrazovány metodami enzymatickými. Jsou hledány takové podmínky, aby proces byl energeticky nenáročný, ale současně efektivní.

#### 4.8.1. Teplota

Jedním z hlavních vlivů, které ovlivňují průběh hydrolyzy je teplota. Optimální teplota se mění s použitým enzymem, viz. obr. 4 (Nigam a Singh, 1995).

Obr. 4: Optimální teploty  $\alpha$ -amyláz a glukoamyláz

Microbial sources	Molecular weight	Optimum temp. (°C)
$\alpha$ -Amylases ( <i>endoenzymes</i> hydrolyzing $\alpha$ -1,4 linkages)		
<i>Bacillus subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i>	41,000	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	49,000	70
<i>Bacillus licheniformis</i>	62,000	90
$\beta$ -amylases (hydrolyzing 1,4-glucosidic bonds)		
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>mycoides</i>	35,000	50
<i>Bacillus circulans</i>	53–63,000	60
<i>Bacillus megaterium</i> NCIB 9323	35,000	50
<i>Bacillus megaterium</i> NCIB 9376	32,000	50
<i>Bacillus polymyxa</i>	59,000	37
<i>Bacillus polymyxa</i>	44,000	45
<i>Bacillus</i> sp. IMD 198	58,000	55
<i>Bacillus</i> sp. BQ 10	160,000	45–55
<i>Pseudomonas</i> sp. BQ 6	37,000	45–55
Microbial sources	Molecular weight	Optimum temp. (°C)
<i>Aspergillus awamori</i>	83,700–88,000	60
<i>Aspergillus niger</i> I	99,000	
<i>Aspergillus niger</i> II	112,000	
<i>Aspergillus oryzae</i> I	76,000	60
<i>Aspergillus oryzae</i> II	38,000	50
<i>Aspergillus oryzae</i> III	38,000	40
<i>Aspergillus saitoi</i>	90,000	
<i>Cephalosporium eichhormoniae</i>	26,850	45–62
<i>Lipomyces kononenkoae</i>	811,500	50
<i>Mucor rouxianus</i> I	59,000	55
<i>Mucor rouxianus</i> II	49,000	55
<i>Penicillium oxalicum</i> I	84,000	55–60
<i>Penicillium oxalicum</i> II	86,000	60
<i>Rhizopus delemar</i>	100,000	40

Zdroj: Nigam a Singh, 1995

Při použití  $\alpha$ -amylázy z *Aspergillus awamori* a proteázy z *Aspergillus oryzae* jsou optimální teploty 60 °C a 55 °C (Wang et al., 2007). Naproti tomu pro  $\alpha$ -amylázu II (A6380) získávané z *Bacillus sp.* je optimální teplota  $50 \pm 2$  °C. Při zvyšování teploty nad 55 °C již dochází k ireverzibilní teplotní inaktivaci enzymu. Přídavek kosolventu do roztoku enzymu prokazatelně snižuje inaktivaci. Stabilizační efekt je výrazně závislý na použité koncentraci kosolventu, kdy vyšší koncentrace mají vyšší stabilizační efekt. Jako kosolventy lze využít trehalózu, glycerol, sacharózu, sorbitol. Přičemž jejich stabilizační efekt klesá v tomto pořadí trehalóza > glycerol > sacharóza > sorbitol. Bod tepelné denaturace pro  $\alpha$ -amylázu byla stanovena na  $61 \pm 1$  °C. Po přidání 40 % trehalózy tato teplota stoupla až na  $81 \pm 1$  °C (Yadav a Prakash, 2009).

Byl prokázán vliv objemu zahřívání směsi na dobu potřebnou pro její ohřátí na potřebnou teplotu. Při dlouhém zahřívání dochází k výraznému snížení aktivity glukoamylázy. Následně při nízké aktivitě glukoamylázy dochází ke zvyšování viskozity. Zejména u směsí s vyšším obsahem surového materiálu, tj. asi  $300 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  (Wang et al., 2007). Způsoby jak tomuto zabránit jsou dva. Jedním je přidat do směsi takové množství glukoamylázy, které zaručí i po zahřívání dostatečnou aktivitu enzymu. Druhým způsobem je jak dosáhnout simultánní gelatinizace je zmenšení reakčního objemu. Simultánní hydrolýza škrobu snižuje potřebnou dobu pro téměř plnou hydrolýzu asi na 24 hodin. Wang et al. (2007) uvádí, že při použití enzymu z *Aspergillus awamori* byl škrob hydrolyzován z 99, 2 %, ale bylo uvolněno jen 11,2 % z dusíku vázaného v mouce. Také Walon (US4235965) popisuje postup, jak tomuto jevu předejít a zároveň vytvořit vysoce koncentrovanou suspenzi při podmínkách pro využití termostabilních enzymů. Počátečním materiálem je zápara (DE = 1 – 25 a až 40 % hm. suspendovaných látek). K této zápaře je poté přidáván škrob při podmínkách, které nevedou k jeho gelatinizaci. Současně je možné přidávat  $\alpha$ -amylázy. V této fázi je teplota volena podle optima příslušného enzymu. Zejména je doporučována amyláza *Bacillus licheniformis*. Poté co dojde k likvifikaci je možné zvýšit teplotu až na 90 – 105 °C, aniž by docházelo ke gelatinizaci a zvyšování viskozity. Tímto postupem je možné získat suspenzi s obsahem částic větším než 70 % hm.

Bobtnavost škrobových zrn dává předpoklad dobrému průběhu hydrolýzy. Bobtnavost je ovlivněna řadou faktorů: složení obilného zrna, přítomností komplexů

lipid-amyulóza, ale také třeba průběhem teplot během pěstování, kdy vyšší teploty podporují vznik krystalických struktur uvnitř škrobových zrn. Ty pak následně způsobují zvýšení teploty gelatinizace (Tester a Karkalas, 1996).

#### 4.8.2. Enzymy degradující škrob

Průmyslové zpracování škrobu na jednodušší cukry (zejména glukózu) je klíčová operace výroby etanolu, ale i jiných odvětví (Labeille et al., 1997). Metody enzymatické hydrolýzy se výrazně rozvíjí od poloviny 20. století. V roce 1940 patentovali Dale a Langlois (US2201609) využití houbových amyláz pro hydrolýzu škrobu. V roce 1946 patentovali Dale a Langlois použití komerčně dostupných enzymů.

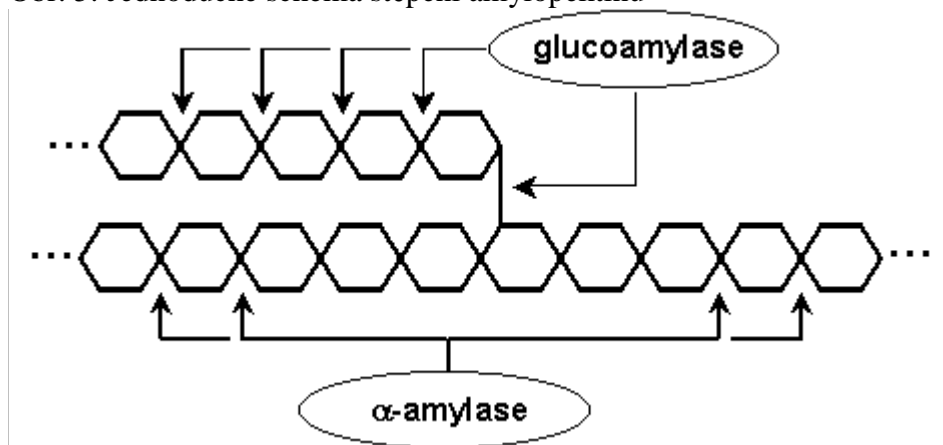
Hydrolýzy škrobu se účastní několik enzymů. Jsou to:  $\alpha$ -amylázy (E.C.3.2.1.1), glukoamylázy (E.C.3.2.1.3),  $\alpha$ -glukosidázy (E.C.3.2.1.20), isoamylázy (E.C.3.2.1.68) a  $\beta$ -amylázy (E.C.3.2.1.2).  $\alpha$ -amylázy štěpí vazby 1-4 uvnitř glukózových řetězců (obr. 5). Jejich působením vznikají dextriny. Isoamylázy štěpí vazby 1-6 a rozrušují tak větvení amylopektinu.  $\beta$ -amylázy pak štěpí vazby 1-4 postupně od neredukujícího konce glukózového polymeru a produkují maltózu. Glukoamylázy působí především na vazby 1-4 a produkují  $\beta$ -glukózu. Glukosidázy působí výhradně na vazby 1-4 a produkují  $\alpha$ -glukózu (Robertson et al., 2006). Jako zdroj glukoamyláz uvádí Nigam a Singh (1995) *Aspergillus niger* a rod *Rhizopus*. Jako zdroj pulanáz (E.C.3.2.1.41) potom zejména *Klebsiella pneumoniae* a *Bacillus acidopullulyticus*.

##### 4.8.2.1. $\alpha$ - amyláza

$\alpha$ - amylázy jsou jedny z nejdůležitějších enzymů používaných v různých odvětvích průmyslu. Vhodným zdrojem  $\alpha$ -amyláz jsou některé druhy rodu *Bacillus*. Zejména jsou to druhy *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines* a *Bacillus licheniformis* (Sarıkaya et al., 2000). Dettori-Campus et al. (1992) uvádí, že při použití  $\alpha$ -amylázy *B. stearothermophilus* NCA 26 a teploty 60 °C je nejlépe hydrolyzován škrob ječmene. Nigam a Singh (1995) uvádí jako zdroj  $\alpha$ -amylázy rovněž *Aspergillus oryzae*.

Sarıkaya et al., (2000) upozorňuje, že  $\beta$ -amylázy působí na surový škrob méně než  $\alpha$ -amylázy. Zároveň však uvádí, že bakteriální  $\beta$ -amylázy jsou efektivnější než  $\beta$ -amylázy rostlinného původu.

Obr. 5: Jednoduché schéma štěpení amylopektinu



Zdroj: Wageningen UR, 2011

Enzymatická hydrolýza se skládá ze 3 kroků: gelatinizace, likvifikace a sacharifikace. V průmyslovém měřítku se pro gelatinizaci využívá ohřev tryskou (jet-cooker), kterou se škrobová kaše mísí s párou při teplotě 100 – 175 °C (Van der Maarel et al., 2002). Crabb a Mitchinson (1997) uvádějí v procesu likvifikace nahrazení AA *Bacillus amyloliquefaciens* termostabilnějšími  $\alpha$ -amylázami *Bacillus stearothermophilus* nebo *B. licheniformis*. Uvádí se, že při použití dvou různých skupin  $\alpha$ -amyláz v procesu likvifikace dojde ke zvýšení produkce etanolu (Forrester et al., US 2011/0033907 A1). Tento proces probíhá při sušině škrobové kaše asi 30 – 35 %. Zvýšení koncentrace během enzymatické hydrolýzy může poskytnout vyšší produktivitu a vyšší enzymovou stabilitu (DeCordt et al., 1994). Zvýšení koncentrace škrobu však vyžaduje zvýšení teploty potřebné pro úplnou gelatinizaci. Navíc při zvýšení koncentrace dojde ke zvýšení viskozity do té míry, že je vyloučeno použití klasického „jet-cookeru“. Eliminaci tohoto problému někteří řeší využitím extrudéru (Blanche a Sun, 2004). Doba setrvání směsi v extrudéru je však omezená a tak není možné dosáhnout vysokého dextrózového ekvivalentu. Pokud je vyžadován větší DE, lze za extrudér zařadit „komorový reaktor“. Další možností je využití likvifikačních preparátů. Pro úplnou gelatinizaci 50, 60 a 70 % směsi škrobu a vody jsou potřebné tyto teploty: 85, 105, 130 (Baks et al., 2008). Stupeň gelatinizace rovněž stoupá s otáčkami extrudéru. Pokud jsou tyto extrudované směsi využity pro následnou hydrolýzu, vykazují různé výsledky. Při nízkém poměru enzymu vůči substrátu dochází při zvyšování koncentrace substrátu ke snižování produkce. Při vysokém poměru enzymu vůči substrátu vykazuje největší produkci 60% směs (1,4 mmol/g po 24 hodinách). Hodnota DE po enzymatické hydrolýze není závislá na

stupni gelatinizace. Dextrózový ekvivalent vykazuje přímou závislost na poměru enzymu vůči substrátu. Dále je také závislý na době hydrolýzy. DE získaný po 3 hodinách hydrolýzy je nižší než po 24 hodinách (Baks et al., 2008). Hodnota  $K_m$  pro  $\alpha$ -amylázu z *Bacillus licheniformis* je 1,2 g/l a je nezávislá na teplotě (Dobrevá, Ivanova a Emanuilova, 1994). Yankov et al. (1986) upozorňuje na to, že koncentrace škrobu nad 300 g/l způsobují zpomalování hydrolýzy prostřednictvím  $\alpha$ -amylázy z *Bacillus licheniformis*. Rovněž tak přidavek glukózy vyvolává zpomalení hydrolýzy. Baks et al. (2008) zjistil průměrnou zbytkovou aktivitu  $\alpha$ -amylázy po 1 a 24 hodinách 84 % a 67 %. Při použití 20 % škrobové směsi byla tato aktivita po 1 a 24 hodinách 63 % a 2 %. Z tohoto důvodu se použití koncentrovanější škrobové směsi jeví výhodnější.

Pro  $\alpha$ -amylázu získanou z *Bacillus licheniformis* uvádí Richardson et al. (2002) optimální podmínky 90 °C při pH 6. To vyžaduje přidavek  $Ca^{2+}$  pro zajištění dostatečné termostability. Tyto podmínky se však liší od podmínek ve většině průmyslových závodů, kde je enzym využíván. Při hydrolýze škrobu se většinou používá  $\alpha$ -amyláza společně s glukosidázou. Neoptimálnější reakce prostředí pro působení glukosidáz nabývá přibližně hodnoty pH = 5. Problémem je, že většina  $\alpha$ -amyláz vyžaduje vyšší pH.  $\alpha$ -amyláza získaná z druhu *Bacillus sp.* PS-7 vykazuje optimum při pH = 6,5 a vykazuje vysokou aktivitu při pH 6 a 5, což je rovněž oblast vysoké aktivity glukosidáz. Reziduální aktivita této  $\alpha$ -amylázy je při pH 5 – 5,5 96 – 98 % po 90 minutách inkubace (Sodhi et al., 2005). Cates et al. (US7727726B2) uvádí variantu likvifikace bez potřeby úpravy pH a za relativně nízkých teplot.

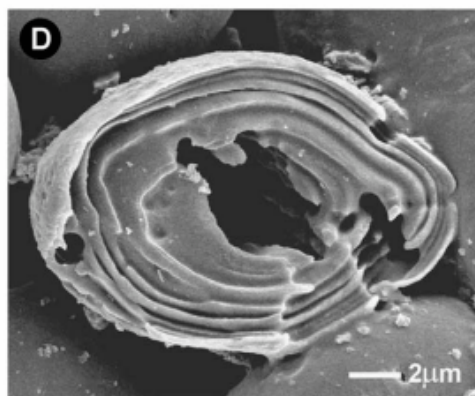
Pokud je jako surovina použita netříděná pšeničná mouka, jsou před započítáním sacharifikace nutné minimálně 2 hodiny likvifikace. To sice vede ke zvýšení dextrózového ekvivalentu, ale při zkrácení procesu likvifikace je viskozita mladiny tak vysoká, že nedovoluje efektivní hydrolýzu glukózových polymerů. Pro úplnou hydrolýzu surového pšeničného škrobu jsou uváděny hodnoty 16 hodin likvifikace a sacharifikace oproti 6 hodinám pro čištěný škrob (Montesinos a Navarro, 2000).

Elektronová mikroskopie (Planchot, Colonna a Buleon, 1997) odhalili, že působení alfa-amylázy probíhá v několika krocích. Enzym nejprve v povrchu škrobových zrn vytvoří důlky. Pak proniká přes důlky do vnitřních kanálek zrn a teprve potom rozkládá škrobová zrna zevnitř (viz obr.: 6).



Rovněž další výzkumy různých druhů  $\alpha$ -amyláz prokázaly vysoký stupeň hydrolýzy pšeničného škrobu při 60 °C:  $\alpha$ -amyláza z *Bacillus sp.* 96,2 %, *Bacillus licheniformis* 99,02 %, *Aspergillus oryzae* 91,14 % po 90 min procesu.  $\alpha$ -amyláza z *Bacillus licheniformis* rovněž vykazuje při teplotách do 60 °C nejvyšší zbytkovou aktivitu. Stupeň hydrolýzy i zbytková aktivita se lišily v závislosti nejen na použitém enzymu, ale i na druhu škrobu. Z toho vyplývá, že je třeba optimalizovat podmínky pro specifické kombinace škrobu a enzymu (Crabb, Mitchinson, 1997).

Obr. 6: Hydrolýza škrobových zrn typu A



Zdroj: Li et al., 2004

#### 4.8.2.2. Glukoamyláza

Glukoamylázy používané v lihovarnickém průmyslu se obvykle získávají z *Aspergillus niger* nebo druhů rodu *Rhizopus*. Avšak je preferována glukoamyláza *Aspergillus niger*, jelikož vykazuje větší odolnost vysokým teplotám (60 °C proti 55 °C). Jejich nevýhodou je, že samovolně vykazují určitou transglukosidázovou aktivitu. To vede k produkci nezkvasitelných oligosacharidů, jako je isomaltóza. To má za následek nižší výtěžek glukózy. Výhodou preparátů získaných z *Aspergillus niger* jsou jejich proteolytické a celulolytické účinky, při kterých vznikají kvasinkami využitelné živiny a zároveň dochází i k poklesu viskozity (Labeille et al., 1997)

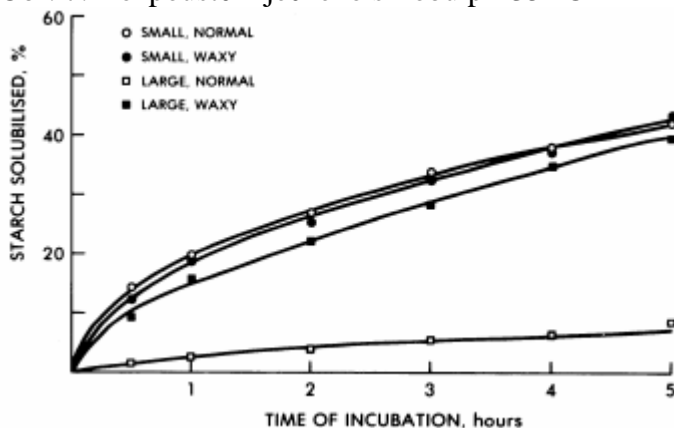
Byly pozorovány synergické účinky mezi  $\alpha$ -amylázou ječmene a glukoamylázou *Lentinula edodes*. V kombinaci zvyšují míru hydrolýzy asi 3x oproti sumě individuálního působení. Změny poměru enzymů za předpokladu, že celkové množství zůstává stejné, nemají výrazný vliv intenzitu hydrolýzy. Avšak pokud je množství jednoho enzymu zachováno a zvýší se množství druhého mění se intenzita hydrolýzy. V případě zachování množství  $\alpha$ -amylázy a zvýšení množství glukoamylázy nebylo zvýšení intenzity hydrolýzy významné. Avšak při zachování

glukoamylázy a zvýšení  $\alpha$ -amylázy byl nárůst značný. Lze to přičíst tomu, že působením  $\alpha$ -amylázy vzniká vyšší počet neredukujících konců glukózových řetězců, ne kterých působí glukoamyláza (Wong et al., 2007).

#### 4.8.2.3. Enzymy ječného sladu

MacGregor a Ballance, (1980) rozlišují v ječném sladu 2 typy  $\alpha$ -amyláz.  $\alpha$ -amyláza I vykazuje vysokou afinitu vůči škrobovým zrnům typu A waxy škrobů, po 5 hod při 35 °C bylo hydrolyzováno 72,5 % těchto zrn. U zrn typu B waxy škrobů to bylo jen 38 %. U normálních škrobů proběhla hydrolyza z 40 – 45 % zrn obou typů. U zrn typu B probíhala hydrolyza zpočátku silně progresivně, kdy po asi 2 hodinách se rychlost hydrolyzy výrazně snížila, zatímco u zrn typu A probíhala hydrolyza téměř lineárně (viz. obr. 7).  $\alpha$ -amyláza II vykazuje při stejných podmínkách podobné výsledky. Velká i malá zrna waxy škrobu a malá zrna normálního škrobu byla hydrolyzována z 42 – 45 %. Velká zrna normálního škrobu, která tvoří hlavní složku ječného škrobu, byla po 5 hod hydrolyzována pouze asi z 8 %, i když  $\alpha$ -amyláza II tvoří hlavní složku amyláz sladu (viz. obr. 7).

Obr. 7: Rozpouštění ječného škrobu při 35 °C



Zdroj: MacGregor a Ballance, 1980

V prvních asi 5 – 10 minutách byla intenzita hydrolyzy velmi vysoká, poté intenzita poklesla. To je přičítáno rychlejší hydrolyze poškozených škrobových zrn, která mají větší specifický povrch. Rovněž u těchto enzymů byla pozorována hydrolyza škrobových zrn typu A zevnitř ven a u škrobových zrn typu B povrchová hydrolyza.

Ječná  $\alpha$ -amyláza se jeví jako velmi vhodná pro hydrolyzu pšeničného škrobu (Lim, Macdonald a Hill, 2003). Výrazným problémem při jejím využití je její značná deaktivace. Ta dosahuje při 45 °C až 1 % během 1 hodiny (Hill, Macdonald

a Lang, 1997). Stabilizace enzymu výrazně omezí spotřebu enzymu, což se výrazně projeví ve výsledné ceně etanolu. Jednou z nejúčinnějších možností, jak dosáhnout stability je použití imobilizovaného enzymu. Imobilizovaná ječná  $\alpha$ -amyláza je schopná hydrolyzovat pšeničná škrobová zrna při teplotě nižší, než je teplota gelatinizace. Ideální podmínky pro takovýto enzym je teplota 40 °C, pH 4,5; obsah iontu vápníku 0,002 M a to při dávce enzymu 30 mg.ml<sup>-1</sup>. Imobilizovaná amyláza je schopná hydrolyzovat škrobová zrna až do 100 mg škrobových zrn na ml s finální konverzí 90 % během 24 h. Během prvních 8 h dojde k hydrolyze více než 60 % škrobu. I u imobilizovaného enzymu však dochází k inhibici produkty, tedy maltózou a glukózou. Výsledný hydrolyzát při použití imobilizované ječné amylázy vykazuje obsah maltózy asi 60 % a 40 % vyšších cukrů. Obsah glukózy je ale velmi nízký (Lim, Macdonald a Lang, 1997). Velmi nízký obsah glukózy v hydrolyzátu zmiňuje i Žáčková a Kvasnička (1994) při hydrolyze pšeničného škrobu pomocí pšeničného sladu.

#### **4.8.2.4. Enzymatická aktivita semen obilovin**

V suchých semenech obilovin (pšenice, ječmenu, rýže) nebyla registrována aktivita  $\alpha$ -amylázy. Ta ovšem velmi prudce vzrůstá se začátkem procesu klíčení. V anoxickém prostředí je schopna indukovat  $\alpha$ -amylázu pouze rýže. Aktivita  $\beta$ -amylázy v suchých semenech rýže je prakticky nulová. Naproti tomu u pšenice a ječmene je tato aktivita v suchých semenech vysoká. V ječmeni je  $\beta$ -amyláza přítomná jak ve volné formě, tak vázaná na škrobová zrna. U pšenice a ječmene je aktivita  $\beta$ -amylázy vysoká v anoxickém prostředí. S aerací její aktivita klesá. Nicméně samotná  $\beta$ -amyláza není schopná degradace škrobu (Guglielminetti et al., 1995).

#### **4.9. Hydrolyza a ultrastruktura ječného škrobu**

(Li et al., 2004) ve své práci dokládají vliv zdroje alfa-amylázy a použití různých odrůd ječmene na efektivnost enzymatické hydrolyzy škrobových zrn a následně výtěžek alkoholu.

Vnímavost různých druhů škrobu byla zaznamenána již dříve (Colonna, Leloup a Buléon, 1992).

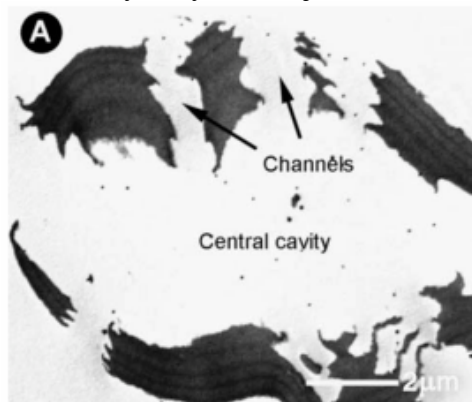
Škrob bezpluchého ječmene je v mnoha vlastnostech podobný škrobu kukuřice (Li et al., 2001). Gérard et al. (2001) upozorňuje na to, že nejvyšší míra hydrolyzy je ovlivněna obsahem krystalitů typu B. Li et al. (2004) ve své práci

dokládají, že hydrolýza škrobových zrn probíhá dvoufázově. Dále upozorňují na rychlý průběh hydrolýzy v počáteční fázi a následný progresivní pokles. Rychlost hydrolýzy je v úvodní fázi silně závislá na druhu škrobu a druhu použitého enzymu. Waxy škrob byl narušen během pokusu nejvíce a to bez ohledu na použitý enzym. Při použití  $\alpha$ -amylázy z prasečí slinivky byly zrna waxy škrobu rozrušena po 72 hodinách z 97 %. U škrobu s vysokým obsahem amylózy to bylo jen 91 %. Při použití amylózy AAG (*Aspergillus Niger*) bylo pozorováno mnohem menší rozrušení povrchu škrobových zrn. U waxy škrobu 67 %, 33 % u vysokoobsahového škrobu a 30 % u normálního škrobu. Za kritické kinetické parametry hydrolýzy škrobu je považována dostupná plocha povrchu škrobových zrn a účinnost vázání se enzymu k povrchu zrn. Huber a BeMiller (2000) tvrdí, že otvory a vnitřní kanálky se v zrnech vyskytují přirozeně a tvoří tak vhodná místa pro navázání enzymu. A vysvětlují tak rychlejší průběh hydrolýzy waxy škrobových zrn bezpluchého ječmene. Intenzivnější hydrolýzu u bezpluchého ječmene zmiňuje i Gibreel et al. (2009). Škrobová zrna u ječmene s normálním a vysokým obsahem amylózy vykazují podobnou velikost mezi 6,7 – 6,8  $\mu\text{m}$  v průměru. Nicméně škrobová zrna s vysokým obsahem amylózy vykazují vyšší stupeň hydrolýzy v počáteční fázi než zrna s normálním obsahem. Li at al. (2001) to vysvětlují tím, že vzhledem k většímu množství (až 38 % hmotnostních) zrn s průměrem do 10  $\mu\text{m}$  u ječmene s vysokým obsahem amylózy. To má za následek zvětšení reakční plochy.

.Elektronovou mikroskopií bylo prokázáno, že při použití  $\alpha$ -amylázy z vepřové slinivky dochází k narušení povrchu škrobových zrn už po 1 hodině. Na povrchu zrn byl ujištěn výskyt kruhových až elipsovitých otvorů (0,3 – 3  $\mu\text{m}$  v průměru), které pronikaly do zrn skrz několik růstových vrstev zrna. Rozrušení bylo nižší u škrobových zrn s normálním a vysokým obsahem amylózy. U některých škrobových zrn dochází k „tříštivému“ otevření škrobového zrna, čímž se odhalí jejich vnitřní struktura (viz. obr. 8). To Li at al., (2004) vysvětlují tím, že dochází k strukturálnímu zeslabení v oblasti ekvatoriální roviny v procesu hydrolýzy, nebo poškozením škrobového zrna v procesu izolování škrobu. Toto roztržení bylo častěji pozorováno u waxy zrn než u zrn s normálním či vysokým obsahem amylózy. Podobná struktura rozrušení škrobových zrn byla pozorována i u pšenice (Evers a McDermott, 1970) a některých jiných druhů. Li at al. (2004) prokázali po 3 hodinách hydrolýzy prostřednictvím PPA, že v další fázi hydrolýzy dochází k rozrušování zrn v místech původního narušení z předchozí fáze a ne k tvorbě nových reakčních míst.

Dále po třech hodinách pozorovali, že u mnohých zrn waxy škrobů došlo k jejich fragmentaci, zatímco u škrobová zrna s normálním a vysokým obsahem amylozy si udržovaly svůj tvar. U těchto nefragmentovaných zrn prokázali výskyt jakési skořápky o různé tloušťce. Po 6 hodinách Li et al. (2004) prokázali silnou fragmentaci a deformaci škrobových zrn waxy škrobů a také u škrobů s normálním obsahem amylozy. U škrobů s vysokým obsahem amylozy byl mezi 6 a 21 hodinou hydrolýzy pozorován silný výskyt zrn, která měla slabou skořápku a hluboké otvory zasahující hluboko do zrna, takže vytvářeli jakousi houbovitou strukturu. Naproti tomu u waxy škrobů byl po 21 hodinách podíl houbovitých zbytků malý. Při větším zvětšení se jeví jako seskupené sférické struktury s průměrem 100 nm a vrstevnatou strukturou (Li et al., 2004). Tenká skořápkovitá struktura u škrobů s normálním a vysokým obsahem amylozy vykazovala vysokou odolnost působení  $\alpha$ -amylázy. Li et al. (2004) to vysvětlují silnými vazbami mezi molekulami amylopektinu. Použití BAA vykazovalo podobné působení jako PPA, ale použití AAG vykazovalo jisté odlišnosti. Při použití AAG byly po 21 hodinách pozorovány široké, mělké a kruhové prohlubeniny s vrstevnatou strukturou na povrchu všech typů škrobů. Při použití různých druhů enzymů a škrobů se také liší vznikající produkty a čas jejich vzniku. Při použití PPA nebo BAA vzniká na počátku hydrolýzy glukóza, maltóza a maltotrióza. Zatímco při použití AAG vzniká pouze glukóza. Při použití AAG byla produkce glukózy z waxy škrobu vždy nejméně 2,8 vyšší než ze škrobu s normálním obsahem amylozy a 3,3 krát vyšší oproti škrobu s vysokým obsahem amylozy. Po jedné hodině hydrolýzy prostřednictvím PPA uvádí Li et al., 2004 obsah maltózy 0,23 – 0,31 mg/mg škrobu, zatímco obsah glukózy 0,01 – 0,03 mg/mg. Po 72 hodinách byl obsah maltózy 0,52 – 0,54 mg/mg a obsah glukózy 0,12 – 0,23 mg/mg (Li et al., 2004).

Obr. 8: Hydrolyzované ječné škrobové zrno



Zdroj: Li et al., 2004

Škrobová zrna typu A jsou mnohem více citlivá k hydrolýze prostřednictvím alfa-amylázy než zrna typu B. „Waxy“ škroby jsou působením alfa-amylázy rozkládány rychleji než „non-waxy“ (MacGregor a Ballance, 1980). Účinnost hydrolýzy pro určitý druh škrobu je dána typem enzymu (Planchot et al., 1997), podmínkami hydrolýzy (zejména teplotou, pH, koncentrací a tlakem), fyzikální a chemickou úpravou škrobu před vlastní hydrolýzou. Různá citlivost obilních škrobů k účinkům amyloglukosidázy může být z části vysvětlena ultrastrukturou jejich škrobových zrn. Na ultrastrukturní úrovni hrají roli zejména vztahy uvnitř řetězce škrobu (Vasanthan a Bhatta, 1996), stupeň krystalizace, vnitřním uspořádáním jednotlivých růstových kruhů (Li et al., 2003) a v neposlední řadě amylo-lipidické vazby. Bylo prokázáno, že v úvodní fázi hydrolýzy škrobových zrn ječmene je nejprve rozrušena vnitřní amorfní a polokrystalická oblast. Amylo-lipidový komplex je hydrolyzován asi až od poloviny reakce. Dalším vlivem, který silně ovlivňuje rychlost hydrolýzy je složení a koncentrace produktů hydrolýzy. Vznikající oligosacharidy mohou vyvolat postupné snižování aktivity alfa-amylázy (Colonna, Leloup a Buleon, 1992). Colonna, Leloup a Buleon, (1992) dále poukazují na to, že hydrolýza na maltotriózu či maltózu vyvolává větší zpomalení než hydrolýza na maltotetraosu. Dále však poukazují na to, že když se spolu s alfa-amylázou použije amyloglukosidáza, tak dochází ke štěpení maltózy a maltotriózy jakožto produktů  $\alpha$ -amylázy na glukózu.

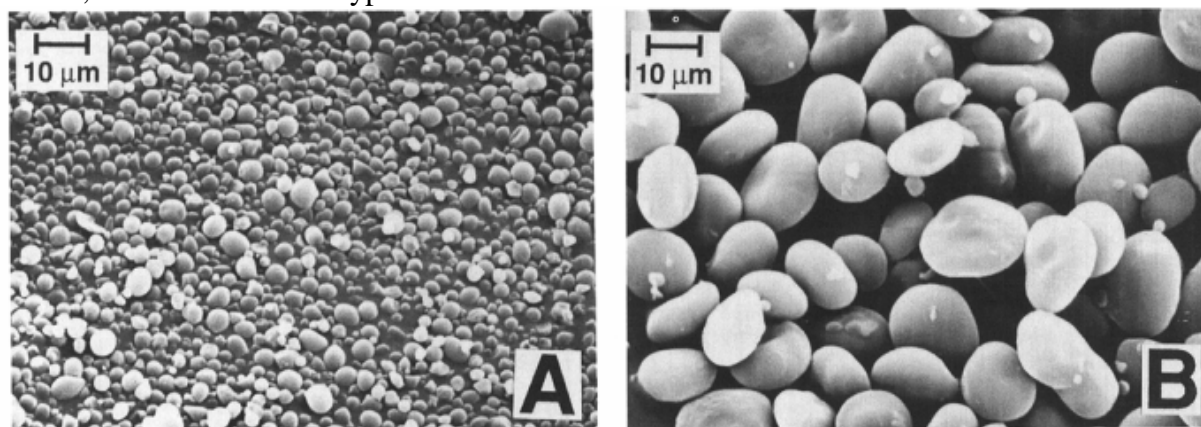
#### 4.9.1. Škrobová zrna

Li et al. (2004) ve své práci prokázali, že škrobová zrna bezpluchého ječmene s vysokým obsahem amylozy jsou menší než zrna s běžným nebo žádným obsahem

amylózy. Poukazují i na to, že se liší stupeň narušení povrchu škrobových zrn. Největší důlky byly pozorovány u waxy ječmenů, zatímco u ječmenů s vysokým obsahem amylózy bylo toto rozrušení povrchu pozorováno jen zřídka. Vasanthan a Bhatta, (1996) uvádějí rozdílné působení  $\alpha$ -amylázy na škrobová zrna různých odrůd. U některých odrůd uvádějí především vnější povrchové narušení, zatímco u jiných odrůd vnitřní hydrolyzu. Přičemž zmiňují i rozdíl mezi škrobovými zrny typu A a B. Podobné výsledky uvádí i MacGregor a Ballance, (1980). U malých škrobových zrn normálního nebo waxy škrobu nezaznamenali výskyt hluboké hydrolyzy. Naproti tomu u velkých škrobových zrn uvádí hydrolyzu zevnitř škrobových zrn.

Ječný škrob obsahuje velká škrobová zrna typu A o velikosti 12 -26  $\mu\text{m}$  (viz. obr. 10). Ta tvoří asi jen 10 – 20 % počtu škrobových zrna, ale představují 85 – 95 % hmotnosti všech škrobových zrn. Další složkou jsou malá škrobová zrna typu B s průměrem 2 – 10  $\mu\text{m}$  (viz. obr. 9). Bobtnavost škrobových zrn se u ječmene liší v závislosti na odrůdě. Některé odrůdy vykazují větší bobtnavost menších škrobových zrn, u jiných je situace opačná. Rozdíly v bobtnavosti se zvětšují s rostoucí teplotou, zejména nad 80  $^{\circ}\text{C}$ . Větší bobtnavost malých škrobových zrn typu A je dána jejich větším specifickým povrchem na jednotku škrobu, čímž je umožněna rychlejší hydratace (Vasanthan a Bhatta, 1996).

Obr. 9, 10: Škrobová zrna typu B a A



Zdroj: Vasanthan a Bhatta, 1996

Colonna, Leloup a Buleon (1992) zmiňují, že příliš intenzivním zpracováním gelatinizovaného škrobu může dojít k dezintegraci granulární struktury.

## **4.10. Fermentace**

Ačkoli laboratorní pokusy vykazují značně rozdílné výsledky, tak v průmyslových podmínkách je dosahováno výtěžnosti přes 90 %. To znamená, že zvýšení efektivity je možné dosáhnout zrychlením fermentace nebo zvýšením koncentrace směsi (Casey a Ingledev, 1986).

Muller et al. (US4243750) uvádí, že pro dosažení vysokého fermentačního výtěžku je vhodné pro fermentaci využít alespoň dva různé kmeny kvasinek. Přičemž první druh (*Saccharomyces bayanus*) je vhodný pro počáteční fázi, ve které je v zápaře vysoký obsah zkvasitelných cukrů, ale jen nízký obsah etanolu. Pro druhou část fermentace pak *Saccharomyces cerevisiae*.

Bylo zjištěno, že nárůst výtěžku alkoholu o 1 % tj. 2,9 ml.l<sup>-1</sup>, přinese ročně pro etanolvý průmysl navíc 100 mil. dolarů (při ceně 0,06 \$.l<sup>-1</sup>.) Kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* YE1358 a YE1615 vykazují zvýšenou toleranci k vyšším teplotám fermentace a vyšším koncentracím glukózy a etanolu. Tyto kmeny jsou schopny využívat koncentraci glukózy až 60 %, aniž by byl limitován růst kultury. Průmyslově využívané kvasnice mají tuto hranici přibližně na úrovni 20 %. Zároveň byla u kmenů *Saccharomyces cerevisiae* YE1358 a YE1615 prokázána výrazná tolerance vůči vysokým koncentracím etanolu až 25 % oproti 10 – 15 %. Ačkoli kmen YE1615 při 30 °C nemá nejvyšší produkci, vykazuje nejnižší hladiny glycerolu a zbytkové glukózy. Navíc už při zvýšení teploty na 35 °C jeho produktivita výrazně stoupá a to při zachování nízké hladiny glycerolu a glukózy. (Forrester et al., US 2011/0033907 A1).

### **4.10.1. Vlivy na kvasný proces**

Kvasný proces, jakožto proces biologický, je podmíněn rozvojem kvasinkové kultury. Proto zajištění optimálních podmínek pro daný druh, ale i kmen kvasinek je základním předpokladem vysokého výtěžku etanolu. Za základní činitele, kteří mají na průběh fermentace největší vliv, se řadí teplota, reakce prostředí, koncentrace směsi, koncentrace vznikajících produktů, zdroje výživy.

#### **4.10.1.1. Koncentrace etanolu**

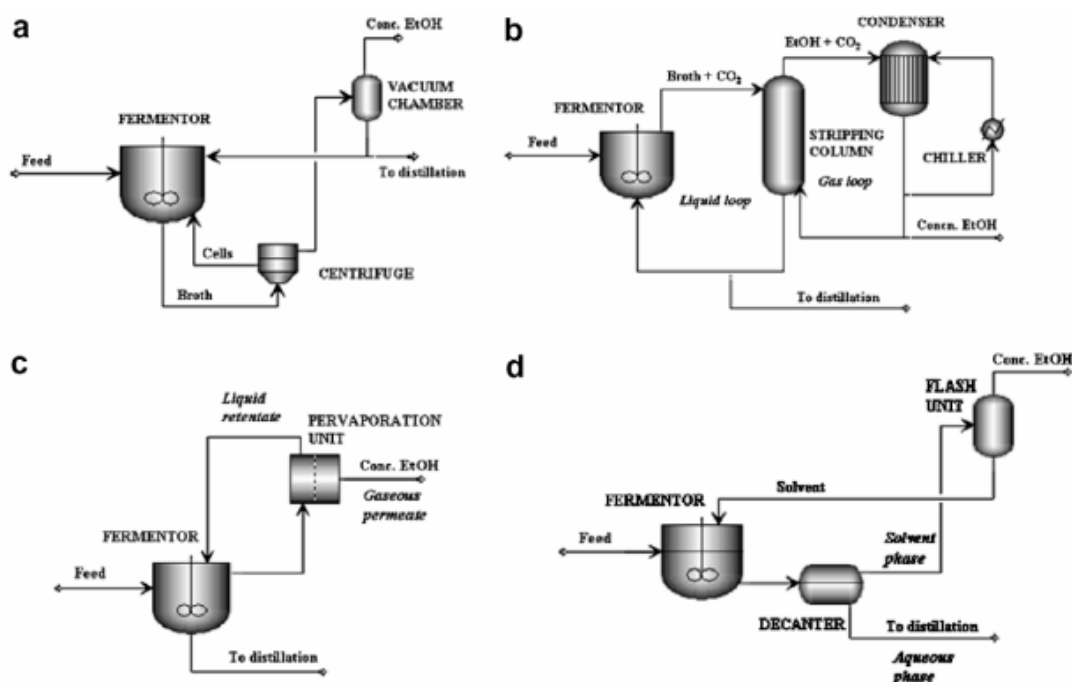
Etanol je dobře známý jako inhibitor růstu mikroorganismů. Ničí mitochondriální DNA kvasinek a inaktivuje některé enzymy, nicméně byly pozorovány kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, které se byly schopné vysokým koncentracím etanolu přizpůsobit (You, Rosenfield a Knipple, 2003). I když



*S. cerevisiae* má oproti jiným druhům kvasinek poměrně vysokou toleranci vůči etanolu, tak má svou limitní hranici. Tento fakt je významný zejména při výrobě diskontinuálním způsobem (Piper et al., 1994). Minimální koncentrace etanolu, která absolutně omezuje růst kvasinek je výrazně ovlivněná složením zápary a kmenem kvasinek (Rose, 1993). Inhibici růstu kvasinkové kultury způsobují v závislosti na podmínkách a konkrétním kmenu už koncentrace menší než 5 %. Dombek a Ingram (1987) uvádějí, že nejvyšší fermentativní aktivita u *S. cerevisiae* byla pozorována během prvních 12 hodin. Při nárůstu koncentrace etanolu na 6,5 % obj. (po 24 h) uvádějí pokles fermentativní aktivity na 50 % a při nárůstu na 10 % obj. už jen 40 %. Vysoce aktivní kvasinky po 12 h jsou více citlivé k přidanému alkoholu, než kvasinky získané po 24 h fermentace. Jako faktory zvyšující toleranci kvasinkové kultury k etanolu jsou uváděny ergosterol, nenasycené mastné kyseliny, palmityl koenzym A, inositol a některé další faktory (Nevoigt, 2008). Výrazný vliv mají právě mono-nenasycené mastné kyseliny, které jsou součástí buněčných membrán. Jedná se především o kyselinu palmitoolejovou a kyselinu olejovou. U kvasinek pěstovaných v prostředí s 5 % etanolu byl pozorován dvojnásobný obsah kyseliny olejové oproti kvasinkám z média bez alkoholu. U kyseliny palmitoolejové naopak došlo k poklesu (You, Rosenfield a Knipple, 2003). V procesu průmyslové výroby je proto vhodné etanol ze zkvašované suroviny průběžně odstraňovat a tím eliminovat jeho inhibiční efekt (Cardona a Sánchez, 2007). Už v roce 1933 Ricard a Guinot (US1912010) zavádějí inovují proces získávání čistého alkoholu prostřednictvím použití několika destilačních kolon. Jednou z možností je separovat etanol pomocí vakua (viz. obr. 11a ). K fermentoru musí být připojeno zařízení na odlučování par a do směsi musí být přidáván čistý kyslík. Tato poměrně velká složitost způsobuje, že se metoda neujala. Nicméně tato metoda může při vhodném uspořádání vykazovat lepší výtěžky než extraktivní fermentace (Da Silva et al., 1999). Další možností je vypuzování etanolu proudem vzduchu (plynu) (viz. obr. 11b). Taylor et al. (1998) uvádí, že pro tento proces je možné využít CO<sub>2</sub> vznikající během fermentace. Další možností je využití semipermeabilních membrán. Takto odebraný etanol je možné predestilovat a výpalky vrátit zpět do fermentoru. Takto lze dosáhnout výrazného snížení produkce odpadních vod (Cardona a Sánchez, 2007). Nomura, Bin a Nakao, (2002) pozorovali vyšší účinnost u zeolitových membrán. Vysvětlují to přítomností solí v roztoku, která zvyšuje selektivitu vůči etanolu. Tuto metodu lze využít i pro

přímé získávání etanolu. Mori a Inaba (1990) takto získali při použití *C. thermohydrosulfuricum* koncentrace 27 – 32 % obj. Gryta, (2001). Cardona a Sánchez, 2007 zmiňují, že když je spojen tubulární reaktor pracující v průběžném režimu s membránovým destilačním modulem, dochází ke zvýšení produkce etanolu až na  $5,5 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ .

Obr. 11: Schémata získávání etanolu



a- získávání etanolu pomocí vakuu; b – získávání pomocí plynu; c – fermentace spojená s odpařovací jednotkou; d – extraktivní fermentace  
Zdroj: Cardona a Sánchez, 2007

Klasickou a dosud hojně využívanou metodou získávání etanolu je destilace. Energetické náklady tohoto procesu tvoří výraznou složku spotřebované energie. Z tohoto důvodu byly vyvinuty různé alternativní metody (viz. výše), jejich využití je vhodné zejména pro proces SSF. V případě, že je využívána destilace a destilační souprava je pouze jednoduchá, tedy výparník a chladič, je ze systému odebíráno velké množství tepla a výroba se tak stává zejména po stránce energetické bilance silně neefektivní. Proto v r. 1980 zavedl Seader (US4234391) takové uspořádání destilačního zařízení, která zajišťuje zpětné využití části vložené energie. Systém vychází z oddělení rektifikační části a vlastního výparníku. V rektifikační části je využívána vyšší teplota než ve výparníku. Teplo, které vystupuje na konci rektifikační sekce je poté využíváno pro ohřev výparníku.

#### 4.10.1.2. Složení vstupující směsi a výživa

Jedním ze základních prvků výživy, který ovlivňuje účinnost kvasného procesu je dostupnost přístupných zdrojů dusíku. Touto problematikou se zabývá mnoho vědeckých prací, ve kterých jsou zpracovávána různá řešení. Základním principem, který musí však být respektován vždy, je, že omezení dusíkaté výživy bývá hlavním důvodem pro zpomalení, nebo dokonce úplné zastavení fermentace (Arifeen et al., 2009). Spotřeba FAN (Free Amino Nitrogen) se také mění v různých fázích života kultury. V průběhu růstu kultury má spotřeba FAN rostoucí tendenci, zatímco po dosažení vrcholu je spotřeba zanedbatelná a obsah FAN se už výrazně nemění až do doby, kdy kultura začne odumírat. V této fázi dochází k mírnému zvýšení obsahu FAN, což je důsledkem lýzy buněk (Arifeen et al., 2009). Novo et al. (2006) toto doplňuje tím, že největší spotřeba dusíku je během prvních 24 hodin fermentace a využití dusíku kvasinkami po dokončení exponenciální fáze růstu již není efektivní.

Dalším důležitým prvkem je koncentrace glukózy. Thatipamala, Rohani a Hill, (1992) zmiňují pokles produkce z 0,45 na 0,3 po zvýšení koncentrace glukózy ze 150 na 280 g.l<sup>-1</sup>. Arifeen et al. (2009) uvádí nejvyšší produkci etanolu při počáteční koncentraci glukózy 143 a 164 g.l<sup>-1</sup>. Bylo prokázáno, že vysoké koncentrace glukózy vedou k akumulaci glycerolu jakožto ochrany před vysokým osmotickým tlakem (Mendes-Ferreira, Mendes-Faia a Leao, 2004). Albers et al. (1996) však upozorňují na to, že FAN efektivně brání tvorbě glycerolu.

Avšak příliš vysoké koncentrace FAN současně s vysokými koncentracemi glukózy mohou způsobit vyšší tvorbu těkavých mastných kyselin v pozdější fázi fermentace (Bely, Rinaldi a Dubourdieu, 2003). Vysoké koncentrace FAN mohou rovněž inhibovat růst kvasinek při koncentracích glukózy nad 164 g.l<sup>-1</sup>. Tento stav nejčastěji způsobují některé aminokyseliny. Jsou to zejména glycin, lysin a arginin (Thomas a Ingledew, 1990). Arifeen et al. (2009) zkoumali vliv extrakce gluteinu na produkci etanolu. Ve své práci prokázali pozitivní vliv tohoto opatření. Ve svém pokusu uvádí při použití vstupní směsi o parametrech 121 g.l<sup>-1</sup> glukózy a 1,76 g.l<sup>-1</sup> FAN produkci etanolu 0,92 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Naproti tomu při použití směsi 121 g.l<sup>-1</sup> glukózy a 0,73 g.l<sup>-1</sup> FAN uvádí produkci etanolu 1,16 g.l<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Dalším zajímavým aspektem je, že při použití směsi s 205 g.l<sup>-1</sup> glukózy nebylo spotřebováno asi 10 g.l<sup>-1</sup> glukózy v případě pokusu bez odstranění gluteinu, zatímco při jeho odstranění se nespotebovalo jen 1,5 g.l<sup>-1</sup> glukózy. Tyto výsledky prokazují i další studie (Thomas

a Ingledew, 1990; Bely, Rinaldi a Dubourdiou, 2003). Toto prokazuje vhodnost odstranění gluteinu z endospermu ještě před jeho hydrolýzou. Takto získaný glutein by mohl být ceněným vedlejším produktem. Jeho další využití by bylo možné např. v krmivářství.

Thomas a Ingledew, (1990) uvádí počet kvasinek  $1.5 \times 10^8 \cdot \text{g}^{-1}$  zkvašované směsi, ve které neproběhla hydrolýza proteinů, během prvních 24 hodin. Tento počet rostl do 48 hodin po inokulaci až na  $2,18 \times 10^8 \cdot \text{g}^{-1}$  a dále se už výrazně neměnil. Naproti tomu při hydrolýze proteinů dosáhl počtu kvasinek  $4.1 \times 10^8 \cdot \text{g}^{-1}$  během 48 hodin. Thomas a Ingledew (1990) dále uvádí, že dodávání minerálií nemělo na průběh fermentace vliv.

Významným způsobem, jak dosáhnout vyšší výtěžnosti je výrazné omezení tvorby vedlejších produktů při kvasném procesu a tím lepší využití zkvasitelných cukrů (Nevoigt, 2008). V případě využití *S. cerevisiae* se jedná zejména o glycerol. U anaerobních kultur některých kmenů *Sacharomyces cerevisiae*, je při produkci etanolu hlavním vedlejším produktem glycerol. Ten je využíván pro zpětnou oxidaci NADH. Bylo zjištěno, že na glycerol jsou převáděna až 4 % cukerného substrátu pro výrobu etanolu (Nissen et al., 2000). Množství vytvořeného glycerolu je závislé na kmenu využívaných mikroorganismů, podmínkách fermentace. Velmi významným činitelem je také zdroj dusíku pro mikroorganismy. Jedním z možných řešení je využití řízené aerace během kvasného procesu (Alfenore et al., 2004). Další možností je využití striktně aerobních kvasinek. Produkci tak lze zvýšit až o 12 %. Avšak růst kultury je značně limitován kapacitou vnějších enzymů pro reoxidaci NADH (Nissen et al., 2000). Dalším výrazným faktorem je zdroj dusíku pro růst kvasinkové kultury. Většina dusíkatých látek, které jsou obsaženy v zrně, je pro výživu kvasinek *S. cerevisiae* při suchém způsobu mletí nedostupná a přechází do výpalků. Tento problém je často řešen přidávkou anorganických zdrojů dusíku (Bothast a Schlicher, 2005), nebo se přidává amino dusík z autolyzovaných kvasinek (Jones a Ingledew, 1994a). Tento problém by bylo možné vyřešit přidáním exogenních proteáz, které by hydrolyzovaly protein zrna na volné aminokyseliny, nebo krátké peptidy. Ty by pak sloužily jako zdroj dusíku (Jones a Ingledew, 1994b). Jen pokud budou všechny podmínky v optimálním rozmezí, lze dosáhnout maximální produkce. Pro tuto optimalizaci podmínek je vhodné využít statistické modely (Wang et al., 2007).

#### 4.10.1.3. Poměr glukózy a FAN.

Velmi nízké, nebo velmi vysoké koncentrace FAN způsobují zpomalují růst kvasinkové kultury a následně tak omezují produkci etanolu.

Nejvyšší produkce etanolu byla po 72 hodinách zjištěna při těchto podmínkách: koncentrace glukózy  $150 \text{ g.l}^{-1}$ , FAN  $310 \text{ mg.l}^{-1}$  a teplota  $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nižší teplota současně s vyšší koncentrací FAN způsobují nárůst produkce vyšších alkoholů (Wang et al. 2007). V pivovarnictví jsou doporučovány tato množství FAN: pro klasické směsi, tj.  $10 - 12 \text{ }^{\circ}\text{P}$   $140 - 150 \text{ mg.l}^{-1}$ , pro vysokoobsahové směsi pak  $200 \text{ mg.l}^{-1}$  pro  $16 \text{ }^{\circ}\text{P}$  a až  $240 \text{ mg.l}^{-1}$  pro  $20 \text{ }^{\circ}\text{P}$  (Dragone et al., 2004).

#### 4.10.1.4. Teplota

Pro kvasné procesy jsou preferovány nižší teploty (cca  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ), kdy jsou metabolické pochody kvasinek podpořeny a fermentace tak probíhá rychleji (Thomas a Ingledew, 1990). Další možností je využití speciálních termo-resistentních kmenů kvasinek umožňujících fermentaci při  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Sree et al., 1999).

Odolnost vůči teplotě je také ovlivněna odolností vůči etanolu. Vyšší odolnost vůči etanolu zvyšuje senzitivitu buněk vůči teplotě (Piper et al., 1994). Tento efekt má daleko větší význam u etanolu než u metanolu. Na pokles teploty, která způsobí teplotní šok je tak třeba  $4 - 6 \%$  metanolu, ale stejného efektu lze dosáhnout jen  $2,6 \%$  etanolu (Neves a François, 1992).

### 4.11. Přímá produkce etanolu

Etanol je dnes vyráběn ze škrobových materiálů především enzymatickou hydrolyzou s následnou fermentací. Tento proces se skládá z několika stupňů, ve kterých se často liší optimální podmínky pro jejich průběh. To činí výrobu organizačně i ekonomicky náročnou. Existuje ale i možnost přímé produkce pomocí kvasinek.

Některé druhy kvasinek z rodů *Aerobasidium*, *Brattanomyces*, *Candida*, *Saccharomyces* a dalších jsou schopné produkovat extracelulárně  $\alpha$ -amylázu a glukoamylázu. Což jsou enzymy, které v určitém poměru stačí pro kompletní hydrolyzu amylozy i amylopektinu (DeMot a Verachtert, 1985) V Brazílských továrnách byl izolován druh kvasinek *Saccharomyces cerevisiae var diastaticus*, který silně fermentuje škrob a produkuje 5x více enzymu než *Schwanniomyces alluvius* (Laluce at al., 1988).

Bylo prokázáno, že tyto druhy se liší jak v sekreci extracelulárních enzymů, tak v rozsahu jejich hydrolýzy. Různé kmeny *Filobasidium capsuligenum* jsou schopné poměrně silné hydrolýzy a velké produkce amylytických enzymů. U *Filobasidium capsuligenum* byla zjištěna přítomnost jak  $\alpha$ -amylázy, ale i 2 glukoamyláz. AA *F. capsuligenum* vykazuje nejvyšší aktivitu při pH = 5,6 a optimální teplotě 50 °C. Zvyšováním teploty dochází k její výrazné inaktivaci. První glukoamyláza má optimum při pH 5,0 – 5,6 a teplotě 55°C. Druhá GA má optimum při pH 4,8 – 5,3 a při teplotě 50 °C. První GA vykazuje rovněž vyšší termostabilitu (De Mot a Verachtert, 1985). Nejvyšší produkce  $\alpha$ -amylázy byla prokázána v konečné fázi exponenciálního růstu kultury.

## 5. Metodika

V praktické části byl zjišťován obsah redukujících cukrů v hydrolyzátech škrobnatého materiálu získaných termotlakovou přípravou s následnou hydrolyzou. Pro hydrolyzu byla použita různá hydrolytická činidla v různých koncentracích – kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), hydroxid sodný ( $\text{NaOH}$ ) a amylolytické enzymatické preparáty. Hloubka hydrolyzy byla posuzována detekcí glukózových ekvivalentů a výtěžkem alkoholu. Následují dílčí body metodiky.

### 5.1. Úprava surovin

Jako vstupní surovina bylo použito zrno pšenice seté – *Triticum aestivum*, ječmene setého – *Hordeum vulgare* a ova setého – *Avena sativa*. Zrno bylo na externím pracovišti rozemleto a extrudováno při tlaku 0,3 a 1MPa. Při dosažení požadovaného tlaku byla suspenze při dané úrovni tlaku udržována 30 min. Následovala prudká dekomprese.

### 5.2. Hydrolyza

Disponibilní extrudáty byly následně podrobovány hydrolyze o různém stupni intenzity. Extrudovaný materiál byl následně za pokojových teplot podroben kyselé a alkalické hydrolyze v rozpětí 3 až 12%. Metodika enzymatických hydrolyz se prováděla za optimálních teplot a pH dle specifik užitých enzymů. Extrudáty podrobuující se hydrolyze měly vstupní sušinu 5 % w/v.

#### 5.2.1. Kyselá hydrolyza

Pro kyselou hydrolyzu byla použita koncentrovaná kyselina sírová ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) v koncentracích 3, 6, 9 a 12 %. Směs nebyla zahřívána.

#### 5.2.2. Zásaditá hydrolyza

Zásaditá hydrolyza byla prováděna prostřednictvím hydroxidu sodného ( $\text{NaOH}$ ) v koncentracích 3, 6, 9 a 12 %. Vlastní provedení bylo shodné s kyselou hydrolyzou.

#### 5.2.3. Enzymatická hydrolyza

Enzymatická hydrolyza byla prováděna různými enzymatickými přípravky.  $\alpha$ -amyláza ASD, tj. termostabilní amyláza s původcem *Bacillus licheniformis*, byla poskytnuta společností INOTEX spol. s r. o. Dalšími přípravky byly použity  $\alpha$ -amylázy AO (*Aspergillus oryzae*) a BS (*Bacillus subtilis*). Tyto přípravky byly

zakoupeny u společnosti Fisher Scientific, spol. s r. o. Poslední metodou byla hydrolyza prostřednictvím sladového mléka. To bylo vlastní výroby (viz. metodika 6.4).

Obr. 12: Průvodní list enzymatického přípravku

**INOSAMPLE ASD**

*α-amyláza*

**Charakteristika :** Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Bacillus licheniformis*. Katalyzuje rozklad škrobu na dextriny až disacharidy.

**Vlastnosti :** Žlutohnědá kapalina  
Rozpustný v teplé i studené vodě  
Neionogenní  
pH rozsah = 5 – 10  
Optimální pH = 6 – 8  
Teplotní rozsah = 20 – 85°C  
Optimální teplota = 50 – 75°C

**Instrukce k použití :**

Enzym se dávkuje do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou.  
Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepřišel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

**Skladovatelnost :** Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

Zdroj: Ing. V. Antonov, INOTEX spol. s r. o.

### 5.3. Dávkování SEA (Maroušek, 2009)

Enzymy rozkládající škrob jsou dávkovány v starch enzyme activity (mg škrobu, které za sekundu hydrolyzuje 1 gram enzymu, S(mg)/t(s)/E(g), dále jen SEA):

1. Do zkumavek navážit po 1,000g škrobu ( $(C_6H_{10}O_5)_n$ )
2. Přidat po 0,1g testovaného enzymu (0,1g = 2 kapky). V případě slepých vzorků tento krok vynechat)
3. Vstříknout 10g destilované  $H_2O$  tak, aby smyla případné zachycené zbytky po stěnách zkumavky a promísila enzym se škrobem
4. Dle charakteristiky enzymu upravit pufrům pH
5. Zkumavky temperovat v optimální teplotě dle charakteristiky enzymu po 30 minut
6. Obsah zkumavek přelit do 200ml Erlenových baněk



7. Přidat 15ml destilované H<sub>2</sub>O a 10ml měďnatého roztoku (na 1000ml měďnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 350ml destilované H<sub>2</sub>O + 50g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> ve 100ml destilované H<sub>2</sub>O + 25g krystalického CuSO<sub>4</sub>. Destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 1000ml a vyčkat na rozpuštění (za studena 24h)).
8. 10minut varu, následně rychlé ochlazení
9. přidat 5ml 30% roztoku KJ (na 200 ml 30% roztoku KJ: 60 g KJ + kapka 10 % NaOH (na 100ml 10% NaOH: 10 g NaOH + destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (na 1000 ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 250 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 750ml destilované H<sub>2</sub>O). Při použití bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v mědnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
10. K titracím připravit zásobu 0,05 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (dále jen sirnatan), (na 2000ml sirnatanu: 25 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O + 2000ml destilované H<sub>2</sub>O).
11. titrem „X“ (kde X≥0,02g≤0,03g) KIO<sub>3</sub> + 1,5 g KI v 50 ml 0,1 M HCl (na 1000 ml 0,1 M HCl: 8,8 ml HCl + 991,2 ml destilované H<sub>2</sub>O), se na titrátoru (pro DL 50 metodou J-titr) stanoví faktor přesnosti 0,05 M sirnatanu (dále jen „Y“)
12. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby sirnatanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745. Tato hodnota je jednotkou škrob–enzymatické aktivity (SEA) a uvádí, kolik mg GE je za optimálních podmínek schopen daný enzym (m = 0,1g) rozštěpit z 1g škrobu za 30 minut. Pro podmínky pokusu byly používány dávky enzymatických preparátů 50 a 100 SEA na 1 litr suspenze.

#### **5.4. Sladové mléko**

Rovněž byla testována metoda sladového mléka, kdy jsou pro hydrolýzu využívány enzymy přítomné v zrně obilnin. Při přípravě sladového mléka se vytváří podmínky vhodné pro klíčení zrna. Za těchto podmínek dochází k aktivaci enzymů, které rozkládají zásobní škrob na jednodušší cukry. Ty pak za běžných podmínek slouží k výživě klíčku.

Sladové mléko je nejvhodnější připravovat ze zadního ječmene, popřípadě z dobře hnojeného krmného ječmene.

1. Ječmen se nejprve dá do nádoby a zalije přebytkem vody o teplotě 20 až 25 °C. Zamíchá se a každou hodinu se voda mění. Voda se mění alespoň třikrát.

Poté se ječmen zalije už vodou o teplotě 10 až 15 °C a máčí se, dokud není máčení ukončeno. To se projevuje:

- Zrno se musí nechat ohnout přes nehet, aniž by se zlomilo,
  - zmáčkne-li se zrno mezi prsty, nesmí píchat,
  - při silnějším stisknutí u ucha musí být slyšet prasknutí, kdy se oddělí plucha od zrna,
  - střed rozříznutého zrna má být bílý a škrtně-li se řezem po prkně, nechává bílou stopu,
  - optimální obsah vody v zrně po máčení je 45 až 50 %.
2. Ječmen se rozprostře do vrstvy 5 – 8 cm silné a každé 2 až 3 hodiny po následující 3 dny přesypá, aby se provzdušnil. Při teplotě 16 až 20 °C by měl ječmen začít klíčit během 3 dní. Později se zrno provzdušňuje jen jedenkrát denně při optimální teplotě do 18 °C.
  3. Když ze zrna vyrazí 3 až 4 kořínky, ječmen začne vonět po oloupaných okurkách. Po 7 až 8 dnech se okurková vůně ztratí. Klíček se nechá dorůst do  $\frac{3}{4}$  délky zrna a kořínky do 1 až 1,5 násobku délky zrna.
  4. Takovýto slad se rozmixuje s vodou v poměru 1 : 5 na „sladové mléko“.

### **5.5. Stanovení glukózové ekvivalentu (GE)**

Po proběhnutí hydrolýzy byl stanovován obsah zkvasitelných cukrů. Ten byl vyjádřen jako glukózový ekvivalent. Ten byl poté porovnáván s alkoholovou výtěžností. Metoda stanovení GE je založena na schopnosti některých cukrů v alkalickém prostředí za varu redukovat měďnatou sůl na  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Nezareagovaný přebytek měďnaté soli se stanoví jodometricky ( $2\text{Cu}^{2+} + 4\text{I}^- \rightarrow 2\text{CuI} + \text{I}_2$ ). Uvolněný jód ( $\text{I}_2$ ) se titruje siriátem ( $\text{I}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{I}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ ).

1. Do 200 ml Erlenových baněk odebrat 1 g hydrolyzátu
2. přidat 10 ml roztoku síranu měďnatého ( $\text{CuSO}_4$ ) + 24 ml destilované  $\text{H}_2\text{O}$
3. vařit 10 minut
4. přidat 5 ml 30 % roztoku KI a 5 ml 25 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$
5. k titraci připravit zásobu 0,05 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
6. na titrátoru zjistit přesnou koncentraci zásobního titračního roztoku a stanovit koef. přesnosti

7. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby sirnatanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745, čímž získáme mgGE g<sup>-1</sup> sušiny materiálu.

$$GE = (\text{spotřeba vzorek} - \text{spotřeba slepý vzorek}) \cdot 1,754 \cdot \text{koef. přesnosti [mg.g}^{-1}\text{]}$$

### **5.6. Stanovení alkoholové výtěžnosti**

1. Stanovit sušinu hydrolyzátu,
2. do 3 baněk odebrat 100 g hydrolyzázu,
  - a) varianta A – neředit,
  - b) varianta B – naředit destilovanou vodou 1:1,
  - c) varianta C – naředit destilovanou vodou 1:5,
3. 1 balíček droždí (40 g) rozmíchat v 90 ml vody na řídkou kašičku,
4. do každé varianty přidat 1/3 kašičky,
5. promíchat a nechat probíhat fermentaci při 29 – 30 °C po 72 hodin,
6. po zkvašení opatrně neutralizovat 0,1 M roztokem NaOH na fenolftaleinu do slabě ružova,
7. převést do destilačního přístroje a oddestilovat do 200 ml odměrné baňky téměř daný objem,
8. destilát vytemperovat na 20 °C a doplnit destilovanou vodou po rysku,
9. destilát převést do odměrného válce a alkoholmetrem zjistit obsah alkoholu.  
Jako výsledek se použije ta varianta, jejíž výtěžek je největší.

## 6. Výsledky

### 6.1. Pšenice

U vzorků pšenice byl zjištěn nejvyšší stupeň hydrolýzy ze všech sledovaných vzorků (viz. obr. 15) Přestože největší výtěžek GE byl při kyselé hydrolýze získán při nejvyšším tlaku a nejvyšší koncentraci, tak největší rozdíl nárůstu výtěžku lze pozorovat u vzorků s koncentracemi 3 a 6 % při tlaku 0,3 MPa (viz. obr. 13). Nejvyššího výtěžku GE 216 mg.g<sup>-1</sup> bylo u pšenice dosaženo při použití  $\alpha$ -amylázy *Bacillus subtilis* při použití nejvyšší dávky a nejvyššího tlaku. Tento výtěžek GE byl rovněž absolutním maximem všech vzorků. Za povšimnutí stojí rovněž využití sladového mléka. To se projevilo jako účinný přípravek zejména za podmínek atmosférického tlaku, kdy tato metoda poskytovala vyšší výtěžky než jiné enzymatické preparáty. U pšenice bylo dosaženo nejvyšší alkoholové výtěžnosti 6 % obj. (viz. obr. 16). Počet vzorků, ve kterých nebyl po fermentaci zjištěn alkohol byl u pšenice nejmenší. Alkohol nebyl zjištěn u vzorků s použitím BS při dávkování 50 a 100 SEA při nejnižším tlaku a u vzorku AO při dávce 50 SEA a nejnižším tlaku (viz. tab. 3, 4).

Tab. 1: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při kyselé hydrolýze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE					Alkoholová výtěžnost (%)			
tlak (Mpa)	Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)				Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)			
	3	6	9	12	3	6	9	12
0	77	104	113	124	0,5	1,5	2	2
0,3	85	136	160	185	1	2,5	3	3,5
1	109	145	172	188	2	2,5	3	3,5

Tab. 2: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při alkalické hydrolýze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE					Alkoholová výtěžnost (%)			
tlak (Mpa)	Koncentrace NaOH (%)				Koncentrace NaOH (%)			
	3	6	9	12	3	6	9	12
0	62	65	70	86	0,5	0,5	0,5	0,5
0,3	73	86	91	101	0,5	0,5	0,5	1
1	84	96	109	113	0,5	1	1	1,5

Tab. 3: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při enzymatické hydrolýze BS (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA BS		SEA BS	
	50	100	50	100
0	44	49	0	0
0,3	167	211	4,5	5,5
1	190	216	5,5	6

Tab. 4: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při enzymatické hydrolýze AO (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA AO		SEA AO	
	50	100	50	100
0	36	68	0	0,5
0,3	50	82	0,5	1
1	116	123	1,5	1,5

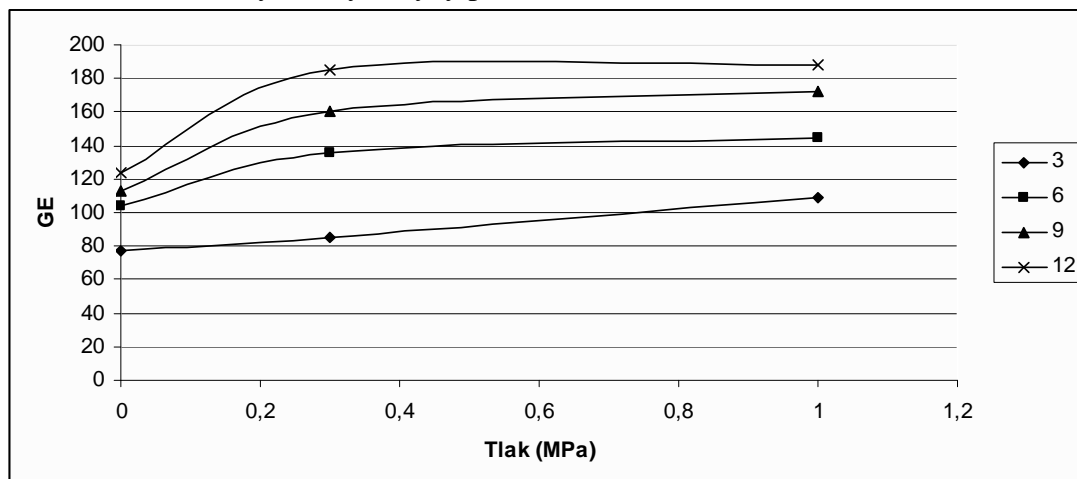
Tab. 5: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při enzymatické hydrolýze ASD (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA ASD		SEA ASD	
	50	100	50	100
0	45	49	0,5	0,5
0,3	72	88	0,5	1
1	91	100	1	1

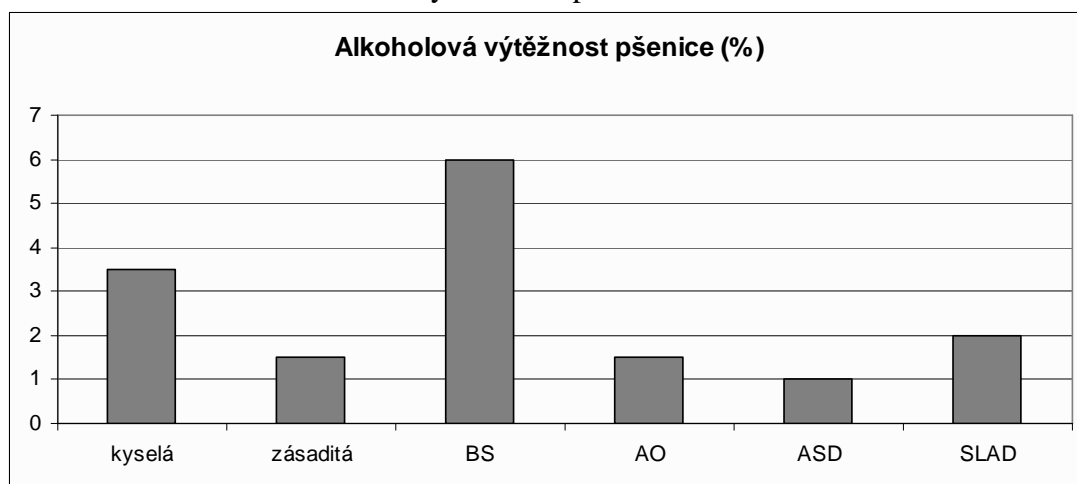
Tab. 6: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna pšenice při enzymatické hydrolýze SLAD (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA SLAD		SEA SLAD	
	50	100	50	100
0	53	77	0,5	0,5
0,3	91	125	1	1,5
1	139	153	1,5	2

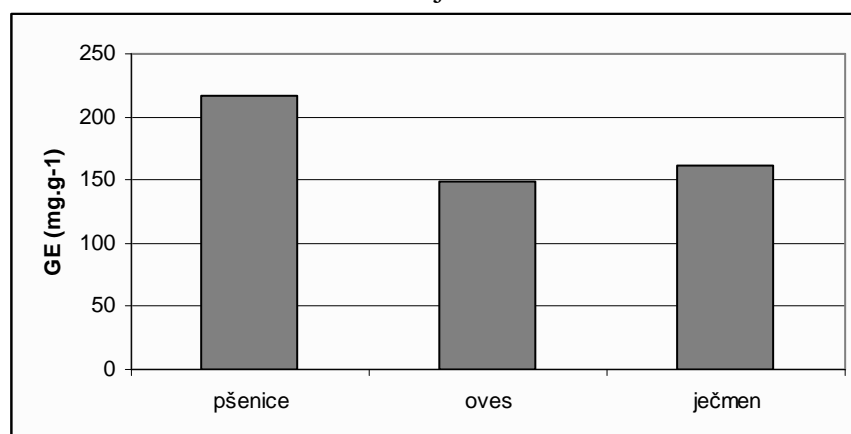
Obr. 13: Závislost kyselá hydrolyzy pšenice na tlaku



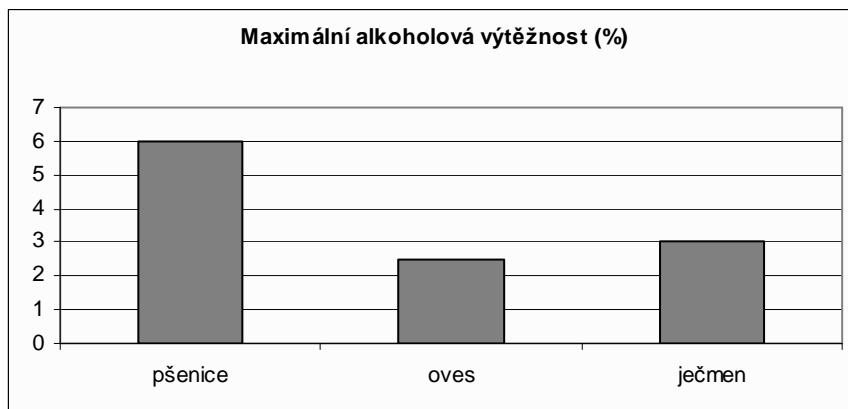
Obr. 14: Maximální alkoholové výtěžnosti - pšenice



Obr. 15: Maximální obsah redukujících cukrů



Obr. 16: Maximální alkoholové výtěžnosti



## 6.2. Oves

V případě vzorků ovsa bylo dosahováno nejnižších hodnot GE. Rovněž jako u ostatních vzorků se i u ovsa pozitivně projevilo zvýšení tlaku. U ovsa bylo možné pozorovat poněkud menší rozdíly mezi kyselou a alkalickou hydrolyzou oproti vzorkům pšenice. Nejvyšších výtěžků GE v případě ovsa bylo dosaženo rovněž enzymatickou hydrolyzou. Nejvhodnějším preparátem pro hydrolyzu ovsa byl přípravek ASD. V případě ovsa se ječné sladové mléko projevilo jako hydrolyticky málo účinné. Alkoholové výtěžky získané z hydrolyzátu ovsa byly nižší oproti výtěžkům z ostatních surovin. Při nízkém obsahu redukujících cukrů v hydrolyzátu nebyl obsah alkoholu měřitelný. Nejvyšší alkoholový výtěžek (viz. obr. 17) odpovídá nejvyššímu obsahu zkvasitelných cukrů v hydrolyzátu získaném hydrolyzou přípravkem ASD.

Tab. 7: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ovsa při kyselé hydrolyze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE		Alkoholová výtěžnost (%)						
tlak (Mpa)	Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)				Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)			
	3	6	9	12	3	6	9	12
0	33	53	68	70	0	0,5	0,5	0,5
0,3	56	79	85	92	0,5	0,5	1	1
1	93	118	121	130	1	1	1,5	1,5

Tab. 8: Obsah GE a alkoholová výtěžnost rna ovsa při alkalické hydrolýze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE					Alkoholová výtěžnost (%)			
tlak (Mpa)	Koncentrace NaOH (%)				Koncentrace NaOH (%)			
	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>9</b>	<b>12</b>
<b>0</b>	19	26	33	51	0	0	0	0,5
<b>0,3</b>	22	36	47	55	0	0	0	0,5
<b>1</b>	34	37	50	59	0	0	0	0,5

Tab. 9: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ovsa při enzymatické hydrolýze BS (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA BS		SEA BS	
	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>0</b>	31	34	0	0
<b>0,3</b>	45	49	0	0
<b>1</b>	48	62	0	0,5

Tab. 10: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ovsa při enzymatické hydrolýze AO (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA AO		SEA AO	
	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>0</b>	45	61	0	0
<b>0,3</b>	56	79	0	0,5
<b>1</b>	70	95	0,5	1

Tab. 11: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ovsa při enzymatické hydrolýze ASD (3 opakování)

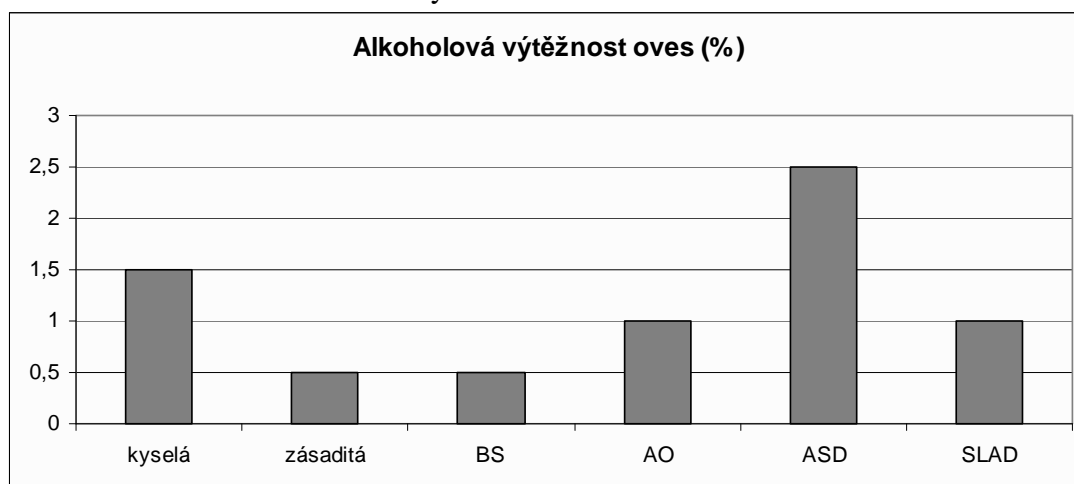
Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA ASD		SEA ASD	
	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>0</b>	57	73	0	0,5
<b>0,3</b>	86	124	1	1,5
<b>1</b>	117	148	1,5	2,5



Tab. 12: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ovsa při enzymatické hydrolýze SLAD (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA SLAD		SEA SLAD	
	50	100	50	100
0	22	46	0	0,5
0,3	40	82	0,5	1
1	75	96	1	1

Obr. 17: Maximální alkoholové výtěžnosti - oves



### 6.3. Ječmen

Ječmen se projevil jako potenciálně vhodná plodina. Maximálního obsahu GE 162 mg.g<sup>-1</sup> bylo dosaženo při kyselé hydrolýze. Hodnoty získané při kyselé hydrolýze se blížily hodnotám pšenice. Enzymatické preparáty vykázaly nižší účinnost. Maximální obsah GE 148 mg.g<sup>-1</sup> v případě enzymatické hydrolýzy byl získán v případě použití přípravku ASD. Rovněž sladové mléko vykázalo dobré hodnoty: maximum 137 mg.g<sup>-1</sup>. Svoji vhodnost ale potvrdilo opět při použití za atmosférického tlaku, kdy dosažené hodnoty byly vyšší než u ostatních použitých hydrolytických přípravků. Maximální alkoholové výtěžky ječmene (obr. 18) nedosahovaly takových hodnot jako v případě pšenice, ale byly vyšší než v případě ovsa. Rovněž u ječmene byly pozorovány nulové výtěžky alkoholu při nízkých hladinách redukujících cukrů v hydrolyzátu.

Tab. 13: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při kyselé hydrolyze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE					Alkoholová výtěžnost (%)			
tlak (Mpa)	Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)				Koncentrace H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%)			
	3	6	9	12	3	6	9	12
0	48	68	83	80	0,5	0,5	0,5	1
0,3	73	95	143	154	0,5	1	2,5	2,5
1	93	114	147	162	1	1,5	2,5	3

Tab. 14: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při alkalické hydrolyze (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE					Alkoholová výtěžnost (%)			
tlak (Mpa)	Koncentrace NaOH (%)				Koncentrace NaOH (%)			
	3	6	9	12	3	6	9	12
0	26	46	57	56	0	0	0	0,5
0,3	36	59	68	80	0	0	0,5	0,5
1	64	73	75	84	0	0,5	0,5	0,5

Tab. 15: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při enzymatické hydrolyze BS (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA BS		SEA BS	
	50	100	50	100
0	45	59	0,5	5
0,3	97	122	1	1,5
1	100	135	1	1,5

Tab. 16: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při enzymatické hydrolyze AO (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA AO		SEA AO	
	50	100	50	100
0	31	36	0	0
0,3	46	49	0	0
1	49	56	0	0,5

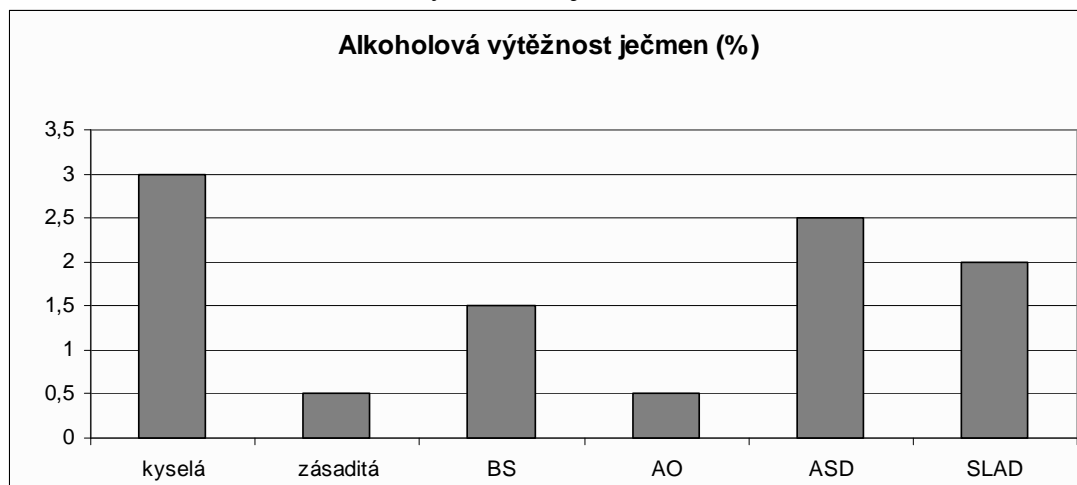
Tab. 17: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při enzymatické hydrolýze ASD (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA ASD		SEA ASD	
	50	100	50	100
0	57	73	0	0,5
0,3	86	124	1	1,5
1	117	148	1,5	2,5

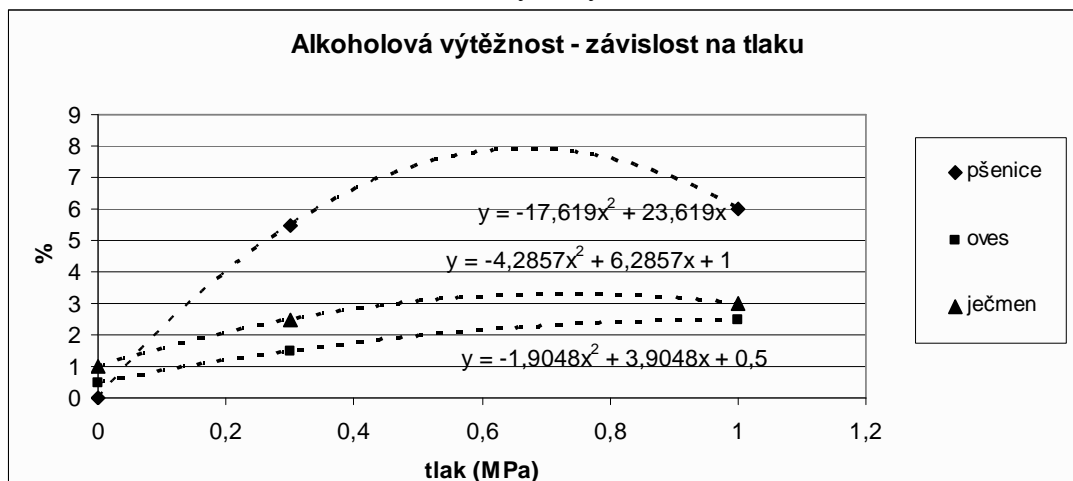
Tab. 18: Obsah GE a alkoholová výtěžnost zrna ječmene při enzymatické hydrolýze SLAD (3 opakování)

Obsah redukujících látek GE			Alkoholová výtěžnost (%)	
tlak (Mpa)	SEA SLAD		SEA SLAD	
	50	100	50	100
0	57	86	0,5	1
0,3	92	113	1	1
1	126	137	1,5	2

Obr. 18: Maximální alkoholové výtěžnosti - ječmen



Obr. 19: Průběh maximálních alkoholových výtěžků v závislosti na tlaku



Z regresních rovnic maximálních alkoholových výtěžností (viz. obr. 19) byly pro jednotlivé suroviny zjištěny tlaky pro získání maximálního alkoholového výtěžku: pšenice 0,67 MPa, oves 1,02 MPa, ječmen 0,73 MPa. Výsledky je třeba považovat spíše za orientační. Pro přesnější stanovení by bylo nutné provést více pokusů při různých variantách tlaku, které by umožnily přesnější stanovení průběhu alkoholové výtěžnosti.

## 7. Diskuse

Prvním faktorem, který výrazně ovlivňuje alkoholovou výtěžnost je stupeň dezintegrace vstupního materiálu. Dohányos (2008) uvádí: „*Zmenšením velikosti častic mechanickou nebo jinou dezintegrací dochází k podstatnému zvětšení povrchu a tím i k větší dostupnosti enzymovému rozkladu*“. Tento jev je často pozorován a je to dlouhodobě uznávaný faktor. K tomuto dodává Khaw et al., (2007), že: „*produkce etanolu roste, když velikostní distribuce škrobových granulí je podobná jako kvasinek*“. Pro vlastní práci byla využívána zrna obilovin, která prošla určitým stupněm mechanické dezintegrace.

Nigam a Singh (1995) uvádějí, že: „*škrob je dosud hydrolyzován na jednoduché dextriny a glukózu prostřednictvím kyselin, ale enzymy mají několik výhod. Hlavní výhodou je, že specifita enzymu umožňuje produkci cukerného roztoku s dobře definovatelnými vlastnostmi*“. Tento faktor je významný zejména v případech, že produkt hydrolýzy je dále zpracováván. Enzymatickou hydrolýzou tak lze zajistit určitou standardizaci jejích produktů. Ačkoli ve vlastní práci nebyl sledován podíl jednotlivých složek vzniklých hydrolýzou škrobnatého materiálu, tak zastoupení složek osmoticky aktivních ovlivňuje proces alkoholové fermentace hydrolyzátu.

Hydrolýza byla prováděna chemickými i enzymatickými přípravky. Kyselá hydrolýza (zmiňovaná výše) se projevila jako universální přípravek. Její efektivita stoupá s růstem extrémních podmínek. Enzymatická hydrolýza však v některých případech vykazuje lepší výsledky. Enzymatickou cestou bylo lepších výsledků dosahováno především za méně extrémních podmínek.

Bylo zjištěno, že nejvyšších výtěžků GE a následně výtěžku alkoholu je dosahováno při vyšším tlaku. Rovněž Selmi, (2000) uvádí, že: „*vysoký tlak při přípravě zrna pšenice má pozitivní vliv na výtěžek glukózy. Vysoký tlak nevede jen ke zvýšení hydrolýzy molekul amylopektinu, ale způsobuje i větší bobtnavost škrobových zrn*“. Selmi (2000) dále uvádí, že termickým zpracováním může dojít ke snížení výtěžku glukózy. Tento jev zdůvodňuje vazbami mezi amylózou a lipidy, které vznikají při zahřívání. Hill, Macdonald a Lang (1997) rovněž uvádějí, že účinnost amylolytických enzymů na tyto komplexy amylózy a lipidů je nižší. Debet a Gidley (2006) uvádějí, že „*lipidové a proteinové povrchové složky škrobových zrn působí redukčně na bobtnavost škrobu pšenice a kukuřice*“. Je uznáváno, že tuky

obsažené ve škrobu lze rozdělit na FAM a LAM, přičemž každá ze složek má jiný vliv na bobtnavost škrobových zrn. LAM působí inhibičně, zatímco FAM stimulačně. Pozitivní vliv tlaku na vznik redukujících cukrů uvádí i Lee (2006), avšak zároveň uvádí vyšší produkci redukujících cukrů pro použití HCl oproti H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, která byla použita v pokusu. Z hlediska ekonomiky výroby etanolu uvádí Nigam a Singh (2005), že: „*ačkoli jsou dnes pro hydrolýzu škrobnatých materiálů využívány enzymatické preparáty, výrazných úspor by bylo možné dosáhnout použitím kvasinek, které produkují vlastní  $\alpha$ -amylázy a glukoamylázy a jsou zároveň schopné produkovat etanol.*“ Takovýmto sloučením procesů lze šetřit energetické vstupy výroby etanolu. Pro podpoření hydrolýzy takovými organismy by bylo možné využít sladového mléka, které v pokusech vykázalo dobré výsledky při nízkém tlaku. Liao et al. (2010) uvádějí, že ječná  $\alpha$ -amyláza je odolná vůči nízkému pH a proto je vhodná zejména pro systémy kontinuální fermentace.

Enzymatickým přípravkem, který vykázal nejvyšší výtěžek GE, resp. alkoholu byla  $\alpha$ -amyláza BS použitá k hydrolýze pšenice. Konsula a Liakopoulou-Kyriakides (2004) uvádějí pro  $\alpha$ -amylázu *Bacillus subtilis* optimální podmínky: teplota 135 °C, přičemž dalšího zvýšení termotability lze dosáhnout přidáním Ca<sup>2+</sup>. Přídavkem Ca<sup>2+</sup> (8 mM) lze při 60 °C a 2 hod inkubaci zvýšit reziduální aktivitu z 84,6 % na 96 %. Optimální uváděné pH je 6,5.

Optimální teplota 135 °C se jeví jako velmi vysoká (viz. obr. 4). V případě Konsula a Liakopoulou-Kyriakides se tedy zřejmě jedná o vysoce termotolerantní kmen tohoto druhu. Provádět hydrolýzu při 135 °C je vysoce energeticky i ekonomicky náročné, avšak za takovýchto podmínek je třeba uvažovat i hydrolytické působení tlaku, které ovlivní výsledný stupeň hydrolýzy.

Pokus prokázal vysokou afinitu enzymatického přípravku BS vůči škrobu pšenice. Podobné výsledky uvádí i Konsula a Liakopoulou-Kyriakides (2004), kteří zmiňují vysokou afinitu enzymu k bramborovému škrobu, ale jen nízkou vůči škrobu ovsa. Nízká afinita tohoto přípravku vůči škrobu ovsa je dobře patrná z tab. 9. Tyto rozdíly v afinitě jsou zdůvodňovány obsahem tuků. Ten je u ovsa vyšší než u ostatních obilovin. Tento jev potvrdily i výsledky pokusu.

V praxi jsou při výrobě etanolu používány jako vstupní surovina suspenze s vysokým obsahem sušiny (200 g.l<sup>-1</sup> a vyšší). Tato metoda je vhodná rovněž pro výrobu etanolu z ječmene a ovsa (Sánchez a Cardona, 2008). Bayrock a Ingledev (2001) uvádí, že systém víceetapové kontinuální fermentace v kombinaci s vysokou

vstupní sušinou je vhodný zejména pro výrobu etanolu z pšenice. Pokus byl prováděn v podmínkách nízké vstupní sušiny ( $50 \text{ g.l}^{-1}$ ). Bylo by vhodné ověřit průběh hydrolýzy suroviny s vysokou sušinou v podmínkách vysokotlaké přípravy záparů.

Wang et al. (1999) uvádí, že: „*výsledná koncentrace etanolu je primárně závislá na poměru sušiny a vody ve směsi.*“ Dále uvádí lineární růst koncentrace etanolu z 9 % na 15 % obj. při snižování poměru voda : sušina z poměru 3,2 na 1,8. Vysokých koncentrací etanolu je sice možné dosáhnout zvýšením sušiny, ale to zároveň vede k prodlužování doby fermentace. Prodloužením doby fermentace ale vzrůstá riziko mikrobiální kontaminace. Faktorem, který nejvýrazněji ovlivňuje rychlost fermentace je teplota. Pro závislost rychlosti fermentace a teploty uvádí Wang et al. (1999) v rozmezí teplot  $17,9 - 32,1 \text{ }^\circ\text{C}$  lineární vztah. Při zvyšování teploty roste lineárně rychlost fermentace z 1 na  $2,7 \text{ ml.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ . Wang et al. (1999) dále uvádí, že optimální podmínky jsou: poměr voda : sušina 2 a teplota  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Ačkoli je alkoholová fermentace považována za anaerobní proces, Alfenore et al. (2004) poukazují na fakt, že aeraci lze u intenzivního vsádkového systému ( $147 \text{ g.l}^{-1}$  během 45 hod) dosáhnout vyšších výtěžků etanolu při redukci produkce vedlejších produktů, zejména glycerolu. „*Plná aerace vedla ke zvýšení živé kvasinkové kultury o 23 % a koncentrace etanolu až o 10 %. Produkce alkoholu byla vyšší při plné aeraci oproti limitované (2,2 vs.  $1,5 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ).*“ Sánchez a Cardona (2008) uvádí, že aerace hraje významnou roli při způsobu kontinuální fermentace.

Další z možností jak zvýšit alkoholovou výtěžnost je použití speciálních kmenů kvasinek. Nissen et al. (2000) předkládá, že: „*kmen TN19 S. cerevisiae má při vsádkovém systému o 10 % větší výtěžek etanolu a až o 38 % nižší vznik glycerolu v porovnání s původními kmeny.*“

Jedním z faktorů, který mohl ovlivnit výši alkoholového výtěžku bylo použití běžně dostupných pekařských kvasnic. Jako alternativu by bylo možné ověřit kvasnice používané ve vinařství.

Nagodawithana a Steikraus (1975) uvádí: „*Etanol přidaný do média je méně letální než ten, který vzniká při intenzivní fermentaci. Při velmi rychlé fermentaci vzniká v buňkách tolik etanolu, že nestačí difundovat do extracelulárního prostředí.*“ Tento efekt ztráty životaschopnosti pivovarských kvasnic lze odůvodnit ztrátou aktivity alkohol dehydrogenázy. Inaktivaci alkohol dehydrogenázy lze pozorovat od koncentrace  $2 \times 10^{11}$  molekul etanolu/buňku. Cot et al. (2007) vysvětlují letální

účinky etanolu ve vsádkovém, aerovaném systému působením na fosfolipidové struktury buněčných membrán.

Inhibiční a letální vlastnosti etanolu neměli během pokusu zřejmě výrazný vliv. Dosahované koncentrace etanolu nebyly vysoké a rovněž tak teploty fermentace nedosahovaly hodnot, kdy by výrazně zvýšily takovéto působení etanolu. Inhibiční působení etanolu se mohlo začít projevovat v případě pšenice, kdy obsah alkoholu dosáhl 6 % obj. Dombek a Ingram (1987) uvádějí, že inhibiční vliv etanolu lze pozorovat od 5 % obj.



## 8. Závěr

Podářilo se prokázat, že extruze (termotlaká příprava) při přípravě suroviny se pozitivně projevila jak na obsahu GE, tak i na výsledném výtěžku alkoholu. Rovněž zvyšováním dávky enzymu došlo ke zvýšení obsahu GE i alkoholového výtěžku. Pro určení podmínek maximálního výtěžku alkoholu je však zapotřebí jiných testů. Předkládaná metodika má za laboratorních podmínek pouze srovnávací schopnost. Pro přesné určení průběhu alkoholového výtěžku by bylo nutné provést více pokusů, ale zejména na provozním, či alespoň poloprovozním zařízení s více variantami tlaku. Tak by se dal přesněji určit průběh výtěžku a následně i regresní rovnice této závislosti. Zajímavým jevem je, že při „nízkých“ hodnotách obsahu GE byla alkoholová výtěžnost rovna nule. Při použití BATCH systému (vsádkový systém), který byl využit i v tomto pokusu, lze tento jev vysvětlit tím, že redukující látky, které jsou tvořeny především jednoduchými cukry, byly využity kvasinkami pro růst. Při růstu kvasinkové kultury tak došlo k vyčerpání těchto jednoduchých cukrů a zbylé cukry, pravděpodobně tvořené nezkvasitelnými cukry, už kvasinky nebyly schopné využít pro tvorbu etanolu. Dalším faktorem, který výrazně ovlivňuje počáteční fázi fermentace a lze jím vysvětlit nízký alkoholový výtěžek, je přítomnost kyslíku. Dokud je v suspenzi přítomen kyslík, dochází k aerobnímu rozkladu glukózy. V této počáteční fázi nemusí tedy vůbec docházet k alkoholové fermentaci, glukóza je využita aerobně a zbylé cukry již nemusí být zkvasitelné a tudíž je alkoholový výtěžek rovněž nulový.

Tvorba etanolu byla zjištěna u všech třech plodin od obsahu GE mezi 50 a 65 mg.g<sup>-1</sup>. U pšenice se tato hranice mírně posouvala nahoru v rozmezí 50 – 70 mg.g<sup>-1</sup>. Podle výsledků se lze domnívat, že pro namnožení kultury a vytvoření vhodných podmínek pro tvorbu etanolu, je třeba obsah GE nižší než 50 mg.g<sup>-1</sup>, aby zbylé cukry mohly projít fermentací.

Lze tedy říci, že hodnocení hydrolýzy pomocí alkoholové výtěžnosti u použitého vsádkového systému a podmínek pokusu není příliš vhodnou metodou, protože zvyšování obsahu GE v substrátu se až do určité „limitní“ hodnoty neprojevilo na alkoholové výtěžnosti a podle alkoholové výtěžnosti by tedy nebylo možné určit, kolik cukrů se uvolnilo ze škrobových zrn.

## 9. Souhrn

Většina produkce etanolu pro průmyslové využití je v ČR vyráběna z obilovin. Byl zkoumán vliv kyselá, alkalická a enzymatická hydrolyzy na výtěžnost po termotlakové přípravě surovin. Jako metoda s největším potenciálem se jeví enzymatická hydrolyza. Největší část pokusů tedy zaujímalo zkoumání účinnosti jednotlivých enzymů k různým druhům obilovin. Jako surovina byly použity oves, ječmen a pšenice z místních farem. Ty byly zpracovány termotlakovou přípravou při různých variantách tlaku. Po provedení hydrolyzy byl stanoven obsah GE a po ukončení fermentace byl zjišťován výtěžek alkoholu.

Klíčová slova: enzymatická hydrolyza; etanol; oves; ječmen; pšenice

## 10. Abstract

Major part of ethanol production for industrial use in Czech Republic is made from cereals. Effect of acid, alkali and enzymatic hydrolysis after thermopressure preparation takes part in the paper. The most promising alternative is enzymatic hydrolysis. Especially efficiency of different hydrolytic enzymes towards different species of cereals takes the main part of the simulations. Local farm products, oats, barley and wheat were prepared by steam explosion in different pressure. After hydrolysis were detected the GE and after fermentation was observed the production of alcohol.

Key words: enzymatic hydrolysis; ethanol; oat; barley; wheat

## 11. Seznam literatury

ADHIKARI, Dilip, et al. Process for the Preparation of Ethanol from Starch. US2010/0099156A1.

ALBERS, E., et al. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1996, vol. 62 [cit. 2010-02-20], s. 3187-3195.

ALFENORE, S., et al. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004-05-01, vol. 63, issue 5, s. 537-542. Dostupný také z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/2va1ygjvahu811jd/fulltext.pdf>>. ISSN 0175-7598, Doi: 10.1007/s00253-003-1393-5.

AO, Zihua; JANE, Jay-lin. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley. *Carbohydrate Polymers*. 2 January 2007, vol. 67, issue 1, s. 46-55. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-4K48NBH-2/2/c1e978d6f3e007cc8a38cfd6f99080b8>>. ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.04.013.

ARIFEEN, N., et al. Development of novel wheat biorefining: Effect of gluten extraction from wheat on bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2009, vol. 43 [cit. 2010-02-20], s. 113-121.

BAKS, Tim, et al. Towards an optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch–water mixtures with alpha-amylase from *B. licheniformis*. *Journal of Cereal Science*. March 2008, vol. 47, issue 2, s. 214-225. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHK-4NG3T9J-4/2/ef30205f1f57e01d340a32c7c6031554>>. ISSN 0733-5210, DOI: 10.1016/j.jcs.2007.03.011.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2001-08-24, vol. 27, issue 2, s. 87-93. Dostupný také z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/32q9xcxy6fen2nk5/fulltext.pdf>>. ISSN 1367-5435, Doi: 10.1038/sj.jim.7000167.

BECKER, Antje; HILL, Sandra E.; MITCHELL, John R. Relevance of Amylose-Lipid Complexes to the Behaviour of Thermally Processed Starches. *Starch - Stärke*. April 2001, vol. 53, issue 3-4, s. 121-130. Dostupný také z WWW: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-379X\(200104\)53:3/4%3C121::AID-STAR121%3E3.0.CO;2-Q/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-379X(200104)53:3/4%3C121::AID-STAR121%3E3.0.CO;2-Q/pdf)>. DOI: 10.1002/1521-379X(200104)53:3/4<121::AID-STAR121>3.0.CO;2-Q.

BELY, M., RINALDI, A., DUBOURDIEU, D. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation. *Journal of Biosciences* [online]. 2003, vol. 96 [cit. 2010-02-20], s. 507-512.

BLANCHE, Stéphanie; SUN, Xiuzhi. Physical characterization of starch extrudates as a function of melting transitions and extrusion conditions. *Advances in Polymer Technology*. 2004, vol. 23, issue 4, s. 277-290. DOI: 10.1002/adv.20017.

BOECKELER, Benjamin Clark, et al. Fermenting Method. 1948 US 2440925.

BOGRACHEVA, T. Y., et al. Structural studies of starches with different water contents. *Biopolymers*. 2002, vol. 64, no. 5, s. 268-281. PMID: 12115134.

BOTHAST, R. J., SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, vol. 67, no. 1 [cit. 2010-02-17], s. 19-25. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/q5505wl6x3m4/?p=ee9e483aa58b4c04b04fada49358e620π=114>>. ISSN 1432-0614.

CARDONA, Carlos A.; SÁNCHEZ, Óscar J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. September 2007, vol. 92, issue 12, s. 2415-2457. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V24-4N5CSJF-2/2/fee0404acabc1a4e8b3470218fa006e2>>. ISSN 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.002.

CASEY, G.P., INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 1986, vol. 13 [cit. 2010-02-21], s. 219-280.

CATES, Edward S., et al. Process for Starch Liquefaction and Fermentation. 2010. US7727726B2.

COLONNA, P.; LELOUP, V.; BULEON, A. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*. 1992, vol. 46, suppl. 2, s. 17-32

CRABB, W. Douglas; MITCHINSON, Colin. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Trends in Biotechnology*. September 1997, vol. 15, issue 9, s. 349-352. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TCW-3RH7GS5-7/2/702d1ef24b22cdd0b844756d0e0682e5>>. ISSN 0167-7799, DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01082-2.

COPELAND, Les, et al. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids*. August 2009, vol. 23, issue 6, s. 1527-1534. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VP9-4TNWH26-1/2/0a73d93127c2303d2eb090acf3fa3f0f>>. ISSN 0268-005X, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.016.

COT, Marlène, et al. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Research*. January 2007, vol. 7, issue 1, s. 22-32. Dostupný také z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1567-1364.2006.00152.x/pdf>>. ISSN 1567-1364, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2006.00152.x.

DA SILVA, F. L. H., et al. Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. *Journal of Chemical Technology*. 1999, vol. 74, issue 2, s. 176–182. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4660(199902)74:2<176::AID-JCTB995>3.0.CO;2-C.

DEBET, Martine R.; GIDLEY, Michael J. Three classes of starch granule swelling: Influence of surface proteins and lipids. *Carbohydrate Polymers*. 30 May 2006, vol. 64, issue 3, s. 452-465. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-4J5563R-4/2/1d6e70690af3d135c4df6b4bc19126fc>>. ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.12.011.

DEBET, Martine R.; GIDLEY, Michael J. Why Do Gelatinized Starch Granules Not Dissolve Completely? Roles for Amylose, Protein, and Lipid in Granule “Ghost” Integrity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, vol. 55, no. 12, s. 4752–4760. Dostupný také z WWW: <<http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/jf070004o>>. DOI: 10.1021/jf070004o.

DE CORDT, S., et al. The influence of polyalcohols and carbohydrates on the thermostability of  $\alpha$ -amylase. *Biotechnology and Bioengineering*. 20 January 1994, vol. 43, issue 2, s. 107-114. DOI: 10.1002/bit.260430202.

DE MOT, René; VERACHTERT, Hubert. Purification and Characterization of Extracellular Amylolytic Enzymes from the Yeast *Filobasidium capsuligenum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985, vol. 50, no. 6, s. 1474-1482. Dostupný také z WWW: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/50/6/1474?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORM AT=1&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&firstpage=1474&resourcetype=HWCIT>>.

DETTORI-CAMPUS, B. G.; PRIEST, F. G.; STARK, J. R. Hydrolysis of starch granules by the amylase from *Bacillus stearothermophilus* NCA 26. *Process Biochemistry*. January 1992, vol. 27, issue 1, s. 17-21. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-43MF3H1-2M/2/7a6f38d2c5378f19295d3dfdf0cb0055>>. ISSN 1359-5113, DOI: 10.1016/0032-9592(92)80004-M.

DOBREVA, E.; IVANOVA, V.; EMANUILOVA, E. Effect of temperature on some characteristics of the thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus licheniformis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994, vol. 10, no. 5, s. 547-550. ISSN 0959-3993, Doi: 10.1007/BF00367664.

- DOHÁNYOS, Michal. Jak zvýšit efektivnost bioplynové stanice?. Alternativní energie. 2008, roč. 6. Dostupný z WWW: <<http://www.tzb-info.cz/t.py?i=5550&t=2>>.
- DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Ethanol Production during Batch Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: Changes in Glycolytic Enzymes and Internal pH. *Applied and Environmental Microbiology*. June 1987, vol. 53, no. 6, s. 1286-1291.
- DOUBLIER, J. L.; PATON, D.; LLAMAS, G. A rheological investigation of oat starch pastes. *Cereal Chemistry*. 1 October 1987, vol. 64, no. 1, s. 21-26. ISSN 0009-0352.
- DRAGONE, Giuliano, et al. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. November 2004, vol. 37, issue 7, s. 797-802. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WMV-4C8P7M8-1/2/14e430ae149c46f4c625977c02dbf643>>. ISSN 0023-6438, DOI: 10.1016/j.lwt.2004.03.006.
- EHNSTROM, Lars Karl Johan. Continuous Fermentation Process. 1976. US3940492.
- EVERS, A. D.; MCDERMOTT, E. E. Scanning Electron Microscopy of Wheat Starch II. Structure of Granules Modified by Alpha-Amylolysis – Preliminary report. *Starch*. 1970, vol. 22, issue 1, s. 23–26. DOI: 10.1002/star.19700220107.
- FETZER, Walter R., et al. Starch Hydrolysis. 1940. US2210659.
- FORRESTER, Kimberly J., et al. Yeast Strains for Improved Ethanol Production US 2011/0033907 A1.
- FRIGARD, T.; ANDERSSON, R.; AMAN, P. Gradual enzymatic modification of barley and potato amylopectin. *Carbohydrate Polymers*. 1 February 2002, vol. 47, issue 2, s. 169-179. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-44HT1SN-B/2/c940e35434eb83d3c7b4c089e18b4d30>>. ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/S0144-8617(01)00161-8.
- GÉRARD, Catherine, et al. Amylolysis of maize mutant starches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. October 2001, vol. 81, issue 13, s. 1281–1287. Dostupný také z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.929/pdf>>. ISSN 1097-0010, DOI: 10.1002/jsfa.929.
- GIBREEL, Amara, et al. Fermentation of Barley by Using *Saccharomyces cerevisiae*: Examination of Barley as a Feedstock for Bioethanol Production and Value-Added Products. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. Mar. 2009, vol. 75, no. 5, s. 1363-1372. doi:10.1128/AEM.01512-08.
- GRYTA, Marek. The fermentation process integrated with membrane distillation. *Separation and Purification Technology*. 1 June 2001, vol. 24, issues 1-2, s. 283-296. ISSN 1383-5866.

GUGLIELMINETTI, Lorenzo, et al. Amylolytic Activities in Cereal Seeds under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Plant Physiology*. 1995, vol. 109, no. 3, s. 1069-1076. Dostupný také z WWW: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/109/3/1069.pdf>>.

HAN, Xian-Zhong, et al. Detection of Proteins in Starch Granule Channels. *Cereal Chemistry*. August 2005, vol. 82, no. 4, s. 351-355. Dostupný také z WWW: <<http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/pdf/10.1094/CC-82-0351>>. DOI:10.1094/CC-82-0351.

HILL, G. A.; MACDONALD, D. G.; LANG, X.  $\alpha$ -Amylase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis. *Biotechnology Letters*. 1997, vol. 19, no. 11, s. 1139-1141. Dostupný také z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/n17r1h56h2681251/>>. DOI: 10.1023/A:1018457030575.

HOOVER, R.; VASANTHAN, T. Studies on isolation and characterization of starch from oat (*Avena nuda*) grains. *Carbohydrate Polymers*. 1992, vol. 19, issue 4, s. 285-297. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-48HXRY-9S/2/f9ded58e0b20de28635aba33b64d6218>>. ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/0144-8617(92)90082-2.

HUBER, K. C.; BEMILLER, J. N. Channels of maize and sorghum starch granules. *Carbohydrate Polymers*. March 2000, vol. 41, issue 3, s. 269-276. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFD-3Y0J98K-6/2/53b24787688fcd6d00830bce797f6ba>>. ISSN 0144-8617, DOI: 10.1016/S0144-8617(99)00145-9.

CHIOTELLI, Eleni; LE MESTE, Martine. Effect of Small and Large Wheat Starch Granules on Thermomechanical Behavior of Starch. *Cereal Chemistry*. 2002, vol. 79, no. 2, s. 286-293. Dostupný také z WWW: <<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/articles/2002/0211-01R.pdf>>.

INGRAHAM, Robert. Method to Facilitate Recycling of Biomass Degrading Enzymes. 2011. US 2011/0020894 A1.

JOHNSON, L. A.; MAY, J. B. *Corn: Chemistry and Technology*. 2nd ed. St. Paul : American Assosiation of Cereal Chemistry, 2003. Wet milling: The basis for corn biorefineries, s. 449-494. ISBN 1891127330.

JONES, A.M., INGLEDEW, W.M. Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolyzate. *Bioresource Technology* [online]. 1994a, vol. 50 [cit. 2010-02-17], s. 97-101.

JONES, A.M., INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production : optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1994b, vol. 60, no. 3 [cit. 2010-02-17], s. 1048-1051.

KHAW, Teik Seong, et al. Enhancement of Ethanol Production by Promoting Surface Contact between Starch Granules and Arming Yeast in Direct Ethanol Fermentation. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*. 2007, vol. 103, no. 1, s. 95-97. DOI: 10.1263/jbb.103.95.

KIM, Hyun-Seok; HUBER, Kerry C. Channels within soft wheat starch A- and B-type granules. *Journal of Cereal Science*. July 2008, vol. 48, issue 1, s. 159-172. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHK-4PN05NN-1/2/a04082d269f479414f61a3f86d3668e0>>. ISSN 0733-5210, DOI: 10.1016/j.jcs.2007.09.002.

KINDRED, Daniel R., et al. Effects of variety and fertiliser nitrogen on alcohol yield, grain yield, starch and protein content, and protein composition of winter wheat. *Journal of Cereal Science*. July 2008, vol. 48, issue 1, s. 46-57. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WHK-4PC8RGS-1/2/d8093e30a2175d5545eb2ae87f8faed0>>. ISSN 0733-5210, DOI: 10.1016/j.jcs.2007.07.010.

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an [alpha]-amylase from *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry*. 30 July 2004, vo. 39, issue 11, s. 1745-1749. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4B4HK5X-1/2/ec7b63b6277b912e81590dc969c5ff09>>. ISSN 1359-5113, DOI: 10.1016/j.procbio.2003.07.003.

KREBS, Josef, et al. Starch Conversion. 1965. US3185633.

LABELLE, P., et al. Comparatiive study of wheat flour saccharification and ethanol production with two glucoamylase preparations. *Industrial Crops and Products*. August 1997, vol. 6, issues 3-4, s. 291-295. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T77-3WDCG5V-G/2/7a043a4260ade77b9d3018abb2f7cfd8>>. ISSN 0926-6690, DOI: 10.1016/S0926-6690(97)00020-4.

LALUCE, Cecília, et al. New Amyolytic Yeast Strains for Starch and Dextrin Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. October 1988, vol. 54, no. 10, s. 2447-2451. Dostupný také z WWW: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/54/10/2447?maxtoshow=&hits=10&RESULTFORM AT=1&andorexacttitle=and&andorexacttitleabs=and&andorexactfulltext=and&searchid=1&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&firstpage=2447&resourcetype=HWCIT>>.

LANTERO, Oreste J., et al. Process for Conversion of Granular Starch to Ethanol. US2007/0281344A1.

LEE, J. H., et al. Nonthermal starch hydrolysis using ultra high pressure: I. Effects of acids and starch concentrations. *LWT - Food Science and Technology* [online]. December 2006, vol.39, issue 10, [cit. 2010-03-25]. s. 1125-1132. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WMV-4GX1J7C-3/2/7a71b38d696db4697e85eefe6a5d83c8>>. ISSN 0023-6438, eclanek DOI: 10.1016/j.lwt.2005.07.006.



LEWIS, Stephen M., et al. Continuous Proces for Producing Ethanol Using Raw Starch . US2005/0239181A1.

LEWIS, Stephen M., et al. Method for Producing Ethanol Using Raw Starch. US2010/0041116A1.

LI, J. H., et al. Starch from Hull-less Barley: Ultrastructure and Distribution of Granule-Bound Proteins. *Cereal Chemistry*. 2003, vo. 80, issue 5, s. 524-532.

LI, J. H., et al. Starch from hull-less barley: I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. *Food Chemistry*. September 2001, vol. 74, issue 4, s. 395-405. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-43T7THV-1/2/e07f29fb046865a18e50a26d07700fdc>>. ISSN 0308-8146, DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00246-1.

LI, J. H., et al. Starch from hull-less barley: V. In-vitro susceptibility of waxy, normal, and high-amylose starches towards hydrolysis by alpha-amylases and amyloglucosidase. *Food Chemistry*. March 2004, vol. 84, issue 4, s. 621-632. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T6R-49N982F-8/2/3a5ce48fdf8ff595578cabb733f9f332>>. ISSN 0308-8146, DOI: 10.1016/S0308-8146(03)00287-5.

LIAO, Bo, et al. Amyolytic activity and fermentative ability of *Saccharomyces cerevisiae* strains that express barley [alpha]-amylase. *Biochemical Engineering Journal*. 15 December 2010, vol. 53, issue 1, s. 63-70. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5N-51336F7-1/2/575e5a032f1ae68dcd375c7a76410ef0>>. ISSN 1369-703X, DOI: 10.1016/j.bej.2010.09.009.

LIM, Leng Hong; MACDONALD, Douglas G.; HILL, Gordon A. Hydrolysis of starch particles using immobilized barley  $\alpha$ -amylase. *Biochemical Engineering Journal*. January 2003, vol. 13, issue 1, s. 53-62. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5N-46RD5KP-1/2/6a472734947664f883b5697b43e02f25>>. ISSN 1369-703X, DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00101-8.

LIN, P. Y.; CZUCHAJOWSKA, Z. Role of Phosphorus in Viscosity, Gelatinization, and Retrogradation of Starch. *Cereal Chemistry*. 1998, vol. 75, no. 5, s. 705-709.

MACGREGOR, A. W.; BALLANCE, D. L. Hydrolysis of Large and Small Starch Granules from Normal and Waxy Barley Cultivars by Alpha-Amylases from Barley Malt. *Cereal Chemistry*. 1980, vol. 57, no. 6, s. 397-402. Dostupný také z WWW: <[http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/backissues/1980/Chem57\\_397.pdf](http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/backissues/1980/Chem57_397.pdf)>.

MAROUŠEK, Josef. *Srovnání hydrolýzy vybraných druhů fytomasy*. České Budějovice, 2009. 99 s. Dizertační práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

- MENDES-FERREIRA, A., MENDES-FAIA, A., LEO, C. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2004, vol. 97 [cit. 2010-02-20], s. 540-545.
- MONTESINOS, Thierry; NAVARRO, Jean-Marie. Production of alcohol from raw wheat our by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, vol. 27, issue 6, s. 362-370. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-40X8HN3-3/2/aab554d8f92307f93ebbf9d911032dd2>>. ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00211-8.
- MORI, Yutaka; INABA, Toshiharu. Ethanol production from starch in a pervaporation membrane bioreactor using *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 20 October 1990, vol. 36, issue 8, s. 849–853. DOI: 10.1002/bit.260360815.
- MORISON, W. R. Starch Lipids: A Reappraisal. *Starch*. 1981, vol. 33, issue 12, s. 408-410. DOI: 10.1002/star.19810331203.
- MULLER, Werner C., et al. Process for the Hydrolysis of Starch and the Continuous Fermentation of the Sugars Obtained therefrom to Provide Ethanol. 1981. US4243750.
- NAGODAWITHANA, Tilak W.; STEINKRAUS, Keith H. Influence of the Rate of Ethanol Production and Accumulation on the Viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "Rapid Fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*. Feb. 1976, vol. 31, no. 2, s. 158-162.
- NEVES, Marcos Antonio, et al. Production of Alcohol by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Low-grade Wheat Flour. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. May 2006, vol. 49, no. 3, s. 481-490. ISSN 1516-8913.
- NEVES, M. J.; FRANÇOIS, J. On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*. 1992, vol. 288, no. 3, s. 859–864. PMID: 1335235.
- NEVOIGT, Elke. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. September 2008, vol. 72, no. 3, s. 379-412. doi:10.1128/MMBR.00025-07.
- NICHOLS, Nancy N., et al. *Alcoholic Fuels*. Saint Louis : CRC Press, 2006. The corn ethanol industry, s. 59-75. ISBN 978-0-8493-3944-8.
- NIERLE, W., et al. Lipids and Rheological Properties of Starch. Part II: The Effect of Granule Surface Material on Viscosity of Wheat Starch. *Starch - Stärke*. 1990, vol. 42, issue 12, s. 471-475. DOI: 10.1002/star.19900421206.

NIGAM, Poonam; SINGH, Dalel. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*. September 1995, vol. 17, issue 9, s. 770-778. Dostupný také z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-42JYXGR-1/2/2e53e78e7a0a75ee0f9fc9d6a5aeb4d0>>. ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/0141-0229(94)00003-A.

NISSEN, T. L., et al. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants impaired in glycerol synthesis. *Yeast*. March 2000, vol. 16, no. 5, s. 463-474.

NIVEN, Robert K. Ethanol in gasoline : environmental impacts and sustainability review article. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2005, vol. 9, issue 6, [cit. 2011-01-24]. Dostupný z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6VMY-4D4XN9N-1/2/a9dc53263c36b667d1902ddd267b718>>.

NOMURA, Mikihiro; BIN, Tang; NAKAO, Sin-ichi. Selective ethanol extraction from fermentation broth using a silicalite membrane. *Separation and Purification Technology*. 1 April 2002, vol. 27, issue 1, s. 59-66. Dostupný také z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THJ-45HD7F5-7/2/6fab7311621d5ccbe1fcb4a681914159>>. ISSN 1383-5866, DOI: 10.1016/S1383-5866(01)00195-2.

NOVO, M.T., et al. Effect of nitrogen limitation and surplus upon trehalose metabolism in wine yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, vol. 66 [cit. 2010-02-20], s. 560-566. Dostupný z WWW: <

<http://www.springerlink.com/content/caen9txt8dmc3r8c>>.

OTTO, Eric, et al. Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). US2005/0026261A1.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. March 2003, vol. 13, issues 2-3, s. 81-84. Dostupný také z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V5N-4712STR-1/2/ddb475131740cb5c6e548701b1580ad0>>. ISSN 1369-703X, DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R.; MITCHELL, David. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. July 2000, vol. 35, issue 10, s. 1153-1169. Dostupný také z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-40VT1WB-B/2/9f0f221b0947e8b87b47d8a56d33dc70>>. ISSN 1359-5113, DOI: 10.1016/S0032-9592(00)00152-7.

PIPER, P. W., et al. Induction of major heat shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology*. 1994, vol. 140, 111, s. 3031-3038.

PLANCHOT, Veronique; COLONNA, Paul; BULEON, Alain. Enzymatic hydrolysis of [alpha]-glucan crystallites. *Carbohydrate Research*. March 1997, vol. 298, issue 4, s. 319-326. Dostupný také z WWW:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TFF-3S9MB24-9/2/f033eff98265c7b8b112936f71f6e1c9>>. ISSN 0008-6215, DOI: 10.1016/S0008-6215(96)00317-5.

RAEKER, M. Ö., et al. Granule size distribution and chemical composition of starches from 12 soft wheat cultivars. *Cereal Chemistry*. 1998, vol. 75, no. 5, s. 721-728. ISSN 0009-0352.

REDDY, L. V. A.; REDDY, O. V. S.; BASAPPA, S. C. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Netherlands : Springer, 2009. Potentiality of Yeasts in the Direct Conversion of Starchy Materials to Ethanol and Its Relevance in the New Millennium, s. 515-549. Dostupné z WWW: <[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4\\_24](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_24)>. ISBN 978-1-4020-8292-4, DOI: 10.1007/978-1-4020-8292-4\_24.

RICARD, Eloi, GUINOT, Henri Martin. Direct Rectifying Process for the Production of Pure Alcohol. US1912010.

RICHARDSON, Toby H., et al. A Novel, High Performance Enzyme for Starch Liquefaction : DISCOVERY AND OPTIMIZATION OF A LOW pH, THERMOSTABLE  $\alpha$ -AMYLASE. *The Journal of Biological Chemistry*. May 2002, vol. 277, no. 29, s. 26501–26507. Dostupný také z WWW: <<http://www.jbc.org/content/277/29/26501.full.pdf+html>>. DOI 10.1074/jbc.M203183200.

ROBERTSON, George H., et al. Native or Raw Starch Digestion: A Key Step in Energy Efficient Biorefining of Grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, no. 2, s. 353-365.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *Journal of Applied Microbiology*. 1993, vol. 74, 11, s. 110S-118S. PMID: 8349530.

SÁNCHEZ, Oscar J.; CARDONA, Carlos A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. September 2008, vol. 99, issue 13, s. 5270-5295. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6V24-4RFD3MX-2/2/64eae255523cc066f4ee0af82b48109d>>. ISSN 0960-8524, DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.013.

SARIKAYA, Elif, et al. Comparison of degradation abilities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylases on raw. *Process Biochemistry*. February 2000, vol. 35, issue 7, s. 711-715. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-3YC063V-B/2/30bfbb6664a3481cc61f42adc27eae92>>. ISSN 1359-5113, DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00133-8.

SASAKI, Tomoko; YASUI, Takeshi; MATSUKI, Junko. Effect of Amylose Content on Gelatinization, Retrogradation, and Pasting Properties of Starches from Waxy and Nonwaxy Wheat and Their F1 Seeds. *Cereal Chemistry*. 2000, vol. 77, no. 1, s. 58-63. Dostupný také z WWW:  
<<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/articles/2000/1206-05R.pdf>>.

SCHENBERG, Ana Clara; PINTO DA COSTA, Sergio Olavo; OLIVER, Stephen G. . Molecular and Genetic Approaches to Alcohol Biotechnology in Brazil . *Critical Reviews in Biotechnology*. January 1987, vol. 6, issue 4, s. 323-355. ISSN 0738-8551.

SEADER, Junior D., Continuous Distillation Apparatus and Method. 1980. US4234391.

SELMİ, B., et al. Amyloglucosidase Hydrolysis of High-Pressure and Thermally Gelatinized Corn and Wheat Starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2000, 48, 7, [cit. 2010-03-24]. Dostupný z WWW:  
<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf991332u>>.

SODHI, Harmeet K., et al. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. *Process Biochemistry*. February 2005, vol. 40, issue 2, s. 525-534. Dostupný také z WWW:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6THB-4D7CDSV-1/2/46771897e0469c1c278590cd2cdeeb7b>>. ISSN 1359-5113, doi:10.1016/j.procbio.2003.10.008.

SOWA, S. M. Hartunian; WHITE, P. J. Characterization of Starch Isolated from Oat Groats with Different Amounts of Lipid. *Cereal Chemistry*. 1992, vol. 69, no. 5, s. 521-527. Dostupný také z WWW:  
<[http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/backissues/1992/69\\_521.pdf](http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/backissues/1992/69_521.pdf)>.

SREE, N. K., et al. High alcohol production by solid substrate fermentation from starchy substrates using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 1999, vol. 20, no. 6, s. 561-563. Dostupný také z WWW:  
<<http://www.springerlink.com/content/ne32haekfe91x8mj/fulltext.pdf>>. ISSN 1615-7591, DOI: 10.1007/PL00009060.

STEPHENSON, Alan William. Starch Hydrolysis. 1971. US3607395.

SURESH, K.; KIRANSREE, N.; VENKATESWAR RAO, L. Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. *Bioprocess Engineering*. 1999, 21, s. 165-168.

ŠNOBL, Josef, et al. *Základy rostlinné produkce*. Praha : Power Print, 2005. 172 s. ISBN 80-213-1340-4.

TANG, H., et al. Some Physicochemical Properties of Small-, Medium-, and Large-Granule Starches in Fractions of Waxy Barley Grain. *Cereal Chemistry*. 2000, vol. 77, no. 1, s. 27-31. Dostupný také z WWW: <<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/articles/2000/1203-06R.pdf>>. ISSN 0009-0352, doi:10.1094/CCHEM.2000.77.1.27.

TAYLOR, F., et al. Kinetics of continuous fermentation and stripping of ethanol. *Biotechnology Letters*. 1998, vol. 20, issue 1, s. 67-72. ISSN 0141-5492, Doi: 10.1023/A:1005339415979.

TESTER, Richard F.; KARKALAS, John. Swelling and Gelatinization of Oat Starches. *Cereal Chemistry*. 1996, vol. 73, no. 2, s. 271-277.

THATIPAMALA, R., ROHANI, S., HILL, G.A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. 1992, vol. 40 [cit. 2010-02-20], s. 289-297.

THOMAS, K.C., INGLEDEW, W.M. Fuel alcohol production: Effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1990, vol. 56 [cit. 2010-02-20], s. 2046-2050.

VAN DER MAAREL, Marc J. E. C., et al. Properties and applications of starch-converting enzymes of the [alpha]-amylase family. *Journal of Biotechnology*. March 2002, vol. 94, issue 2, s. 137-155. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T3C-44W8KKC-1/2/065b04e02e729125c9f9e462d3fa29a4>>. ISSN 0168-1656, DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00407-2.

VASANTHAN, T; BHATTY, R. S. Physicochemical Properties of Small- and Large-Granule Starches of Waxy, Regular, and High-Amylose Barleys. *Cereal Chemistry*. 1996, vol. 73, no. 2, s. 199-207.

VIDAL, B. C., et al. Determining corn germ and pericarp residual starch by acid hydrolysis. *Cereal Chemistry*. 2009, vol. 86, no. 2, s. 133-135. ISSN 0009-0352.

Wageningen UR. *Wageningen UR - Wageningen University - Bioprocess Engineering* [online]. c2011 [cit. 2011-04-02]. Enzymatic starch hydrolysis: background. Dostupné z WWW: <<http://www.bpe.wur.nl/UK/Research/Dissertations/Enzymatic+starch+hydrolysis/Enzymatic+starch+hydrolysis+background/>>.

WALON, Raoul G. P. Starch Hydrolysis at High Dry Substance. 1980. US4235965.

WANG, S., et al. Optimization of Fermentation Temperature and Mash Specific Gravity for Fuel Alcohol Production. *Cereal Chemistry*. 1999, vol. 76, no. 1, s. 82-86. Dostupný také z WWW: <<http://www.aaccnet.org/cerealchemistry/articles/1999/0106-03R.pdf>>.

WANG, R., et al. Optimization of innovative ethanol production from wheat by response surface methodology. *Process Safety and Environmental Protection* [online]. 2007, vol. 85 [cit. 2010-02-18], s. 404-412. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B8JGG-4SB7N5Y-C/2/df1e5dcbfe60e782ea89ca335069892b>>. ISSN 0957-5820.

WANG, L. Z.; WHITE, P. J. Structure and Physiochemical Properties of Starches from Oat with Different Lipid Contents. *Cereal Chemistry*. 1994, vol. 71, no. 5, s. 443-450. Dostupný také z WWW: <structure and physiochemical properties of starches from oat with different lipid contents>.

WONG, D. W. S., et al. Synergistic Action of Recombinant  $\alpha$ -Amylase and Glucoamylase on the Hydrolysis of Starch Granules. *The Protein Journal*. April 2007, vol. 26, no. 3, s. 159-164. Dostupný také z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/5m3761447n324750/fulltext.pdf>>. DOI: 10.1007/s10930-006-9057-9.

YADAV, Jay Kant; PRAKASH, V. Thermal stability of  $\alpha$ -amylase in aqueous cosolvent systems. *Journal of Biosciences*. 2009, vol. 34, no. 3, s. 377-387.

YANKOV, D., et al. Study of optimum conditions and kinetics of starch hydrolysis by means of thermostable [ $\alpha$ ]-amylase. *Enzyme and Microbial Technology*. November 1986, vol. 8, issue 11, s. 665-667. Dostupný také z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-47GMHJ8-HH/2/cae7b72759499ac12336cec09f90ecbe>>. ISSN 0141-0229, DOI: 10.1016/0141-0229(86)90062-1.

YOSHIZUMI, Hajime, et al. Process for Producing Alcohol by Fermentation without Cooking. US1985/4514496.

YOU, Kyung Man; ROSENFELD, Claire-Lise; KNIPPLE, Douglas C. Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Dependent on Cellular Oleic Acid Content. *Applied and Environmental Microbiology*. March 2003, vol. 69, no. 3, s. 1499-1503. DOI: 10.1128/AEM.69.3.1499-1503.2003.

ZHOU, Meixue, et al. Oat Lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999-02-01, vol. 76, issue 2, s. 159-169. ISSN 0003-021X.

ŽÁČKOVÁ, J.; KVASNIČKA, F. A contribution to the raw wheat starch hydrolysis. *Potravinarske Vedy - UZPI*. 1994, vol. 12, no. 6, s. 445-455. ISSN 0862-8653.