



*mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii*

*CZ.1.07/2.2.00/28.0171*

# Biotechnologie

## 3. Výroba lihu, lihovin a biomasy

Marek Petřivalský

Katedra biochemie PŘF UP



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



*Výroba kvasného lihu*

*Výroba biolíhu*

*Výroba lihovin*

# Výroba lihu (ethanolu)

**Syntetický líh** = chemická výroba (např. hydratace ethylenu)

**Kvasný líh** = fermentací (pro potravinářské, chemické, farmaceutické ...)

**Technologie destilace** = izolace a zakoncentrování ethanolu

**Číňané** cca 2000 let př.n.l.

**Egypt** – alchymisté

**Evropa** – cca 11.st přes Španělsko: „*agua vitae*“  
velký technický rozvoj s ***érou alchymie***

**Čechy:** první „***vinopalna***“ za Václav IV v Kutné Hoře

\* 16. st první lihovary – žito

\* 18. st. – používání brambor

\* 19. st. – zpracování melasy v cukrovarech

1874 - celkem **284** zemědělských lihovarů

**Dnes:** 4 průmyslové lihovary (Kralupy, Kolín, Chrudim, Kojetín)  
a cca 40 zemědělských lihovarů

# Suroviny pro výrobu lihu

## A) Suroviny obsahující jednoduché sacharidy

- \* **Melasa** – sacharosa (v ČR pouze řepná x třtinová)  
dostatek dusíkatých látek (Asp, Glu) x nutnost **doplnění fosforu**
- \* **Meziprodukty výroby cukru** – šťávy a sirupy
- \* **Syrovátka** – laktosa 4-6%
- \* **Ovoce** – pro líh vyjímečně (datle) x typické pro destiláty
- \* jiné: palmové šťávy, sukulenty a kaktusy

## B) Škrobnaté suroviny

- \* **Brambory**: 18% škrobu x problémy při skladování
- \* **Pšenice**: 65-71% škrobu
- \* **Žito** (Tritikale)
- \* **Kukuřice**: nejvýnosnější plodina, 5% podíl tuku = výhodné pro kvašení  
x negativní dopady na kvalitu půdy, zvýšení eroze
- \* Další: rýže, kasava, odpady ze zpracování brambor

## C) Suroviny obsahující jiné polysacharidy

- \* **Topinambury:** 16% inulin, D-fruktosa, levulin
- \* **Ligninocelulosevý materiál:** dřevo, sláma  
nutná předúprava = štěpení na zkvasitelné substráty  
hydrolýza celulosy na glukosu apod.



# Výroba líhu z melasy

- 1) **Příprava zápary:** naředění melasy vodou, doplnění živin
- 2) **Příprava kvasinek:** laboratorní propagace kultury
- 3) **Kvašení:** za anaerobních podmínek, pH 4-4,5, teplota do 32°C



## Způsoby kvašení:

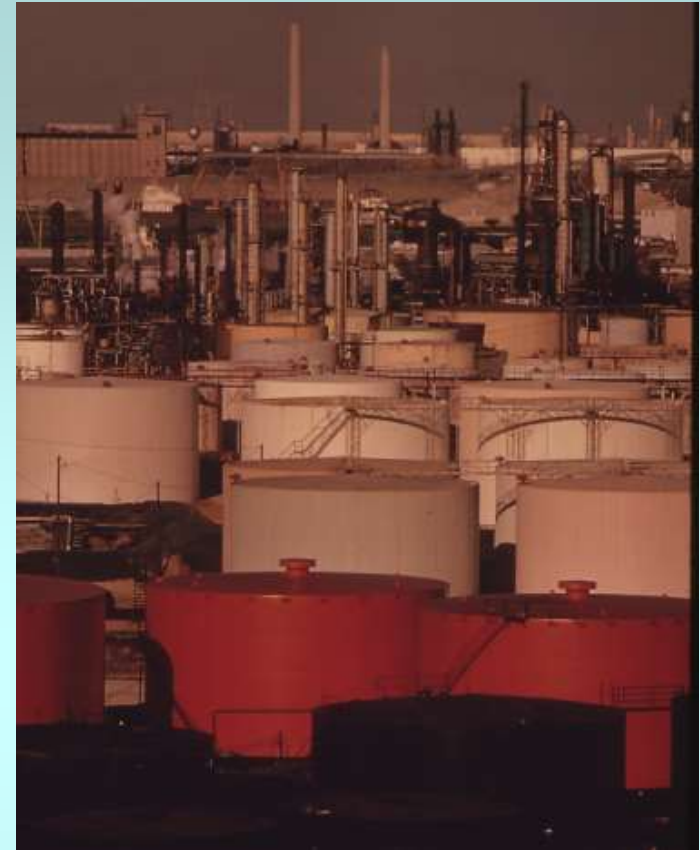
- a) **Klasický vsádkový** (batch): jednoduchý x málo účinný
  - b) **Přítokový** (fed-batch) - limitován výslednou koncentrací etanolu
  - c) **S recyklací kvasinek** – nejrozšířenější  
droždářenské odstředivky  
membránové mikrofiltry
  - d) **Kontinuální** – průběžné odstraňování EtOH x nebezpečí kontaminace
- 4) **Destilace, rektifikace a rafinace:** „opakovaná rovnovážná destilace“  
**záparová kolona** – oddělení surového líhu od výpalků  
**rektifikační kolona** – naředění líhu na cca 30%  
odstranění přiboudlin, úkapu a dokapu



# Co dokáží kvasinky ...

## Molasses Disaster in Boston

*January 15, 1919*



# Výroba líhu z obilí

## 1) Příprava zápary: *ztekucení a zcukření škrobu*

**tlakový způsob** = paření zrn při 120°C a 0,2-0,5 MPa

po zchlazení přidavek „ztekucujících“ enzymů - amylas

**beztlakový způsob** = mletí za sucha nebo mokra, bobtnání

vyhřátí na 65 nebo 90°C – temostabilní  $\alpha$ -amylasy

„*zcukření*“ – směs enzymů (amylasy, xylanasy, glukanasy, atd.)

Novo Nordisk (Dánsko)

## 2) Kvašení: po ochlazení na zákvasnou teplotu

**čisté lihovarské kvasinky** – adaptované na škrobnaté zápary

dobu 48-72 hod při teplotě do 32°C

## 3) Destilace: kontinuálně pracující záparová kolona

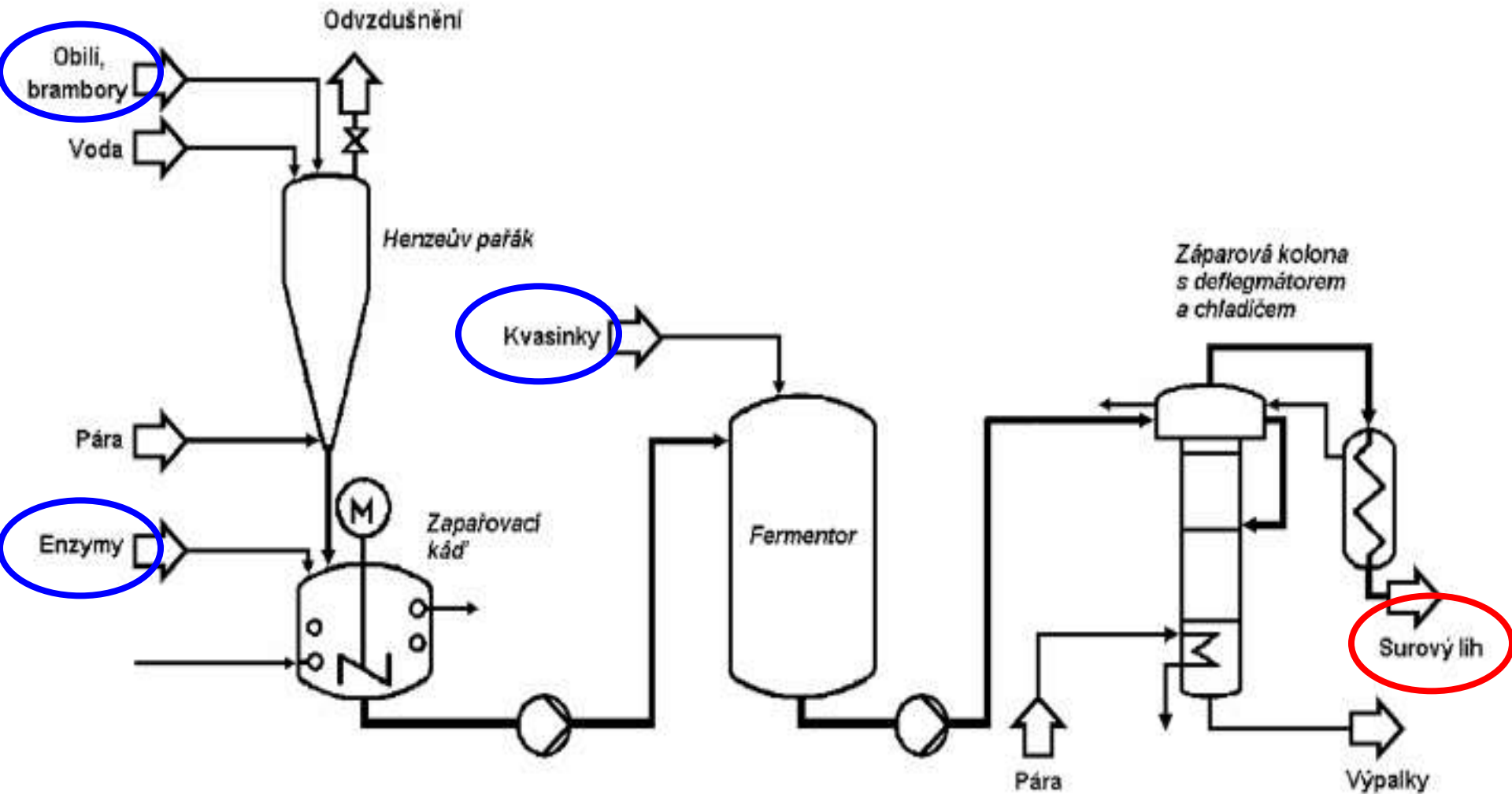
oddělení surového lihu od řídkých obilných výpalků

## 4) Rafinace: většinou v průmyslových lihovarech



# Výroba lihu z obilí II

Schema lihovaru využívající tlakový způsob zápary



# Produkty lihovaru

*Příklad:* **Lihovar Kojetín** („největší a nejmodernější“)

**Lív kvasný rafinovaný jemný 96 %**

Lív kvasný rafinovaný velejemný 96,2 %

Lív kvasný rerafinovaný obilný 96,3 %

Lív kvasný rafinovaný technický 95,7 %

**Lív kvasný bezvodý 99,8 %**

Lív kvasný bezvodý - medicínální "C" 99,8 %

Lív pro UV - spektrofotometrii 99,9 %

**Lív zvláště denaturovaný – celkem 23 druhů**

**Úkapy dokapy 94 %**

**Úkapy dokapy zvláště denaturované**

**Přiboudlina**

**Melasové výpalky**

## Vedlejší produkty při výrobě lihu

**Úkap a dokap** – použití jako technický líc

**Přiboudlina** – směs C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub> alkoholů

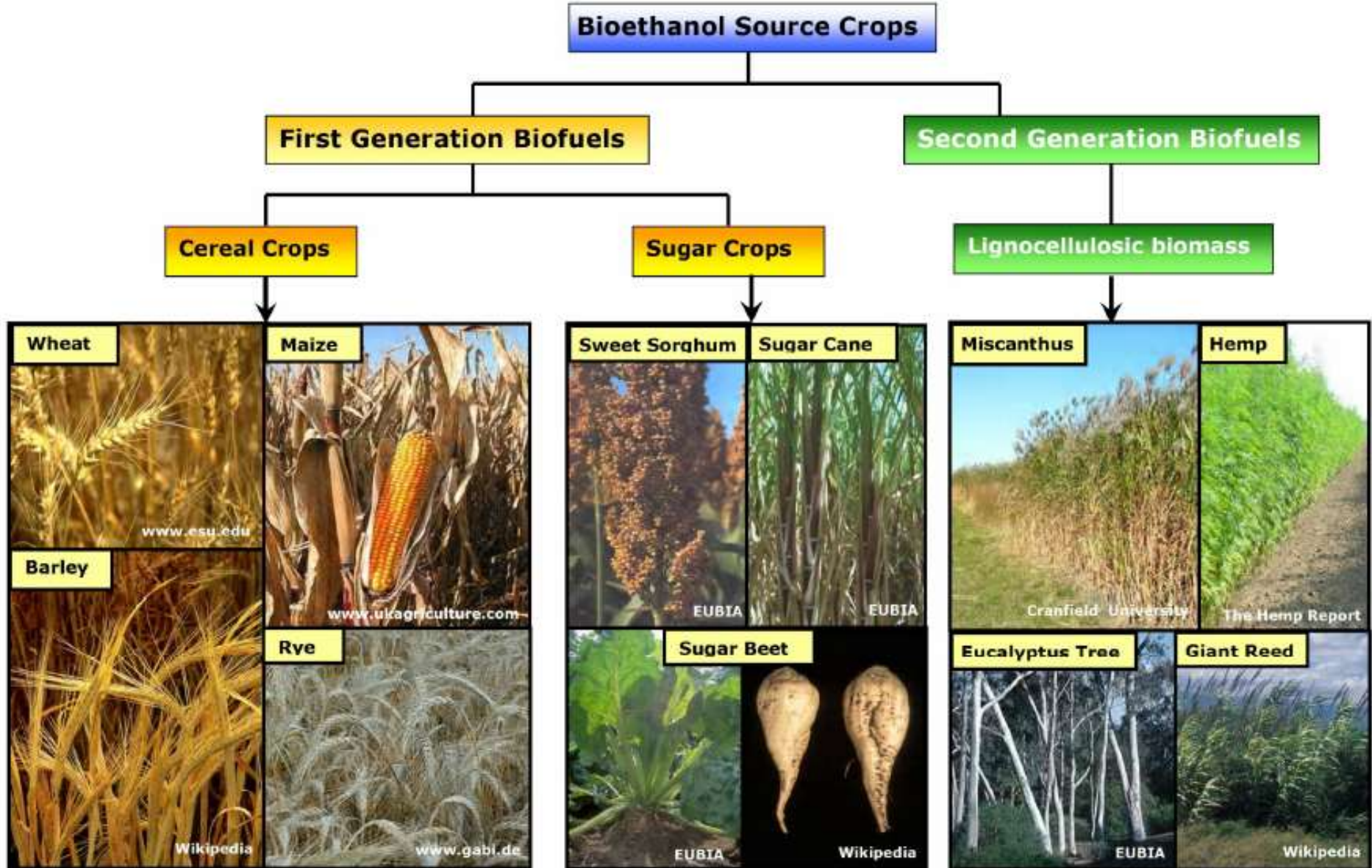
(hlavní složka 2-methyl-1-butanol)

**Lihovarské výpalky** = **hlavní odpad lihovaru**

na 1m<sup>3</sup> lihu cca 10-14 m<sup>3</sup> řídkých výpalků

- \* výživné krmivo – po usušení až 30% bílkovin
- \* hnojivo
- \* substrát pro výrobu **bioplynu**

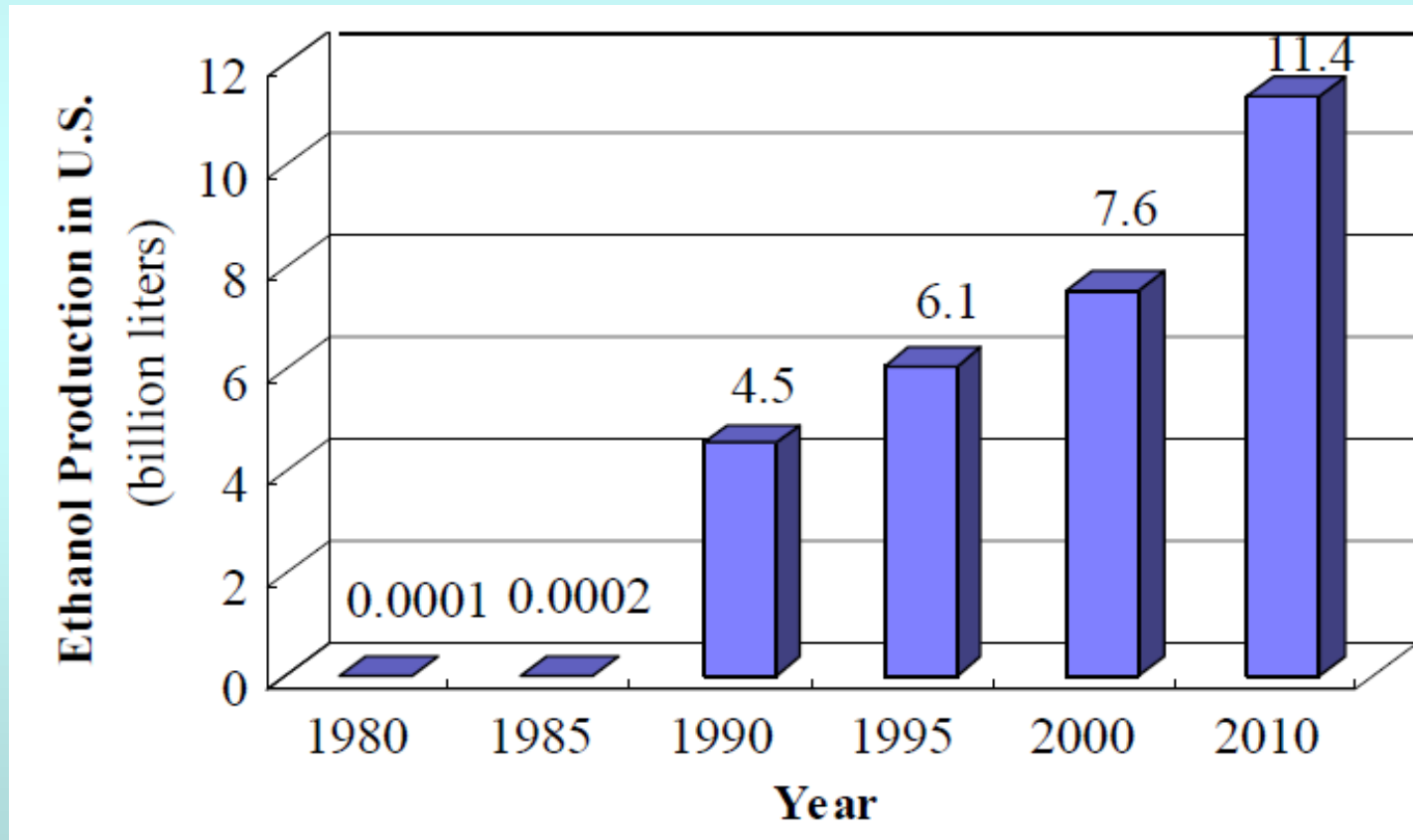
# „Bioetanol“ – 1. a 2. generace



## Bioetanol – 1. generace

### Bioetanol

V r.2010 – USA 11,4 mld. Litrů (většinou směs E10)  
- Evropa leader Abengoa (0,5 mld Litrů/rok)





## Bioetanol – 1.generace

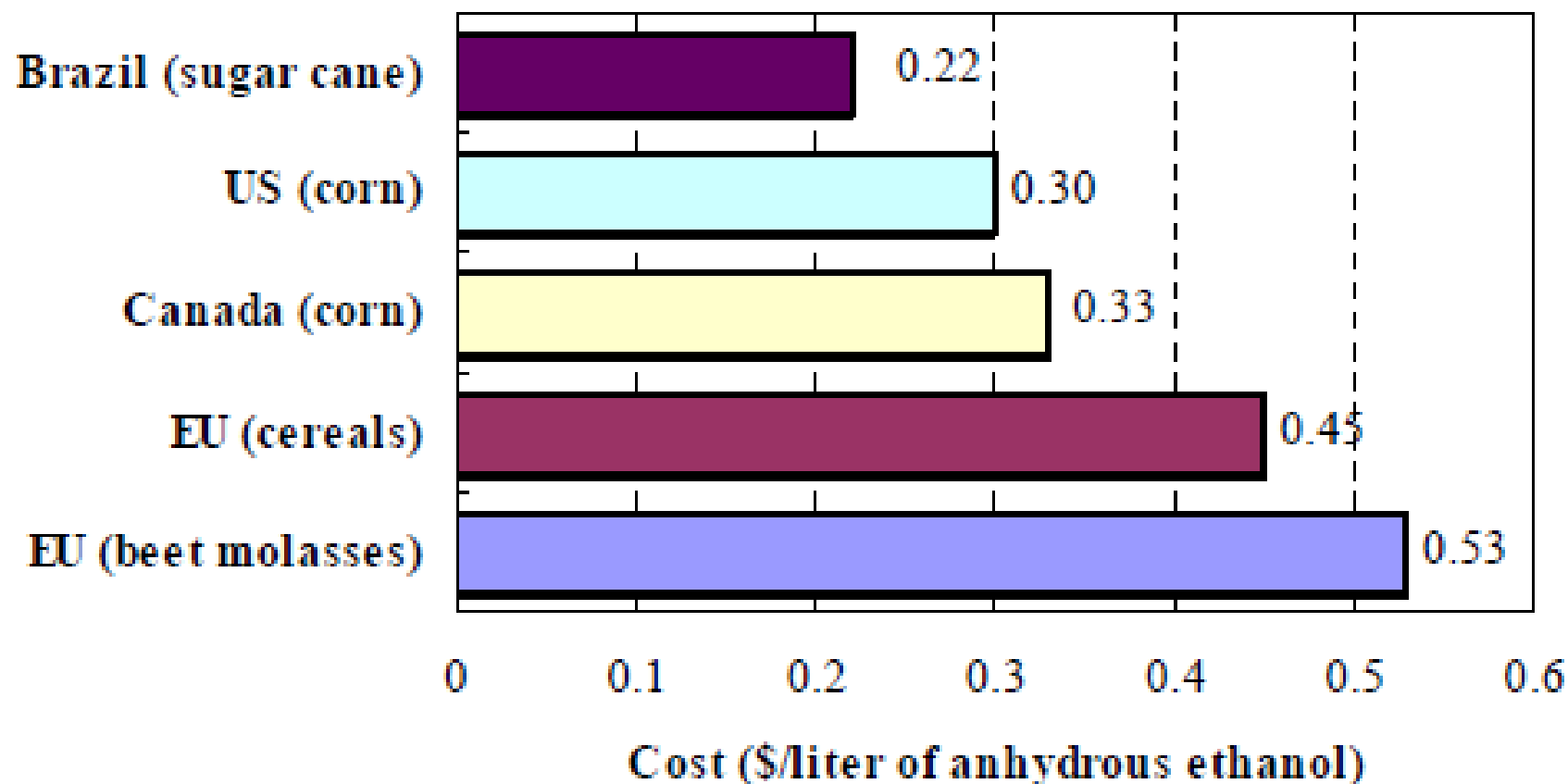
**Abengoa Bioenergía** (Španělsko) – roční produkce

- Bioetanol 40 mil. Litrů
- Elektřina 130000 MWh
- Spotřeba 300.000 tun obilí



**Bioetanol – 1. generace**

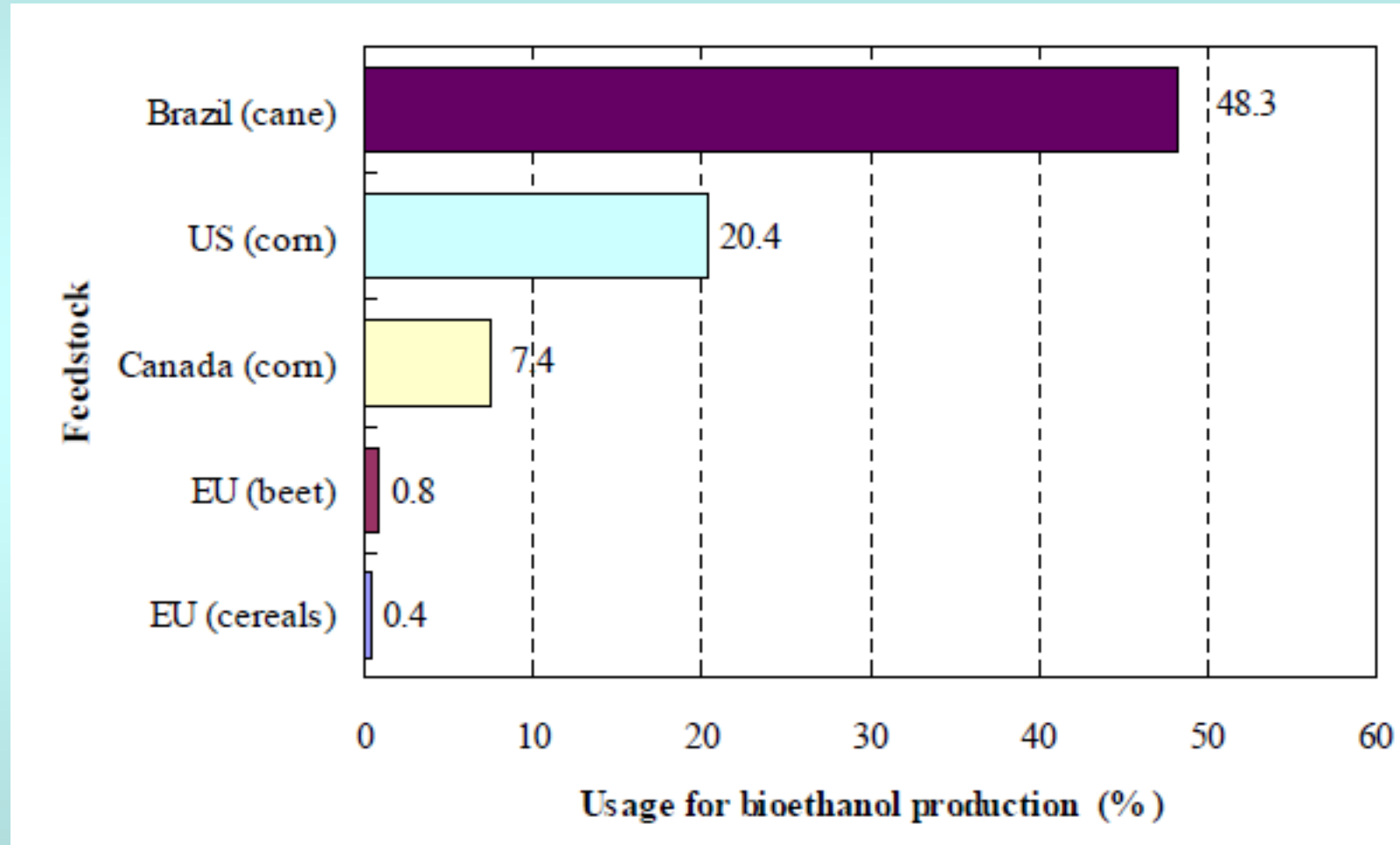
**Náklady na produkci podle surovin (USD/litr bezvodého EtOH):**





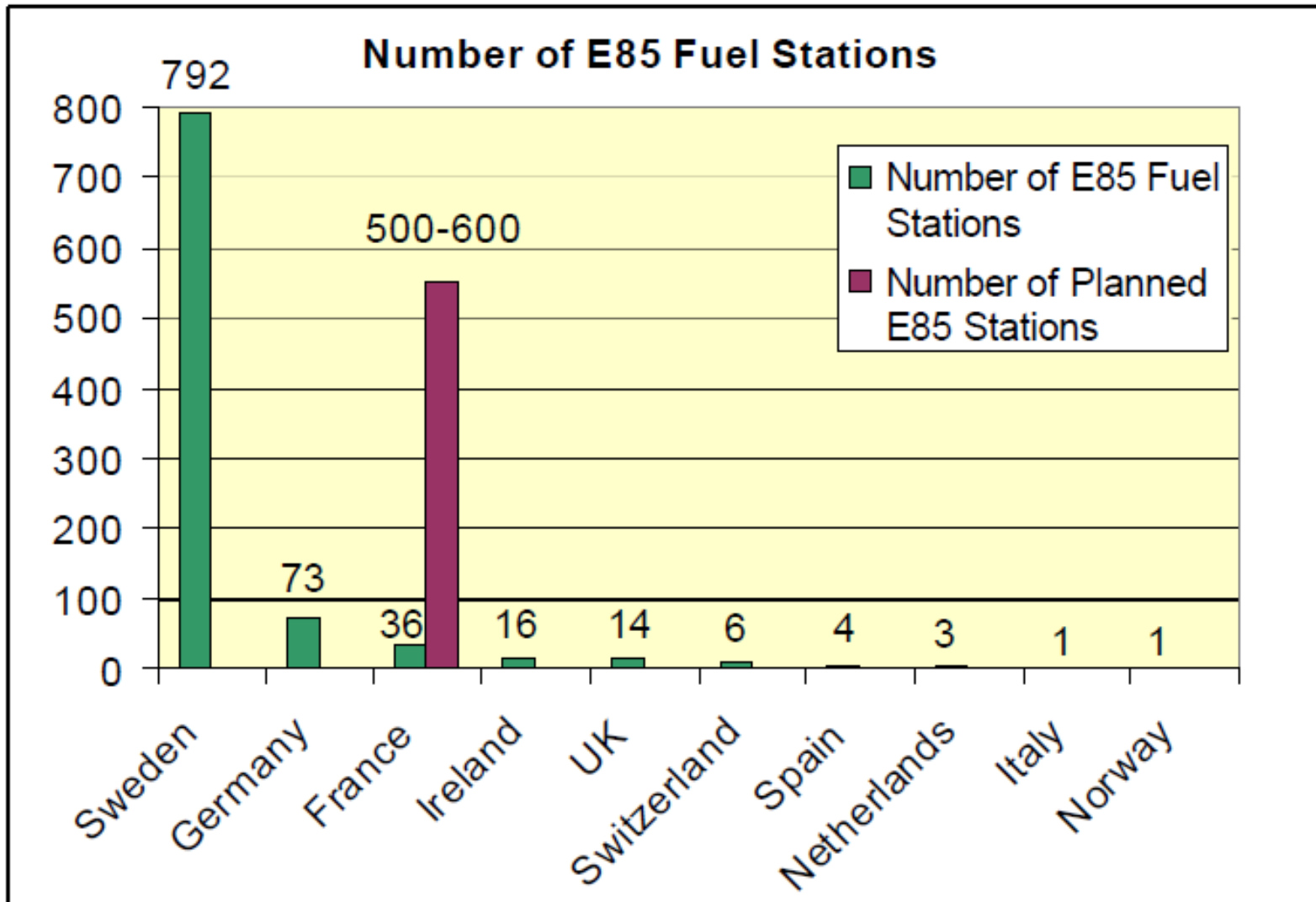
## Bioetanol – 1. generace

Podíl spotřebované zemědělské produkce pro výrobu bioetanolu:



**Bioetanol – 1.generace**

Počet tankovacích stanic s palivem E85 v zemích EU



Rozklad celulosy – **chemická cesta** (silné kyseliny, amoniak, pára, ..)

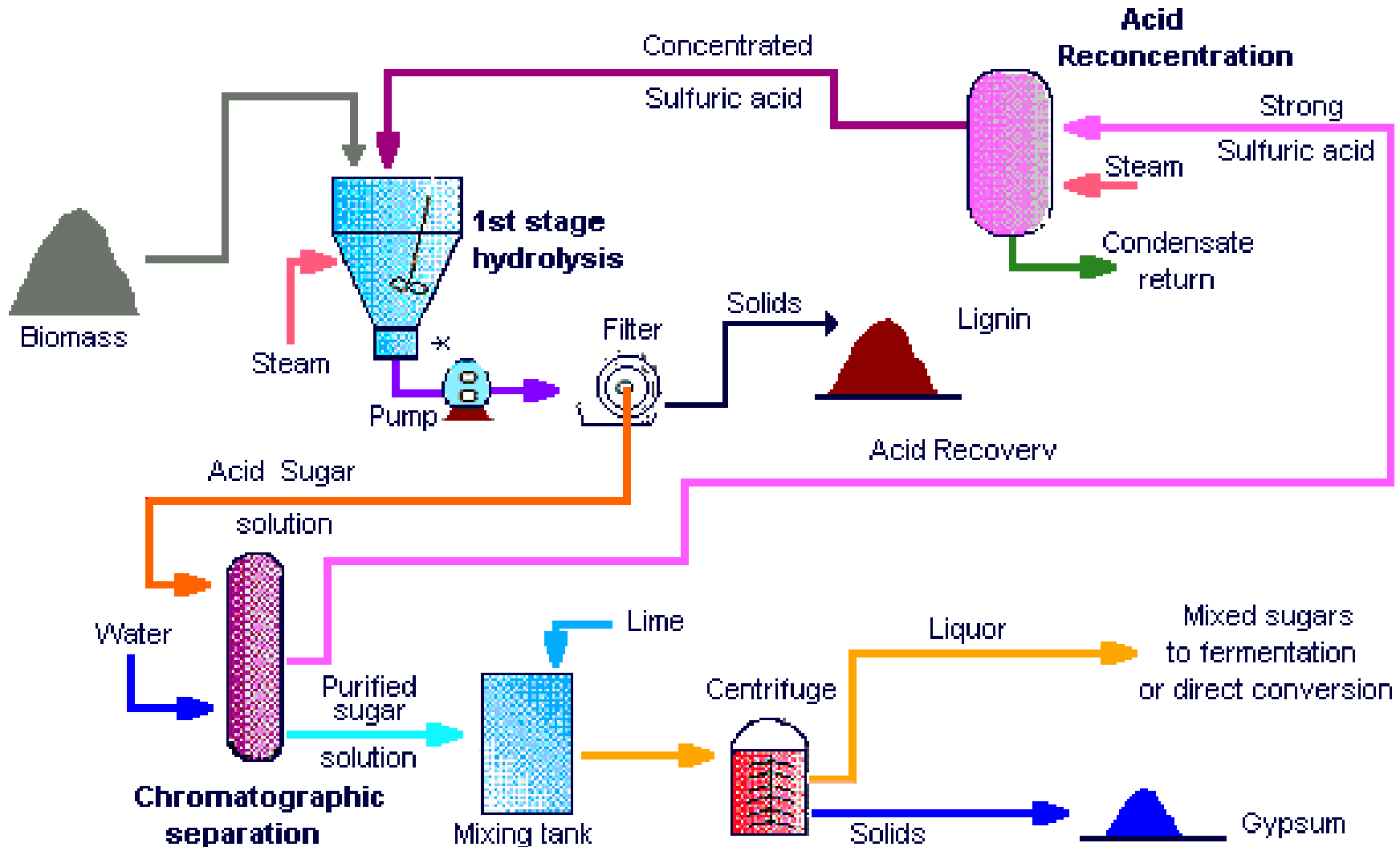
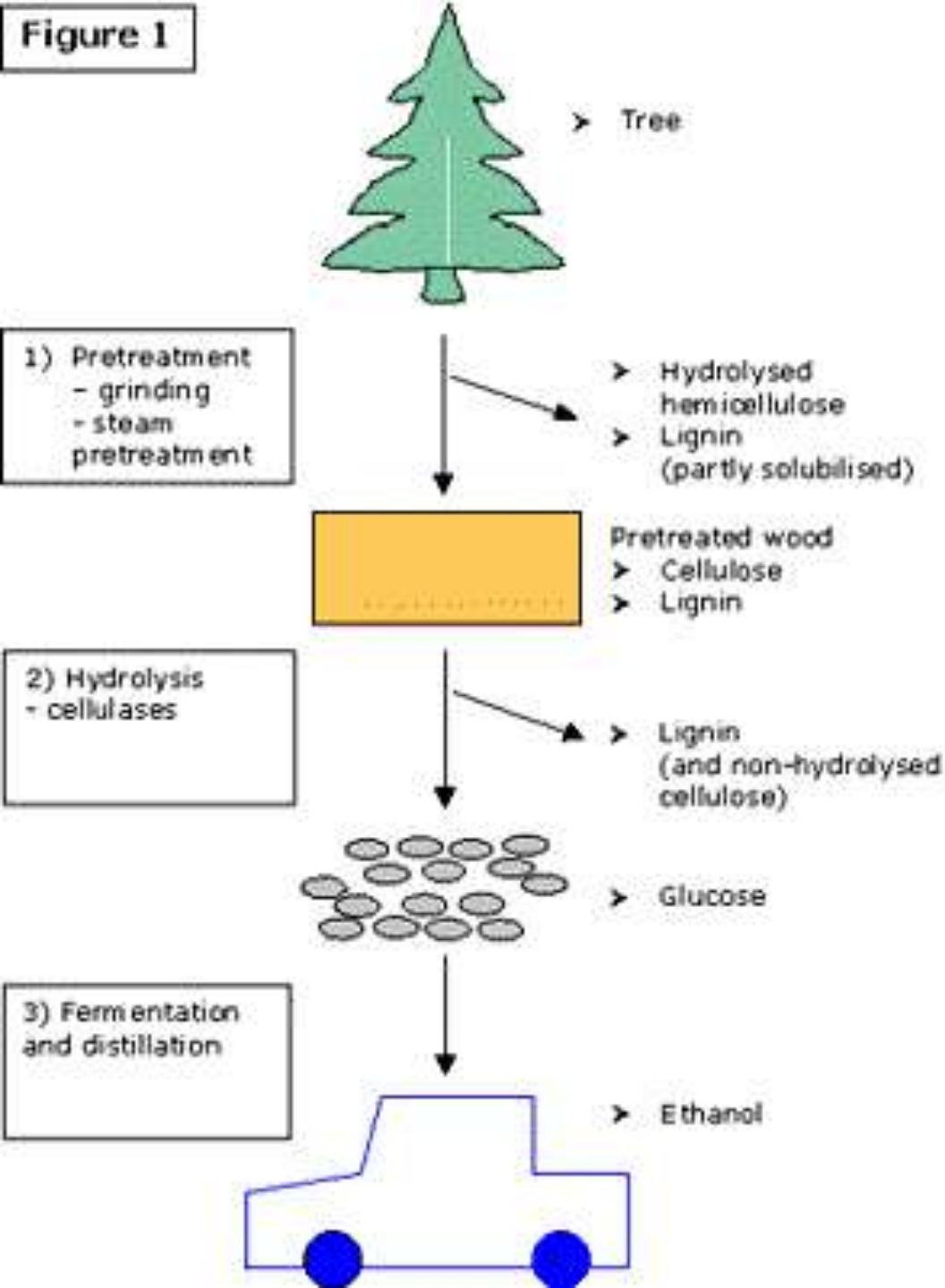


Figure 1



## Bioethanol

### *2.generace*

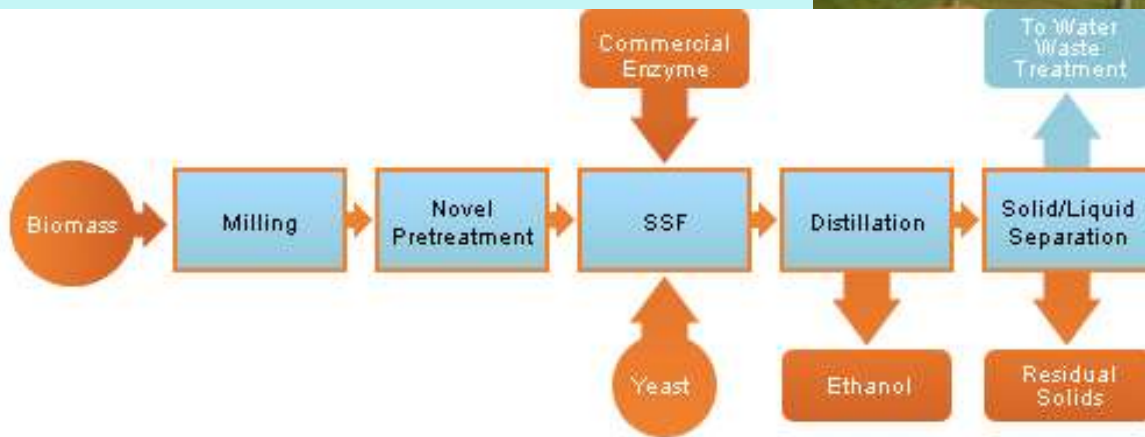
Rozklad celulosy **enzymaticky**  
(celulasy, hemicelulasy, ..)

## Bioetanol – 2. generace

**Abengoa Bioenergía** (Španělsko) – ligninocelulosový substrát (sláma)

- Bioetanol 1,3 mil. Litrů
- Spotřeba 300.000 tun obilí

[Webová stránka firmy](#)



# Výroba lihovin

**Lihoviny** = nápoje obsahující min. 15% EtOH **kromě piva a vína**

- dominantní postavení stále whisky
- příklon k **neutrálním** lihovinám typu gin a vodka
- vzrůstající obliba lihovin s nižším obsahem EtOH („emulzní“ typy)

## Lihoviny v ČR

- vedoucí postavení Fernet Stock (Citrus)



## Základní kategorie lihovin:

### 1) Vyrobené studenou cestou = bez kvašení

- \* smíchání jemného lihu s dalšími složkami – cukr, ovoce, byliny, ...

### 2) Vyrobené teplou cestou = kvašením a destilací

(destiláty, pálenky)

- \* charakter určen **původní surovinou** pro kvašení

„Příloha č. 7 k vyhlášce č. 335/1997 Sb.

## Členění konzumního lihu, lihovin a ostatních alkoholických nápojů na druhy a skupiny

Druh	Skupina
konzumní líh	
lihovina	tuzemák
	ovocný průtahový destilát - Geist
	pálenka – ovocný destilát
	borovička kvasná
	borovička průtahová
	Zlatá voda
ostatní alkoholické nápoje	
ostatní alkoholické nápoje se sníženým obsahem alkoholu	



# Druhy lihovin

Druhy podle složení (obsahu cukru) a konzistence :

- **neslazené** (vodka, destiláty, aj.)
- **slazené**
- **likéry** s obsahem cukru nejméně 100 g/L
  - \* Praděd, Becherovka, Griotka aj.
- **krémy** s obsahem cukru nad 250 g/L
  - \* kávový krém apod.
- **krystalické likéry** obsahují část cukru (sacharosy nebo laktosy) ve formě nerozpuštěných krystalků
  - \* krystalická kmínka
- **emulzní lihoviny** - krémovitě konzistence
  - \* směsi žloutků, mléka, cukru a lihu (vaječný likér)
  - \* přísávkem "kalící" složky na bázi modifikovaných dextrinů ( řídké emulzní lihoviny)

# Výroba destilátů

## Příprava kvasu:

- pouze vyzrálé, zdravé a čisté ovoce
- odstranění stopek a zbytku listů
- rozmáčknutí u tužšího ovoce (peckoviny) x poškození pecek
- lisování šťávy u jádrového ovoce
- zkapalnění a zcukřování zeleného sladu u obilí (50-60°C)

## Kvašení:

a) **spontánní kvašení** (ovoce) = využití přirozené mikroflóry

b) **řízené kvašení** (obilí) = inokulace čistými kulturami

dnes: uzavřené kvasné nádoby plněné do cca 4/5

„**matolinový koláč**“ = vrchní vrstva tvořená v průběhu fermentace

„**studené vedení kvasu**“ – menší riziko vzniku vedlejších produktů

**Destilace** – běžně dvojstupňová: cílem není pouze max. výtěžek EtOH !!

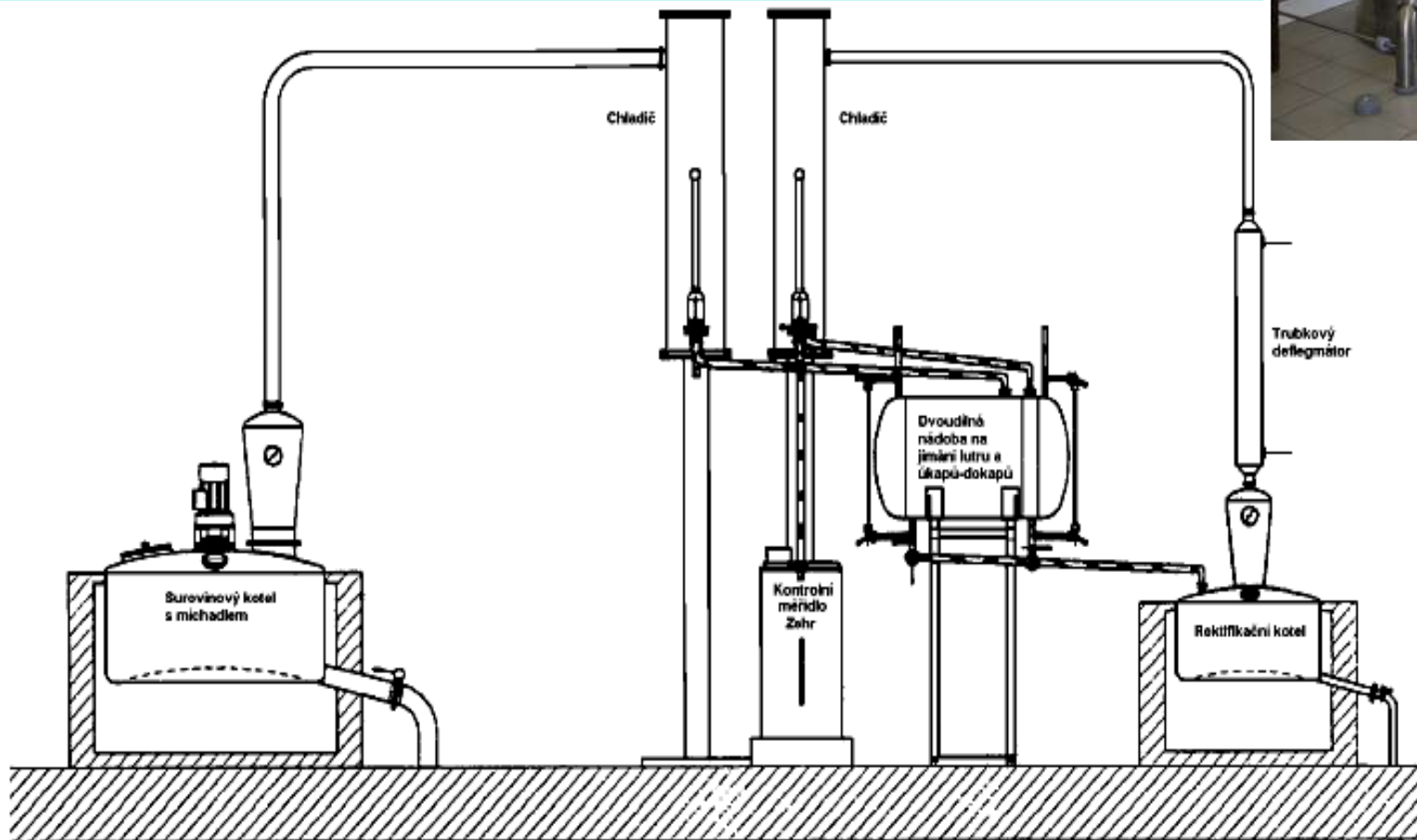
**1. stupeň** = vydestilování veškerého EtOH z kvasu – „**lutr**“

**2. stupeň** = frakční destilace (zesílení konc., sensorické vlastnosti)

„**úkap – jádro - dokap**“

# Destiláty

## Schema pěstitelské pálenice



# SLIVOVICE

# R. JELÍNEK

*Original Czech Distillation*

**Surovina:** švestky  
**Výroba:** kvašení, trojstupňová destilace  
**Kategorie:** bílá, zlatá, košér



**WHISKY** – typický nápoj anglicky-mluvícího světa

\* **Skotská whisky**

- a) **Malt** (sladová): ječný slad sušený rašelinovým kouřem  
dvojitá destilace na typických „pot-still“ aparátech  
zrání 3 a více let v dubových sudech = **zlatá barva**
- b) **Grain** (obilná): kromě sladu použití i nesladového obilí a kukuřice

\* **Irská whisky**

- 3x destilovaná, silnější kouřové aroma

„**blending**“ – míchání různých whisky pro vytvoření stálé vůně a chuti (až **desítky druhů** !!)

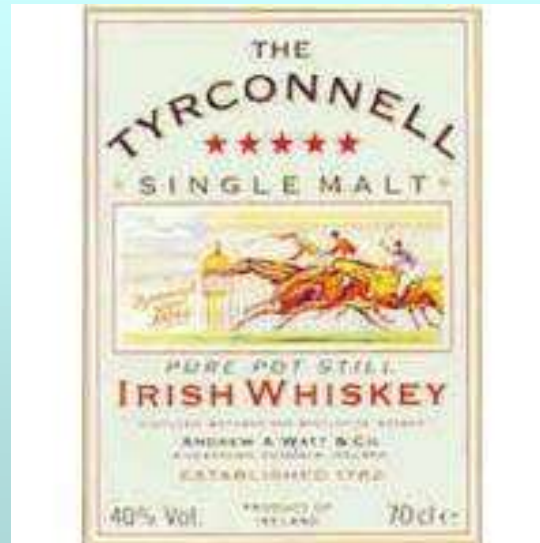
\* **Americká whisky** – nemíchají se = drsnější chuť

- a) **Bourbon**: z kukuřice      Video: [výroba kukuřičné pálenky](#)
- b) Ray whiskey: ze žita



# Whiskey

## Blending



# Gin - Genevre

## Gin

Pálenka – pšenice, ječmen + koření jalovec, koriandr + tajné přísady ...  
redestilace + možno mírně přisládit (nejvýše 10%)

## Genevre

Pálenka – žito + pšenice + ječmen + koření jalovec, anýz, kmín, koriandr,  
Trojstupňová destilace





# Vinný destilát Cognac / Brandy

**Surovina:** mladé víno (3 týdny – 8%)

**Výroba:** dvojitá destilace – na 70% konc.  
odpařování v pórovitých sudech  
na cca 40%

„*la part des anges*“

**Kategorie:** \*\*\*, VS - min. 2 roky v sudech-

VSOP – min. 4 roky v sudech

X.O. - min. 6 (10) let

„Napoléon“ – mezi VSOP a XO



# Rum

*„Komu smrdí rum, tomu smrdí práce!“*

- Surovina:** melasa z cukrová třtiny
- Výroba:** kvašení, jednostupňová destilace, filtrace akt. uhlí
- Kategorie:** *významné národní odlišnosti*  
*Šp – bílé rumy, Ang – tmavé rumy*  
*Fr – rumy z čisté třtinové šťávy*  
bílý, tmavý (zralý, aňejo)  
dozrávání v koňakových sudech



12090 Harvesting Sugar Cane - Recogiendo Caña, Cuba.





# TEQUILA (mezcal)

„Hecho en Mexico“

**Surovina:** agave (Weberova modrá pro tequila)  
– kvašený nápoj „*pulque*“  
vysoký obsah fruktózy

**Výroba:** vaření, kvašení, dvojitá destilace

**Kategorie:** **blanco, reposado, añejo** (sudy po whisky z Kentucky)  
x „*zlatý*“ – nejhorší kvalita

Video: [výroba tequila](#)



# VODKA

- Surovina:** velejemný obilný nebo bramborový líh
- Výroba:** filtrace na aktivním (dřevěném) uhlí, ředění vodou  
*neutrální čistá chuť x ochucené vodky*
- Kategorie:** vodka



*Příště:*

## **Výroba biomasy**







# **Mikrobiální biotechnologie**

# Fermentační technologie a kvasný průmysl

Lat. *fervere* = vřít

## **Mikroorganismy:**

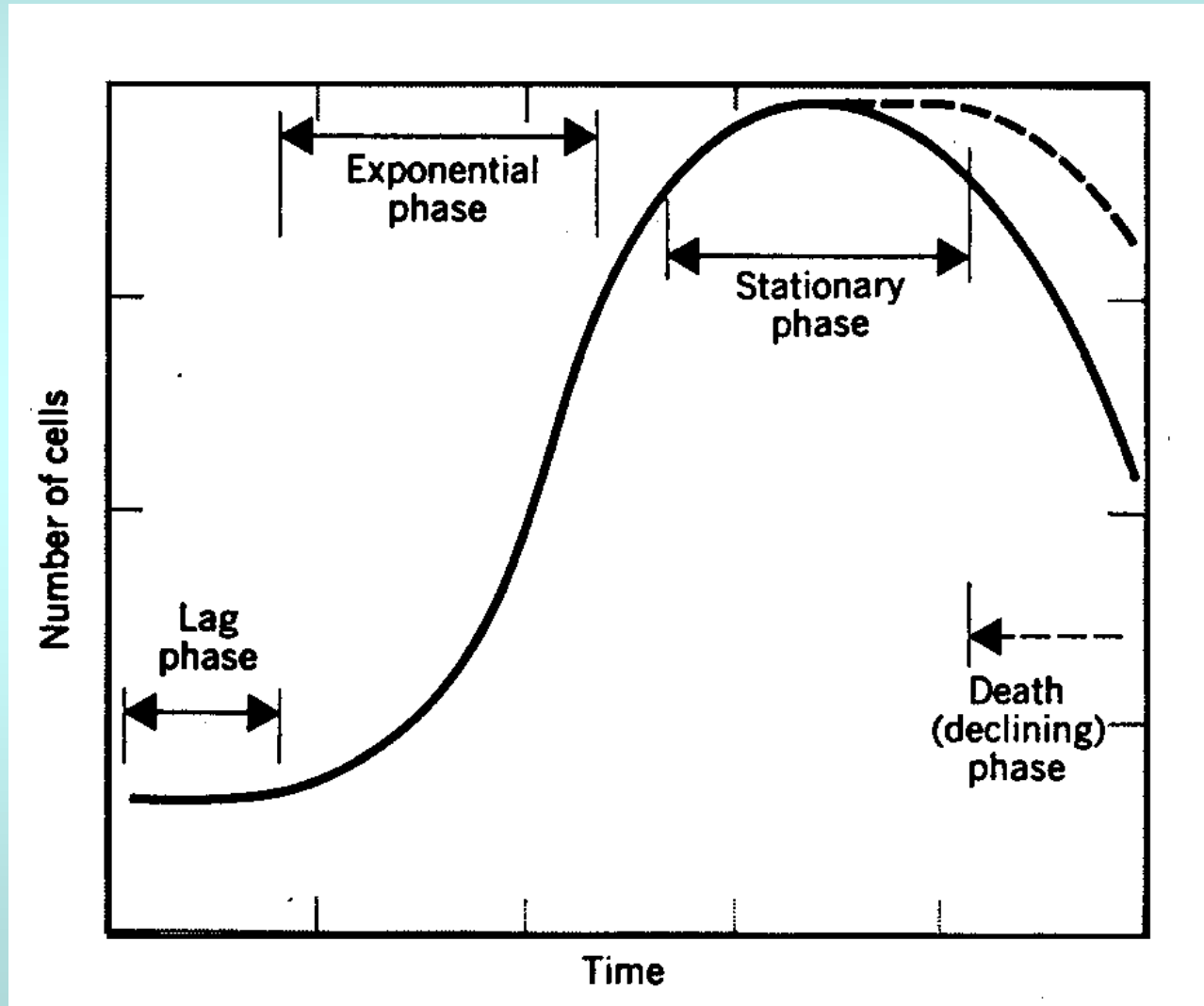
- široké spektrum živných substrátů
- široké spektrum metabolických produktů

## **Typické fáze růstu mikrobiální kultury:**

- \* **lag fáze**
- \* **log fáze** (exponenciální)
- \* zpomalovací fáze (hromadění biomasy a toxických produktů)
- \* **stacionární fáze**
- \* odumírání buněk



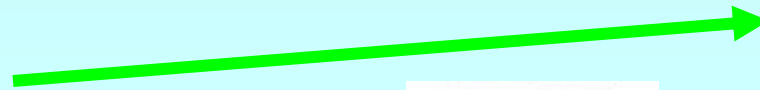
## Typické fáze růstu mikrobiální kultury:



# Fermentační technologie

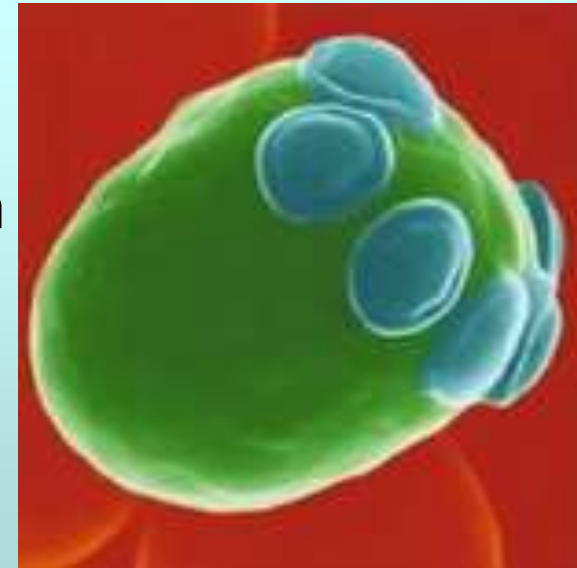
## Typy mikrobiální produkce:

- biomasa
- mikrobiální metabolity
- mikrobiální enzymy
- transformace přidaných substrátů
- rekombinantní peptidy a proteiny



## BIOMASA

- 18.století k pečení je používáno pивní droždí
- 1825 droždář pan Tebbenhof vyrábí lisované droždí
- 1863 zavedení **čisté kultury**, odstředivky a filtrů
- cca 1900 Průmyslová produkce pekařského droždí
- 1915 nahrazení živného prostředí  
na bázi cereálií **melasou**
- 1914-18 droždí jako potravinová náhražka
- 1960- droždí jako krmivo (ICI Pruteen)



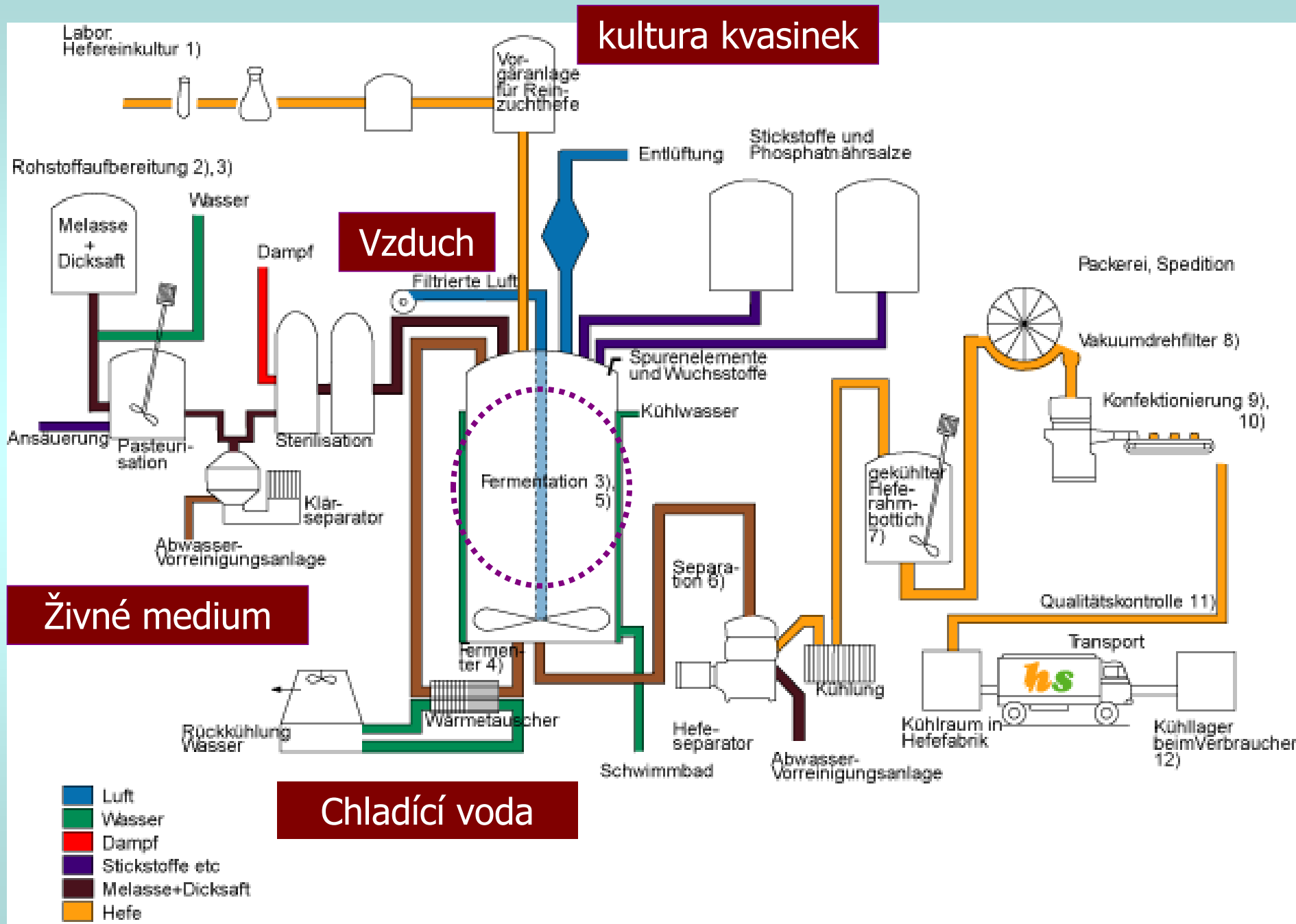
# SUROVINY PRO VÝROBU DROŽDÍ

**Pro pekařské droždí:** výlučně **řepná melasa**

(další použití: líh, zemědělství, kys. citronová)

- \* sušina 75-80%
- \* sacharóza (zpravidla 48-50% hm.)
- \* invertní cukr (0,2-2% hm., u "špatných" melas až 2%)
- \* rafinóza (0,5-2%)
- \* obsah dusíku 1,2-1,6% hm  
betainový dusík 40-60% - není kvasinkami využit
- \* popeloviny 8-10%

Řepná melasa má mít alkalickou reakci.





Čistá kultura  
kvasinek



Fermentory



Pohled do  
fermentoru





Separace kvasinek  
od media



Usazováky



Rotační  
zahušťovák

**Quorn®**

- biomasa plísně *Fusarium venenatum*
- obchodní označení „**mykoprotein**“
- **náhražka masa** (vláknitá textura proteinu)
- **nutná purifikace** pro odstranění DNA a RNA
- Marlow Foods – [www.quorn.com](http://www.quorn.com)

## trendy:

- \* kvasničné suspenze
- \* kvasničné extrakty
- \* potravinové doplňky
- \* krmiva pro domácí zvířata
- \* kvasnice pro domácí výrobu



- obsahuje 40-60% bílkovin
- vysoký obsah vitaminů, hlavně komplexu B a aminokyselin
  - \* vitaminy skupiny B (B1, B2, B6)  
především pivovarské kvasinky.
  - \* provitamin D (ergosterol)
  - \* provitamin A – u rodů *Rhodotorula* a *Rhodospiridium*
- nižší obsahem sirných aminokyselin

## Nedostatky:


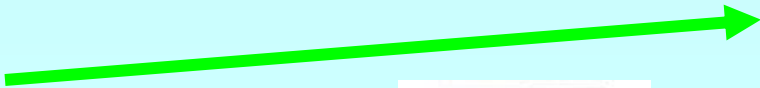


- nestrávitelnost buněčných stěn
- vysoký obsah nukleových kyselin (8-10% sušiny)  
max. denní dávka 2g pro člověka = 20g sušiny biomasy

## **Pří sada do krmných směsí:**

- \* obsahují antioxidantní látky
- \* zabraňují tuhnutí lipidových složek krmiv

# Fermentační technologie

## Typy mikrobiální produkce:

- biomasa 
- mikrobiální metabolity 
- mikrobiální enzymy 
- transformace přidaných substrátů
- rekombinantní produkty 



# METABOLITY

## “tropofáze”

- část log fáze s produkcí tzv. **primárních** metabolitů

## “idiofáze”

- produkce tzv. **sekundárních** metabolitů
- z intermediátů nebo koncových produktů primárního
- probíhá souběžně s pokračující produkcí primárních
- taxonomicky specifické
  - vláknité houby a bakterie,
  - sporulující bakterie x enterobakterie

## **METABOLITY**

### **Primární:**

etanol, organické kyseliny, aminokyseliny, polysacharidy

### **Sekundární:**

antibiotika, hormony, růstové faktory, ...

Vliv primárních metabolitů na nástup sekundárního metabolismu:

**indukce:** Trp (alkaloidy), Met (cyklosporiny)

**represe:** glukóza (benzylpenicilin), fosfát (tetracyklin)



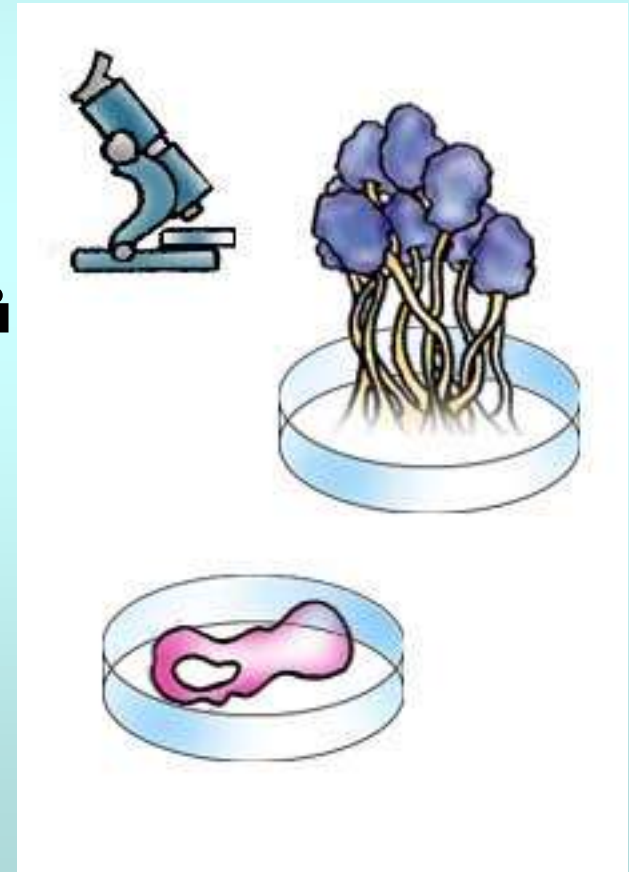
# ENZYMY

- většina produkována jako primární metabolity v log fázi  
x amylasy *Bacillus stearothermophilus* –  
v idofázi jako sekundární metabolity

## a) Mikrobiální enzymy:

potravinářství (nápoje)  
klinické aplikace  
prací prášky

## b) Produkce rostlinných a živočišných enzymů



# BIOKONVERZE

- \* klasický proces – **přeměna etanolu na ocet**
- \* **přeměna odpadních látek** (celulóza)
- \* **mikrobiální syntézy**  
= **chirální katalyzátory**, vysoká regio- a stereospecifita  
oxidace, dehydrogenace, hydroxylace,  
dekarboxylace, deaminace, isomerizace, ...

## *Trendy:*

- \* **imobilizace** mikrobiálních buněk
- \* **imobilizace** enzymových systémů

# REKOMBINANTNÍ PRODUKTY

- \* produkce **heterologních proteinů**  
(většinou *S. cerevisiae*, *E.coli*, *A.niger*)
- \* důležitá kontrola exprese genu, sekrece produktu, zamezení degradace

## Příklady:

Interferon

Insulin

factor VII a IX

hovězí somatostatin

chymosin, ...

## Genetická úprava fermentačních mikroorganismů

\* za normálních podmínek produkce  
komerčně důležitých metabolitů v nízkých koncentracích:

- 1) klasické vylepšení příslušného kmenu **mutacemi a výběrem**
- 2) **rekombinantní technologie**

## MUTACE

- \* Zvýšení pravděpodobnosti mutace:
  - UV, radiace
  - chemikálie (nitrosoguanidine, kofein, HNO<sub>2</sub>)
- \* Někteří z přeživších mutantů mohou produkovat více metabolitu
- \* Přístup snazší pro primární metabolity

Nutno potlačit kontrolu primárního metabolismu:

**zpětná kontrola** = inhibice enzymové aktivity, represe syntézy enzymu

# REKOMBINACE

## A) Technika fúze protoplastů:

- buněčná a jaderná fúze
  - výsledný protoplast regeneruje buněčnou stěnu
- příkl.** 2 kmeny *Brevibacterium flavum*  
s vysokou produkcí Lys a s vysokým příjmem glukosy

## B) In vitro rekombinace DNA :

- \* neúspěšnější při syntéze cizích proteinů
- \* zvýšení kopií genu kritické dráhy nebo operonu
- \* konstrukce vhodných vektorů pro přenos genů
- \* excisní vektory citlivé na zvýšenou teplotu

## V sekundárním metabolismu:

největší pokroky v klonování genů schopnosti na vlastní antibiotikum



*Prístě:*

## **Mlékárénské biotechnologie**

