

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE BIOPRODUKCE ETHANOLU Z ODPADNÍCH  
MATERIÁLŮ METODOU SSF

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. DAGMAR FILOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ  
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN ABIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OPTIMALIZACE BIOPRODUKCE ETHANOLU  
Z ODPADNÍCH MATERIÁLŮ METODOU SSF  
OPTIMIZATION OF ETHANOL BIOPRODUCTION FROM WASTE MATERIALS USING SSF  
METHOD

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
DIPLOMA THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

BC. DAGMAR FILOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE  
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2015



Vysokéučení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-DIP0899/2014** Akademický rok: **2014/2015**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Bc. Dagmar Filová**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)  
Vedoucí práce **Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název diplomové práce:

Optimalizace bioprodukce ethanolu z odpadních materiálů metodou SSF

### Zadání diplomové práce:

- 1) výběr vhodného odpadu a volba mikrobiálních systémů
- 2) rešerše literatury na téma práce
- 3) zpracování metodické části
- 4) provedení optimalizací bioproduktu ve snaze o maximalizaci produkce bioethanolu
- 5) aplikace analytických metod ke stanovení sledovaných látek v odebraných vzorcích
- 6) diskuse, vyhodnocení, závěr

### Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Dagmar Filová  
Student(ka)

-----  
Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Predložená diplomová práca sa zaoberá problematikou výroby bioetanolu ako paliva. V teoretickej časti sú vysvetlené základné pojmy spájajúce sa s touto problematikou, ďalej sú predstavené spôsoby predúpravy lignocelulóзовých materiálov a ich konverzie na etanol. Pozornosť je venovaná aj mikroorganizmom používaným pri produkcii bioetanolu v priemysle a analytickým inštrumentálnym technikám detekcie glukózy a etanolu, použitým v tejto práci. V experimentálnej časti je pozornosť venovaná kompozičnej analýze substrátu – bol zisťovaný obsah sušiny, celulózy a popola. Ako východzia surovina bol zvolený odpadný papier, ktorý v súčasnosti okrem recyklácie nenachádza iné využitie. Produkčným mikroorganizmom, skvasujúcim cukry na etanol bol neznámy kmeň *Saccharomyces cerevisiae*. Prvotná predúprava substrátu – odstránenie rigidných zložiek prebehla niekoľkými fyzikálnymi a fyzikálno – chemickými spôsobmi. Takto upravený substrát bol pripravený na enzýmovú hydrolýzu, počas ktorej došlo k vzniku monoméryných jednotiek z polysacharidov. Etanol bol produkovaný metódou simultánnej sacharifikácie a fermentácie, kedy enzýmová hydrolýza a fermentácia prebehla súčasne a v rovnakej reakčnej nádobe.

## **ABSTRACT**

Presented diploma thesis is dealing with the problematics of fuel ethanol production. Relevant basic terminology is explained in the theoretical part, methods of lignocellulose pre-treatments and their conversion to bioethanol are introduced. Attention is also given to microorganisms used for bioethanol production on industrial scale, as well as analytical instrumental techniques for glucose and ethanol detection. In experimental part, we are focusing on substrate composition analysis – contents of dry matter, cellulose and ash was investigated. Waste paper was chosen as substrate, as it does not find any other use beside recycling these days. Chosen production microorganism, that converts sugars into ethanol was the unknown strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Primal substrate pre-treatment – removal of rigid parts was performed in several physical and physical – chemical ways. Substrate with such pre-treatment was ready for enzymatic hydrolysis, during which monomers from polymer matrix were formed. Ethanol was produced using method of simultaneous saccharification and fermentation, when enzymatic hydrolysis and fermentation take place at the same time and the same container.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

etanol, SSF, odpadný papier, *Saccharomyces cerevisiae*

## **KEYWORDS**

ethanol, SSF, waste paper, *Saccharomyces cerevisiae*

FILOVÁ, D. *Optimalizace bioprodukce ethanolu z odpadních materiálů metodou SSF*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

Týmto by som chcela úprimne poďakovať svojmu vedúcemu diplomovej práce Ing. Mgr. Liborovi Babákovi, Ph.D., ďalej Ing. Helene Hudečkovej, Ing. Viliamovi Hlaváčkovi a Ing. Petre Matouškovej za rady a pomoc pri vypracovávaní experimentálnej časti práce. Vďaka patrí aj spoločnosti Tereos, TTD za poskytnutie mikroorganizmov a spoločnosti Zberné suroviny, a.s. za poskytnutie informácií a tiež všetkým, ktorí mi verili a podporovali ma.

## OBSAH

1.	Úvod .....	7
2.	Teoretická časť .....	8
2.1.	Vymedzenie základných pojmov .....	8
2.1.1.	Biomasa .....	8
2.1.2.	Lignocelulózo­vá biomasa .....	8
2.1.3.	Biopalivo .....	10
2.1.4.	Bioetanol.....	11
2.1.5.	Hydrolýza .....	12
2.1.6.	Enzýmy.....	12
2.1.7.	Fermentácia .....	12
2.2.	Lignocelulózo­vý materiál ako substrát na výrobu bioetanolu .....	12
2.2.1.	Odpadný papier.....	13
2.3.	Predúpravy odpadného papiera .....	13
2.3.1.	Fyzikálne predúpravy .....	13
2.3.2.	Fyzikálno – chemické predúpravy.....	15
2.3.3.	Chemické predúpravy.....	16
2.3.4.	Biologické predúpravy .....	17
2.4.	Enzýmová hydrolýza celulózy .....	18
2.5.	Konverzia lignocelulózo­vých materiálov na bioetanol.....	19
2.5.1.	Etanolové kvasenie .....	19
2.5.2.	Very high gravity (VHG) fermentácia.....	20
2.5.3.	SHF (Oddelená hydrolýza a fermentácia) .....	20
2.5.4.	SSF (Simultánna sacharifikácia a fermentácia).....	20
2.5.5.	One-pot SSF .....	20
2.5.6.	Inhibícia etanolom .....	21
2.6.	Mikroorganizmy produkujúce etanol .....	21
2.6.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	21
2.6.2.	<i>Zymomonas mobilis</i> .....	23
2.6.3.	Nežiaduce mikroorganizmy pri výrobe etanolu .....	24
2.7.	Bioetanol ako palivo.....	25
2.8.	Aktuálne využívanie bioetanolu ako paliva .....	26
2.9.	Inštrumentácia .....	27
2.9.1.	Turbidimetria .....	27
2.9.2.	Stanovenie sušiny biomasy.....	27
2.9.3.	HPLC – Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia .....	28
3.	Experimentálna časť .....	30
3.1.	Použité prístroje, chemikálie a enzýmy.....	30
3.1.1.	Použité chemikálie.....	30
3.1.2.	Použité prístroje.....	30
3.1.3.	Použitý software .....	31
3.1.4.	Použitý substrát.....	31
3.1.5.	Použitá kultúra.....	31
3.1.6.	Použité enzýmy.....	31
3.2.	Príprava roztokov .....	33
3.2.1.	Citrát – fosforečnanový pufr.....	33

3.2.2.	Roztoky na stanovenie celulózy .....	33
3.2.3.	Príprava inokulačného a kultivačného média pre kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
3.2.4.	Príprava mobilnej fázy pre HPLC .....	34
3.2.5.	Príprava kalibračných roztokov glukózy a etanolu .....	34
3.2.6.	Roztoky na predúpravu substrátu .....	34
3.3.	Predúprava substrátu .....	35
3.4.	Kvantitatívne stanovenie vybraných zložiek substrátu .....	35
3.4.1.	Stanovenie sušiny v substráte .....	35
3.4.2.	Stanovenie obsahu popola .....	36
3.4.3.	Stanovenie celulózy .....	36
3.5.	Rastová krivka <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	37
3.5.1.	Turbidimetrické stanovenie optickej hustoty buniek.....	37
3.5.2.	Gravimetrické stanovenie sušiny biomasy .....	37
3.6.	Enzymová hydrolýza substrátu – odpadného papiera .....	37
3.7.	Simultánna sacharifikácia a fermentácia.....	38
3.8.	HPLC stanovenie výsledkov .....	38
3.9.	Štatistické spracovanie výsledkov.....	39
4.	Výsledky a diskusia .....	40
4.1.	Kvantitatívne stanovenie vybraných zložiek substrátu .....	40
4.1.1.	Stanovenie sušiny v substráte .....	40
4.1.2.	Stanovenie obsahu popola .....	41
4.1.3.	Stanovenie celulózy .....	42
4.2.	Diskusia k fyzikálno – chemickým hydrolýzám .....	45
4.3.	Diskusia k stanoveniu celulózy po enzymovej hydrolýze .....	46
4.4.	Rastové krivky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	46
4.4.1.	Teplota kultivácie .....	46
4.4.2.	pH rastového média .....	46
4.4.3.	Spôsob inokulácie.....	46
4.4.4.	Diskusia rastových kriviek <i>S. cerevisiae</i> .....	48
4.5.	Kalibračné krivky - HPLC stanovenie .....	49
4.6.	Enzymová hydrolýza.....	51
4.6.1.	Porovnanie výťažkov glukózy jedného typu predúpravy pri rôznych reakčných podmienkach.....	51
4.6.2.	Vzájomné porovnanie výťažkov glukózy pri všetkých typoch predúprav .....	55
4.6.3.	Porovnanie obsahu celulózy pred enzymovou hydrolýzou a po nej .....	56
4.6.4.	Prehľad a porovnanie množstva vzniknutej glukózy pri rôznych reakčných podmienkach a všetkých typov predúprav .....	58
4.7.	Simultánna sacharifikácia a fermentácia.....	58
4.7.1.	Porovnanie množstva vzniknutého etanolu .....	62
4.7.2.	Porovnanie výsledkov s ostatnými publikáciami .....	62
5.	Záver.....	64
6.	Zoznam použitej literatúry.....	65
7.	Zoznam použitých skratiek.....	71

## 1. ÚVOD

Narastajúca spotreba a súčasne znižujúce sa zásoby fosílnych palív nútia vedcov stále hľadať nové možnosti, ako uspokojiť celosvetový dopyt po pohonných hmotách. Naopak, množstvo biologického odpadu pochádzajúceho z poľnohospodárstva, drevospracujúceho a potravinárskeho priemyslu, ale aj domácností a reštaurácií stále narastá. Spracovanie tohoto odpadu je ekonomicky náročné a má negatívny dopad na životné prostredie. Využívanie fosílnych palív má zase za následok zvyšovanie množstva skleníkových plynov v ovzduší, globálne otepľovanie a topenie ľadovcov.

Ako jedno z možných riešení týchto problémov sa ponúka výroba a využitie obnoviteľných palív, ako sú biovodík, propán – bután (LPG), bionafta, bioetanol a podobne. Substrát na výrobu bioetanolu musí obsahovať veľké množstvo skvasiteľných cukrov, musí byť ekonomicky dostupný a ideálne by to mala byť odpadná surovina upravovaná biologickým spôsobom, aby nedochádzalo k ďalšiemu hromadeniu odpadu. Lignocelulóza tieto podmienky spĺňa: celulóza v nej obsiahnutá je hydrolyzovateľná na jednoduché cukry, ktoré sú skvasiteľné viacerými druhmi kvasiniek a baktérií na etanol. Ďalej sa dá využiť napríklad na výrobu bioplynu alebo spracovať do palivových brieket, no najväčší záujem je práve o výrobu bioetanolu. [1]

Bioetanol sa dá zaradiť do biopalív prvej a druhej generácie. Do prvej skupiny patria biopalivá vyrábané z biomasy, ktorá konkuruje potravinárskej a poľnohospodárskej výrobe. Patrí sem bioetanol vyrobený kvasením primárnych zdrojov, teda škrobnatých produktov, obilnín, cukrovej repy a pod. Takisto metylester repkového oleja (MERO), vyrobený jeho esterifikáciou a metylester masných kyselín (FAME), vyrobený z vylisovaných olejnatých rastlín.

Biopalivá druhej generácie spracovávajú nepotravinársku biomasu. Ich výroba teda nekonkuruje potravinárskemu a poľnohospodárskemu priemyslu. Do tejto skupiny sa radí bioetanol, biovodík, syntetická motorová nafta ako produkt Fischer – Tropshovej syntézy, biometanol a biodimetyler. [2] Začína sa s vývojom palív tretej generácie, ktoré by sa mali vyrábať z mikroorganizmov a rias. Od zavedenia biopalív 2. a 3. generácie do praxe nás pravdepodobne delí dlhá cesta, keďže len výskum a komercializácia palív prvej generácie trvala takmer 80 rokov. [3]

Etanol ako biopalivo sa môže používať samostatne, alebo v zmesi s inými látkami. Najďalej v tomto smere prišla Brazília, kde tamojšie autobusy jazdia na čistý etanol. U nás sa z neho najčastejšie vyrába tzv. E85, čo je zmes etanolu a benzínu v pomere 85:15. Etanol v zmesi s benzínom zvyšuje oktánové číslo, čo znamená, že znižuje tvorbu CO a prchavých organických zlúčenín. [4]

Cieľom tejto práce v teoretickej časti je literárna rešerša študovanej problematiky, v experimentálnej časti voľba mikrobiálneho systému a vhodného odpadného substrátu. Ďalej je to spracovanie metodologickej časti, optimalizácia bioprocessu tak, aby boli dosiahnuté čo najvyššie výťažky ethanolu. Veľká pozornosť je kladená na analytické metódy slúžiace na stanovenie látok vo vzorkách a samozrejme na spracovanie výsledkov a ich diskusiu.



## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1. Vymedzenie základných pojmov

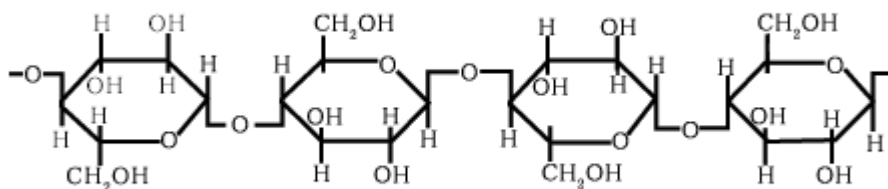
#### 2.1.1. Biomasa

Biomasa je biologický materiál, ktorý vzniká zo živých alebo odumretých tiel rastlinného alebo živočíšneho pôvodu. Tento materiál môže byť použitý ako zdroj energie, alebo ako zdroj látok v ňom obsiahnutých. Biomasa sa často nazýva rastlinné materiály, ktoré nesú špeciálny názov – lignocelulózová biomasa. [5]

#### 2.1.2. Lignocelulózová biomasa

Do kategórie lignocelulózovej biomasy sa radí biomasa rastlinného pôvodu, najmä dreviny, kry, trávy a ďalšie rýchlo rastúce rastliny. Jej stavebnými zložkami sú celulóza, hemicelulóza a lignín. Okrem nich sa v rastlinnej biomase vyskytujú tzv. extraktíva a popoloviny. Zastúpenie jednotlivých zložiek sa mení v závislosti od typu materiálu. [6]

Celulóza je hlavná stavebná zložka rastlinných buniek a najrozšírenejšia látka v prírode. V dreve tvorí okolo 40 – 50% hmotnosti (vzhľadom na suchý materiál). Je tvorená reťazcami  $\beta$ -D-glukopyranózy, ide teda o homopolysacharid. Väzba v celulóze je  $\beta$ -1,4-glykozidická, reťazec je nevetvený. Obsahuje kryštalické a amorfné úseky v pomere 3:1. Jednotlivé reťazce sú vzájomne viazané vodíkovými väzbami, čím sa vytvára vláknitá štruktúra. Celulóza je vo vode úplne nerozpustná, čo je všeobecnou vlastnosťou  $\beta$  – väzieb, no v organických rozpúšťadlách je čiastočne rozpustná. Jej sumárny vzorec je  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , kde n je počet jednotiek monoméru. Reťazec celulózy sa obvykle skladá z 800 – 17 000 jednotiek glukózy. [7,8]

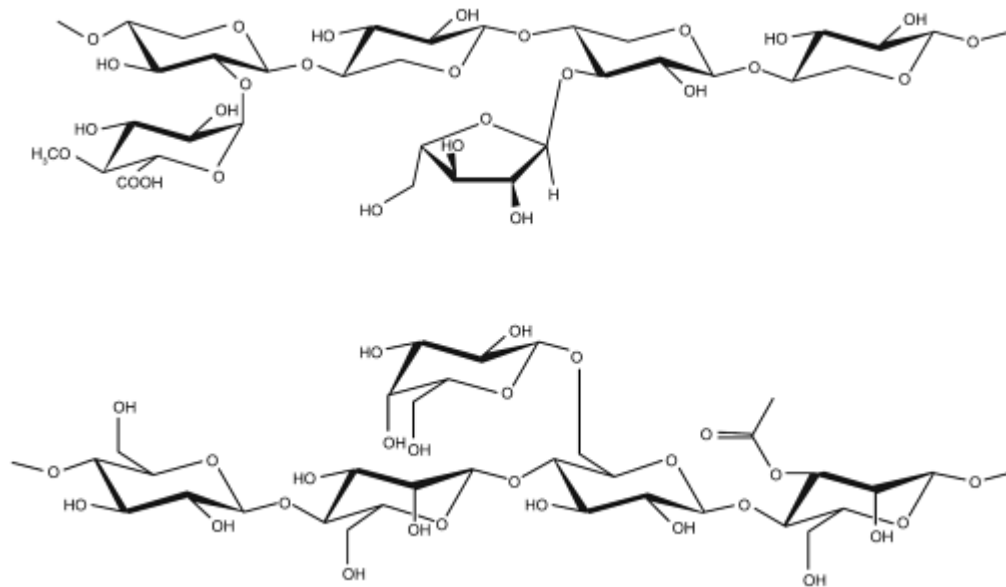


[9]

Obr. č. 1: Štruktúra celulózy

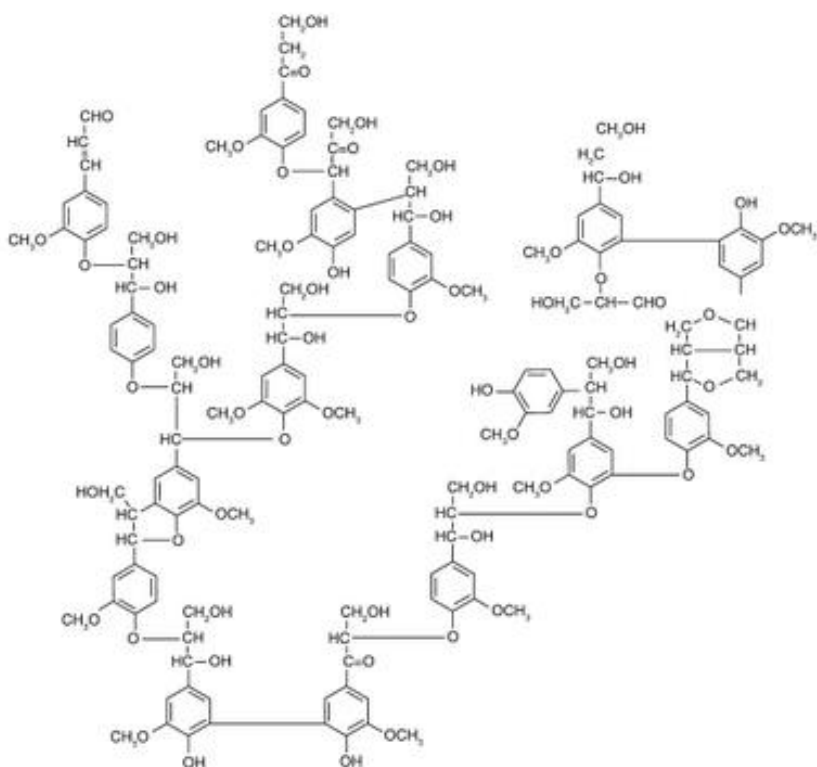
Hemicelulóza je rozvetvený polymér päť- a šesťuhlíkatých cukrov, najmä D-glukózy, ďalej D-xylózy, L-arabínózy, D-galaktózy a D-manózy. Obsahuje taktiež urónové kyseliny. Dominantná komponenta hemicelulózy sa líši v mäkkom a tvrdom dreve. Tvrdé drevo obsahuje xylan, kdežto mäkké drevo miesto neho obsahuje glukomanan. Kvôli rozvetvenej štruktúre hemicelulózy nie je možná tvorba vodíkových mostíkov, a preto hemicelulóza nevytvára kryštalickú štruktúru. Absencia kryštalickej štruktúry robí hemicelulózu náchylnejšiu na hydrolýzu glykozidickej väzby, podobne ako škrob. [10] Hemicelulóza v lignocelulózovom materiáli spája lignín a celulózu, čo dodáva celému komplexu lignín – hemicelulóza – celulóza vyššiu pevnosť. Rozpustnosť hemicelulózy rastie s rastúcou teplotou. Za neutrálnych podmienok sa začína celulóza rozpúšťať pri 180 °C. Rozpustnosť hemicelulózy však nezávisí len od teploty, ale aj od vlhkosti v nej viazanej a pH. Z lignínu, celulózy a hemicelulózy je práve hemicelulóza najmenej termochemicky stála. Počas

chemickej predúpravy za zvýšenej teploty reagujú najskôr bočné reťazce hemicelulózy, až po nich nasleduje skelet. [11]



Obr. č. 2: Štruktúra hemicelulózy s naviazaným xyланom a glykomananom. [10]

Lignín je druhý najrozšírenejší polymér na Zemi. Je to amorfný heteropolymér, jeho štruktúra obsahuje tri rôzne fenypropánové jednotky (p-kumaryl, koniferyl a sinapyl alkohol). Funkcia lignínu v prírode je spájať vlákna celulózy a vytvárať tak lignocelulóзовú biomasu. Okrem toho sa podieľa na ochrane rastliny pred mikrobiálnym atakom a oxidatívnym stresom. Amorfný heteropolymér je nerozpustný vo vode a opticky neaktívny, čo sťažuje jeho degradáciu. Vzájomný pomer celulózy, hemicelulózy a lignínu v biomase závisí od konkrétneho druhu rastliny alebo dreveniny. Energetická hodnota lignínu je oproti celulóze a hemicelulóze vyššia, pretože vo svojej molekule obsahuje menej naviazaného kyslíku. Rovnako ako hemicelulóza sa lignín začína rozpúšťať vo vode pri teplote 180 °C pri neutrálnych podmienkach. [10], [11] Hlavným cieľom chemických predúprav popísaných ďalej v tejto práci bude odstránenie lignínu a umožnenie dekryštalizácie celulózy.



Obr. č. 3: Chemická štruktúra lignínu [10]

### 2.1.3. Biopalivo

Ako biopalivo je definované akékoľvek palivo ktoré sa získava procesom biologickej fixácie uhlíka, čo znamená konverziu anorganického uhlíka do organických zlúčenín. Biopalivo sú teda uhľovodíky, ktoré sa vyrábajú z organickej hmoty. [12]

Biopalivá prvej generácie sa vyrábajú priamo z poľnohospodárskych plodín. Palivo vzniká zo sacharidov a tukov, ktoré sú v nich obsiahnuté. Kukurica, obilie, cukrová repa a v niektorých oblastiach sveta cukrová trstina sú najpoužívanejšie plodiny pre výrobu biopalív prvej generácie. Je dôležité podotknúť, že chemické zloženie samotného biopaliva nezávisí od toho, do ktorej generácie patrí, resp. surovina, z ktorej je biopalivo vyrobené ho zaraďuje do jednej z generácií. [12]

Biopalivá druhej generácie sa často objavujú pod názvom pokročilé biopalivá. Vyrábajú sa z biomasy, ktorá nie je použiteľná ako potravina alebo krmivo. Výnimku tvorí prípad, kedy poľnohospodárska plodina už bola použitá pre ľudskú alebo kŕmnu spotrebu, napríklad použitý rastlinný olej, ktorý sa nedá recyklovať a použiť k rovnakému účelu. Vo všeobecnosti sa dá povedať, že biopalivá druhej generácie vznikajú skvasovaním odpadných materiálov. [12]

V súvislosti s so surovinami vhodnými pre produkciu biopalív druhej generácie sa najčastejšie hovorí o lignocelulózových materiáloch, z ktorých sa bude vychádzať aj v tejto diplomovej práci. K lignocelulózovým materiálom sa radí: odpad z agropriemyslu, lesníctva, energetické plodiny, poľnohospodársky a komunálny odpad, organický odpad a rôzne druhy tráv a rastlín, vrátane geneticky modifikovaných rastlín. [13] Podľa informácií *International Energy Agency* môžu byť biopalivami druhej generácie aj palivá vzniknuté zniešaním palív pochádzajúcich z biomasy s fosílnymi palivami (napríklad zmes bioetanolu a benzínu – E85, E15 apod.). Ďalším príkladom môže byť palivo získané Fischer – Tropschovou syntézou. [14]

Druh biopaliva	Presný názov	Surovina/Biomasa	Technologický postup výroby
<b>I. generácia</b>			
bioetanol	konvenčný (tradičný) bioetanol	cukrová repa, obilniny	hydrolyza a fermentácia (kvasenie)
<b>II. generácia</b>			
bioetanol	bioetanol z celulózy	lignocelulóзовé materiály	moderná hydrolyza a fermentácia (kvasenie)
syntetické biopalivá	kvapaliny z biomasy (BTL-postupom): syn-bioetanol	lignocelulóзовé materiály, spracovateľné odpadové suroviny	pyrolýzne splyňovanie a následná syntéza

Obr. č. 4: Porovnanie spôsobu výroby biopalív 1. a 2. generácie [15]

Biopalivami tretej generácie sa rozumejú biopalivá odvozené od rias. Ide o relatívne nový pojem, pretože predtým boli tieto biopalivá klasifikované ako biopalivá druhej generácie. Neskôr sa zistilo, že riasy poskytujú relatívne vysoké výťažky z malého objemu vstupného substrátu v porovnaní s ostatnými surovinami. Diverzita palív, ktoré sú riasy schopné vyprodukovať je daná ich vlastnosťami: riasy produkujú olej, ktorý môže byť rafinovaný na diesel, alebo niektoré komponenty benzínu. Ďalšou veľkou výhodou je ich genetická variabilita. Genetická modifikácia umožňuje riasam produkovať metabolity ako etanol, butanol, benzín, metán, a biodiesel. Veľkou nevýhodou je vysoká spotreba vody, dusíku a fosforu na rast rias. Týmto sa navyšuje cena biopaliva vyrobeného z rias, ďalším negatívom je použitie hnojív, ktoré sú potrebné na ich rast. Výroba hnojív je zaťažovaná produkciou skleníkových plynov, ktorých sa vo výsledku vyprodukuje viac, ako sa ich ušetrí používaním rias na výrobu biopalív. [12]

#### 2.1.4. Bioetanol

Bioetanol je etanol vyrobený kvasením biomasy, ktorou môže byť pšenica, kukurica, odpad z poľnohospodárskej výroby, trávy, obilná slama, odpad z drevospracujúceho priemyslu a podobne. [10] Podľa suroviny, z ktorej je bioetanol vyrobený, sa môže zaradiť k prvej alebo druhej generácii biopalív. V súčasnosti je trend uprednostňovať biopalivá druhej generácie, aby nedochádzalo ku konkurenčnému boju s poľnohospodárskym priemyslom a zvyšovaniu cien potravín. Najväčším výrobcom palivového bioetanolu sú v súčasnosti USA (13,3 miliónov galónov), za ňou nasleduje Brazília s 6,3 miliónmi a Európa s 1,4 miliónmi galónov. Všetky údaje sú za rok 2013. [16]

### 2.1.5. Hydrolýza

Hydrolýza je chemický dej, pri ktorom dochádza k rozkladu molekúl adíciou vody. Aktivačná energia hydrolýzy býva vysoká, preto hydrolýza mnohých biologicky dôležitých látok neprebíha pri bežných teplotách a pH. [17]

### 2.1.6. Enzýmy

Enzýmy sú makromolekulárne biokatalyzátory, ktoré uchýchľujú chemické deje. Na rozdiel od anorganických katalyzátorov sa enzýmy vyznačujú vysokou substrátovou a druhovou špecifitou, preto sa množstvo existujúcich enzýmov odhaduje na miliardy. Enzýmy neovplyvňujú energetiku reakcie, ale znižujú aktivačnú energiu reakcie. [18]

### 2.1.7. Fermentácia

Fermentácia označuje katabolickú dráhu katalyzovanú enzýmami, pri ktorej dochádza k zisku energie. Fermentácia sa vyskytuje pri nedostatku kyslíku, kedy fermentujúci mikroorganizmus získava energiu anaeróbne, a za nižšieho energetického zisku v porovnaní s aeróbnym procesom. Fermentácia je teda stresová dráha, pre mikroorganizmus energeticky nevýhodná. [17], [18]

V priemysle označuje termínom fermentácia proces, ktorý vedie buď k produkcií žiadaných metabolitov činnosťou mikroorganizmov, alebo k rozkladu látok mikroorganizmami. [19]

V tejto diplomovej práci sa budem zaoberať etanolovou fermentáciou, kedy zo skvasiteľných cukrov vzniká etanol:



## 2.2. Lignocelulózový materiál ako substrát na výrobu bioetanolu

Lignocelulózová biomasa predstavuje perspektívny zdroj pre výrobu bioetanolu. [20] Zdroje lignocelulózovej biomasy môžeme zaradiť do nasledovných tried:

- odpad z poľnohospodárskeho priemyslu – slama z obilovín, kukuričná siláž, ryžová slama, rôzne druhy tráv, čirok, výlisky z cukrovej repy a trstiny
- odpad z lesného priemyslu – odpad z ťažby dreva, ale aj drevo spadnutých stromov
- priemyselný odpad – sulfitové výluhy z papierenskej výroby, zberný (odpadný) papier, obalové materiály
- iné – odpad z domácností a záhrad [21]

Lignocelulózové energetické plodiny teda predstavujú sľubnú surovinu kvôli vysokým výťažkom, nízkym nákladom, využiteľnosti menej kvalitných pôd a celkovej nízkej environmentálnej záťaži. [20] Nevýhoda, ktorú majú lignocelulózové materiály v porovnaní so škrobnatými a cukronatými surovinami, je komplexnosť ich matrice. Tá okrem celulózy obsahuje aj hemicelulózu a lignín, ktoré sú navzájom pevne spojené a tvoria rigidnú maticu. V malom množstve sa vyskytujú aj proteíny, pektín, minerálne látky, taníny alebo tuky. Zastúpenie jednotlivých zložiek sa líši od typu biomasy, miesta, kde vyrástla a klimatických podmienok danej oblasti. Hlavnou prekážkou degradácie lignocelulózovej biomasy je prítomnosť lignínu, ktorý je odolný voči oxidácií a mikrobiálnemu rozkladu. Aby bolo možné túto biomasu využiť, je nutné narušiť lignínový komplex a upraviť maticu tak, aby boli získané fermentovateľné cukry, ktoré by boli mikroorganizmami využiteľné na rast a produkciu metabolitov. [22]

Tabuľka č. 1: Percentuálne zastúpenie jednotlivých zložiek mäkkého a tvrdého dreva

Komponent	Tvrde drevo (%)	Mäkké drevo (%)
Celulóza	40 – 50	40 - 50
Hemicelulóza	25 – 35	25 -30
Lignín	20 – 25	25 - 35
Pektín	1 – 2	1 - 2
Škrob	stopy	stopy

[23]

### 2.2.1. Odpadný papier

Táto diplomová práca sa zaoberá odpadným papierom ako substrátom pre výrobu bioetanolu, pretože tvorí značnú časť mestského a priemyselného odpadu. A to aj napriek tomu, že v posledných rokoch boli snahy čo najväčšiu časť zrecyklovať. Po recyklácii vznikne papier s nižšou kvalitou, ako bol pôvodný. S každou ďalšou recykláciou sa dĺžka vlákien znižuje a spolu s ňou klesá aj kvalita recyklovaného papiera, ktorý sa preto nedá recyklovať neobmedzene. Nachádzanie nových spôsobov, ako opäť zhodnotiť odpadný papier je v súčasnosti nutnosťou. Východiskom môže byť výroba bioproduktov, ako napríklad etanolu alebo kyseliny mliečnej. [24] Odpadný papier má oproti iným suroviám značné výhody, a to napríklad: nízka cena (často ju tvoria iba náklady na odvoz), dostupnosť nie je obmedzená klimatickým pásmom a sezónnosťou výroby a do zberu odpadného papiera sa aktívne zapájajú spotrebitelia. [25]

### 2.3. Predúpravy odpadného papiera

Hlavnou prekážkou masívneho využitia odpadnej fytomasy je komplexita materiálu, ktorý okrem celulózy obsahuje aj hemicelulózu a lignín. Lignín tvorí nepriepustnú priestorovú štruktúru odolnú voči mikrobiálnemu rozkladu a oxidácií a z tohoto dôvodu predstavuje aj hlavnú prekážku degradácie lignocelulózy. Aby ju bolo možné využiť pre výrobu biopalív, je nutné túto komplexnú štruktúru narušiť tak, aby boli získané fermentovateľné cukry, ktoré môžu byť mikroorganizmami využité na rast a produkciu metabolitov. Pri predúpravách obvykle dochádza najskôr k mechanickému a potom fyzikálno - chemickému narušeniu štruktúry substrátu, pričom dochádza k hydrolýze, prípadne aj deštrukcií hemicelulózy, zvýšeniu obsahu amorfnej celulózy a uvoľneniu lignínu. Pretože je proces predúpravy lignocelulóзовých materiálov pomerne komplikovaný a nákladný, predstavuje ekonomickú bariéru, ktorá bráni širšiemu využitiu fytomasy ako suroviny na výrobu biopalív. [22] Aj napriek tomu, že bolo vyvinutých veľa metód predúprav, doposiaľ nexistuje žiadna, ktorá by bola univerzálna, finančne a technicky nenáročná. [26]

#### 2.3.1. Fyzikálne predúpravy

Cieľom fyzikálnych predúprav je dezintegrovat' komplexnú lignocelulóзовú maticu tak, aby sa zväčšil jej merný povrch, zmenšila kryštalinita celulózy a skrátil sa čas potrebný na chemickú alebo enzymatickú hydrolýzu, ktoré sú popísané v štatiach nižšie. [26]

- Mechanická dezintegrácia

Mechanickou dezintegráciou rozumieme mletie, drvenie, sekanie apod. Týmto spôsobom sa redukuje dĺžka celulóзовých vlákien, najčastejšie sa na tento účel používa valcový, prípadne vibračný mlyn. [27]

- Pyrolýza

Pri pyrolýze sa používa teplota približne 250 °C. Pri vyšších teplotách, zhruba 300 °C už dochádza k spylňovaniu celulózy a vzniku uhlia, pri nižších teplotách je rozklad príliš pomalý. Za najúčinnějšíu je považovaná pyrolýza za nízkej koncentrácie substrátu a vysokej koncentrácie chemikálií. Substrát sa zmieša so slabou kyselinou a zahreje sa, čím dochádza k hydrolyze. Tým sa dosiahne 80 - 85% konverzia celulózy za vzniku redukujúcich cukrov. Pri teplotách nižších ako 250 °C je tiež možné dosiahnuť rozklad celulózy, musí sa však použiť katalyzátor, v tomto prípade chlorid zinočnatý alebo uhličitan sodný. [27]

- Extrúzia

Extrúzia je nová a sľubná metóda fyzikálnej predúpravy. Počas extrúzie je materiál vystavený vysokej teplote a mechanickej dezintegrácii, čo ústi do fyzikálnych a chemických zmien materiálu. Konkrétne dochádza k defibrilácii a skracovaniu a opätovnému zvlákňovaniu, výsledkom je väčšia dostupnosť uhl'ovodíkového skeletu pre enzýmy. Pri optimalizácii procesu sa musia brať do úvahy parametre konkrétneho bioreaktoru. Zvažuje sa aj použitie enzýmov počas procesu extrúzie, ktoré sa zdá byť sľubnou technológiou pre produkciu bioetanolu. [28]

- Ožiarenie

Ožiarenie gama lúčmi, prúdom elektrónov a mikrovlnami môže zlepšiť výťažky enzýmovej hydrolyzy lignocelulóзовých materiálov. Kombinácia s ďalšími metódami, napríklad pôsobením kyselín, môže tento proces ešte urýchliť. Vlákna celulózy obsiahnuté v substráte sa môžu ožiarением štiepiť za vzniku nízkomolekulárných oligomérov a dokonca celobiózy. Žiarenie 100 mR a viac môže viesť k rozkladu oligosacharidov a cyklickej štruktúry glukózy. Enzýmová hydrolyza filtračného papiera, ktorý neobsahoval lignín nedosiahla vyššie výťažky s použitím ožiarenia. Výťažky po enzýmovej hydrolyze novínového papiera s malým obsahom lignínu boli po ožiarení o niečo vyššie. Pri posudzovaní účinnosti predúpravy ožiarением by sa teda mal brať ohľad na množstvo lignínu v matici, kryštalinitu a hustotu. Nevýhodou je nepoužitelnosť tejto metódy v priemyselnom meradle. [29]

- Ultrazvuk

Pri predúprave ultrazvukom ide o mechanické narušenie biomasy, kedy dochádza k redukcii veľkosti častíc. Bol intenzívne študovaný vplyv ultrazvuku na extrakciu hemicelulózy, celulózy a lignínu. Niektorí vedci dokázali, že sacharifikácia celulózy je efektívnejšia s použitím ultrazvuku ako metódy predúpravy. Pri enzýmovej hydrolyze sa použitím ultrazvuku tiež dosiahli vyššie výťažky, pretože kavitáciou sa zväčšil aktívny povrch substrátu a molekuly enzýmov tak mohli prenikať hlbšie do jeho štruktúry. Okrem toho sa najlepších výsledkov pri kavitácii dosiahlo pri 50 °C, čo je aj teplotné optimum mnohých enzýmov. [28]

### 2.3.2. Fyzikálno – chemické predúpravy

- Parná explózia (autohydrolyza)

Na nasekanú biomasu sa aplikuje vodná para pod veľkým tlakom pri teplote 160 - 200 °C. Nasleduje prudké uvoľnenie tlaku, ktoré má za následok explozívnu dekompresiu. Pri týchto teplotách dochádza k degradácii hemicelulózy a zmene v štruktúre lignínu, čím sa celulóza stane dostupnejšou pre hydrolyzu zriedenou kyselinou sírovou. Výhodou parnej explózie je nízka spotreba energie a šetrnosť k životnému prostrediu. Nevýhodou je vznik fenolických zlúčenín, ktoré by počas fermentácie pôsobili inhibične, a preto je ich treba odstrániť.

- Amoniakálna explózia (AFEX – Ammonia fibre expansion)

Tento proces je princípom veľmi podobný parnej explózií, no namiesto vodnej pary sa tu používa kvapalný amoniak. Proces prebieha pri teplote 60 – 100 °C, pri poklese tlaku sa mení skupenstvo amoniaku na plynné. Dochádza k narušeniu vlákien a k čiastočnej dekryštalizácii celulózy. Na rozdiel od parnej explózie však pri amoniakálnej explózií nedochádza k rozpúšťaniu hemicelulózy. Účinnosť tejto metódy závisí od použitého substrátu. Výhodou sú nižšie procesné náklady, pretože vzniká predupravený materiál bez kvapalného podielu. Taktiež nevznikajú ani fenolické zlúčeniny ako u metódy parnej explózie. Na druhej strane, nevýhodou je menšia šetrnosť k životnému prostrediu z dôvodu použitia amoniaku. [27], [28]

- Predúprava horúcou vodou

Predúprava horúcou vodou nevyžaduje rýchlu dekompresiu a neúčastnia sa jej žiadne chemikálie, ani katalyzátory. Tlak sa používa iba v takom množstve, aby voda zostala v kvapalnom stave pri teplotách 160 – 240 °C. Horúca voda rozpúšťa najmä hemicelulózu, čím sa celulóza stáva prístupnejšou pre enzýmy. Sediment, ktorý vznikol po predúprave dáva po sfiltrácii dve frakcie: pevnú, ktorá obsahuje celulózu a kvapalnú, ktorá obsahuje cukry z hemicelulózy. Aby sa predišlo vzniku inhibítorov, pH by sa malo udržiavať v rozmedzí 4 – 7, pretože pri tomto pH sú hemicelulolytické cukry najmä vo forme oligomérov, štiepenie na monoméry je minimálne. Vznik degradačných produktov je preto tiež menší.

Predúprava horúcou vodou odstraňuje až 80% hemicelulózy. Lignín je pri tejto predúprave čiastočne depolymerizovaný a rozpustený, ale úplná delignifikácia použitím tejto metódy samotnej nie je možná. Výhoda tejto metódy tkvie v jej nenáročnosti: reaktor je jednoduchej koštruktie, nie je potrebný katalyzátor, koncentrácie rozpusteného lignínu a hemicelulózy sú nízke, rovnako ako aj koncentrácie degradačných produktov. Na druhej strane je veľká spotreba vody a energie na jej ohrev, preto sa táto metóda komerčne nepoužíva. [28]

- Explózia CO<sub>2</sub>

Táto metóda je založená na použití CO<sub>2</sub> ako superkritickej tekutiny. Pri týchto podmienkach je možné efektívne odstrániť lignín, čím sa zvýši využiteľnosť substrátu. Navyše CO<sub>2</sub> vo vodných roztokoch kyselinu uhličitú, ktorá podporuje hydrolyzu polymérov. Delignifikáciu podporuje aj prídavok niektorých činidiel, napríklad etanolu. Molekuly CO<sub>2</sub> sú veľkosťou podobné molekulám vody alebo amoniaku a dokážu rovanko penetrovať malé póry lignocelulózy. Tento proces prebieha za zvýšeného tlaku, po jeho explozívnom uvoľnení nastáva deštrukcia celulózy a hemicelulózy a tým sa pre enzýmy zvyšuje využiteľná plocha substrátu. [28]



### 2.3.3. Chemické predúpravy

- Zásadité predúpravy

Princípom týchto predúprav je efekt, ktorý majú niektoré zásadité látky na lignocelulóзовý materiál. Efektivita pritom závisí od obsahu lignínu v biomase. Zásaditá predúprava zvyšuje dostupnosť celulózy pre enzýmy a rozpúšťa lignín. Pritom dochádza k minimálnej rozpustnosti hemicelulózy a celulózy v porovnaní s kyslými alebo hydrotermálnymi procesmi. Zásaditá hydrolýza sa môže prevádzať pri izbovej teplote a v časovom rozpätí od niekoľkých sekúnd po niekoľko dní. Spôsobuje menší rozklad cukrov ako kyslá hydrolýza. Nevýhodou je, že je menej účinná na drevnatú biomasu.

Vhodnými činidlami na zásaditú hydrolýzu sú hydroxid sodný, hydroxid draselný, hydroxid vápenatý a hydroxid amónny. Hydroxid sodný, ktorý bol použitý aj v experimentálnej časti tejto diplomovej práce, spôsobuje rozpínanie matrice, zväšcovanie vnútorného povrchu celulózy, znižovanie stupňa polymerizácie a kryštalinity, čo má za následok rozrušenie štruktúry lignínu. Obsah lignínu v matrici sa teda zníži z pôvodných 24 - 55% na 20%.

Prídavok antioxidantu (kyslíku alebo peroxidu vodíka) k alkalickej hydrolýze (NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>) zvyšuje efektivitu procesu, pretože dochádza k lepšiemu odbúraniu lignínu. Okrem toho, pri použití zásaditej predúpravy v kombinácii s peroxidom vodíka, neboli v hydrolýzatoch detegované furfural ani hydroxymetylfurfural. Neprítomnosť týchto látok je dôležitá vo fermentačnej časti výroby bioetanolu. [28]

- Kyslé predúpravy

Hlavným dôvodom, prečo sa robí kyslá predúprava je rozpustenie hemicelulóytickej frakcie a sprístupnenie celulózy pre enzýmy. Môže sa použiť koncentrovaná alebo zriedená kyselina, ale pre účely výroby bioetanolu je vhodnejšie použiť zriedenú kyselinu. Použitím zriedenej kyseliny nedochádza k produkcií inhibičných látok, ekonomická náročnosť je nižšia, dá sa použiť pre širokú škálu lignocelulóзовých materiálov. Môže sa použiť vyššia teplota (napr. 180 °C) po kratšiu dobu, alebo nižšia teplota (napr. 120 °C) po dobu 30 – 90 minút. Dochádza k rozpusteniu hemicelulózy a jej konverzií na skvasiteľné cukry. Na mikroorganizmy počas fermentácie negatívne vplyvajú niektoré produkty degradácie cukrov a lignínu (napr. furfural, hydroxymetylfurfural).

Najviac študovaná kyselina na tento typ predúprav je kyselina sírová, u nej sa dosiahli najlepšie výsledky. Okrem toho sa robili experimenty aj s kyselinou chlorovodíkovou, fosforečnou a dusičnou. Z organických kyselín boli testované kyselina jablčná a fumarová, lepšie výsledky sa dosiahli u kyseliny jablčnej. V porovnaní s kyselinou sírovou dochádzalo u kyseliny jablčnej k menšej tvorbe furfuralu. [28]

- Ozonolýza

Ozón vykazuje vysokú účinnosť odstránenia lignínu. Je to silný antioxidant, pri jeho použití nevznikajú žiadne inhibičné látky. Predúprava prebieha pri izbovej teplote a atmosférickom tlaku. V praxi by však bolo nutné použitie veľkého množstva ozónu, čo je pre priemyselné využitie finančne príliš nákladné. [28]

- Predúprava organickými rozpúšťadlami

Ako rozpúšťadlá na rozpustenie lignínu sa môžu použiť metanol, etanol, acetón, etylén glykol. Okrem toho vzniká celulóza vhodná na enzýmovú hydrolýzu. Výhodou oproti iným metódam je opätovné získanie lignínu, ktorý môže byť ďalej využitý v iných aplikáciách.

Výhodné je, ak tomuto procesu predchádza kyslá hydrolýza. Dosahuje sa odstránenie lignínu až 70% a minimálne straty celulózy (menej ako 2 %).

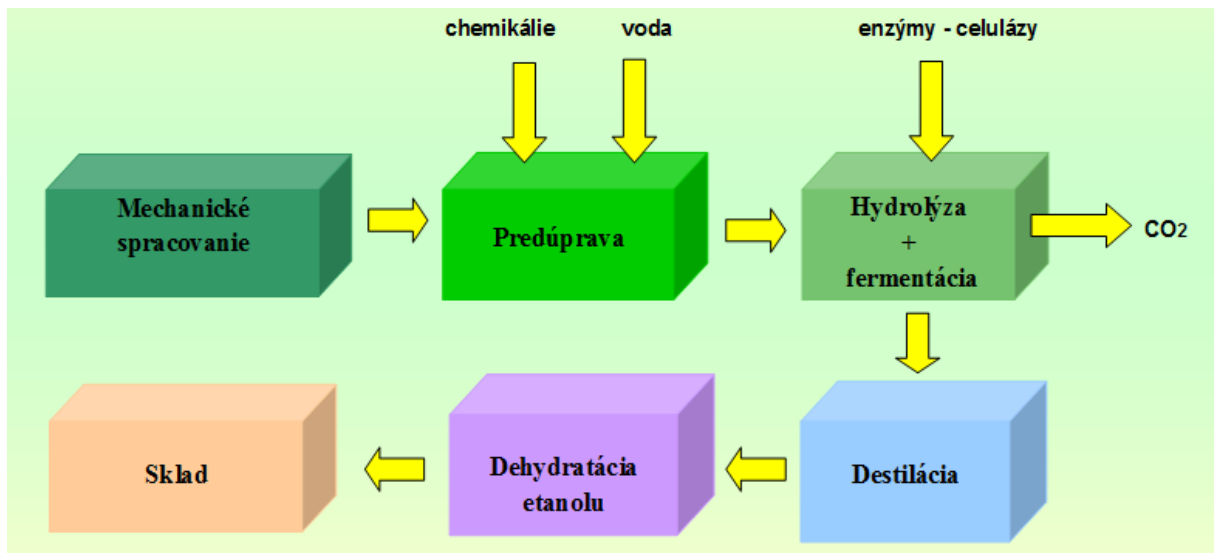
Rozpúšťadlá je výhodné recyklovať, extrahujú sa pomocou separačných techník, napríklad odparením a kondenzáciou. [28]

#### 2.3.4. Biologické predúpravy

Pri biologických predúpravách sa využíva činnosť drevokazných húb, najmä bielej a hnedej hniloby. Používané kmene rozkladajú lignín a hemicelulózu, pričom celulóza zostáva intaktná. Pri výrobe bioetanolu je výhodná kombinácia biologických predúprav s predúpravou organickými rozpúšťadlami, po ktorej nasleduje simultánna sacharifikácia a fermentácia. Konkrétne sa na lignocelulóзовé materiály používajú: *Phanerocheate chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercolerus*, *Ceriporiopsis subvermispora* a ďalšie. Biologické predúpravy sú atraktívne z hľadiska nízkych nákladov (malá spotreba energie) a miernych podmienok, za ktorých prebiehajú. [28]

Výber metódy predúpravy má významný vplyv na následnú enzýmovú hydrolýzu. Do úvahy sa musia vziať nasledovné faktory:

- cena predúpravy, ktorú tvorí energia, chemikálie a ich recyklovanie. Aby sa ušetrili náklady, častokrát musí chemickej predúprave predchádzať fyzikálna dezintegrácia.
- miera, do ktorej je lignín odstránený. Úplná delignifikácia nie je pre hydrolýzu nevyhnutná. Niektoré predúpravy iba zmenia pozíciu lignínu, čím katalyzujú hydrolýzu bez odstránenia lignínu. Nešetrná delignifikácia dokonca môže znížiť využiteľnosť celulózy.
- miera, do ktorej predúprava hydrolyzuje polysacharidy v lignocelulóзовej biomase. V minulosti bola snaha o maximálnu degradáciu lignocelulózy, aby sa zlepšil prístup enzýmov k celulóze. Viaceré metódy predúprav sa preto zameriavali na odstránenie hemicelulózy, napríklad kyslé predúpravy.
- snaha vyhnúť sa vzniku produktov rozkladu cukrov a lignínu, čo je často následok nešetrných predúprav. Tieto produkty treba pred fermentáciou odstrániť, aby nedochádzalo k inhibícií. [30]



Obr. č. 5: Výroba biopalív 2. generácie [15]

## 2.4. Enzýmová hydrolýza celulózy

K enzýmovej hydrolýze dochádza pôsobením vysoko špecifických enzýmov. Produkty hydrolýzy sú redukujúce cukry obsahujúce glukózu. Náklady na enzýmovú hydrolýzu sú nízke v porovnaní s kyslou alebo zásaditou hydrolýzou, pretože enzýmová hydrolýza prebieha za miernych podmienok (pH 4,8, teplota 45 – 50 °C) a nedochádza ku korózií zariadení. Tieto enzýmy sa nazývajú celulózy a sú produkované vláknitými hubami a baktériami. Z baktérií sú to rody *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* a *Streptomyces*, ktoré sú producentmi celuláz. Kvôli produkcii celuláz boli intenzívne študované druhy *Cellulomonas fimi* a *Thermomonospora fusca*. Aj keď bakteriálnych druhov produkujúcich celulózy je veľa a produkujú enzýmy s vysokou špecifickou aktivitou, zvyčajne to nie je v dostatočnom množstve. Platí to najmä o anaeróbných druhoch *Clostridium thermocellum* a *Bacteroides cellulolytic*, ktoré navyše vyžadujú anaeróbne podmienky a majú nízky nárast. Z týchto dôvodov sa výskum v oblasti komerčných celuláz upriamuje viac na vláknité huby.

Druhy vláknitých húb, ktoré produkujú celulózy sú *Sclerotium rolfisii*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* a *Penicillium*. Na účely produkcie celuláz bola z týchto kmeňov najviac študovaná *Trichoderma*.

Celulózy sú zvyčajne zmesou viacerých enzýmov. V procese hydrolýzy sú zastúpené minimálne tri rôzne skupiny celuláz:

- endo-1,4- $\beta$ -glukanáza (EG, endo-1,4-D-glukanohydroláza, alebo EC 3.2.1.4), ktorá atakuje celulózu s nízkou kryštalinitou a katalyzuje štiepenie 1,4 väzby medzi glukózovými jednotkami celulózy
- exo-1,4- $\beta$ -glukanáza, alebo celobiohydroláza (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glukan celobiohydroláza, alebo EC 3.2.1.91) atakuje konce reťazov celulózy, z molekuly sa odštiepujú celobiózové jednotky. Dochádza k hydrolýze 1,4- glykozidickej väzby, ktorá už bola hydrolyzovaná na kratšie polysacharidy endoglukanázou. Tým sa tvoria disacharidy a tetrasacharidy (napr. celobioza). Patria sem dve skupiny exo-1,4- $\beta$ -glukanáz, exo-1,4- $\beta$ -glukan celobiozidáza (CBH – I) štiepi celulózu z jej

redukujúceho konca, exo-1,4- $\beta$ -glukozidáza (CBH – II) štiepi celulózu z jej neredukujúceho konca.

- $\beta$ -1,6-glukozidáza (EC 3.2.1.21) hydrolyzuje celobiózu za vzniku glukózy. Katalyzuje iba rozklad celo-oligosacharidov a celobiózy, čím z celobiózy vznikajú monoméry glukózy [31], [32]

Okrem týchto troch enzýmov sa v celulólytickej zmesi nachádzajú aj pomocné enzýmy, ktoré atakujú hemicelulózu, ako napríklad glukuronidáza, acetylésteráza, xylanáza,  $\beta$ -xylozidáza, galaktomananáza a glukomananáza. Takto vzniknuté redukujúce cukry môžu byť v procese fermentácie skvasiteľné baktériami alebo kvasinkami za vzniku bioetanolu. [21]

Nevýhodou je citlivosť enzýmov na podmienky reakcie, už malé zmeny teploty môžu vyvolať zmenu trojrozmernej štruktúry enzýmu a tým ovplyvniť jeho aktivitu. Príliš vysoká teplota a zvýšená koncentrácia solí môžu viesť k denaturácii enzýmu. Tepelná denaturácia enzýmu je ireverzibilná, denaturácia spôsobená vysokou koncentráciou solí je zvyčajne reverzibilná. Soli ťažkých kovov taktiež spôsobujú ireverzibilnú denaturáciu. [28]

Enzýmovú hydrolýzu ovplyvňujú nasledovné faktory: vzájomný pomer enzýmu a substrátu, pomer množstva enzýmu a produktu (môže dochádzať k inhibícií enzýmu nahromadením produktu), pH, teplota, viskozita roztoku, mechanické nečistoty blokujúce aktívne centrá enzýmu, žiarenie (napr. gama lúče), elektrické a magnetické pole [28]

## 2.5. Konverzia lignocelulóзовých materiálov na bioetanol

Cieľom predúprav spomínaných v predchádzajúcej kapitole je maximalizovať výťažnosť bioetanolu v procese liehového kvasenia.

### 2.5.1. Etanolové kvasenie

Kvasný spôsob výroby etanolu je založený na pôsobení enzýmov v procese liehového kvasenia. Prebieha prevažne bez prístupu vzduchu, aj keď v prípade kvasiniek nejde o striktné anaeróbne podmienky. Mierne prevzdušnenie kvasného média na začiatku fermentácie je potrebné pre rast biomasy a ich aktivitu. Dochádza k postupnej utilizácii sacharidov a uvoľňovaniu energie, jej menšia časť je fixovaná vo forme ATP, zvyšok je premieňaný na teplo. [33] *S. cerevisiae* metabolizuje väčšinou hexózy, glukózu utilizuje cez Embden – Meyerhof – Parnasovu (EMP) dráhu, tiež ozačovanú ako hexózodifosfátová dráha. Sumárne je možné vyjadriť ju reakciou:



Energetická bilancia etanolového kvasenia vzťahnutá na 1 mol glukózy je zisk 2 molov ATP. [34] Okrem hlavných produktov vzniká v priebehu kvasenia celá rada ďalších látok. Najväčší význam má glycerol, ktorého tvorbu je možné ovplyvniť podmienkami fermentácie (pH, obsah siričitanov, použitá kultúra kvasiniek). Z vyšších jednosýtnych alkoholov sú ako súčasť prbudliny najvýznamnejšie izoamylalkohol, propanol a butanol. Prbudlina vzniká pevažne enzýmovými pochodmi z aminokyselín, v surovom liehu jej býva 0,1 - 0,5 %. Z ďalších produktov sa v surovom liehu vyskytujú acetaldehyd, kyselina jantárová, mravčia, mliečna a octová. Pri výrobe liehu z ovocia je nutné brať ohľad na vznik metanolu, ktorý sa tvorí enzymatickým rozkladom pektínu. [35], [36]

### 2.5.2. Very high gravity (VHG) fermentácia

VHG fermentácia je technológia produkcie bioetanolu založená na fermentácií vysoko koncentrovaných zápar, a to minimálne 270 g extraktu na 1 kg zápary. Je určená najmä pre spracovanie škrobnatých surovín: kukurica, pšenica, jačmeň, raž. VHG technológia umožňuje podstatné zvýšenie finálnej koncentrácie etanolu v prekvasenej zápare. Pri 20 °C a zvýšenom obsahu zdroja dusíka je možné dosiahnuť až 21 – 23 % obj. etanolu. Na dosiahnutie uvedených koncentrácií produktu neboli použité špeciálne pripravené alebo geneticky upravené kmene kvasiniek. Jediným problémom je nízky obsah dusíka v zápare, preto je potrebné ho pridávať. Stimuluje sa tým rast kvasiniek a zvyšuje rýchlosť fermentácie. Ekonomicky prijateľným zdrojom dusíka pre využitie v priemysle je močovina, avšak tá nesmie byť použitá pri výrobe pitného alkoholu. Dobrým zdrojom dusíka sú aj použité liehovarnícke kvasinky, ktoré sa nechajú autolyzovať a extrakt sa použije ako dusíkatý zdroj pre nasledujúcu fermentáciu. [37]

### 2.5.3. SHF (Oddelená hydrolýza a fermentácia)

Pri oddelenej hydrolýze a fermentácií je surovina najskôr predupravená a hydrolyzovaná. Vznikne tekutina obsahujúca fermentovateľné cukry (glukózu a xylózu), následne je hydrolyzát fermentovaný na etanol. Výhodou SHF je, že hydrolýza a fermentácia sú prevedené pri ich optimálnych podmienkach. Optimum enzýmovej hydrolýzy je 45 – 50 °C a pH 4,4 – 5,5, pričom optimum fermentácie je 30 – 35 °C a neutrálne pH. Nevýhodou je, že pri enzymatickom štiepení celulózy sa akumuluje celobióza, ktorá spôsobuje inhibíciu endoglukanázy a celobiohydrolázy, prívysoká koncentrácia vznikajúcej glukózy zase inhibuje enzým  $\beta$  - glukozidázu. Koncentrácia celobiózy preto nemôže byť príliš vysoká, a teda aj výtťažky etanolu sú nízke. [38]

### 2.5.4. SSF (Simultánna sacharifikácia a fermentácia)

Metóda simultánnej sacharifikácie a fermentácie bola vyvinutá v 70. rokoch minulého storočia. Jej princíp spočíva v tom, že k hydrolýze a tvorbe etanolu dochádza v rovnakom čase a v tom istom reaktore. Glukóza vzniknutá enzýmovou hydrolýzou celulózy je rýchlo spotrebovaná mikroorganizmami, čím sa zabraňuje jej nahromadeniu a z nej vyplývajúcej inhibícií. Rýchlosť sacharifikácie je v porovnaní so SHF vyššia, čím sa zvyšujú aj výtťažky etanolu. Jeho prítomnosť zabraňuje napadnutiu zmesi nežiadúcimi orgaanizmami, ktoré sú na jeho prítomnosť citlivé. Tiež sa znižuje tvorba nežiadúcich vedľajších produktov. SSF vyžaduje kompatibilné fermentačné a sacharifikačné podmienky, s podobným pH, teplotou a optimálnou koncentráciou substrátu. Pretože optimálna teplota hydrolýzy a fermentácie sa nezhodujú, bolo nutné nájsť kompromis – 37 – 38 °C. ďalšou možnosťou je použiť termotolerantné kmene kvasiniek schopné produkovať etanol pri teplotách vyšších ako 40 °C. Okrem vybraných kmeňov rodu *Saccharomyces* je možné pre tieto účely použiť niektoré kmene *Kluyveromyces* a *Fabospora*. Najlepšie výsledky sa však dosiahli použitím *Kluyveromyces marxianus* LG. [38], [39]

### 2.5.5. One-pot SSF

Koncept one-pot SSF vychádza z myšlienky spojiť krok predúpravy so simultánnou sacharifikáciou a fermentáciou. Všetky tieto deje sa odohrávajú v jednom reaktore. Predúprava sa používa alkalická (NaOH), zásadité pH sa neutralizuje prídavkom  $H_3PO_4$ . Ak by bol tento proces v budúcnosti prevedený v priemyselnom meradle, dala by sa nahradiť

sterilizácia fermentačného média predúpravou pri teplote 121 °C. [40] V roku 2012 publikoval Park *et al.* [41] štúdiu, v ktorej opísal výrobu etanolu z celulózy (Solka – Floc) v jedinom bioreaktore použitím *Acetomonium cellulolyticus* a *Saccharomyces cerevisiae*. Enzýmy potrebné na hydrolýzu celulózy boli produkované *A. cellulolyticus*, pridané v čase 0 hod. od začiatku fermentácie. Enzýmy boli produkované z celulóзовého substrátu Solka – Floc (SF). Využitelnosť tohoto procesu bola demonštrovaná v zavedenej biorafinérii na SF ako substráte. Optimalizácia procesu ukázala, že je dôležité zachovávať 10 – 20 % množstvo rozpusteného kyslíka v hydrolytickej a fermentačnej fáze. Inokulácia *S. cerevisiae* do média, v ktorom už sú prítomné bunky *A. cellulolyticum* musí byť v čase pred maximálnou celulólytickou aktivitou a súčasne medzi stredom exponenciálnej a stacionárnej fázy rastu *A. cellulolyticum*. Prakticky táto doba činila 60 hodín od jeho zaočkovania. V rovnakom čase sa do bioreaktora pridáva aj celulóza (SF) určená na hydrolýzu celulózami a následnú fermentáciu. Tento spôsob výroby bioetanolu nevyžaduje samostatnú predúpravu materiálu, ani externý prídavok enzýmov. [41]

### 2.5.6. Inhibícia etanolom

Mikrobiálne bunky reagujú na etanol tak, že jeho prítomnosti prispôbia svoj metabolizmus. Tento fenomén sa nazýva inhibícia etanolom. [42]

Kumulácia etanolu v kultivačnom médiu môže byť významným stresorom počas fermentácie. Aj napriek tomu, že je kvasinka *S. cerevisiae* veľmi etanol tolerantná, relatívne vysoké koncentrácie etanolu inhibujú rast buniek a delenie, ich viabilitu, znižuje sa produktivita fermentácie a ďalšie výtťažky etanolu. Etanol nepriaznivo ovplyvňuje bunkový metabolizmus, miestami, kde sa jeho nepriaznivý účinok najviac prejavuje sú bunkové membrány, plazmatické retikulum a hydrofóbne a hydrofilné proteíny. Priepustnosť membrán sa zvyšuje a znižuje sa ich integrita. Kvasinky vystavené etanolu syntetizujú HSP (heat shock proteins – proteíny tepelného šoku), ktoré fyziologicky ovplyvňujú ich toleranciu k alkoholu. V ďalších štúdiách bol dokázaný vplyv etanolu na transkriptóm *S. cerevisiae*. Do budúca sa predpokladá aplikácia mutantných kmeňov *S. cerevisiae*, ktoré sa javia ako ideálni producenti. [43]

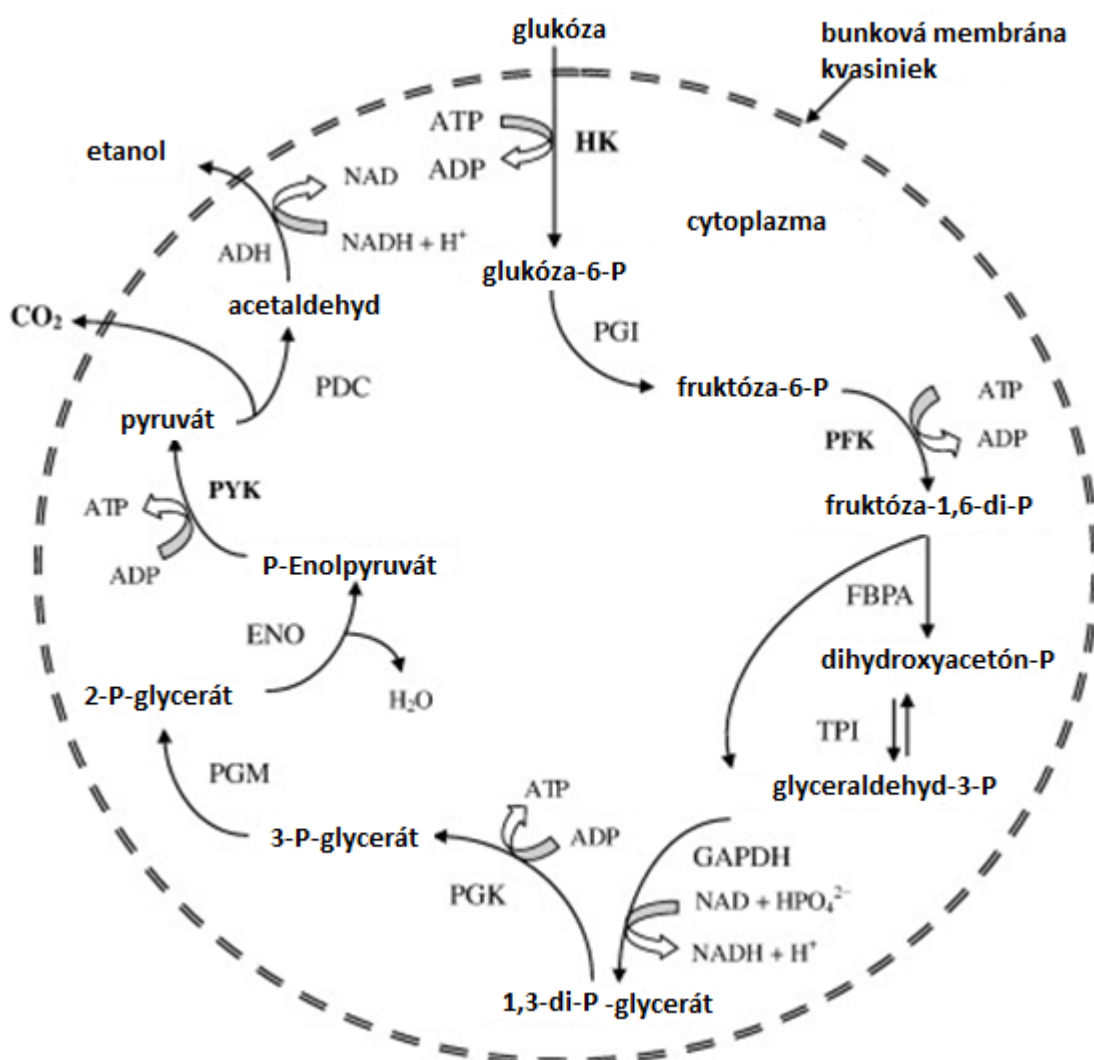
## 2.6. Mikroorganizmy produkujúce etanol

Etanol produkujú vo väčšom alebo menšom množstve rôzne mikroorganizmy, na cieľnú výrobu liehu sa ich však používa iba niekoľko druhov.

### 2.6.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Rod *Saccharomyces* patrí do triedy *Ascomyces*, rozmnožuje sa vegetatívne multilaterálnym pučaním. Bunky sú guľovitého alebo elipsoidného tvaru, vytvárajú rudimentárne alebo stromčekovité, bohato vetvené pseudomycélium. [34] Kvasinky rodu *Saccharomyces* sú najpoužívanejším producentom etanolu. Hlavná metabolická dráha etanolovej fermentácie je glykolýza (Embden – Meyerhof – Parnasova dráha – EMP). Touto dráhou vznikajú z jednej molekuly glukózy dve molekuly pyruvátu. Dráhu znázorňuje Obr. č. 5. Za anaeróbných podmienok sa pyruvát redukuje na etanol za vzniku CO<sub>2</sub> ako medziproduktu. V procese glykolýzy vznikajú 2 molekuly ATP, ktoré sa spotrebujú na energeticky náročný biochemizmus buniek. Produkcia etanolu je teda závislá od rastu buniek, ktoré po ukončení

reakcie tvoria biomasu. Rast buniek je nevyhnutný aj z toho dôvodu, že akumulácia ATP by inhibovala činnosť fosfofruktokinázy, ktorá je jedným z kľúčových enzýmov glykolýzy. Okrem etanolu a CO<sub>2</sub> ešte vznikajú medziprodukty, ako glycerol (v množstve 1% w/v), organické kyseliny a vyššie alkoholy sú produkované v oveľa menšej miere. Skutočné výťažky etanolu v porovnaní s teoretickými sú nižšie, pretože medziprodukty reakcie postupujú do iných metabolických dráh, čím sa výťažnosť etanolu znižuje. Percentuálne sa výťažnosť etanolu v priemyselných výrobách z celkových cukrov pohybuje v rozmedzí 90 – 93% teoretického výťažku, bez odpočítania zbytkového cukru. Napríklad, u škrobnatých materiálov by zbytkový cukor nemal prekročiť hranicu 5 g.l<sup>-1</sup>. Počas fermentácie sú kvasinky vystavené stresu z limitácie živinami, vysokej teplote (35 – 38 °C), pH (< 3,5), kontaminácií, akumulácií etanolu (15% v/w) a osmotického tlaku cukru (25% v/w). Veľa z nich pôsobí synergicky a v takých prípadoch má na bunku horší dopad ako keby pôsobil individuálne. Environmentálny stres vedie k zníženej viabilite buniek a nižšej výťažnosti etanolu. [42]



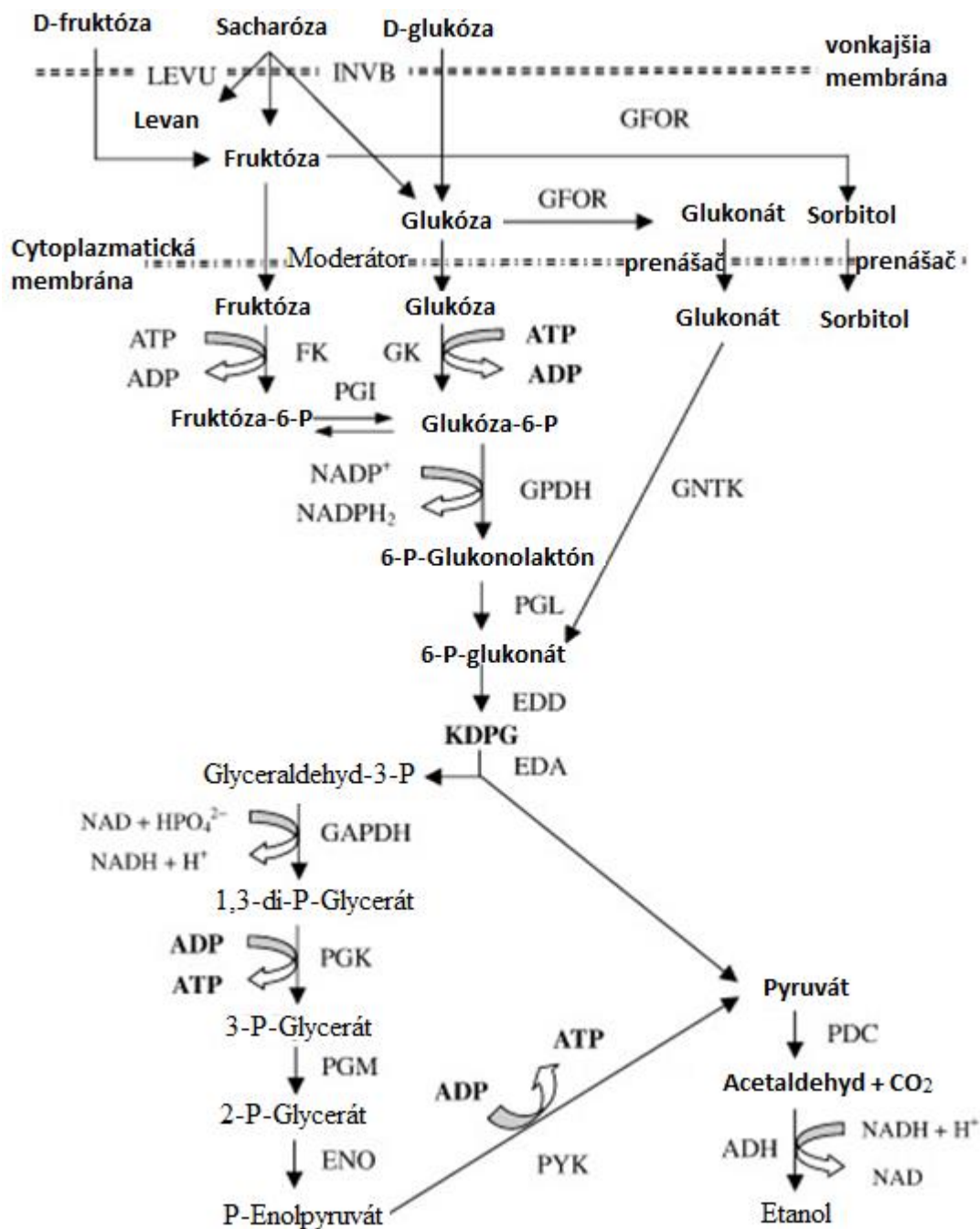
Obr. č. 6: Metabolická dráha etanolovej fermentácie kvasinkami *S. cerevisiae*. Význam skratiek v obrázku: HK: hexokináza, PGI: fosfoglukoizomeráza, PFK: fosfofruktokináza, FBPA: fruktoza bisfosfát aldoláza, TPI: trióza fosfát izomeráza,

*GAPDH*: glyceraldehyd 3-fosfo dehydrogenáza, *PGK*: fosfoglycerát kináza, *PGM*: fosfoglyceromutáza, *ENO*: enoláza, *PYK*: pyruvát kináza, *PDC*: pyruvát dekarboxyláza, *ADH*: alkohol dehydrogenáza

### **2.6.2. *Zymomonas mobilis***

*Z. mobilis* je anaeróbna, gram - negatívna baktéria produkujúca etanol z glukózy prostredníctvom Entner - Doudoroffovej (ED) dráhy za účinku enzýmu pyruvát dekarboxylázy a alkoholdehydrogenázy. *Z. mobilis* bol objavený v rastlinných výhonkoch obsahujúcich kvasiteľné cukry, napr. v agáve. V ED dráhe vznikajú glyceraldehyd-3-fosfát a pyruvát za vzniku iba 1 molekuly ATP na monomér glukózy. Dôsledkom toho produkuje *Z. mobilis* menej biomasy ako *S. cerevisiae*, čím sa spotrebuje viac energie na tvorbu etanolu. Výťažnosť etanolu je podľa niektorých zdrojov [44] je výťažnosť etanolu až 97 % teoretického výťažku. Napriek tejto výhode nie je *Z. mobilis* vhodný na priemyselnú výrobu bioetanolu. V prvom rade je schopný metabolizovať iba tri druhy cukrov: D-glukózu, D-fruktózu a sacharózu. Pri použití sacharózy dochádza k extracelulárnej tvorbe levanu a sorbitolu, čím sa zníži výťažok etanolu. Taktiež nie je vhodný na fermentáciu škrobnatých surovín a je problém so spracovaním biomasy, pretože na rozdiel od *S. cerevisiae* nemôže byť použitá ako krmivo pre zvieratá. Poslednou nevýhodou je diskontinuálna fermentácia, čím sa zvyšuje riziko vzniku väčšieho množstva zbytkového cukru. [42]





Obr. č. 6: Metabolická dráha *Z. mobilis*. Skratky: LEVU: levansukráza, INVb: invertáza, GFOR: glukóza-fruktóza oxidáza, FK: fruktokináza, GK: glukokináza, GPDH: glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, PGL: fosfogluconolaktonáza, EDD: 6-fosfogluconát dehydratáza, KDPG: 2-keto-3-deoxy-6-fosfogluconát, EDA: 2-keto-3-deoxy-glukonát aldoláza, GNTK: glukonát kináza [42]

### 2.6.3. Nežiaduce mikroorganizmy pri výrobe etanolu

V liehovarských záparách sa častokrát stretávame aj s kontaminujúcimi organizmami, ktoré procesu fermentácie škodia. Najčastejšie sa stretávame s baktériami, plesňami a divokými kvasinkami. [45]

- **Bakteriálna kontaminácia**

Baktérie môžu spôsobiť závažné problémy v priemyselnej produkcii etanolu. V kvase môžu byť prítomné stovky, ba až tisícky rôznych kontaminantov. Najväčšie problémy však spôsobujú baktérie mliečneho kvasenia. [46]

Do tejto skupiny patrí niekoľko rodov gram - pozitívnych, nesporulujúcich baktérií. Konkrétne sú to rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* a iné. Podmienky, pri ktorých dochádza k tvorbe etanolu sú optimálne pre rast a rozmnožovanie týchto baktérií – pH, teplota, nutričné zdroje. [47] Ďalšími bakteriálnymi kontaminantami sú baktérie maslového a octového kvasenia. Spoločným znakom týchto kontaminantov je produkcia iných metabolitov ako etanolu, čím sa nielen znižuje jeho výťažnosť, ale dochádza aj k utlmeniu alebo až umŕtveniu kvasiniek. Do kontaktu s kvasinkami sa dostávajú vodou, surovinou, zo vzduchu a nedostatočne premytých nádob a potrubí. Za zvlášť nebezpečné sa pokladajú spórotvorné baktérie. [48], [49]

- **Plesne a divoké kvasinky**

Plesne v liehovare bývajú známkou zanedbanej čistoty a nedostatočnej údržby prevádzky. Sú málo odolné voči vyššej teplote, nepredstavujú pre liehovar veľký problém. Vyskytujú sa najmä v procese dokvášania. Hotovému výrobku dávajú nepríjemnú chuť a vôňu, a taktiež znižujú výťažnosť. [45]

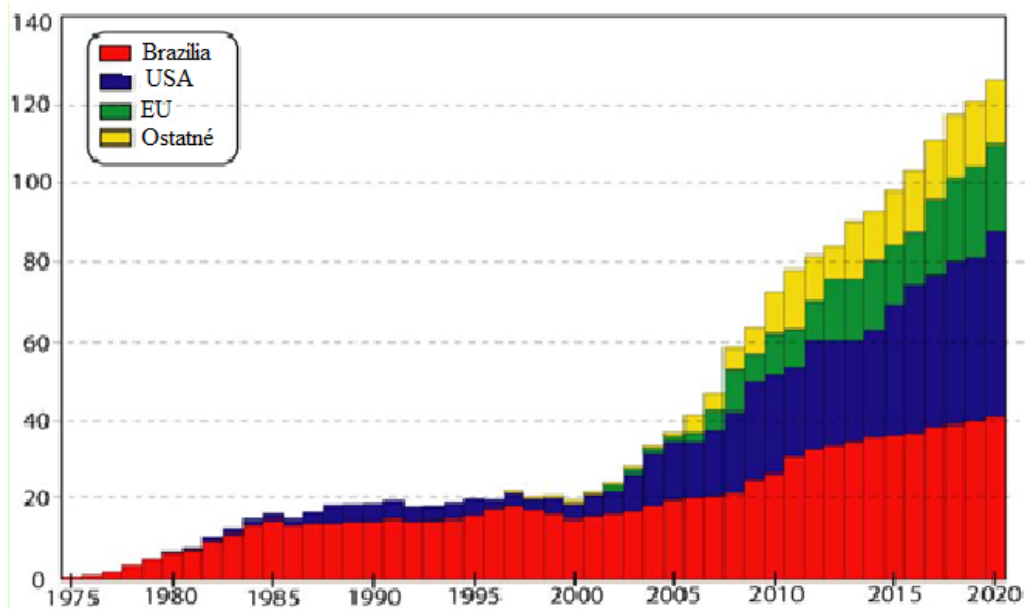
Zdrojom divokých kvasiniek je voda, vzduch a tiež surovina. Prejavujú sa najmä vo fáze dokvášania, tvoria v záparých povlak a oxidujú etanol až na vodu a oxid uhličitý. Ide najmä o rody *Candida* a *Pichia*. [48]

## **2.7. Bioetanol ako palivo**

Bioetanol je druh alternatívneho paliva. Jeho použitie je možné ako palivo s obsahom do 10% etanolu pre vozidlá s neprestávaným motorom, vyššie množstvá sú vhodné len u vozidiel so špeciálne prispôbenými zážehovými motormi. V praxi sa najčastejšie mieša s benzínom, najmä v pomere 85:15, čím vzniká palivo s označením E 85 (obsahuje 85% etanolu a 15% benzínu). Použitím tohoto typu paliva dochádza k znižovaniu emisií CO<sub>2</sub>, zvýšeniu oktánového čísla (znižuje tzv. klepanie motora, ku ktorému dochádza pri samovznietení paliva) a ďalšou veľkou výhodou je približne o tretinu nižšia cena v porovnaní s benzínom. Etanol je menej toxický než nafta, benzín alebo metanol a tým je environmentálne prijateľnejší. Nevýhodou jeho použitia je riedka sieť čerpacích staníc, problémy so štartovaním za mrazivého počasia a tiež fakt, že nie všetky vozidlá sú vhodné na prestavenie motora (platí to predovšetkým pre staršie vozidlá). [49] Etanol má tiež nižšiu energetickú hustotu a nižšiu tenziu pár ako benzín, čo sa podpisuje pod problémy so štartovaním za chladného počasia. Palivový etanol má nízke cetánové číslo, ktoré charakterizuje rýchlosť vznietenia paliva. V naftových motoroch môže byť použitý iba za prítomnosti aditív, napríklad ditercbutyl peroxidov. [50] Nízke cetánové číslo zapríčiňuje dlhú dobu vznietenosti a spôsobuje nízky výkon motoru. Vhodnými typmi automobilov sú takzvané FFV (flexible fuel vehicles), u ktorého je možné použitie klasického benzínu, ako aj zmesi s až 85% etanolu. [10]

## 2.8. Aktuálne využívanie bioetanolu ako paliva

V súčasnosti nachádzajú bioetanolové palivá uplatnenie takmer v každom štáte. [20] V roku 2013 bola celková svetová produkcia palivového etanolu 88,7 mld. litrov. [51]. Najväčším producentom sú USA tesne nasledované Brazíliou. Spoločne presahujú 80% celkovej svetovej produkcie. V USA je najviac používanou surovinou pre výrobu etanolu kukurica, v Brazílii zase cukrová trstina.



Obr. č. 7: Svetová produkcia palivového etanolu v miliardách litroch a prognóza do r. 2020 [15]

V roku 2003 Európska únia prijala smernicu Európskeho parlamentu a Rady o podpore využívania biopalív alebo iných obnoviteľných palív v doprave. Podľa nej majú členské štáty zabezpečiť, aby sa na trh uvádzalo aspoň minimálne percento biopalív a iných obnoviteľných pohonných hmôt. Referenčná hodnota pre tieto ciele činila 2%. [20] V ČR vyrobí štyria najväčší výrobcovia bioetanolu celkovo 370 000 m<sup>3</sup> za rok. [52] V Českej republike sa do konvenčného benzínu primiešava necelých 5% bioetanolu. ČR sa tiež zaviazala, že do roku 2020 zvýši podiel primiešavaného bioetanolu minimálne na 10%. [53] Vláda ČR podporuje biopalivá druhej generácie a o tejto skutočnosti svedčí aj fakt, že biopalivá prvej generácie majú mať maximálne 5% podiel na dosiahnutí 10% cieľa stanoveného na rok 2020. Po roku 2020 už biopalivá prvej generácie nemajú byť podporované. [54]

Vo východoslovenskej obci Strážske majú v prvej polovici roku 2017 spustiť výrobu liehovaru vyrábajúceho bioetanol z lignocelulóзовých materiálov. Ročne sa má v Strážskom vyrobiť až 55 000 ton bioetanolu. Bude v poradí tretím podnikom na sieti, ktorý nadviaže na technológiu Proesa používanú v liehovare v talianskom meste Crescentino a brazílskom Alagoase. [55]

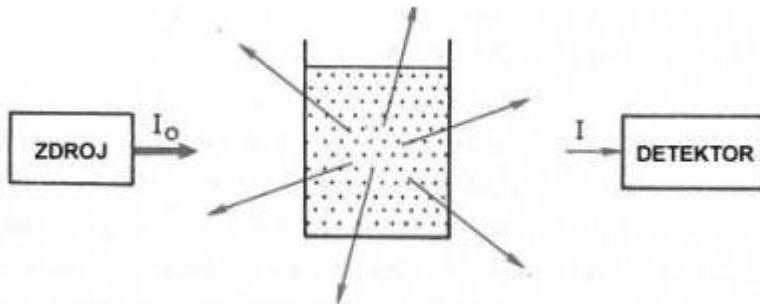
Jedným z perspektívnych odpadných materiálov je aj ryžová slama. Ku každému vypestovanému kilogramu ryže vzniká ako vedľajší produkt 1 – 1,5 kg slamy, ktorá sa hlavne používa ako krmivo pre dobytok, zvyšok tvorí odpad. [56] Ročne sa takto vo svete vyprodukuje až 731 miliónov ton, v samotnej Ázii je to 667,6 miliónov ton. Toto množstvo ryžovej slamy by mohlo vyrobiť až 205 mld. litrov bioetanolu, čím by sa mohla stať

najväčším surovinovým zdrojom na výrobu bioetanolu. [57] Nutnosťou je predúprava ryžovej slamy, ktorá sa robí za zvýšeného tlaku a teploty za účasti 4% NaOH a 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. [58]

## 2.9. Inštrumentácia

### 2.9.1. Turbidimetria

Turbidimetria je optická metóda založená na meraní stupňa zákalu (turbidity). Na časticiach dochádza k rozptylu žiarenia a čiastočne aj jeho absorpcii. Žiarenie dopadá na kvvetu ako u klasickej spektrofotometrie. Sleduje sa pokles intenzity žiarenia prechádzajúceho absorbujúcou a rozptyľujúcou vrstvou. Prejdené žiarenie má teda nižšiu intenzitu ako dopadajúce žiarenie. [59]



Obr. č. 8: Dráha lúča primárneho žiarenia [59]

Detektor je umiestnený v osi lúča a meria sa žiarenie ochudobnené o jeho rozptýlenú zložku. Je vodný aj pre koncentrovanejšie roztoky. [60]

Keď lúč prechádza „absolútne čistým“ prostredím, opisuje relatívne priamu trajektóriu. Keď lúč prechádza kvapalinou obsahujúcou suspendované pevné častice, tieto častice absorbujú energiu svetla a odrazia svetlo do všetkých smerov. Ako zdroj svetla sa používa polychromatická volfrámová lampa, ktorá vyžaruje svetlo o rôznych vlnových dĺžkach. Toto môže spôsobiť interferenciu pri turbidimetrickom meraní, pretože častice obsiahnuté vo vzorke môžu absorbovať určité vlnové dĺžky a znížiť tak intenzitu rozptýleného svetla. Ďalšou nevýhodou je, že výkon lampy sa časom znižuje a lampa „vyhasína“, čo vedie k nutnosti častej kalibrácie prístroja. Aby sa týmto problémom predišlo, obsahujú niektoré turbidimetre zdroj monochromatického žiarenia (napr. LED diódy), lasery, alebo sa v nich používajú rôzne kombinácie filtrov.

Detektory používané v turbidimetriách detegujú svetlo vzniknuté interakciou svetla zo zdroja so vzorkou, čím vzniká elektrický signál, ktorý je neskôr prevedený na hodnotu turbidity. Bežné typy používaných detektorov sú fotonásobiče, vákuové fotodiódy a ďalšie. [61]

### 2.9.2. Stanovenie sušiny biomasy

Stanovenie sušiny biomasy je najbežnejší spôsob stanovenia biomasy mikroorganizmov. Robí sa po záchyťe buniek z definovaného objemu média centrifugáciou s následným trojitým resuspendovaním buniek v destilovanej vode. Suspenzia sa potom vysuší v predom vysušených a odvážených kelímkoch pri teplote 105 °C do konštantnej hmotnosti. [62]

### 2.9.3. HPLC – Vysokoučinná kvapalinová chromatografia

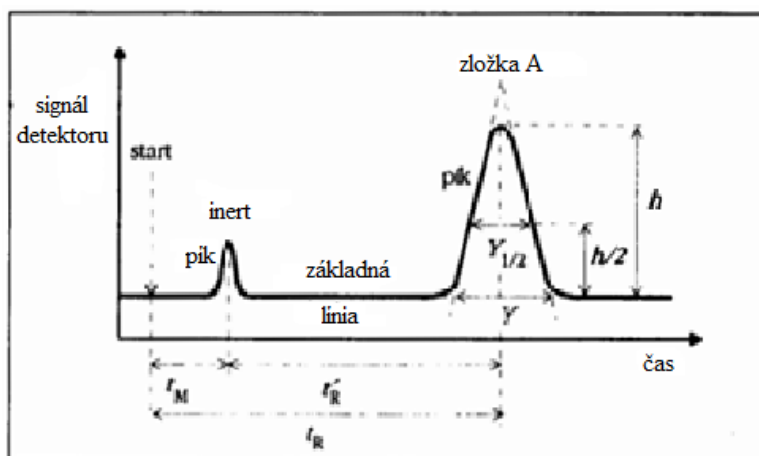
HPLC je analytická metóda separácie zložiek vo vzorke za účelom stanovenia jednotlivých analytov a ich kvantifikácie vo vzorke. Na rozdiel od bežnej stĺpcovej kvapalinovej chromatografie obsahuje HPLC vysokotlakové čerpadlo, ktoré umožňuje prietok mobilnej fázy kolónou menších rozmerov, v ktorej sa nachádza stacionárna fáza viazaná na častice o veľkosti niekoľkých mikrometrov. Vďaka tomuto usporiadaniu dosahuje HPLC vyššiu účinnosť separácie látok za kratší časový interval. HPLC využíva separáciu látok medzi dve fázy, pohyblivú a nepohyblivú. Nepohyblivá (stacionárna) fáza sa nachádza pevne viazaná v kolóne, pohyblivá fáza (eluent) unáša analyty kolónou. Výstupom nie len HPLC, ale aj ostatných chromatografických techník je chromatogram. [63]

V priebehu chromatografickej analýzy dochádza k opakovanému transportu zložiek z mobilnej fázy do stacionárnej a späť. Rozdelenie medzi dve fázy sa blíži rovnováhe, preto ho môžeme popísať dostribočnou konštantou:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m} = \frac{(n_A)_s}{(n_A)_m} \cdot \frac{V_m}{V_s} \quad (\text{rovnica č. 3})$$

kde  $[A]_s$  je množstvo látky v stacionárnej fázi a  $[A]_m$  je množstvo látky v mobilnej fázi,  $V_s$  a  $V_m$  sú objemy stacionárnej a mobilnej fázy. [64]

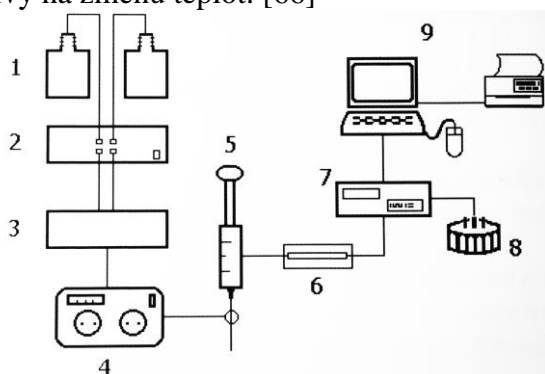
Pokiaľ sú zložky analyzovanej zmesi dobre rozdelené, odpovedá každej zložke jeden pík. Ten sa vyznačuje svojou polohou na x-ovej osi, kde je vynesý retenčný čas. Retenčný čas je veličina charakteristická pre každý analyt, je to doba od nástreku vzorky po jeho eluáciu. Retenčný čas teda súvisí s afinitou analytu k stacionárnej fázi. Na základe retenčných časov pri uvedených podmienkach je možné látky identifikovať, ide teda o kvalitatívnu analýzu. [65] Výška píku súvisí s intenzitou daného analytu, plocha píku zase vypovedá o jeho kvantitatívnom zastúpení.



Obr. č. 9: Grafické znázornenie retenčných charakteristík [64]

HPLC zostava pozostáva z dávkovača vzorky, ktorá je pomocou dávkovacej smyčky alebo automatického dávkovača (autosampleru) vpravená do prúdu mobilnej fázy. Na zabezpečenie pohybu mobilnej fázy a teda aj vzorky je nevyhnutné vysokotlakové bezpulzné čerpadlo. Aby mobilná fáza mohla prejsť kolónou, musí byť pod vysokým tlakom (až 40 MPa). Kolónou sa

rozumie spravidla nerezová trubica naplnená stacionárnou fázou. O jej schopnosti separovať určité zmesi na jednotlivé zložky rozhoduje náplň kolóny - stacionárna fáza. Detektory v HPLC merajú koncentráciu analytu sledovaním jednej z jeho vlastností. V prípade tejto diplomovej práce bol použitý refraktometrický detektor, ktorý má univerzálne použitie, no zároveň sa vyznačuje aj nižšou citlivosťou, je nekompatibilný s gradientovou elúciou a je citlivý na zmenu teplôt. [66]



Obrázok č. 10: Blokové schéma HPLC. (1) zásobníky mobilných fáz, (2) odplyňovač (degasser), (3) zmiešavač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorky, (6) chromatografická kolóna v termostate, (7) detektor, (8) zberač frakcií, (9) dátová stanica [63]

### 3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1. Použité prístroje, chemikálie a enzýmy

##### 3.1.1. Použité chemikálie

Na predúpravu substrátu boli použité nasledovné chemikálie:

- kyselina sírová 96% - p.a., LachNer, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- hydroxid sodný - čistý, PENTA, NaOH
- destilovaná voda, H<sub>2</sub>O

Na prípravu roztokov na stanovenie celulózy boli použité nasledovné chemikálie:

- kyselina sírová 96% - p.a., LachNer, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- kyselina octová 99,8% - p.a., LachNer, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>
- kyselina dusičná 65% - p.a., LachNer, HNO<sub>3</sub>
- destilovaná voda, H<sub>2</sub>O

Na prípravu pufov boli použité nasledovné chemikálie:

- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát – Lachema, a.s., Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O
- kyselina citrónová monohydrát – p.a., LachNer, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O

Na prípravu kultivačných a inokulačných médií boli použité nasledovné chemikálie:

- destilovaná voda, H<sub>2</sub>O
- kvasničný extrakt – pre bakteriológiu, Carl ROTH
- dihydrogenfosforečnan draselný – p.a., LachNer, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- síran horečnatý, heptahydrát – p.a., LachNer, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O
- síran amónny – p.a., LachNer, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- D-glukóza bezvodá – p.a., PENTA, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>
- kyselina sírová – 96%, p.a., LachNer, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- hydroxid sodný, čistý, PENTA, NaOH

Na prípravu kalibračných roztokov pre HPLC analýz boli použité:

- D-glukóza bezvodá – p.a., PENTA, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>
- etanol 99,9% - pre HPLC, Sigma – Aldrich, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH

Ďalšie chemikálie:

- azid sodný – p.a., PENTA, NaN<sub>3</sub>

##### 3.1.2. Použité prístroje

- analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- elektronické váhy Helago EK - 300
- centrifúga Eppendorf 5417 R
- inkubátor Memmert
- kombinovaná chladnička Bosch
- minitrepačka, Lab dancer Vario
- mixér Rohson MultiDuo R-536

- muflová pec VEB ELEKTRO BAD FRANKENHAUSEN
- pH meter inoLab® pH 720
- spektrofotometer Helios ε
- trepačka s termostatom Heidolph® Promax 1020
- topné hniezdo LTHS 500
- plynový kahan
- ultrazvuková čistička Ultrasound
- denzitomerter Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- mikrovlnná rúra Daewoo KOR-6L15, výkon 700W
- HPLC
  - detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
  - diferenciálny refraktometer RIDK 101
  - pumpa ECOM s.r.o.
  - sampler HTA HT300a
  - kolónový termostat LCO 101 ECOM s.r.o.
  - kolóna WATREX 250x8 mm Polymer IEX H+ o rozmeroch 250 x4,6 mm a zrnění 8 μm
- bežné laboratórne sklo a pomôcky

### 3.1.3. Použitý software

- MS Office (MS Word 2007, MS Excel 2007)

### 3.1.4. Použitý substrát

Ako substrát pre produkciu bioetanolu bola použitá zmes odpadného papiera s takým pomerom jednotlivých zložiek, aký sa bežne vyskytuje v zberniach odpadného papiera:

super biely papier 1,99%

biely papier 8,81%

noviny, časopisy 27%

lepenka 56,38%

zmiešaný, iný papier 5,86%

Údaje boli získané zo spoločnosti Zberné suroviny a.s., Žilina. Na základe týchto informácií bola pripravená zmes papiera odpovedajúca vyššie uvedenému percentuálnemu zastúpeniu.

### 3.1.5. Použitá kultúra

Ako produkčný mikroorganizmus bola vybraná kvasinka rodu *Saccharomyces cerevisiae* neznámeho kmeňa pochádzajúca z liehovaru Agroetanol, TTD, kde sa využíva na výrobu palivového etanolu z repnej melasy.

### 3.1.6. Použité enzýmy

- Novozymes® Biomass Kit, NS50013 (*celulázový komplex*)

Boli použité enzýmy od firmy Novozymes®, celulázový komplex katalyzuje rozklad celulózy na glukózu, glukooligosacharidy a celobiózu. Hlavnými produktmi tejto reakcie sú glukóza a celobióza. Pre dosiahnutie maximálneho výťažku enzymatickej hydrolýzy sa odporúča použiť optimálna zmes enzýmov, ktorá sa mení na základe pomeru celulózy, hemicelulózy a lignínu v substráte. Aktivita týchto enzýmov závisí od teploty hydrolýzy. Pre potreby vypracovania



tejto práce boli použité enzýmy z rady výrobkov *Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit*. [67]

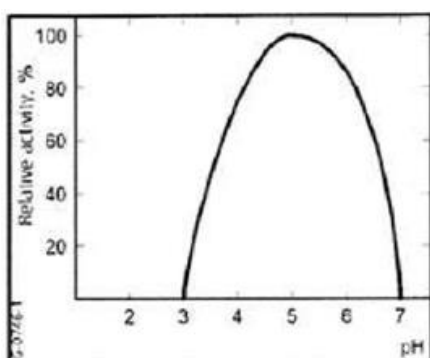
Tabuľka č. 2 - Enzymová aktivita preparátu NS50013, odporúčané pH, teplota a dávkovanie

Enzým <sup>1</sup>	Aktivita	Hustota <sup>2</sup> (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkovanie <sup>3</sup> % w/w (na TS)
NS50013 (celulázový komplex)	700 EGU/g (pribl. 70 FPU/g)	1,2	4,5 - 6,5	45 - 50	2 - 6 %

<sup>1</sup> - EGU endo-glucanase unit, FPU – filter paper unit

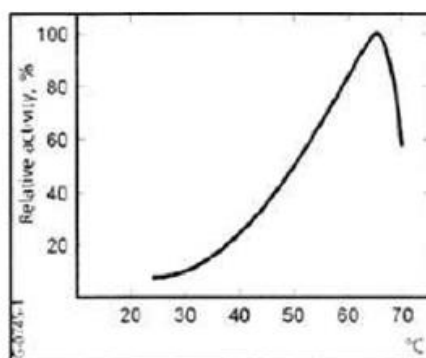
<sup>2</sup> – hodnota hustoty je približná

<sup>3</sup> – dávkovanie závisí od typu suroviny, použitej predúpravy a ďalších podmienok. Môže byť značne variabilné.



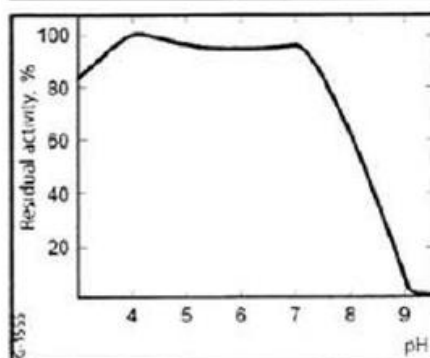
Obr. 1: Vplyv pH na enzymovú aktivitu NS20013

Koncentrácia enzýmu	0,009 EGU/ml
Teplota	50 °C (122 F)
Reakčný čas	20 minút



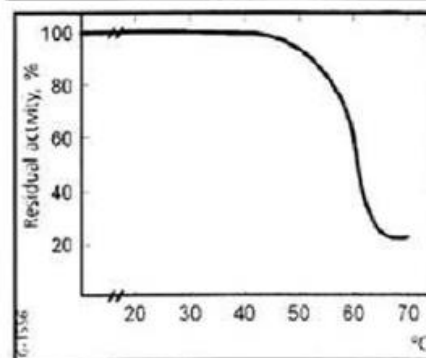
Obr 2: Vplyv teploty na aktivitu preparátu NS 50013

Koncentrácia enzýmu	0,009 EGU/ml
pH	4,8
Reakčný čas	20 minút



Obr. 3: Vplyv pH na stabilitu pripravku NS 50013

Koncentrácia enzýmu	0,9 EGU/ml
Teplota	25 °C (77 F)
Doba inkubácie	16 hodín
Pufir	McIlvaine



Obr. 4: Vplyv teploty na stabilitu NS 50013

Koncentrácia enzýmu	0,9 EGU/ml
pH	4,8
Reakčný čas	30 minút

Obr. č. 11: Vplyv pH a teploty na stabilitu preparátu NS50013 [67]

- NS50010 (β - glukozidáza)

Pre maximálny výťažok hydrolýzy lignocelulózových materiálov sa odporúča používať

$\beta$  - glukozidázu súčasne s preparátom NS50010 (celulázový komplex).  $\beta$  - glukozidáza hydrolyzuje celobiózu na glukózu, čím sa zvyšujú výtťažky cukrov dostupných pre mikroorganizmy. Odporúča sa pridávať v množstve 5 - 10% (V/V) celulázového komplexu (NS50013) pre úplnú hydrolyzu dostupnej celulózy.

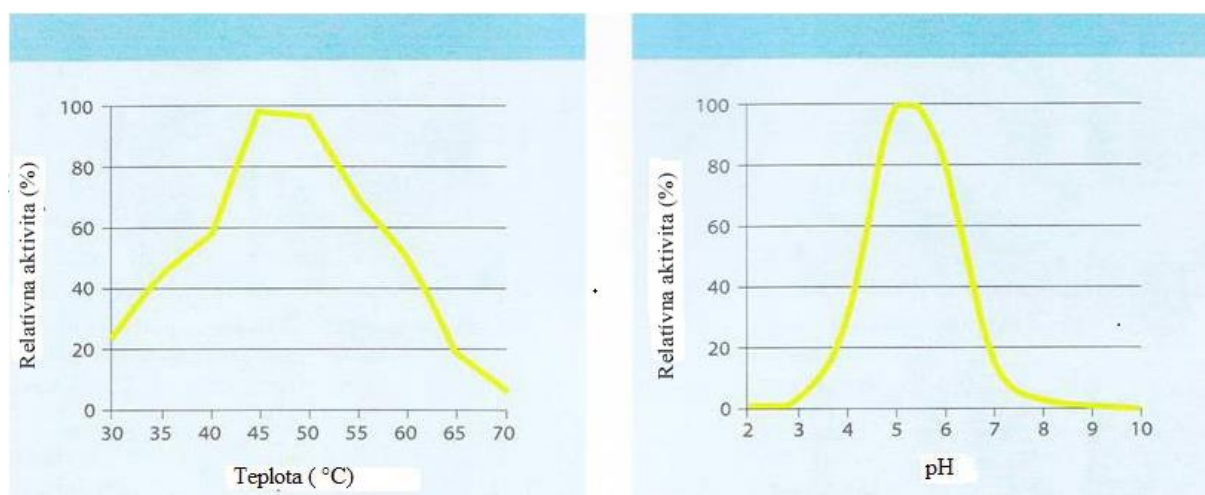
Tabuľka č. 3: Vplyv pH a teploty na stabilitu preparátu NS50010 [67]

Enzým <sup>1</sup>	Aktivita	Hustota <sup>2</sup> (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkovanie <sup>3</sup> % w/w (na TS)
NS50010 ( $\beta$ - glukozidáza)	250 CBU/g	1,2	2,5 - 6,5	45 – 70	0,2 - 0,6 %

<sup>1</sup> – CBU – cellobiose unit

<sup>2</sup> – hodnota hustoty je približná

<sup>3</sup> – dávkovanie závisí od typu suroviny, spôsobu predúpravy a ďalších podmienok spracovania, preto môže byť značne variabilné



Obr. č. 12: Vplyv teploty a pH na relatívnu aktivitu  $\beta$  – glukozidázy [67]

## 3.2. Príprava roztokov

### 3.2.1. Citrát – fosforečnanový pufr

17,77 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  bolo rozpustených v destilovanej vode v odmernej banke s objemom 200 ml. Roztok bol zriedený približne na 600 ml a pH bolo upravené prídavkom monohydrátu kyseliny citrónovej na hodnotu 4,8. Roztok bol kvantitatívne prevedený do odmernej banky s objemom 1000 ml a doplnený destilovanou vodou po rysku. pH bolo ešte raz skontrolované, roztok bol uchovávaný v chladničke.

### 3.2.2. Roztoky na stanovenie celulózy

Bola pripravená 80 % kyselina octová zmiešaním 864,5 ml koncentrovanej kyseliny octovej (99,8 %) s 129,67 ml destilovanej vody. Výpočet bol stanovený na riedenie do 1000 ml. Nariedená kyselina octová bola ďalej zmiešaná s koncentrovanou kyselinou dusičnou (65 %) v pomere 10 : 1. Takže k už pripravenej 80 % kyseline dusičnej bolo pridaných 100 ml koncentrovanej  $\text{HNO}_3$ . Na prípravu 72 % kyseliny sírovej sa použilo

667,7 ml koncentrovanej kyseliny (96 %) zmiešaním s destilovanou vodou do objemu 1000 ml.

### 3.2.3. Príprava inokulačného a kultivačného média pre kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*

Bolo pripravené štandardné médium pre kultiváciu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* podľa nasledovnej tabuľky:

Tabuľka č. 4: Zloženie inokulačného a kultivačného média kvasiniek *S. cerevisiae*

destilovaná voda	1000 ml
kvasničný extrakt	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g

Pri príprave inokulačného média sa k roztoku pridalo 100 g glukózy ako zdroja uhlíku. pH bolo upravené kyselinou sírovou riedenou v pomere 1:1 na hodnotu 5,5. Pred použitím boli média sterilizované pri teplote 120 °C po dobu 15 min.

### 3.2.4. Príprava mobilnej fázy pre HPLC

Ako mobilná fáza bol použitý prefiltrovaný roztok 9 mmol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Bol vypočítaný objem koncentrovanej kyseliny sírovej 580 µl. Tento objem bol napipetovaný do 1000 ml odmernej banky s vodou a objem bol doplnený po rysku. Roztok bol dôkladne premiešaný a prefiltrovaný cez nitrocelulózový membránový filter s veľkosťou pórov 0,45 ± 0,006 µm. Tým sa mobilná fáza zbavila prípadných nečistôt a po preliatí do zásobnej nádoby bola vložená na ultrazvuk po dobu 30 minút, aby došlo k odplyneniu.

### 3.2.5. Príprava kalibračných roztokov glukózy a etanolu

Pred HPLC analýzou produktov enzýmovej hydrolýzy a SSF boli pripravené sady kalibračných roztokov glukózy a etanolu. Najskôr boli pripravené roztoky o najvyššej koncentrácii, ktoré sa postupne riedili.

Tabuľka č. 5: Príprava kalibračných roztokov glukózy a etanolu

	c [g.l <sup>-1</sup> ]									
glukóza	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
etanol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

### 3.2.6. Roztoky na predúpravu substrátu

Na základe štúdie [68] boli zvolené 2 % w/V roztoky kyseliny sírovej a hydroxidu sodného. Pri týchto koncentráciách boli v uvedenej štúdií dosiahnuté najlepšie výsledky.

Na kyslú hydrolýzu bola vypočítaná navážka 20 g NaOH na 1000 ml destilovanej vody. Roztok bol hneď použitý k spotrebe. Obdobne bol vypočítaný objem koncentrovanej kyseliny sírovej. Nariedením 11 ml 96 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a doplnením destilovanou vodou na výsledný objem 1000 ml bola dosiahnutá požadovaná koncentrácia 2 % w/V.

### 3.3. Predúprava substrátu

Hlavnou zložkou lignocelulóзовých materiálov je lignín, celulóza a hemicelulóza. Aby došlo k zlepšeniu dostupnosti celulózy pre enzýmový komplex, bolo nutné substrát predupraviť.

V práci sú použité štyri typy predúprav:

1. Fyzikálna predúprava: Substrát bol nastrihaný na malé časti, rozmočený vo vode a pomletý vlhkým mletím v kuchynskom mixéri. Materiál bol sfiltrovaný a znova prepraný vo vode. Vzniknutý filtračný koláč bol sušený v tenkej vrstve v sušiarňi pri 105 °C, po vysušení bol pomletý v kuchynskom mixéri pre dosiahnutie prachovej konzistencie. Tento typ predúpravy slúžil jednak priamo na enzýmovú hydrolýzu a SSF, ale tiež ako základ chemických predúprav, ktoré sú popísané v ďalších bodoch.

V prípade chemických hydrolýz sa zvolilo množstvo substrátu 3 g (2% w/w). Táto hodnota bola experimentálne stanovená ako najoptimálnejšia v diplomovej práci Ing. Andriovej [69]. Hydrolýzy prebiehali v mikrovlnnej rúre pri maximálnom výkone – 700 W. Následne bola zmes ochladená, prefiltrovaná cez gázu a premývaná vodou až do neutrálnej reakcie. Prebytočná voda bola vytlačená a filtračný koláč bol sušený v sušiarňi pri teplote 105 °C. Po vysušení bol materiál dezintegrovaný v mixéri.

2. Kyslá predúprava: Substrát pripravený mechanickou dezintegráciou bol hydrolyzovaný v 150 ml 2 % roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hydrolýza prebiehala v mikrovlnnej rúre po dobu 8 minút a pri výkone 700W.
3. Zásaditá predúprava: Substrát pripravený mechanickou dezintegráciou bol hydrolyzovaný v 150 ml 2% roztoku NaOH. Hydrolýza prebiehala v mikrovlnnej rúre po dobu 10 minút a pri výkone 700 W. Počas hydrolýzy dochádzalo k búrlivej reakcii a intenzívnemu peneniu, preto bol ohrev častokrát prerušený a substrát premiešaný.
4. Kombinácia kyslej a zásaditej predúpravy: V prvom kroku sa postupovalo analogicky ako v prípade kyslej hydrolýzy – 3 g substrátu boli hydrolyzované v 150 ml 2 % roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pri plnom výkone mikrovlnnej rúry po dobu 8 minút. Po ochladení, prefiltrovaní a premytí substrátu vodou až do neutrálnej reakcie bol filtračný koláč kvantitatívne prevedený do novej kadičky so 150 ml 2 % roztoku NaOH. Hydrolýza prebiehala pri plnom výkone mikrovlnnej rúry po dobu 10 minút. Penenie v tomto prípade bolo menej intenzívne ako v predchádzajúcom. Po ukončení reakcie bol substrát ochladený na laboratórnu teplotu, prefiltrovaný, premytý vodou do neutrálnej reakcie, vysušený v sušiarňi pri 105 °C a dezintegrovaný na prach v kuchynskom mixéri.

### 3.4. Kvantitatívne stanovenie vybraných zložiek substrátu

Pre lepšie pochopenie zloženia a vlastností substrátu bola prevedená kvantitatívna analýza sušiny, popola a celulózy u každého typu predúpravy.

#### 3.4.1. Stanovenie sušiny v substráte

Žihacie kelímky boli sušené v sušiarňi pri teplote 105 °C po dobu 1 hodina. Po vychladnutí v exsikátore boli odvážené na analytických váhach s presnosťou na 0,0001 g. Do kelímkov

bol navážený substrát s približnou hmotnosťou 0,5 g, presná hodnota bola zvážená na analytických váhach a táto hodnota bola zaznamenaná. Kelímky boli umiestnené v sušiarňi na dobu 4 hodiny a pri teplote 105 °C. Po uplynutí tejto doby boli vychladené v exsikátore a ich hmotnosť bola opäť zistená pomocou analytických váh. Percentuálne zastúpenie sušiny vo vzorke bolo vypočítané nasledovným vzorcom:

$$\% \text{ sušina} = \frac{m_{(\text{kelímok+vzorka po vysušení})} - m_{(\text{prázdny kelímok})}}{m_{(\text{vzorka pred vysušením})}} \cdot 100\% \quad (\text{rovnica č. 3})$$

### 3.4.2. Stanovenie obsahu popola

Prázdne žihacie kelímky boli vložené do muflovej pece na 30 minút pri 550 °C. Po vychladnutí v exsikátore boli zvážené a bol do nich navážený 1 g substrátu (analytické váhy, presnosť na 0,0001 g). Kelímky so substrátom boli žihané nad kahanom až do jeho úplného rozkladu a vzniku popola. Následne boli premiestnené do muflovej pece na dobu 3 hodiny pri teplote 550 °C, aby došlo k dokonalému rozkladu uhlíkatých látok. Po troch hodinách boli kelímky z pece vybraté a umiestnené do exsikátora. Po vychladnutí v exsikátore boli kelímky zvážené na analytických váhach a percentuálne zastúpenie popola bolo vypočítané nasledovným vzorcom:

$$\% \text{ popol} = \frac{m_{(\text{kelímok+vzorka})} - m_{(\text{prázdny kelímok})}}{m_{(\text{popol})}} \cdot 100 \quad (\text{rovnica č. 4})$$

### 3.4.3. Stanovenie celulózy

Bolo pripravených 4×30 ml zmesi 80 % kyseliny octovej a koncentrovanej kyseliny dusičnej v pomere 10 : 1. Do štyroch Erlenmayerových baniek s objemom 100 ml bolo vpravených po 0,8 g papiera (papier bol odvážený na analytických váhach s presnosťou na 0,0001 g), do každej banky bolo vliatych 30 ml zmesi kyselín. Bol pripravený vriaci kúpeľ, v ktorom boli banky ponechané po dobu 1 hodiny. Aby nedochádzalo k veľkému odparu kvapaliny, boli do hrdiel baniek vložené sklené nálevky. Po 1 hodine boli banky z kúpeľa vybraté, nechali sa ochladiť pri laboratórnej teplote a ich obsah bol prefiltrovaný cez nuče s fritou (veľkosť pórov S4). Nuče boli vopred zvážené na analytických váhach, pevný podiel bol dôkladne premývaný etanolom a sušený v sušiarňi pri teplote 105 °C po dobu 4 hodiny. Po uplynutí tohoto času boli frity vychladené v exsikátore a odvážené na analytických váhach. Obsah každej frity bol zmočený etanolom a kvantitatívne prevedený do 100 ml Erlenmayerových baniek. Etanol bol odparený umiestnením baniek do vriaceho kúpeľa. Po vychladnutí baniek k nim bolo pridaných 20 ml 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, vzniknutá suspenzia bola temperovaná na trepačke pri 30 °C a 150 rpm po dobu 60 minút. Počas temperovania vzoriek s kyselinou sírovou boli pripravené a na analytických váhach odvážené nuče s fritou (S3). Do nich bol vpravený pevný podiel z baniek a bol filtrovaný za zníženého tlaku. Vzorka bola počas filtrovania premývaná etanolom. Nuče so vzorkami boli sušené v sušiarňi pri 105 °C 4 hodiny, následne boli ochladené v exsikátore. Po vychladnutí boli zvážené na analytických váhach. Percentuálne zastúpenie celulózy vo vzorkách bolo vypočítané nasledovným vzorcom:

$$\% \text{ celulózy} = \frac{(m_{S4+vzorka} - m_{S4}) - (m_{S3+vzorka} - m_{S3})}{m_{(\text{navážka papiera})}} \cdot 100 \quad (\text{rovnica č. 5})$$

### 3.5. Rastová krivka *Saccharomyces cerevisiae*

Rastová krivka kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* bola stanovovaná pri 2 rôznych teplotách a použitím dvoch rôznych foriem mikroorganizmov. V prvom prípade išlo o sušenú formu tak, ako bola dodaná z firmy Agroetanol, TTD. V druhom prípade boli kvasinky pred stanovením rastovej krivky viabilizované – bolo pripravené inokulum s prídavkom glukózy tak, ako je uvedené v tabuľke č. 4. Na zaočkovanie rastového média bolo z inokula odobratých 10 ml suspenzie medzi 12. a 13. hodinou kultivácie, kedy *S. cerevisiae* dosahuje stred exponenciálnej fázy (vyplýva to zo zistení tejto práce uvedených v kapitole 4.4).

Celkovo bola zostavená rastová krivka pre 4 rôzne podmienky:

1. 30 °C, zaočkované sušenými kvasinkami
2. 45 °C, zaočkované sušenými kvasinkami
3. 30 °C, zaočkované inokulom
4. 45 °C, zaočkované inokulom

Pri použití sušených kvasiniek bol do banky s 200 ml kultivačného média pridaný 1 g sušiny. Banka bola umiestnená na temperovanú trepačku s otáčkami 130 rpm. Kultivácia prebiehala bez vonkajších zásahov 26 hodín. Množstvo mikroorganizmov pri každom odbere bolo stanovené dvomi spôsobmi – turbidimetricky a gravimetricky (podrobnejší popis týchto analytických metód sa nachádza v štátiach 3.5.1 a 3.5.2). Turbidimetrické stanovenie množstva buniek sa robilo každú hodinu, odoberala sa vzorka s objemom 2,5 ml. Vzhľadom k objemu média sa vzorky na gravimetrické stanovenie odoberali každé 2 hodiny v objeme 10 ml.

#### 3.5.1. Turbidimetrické stanovenie optickej hustoty buniek

2,5 ml odobranej vzorky bolo vpravených do kyvety a optická hustota bola meraná na prístroji Ultrospec™ 10 pri vlnovej dĺžke 600 nm. Ako blank bolo použité nezaočkované médium. Každá vzorka bola premeraná trikrát, v prípade, že absorbanca bola vyššia ako 1, boli vzorka aj blank riedené v pomere 1 : 1.

#### 3.5.2. Gravimetrické stanovenie sušiny biomasy

Vzorka s objemom 10 ml odobraná každé 2 hodiny bola centrifugovaná na prístroji Eppendorf 5417 R po dobu 10 minút pri otáčkach 6000 rpm. Supernatant bol odpipetovaný, biomasa bola resuspendovaná v malom objeme destilovanej vody a premiešaná na vortexe. Centrifugácia a resuspendácia biomasy bola celkovo prevedená trikrát. Bunky boli kvantitatívne prevedené na dopredu vysušenú a zváženú odparovaciu misku, v ktorej boli sušené pri teplote 105 °C v sušiarňi. Po odparení všetkej kvapaliny bola miska s biomasou zvážená na analytických váhach, z rozdielu hmotností prázdnej misky a misky s biomasou bolo vypočítané množstvo buniek v médiu v čase odberu. Následne, podľa vzorca  $c = \frac{m}{V}$  bola hmotnosť buniek prepočítaná na ich koncentráciu v čase odberu. Z týchto hodnôt v závislosti na čase bol vytvorený graf.

### 3.6. Enzymová hydrolýza substrátu – odpadného papiera

Substrát bol podrobený enzymovej hydrolýze. Vzorky odpadného papiera s rôznymi typmi predúprav boli navážené na predvážkach s presnosťou na 0,01 g. Navážky sa volili v dvoch rôznych koncentráciách – 6% w/V a 8% w/V, čo činilo 3 a 4 g. Vzorky boli vložené do Erlenmayerových baniek s objemom 100 ml, ku každej vzorke bolo pridaných 50 ml citrát -

fosforečnanového pufru s pH 4,8. Substrát a pufr boli súčasne sterilizované vo vriacom vodnom kúpeli po dobu 15 minút. Aby bola zabezpečená aseptickosť hydrolýzy, bol po vychladnutí do každej banky pridaný azid sodný v množstve 0,02 % w/V (tj. 0,01 g). Enzýmy boli pridávané v dvoch rôznych množstvách. V prvom prípade to bolo 6 % w/w celulóзовého komplexu na TS a 0,6 %  $\beta$ -glukozidázy na TS. V druhom prípade bol vyskúšaný vyšší obsah enzýmov – 8 % w/w celulóзовého komplexu na TS a 0,8 %  $\beta$  - glukozidázy na TS. Hydrolýza prebiehala pri dvoch rôznych teplotách – 40 a 45 °C. Banky boli umiestnené na trepačkách s miešaním 130 rpm. Celkový čas priebehu hydrolýzy bol 136 hodín, odbery sa robili v nasledovných hodinách: 1, 3, 13, 17, 22, 27, 37, 44, 51, 61, 69, 75 a 138. Po odberoch boli vzorky okamžite zamrazené, aby sa zabránilo ďalšej činnosti enzýmu. Substrát, ktorý zostal po hydrolýze, bol použitý na analýzu množstva zvyškovej celulózy.

### 3.7. Simultánna sacharifikácia a fermentácia

Simultánnej sacharifikácií a fermentácií bol podrobený papier so všetkými typmi predúprav. Celkovo boli SSF podrobené 4 vzorky (s fyzikálnou, kyslou, zásaditou a kombinovanou kyslo - zásaditou predúpravou). Odber sa robil v priebehu 150 hodín. Zvolené množstvo substrátu bolo 6 g (8% w/V). Boli použité rovnaké enzýmy ako v prípade hydrolýzy, celulóзовý komplex bol pridaný v množstve 6 % w/w na TS,  $\beta$  - glukozidáza sa pridávala v 10 - násobne menšom objeme. Fermentácia prebiehala v bankách o objeme 250 ml. Banky boli počas celej doby fermentácie umiestnené v temperovanej trepačke, pri teplote 40 °C a otáčkach 150 rpm. Ako reakčné prostredie bol zvolený citrát – fosforečnanový pufr s pH 4,8, ktorého príprava je popísaná v stati 3.2.1 a ktorý bol použitý aj na enzýmovú hydrolýzu. Médium bolo zaočkované 12 - hodinovým inokulom *S. cerevisiae* v čase 0 hod. (kvasinky a enzýmy boli pridané v rovnakom čase). Inokulum bolo pripravené suspendovaním 1 g kultúry sušených kvasiniek *S. cerevisiae* a ich kultiváciou pri 30 °C a otáčkach 130 rpm v laboratórnej trepačke. Bunky boli zaočkované v množstve 20 % V/V, čo prakticky činilo 15 ml. Optická hustota supernatantu, ktorým bolo médium zaočkované, bola  $0,51 \pm 0,02$ . Odber vzoriek na HPLC analýzu bol robený v čase 1, 8, 20, 30, 43, 53, 69, 83, 91, 115, 121, 136 a 150 hodín. Odoberala sa vzorka s objemom 2 ml do skúmavok typu Eppendorf, ktoré boli okamžite po odbere vložené do mraziaceho boxu, aby sa zabránilo ďalšiemu priebehu fermentácie. Pred HPLC analýzou bol obsah Eppendorf skúmaviek centrifugovaný po dobu 10 min.

### 3.8. HPLC stanovenie výsledkov

Produkty hydrolýzy a simultánnej sacharifikácie a fermentácie boli stanovené pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie. Ako mobilná fáza bola použitá 9 mmol.l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jej prietok bol nastavený na 1 ml.min<sup>-1</sup> a nemenil sa počas celej doby analýzy. Čas analýzy bol pri glukóze nastavený na 10 minút a pri etanole na 20 minút. Na zistenie koncentrácie analytov vo vzorkách bolo potrebné zostrojiť kalibračnú krivku. Tá bola pre glukózu aj etanol 10 - bodová, bola teda zostrojená rada o 10 koncentráciách. Po analýze boli stanovené retenčné časy analytov a integráciou bola zistená plocha jednotlivých pík. Plocha týchto pík bola vynesena do grafu v závislosti od známej koncentrácie a prepočtom pomocou rovnice lineárnej regresie boli stanovené koncentrácie konkrétnych analytov vo vzorkách.

### **3.9. Štatistické spracovanie výsledkov**

Všetky namerané hodnoty v tejto práci boli stanovené trikrát, aby mohli byť štatisticky vyhodnotiteľné. Spracovanie bolo prevedené pomocou programu MS Excel. Z každej sady výsledkov bol vypočítaný priemer pomocou funkcie AVERAGE a interval spoľahlivosti pomocou CONFIDENCE. Pracovala som s hladinou štatistickej významnosti  $\alpha = 0,05$ . Všetky získané výsledky dosiahnuté v práci sú uvedené a popísané v kapitole *Výsledky a diskusia*. Vo väčšine prípadov neboli chybové úsečky vynášané do grafov, pretože ich hodnota bola príliš malá v grafe by boli zle viditeľné.



## 4. VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1. Kvantitatívne stanovenie vybraných zložiek substrátu

#### 4.1.1. Stanovenie sušiny v substráte

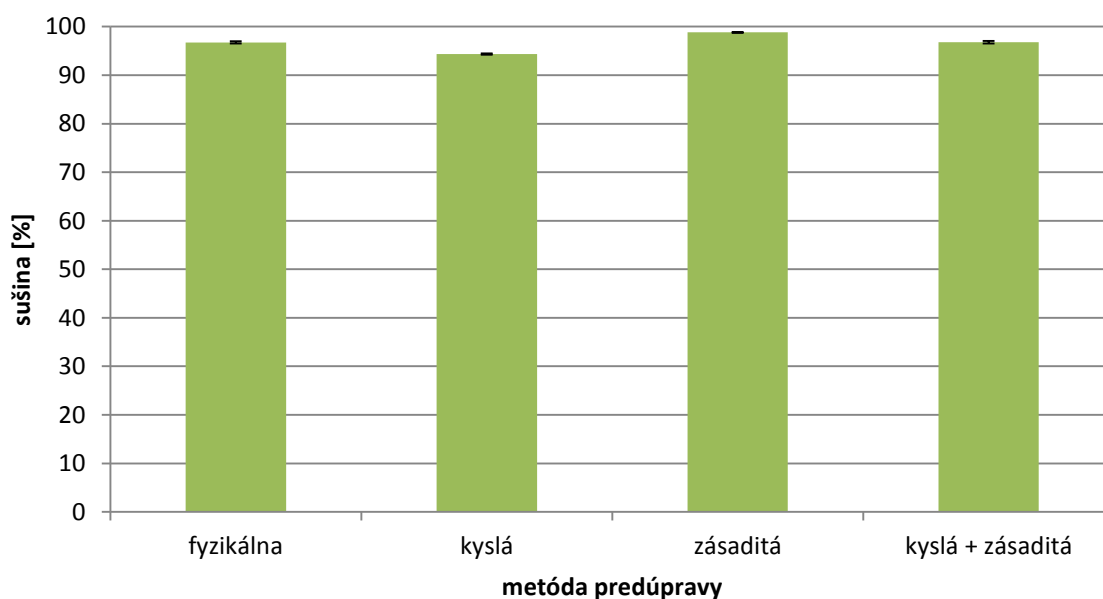
Pri stanovení sušiny sa bral ohľad na typ predúpravy papiera. Na stanovenie bol použitý postup a výpočtový vzorec uvedený v kapitole 3.4.1. Výsledky sú spracované v tabuľke č. 6.

Tabuľka č. 6: Stanovenie sušiny substrátu s rôznou predúpravou:

Predúprava	prázdny kelímok [g]	kelímok + substrát [g]	substrát po vysušení [g]	sušina %	IS
fyzikálna	33,270	33,789	33,771	96,59	0,24
	33,276	33,791	33,771	96,25	
	33,280	33,788	33,772	96,75	
kyslá	35,237	35,733	35,705	94,38	0,14
	35,238	35,701	35,676	94,43	
	35,236	35,784	35,752	94,16	
zásaditá	20,976	21,472	21,466	98,83	0,1
	20,975	21,488	21,481	98,65	
	20,978	21,460	21,454	98,86	
kyslá + zásaditá	35,688	36,197	36,181	96,80	0,28
	35,680	36,200	36,181	96,29	
	35,691	36,219	36,202	96,83	

Z vyššie uvedenej tabuľky vyplýva, že spôsob predúpravy substrátu má na obsah sušiny nevýznamný dopad.

Graf č. 1: Zastúpenie sušiny v zmesnom odpadnom papieri s rôznym typom predúpravy



#### 4.1.2. Stanovenie obsahu popola

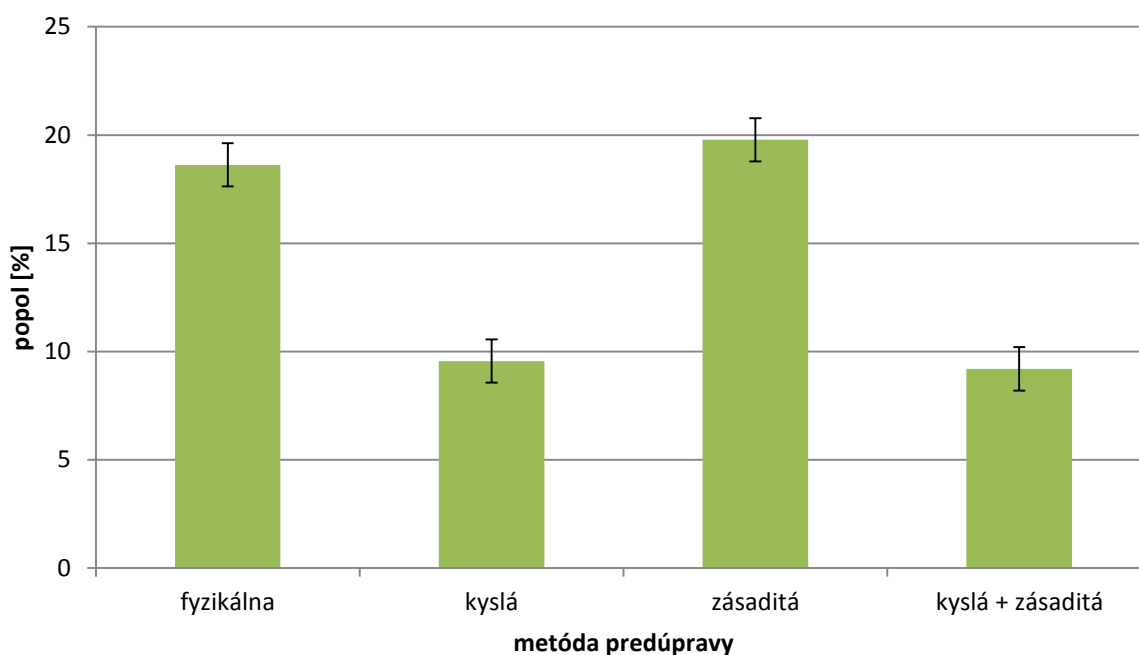
Podľa postupu v kapitole 3.4.2 bolo stanovené množstvo popola u všetkých typov predúprav papiera. Výsledky sú spracované v tabuľke č. 7 a v grafe č. 2. Množstvo popola bolo vypočítané vzťahom uvedeným v stati 3.4.2.

Tabuľka č. 7: Závislosť množstva popola od typu predúpravy:

Predúprava	prázdny kelímok [g]	navážka papiera [g]	vyžiháný papier + kelímok [g]	popol %	IS
fyzikálna	15,379	1,004	15,566	18,62	1,020
	15,378	1,009	15,579	19,91	
	15,376	1,106	15,604	20,64	
kyslá	18,838	0,999	18,934	9,56	1,020
	18,856	0,985	18,972	11,74	
	18,027	0,975	18,133	10,96	
zásaditá	18,474	1,020	18,676	19,78	0,129
	18,578	1,049	18,783	19,51	
	18,561	1,058	18,768	19,62	
kyslá + zásaditá	15,162	0,999	15,254	9,20	1,027
	15,267	0,995	15,361	9,39	
	15,395	1,028	15,510	11,21	

Na rozdiel od predchádzajúceho stanovenia sa obsah popola v závislosti od jednotlivých predúprav líši. V prípade fyzikálnej a zásaditej hydrolýzy je percento popola vysoké, naopak, u kyslej a kombinovanej hydrolýzy je približne o polovicu menšie. Popol je zvyšok po pyrolýze substrátu, zväčša ide o neuhlíkaté látky buď prirodzene sa vyskytujúce v substráte (napr. minerálne látky) alebo o látky pridvané do substrátu v procese výroby (citacia?). V prípade papiera ide najmä o plnidlá, všeobecne platí, že čím je papier kvalitnejší, tým väčší podiel plnidiel obsahuje. Z vyššie uvedenej tabuľky je preto zrejmé, že kyslé prostredie má výrazný vplyv na rozpúšťanie plnidiel. Toto je pre priemyselnú výrobu žiaduce, pretože plnidlá pôsobiť inhibične na mikroorganizmy. Z tohoto pohľadu sa výhodne javí použitie kyslej, alebo kyslo – zásaditej hydrolýzy.

Graf č. 2: Zastúpenie popola v zmesnom odpadnom papieri s rôznym typom predúpravy



#### 4.1.3. Stanovenie celulózy

Obsah celulózy bol zisťovaný u všetkých typov predúprav. Táto informácia je zásadná z dôvodu zistenia teoretického množstva glukózy skvasiteľnej na alkohol. Z podielu skutočného množstva glukózy v hydrolyzáte a teoretickou hodnotou sa dá získať informácia o výťažnosti. Stanovenie obsahu celulózy prebehlo podľa návodu opísaného v stati 3.4.3. Výsledky sú spracované v tabuľke č. 8.

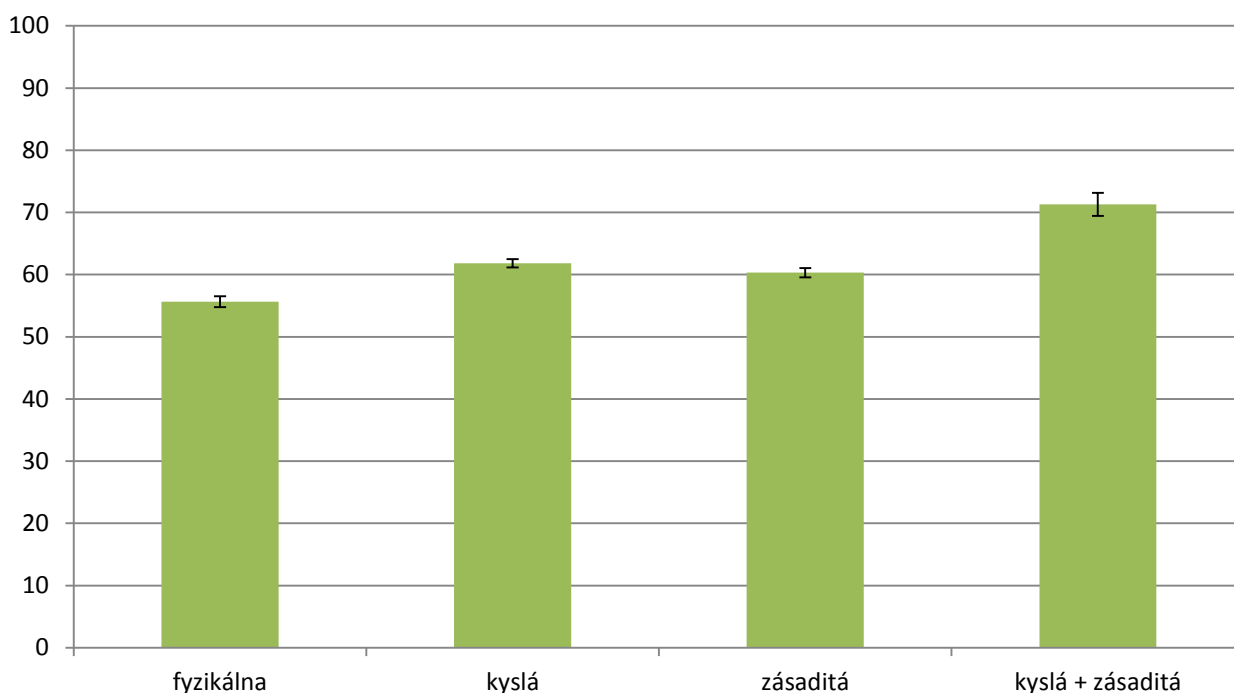
Tabuľka č. 8: Závislosť obsahu celulózy od typu predúpravy substrátu:

Predúprava	prázdny kelímok [g]	kelímok + papier [g]	frita S4 [g]	frita S4 + vzorka [g]	frita S3 [g]	frita S3 + vzorka [g]	celulóza %	IS
fyzikálna	56,781	57,577	27,993	28,483	28,0108	28,059	55,65	0,87
	56,795	57,603	27,996	28,496	28,01	28,060	54,39	
	56,893	57,697	27,996	28,492	28,01	28,101	56,24	
kyslá	57,343	58,145	29,373	29,950	29,3727	29,454	61,81	0,66
	57,624	58,453	29,373	29,821	29,37	29,760	61,12	
	57,647	58,445	29,373	29,889	29,37	29,751	60,39	
zásaditá	60,224	61,033	26,6515	27,176	26,6521	26,689	60,31	0,74
	60,189	60,966	26,6515	27,152	26,65	26,694	61,35	
	59,616	60,480	26,6515	26,204	26,65	26,702	61,89	
kyslá + zásaditá	58,775	59,598	27,4913	28,124	27,493	27,539	71,28	1,86
	58,365	59,121	27,4913	28,136	27,49	27,531	72,19	
	58,651	59,506	27,4913	28,220	27,49	27,543	75,14	

Analýzou výsledkov sa zistilo, že všetky typy chemických predúprav zvyšujú množstvo celulózy vo vzorke, avšak nie rovnakým podielom. Obsah celulózy pri predúpravách stúpal

v poradí: fyzikálne predúprava, zásaditá predúprava, kyslá predúprava a kombinácia kyslej a zásaditej hydrolýzy. Najlepších výsledkov sa teda dosiahlo použitím kyslej a zásaditej hydrolýzy súčasne, kedy sa obsah celulózy zvýšil z 55,65% až na 71,28%. Kyslá a zásaditá hydrolýza samostatne zvýšili podiel celulózy v substráte iba na približne 61%.

Graf č. 3: Zastúpenie celulózy v zmesnom odpadnom papieri s rôznym typom predúpravy



Množstvo reziduálnej celulózy bolo zisťované aj po prebehnutí hydrolýzy. Substrát bol vysušený a pomletý, samotný postup stanovenia bol totožný so stanovením popísaným v stati 3.4.3. Hydrolýza prebiehala pri 4 rôznych podmienkach a so 4 typmi predupraveného substrátu.

Tabuľka č. 9: Stanovenie obsahu celulózy po enzýmovej hydrolýze

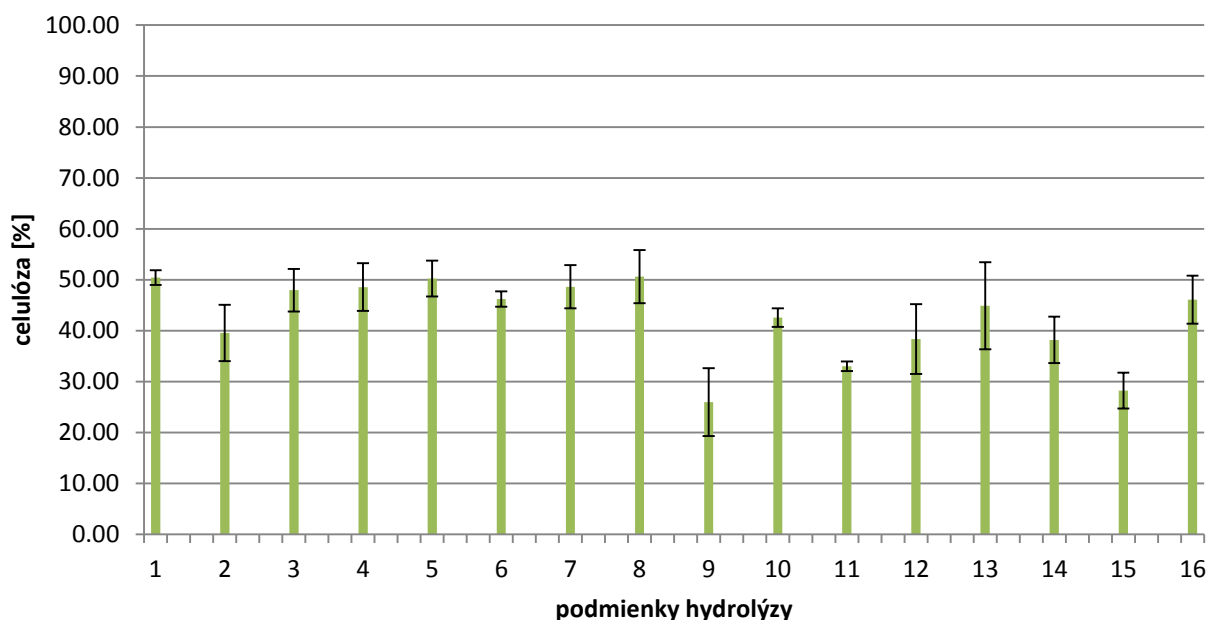
predúprava	prázdny kelímok [g]	kelímok + papier [g]	frita S4 [g]	frita S4 + vzorka [g]	frita S3 [g]	frita S3 + vzorka [g]	celulóza %	IS
1	2,172	2,968	29,379	29,849	30,2999	30,376	49,39	1,442
	2,172	2,964	29,379	29,849	30,2986	30,375	49,67	
	2,171	2,96	29,376	29,862	30,2968	30,367	52,22	
2	2,171	2,992	24,265	24,763	24,2767	24,402	45,45	5,557
	2,172	2,991	24,264	24,743	24,2738	24,427	39,77	
	2,172	2,991	24,264	24,762	24,2701	24,495	33,43	
3	2,174	2,988	27,957	28,462	31,0896	31,206	47,66	4,191
	2,174	2,975	27,947	28,421	31,0869	31,139	52,63	
	2,177	2,985	27,932	28,404	31,0861	31,206	43,57	
4	2,171	2,979	27,499	28,046	27,9749	28,108	51,11	4,672

	2,171	2,975	27,500	28,057	27,9872	28,201	42,73	
	2,171	2,975	27,499	28,049	27,9875	28,121	51,82	
5	2,171	2,985	26,646	27,125	26,6645	26,725	51,37	3,54
	2,171	2,971	26,896	27,265	26,6986	26,699	45,96	
	2,171	2,959	26,641	27,159	26,6879	26,785	53,37	
6	2,207	3,026	30,259	30,752	27,949	28,062	46,44	1,513
	2,209	3,057	30,259	30,759	27,946	28,069	44,46	
	2,207	2,999	30,259	30,759	27,946	28,069	47,71	
7	2,171	2,997	30,258	30,778	26,922	27,025	50,48	4,241
	2,171	2,979	30,260	30,790	26,926	27,036	51,96	
	2,172	2,978	30,260	30,781	26,925	27,097	43,37	
8	2,208	3,028	29,398	29,947	26,643	26,723	57,12	5,224
	2,206	3,064	29,399	29,946	26,642	26,779	47,81	
	2,206	3,087	29,389	29,945	26,642	26,785	46,91	
9	2,211	3,035	24,540	24,75	29,283	29,290	25,04	6,645
	2,211	3,046	24,569	24,742	29,269	29,281	19,29	
	2,211	3,058	24,570	24,875	29,278	29,299	33,59	
10	2,211	3,017	27,059	27,475	26,908	26,985	42,01	1,818
	2,211	3,018	27,069	27,482	26,903	26,986	40,98	
	2,211	3,021	27,066	27,452	26,963	26,986	44,78	
11	2,173	3,018	27,691	28,038	31,159	31,220	33,91	0,925
	2,173	3,013	27,692	28,039	31,156	31,224	33,19	
	2,173	3,013	27,693	28,035	31,162	31,236	31,94	
12	2,205	3,016	30,258	30,532	31,276	31,280	33,31	6,824
	2,205	3,024	30,269	30,570	31,263	31,278	34,92	
	2,205	3,035	30,278	30,654	31,302	31,289	46,83	
13	2,206	3,015	28,063	28,416	24,265	24,327	36,00	8,533
	2,206	3,013	28,064	28,430	24,329	24,338	44,24	
	2,206	3,013	28,109	28,402	24,452	24,307	54,44	
14	2,171	2,984	31,009	31,491	27,540	27,677	42,58	4,569
	2,171	2,971	31,058	31,486	27,504	27,668	32,83	
	2,171	2,979	31,055	31,455	27,598	27,683	39,12	
15	2,210	3,010	27,500	27,682	27,067	27,004	30,66	3,516
	2,210	3,008	27,430	27,690	27,007	27,003	30,17	
	2,215	3,009	27,459	27,689	27,001	27,043	23,83	
16	2,172	2,973	26,908	27,435	29,421	29,602	43,15	4,715
	2,172	2,985	26,966	27,498	29,503	29,612	52,00	
	2,172	2,896	26,896	27,485	29,536	29,813	43,18	

Tabuľka č. 10: Legenda k číslovaniu predúprav x-ovej osi:

	Predúprava	Teplota [°C]	Množstvo substrátu [g]
1	iba fyzikálna	40	3
2	kyslá (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	40	3
3	zásaditá (NaOH)	40	3
4	kyslá + zásaditá	40	3
5	iba fyzikálna	40	4
6	kyslá (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	40	4
7	zásaditá (NaOH)	40	4
8	kyslá + zásaditá	40	4
9	iba fyzikálna	45	3
10	kyslá (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	45	3
11	zásaditá (NaOH)	45	3
12	kyslá + zásaditá	45	3
13	iba fyzikálna	45	4
14	kyslá (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	45	4
15	zásaditá (NaOH)	45	4
16	kyslá + zásaditá	45	4

Graf č. 4: Porovnanie reziduálneho obsahu celulózy po hydrolýze pri rôznych podmienkach



#### 4.2. Diskusia k fyzikálno – chemickým hydrolýzám

Zo stanovenia sušiny, celulózy a popola je podľa môjho názoru pre priemyselnú výrobu bioetanolu najvýznamnejší obsah celulózy. Keďže išlo o analýzu rovnakého substrátu, môžeme predpokladať, že pred úpravami bol obsah celulózy rovnaký. Z výsledkov stati 4.1.3 vyplýva, že najväčší podiel celulózy obsahoval substrát po kombinovanej (kyslej a zásaditej) hydrolýze

(viac ako 70 %), avšak rozdiel s ostatnými typmi predúprav nie je nijak markantný. Podľa očakávania sa najmenej celulózy nachádzalo v substráte predupravenom iba fyzikálnym spôsobom (približne 55 %), u predúprav pomocou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH bol dosiahnutý približne rovnaký výsledok (60 %).

#### **4.3. Diskusia k stanoveniu celulózy po enzýmovej hydrolýze**

Bolo vzájomne porovnávaných 16 vzoriek, u ktorých prebiehala enzýmová hydrolýza pri rôznych podmienkach. Vo výsledkoch zhrnutých v grafe č. 4 nebol pozorovaný žiadny trend. Obsah celulózy u väčšiny vzoriek sa pohyboval v rozmedzí 40 – 50%. Výraznejšie sa odlišujú iba vzorky 9 a 15, u ktorých bol nameraný menší obsah celulózy (menej ako 30%). Vzorka č. 9 je vzorka iba s fyzikálnou predúpravou, teplotou hydrolýzy 45 °C a s navážkou 3 g substrátu. Vzorka č. 15 má zásaditú predúpravu, hydrolýza prebiehala pri 45 °C a navážka substrátu činila 4 g. Dá sa usúdiť, že u týchto vzoriek bola hydrolýza najúčinnjšia, pretože sa hydrolyzoval väčší podiel celulózy za vzniku glukózy.

#### **4.4. Rastové krivky *Saccharomyces cerevisiae***

Bola prevedená analýza rastových kriviek neznámeho kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae*. Pri určovaní podmienok, pri ktorých mali bunky rásť, sa vychádzalo zo všeobecných nárokov druhu *S. cerevisiae*. Uvažované boli nasledovné parametre: optimálna teplota rastu, zloženie a pH kultivačného média, nároky na prísun kyslíku – miešanie, dĺžka kultivácie a spôsob zaočkovania.

##### **4.4.1. Teplota kultivácie**

Podľa odborných publikácií [48] je optimálna teplota rastu a množenia kvasiniek *S. cerevisiae* 25 – 30 °C, optimálna teplota pre fermentáciu je 27 – 29 °C. V našom prípade bola uvažovaná vyššia teplota s ohľadom na metódu simultánnej sacharifikácie a fermentácie, kde je teplotné optimum enzýmov NS 50013 (celulázový komplex) a NS 50010 (β-glukozidáza) 40 - 50 °C (viď kapitola 3.1.6). Ako kompromis boli zvolené teploty 35 °C a 40 °C, pri ktorých rast buniek prebiehal.

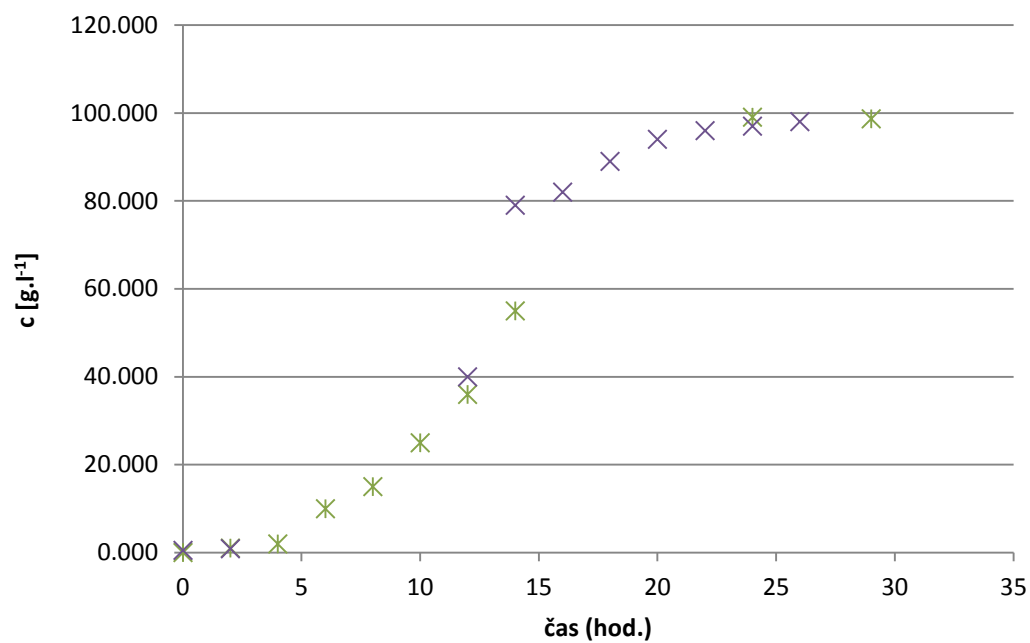
##### **4.4.2. pH rastového média**

pH bolo pomocou zriedenej kyseliny sírovej upravené na hodnotu 5,5, ktorá by mala byť optimom pre kvasinky tohoto druhu. [36]

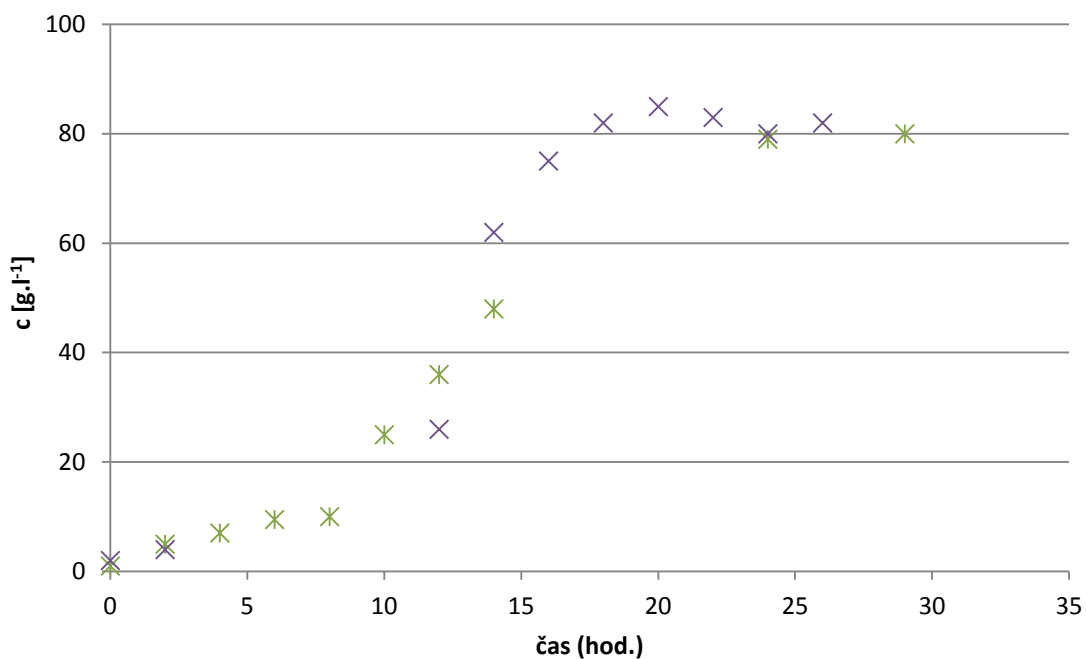
##### **4.4.3. Spôsob inokulácie**

Priama inokulácia 1 g sušených buniek *S. cerevisiae* sa ukázala ako nevhodný spôsob, preto vo výsledkoch uvádzam iba metódou inokulácie z inokulačného média v čase 12 hodín od zaočkovania.

Graf č. 5: Rastová krivka kvasiniek *S. cerevisiae*, teplota kultivácie 35 °C, gravimetrická metóda

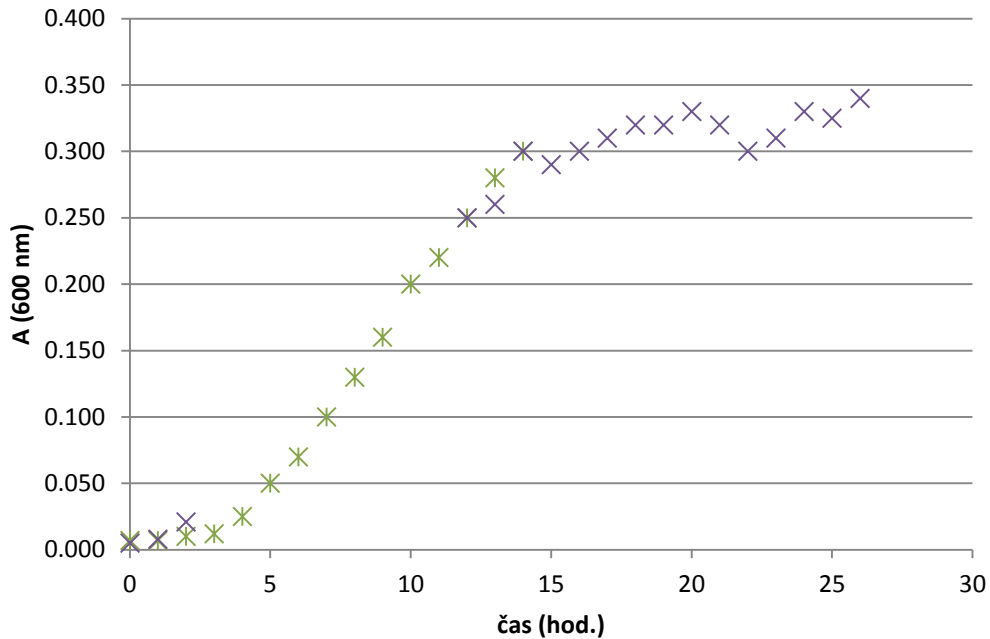


Graf č. 6: Rastová krivka kvasiniek *S. cerevisiae*, teplota kultivácie 40 °C, gravimetrická metóda

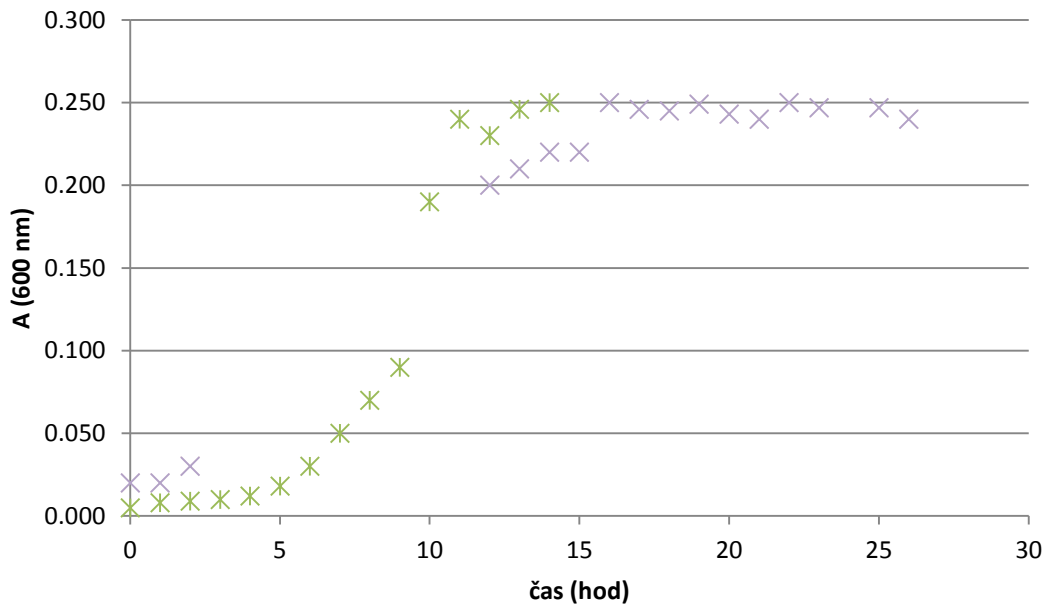




Graf č. 7: Rastová krivka kvasiniek *S. cerevisiae*, teplota kultivácie 35 °C, turbidimetrická metóda



Graf č. 8: Rastová krivka kvasiniek *S. cerevisiae*, teplota kultivácie 40 °C, turbidimetrická metóda



#### 4.4.4. Diskusia rastových kriviek *S. cerevisiae*

Rastové krivky majú typický sigmoidný tvar. Lag-fáza je minimálna, s výnimkou grafu č. 6, no vo väčšine prípadov prechádza plynule do exponenciálnej fázy. Toto je v priemysle určite výhodou, pretože sa šetrí čas, ktorý by kvasinky potrebovali na adaptáciu.

Zaujímavé je aj porovnanie nárastu biomasy pri teplote 35 °C a 40 °C. Podľa očakávania by pri teplote 40 °C mal byť nárast nižší ako pri 35 °C, no v tomto prípade je rozdiel len nepatrný. Môžeme si to vysvetliť odolnosťou týchto kvasiniek voči vyšším teplotám.

Pri oboch gravimetrických stanoveniach bez ohľadu na teplotu kultivácie bol medzi 13. – 13. hodinou kultivácie dosiahnutý stred exponenciálnej fázy, po ktorej nasledovala stacionárna fáza. Naopak, v prípade turbidimetrického stanovenia (bez ohľadu na teplotu kultivácie) bol stred exponenciálnej fázy dosiahnutý v skorších hodinách a medzi 12. a 13. hodinou kultivácie sa už kvasinky nachádzali na pomedzí exponenciálnej a stacionárnej fázy. Nie je jasné, nakoľko boli bunky viabilné v posledných hodinách kultivácie, keďže pomocou použitých metód to nie je možné určiť. Čo sa týka porovnania gravimetrickej a turbidimetrickej metódy – gravimetrická metóda by mala byť presnejšia. Z grafov vyššie to ale nie je možné poznať.

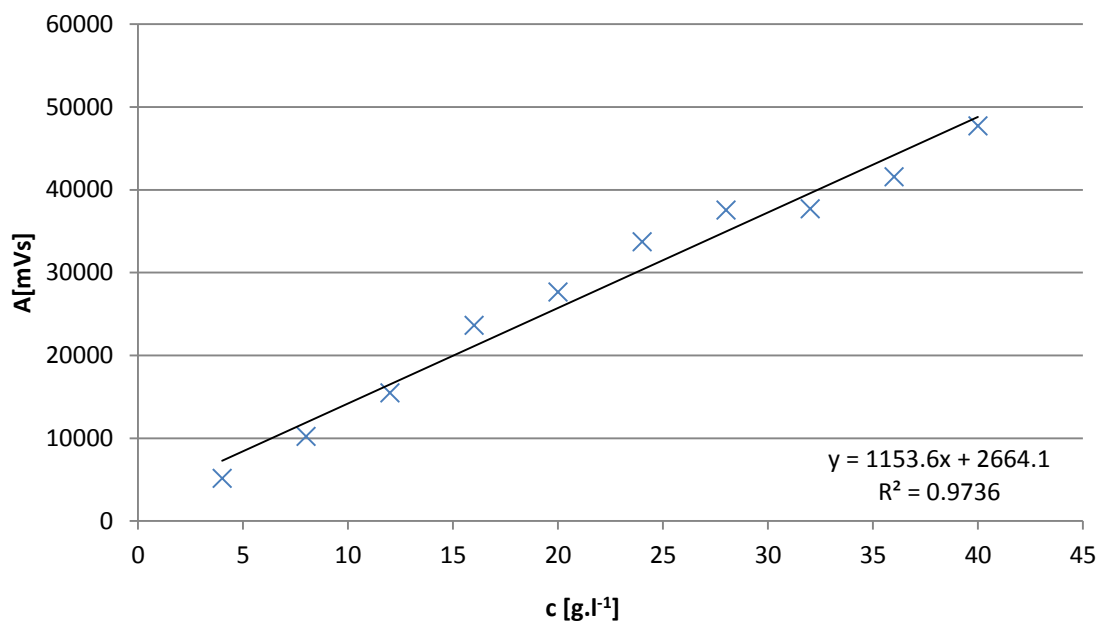
#### 4.5. Kalibračné krivky - HPLC stanovenie

Kalibračné krivky glukózy a etanolu boli stanovené pomocou metódy HPLC s refraktometrickým detektorom. Postup je popísaný v kapitole 3.8. Každá vzorka bola stanovená trikrát a pri každom stanovení bol vypočítaný interval spoľahlivosti (IS). Výsledky stanovenia boli spracované do grafu, ktorý obsahuje rovnicu lineárnej regresie. Pomocou nej boli vypočítané koncentrácie glukózy/etanolu v produktoch enzýmovej hydrolýzy a SSF.

Tabuľka č.11: Výsledky stanovenia kalibračnej krivky glukózy

c [g.l <sup>-1</sup> ]	A [mVs]			priemer	IS
4	3459,201	5896,125	6172,213	5175,846	1379
8	9922,218	10506,484	10259,328	10229,340	1101
12	14200,009	16554,991	15697,230	15484,080	1101
16	25779,609	21367,008	23697,416	23614,680	2040
20	28654,239	27328,249	26960,201	27647,560	823
24	34565,194	34756,900	31816,354	33712,820	1520
28	37954,369	37743,076	36975,267	37557,570	476
32	40005,242	36236,870	36860,289	37700,800	1866
36	47813,195	36073,280	40856,254	41580,910	5454
40	37271,263	58544,285	47350,605	47722,050	9832

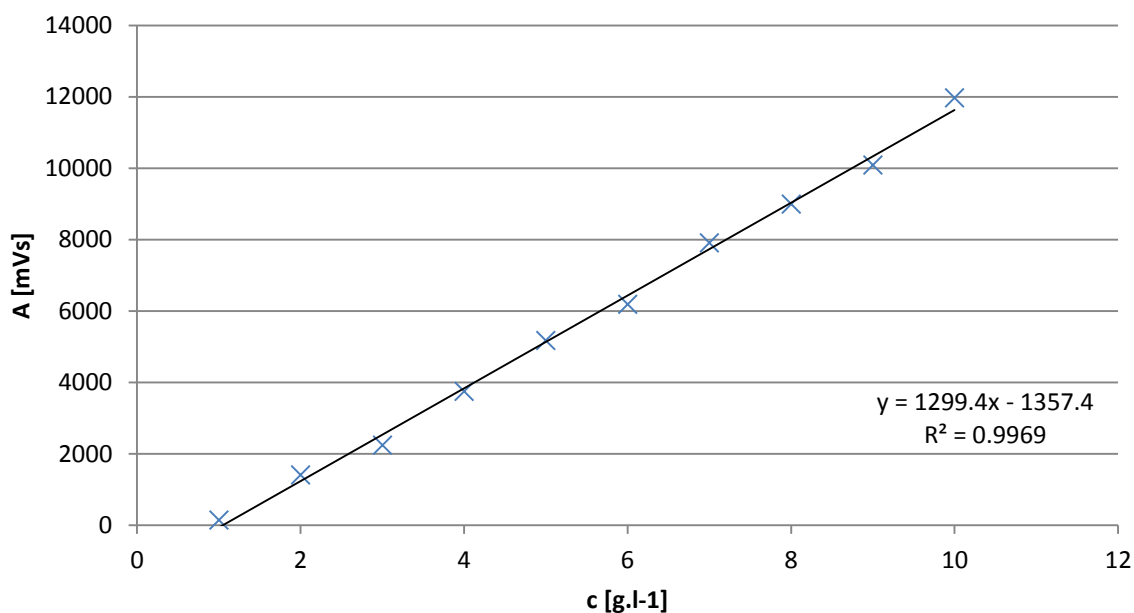
Graf č. 9: Kalibračná krivka glukózy



Tabuľka č. 12: Výsledky stanovenia kalibračnej krivky etanolu

c [g.l <sup>-1</sup> ]	A [mVs]			priemer	IS
1	201,815	125,475	114,65	147,3133	44
2	1579,267	1426,597	1236,218	1414,027	159
3	2357,587	2158,564	2227,684	2247,945	93
4	3781,67	3771,353	3699,584	3750,869	41
5	5129,227	5089,541	5302,549	5173,772	105
6	6237,659	6119,541	6198,64	6185,28	56
7	7953,627	7886,512	7902,546	7914,228	32
8	9003,541	9025,899	8964,297	8997,912	29
9	9854,644	9843,656	10562,364	10086,89	380
10	11967,547	11873,523	12078,854	11973,31	95

Graf č. 10: Kalibračná krivka glukózy



#### 4.6. Enzýmová hydrolýza

Enzýmová hydrolýza bola prevedená pri podmienkach uvedených v stati 3.6. Hydrolyzovaný bol substrát so všetkými typmi predúprav. Účelom prevedenia enzýmovej hydrolýzy bolo porovnanie účinnosti jednotlivých typov predúprav vzhľadom k množstvu uvoľnenej glukózy. V tabuľkách nižšie sú zhrnuté výsledky tvorby glukózy za rôznych podmienok. Výsledky sú ďalej spracované vo forme grafov.

##### 4.6.1. Porovnanie výťažkov glukózy jedného typu predúpravy pri rôznych reakčných podmienkach

Podmienky priebehu enzýmovej hydrolýzy platné pre tabuľky 13-17 a grafy 11-15:

c<sub>1</sub>: 40 °C, 4 % w/V

c<sub>2</sub>: 40 °C, 6 % w/V

c<sub>3</sub>: 45 °C, 4 % w/V

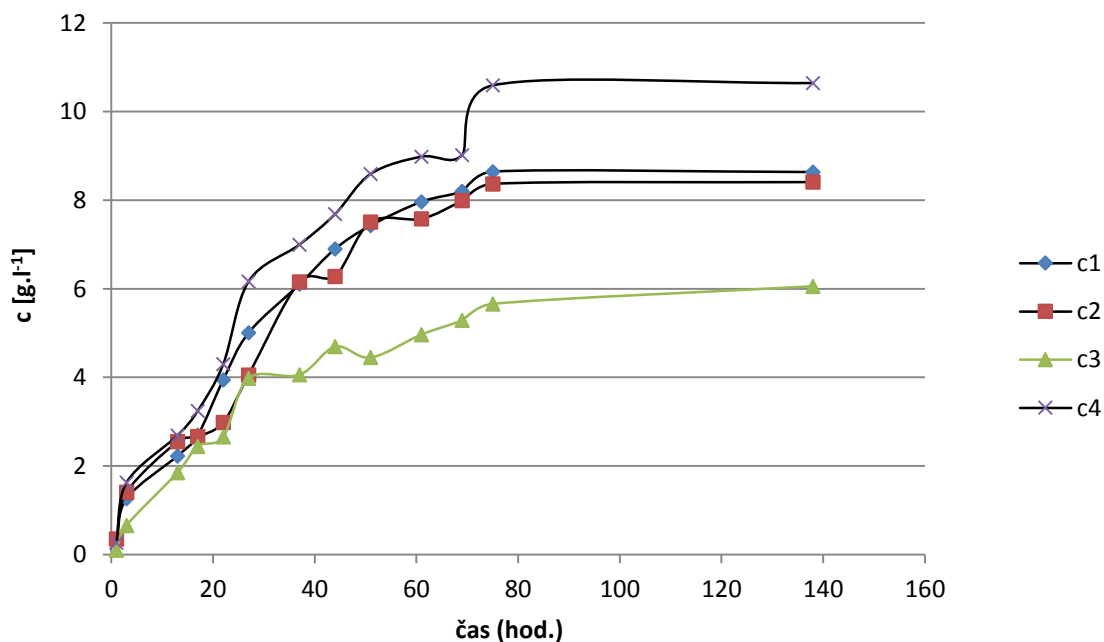
c<sub>4</sub>: 45 °C, 6 % w/V

Tabuľka č. 13: Koncentrácia vzniknutej glukózy z papiera s fyzikálnou predúpravou

Predúprava	čas odberu	c <sub>1</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>2</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>3</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>4</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]
fyzikálna	1	0,283	0,356	0,106	0,268
	3	1,266	1,409	0,659	1,628
	13	2,228	2,548	1,853	2,689
	17	2,697	2,667	2,446	3,248
	22	3,943	2,987	2,658	4,297
	27	5,008	4,056	3,982	6,166
	37	6,102	6,158	4,058	6,997
	44	6,899	6,279	4,694	7,684
	51	7,428	7,506	4,448	8,591
	61	7,964	7,58	4,967	8,982
	69	8,203	7,988	5,289	9,018
	75	8,644	8,367	5,659	10,59
	138	8,634	8,407	6,056	10,642

Grafy 11-14 obsahujú experimentálne dáta získané po enzymovej hydrolýze odpadného papiera. Koncentrácia vzniknutej glukózy je vynesená v závislosti od času odberu. Časom 0 hodín sa rozumie moment pridania enzýmov a zahájenia enzymovej hydrolýzy.

Graf č. 11: Časová závislosť koncentrácie vyprodukovanej glukózy z papiera s fyzikálnou predúpravou

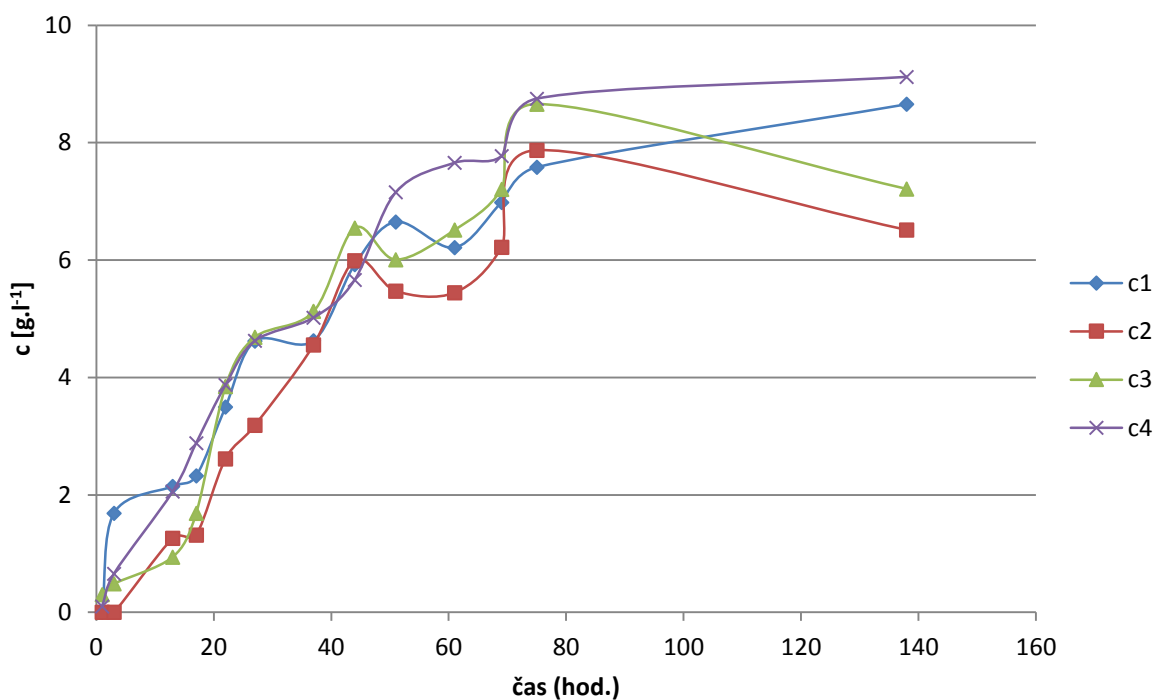


V prípade fyzikálnej predúpravy odpadného papiera bolo najlepších výsledkov dosiahnuté pri 45 °C a 6 % w/V substrátu, a to takmer 11 g.l<sup>-1</sup>. Takýto výsledok sa dal očakávať vzhľadom k optimálnej teplote účinnosti enzýmov (okolo 50 °C pri zachovaní jeho stability). Najnižšie výťažky boli dosiahnuté pri podmienkach 40 °C a 4 % w/V substrátu (6 g.l<sup>-1</sup>). Približne rovnaká účinnosť hydrolýzy bola dosiahnutá v posledných dvoch prípadoch, teda pri použití 40 °C a 6 % w/V, ako aj 45 °C a 4 % w/V.

Tabuľka č. 14: Koncentrácia vyprodukovanej glukózy z papiera s kyslou predúpravou

Predúprava	čas odberu	c <sub>1</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>2</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>3</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>4</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]
kyslá	1	0	0	0,3	0,1
	3	1,687	0	0,485	0,657
	13	2,146	1,26	0,942	2,057
	17	2,324	1,318	1,687	2,883
	22	3,498	2,614	3,846	3,873
	27	4,618	3,186	4,684	4,624
	37	4,626	4,554	5,125	5,02
	44	5,922	5,991	6,547	5,664
	51	6,651	5,473	6,008	7,156
	61	6,213	5,445	6,512	7,657
	69	6,984	6,216	7,205	7,772
	75	7,582	7,872	8,658	8,75
	138	8,654	6,514	7,212	9,121

Graf č. 12: Časová závislosť koncentrácie vyprodukovanej glukózy z papiera s kyslou predúpravou

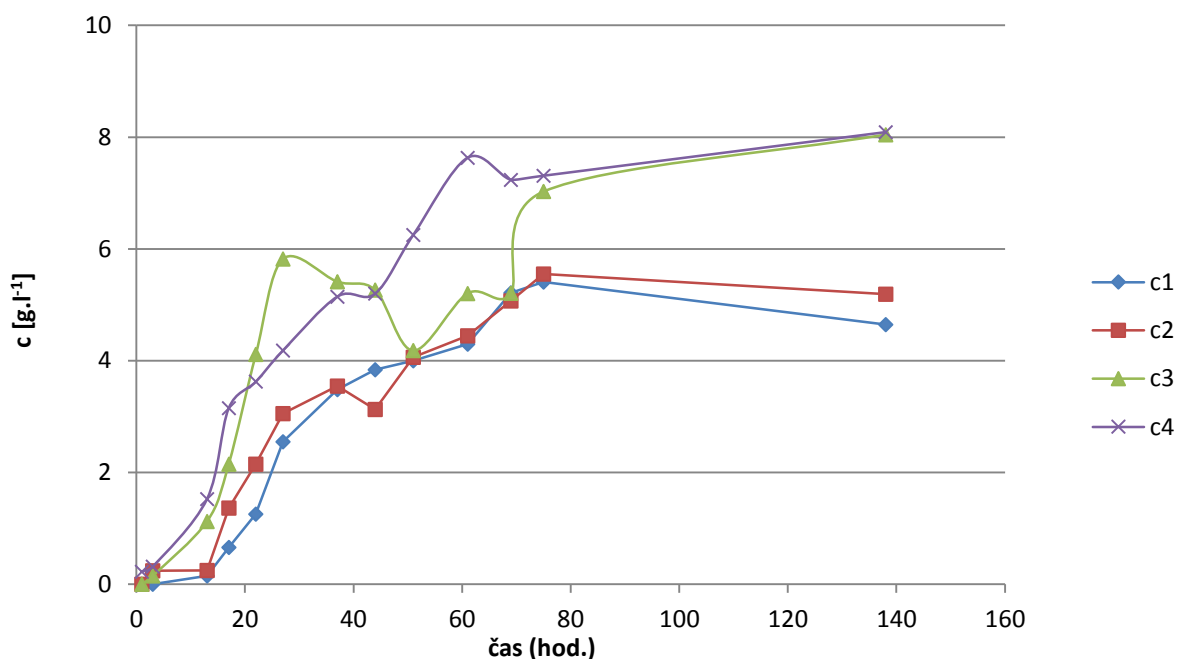


V prípade hydrolýzy substrátu s kyslou predúpravou už výsledky nie sú tak jednoznačné, ako v predchádzajúcom prípade. Vo výsledku boli najvyššie výtťažky opäť dosiahnuté pri podmienkach 45 °C a 6 % w/V, no výtťažky glukózy v priebehu hydrolýzy sú takmer zhodné. Pri podmienkach 40 °C a 6 % w/V pozorujeme pokles a opätovný nárast koncentrácie glukózy od 40. hodiny hydrolýzy. Tento jav môže byť spôsobený nevhodným odberom vzoriek, kontamináciou hydrolyzátu, alebo chybou na strane prístrojovej techniky. Zaujímavý je v konečnom dôsledku rozdiel koncentrácií glukózy získanej za rôznych podmienok, ktorý aj napriek podobným priebehom hydrolýzy činil necelé 3 g.l<sup>-1</sup>.

Tabuľka č. 15: Koncentrácia vyprodukovanej glukózy z papiera so zásaditou predúpravou

Predúprava	čas odberu	c <sub>1</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>2</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>3</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>4</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]
zásaditá	1	0	0	0	0,226
	3	0	0,242	0,15	0,314
	13	0,148	0,248	1,124	1,524
	17	0,662	1,366	2,148	3,15
	22	1,253	2,148	4,115	3,625
	27	2,548	3,056	5,82	4,183
	37	3,486	3,546	5,414	5,146
	44	3,84	3,129	5,263	5,202
	51	4,002	4,065	4,18	6,251
	61	4,296	4,446	5,204	7,632
	69	5,213	5,073	5,206	7,237
	75	5,411	5,549	7,027	7,31
	138	4,648	5,189	8,046	8,09

Graf č. 13: Časová závislosť koncentrácie vyprodukovanej glukózy z papiera so zásaditou predúpravou

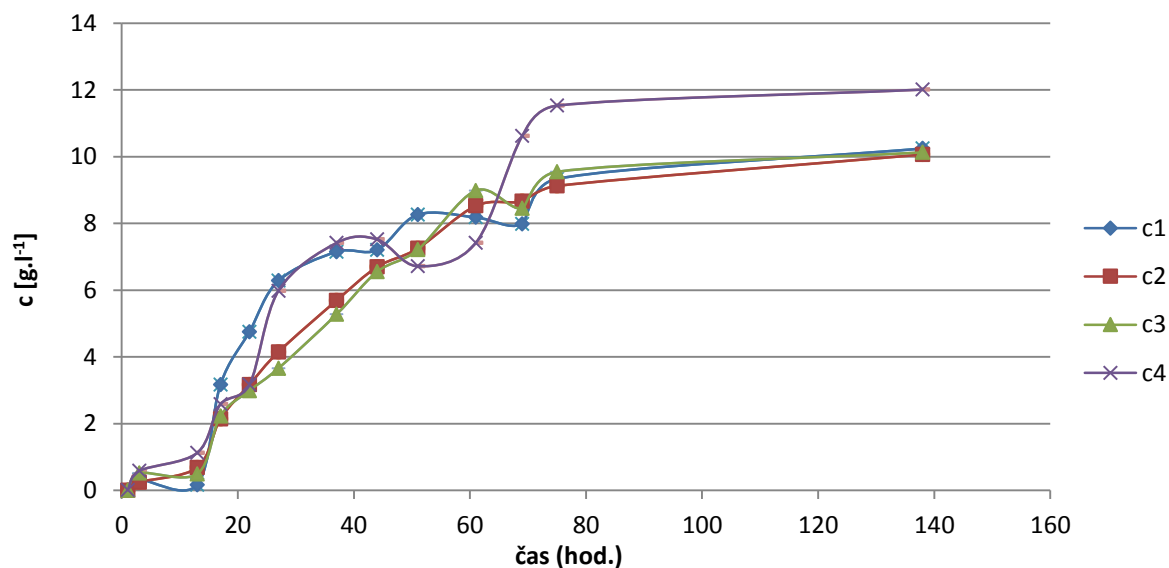


V prípade zásaditej hydrolýzy dostávame aj napriek nejednoznačným priebehom jednoznačné konečné výsledky. Rovnaké výťažky boli dosiahnuté pri podmienkach 45 °C a 4 % w/V ako aj 45 °C a 4 % w/V, konkrétne 8 g.l<sup>-1</sup>. Pri ostatných dvoch predúpravách sa výťažky pohybovali v rozmedzí 4,6 - 5,2 g.l<sup>-1</sup>. Ako aj u ostatných predúprav, pri podmienkach 45 °C, 6 % w/V boli dosiahnuté najvyššie výťažky.

Tabuľka č. 16: Koncentrácia vyprodukovanej glukózy z papiera s kyslou a zásaditou predúpravou

Predúprava	čas odberu	c <sub>1</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>2</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>3</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]	c <sub>4</sub> [g.l <sup>-1</sup> ]
kyslá + zásaditá	1	0	0	0	0,01
	3	0,32	0,244	0,517	0,582
	13	0,168	0,685	0,494	1,125
	17	3,169	2,142	2,229	2,581
	22	4,754	3,168	2,987	3,164
	27	6,282	4,149	3,658	5,982
	37	7,148	5,689	5,274	7,414
	44	7,205	6,695	6,551	7,521
	51	8,263	7,251	7,212	6,718
	61	8,18	8,526	8,985	7,416
	69	7,985	8,66	8,457	10,62
	75	9,337	9,124	9,547	11,529
	138	10,245	10,064	10,128	12,01

Graf č. 14: Časová závislosť koncentrácie vyprodukovanej glukózy z papiera s kyslou a zásaditou predúpravou



V poslednom prípade, pri použití kyslej a zásaditej predúpravy, dosahujú 3 rôzne reakčné podmienky približne rovnaké výt'azky, ktoré sa pohybujú mierne nad 10 g.l<sup>-1</sup>. Výnimkou sú iba podmienky 45 °C a 6 0160% w/V, pri ktorých sa dosiahli výt'azky prbližne o 2 g.l<sup>-1</sup> vyššie. Rozdiel vo výt'azkoch v tejto predúprave činil približne 2 g.l<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2. Vzájomné porovnanie výt'azkov glukózy pri všetkých typoch predúprav

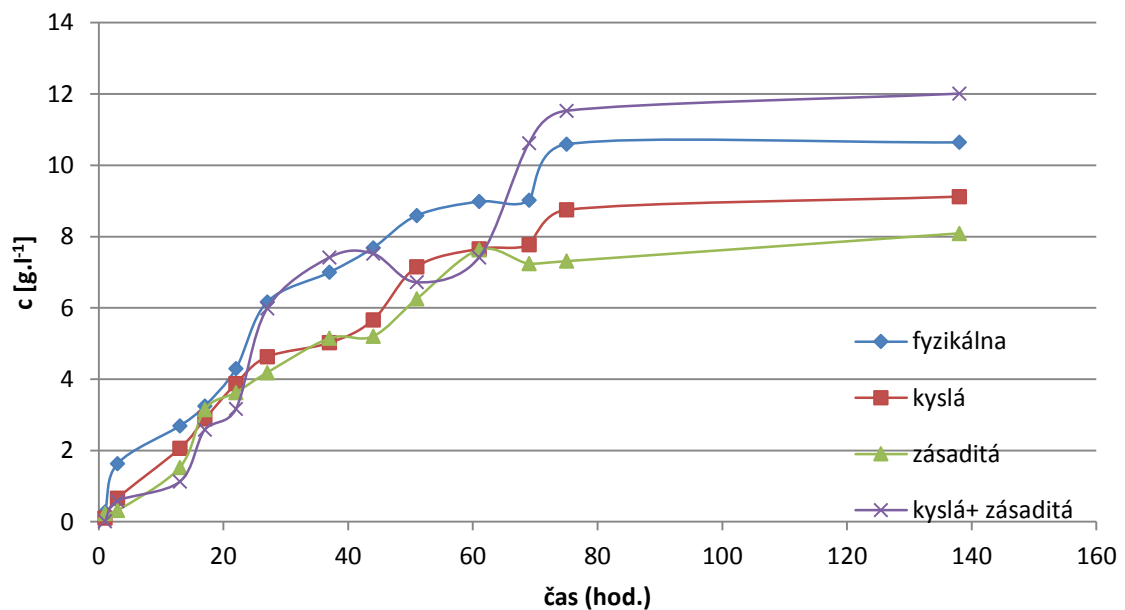
Aby sme vedeli objektívne zhodnotiť a porovnať účinnosť reakčných podmienok a jednotlivých typov predúprav, bola zostrojená nasledovná tabuľka. Dáta boli následne vynesené do grafu, ktorý porovnáva výt'azky najúčinnějších podmienok hydrolyzy a jednotlivých typov predúprav.



Tabuľka č. 17: Výťažky glukózy najúčinnějších podmienok hydrolýzy u všetkých typov predúprav

čas odberu (hod.)	Predúprava			
	fyzikálna	kyslá	zásaditá	kyslá + zásaditá
	$c_1$ [g.l <sup>-1</sup> ]	$c_2$ [g.l <sup>-1</sup> ]	$c_3$ [g.l <sup>-1</sup> ]	$c_4$ [g.l <sup>-1</sup> ]
1	0,268	0,1	0,226	0,01
3	1,628	0,657	0,314	0,582
13	2,689	2,057	1,524	1,125
17	3,248	2,883	3,15	2,581
22	4,297	3,873	3,625	3,164
27	6,166	4,624	4,183	5,982
37	6,997	5,02	5,146	7,414
44	7,684	5,664	5,202	7,521
51	8,591	7,156	6,251	6,718
61	8,982	7,657	7,632	7,416
69	9,018	7,772	7,237	10,62
75	10,59	8,75	7,31	11,529
138	10,642	9,121	8,09	12,01

Graf č. 15: Porovnanie najúčinnějších podmienok hydrolýzy u všetkých typov predúprav



Najlepšie výsledky, vyplývajúce z grafu vyššie, boli dosiahnuté použitím kombinovaného typu hydrolýzy – kyslej a zásaditej. Výťažok dosahoval hodnoty až 12 g.l<sup>-1</sup>. Najnižšie výťažky pri použití rovnakých podmienok sa dosiahli použitím zásaditej predúpravy substrátu. Rodiel v nich bol až 4 g.l<sup>-1</sup>. Z priebehov jednotlivých hydrolýz ich účinnosť nie je jasná, diferencia je markantná až od 80. hodiny.

#### 4.6.3. Porovnanie obsahu celulózy pred enzýmovou hydrolýzou a po nej

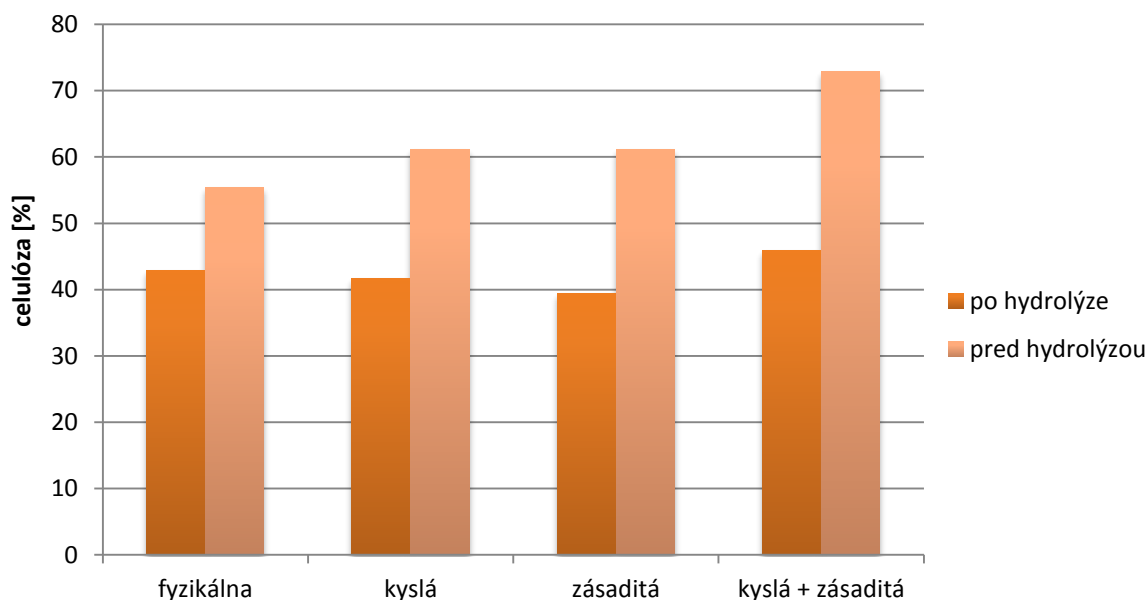
Boli porovnané výsledky obsahu celulózy v substráte pred enzýmovou hydrolýzou a po enzýmovej hydrolýze. Keďže táto prebiehala pri rôznych reakčných podmienkach, pre

zjednodušenie vychádzam z priemerných hodnôt z každého typu predúpravy uvedených v tabuľke č. 18.

Tabuľka č. 18: Porovnanie obsahu celulózy v substráte pred a po hydrolýze

typ predúpravy	pred hydrolýzou	po hydrolýze
	celulóza [%]	celulóza [%]
fyzikálna	55,43	42,88
kyslá	61,11	41,63
zásaditá	61,18	39,45
kyslá + zásaditá	72,87	45,91

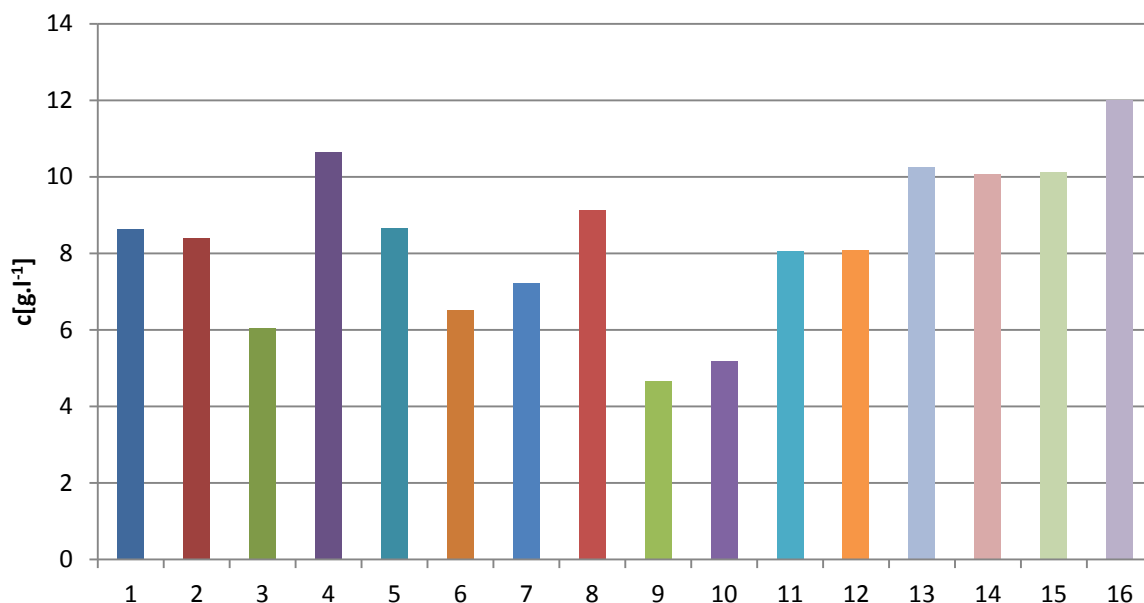
Graf č. 16: Porovnanie obsahu celulózy v substráte pred a po hydrolýze



Z výsledkov stanovenia vyplýva, že v prípade kombinovanej (kyslej a zásaditej) predúpravy bola účinnosť hydrolýzy najvyššia, až 26%. Tento výsledok korešponduje aj s HPLC stanovením, kedy najvyššie výťažky glukózy boli dosiahnuté práve touto predúpravou. Na druhej strane, výťažky neboli postatne vyššie, ak vezmeme do úvahy porovnanie s ostatnými typmi predúprav, ako aj fakt, že pred hydrolýzou obsahoval tento typ predúpravy najvyššie množstvo celulózy. Prekvapivé sú výsledky stanovenia glukózy po fyzikálnej predúprave, kedy sa hydrolyzovalo len 13% celulózy a napriek tomu výťažky dosahovali až 10,64 g.l<sup>-1</sup> (maximum u kombinovanej predúpravy bolo 12,01 g.l<sup>-1</sup>). Čo sa týka kyslej a zásaditej predúpravy, v obsahu celulózy pred a po hydrolýze dosiahli veľmi podobné výsledky, no množstvo vzniknutej glukózy bolo u kyslej hydrolýzy vyššie až o 1 g.l<sup>-1</sup> (vzhľadom k podmienkam s najvyššou výťažnosťou – 45 °C a 6 % w/V). Ako je možné pozorovať na graf č. 17, veľmi záleží na reakčných podmienkach hydrolýzy.

#### 4.6.4. Prehľad a porovnanie množstva vzniknutej glukózy pri rôznych reakčných podmienkach a všetkých typov predúprav

Graf č. 17: Prehľad množstva vzniknutej glukózy



1 - fyz. predúprava, 40 °C, 4% w/V; 2 - fyz. predúprava, 40 °C, 6% w/V; 3 - fyz. predúprava, 45 °C, 4% w/V; 4 - fyz. predúprava, 45 °C, 6% w/V; 5 - kys. predúprava, 40 °C, 4% w/V; 6 - kys. predúprava, 40 °C, 6% w/V; 7 - kys. predúprava, 45 °C, 4% w/V; 8 - kys. predúprava, 45 °C, 6% w/V; 9 - zás. predúprava, 40 °C, 4% w/V; 10 - zás. predúprava, 40 °C, 6% w/V; 11 - zás. predúprava, 45 °C, 4% w/V; 12 - zás. predúprava, 45 °C, 6% w/V; 13 - kys. + zás. predúprava, 40 °C, 4% w/V; 14 - kys. + zás. predúprava, 40 °C, 6% w/V; 15 - kys. + zás. predúprava, 45 °C, 4% w/V; 16 - kys. + zás. predúprava, 45 °C, 6% w/V

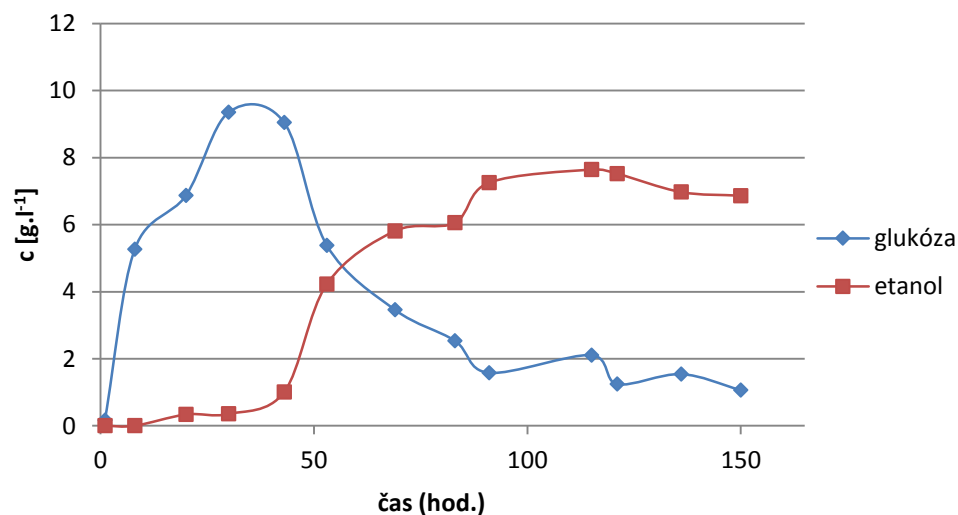
#### 4.7. Simultánna sachrifikácia a fermentácia

Simultánna sacharifikácia a fermentácia bola prevedená tak, ako je uvedené v kapitole 3.7. SSF boli podrobené všetky predúpravy substrátu, v médiu bol sledovaný obsah glukózy a etanolu.

Tabuľka č. 19: Priebeh spotreby glukózy a tvorby etanolu z odpadného papiera ako substrátu

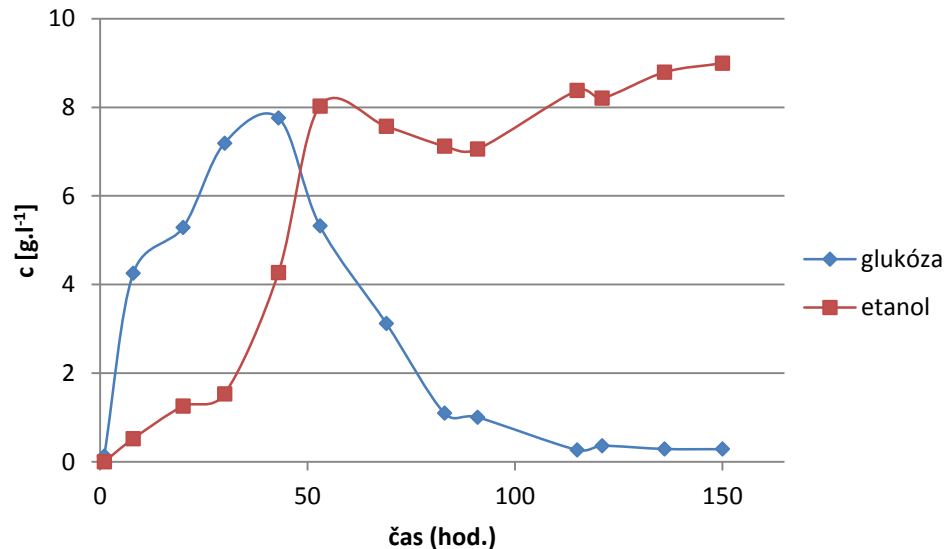
čas odberu (hod.)	predúprava							
	fyzikálna		kyslá		zásaditá		kyslá + zásaditá	
	C (glukóza) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (etanol) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (glukóza) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (etanol) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (glukóza) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (etanol) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (glukóza) [g.l <sup>-1</sup> ]	C (etanol) [g.l <sup>-1</sup> ]
1	0,165 ± 0,2	0	0,129 ± 0,61	0	0,107 ± 0,89	0	1,547 ± 0,70	0
8	5,267 ± 0,92	0	4,254 ± 0,89	0,523 ± 1,16	4,257 ± 0,36	0	3,547 ± 0,70	0,016 ± 0,4
20	6,871 ± 0,10	0,337 ± 0,8	5,285 ± 0,74	1,258 ± 0,58	4,098 ± 0,66	0,414 ± 0,41	6,891 ± 0,30	0,522 ± 0,21
30	9,354 ± 0,40	0,352 ± 0,4	7,190 ± 0,02	1,534 ± 1,22	3,517 ± 0,14	0,521 ± 0,99	9,102 ± 0,39	0,681 ± 0,22
43	9,049 ± 0,79	1,004 ± 0,2	7,761 ± 0,96	4,269 ± 0,14	2,112 ± 0,72	1,62 ± 0,91	12,588 ± 0,28	1,218 ± 0,09
53	5,384 ± 0,80	4,225 ± 0,19	5,323 ± 0,60	8,029 ± 0,89	2,066 ± 0,78	2,961 ± 1,58	8,258 ± 0,55	5,146 ± 0,18
69	3,457 ± 0,40	5,814 ± 0,08	3,123 ± 0,80	7,568 ± 0,15	1,658 ± 0,22	5,046 ± 1,55	5,248 ± 0,74	6,747 ± 1,12
83	2,536 ± 0,51	6,057 ± 0,06	1,101 ± 0,62	7,124 ± 1,12	1,423 ± 0,55	6,406 ± 0,9	3,543 ± 0,64	6,998 ± 0,23
91	1,581 ± 0,02	7,254 ± 0,81	1,006 ± 0,44	7,055 ± 0,4	0,982 ± 1,16	6,314 ± 0,25	2,461 ± 0,95	8,867 ± 1,23
115	2,106 ± 0,30	7,644 ± 0,3	0,269 ± 0,60	8,381 ± 0,08	0,719 ± 0,70	7,054 ± 1,01	1,296 ± 0,41	8,955 ± 0,17
121	1,243 ± 0,60	7,524 ± 0,06	0,364 ± 0,69	8,206 ± 0,6	0,431 ± 0,63	7,625 ± 0,29	1,550 ± 0,30	9,157 ± 0,88
136	1,541 ± 0,15	6,974 ± 0,85	0,291 ± 0,35	8,79 ± 1,40	0,462 ± 0,56	7,025 ± 0,36	0,941 ± 0,19	9,118 ± 0,79
150	1,064 ± 0,28	6,865 ± 0,21	0,287 ± 0,48	8,994 ± 0,26	0,548 ± 0,26	7,119 ± 0,87	0,944 ± 0,28	9,218 ± 0,47

Graf č. 18: Vyhodnotenie SSF substrátu s fyzikálnou predúpravou



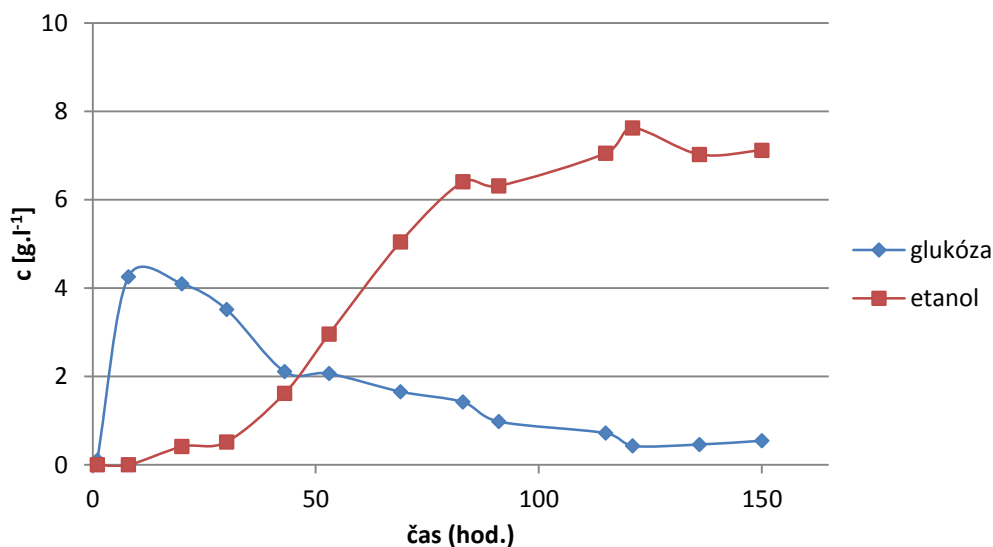
Bol pozorovaný prudký nárast glukózy na začiatku SSF, ktorá dosahovala hodnotu  $9,35 \text{ g.l}^{-1}$  vo svojom maxime. Od 20. hodiny pozorujeme tvorbu etanolu, ktorý začal vznikáť so súčasnou spotrebou glukózy. Maximum jeho tvorby sa dosahuje v 115. hodine fermentácie a jeho množstvo činí  $7,64 \text{ g.l}^{-1}$ . Množstvo glukózy prítomnej v médiu klesalo postupne, spolu s nárastom tvorby etanolu. Zvyšková koncentrácia glukózy sa pohybovala v rozmedzí  $1-2 \text{ g.l}^{-1}$ . Produkcia etanolu výrazne stúpila medzi 43. a 53. hodinou fermentácie. V priebehu enzýmovej hydrolýzy bol pomocou fyzikálnej predúpravy dosiahnutý výťažok glukózy viac ako  $10 \text{ g.l}^{-1}$ , a to pri  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $4\% \text{ w/V}$  substrátu.

Graf č. 19: Vyhodnotenie SSF substrátu s kyslou predúpravou



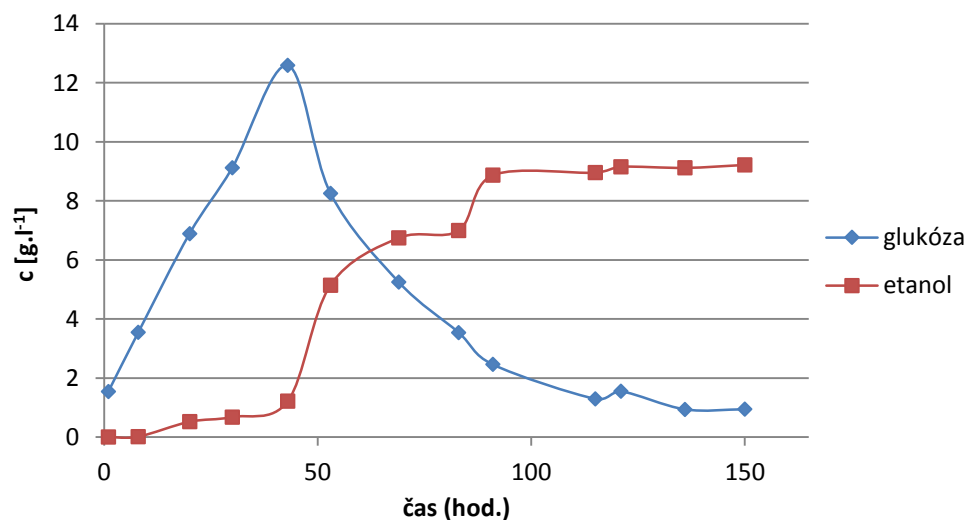
Podobne ako v predchádzajúcom prípade, aj tu pozorujeme prudký nárast koncentrácie glukózy v počiatočných hodinách SSF. Svoje maximum dosiahla glukóza v 43. hodine fermentácie, po ktorej bol pozorovaný prudký pokles. Súčasne s poklesom množstva pítomnej glukózy rastie koncentrácia etanolu, ktorý sa začal tvoriť prakticky od 8. hodiny, kedy jeho koncentrácia dosahovala  $0,52 \text{ g.l}^{-1}$ . Maximum bolo dosiahnuté v 115. hodine fermentácie a činilo  $8,99 \text{ g.l}^{-1}$ . Zvyšková koncentrácia glukózy zostávala od 115. hodiny na svojom minime a dosahovala hodnoty  $0,2 - 0,3 \text{ g.l}^{-1}$ . V porovnaní s fyzikálnou hydrolýzou boli dosiahnuté vyššie výťažky etanolu, no koncentrácia glukózy bola nižšia. Tento jav sa dá vysvetliť nedokonalejšou konverziou glukózy na etanol a väčším nožstvom reziduálnej glukózy u fermentácie s fyzikálnou predúpravou.

Graf č. 20: Vyhodnotenie SSF substrátu so zásaditou predúpravou



SSF so zásaditou predúpravou substrátu môžeme vyhodnotiť ako najmenej účinnú, čo sa týka výťažkov glukózy, aj etanolu. Glukóza dosiahla koncentráciu iba  $4,26 \text{ g.l}^{-1}$  už v 8. hodine SSF, etanol dosiahol svoje maximum v 121. hodine a to činilo  $7,63 \text{ g.l}^{-1}$ . Reziduálna glukóza sa pohybovala v okolí  $0,5 \text{ g.l}^{-1}$ . V enzýmovej hydrolýze táto predúprava tiež dosahovala najnižšie výťažky.

Graf č. 21: Vyhodnotenie SSF substrátu s kyslou a zásaditou predúpravou

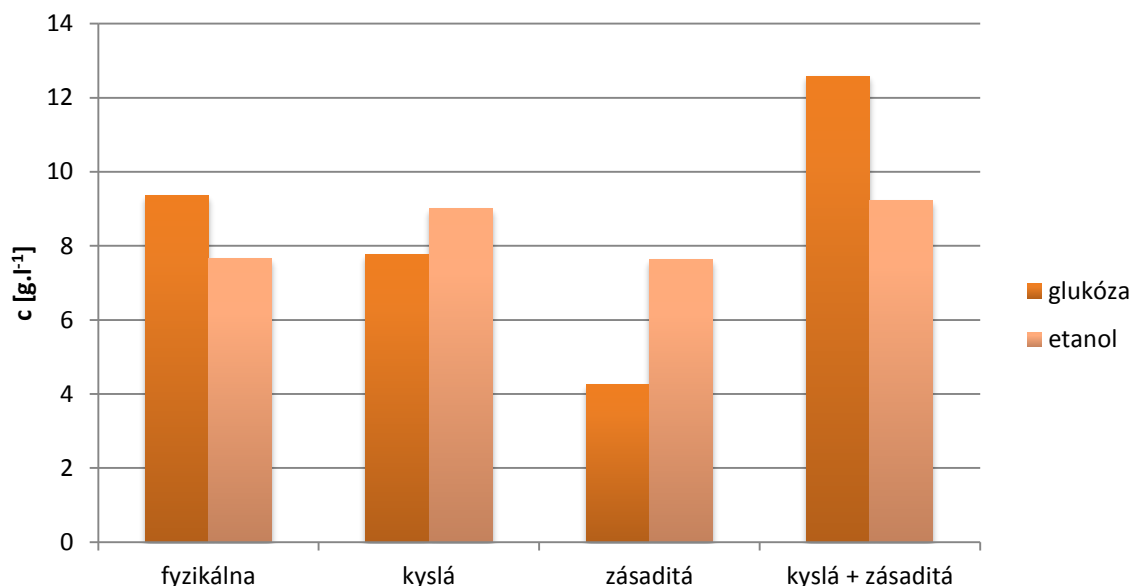


V prípade kombinovanej (kyslej a zásaditej) predúpravy boli dosiahnuté najvyššie výťažky zo všetkých typov predúprav. Tvar kriviek glukózy a etanolu v grafe kopíruje trend z predchádzajúcich grafov. Produkcia glukózy dosiahla maximum v 43. hodine hydrolýzy, rovnako ako u kyslej predúpravy. Koncentrácia glukózy v tomto čase bola  $12,59 \text{ g.l}^{-1}$ . V 150. hodine SSF bola koncentrácia etanolu  $9,22 \text{ g.l}^{-1}$ . Koncentrácia zbytkovej glukózy bola v posledných dvoch hodinách SSF približne konštantná a činila  $0,94 \text{ g.l}^{-1}$ .

#### 4.7.1. Porovnanie množstva vzniknutého etanolu

Pre prehľadnosť uvádzam graf, ktorý porovnáva výťažky etanolu v závislosti od spôsobu predúpravy substrátu.

Graf č. 22: Prehľad výťažkov etanolu v závislosti od spôsobu predúpravy substrátu a množstva glukózy prítomnej v médiu.



Kombinovaná (kyslá a zásaditá) predúprava dosiahla spolu s kyslou hydrolyzou najvyššie výťažky etanolu, výťažky fyzikálnej a zásaditej hydrolyzy boli porovnateľné. Na druhej strane, koncentrácia glukózy sa u rôznych typov predúprav líšila. Suverénne najviac jej vzniklo v prípade kombinovanej hydrolyzy, najmenej v prípade zásaditej. Čo však stojí za povšimnutie je vzájomný pomer glukózy a etanolu. Aj napriek nižším výťažkom glukózy u zásaditej hydrolyzy je konverzia na etanol veľmi účinná, účinnejšia ako u ostatných typov predúprav. Sklamaním je v tomto prípade kombinovaná hydrolyza, ktorá vzhľadom k vysokej koncentracii glukózy dosiahla najnižšiu mieru konverzie na etanol.

#### 4.7.2. Porovnanie výsledkov s ostatnými publikáciami

Pre účinné zhodnotenie výsledkov tejto práce je nutné ich porovnanie s predchádzajúcimi publikáciami. V literárnych zdrojoch bolo obtiažne nájsť výsledky experimentov prevedených za rovnakých podmienok ako v našom prípade, preto uvádzam tie, ktorých základné rysy boli rovnaké ako v tejto práci: použité mikroorganizmy (*S. cerevisiae*), použitý substrát (odpadná papierovina) a metóda prevedenia (batch SSF). Neboli porovnávané výsledky stanovení použitím geneticky upravených *S. cerevisiae* tak, aby boli odolnejšie voči vyšším teplotám.

V práci „Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol“ [70] dosiahol Kádár *et al.* koncentráciu etanolu 14,2 g.l<sup>-1</sup>. Experiment prebiehal pri teplote 40 °C, ako aj v našom prípade. Žiadne predúpravy v práci neboli spomínané, preto môžeme predpokladať, že išlo iba o fyzikálnu dezintegráciu substrátu. V našom prípade bol za rovnakých podmienok dosiahnutý výťažok etanolu 7,64 g.l<sup>-1</sup>, čo je výťažok približne o polovicu nižší. Na práci Kádár *et al.* [70] je prekvapivé, že pre porovnanie bol rovnaký experiment vykonaný aj s použitím termotolerantného kmeňa

*Kluyveromyces marxianus*. Bol predpoklad dosiahnutia vyšších výťažkov etanolu, no v sutočnosti pri rovnakých podmienkach boli dosiahnuté veľmi podobné výťažky – v prípade *K. marxianus* 14,1 g.l<sup>-1</sup> etanolu.

V práci Ing. Hlaváčka [71] boli dosiahnuté nasledové výsledky: pri fyzikálnej predúprave bol maximálny výťažok etanolu 14,19 g.l<sup>-1</sup> pri pridaní inokula v objeme 20 % V/V. Bohužiaľ sa v práci neuvádza, o akú predúpravu substrátu šlo. Lepšie výsledky boli dosiahnuté už len fermentáciou vo fermentore, kedy najlepší výťažok činil 23,49 g.l<sup>-1</sup> etanolu, za použitia krátkodobého zvýšenia teploty na 50 °C, čím došlo k zvýšeniu aktivity enzýmov a zároveň sa znížila rýchlosť fermentácie kvasiniek. Je nutné dodať, že Ing. Hlavíček nepracoval so zmesným odpadným papierom, ale s odpadnou lepenkou. V porovnaní s výsledkami dosiahnutými v tejto práci ide opäť približne o 2-násobné výťažky.



## 5. ZÁVER

Cieľom tejto práce bola výroba etanolu použitím metódy simultánnej sacharifikácie a fermentácie z vhodného odpadného substrátu a za pôsobenia vhodných mikroorganizmov. Ako odpadný substrát bol vybraný zberný papier, najmä pre jeho nízku cenu a veľké množstvá, ktoré sú dostupné nezávisle od lokality. Ako produkčný mikroorganizmus boli vybrané kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* neznámeho kmeňa, poskytnuté firmou Agroetanol, TTD.

Ďalším zámerom práce bola optimalizácia tohoto procesu a nájdenie optimálnych podmienok sacharifikácie a fermentácie pri použití zmienených mikroorganizmov a substrátu.

Substrát bol podrobený štyrom rôznym typom predúprav, ktorých účelom bola čiastočná delignifikácia substrátu, rozštiepenie hemicelulózy a sprístupnenie celulózy enzýmom. Bol použitý jeden typ fyzikálnej predúpravy - mletie a 3 typy fyzikálno - chemických predúprav: mletie spojené s kyslou, zásaditou a kombinovanou kyslo – zásaditou predúpravou. Substrát bol analyzovaný z viacerých uhľov pohľadu – bola prevedená kvantitatívna analýza na zistenie obsahu popola (stanovenie obsahu plnidiel, ktoré by mohli mať inhibičný efekt pri SSF), sušiny (zistenie obsahu vzdušnej vlhkosti) a množstva celulózy. Podľa našich stanovení obsahovala najväčší podiel celulózy kombinovaná, kyslo - zásaditá predúprava, ktorej obsah činil až 72,87 %. Najviac popola (a tým pádom plnidiel) obsahovali vzorky s fyzikálnou a zásaditou predúpravou. Kyslou a kombinovanou predúpravou dochádza k najúčinniejšiemu odstráneniu plnidiel.

V priebehu enzýmovej hydrolýzy bolo sledované množstvo glukózy, ktoré vznikne hydrolýzou v priebehu 138 hodín pri rôznych podmienkach. Najlepšie výsledky sa dosiahli použitím nasledovných podmienok: substrát predupravený kyslo – zásaditou predúpravou teplota hydrolýzy 45 °C, množstvo substrátu 8% w/V. Celkovo sa dá zhrnúť, že najvyššie výťažky sa dosahovali použitím vyššej teploty, väčšieho množstva substrátu a kyslo – zásaditej predúpravy. Naopak, ako menej vhodné sa javí použitie podmienok nižšej teploty a menšieho množstva substrátu. Z porovnania výsledkov sa nedá s určitosťou označiť jeden typ predúpravy ako nevyhovujúci.

Čo sa týka SSF, najlepšie výťažky boli opäť dosiahnuté kyslo – zásaditou predúpravou a výťažnosť etanolu dosiahla vo svojom maxime 9,22 g.l<sup>-1</sup>. Naopak, najnižšie výťažky sa dosiahli použitím fyzikálnej a zásaditej predúpravy. Kvasinky v priebehu SSF boli schopné produkovať etanol takmer od začiatku, nedochádzalo k dlhej lag fáze a z dôvodu vhodného množstva substrátu ani k limitácii kvasiniek. Enzýmy boli schopné hneď od počiatku hydrolýzy produkovať dostatočné množstvo glukózy. Množstvo reziduálnej glukózy zostávalo nízke, konverzia glukózy na etanol bola účinná.

Celkovo možno na základe výsledkov povedať, že by bolo vhodné previesť ďalšie experimenty pri rôznych podmienkach SSF, ktoré nebolo možné uskutočniť v rámci tejto práce z časových a iných dôvodov. Neznámy kmeň *S. cerevisiae* sa ukázal ako vhodný producent etanolu z glukózy, vzhľadom k množstvu vzniknutej glukózy. Zaujímavá by určite bola imobilizácia *S. cerevisiae* do vhodného nosiča, napríklad PVA a následné prevedenie SSF v reaktore s väčším objemom.

## 6. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ALEBZIA, F. *et al.* Utilization of carbohydrates content of paper tube residuals for ethanol production. *Carbohydrate Polymers*. 2012, č. 3. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711009441>
2. HROMÁDKO, J. Technologie výroby biopaliv druhé generace. *Chemické listy*. 2009. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_08\\_784-790.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_08_784-790.pdf)
3. Definícia. ZDRUŽENIE PRE VÝROBU A VYUŽITIE BIOPALÍV. *Všetko o biopalivách* [online]. 2013 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.vsetkoobiopalivach.sk/biopaliva/definicia/>
4. HAMELINCK, C. *et al.* Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2005, č. 4 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953404001801>
5. What is biomass?. *Biomass energy centre* [online]. [cit. 2015-02-15]. Dostupné z: [http://www.biomassenergycentre.org.uk/portal/page?\\_pageid=76,15049&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL](http://www.biomassenergycentre.org.uk/portal/page?_pageid=76,15049&_dad=portal&_schema=PORTAL)
6. JELEMENSKÝ, Ľ. *et al.* Energetické využitie rastlinnej biomasy 1 – Chemické zloženie a technológie. *Biomasa, biopaliva, bioplyn, pelety, kompostování a jejich využití* [online]. 2013 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/energeticke-vyuzitie-rastlinnej-biomasy-1-chemicke-zlozenie-a-technologie>
7. CRAWFORD, R. *Lignin biodegradation and transformation*. Manchester, UK: John Wiley and Sons Ltd, 1981, ISBN 978-0471057437.
8. Cellulose. *Encyclopaedia Britannica* [online]. 2014 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/101633/cellulose>
9. Chemical structure of cellulose. *Nippon Paper Industries Co., Ltd.* [online]. [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.npchem.co.jp/english/product/dp/>
10. LUQUE, R. *et al.* *Handbook of Biofuels Production: Processes and Technologies*. UK: Woodhead Publishing, 2011. ISBN 978-1-84569-679-5.
11. HENDRIKS, A. T. W. M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* [online]. 2009, roč. 100, č. 1 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408004574>
12. *Biofuels: The fuel of the future* [online]. 2010 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://biofuel.org.uk/>
13. MIKULEC. Biopalivá druhej generácie - stav a perspektívy. *Česká společnost průmyslové chemie* [online]. 2009 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.cspch.cz/TextyA/175.pdf>

14. ESENTRAUT, A. Sustainable production of second - generation biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. *International Energy Agency* [online]. 2010 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: [http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second\\_generation\\_biofuels.pdf](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/second_generation_biofuels.pdf)
15. KOSTÍK, P. ENVIRAL, a.s. *Aktuální stav a trendy vo výrobě bioetanolu*. World fuel ethanol production. *Renewable fuels association* [online]. 2015 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>
16. OLSSON, L. *et al.* Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996, č. 5 [cit. 2015-03-01]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022995001573>
17. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie*. Praha: Academia, 1999. ISBN 80-200-0438-6.
18. MÁROVÁ, I. *Přednášky z Biochemie II*. Brno, 2014.
19. KODÍČEK, M. *Biochemické pojmy: Výkladový slovník*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2004. ISBN 807080551x.
20. HROMÁDKO, J. *et al.* Výroba bioetanolu. *Listy cukrovarnické a řepařské*. 2010, roč. 126, 7-8.
21. SUN, Y. a J. CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource technology* [online]. 2002, roč. 83, č. 1 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>
22. PAULOVÁ, L. *et al.* Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. *CHEMAGAZÍN*. 2010, roč. 20, č. 5.
23. JOSHI, B. *et al.* Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review* [online]. 2011, roč. 6, č. 8 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/article/article1380119828\\_Joshi%20et%20al.pdf](http://www.academicjournals.org/article/article1380119828_Joshi%20et%20al.pdf)
24. IKEDA, Y. *et al.* Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* [online]. 2006, roč. 97, č. 8 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405002440>
25. NAIL, S. N. *et al.* Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. *Renewable and sustainable energy reviews* [online]. 2010, roč. 14, č. 2 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002342>
26. SZCZODRAK, J. a J. FIEDUREK. Technology and conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 1996, roč. 10, 5/6.

27. BHARATHIRAJA, B. *et al.* Bioethanol Production from Lignocellulosic Materials - An Overview. *The Scitech Journal*. 2014, roč. 1, č. 7.
28. ALVIRA, P. *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology* [online]. 2010, roč. 101, č. 13 [cit. 2015-03-15]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015983>
29. TAHERZADEH, M. J. *et al.* Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2008, roč. 9, č. 9 [cit. 2015-03-17]. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/htm>
30. VAN DYK, S. J. a B. I. PLETSCHE. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances* [online]. 2012, roč. 30, č. 6 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000687>
31. KUMAR, R. *et al.* Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, roč. 35, č. 5 [cit. 2015-03-18]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-008-0327-8>
32. *Biofuels and Bioenergy: Processes and Technologies*. Florida, USA: CRC Press, 2012. ISBN 978 -1-4200-8955-4.)
33. KADLEC, P. *et al.* *Technologie potravin II*. Praha: VŠCHT Praha, 2002. ISBN 978-80-7080-510-7.
34. REBROŠ, M. *et al.* Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: Baktérie alebo kvasinky?. *Chemické listy*. 2005, č. 99.
35. PELIKÁN, M. a L. SÁKOVÁ. *Jakost a zpracování rostliných produktů*. České Budějovice: Skripta ZF JČU, 2001.
36. RYCHTERA, M. *et al.* *Lihovarství, droždářství a vinařství*. Praha: VŠCHT Praha, 1991. ISBN 80-7080-117-4.)
37. BAFRNCOVÁ, P. a D. ŠMORGOVIČOVÁ. Inovačné trendy pri výrobe etanolu. *Chemické listy* [online]. 1999, č. 93 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_08\\_512-517.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_08_512-517.pdf)
38. CHEN, H. *Technology of Lignocellulose: Theory and Practice* [online]. 2014 [cit. 2015-03-22]. ISBN 978-94-007-6897-0. Dostupné z: [https://books.google.cz/books?id=0tcsBAAAQBAJ&pg=PA218&lpg=PA218&dq=shf+lignocellulose&source=bl&ots=eWZtsRrrHf&sig=swir6nSW\\_a-](https://books.google.cz/books?id=0tcsBAAAQBAJ&pg=PA218&lpg=PA218&dq=shf+lignocellulose&source=bl&ots=eWZtsRrrHf&sig=swir6nSW_a-)

[EAIPrV2FcZ2igOes&hl=cs&sa=X&ei=GgIPVcDkCMnqavnmgvgH&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=shf%20lignocellulose&f=false](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414003083)

39. BALLESTEROS, M. et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Chemistry*. 2004, roč. 39, č. 12.
40. LI, J. et al. One-pot simultaneous saccharification and fermentation: A preliminary study of a novel configuration for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology* [online]. 2014, č. 161 [cit. 2015-03-23]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414003083>
41. PARK, E. Y. et al. One-pot bioethanol production from cellulose by co-culture of *Acremonium cellulolyticum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2012, roč. 64, č. 5 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/5/1/64>
42. BAI, F. W. et al. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, roč. 26, č. 1 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975007001000>
43. STANLEY, D. et al. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, č. 109.
44. SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 1996, roč. 145, č. 3 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378109796003965>
45. PELIKÁN, M. a L. SÁKOVÁ. *Jakost a zpracování rostlinných produktů*. České Budějovice: Skripta ZF JČU, 2001.
46. Solutions Through Science. *Ferm Solutions: Fermentation Optimization Expertise* [online]. [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.ferm-solutions.net/>
47. ADAMS, M.R. Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* [online]. 1999, roč. 68, 2-3 [cit. 2015-03-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165698001989>
48. ROP, O. a J. HRABĚ. *Nealkoholické a alkoholické nápoje*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2009.
49. Alternativní paliva – etanol E85. *Point S* [online]. 2015 [cit. 2015-04-04]. Dostupné z: <http://point-s.cz/novinky/alternativni-paliva-etanol-e85/>
50. PILOTO-RODRÍGUEZ, R. et al. Prediction of the cetane number of biodiesel using artificial neural networks and multiple linear regression. *Energy Conversion and Management* [online]. 2013, roč. 65 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890412003093>

51. World Fuel Ethanol Production. In: *Renewable Fuels Association* [online]. 2014 [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>
52. CVENGROŠ, T. Motorové biopalivá – ich súčasný stav a perspektívy. *Biom.cz* [online]. 2008 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/motorove-biopaliva-ich-sucasny-stav-a-perspektivy>
53. Biopaliva v ČR – aktuální situace. *Biopaliva frčí* [online]. 2015 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://biopalivafrci.cz/jsem-novinar-a-hledam-informace/>
54. Víceletý program podpory dalšího uplatnění udržitelných biopaliv v dopravě na období 2015 – 2020. *Ministerstvo zemědělství* [online]. 2014 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/ziivotni-prostredi/obnovitelne-zdroje-energie/biopaliva/vicelety-program-podpory-dalsiho-1.html>
55. Beta Renewables, Biochemtex ink deal for commercial-scale cellulosic biofuels project in Slovakia. *BiofuelsDigest* [online]. 2015 [cit. 2015-04-05]. Dostupné z: <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/10/06/beta-renewables-biochemtex-ink-deal-for-commercial-scale-cellulosic-biofuels-project-in-slovakia/>
56. NAGALAKSHMI, S. *et al.* Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology* [online]. 2010, roč. 101, č. 13 [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409014862>
57. SEUNG, G.W. *et al.* Bioethanol production from rice straw by popping pretreatment. *Biotechnology for Biofuels* [online]. 2013 [cit. 2015-03-14]. Dostupné z: <http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/166>
58. SUBRAMANIAN, K. Biochemical conversion of rice straw into bioethanol - a n exploratory investigation. In: [online]. [cit. 2015-04-06]. Dostupné z: [www.compete-bioafrica.net/events/events2/seminar\\_india/ppt/4-5-Subramanium.pdf](http://www.compete-bioafrica.net/events/events2/seminar_india/ppt/4-5-Subramanium.pdf)
59. VÁVROVÁ, J. Abstrakt. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky* [online]. [cit. 2015-04-08]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVABU.htm>
60. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. druhé. Ostrava: nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
61. Basic turbidimeter design and concepts. *United States Environmental Protection Agency* [online]. 1999 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: [http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/mdbp/upload/2001\\_01\\_12\\_mdbp\\_turbidity\\_chap\\_11.pdf](http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/mdbp/upload/2001_01_12_mdbp_turbidity_chap_11.pdf)
62. HORÁKOVÁ, D. a M. NĚMEC. Laboratorní cvičení z fyziologie bakterií. In: *Katedra mikrobiologie, Falukta přírodovědecká, Masarykova univerzita v Brně* [online]. 2003 [cit. 2015-04-09]. Dostupné z: [http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z\\_fyziol.bakterii\\_upravene.pdf](http://is.muni.cz/elportal/estud/prif/ps06/3074288/Labor.cv.z_fyziol.bakterii_upravene.pdf)

63. NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha: Europrint a.s, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.)
64. Základní charakteristiky chromatografického procesu. *HPLC* [online]. [cit. 2014-11-16]. Dostupné z: [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz)
65. High Performance Liquid Chromatography, HPLC. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze* [online]. 1996 [cit. 2014-11-16]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>
66. CVAČKA, J. Detekce ve vysokoúčiné kvapalinové chromatografii. *Přírodovědecká fakulta univerzity Karlovy v Praze* [online]. 2010 [cit. 2014-11-16]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf>
67. Novozymes® . Novozymes® biomass kit : Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.
68. KESHWANI, Deepak R. a Jay J. CHENG. *Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production*. *Biotechnology Progress* [online]. 2010, vol. 26, issue 3, s. 644-652 [cit. 2013-05-01]. ISSN 87567938. DOI: 10.1002/btpr.371. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.371>
69. ANDRLOVÁ, K. *Využití Kluyveromyces marxianus k produkci bioethanolu z odpadního papíru*. Brno, 2013. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
70. KÁDÁR, Zs. *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *5th European Symposium on Industrial Crops and Products and the 3rd International: Congress and Trade Show GreenTech 2002* [online]. 2004, roč. 20, č. 1 [cit. 2015-04-27]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669004000135>
71. HLAVÁČEK, V. *Enzymatická hydrolýza odpadní lepenky s využitím metody SSF - zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv*. Brno, 2013. Diplomová práce. Fakulta chemická, Vysoké učení technické.



## 7. ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

apod.	a podobne
ATP	adenozín trifosfát, makroergická zlúčenina
c	koncentrácia
EMP	Embden – Meyerhof – Parnasova dráha
ED	Entner – Doudoroffova dráha
FAME	metylester mastných kyselín
hod.	hodina
HPLC	vysokotlaková kvapalinová chromatografia (high pressure liquid chromatography)
IS	interval spoľahlivosti
MERO	metylester repkového oleja
mld	miliarda
mR	mili rentgen
napr.	napríklad
p.a.	označenie chemikálií používaných na analýzu
pribl.	približne
PVA	polyvinylalkohol
rpm	revolutions per minute (otáčky za minútu)
SF	Solka – Flocc
SSF	simultánna sacarifikácia a fermentácia