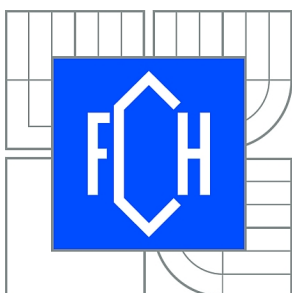




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA ODPADNÍ LEPENKY S VYUŽITÍM METODY SSF - ZDROJ SUROVINY PRO VÝROBU KAPALNÝCH BIOPALIV.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE CARDBOARD USING THE SSF METHOD - A SOURCE
OF RAW MATERIALS FOR THE PRODUCTION OF LIQUID BIOFUELS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VILIAM HLAVÁČEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR GABRIEL

BRNO 2013



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0739/2012	Akademický rok: 2012/2013
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Viliam Hlaváček	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Petr Gabriel	
Konzultanti:	Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.	

Název diplomové práce:

Enzymatická hydrolyza odpadní lepenky s využitím metody SSF - zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv.

Zadání diplomové práce:

1. Analýza a vyhodnocení výsledků předchozích diplomových prací na toto téma.
2. Doplnění literární rešerše - možné vlivy na rychlost a stupeň enzymatické hydrolyzy lignocelulóзовých materiálů a teoretické základy metody SSF. Vhodné typy termofilních mikroorganismů především pro etanolové kvašení.
3. Odpadová lepenka, jako surovina pro enzymatickou hydrolyzu.
4. Metody předúpravy suroviny pro hydrolyzu a jejich zhodnocení.
5. Ověření reprodukovatelnosti dosažených výsledků.
6. Laboratorní ověření technologického postupu.
7. Vyhodnocení výsledků měření, diskuse a návrh přenosu do poloprovozních měřítek ověřování.
8. Závěr.

Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Viliam Hlaváček
Student(ka)

Ing. Petr Gabriel
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2013

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Abstrakt

Diplomová práca pojednáva o využití enzymatickej hydrolýzy odpadnej lepenky s využitím metódy simultánnej sacharifikácie a fermentácie (SSF) ako zdroja pre výrobu kvapalných biopalív. Táto práca je priamym pokračovaním diplomovej práce Ing. Lepaře a Ing. Brummera. Vychádza teda z poznatkov získaných v týchto prácach a ďalej ich rozvíja.

V teoretickej časti sú zhrnuté dôvody pre vývoj tejto metódy a rovnako sú v nej popísané aj doteraz dosiahnuté výsledky a pokroky dosiahnuté v spracovaní lignocelulóзовých materiálov metódou SSF. Táto časť taktiež pojednáva o všeobecnej charakteristike lignocelulóзовého materiálu a zároveň aj celulólytických enzýmov. Pozornosť je venovaná jednotlivým možným metódam predúpravy lignocelulóзовého materiálu a možnostiam zvýšenia výťažnosti celého procesu.

Experimentálna časť overuje výsledky, ktoré boli dosiahnuté v predchádzajúcich prácach a zároveň bola v tejto časti uskutočnená ďalšia optimalizácia procesu s jeho prenesením do fermentoru. Substrátom bola vlnitá lepenka vyhodnotená Ing. Brummerom ako najvhodnejší substrát a na hydrolýzu boli použité enzýmy dodané firmou Novozymes®. Parametre ako teplota, pH a druh pufru, koncentrácia dávkovanej substrátu a enzýmov, boli prevzaté z práce Ing. Lepaře, ktorá sa zaoberala ich optimalizáciou. Proces SSF vo fermentore o objeme 2,0 l potvrdil výsledky dosiahnuté v práci Ing. Lepaře a došlo ak jeho zefektívneniu vďaka optimalizácii množstva pridávaného inokula. Bolo potvrdené, že najvhodnejším substrátom je vlnitá lepenka predupravená pomocou rozomletia vibračným mlynom. V rámci snahy o zvýšenie koncentrácie etanolu, boli uskutočnené aj pokusy s pridaním živín k produkčnému médiu, čo však nevedlo k uspokojivým výsledkom. Maximálna dosiahnutá koncentrácia etanolu činila 23,49 g/l, po dodatočnej optimalizácii niekoľkých parametrov, čo zodpovedá experimentálnemu výťažku 84,79 %.

Abstract

This master's thesis discusses the use of enzymatic hydrolysis process of waste cardboard using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) as a source of raw materials for production of liquid biofuels. This thesis is based on theses written by Ing. Brummer and Ing. Lepař. Thus, results gained in these works have been used and also further developed.

The theoretical part summarizes the reasons for further development of SSF method and discusses, as well, the achievements reached in the processing of lignocellulosic waste materials by the SSF method so far. This section also discusses the general characteristics of lignocellulosic materials and also of the cellulolytic enzymes. It focusses also on individual pretreatment methods of lignocellulosic material and options of increasing the yield of the whole process.

The experimental part verifies the particular results reached in previous theses and at the same time a further optimization of the method has been carried out because of the transfer of the whole process into a fermenter. Cardboard was set as the substrate for the experiments as it was evaluated by Ing. Brummer as the best one for enzymatic hydrolysis which was carried out by enzymes from Novozymes®. Parameters such as temperature, pH and kind of used buffer, the loading concentration of substrate and enzymes, were set according to the thesis of Ing. Lepař, which was aimed to their optimization. The SSF process done in fermenter of 2.0 l volume confirmed the previous results and furthermore it has been more effective through optimization of the added inoculum volume. It has been confirmed that the best substrate is cardboard finely grinded by vibrating mill. Also experiments with added nutrients had been done as an effort to increase the ethanol concentration, but these haven't resulted in satisfying results. The maximal concentration of ethanol was 23,49 g/l, which was achieved after further optimization of various conditions. This result equals to experimental yield of 84,79 %.

Klíčové slová

SSF, enzymatická hydrolýza, celulolytické enzymy, odpadná lepenka,
Saccharomyces cerevisiae, bioetanol

Key words

SSF, enzymatic hydrolysis, cellulolytic enzymes, waste cardboard, *Saccharomyces cerevisiae*,
bioethanol

HLAVÁČEK, V. *Enzymatická hydrolyza odpadní lepenky s využitím metody SSF - zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv..* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 62 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Gabriel.

PREHLÁSENIE

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

.....
Podpis študenta

Podakovanie

Rád by som týmto poďakoval za odborné rady, pripomienky a konzultácie Ing. Mgr. Liborovi Babákovi, Ph.D. a taktiež Ing. Petrovi Gabrielovi.

Ďalej by som rád poďakoval kolegyniam z biotechnologického laboratória, vďaka ktorým vládla v laboratóriu vždy dobrá nálada.

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická časť	10
2.1	Lignocelulóza.....	10
2.1.1	Celulóza.....	12
2.1.2	Hemicelulóza.....	13
2.1.3	Lignín.....	14
2.2	Odpadná lepenka ako substrát pre simultánnu sacharifikáciu a fermentáciu	15
2.2.1	Výroba lepenky.....	15
2.2.2	Chemické zloženie lepenky	16
2.3	Metódy predúpravy lignocelulóзовých materiálov	16
2.3.1	Fyzikálna predúprava	16
2.3.1.1	Mletie.....	16
2.3.1.2	Predúprava mikrovlnným žiarením	16
2.3.2	Chemická predúprava	17
2.3.2.1	Ozónolýza.....	17
2.3.2.2	Kyslá hydrolýza.....	17
2.3.2.3	Alkalická hydrolýza	17
2.3.3	Fyzikálne – chemická predúprava	17
2.3.3.1	Explózia vodnou parou.....	17
2.3.3.2	Kombinácia mikrovlnného žiarenia a chemickej predúpravy.....	17
2.3.4	Biologická predúprava.....	18
2.4	Celulózy a enzymatická hydrolýza	18
2.4.1	Molekulárna štruktúra celulytických enzýmov	18
2.4.2	Systém celulóзовých enzýmov.....	19
2.5	Metóda simultánnej sacharifikácie a fermentácie.....	20
2.6	Mikroorganizmy vhodné pre metódu SSF	20
2.6.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2.6.2	<i>Zymomonas mobilis</i>	21
2.6.3	Využitie plesní.....	21
2.7	Prehľad výsledkov dosiahnutých v predošlých diplomových prácach	21
2.7.1	Optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy v práci Ing. Brummera..	21
2.7.2	Optimalizácia SSF v práci Ing. Lepaře.....	22
3	Experimentálna časť.....	23

3.1	Zoznam použitých chemikálií a prístrojov.....	23
3.2	Použité enzýmy.....	23
3.3	Použité chemikálie.....	25
3.4	použité prístroje.....	25
3.5	Použitá kultúra.....	26
3.6	Použitá substrát.....	26
3.7	Príprava médií pre inokuláciu a kultiváciu <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3.8	Predúprava lepenky.....	26
3.8.1	Vibračný mlyn.....	26
3.8.2	Predúprava pomocou mikrovlnného žiarenia a NaOH/Ca(OH) ₂	27
3.9	Kompozičná analýza lepenky.....	27
3.9.1	Stanovenie celulózy.....	27
3.9.2	Stanovenie sušiny.....	28
3.9.3	Sitová analýza veľkosti častíc.....	28
3.10	Stanovenie počtu buniek a rastovej krivky.....	28
3.10.1	Turbidimetrické stanovenie počtu buniek a rastovej krivky.....	28
3.10.2	Stanovenie počtu buniek metódou výsevu na agarové platne.....	28
3.10.3	Stanovenie závislosti počtu buniek na turbidimetrickej absorbancii.....	28
3.11	Overenie reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých v práci Ing. Lepaře.....	29
3.11.1	Enzymatická hydrolýza.....	29
3.11.2	Simultánna sacharifikácia a fermentácia.....	29
3.12	Optimalizácia podmienok SSF.....	29
3.12.1	Optimalizácia času zaočkovania média.....	29
3.12.2	Optimalizácia množstva pridaného inokula.....	30
3.12.3	Optimalizácia množstva a druhu pridávaných živín.....	30
3.12.4	Optimalizácia substrátu.....	30
3.13	HPLC analýza produktov hydrolýzy a SSF.....	30
4	Výsledky a diskusia.....	31
4.1	Vyhodnotenie obsahu jednotlivých látok pomocou HPLC.....	31
4.2	Kompozičná analýza lepenky.....	33
4.2.1	Stanovenie sušiny v lepenkách rôznej predúpravy.....	33
4.2.2	Stanovenie celulózy.....	35
4.2.3	Určenie veľkosti častíc lepenkového prachu.....	36
4.3	Optimalizácia použitého substrátu.....	36
4.4	Enzymatická hydrolýza odpadnej lepenky.....	38

4.5	Rastová krivka <i>S. cerevisiae</i> na štandardnom médiu	40
4.6	Stanovenie závislosti počtu buniek na optickej hustote.....	40
4.7	Optimalizácia procesu SSF	41
4.7.1	Optimalizácia času zaočkovania produkčného média	41
4.7.2	Optimalizácia množstva pridaného inokula	44
4.7.3	Optimalizácia množstva a druhu pridaných živín	47
4.8	SSF odpadnej lepenky vo fermentore	51
4.8.1	Substrát – lepenka predupravená vibračným mlynom	51
4.8.2	Substrát – lepenka predupravená pomocou MW/NaOH	53
5	Záver.....	55
6	Použitá literatúra	57
7	Zoznam skratiek	62

1 Úvod

V priebehu uplynulých 150 rokov došlo aj vďaka ľudskej aktivite k dramatickému nárastu koncentrácie oxidu uhličitého v atmosfére. Za tento časový úsek došlo k nárastu koncentrácie CO₂ z 280 ppm na 365 ppm. Najväčší príspevok k tomuto nárastu má pritom na svedomí doprava, v rámci ktorej sa emisie každoročne zvyšujú. [1]

Jedným z možných spôsobov ako tento dopad na životné prostredie zmierniť a zároveň znížiť závislosť na fosílnych palivách je využívanie palív 2. generácie medzi ktoré spadá aj bioetanol. Pri jeho spaľovaní vzniká jednak omnoho nižšia emisia CO₂ a taktiež sa uvoľňuje omnoho menej ostatných škodlivých exhalátov ako napr. CO, oxidy dusíku, prchavé organické zlúčeniny atď. Na druhú stranu je však nutné spomenúť, že sa pri spaľovaní bioetanolu uvoľňuje acetaldehyd a formaldehyd. Z toho dôvodu musia byť vozidlá spalujúce etanol vybavené účinným a odolným katalyzátorom, schopným kontrolovať emisie aldehydov. [1]

Hlavný objem kvapalných biopalív, ale dnes vzniká fermentáciou škrobnatých surovín napr. kukurice, pšenice, alebo surovín s vysokým obsahom sacharózy teda cukrovej trstiny a cukrovej repy. Tieto plodiny však slúži predovšetkým pre výživu poľnohospodárskych zvierat a ľudí a tak je pri ich nízkej úrode využívaná táto ich primárna funkcia a taktiež v týchto obdobiach dochádza k značnému nárastu ich ceny. Produkcia palív z týchto surovín však zostáva výhodná pre krajiny ako Brazília a štáty Južnej a Strednej Ameriky, kde je napríklad možný zber cukrovej trstiny dvakrát do roka a je jej tu teda prebytok. Navyše znižuje závislosť daného štátu na rope, znižujú sa emisie a vytvárajú pracovné príležitosti [2].

V súčasnej dobe sa však do popredia dostávajú zatiaľ zriedka využívané lignocelulózové materiály kvôli ich nízkej cene a taktiež vďaka znižujúcim sa cenám komerčne dostupných enzýmových preparátov využívaných na ich hydrolýzu. Hlavne teda ide o využitie odpadných surovín s obsahom celulózy kam možno zaradiť slamu, piliny, drevné štiepky, rôzne poľnohospodárske odpady a komunálny odpad obsahujúci celulózu, teda hlavne odpadnú papierovinu. [3]

Práve na hydrolýzu odpadnej papieroviny a to konkrétne jednu z jej najväčších frakcií lepenku, je zameraná aj táto práca. Lepenka predstavuje veľmi dobre enzýmovo stráviteľný substrát. Tento fakt súvisí so spracovaním surového materiálu pri jej výrobe. Technológia Kraft procesu totiž zaisťuje čiastočné odstránenie lignínu a hemicelulózy čím sa pre enzýmy lepšie sprístupnia vlákna celulózy. Taktiež jej cenu často tvoria len náklady spojené s jej prepravou do miesta spracovania. [4]

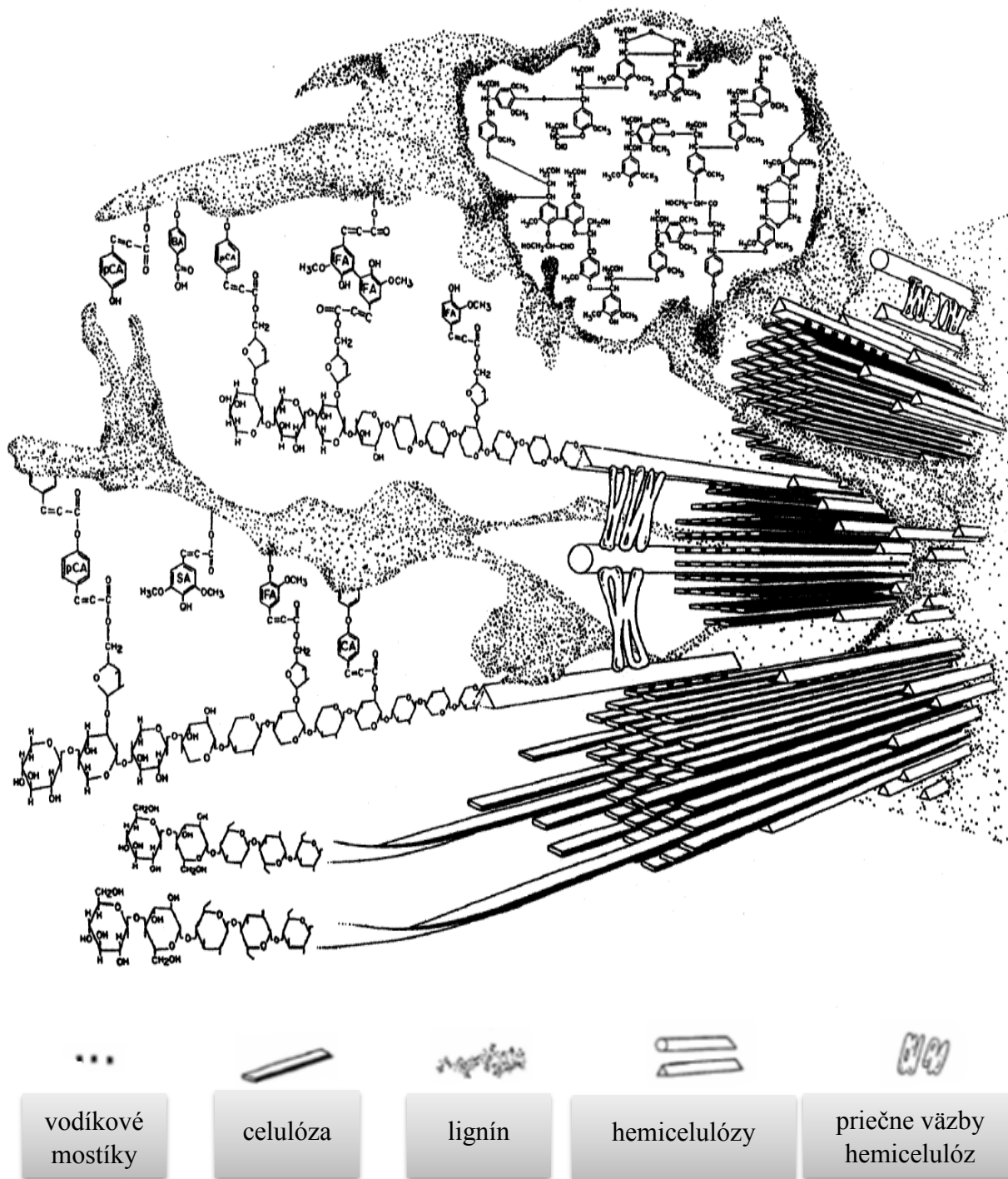
V rámci diplomovej práce boli využité poznatky získané z experimentov predošlých prác. Na ich základe bol testovaný proces simultánnej sacharifikácie a fermentácie vo fermentore o objeme 2,0 l a pre tento objem boli uskutočnené aj ďalšie optimalizácie.

2 Teoretická časť

2.1 Lignocelulóza

Lignocelulóзовý materiál je najrozšírenejším biologickým materiálom na svete. Jeho hlavnými zdrojmi, ďalej využiteľnými v priemysle, sú napríklad zvyšky z poľnohospodárskej činnosti, odpady z lesného hospodárstva, časť komunálneho odpadu a rôzne priemyselné odpady, ktoré majú veľký potenciál, čoby do využitia ako druhotné suroviny.

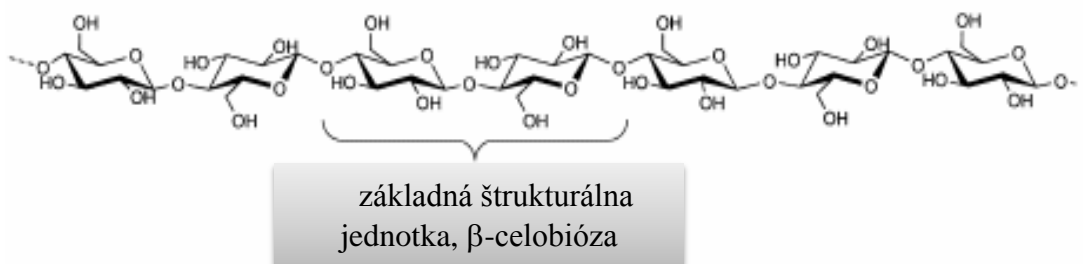
Lignocelulóзов pritom rozumieme súhrnný názov pre jej tri hlavné zložky a to celulózu, hemicelulózy a lignín. V rastlinnej bunkovej stene sú práve za jej pevnosť zodpovedné lineárne celulóзовé reťazce, zatiaľ čo lignín je zodpovedný za chemickú odolnosť a čiastočne ochranu proti vode. Hemicelulóza zasa zabezpečuje prepojenie predchádzajúcich zložiek. Z toho vyplývajú dve hlavné prekážky, ktoré bránia hydrolýze lignocelulóзовého materiálu. Jednou z nich je odolnosť kryštalickej štruktúry samotnej celulózy, vychádzajúcej z lineárnej štruktúry celulóзовých reťazcov pevne viazaných do štruktúry mikrofibríl. Druhou je lignín, ktorý obklopuje celulózu a tým jej poskytuje dobrú fyzikálnu ochranu pred pôsobením mikroorganizmov, respektíve ich celulólytických enzýmov. [5]



Obrázok 2.1 Model molekulárnej štruktúry hlavných zložiek lignocelulóзовého materiálu, rastlinnej bunkovej steny. Jednotlivé zložky sú usporiadané tak, že celulóзовé a hemicelulóзовé reťazce sú obklopené lignínom. Paralelné reťazce celulózy sú pevne viazané prostredníctvom vodíkových mostíkov a poskytujú tým pevnosť rastlinnému materiálu, pokiaľ ich obklopujúci lignín vytvára bariéru proti mikrobiálnemu pôsobeniu a vode. Hemicelulóza spája celulózu a lignín prostredníctvom siete priechne spojených vlákien. [6]

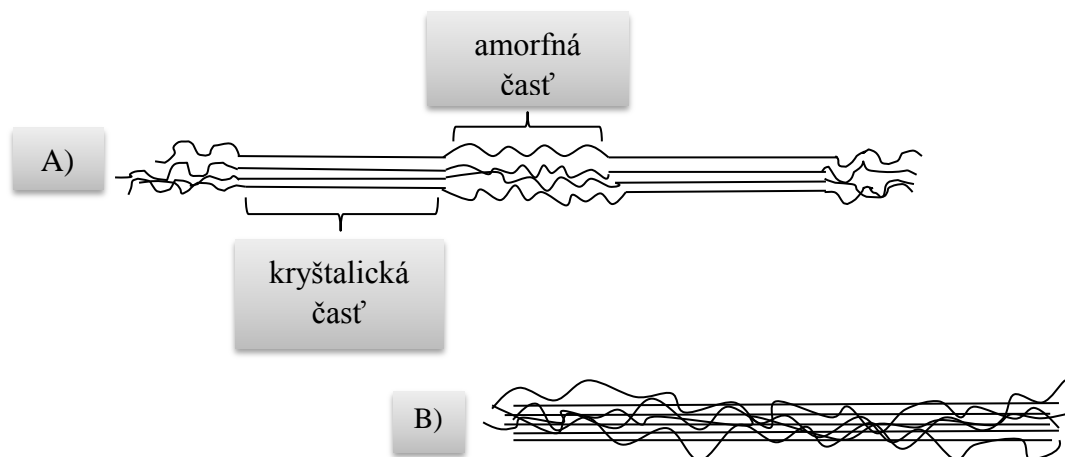
2.1.1 Celulóza

Celulóza je hlavnou zložkou lignocelulózy. Chemicky, ju možno považovať za jedinú molekulu, zloženú z D-glukopyranózy lineárne spojenej cez β -1,4 väzby. Zatiaľ čo chemicky sa opakujúcou základnou jednotkou je glukóza, základnou štruktúrnou jednotkou je disacharid β -celobióza. [6] V štruktúre celulózy sú glukózové reťazce pevne spojené prostredníctvom van der Waalsových síl a vodíkových mostíkov do kryštalickej štruktúry známej ako elementárna fibrila, ktorá sa skladá zhruba zo 40 glukózových jednotiek. Ich šírka je približne 40 Å, hrúbka 30 Å a dĺžka 100 Å. [7] Agregáty elementárných fibríl, teoreticky nekonečnej dĺžky a šírky približne 250 Å, sú nazývané mikrofibrily. [8]



Obrázok 2.2 Chemická štruktúra celulózy. Každá molekula glukózy je oproti predchádzajúcej pootočená o 180° , vytvárajúc tým základnú štruktúrne sa opakujúcu jednotku β -celobiózy. [6]

Vysoko usporiadané oblasti, v rámci štruktúry mikrofibríl sú nazývané kryštalickými a oproti tomu oblasti s menej dokonalou priestorovo štruktúrou ako amorfne. Termín amorfne celulóza je síce všeobecne používaný, no však je trochu rozporuplný, nakoľko amorfne materiál je definovaný ako beztvary, postrádajúci určitý tvar. Napriek tomu má však aj amorfne celulóza určitý stupeň priestorového usporiadania. [9] Podľa štruktúrnej štúdie celulózy, prevedenej Larssonsonom, et al. (1997) [10], väčšina amorfne regiónov zodpovedá reťazcom umiestneným na povrchu, pokým kryštalické štruktúry predstavujú jadro mikrofibríl. Odlišná molekulárna štruktúra však bola navrhnutá Moiserom, et al. (1999) [11]. Táto štúdia popisuje celulózu ako semi-kryštalickú, pričom oblasti s vysokou kryštalinitou, dlhé približne 200 glukózových jednotiek, sú od seba oddelené amorfne oblastami.



Obrázok 2.3 Rôzne štrukturálne modely usporiadania kryštalických a amorfných reťazcov celulózy podľa Larsonsa a Moiserera. [10, 11]

Celulóza sa vyskytuje v siedmich kryštalických štruktúrach označovaných ako $I\alpha$, $I\beta$, II , III_I , III_{II} , IV_I , and IV_{II} . [9] V prírode sú najrozšírejšími kryštalickými formami celulóza $I\alpha$ a $I\beta$. Polymorf $I\alpha$ je oproti $I\beta$ meta-stabilný a preto teda viac reaktívny. Percentuálne zastúpenie $I\alpha$ polymorfu v kryštalickej celulóze kolíše od 70 % v bakteriálnej celulóze [9], cez 64 % v celulóze izolovanej z riasy *Valonia ventricosa*, až po 20 % v celulóze pochádzajúcej z bavlny. [12]

2.1.2 Hemicelulóza

Popri celulóze je hemicelulóza hneď druhým najrozšírejším obnoviteľným organickým materiálom na Zemi. Pri konverzii lignocelulózy na palivo a iné chemikálie, je využitie hemicelulózy ako vedľajšieho produktu nevyhnutné pre zvýšenie ekonomickej výhodnosti spracovania tohto materiálu.

Hemicelulóza je rozvetvený heterogénny polymér zložený z množstva rozdielnych cukorných monomérov ako napríklad D-xylóza, L-arabínóza, D-manóza, D-glukóza, D-galaktóza, L-rhamnóza, 4-O-metyl-D-glukurónová kyselina, D-glukurónová kyselina a D-galaktourónová kyselina. [13] Jednotlivé druhy hemicelulóz sa navzájom líšia v závislosti od zastúpenia jednotlivých monomérnych zložiek. Napríklad hemicelulózy pochádzajúce z rôznych druhov drevín, ako tvrdého a mäkkého dreva, sa líšia ako v štruktúre tak aj v zastúpenom množstve jednozvlivých zložiek. Hemicelulózy z tvrdého dreva sú zložené hlavne zo xylanu a tvoria od 20 do 37 % drevnej hmoty, zatiaľ čo hemicelulózy z mäkkého dreva sú zložené prevažne z galaktouronánov a v drevnej hmote tvoria 16 až 27 %. [13] Priemerný stupeň polymerizácie sa pri tom pohybuje medzi 70 až 200 jednotkami a závisí od jednotlivých druhov dreva. [14]

Tabuľka 2.1 Hlavné zložky hemicelulózy. SP: stupeň polymerizácie; β -D-Manp: β -D-Manpyranóza; β -D-Glup: β -D-Glukopyranóza; α -D-Galp: α -D-Galaktopyranóza; β -D-Xylp: β -D-Xylopyranóza; 4-O-Me- α -D-GlupA: 4-O-metyl- α -D-Glukurónová kyselina; α -L-Araf: α -L-Arabinofuranóza; β -D-Galp: β -D-Galaktopyranóza; β -L-Arap: β -L-Arabinopyranóza; β -D-GlupA: β -D-Glykopyranozyl-urónová kyselina. [13]

Druh hemicelulózy	výskyt	obsah [% drevnej hmoty]	Zloženie			SP
			zložka	molárny pomer	väzba	
glaktoglukomanan	mäkké drevo	5,0-8,0	β -D-Manp	3	1,4	cca 200
			β -D-Glup	1	1,4	
			α -D-Galp	1	1,6	
			Acetyl	1		
galaktoglukomanan	mäkké drevo	10,0-15,0	β -D-Manp	4	1,4	cca 200
			β -D-Glup	1	1,4	
			α -D-Galp	0,1	1,6	
			Acetyl	1		
arabinoglukuronoxylan	mäkké drevo	7,0-10,0	β -D-Xylp	10	1,4	cca 200
			4-O-Me- α -D-GlupA	2	1,2	
			α -L-Araf	1,3	1,3	
arabinogalaktan	smrekovcové drevo	5,0-35,0	β -D-Galp	6	1,3	350
			α -L-Araf	cca 2/3	1,6	
			β -L-Arap	cca 1/3	1,3	
			β -D-GlupA	stopy	1,6	
glukuronoxylan	tvrdé drevo	15,0-30,0	β -D-Xylp	10	1,4	200
			4-O-Me- α -D-GlupA	1	1,2	
			Acetyl	7		
glukomannan	tvrdé drevo	2,0-5,0	β -D-Manp	cca 1-2	1,4	200
			β -D-Glup	1	1,4	

Vďaka svojej rozvetvenej štruktúre sú hemicelulózy viac rozpustné než celulóza a tým pádom sa dajú izolovať z dreva extrakciou. Taktiež môžu byť ľahko hydrolyzované silnými kyselinami, pričom zostávajú celulóza a lignín nedotknuté [15] a podobného efektu sa dosiahne aj silnými zásadami. [8] Vo väčšine prípadov predúprava s použitím zriedenej kyseliny pri vysokých teplotách vedie k degradácii väčšej časti hemicelulózy na rozpustné pentózy a hexózy [15]. Aj keď tento druh predúpravy nie je priamo zameraný na rozpustenie lignínu, je jeho štruktúra narušená a preusporiadaná, čo vedie k zlepšeniu kvality z hľadiska substrátu pre enzymatickú hydrolýzu. [16]

2.1.3 Lignín

Lignín je pravdepodobne najzložitejšou a najmenej charakterizovanou zložkou spomedzi ostatných komponentov drevnej hmoty. Jeho primárnou funkciou je zabezpečiť pevnosť štruktúry rastlinného pletiva a jeho permeabilitu pre vodu, ale taktiež poskytuje ochranu pred napadnutím patogénmi. Lignín sa skladá z trojrozmerného poprepájaného p-hydroxyfenolu,

guaiacylu a/alebo syringylu. Tieto tri monoméry sa od seba navzájom líšia rozdielnou metoxyláciou na aromatickom kruhu. [17] Rovnako ako u hemicelulózy, taktiež štruktúra a množstvo lignínu prítomného v drevných materiáloch sa líši na základe konkrétneho druhu dreveniny, typu bunky a štádia vývinu rastlinného pletiva. Lignín pritom tvorí 20-35 % drevnej štruktúry. [8]

V procese enzymatickej hydrolýzy lignocelulózy [18] a rovnako aj v papierenskom priemysle je lignín nežiaducou zložkou a preto je ho vo všeobecnosti potrebné chemickou úpravou odstrániť. Popri fyzikálnej bariére [19] môžu byť taktiež celulózy ireverzibilne naviazané na lignín, čím je ovplyvnené množstvo enzýmu potrebné pre hydrolýzu, ale taktiež je sťažená regenerácia enzýmov po hydrolýze. [20] Pre jeho odstránenie sú najpoužívanejšie hlavne nasledujúce dve metódy. Prvou je oxidatívna delignifikácia, katalyzovaná enzýmami katalázy v prítomnosti peroxidu vodíku. Druhou metódou je proces organosolv, pri ktorom je organické rozpúšťadlo spolu v zmesi s anorganickým kyslým katalyzátorom, HCl/H₂SO₄, použité na rozrušenie vnútorných väzieb medzi lignínom a hemicelulózou. Pre čiastočné rozpustenie lignínu sa ako účinným ukázal aj proces vlhkej oxidácie. Jedná sa o predúpravu uskutočňovanú pri teplotách medzi 170 °C a 200 °C a pretlaku kyslíku od 10 do 12 bar po dobu 10 až 15 minút. [21]

2.2 Odpadná lepenka ako substrát pre simultánnu sacharifikáciu a fermentáciu

Odpadná lepenka a odpadné materiály na báze celulózy vo všeobecnosti, sú vhodnými surovinami pre výrobu bioetanolu, pretože pochádzajú z obnoviteľných zdrojov. Ich ďalšou výhodou oproti poľnohospodárskym surovinám, používaným na majoritnú výrobu etanolu v súčasnosti, je fakt, že ich cena je veľmi nízka, často sa ju tvoria len náklady spojené s prepravou materiálu. [4, 17]

Medzi ďalšie výhody oproti iným alternatívnym surovinám (napr. slama), ponúka použitie odpadnej papieroviny ešte niekoľko ďalších výhod:

- široká dostupnosť a nesezónny charakter
- zber a preprava sú uľahčené zvýšením spolupráce spotrebiteľov
- zníženie nákladov spojených s predúpravou materiálu pre SSF vďaka predošlým chemickým úpravám [4]

2.2.1 Výroba lepenky

Lepenka je druh papieroviny, vyrábaný pomocou Kraft procesu alkalickým rozvlákňovaním smrekového, alebo borovicového dreva. Jedná sa o jednu z majoritných frakcií odpadnej papieroviny. [24]

Kraft proces využíva pri výrobe zmes hydroxidu sodného a sulfidu sodného, ktorých zmes je známa ako biely likér. Hydroxid rozrušuje štruktúru lignínu, štiepy ho na menšie fragmenty, ktoré sú rozpustné v alkalickom roztoku. Takto sa získajú oddelené drevné vlákna a čierny likér, čiže zmes rozpusteného lignínu a čiastočne zreagovaných rozvlákňovacích chemikálií. [24, 25]

Zvyškový lignín má veľmi pozmenenú štruktúru, jednak čo sa týka veľkosti jeho molekúl, ale aj väzieb so samotnou celulózou. Počas tejto výroby dochádza v značnej miere aj k rozpusteniu a extrakcii hemicelulózy. V dôsledku týchto faktov dochádza k oddeleniu vlákien a tým k lepšiemu sprístupneniu β -1,4-glykozidických pre enzymatickú hydrolýzu. [24]

2.2.2 Chemické zloženie lepenky

V závislosti na samotnom pôvode lepenky a dreve z ktorého bola vyrobená, je jej chemické zloženie v malej miere variabilné. Zastúpenie jednotlivých zložiek v sušine však kolíše okolo nasledovných hodnôt:

- celulóza 60 % w/w
- hemicelulóza 14 % w/w
- lignín 14 % w/w
- ďalšie zložky (plnidlá, lepidlá, atd.) 12 % w/w [4]

2.3 Metódy predúpravy lignocelulóзовých materiálov

Lignocelulóзовý materiál je nutné pred samotnou hydrolýzou a fermentáciou predupraviť. Tento krok je dôležitý z hľadiska zvýšenia porozity materiálu a odstránenia zvyškového lignínu a hemicelulózy, ktoré znižujú výťažnosť procesu. [26] Predúprava materiálu je z ekonomického hľadiska jedným z najdrahších krokov celého procesu. [27]

Požiadavky na účinnú predúpravu sú nasledovné:

- zlepšenie dostupnosti celulóзовých reťazcov pre celulólytické enzýmy
- nesmie dochádzať k stratám polysacharidov a nežiaducim degradáciám
- vznik vedľajších produktov, ktoré by mohli inhibovať ďalší proces musí byť minimálny, najlepšie úplne eliminovaný
- proces musí byť finančne efektívny [26]

2.3.1 Fyzikálna predúprava

2.3.1.1 Mletie

Veľmi jednoduchá a často využívaná metóda. Pri jej použití sa výsledná veľkosť častíc pohybuje v rozmedzí 0,2 – 2,0 mm. Energetické nároky sa pritom líšia podľa druhu použitého materiálu a konkrétneho typu použitého prístroja. Týmto spôsobom je možné zvýšiť výťažnosť až 3 krát. [26, 28]

2.3.1.2 Predúprava mikrovlnným žiarením

Aplikácia pôsobenia mikrovlnného žiarenia na lignocelulóзовý materiál vo vodnom prostredí sa ukazuje ako veľmi sľubná metóda predúpravy. Význam tohto druhu predúpravy spočíva v dvoch aspektoch.

Za prvé, mikrovlnné žiarenie dodáva materiálu vnútornú energiu, čo sa prejavuje rozkmitaním polárnych väzieb biomasy a rovnako aj obklopujúceho vodného prostredia. Žiarenie vytvára kontinuálne sa meniace magnetické pole nútiace polárne väzby kmitať počas ich zarovňavania sa v magnetickom poli. Toto narušenie a šok pôsobiaci na polárne väzby spôsobuje urýchlenie chemických biologických, fyzikálnych a chemických procesov. [29]

Za druhé, je známe, že tepelné ošetrenie lignocelulóзовého materiálu vo vodnom prostredí spôsobuje uvoľnenie kyseliny octovej. Tým vzniká vhodné, kyslé, prostredie pre autohydrolýzu. [30]

2.3.2 Chemická predúprava

2.3.2.1 Ozónolýza

Touto metódou dochádza k selektívnemu odstráneniu lignínu a hemicelulóz, zatiaľ čo zostáva celulóza intaktná. Táto metóda sa používa na predúpravu celého radu lignocelulózových materiálov ako sú napríklad drevené piliny seno, pšeničná slama. Hlavnou výhodou procesu je, že nedochádza k vzniku inhibítorov za súčasného efektívneho odstránenia lignínu. Metóda je však náročná na množstvo použitého ozónu, čo proces značne predražuje. [26]

2.3.2.2 Kyslá hydrolýza

Samotnej enzymatickej hydrolýze môže predchádzať hydrolýza pomocou koncentrovaných, alebo zriedených kyselín. Aj keď predúprava zriedenými kyselinami môže významne zlepšiť výťažnosť procesu hydrolýzy, sú náklady tohto procesu vyššie ako pri rovnako účinných fyzikálne – chemických metódach predúpravy. [26]

2.3.2.3 Alkalická hydrolýza

Pri alkalickej hydrolýze sú používané draselné, vápenaté, sodné a amónne hydroxidy. Samotná účinnosť predúpravy pritom závisí od obsahu lignínu v materiáli. Pôsobením hydroxidu dochádza k zmydelneniu intramolekulárnych esterických väzieb viažucich sa na xylany hemicelulóz a ďalších komponentov ako lignínu a iných častí hemicelulóz. Napríklad pri použití NaOH na tvrdé drevo bol znížený obsah lignínu v materiály z pôvodných 24 – 55 % na 20 %. Metóda je efektívna aj pri použití na predúpravu slamy, ale naopak neprináša zlepšenie vlastností materiálu pri ošetrení mäkkého dreva s obsahom lignínu viac ako 26 %. [26]

2.3.3 Fyzikálne – chemická predúprava

2.3.3.1 Explózia vodnou parou

Pri predúprave lignocelulózového materiálu je táto metóda najpoužívanejšia. Rozdrvená biomasa je vystavená pôsobeniu vysokotlakej nasýtenej vodnej pary. Tlak je následne rýchlo znížený, čo vedie k explozívnej dekompresii materiálu. Explózia je iniciovaná pri teplotách 160 – 260 °C (tlak 0,7 – 4,8 MPa) po niekoľko sekúnd až minút a následne dochádza k poklesu tlaku až na atmosférický. Aj keď sa pri tejto metóde spotrebuje až o 70 % menej energie, na dosiahnutie rovnakej veľkosti častíc ako pri mechanických procesoch, je jej veľkou nevýhodou vznik inhibičných látok pre MO rozkladom časti xylanovej frakcie. [26]

2.3.3.2 Kombinácia mikrovlnného žiarenia a chemickej predúpravy

Pri tomto druhu predúpravy je lignocelulózový materiál suspendovaný vo vodnom roztoku kyseliny, alebo zásady a následne vystavený mikrovlnnému žiareniu. Chemická predúprava spojená s účinkom mikrovlnného žiarenia je omnoho efektívnejšou alternatívou ku konvenčne používanému postupu, využívajúcemu zahrievanie suspenzie pod refluxom. Dochádza totiž ku špecifickému účinku mikrovlnného žiarenia a celý proces sa skraca z niekoľkých hodín na niekoľko málo minút. Navyše sa zvyšuje aj množstvo odstráneného lignínu a hemicelulóz z biomasy. Najvyššiemu prečisteniu biomasy a teda k najväčšiemu nárastu obsahu celulózy, dochádza pri použití kombinovanej metódy. Pri tomto postupe je biomasa najskôr

suspendovaná v roztoku NaOH a vystavená mikrovlnnému žiareniu o výkone 700 W po dobu 5 min. následne je premytá až do neutrálnej reakcie a znovu suspendovaná, ale tentokrát v roztoku zriedenej H₂SO₄. Suspenzia je podrobená rovnakým účinkom mikrovlnného žiarenia ako v predošlom prípade. Konečným krokom, ktorý môže ďalej zvýšiť výťažnosť celulózy je suspendácia zvyšku biomasy v roztoku peroxidu vodíka. Suspenzia sa nechá odstáť po dobu 12 h na tmavom mieste a následne je pred enzymatickou hydrolýzou odfiltrovaná a premytá vodou. Tento posledný krok je však z ekonomického hľadiska nie príliš efektívny. Neúmerne predlžuje čas celej predúpravy, pričom sa nedosiahne markantného zvýšenia koncentrácie celulózy v biomase. [29]

2.3.4 Biologická predúprava

Na biologickú predúpravu lignocelulóзовého materiálu môžu byť použité vláknité huby so schopnosťou degradácie lignínu a hemicelulóz. Patria sem napríklad *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyathus stercoreus*, *Penicillium chrysosporium* a iné. Hlavnou výhodou takejto predúpravy sú nízke energetické náklady a mierne podmienky procesu. Samotná účinnosť takejto predúpravy je však veľmi nízka. [26]

2.4 Celulózy a enzymatická hydrolýza

V prírode je celulóza väčšinou degradovaná mnohými druhmi celulólytických baktérií a húb. Tieto MO pritom môžu byť aeróbne alebo anaeróbne, mezofilné alebo termofilné. [18]

Medzi baktérie produkujúce celulózy patria rody: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora* a *Streptomyces*. [31]

Producenti z radu vláknitých húb, produkujúci celulózy sú napr. *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma konigii*, *Penicillium irensii* a *Fusarium solani*. [32]

Práve celulózy týchto mikroorganizmov sú používané v mnohých priemyselných procesoch napr. pri recyklácii papiera, spracovaní bavlny. Pokiaľ sa teda biopalivá vyrábajú z celulóзовých materiálov stanú majoritnými na trhu s pohonnými hmotami, stanú sa celulózy najprodukovanejšími priemyselnými enzýmami. [33]

V súčasnosti je najvýznamnejším producentom celulóz vláknitá huba *Trichoderma reesei* (taktiež *Hypocrea jecorina*), ktorá bola intenzívne skúmaná už od jej identifikovania počas 2. Svetovej vojny. Veľký záujem o túto pleseň spočíva v jej schopnosti vylučovať veľké množstvá enzýmov. Postupom času boli získané kmene produkujúce 0,14-0,38 g rozpustného proteínu na 1 g uhlíkatého zdroja. [33]

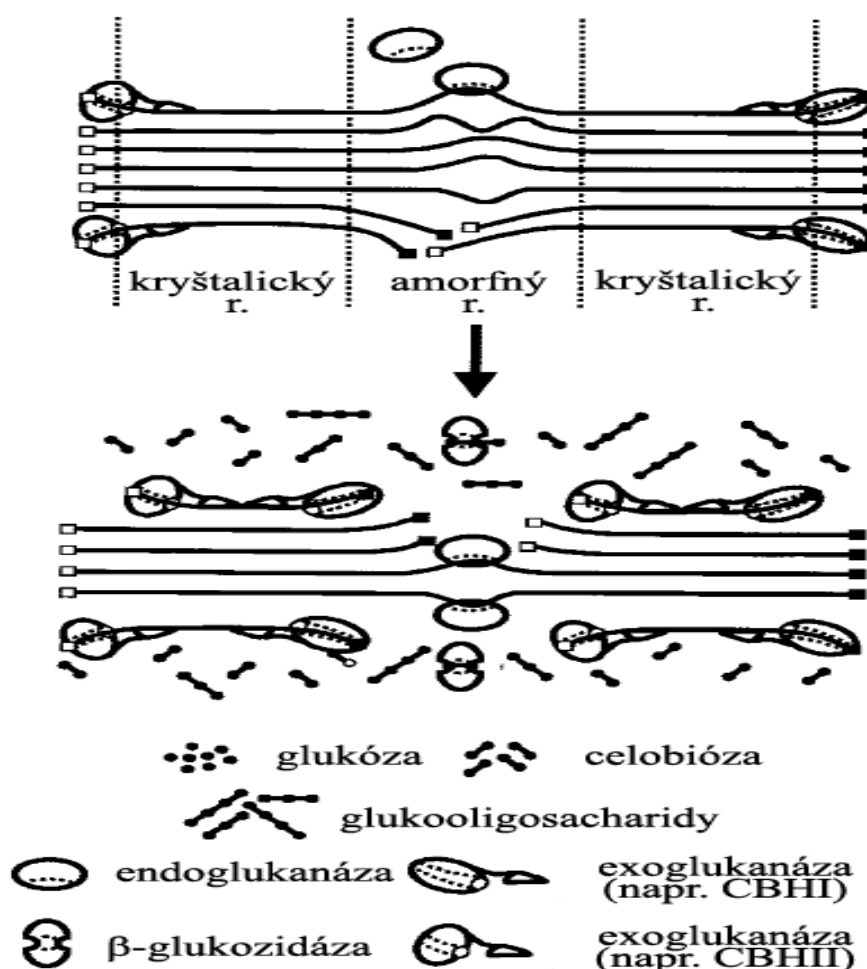
2.4.1 Molekulárna štruktúra celulólytických enzýmov

Celulózy sú enzýmy zložené zo štruktúrálne a funkčne diskretných podjednotiek označovaných ako domény a moduly. [34] Najčastejšie sa celulózy skladajú z jednej katalytickej domény a jedného modulu, schopného väzby na uhl'ovodíkový reťazec. Tieto dve podjednotky sú spojené relatívne dlhým (30-40 aminokyselín) a často glykozylovaným, spojovacím peptidom. [34]

2.4.2 Systém celulázových enzýmov

Napriek tomu že je celulóza homopolymérna látka, je na jej degradáciu potrebných hneď niekoľko rôznych enzýmov. Tieto môžeme rozdeliť do troch hlavných skupín: Endoglukanázy (EG) (EC 3.2.1.4), ktoré náhodne hydrolyzujú interné β -1,4-D-glykozidické väzby celulózového reťazca; Celobihydrolázy (CBH) (EC 3.2.1.91), taktiež známe ako exoglukanázy, ktoré potupujú od konca celulózového reťazca a odštiepujú pri tom jednotky celobiózy; β -glukozidázy (BG) (EC 3.2.1.21), ktoré sú zodpovedné za štiepenie celobiózy na samotnú glukózu a taktiež odštiepujú glukózové jednotky z celulózových oligosacharidov.

Pri degradácii celulózy tieto enzýmy synergicky spolupracujú tak, že nedochádza k ich produktovej inhibícii. Táto koordinovaná spolupráca zabezpečuje efektívnu degradáciu celulózy. [35, 36]



Obrázok 2.4 Schcematické znázornenie enzymatickej hydrolýzy celulózy komplexom celulólytyckých enzýmov. [22]

T. reesei produkuje zmes dvoch druhov celobiohydroáz, piatich endoglukanáz a dvoch β -glukozidáz. Multiplicita týchto enzýmov sa ukázala ako užitočná z toho hľadiska, že vykazujú rôznu afinitu pre rôzne miesta štiepenia a takisto hydrolyzujú celulózu z jej rozličných koncov. [37, 38] *T. reesei* taktiež produkuje niekoľko hemiceluláz. Ako už bolo spomenuté, shemicelulózy sú rôznorodou skupinou heterogénnych polymérov s rôznymi postrannými skupinami. Z toho dôvodu je systém hemiceluláz viac komplexný a zahŕňa napríklad

xylanázy, manázy, arabinázy a niekoľko esteráz. V závislosti na substráte a druhu jeho predúpravy môžu byť hemicelulózy kľúčové pre hydrolýzu lignocelulóзовého materiálu. [39]

2.5 Metóda simultánnej sacharifikácie a fermentácie

Metóda simultánnej sacharifikácie a fermentácie (SSF) v sebe zahŕňa hydrolýzu lignocelulóзовého materiálu na skvasiteľné cukry a ich okamžité využitie ako substrátu vhodnými MO. Oba procesy pritom prebiehajú za rovnakých podmienok, čiže súčasne v jednom bioreaktore. Vďaka tomu sa výrobné náklady produkovaného etanolu značne znižia. [40]

Nevýhodou tohto procesu však je skutočnosť, že sa musia zvoliť podmienky, ktoré sú akýmsi kompromisom medzi optimálnymi podmienkami pre celulytické enzýmy a optimálnymi podmienkami pre činnosť MO. Jedná sa pri tom hlavne o teplotu pri ktorej SSF prebieha. Optimálna teplota hydrolýzy sa totiž pohybuje v rozmedzí teplôt 45 – 50 °C, zatiaľ čo vhodná teplota pre fermentáciu leží v rozmedzí 28 – 35 °C. Pre SSF sa teda volí teplota nižšia ako optimálna teplota pre činnosť enzýmov. Možným riešením tohto problému je použitie termotolerantných MO. [41] Pri použití SSF je taktiež obtiažna recyklácia kvasiniek a samotných enzýmov, ktoré sa viažu na substrát. Tieto skutočnosti teda vedú k finančným stratám. Riešením by však mohlo byť použitie imobilizovaných MO a enzýmov, ktoré by sa spolu s nosičom dali ľahko oddeliť od nezhydrolyzovaného substrátu. [42]

Značnou výhodou ale zostáva skutočnosť, že sa zvyšujú výnosy glukózy oproti samostatnej enzymatickej hydrolýze a tým je možné dosiahnuť aj vyššiu výťažnosť etanolu oproti oddelenej hydrolýze a fermentácii (SHF). Je to vďaka skvasovaniu vznikajúcej glukózy, čím sa zmiernuje produktová inhibícia celuláz. [22] Proces SSF nám teda dovoľuje použiť nižšie koncentrácie enzýmov a vyššie počiatočné koncentrácie substrátu. Celý proces SSF trvá kratšiu dobu (do 72 h) oproti SHF (až 120 h) a je potrebný iba jeden reaktor. [43, 44]

2.6 Mikroorganizmy vhodné pre metódu SSF

Medzi základné požiadavky na výber vhodného MO pre metódu SSF sa radia hlavne tolerancia k vyššej teplote, vysoká výťažnosť etanolu zo substrátu, tolerancia voči vyšším koncentráciám etanolu, genetická stabilita a odolnosť voči nožnej prítomnosti inhibítorov. Z hľadiska charakteru substrátu je tiež výhodné ak je daný MO schopný skvasovať viac druhov sacharidov a to hlavne aj pentózy, vznikajúce rozkladom celobiózy. Tradične sa pre tieto účely využíva najrozšírenejší priemyslovo využívaný MO, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, ktorá však nedokáže skvasovať pentózy. MO schopný využívať pentózy ako substrát pre tvorbu etanolu je baktéria *Zymomonas mobilis*. V budúcnosti by sa mohli osvedčiť aj GMO. [45, 46]

2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Jedná sa o najpreskúmanejšiu kvasinku vôbec. V priemyselnej produkcii je hojne využívaná a je taktiež tradičným MO liehovarníctva. *S. cerevisiae* je zástupcom radu *Endomycetales*. Je fakultatívne anaeróbná, má guľovitý až oválny tvar. Vegetatívne sa rozmnožuje multilaterálnym pučaním, pričom môže vytvárať pseudomycélium. Pri generatívnom rozmnožovaní tvorí aská so štyrmi haploidnými spórmi. Je schpná fermentovať nasledovné sacharidy: glukózu, fruktózu, galaktózu, maltózu, manózu, sacharózu a rafinózu. Hexózy metabolizuje prostredníctvom glykolytickej dráhy. [47]

2.6.2 *Zymomonas mobilis*

Jedná sa o fakultatívne anaeróbnú, gramnegatívnu baktériu. Pre metabolizmus sacharózy a teda aj glukózy a fruktózy využíva Entner – Doudorffovu glykolytickú dráhu. *Zymomonas mobilis* vykazuje oproti kvasinkám *Saccharomyces cerevisiae* troj- až päťnásobne vyššiu rýchlosť produkcie etanolu a výťažnosť až 97 % oproti kvasinkám s výťažnosťou 90 – 92 %. Oproti kvasinkám sú navyše niektoré kmene *Zymomonas mobilis* tolerantnejšie k inhibítorm nachádzajúcim sa v lignocelulóзовých hydrolyzátach, ako sú napríklad furfural a kyselina octová. [48, 49]

2.6.3 Využitie plesní

Pre proces SSF celulózy boli testované aj plesne *Fusarium oxysporum*. Hlavnou výhodou použitia plesní je fakt že produkujú beta-glukozidázu a celobiohydrolázu, čím odpadá nutnosť použitia celulólytických preparátov.

Za anaeróbných podmienok tieto plesne produkovali etanol v miere 0,35 g/g celulózy. Okrem toho sa však v médiu hromadí aj veľké množstvo vedľajších produktov a to hlavne kyseliny octovej 0,2 g/g celulózy a taktiež väčšie množstvá gama-aminomaslovej kyseliny (GABA). Pravdepodobne teda dochádza k inhibícii TCA cyklu a k regenerácii NADH dochádza pomocou vzniku kyseliny octovej, čo zapríčiňuje jej vysoké koncentrácie. [50]

2.7 Prehľad výsledkov dosiahnutých v predošlých diplomových prácach

Predkladaná diplomová práca priamo nadväzuje na predchádzajúce dve diplomové práce s názvom Enzymatická hydrolýza odpadní papíroviny – zdroj pro výrobu kapalných biopaliv od autorov Ing. Vladimíra Brummera a Ing. Petra Lepaře. Výsledkom týchto prác bola optimalizácia predúpravy a výber najvhodnejšieho substrátu pre samotnú hydrolýzu ako aj optimalizácia fyzikálno – chemických podmienok hydrolýzy a SSF.

V obidvoch prípadoch boli na degradáciu biomasy použité enzýmy z testovacieho balíčku Novozymes® Biomass kit. Konkrétne, enzýmový preparát NS50013 (celulázový komplex) a NS500010 (β - glukozidáza).

2.7.1 Optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy v práci Ing. Brummera

V diplomovej práci Ing. Brummera boli optimalizované podmienky hydrolýzy celulózy z odpadnej papieroviny. Bola vykonaná hrubá optimalizácia priebehu hydrolýzy pomocou modelových substrátov (filtračný papier, buničina). Optimalizované parametre boli typ a sila tlmivého roztoku, pH, teplota a koncentrácia enzýmov a substrátu a intenzita miešania.

Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri použití octanového pufru s pH a silou nastavenou tak aby pH výluhu po hydrolýze dosahovalo 4,43 – 4,93. Intenzita miešania bola nastavená na 190 rpm. Najlepších výsledkov hydrolýzy bolo dosiahnutých pri teplote 50 °C. Koncentrácia substrátu by mala byť 8 % w/v. Čo sa týka dávkovania enzýmu, boli najvyššie výťažky dosiahnuté pri dávkovaní 6 a 10 % w/w na TS preparátu NS50013 s prídavkom 0,6 a 1,0 % w/w na TS preparátu NS50010.

Po optimalizovaní podmienok hydrolýzy bol určený najvhodnejší typ odpadného materiálu, určeného k enzymatickej hydrolýze. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté pri použití lepenky. Pri jej hydrolýze bol dosiahnutý výťažok 24,4 % pri fed-batch enzymatickej hydrolýze s dávkovaním enzýmov 2 % w/w na TS. U iných papierov ako recyklovaný potlačený a recyklovaný nepotlačený boli dosiahnuté výťažky 20,9 % a 23,0 % čo naznačuje že farbivá majú síce inhibičný účinok, ktorý je však málo významný. Ešte lepších výťažkov z lepenky

bolo dosiahnutých pri dávkovaní 10 % w/w enzymatického komplexu na TS a použití predúpravy lepenky mletím a následným aplikovaním 0,25 % H₃PO₄ a 2 % NaOH. U takto upravenej lepenky sa zvýšil výťažok na 48,3 %.

Podľa záverov práce by bolo vhodné za účelom zvýšenia výťažnosti zaviesť simultánnu sacharifikáciu a fermentáciu. Týmto spôsobom by sa mal zvýšiť výťažok, nakoľko by bola vznikajúca glukóza utilizovaná MO a nedochádzalo by tým pádom k inhibícii celulolytických enzýmov týmto produktom enzymatickej hydrolýzy. [51]

2.7.2 Optimalizácia SSF v práci Ing. Lepaře

V nadväznosti na predchádzajúcu prácu bola otestovaná jej reprodukovateľnosť a boli uskutočnené pokusy so SSF.

Znovu boli otestované jednotlivé spôsoby predúpravy lepenky a následne bola prevedená kompozičná analýza po jednotlivých predúpravách. Najvyšší obsah celulózy bol pritom potvrdený pri predúprave pomocou mletia a následnej aplikácie 0,25 % H₃PO₄ a 2 % NaOH. Pre samotnú hydrolýzu sa však ako najvhodnejší spôsob predúpravy ukázala fyzikálna predúprava pomocou mixéru a vibračného mlynu. Týmto spôsobom bol dosiahnutý výťažok glukózy 33,28 %.

Bolo zistené že najvyšších výťažkov hydrolýzy pri 37 °C bolo dosiahnutých pri batch enzymatickej hydrolýze s dávkovaním preparátu NS 50013 6 % w/w na TS, po dobu 96 h, s dávkovaním lepenky 8 % w/v. Výťažok redukujúcich sacharidov bol pri použití týchto parametrov 44 %. Hlavnými produktmi hydrolýzy pritom boli glukóza s koncentráciou 15,03 g/l a celobióza 8,15 g/l.

Za účelom zvýšenia výťažku enzymatickej hydrolýzy bola testovaná SSF. Vďaka fermentácii sa totiž spotrebuje glukóza, ktorá má inhibičný efekt na celulolytické enzýmy. Za týmto účelom bolo potrebné optimalizovať ďalšie parametre SSF. Podmienky boli optimalizované pri použití kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Najlepšej vitality kvasiniek sa dosiahlo pri použití 0,1M citráto-fosforečnanového pufru pri pH 4,8 na počiatku hydrolýzy. Množstvo dávkovaných kvasiniek činilo 40·10⁶ CFU/ml. Najvhodnejšia koncentrácia dávkovaných enzýmov bola určená na 6 + 0,6 % w/w vzhľadom k substrátu, najvhodnejšie množstvo substrátu 8 % w/v. Proces SSF prebiehal pri 40 °C.

Finálna koncentrácia etanolu činila 13,9 g/l. Bol teda dosiahnutý experimentálny výťažok 58,80 % vzhľadom k množstvu vstupnej celulózy a 51,53 % výťažku RS. Inhibícia substrátom sa teda vďaka SSF podarila čiastočne odstrániť. Ďalšou výhodou je skrátenie celého procesu pre ktorý stačí 48 h, oproti tomu pri SHF je potrebných na samotnú hydrolýzu minimálne 72 h a na následné kvasenie ďalších 48 h. [52]

3 Experimentálna časť

Cieľom experimentálnej časti diplomovej práce bolo overenie reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých v predchádzajúcich prácach vo väčších pracovných objemoch. Rovnako bola optimalizovaná doba zaočkovania média od počiatku hydrolýzy a taktiež množstvo inokula a koncentrácia predupravenej lepenky. V rámci experimentálnej časti bola otestovaná aj alternatívna úprava odpadnej lepenky pomocou mikrovlnného žiarenia na jej suspenziu v roztoku NaOH.

3.1 Zoznam použitých chemikálií a prístrojov

3.2 Použité enzýmy

Novozymes® Biomass Kit – NS50013 (celulázový komplex)

Celulázový komplex katalyzuje rozklad celulózy na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy. Hlavnými produktmi enzymatickej reakcie sú celobióza a glukóza. Pre maximalizáciu výťažku sa preparát NS50013 kombinuje s preparátom NS50010. [53]

Tabuľka 3.1 Enzymová aktivita preparátu NS50013, doporučené pH, teplota a dávkovanie [53]

enzým	aktivita ¹	hustota ² [g/ml]	pH	teplota [°C]	dávkovanie ³ % w/w (na TS)
NS50013 (celulázový komplex)	700 EGU/g (~ 70 FPU/g)	1,2	4,5 – 6,5	45 – 50	2 – 6 %

1 – EGU – endo-glucanase unit, FPU – filter paper unit

2 – hodnota hustoty je približná

3 – dávkovanie je značne závislé na druhu použitého materiálu, typu predúpravy, ktorá bola použitá a ďalších podmienok spracovania, preto môže byť dávkovanie pomerne variabilné

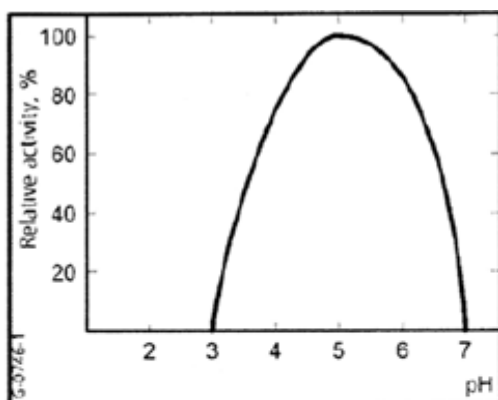


Fig. 1. Influence of pH on the activity of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.009 EGU/ml
Temperature:	50°C (122°F)
Reaction time:	20 minutes

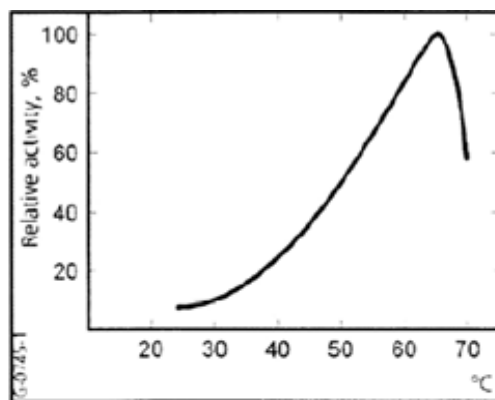


Fig. 2. Influence of temperature on the activity of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.009 EGU/ml
pH:	4.8
Reaction time:	20 minutes

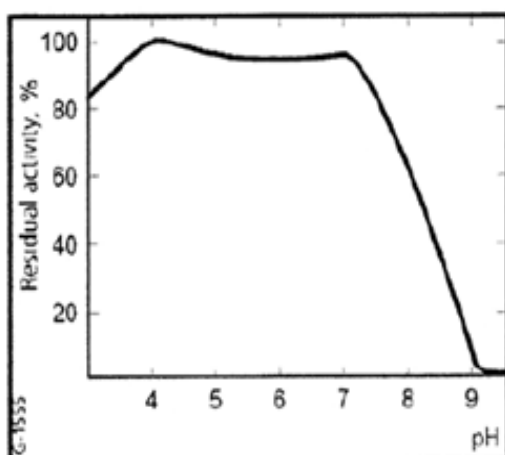


Fig. 3. Influence of pH on the stability of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.9 EGU/ml
Temperature:	25°C (77°F)
Incubation time	16 hours
Buffer system:	Mcllvaine

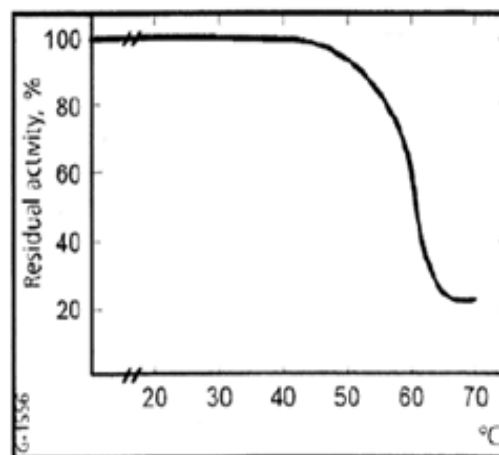


Fig. 4. Influence of temperature on the stability of NS50013.

Concentration of enzyme:	0.9 EGU/ml
pH:	4.8
Reaction time:	30 minutes

Obrázok 3.1 Vplyv pH a teploty na aktivitu a stabilitu preparátu NS50013 (celulázového komplexu) [53]

Novozymes® Biomass Kit – NS50010 (β - glukozidáza)

Preparát β - glukozidázy katalyzuje hydrolýzu celobiózy na glukózu. Doporučený prídavok tohto preparátu tvorí 5 – 10 % (V/V) na množstvo enzýmového preparátu NS50013, pre konkrétnu hydrolýzu dostupnej celulózy. [53]

Tabuľka 3.2 Enzymová aktivita preparátu NS50010, doporučené pH, teplota a dávkovanie [53]

enzým	aktivita ¹	hustota ² [g/ml]	pH	teplota [°C]	dávkovanie ³ % w/w (na TS)
NS50010 (β - glukozidáza)	250 CBU/g	1,2	2,5 – 6,5	45 – 70	0,2 – 0,6 %

1 – CBU – cellobiase unit

2 – hodnota hustoty je približná

3 – dávkovanie je značne závislé na druhu použitého materiálu, typu predúpravy, ktorá bola použitá a ďalších podmienok spracovania, preto môže byť dávkovanie pomerne variabilné

3.3 Použité chemikálie

- destilovaná voda, H₂O
- kyselina citrónová, monohydrát – p. a., LachNer, C₆H₈O₇ · H₂O
- hydrogénfosforečnan sodný, stredný, dodekahydrát – Lachema a.s., Na₂HPO₄ · 12 H₂O
- kyselina sírová – 96 %, p. a., LachNer, H₂SO₄
- hydroxid sodný – čistý, PENTA, NaOH
- kvasničný extrakt – pre bakteoriológiu, Carl ROTH
- dihydrogenfosforečnan draselný – p. a., LachNer, KH₂PO₄
- síran horečnatý heptahydrát – p. a., LachNer, MgSO₄ · 7 H₂O
- síran manganatý monohydrát – čistý, PENTA, MnSO₄ · H₂O
- síran amónny – p. a., LachNer, (NH₄)₂SO₄
- agar – bakteriologický, Carl ROTH
- D-glukóza bezvodá – p. a., PENTA, C₆H₁₂O₆
- Celobióza – Sigma-Aldrich, C₁₂H₂₂O₁₁
- Xylóza – Sigma-Aldrich, C₅H₁₀O₅
- Etanol 99,9% - pre HPLC, Sigma-Aldrich, C₂H₅OH
- kyselina dusičná koncentrovaná – LachNer, HNO₃
- kyselina fosforečná – PENTA, H₃PO₄

3.4 použité prístroje

- Analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- Bežné laboratórne sklo
- Centrifúga Eppendorf 5417 R
- Inkubátor Memmert
- Kombinovaná chladnička BOSCH
- Laboratórny vibrační mlyn VM 4, Okresní podnik služieb Přerov
- Minitrepačka, lab dancer Vario
- Mixér Rohson MultiDuo R-536
- Muflová pec VEB ELEKTRO BAD FRANKENHAUSEN
- Rúra Mora 524
- pH meter inoLab® pH 720
- Spektrofotometer Helios ε
- Termostatovaná trepačka Heidolph® Promax 1020
- Topné hniezdo LTHS 500
- Ultrazvuková čistička Ultrasound

- Denzitometer Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- Váhy OHAUS
- Mikrovlnná rúra Daewoo KOR-6L15, výkon 700 W
- HPLC
 - Detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
 - Diferenciálny refraktometer RIDK 101
 - Pumpa ECOM s.r.o.
 - Sampler HTA HT300a
 - Termostat kolónový LCO 101 ECOM s.r.o.

3.5 Použitá kultúra

Pre fermentáciu bola využitá kultúra *Saccharomyces cerevisiae* pochádzajúca zo zbierky mikroorganizmov Slovenskej technickej univerzity v Bratislave, ústavu biotechnológie a potravinárstva.

3.6 Použitá substrát

Bežne dostupná, odpadová vlnitá lepenka.

3.7 Príprava médií pre inokuláciu a kultiváciu *Saccharomyces cerevisiae*

Inokulačné a kultivačné médiá boli pripravené podľa návodu dodaného zo Slovenskej technickej univerzity v Bratislave. Roztoky boli namiešané vždy podľa tabuľky 3.3, pričom inokulačné médium obsahovalo navyše 100 g/l glukózy. Pre tvorbu pevného média určeného na výsev bol do roztoku okrem glukózy pridaný aj agar v množstve 20 g/l.

pH všetkých médií bolo upravené zriedenou kyselinou sírovou na hodnotu 5,5 a všetky médiá boli sterilizované pri teplote 120 °C po dobu 10 minút.

Tabuľka 3.3 Zloženie média pre kultiváciu a inokuláciu

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

3.8 Predúprava lepenky

Ako už bolo spomenuté v kapitole 2.3, je nutné lignocelulózový materiál pred samotnou hydrolyzou vhodne predupraviť tak, aby sa zlepšila dostupnosť celulóзовých vlákien pre enzýmy. Konkrétne boli použité nasledovné metódy.

3.8.1 Vibračný mlyn

Lepenka bola predupravená viackrokovým mechanickým pôsobením. V prvom kroku bola lepenka nastrihaná na menšie kúsky, ktoré boli následne namočené do destilovanej vody a následne rozomleté pomocou mixéru. Takto vzniknutá suspenzia bola prefiltrovaná a prepraná destilovanou vodou. Rozomletý materiál bol rozprestretý do tenkej vrstvy a usušený v sušiarňi pri 80 °C. Materiál bol usušený podrobený účinku vibračného mlynu. Čím sa dosiahlo prachovitej konzistencie.

3.8.2 Predúprava pomocou mikrovlnného žiarenia a NaOH/Ca(OH)₂

Lepenka bola po rozstrihaní namočená do destilovanej vody tak aby tvorila 10% (w/V) suspenziu. Tá bola následne rozomletá pomocou mixéru. Do takto vzniknutej jemnej suspenzie papieroviny bol pridaný hydroxid sodný tak aby jeho koncentrácia bola 3 % (w/V), alebo hydroxid vápenatý množstve 0,160 g/100 ml H₂O. Suspenzie spolu s pridanými hydroxidmi boli vystavené mikrovlnnému žiareniu o sile 700 W po dobu 5 minút.

Zreagovaná suspenzia bola prefiltrovaná a premytá vodou až do neutrálnej reakcie. Takto získaný materiál bol buďto hneď suspendovaný v pufre a podrobený procesu SSF, alebo usušený v tenkej vrstve v sušiarňi pri 80 °C a následne podrobený kompozičnej analýze.

3.9 Kompozičná analýza lepenky

Pre možnosť vyhodnotenia najvhodnejšej predúpravy a pre možnosť určenia efektivity a výťažnosti hydrolýzy, bol určený obsah celulózy v predupravenej lepenke. Taktiež bola určená sušina jednotlivých materiálov. Kvantitatívna kompozičná analýza, zameraná na zvyškovú celulózu, bola prevedená aj pri nezreagovaných zvyškoch substrátov po hydrolýze.

3.9.1 Stanovenie celulózy

Do 100 ml Erlemeyerovej banky bolo navážených približne 0,8 g vzorky s presnosťou na 0,0001 g. následne bolo pridaných 30 ml zmesi kyseliny octovej a kyseliny dusičnej (80 % kyselina octová : koncentrovaná kyselina dusičná = 10 : 1). Banka so suspenziou prikrytá filtračným lievikom, pre zníženie odparovania, bola vložená do vodného kúpeľa po dobu 1 hodiny. Po uplynutí tejto doby bola celá suspenzia kvantitatívne prevedená pomocou stričky s etanolom do predom zväženej frity s veľkosťou pórov 15 μm (označenie S4) a pomocou vývevy odfiltrovaná. Filtračný koláč na fritu bol premytý etanolom a následne bola fritu s premytým materiálom umiestnená do sušiarne nastavenej na 105 °C minimálne na 4 hodiny. Po usušení bola fritu umiestnená do exikátoru. Vychladnutá fritu bola zväžená na analytických váhach s presnosťou na 0,0001 g. Následne bola vzorka z frity zmočená etanolom prevedená pomocou špachtle do 100 ml Erlemeyerovej banky a dôkladne vypláchnutá, do tej istej banky, s použitím etanolu, aby došlo ku kvantitatívnemu prevedeniu materiálu. Etanol bol z banky odparený pomocou vodného kúpeľa. Po dôkladnom odparení etanolu bolo do banky pridaných 20 ml 72% kyseliny sírovej a suspenzia sa nechala 1 hodinu hydrolyzovať na temperovanej trepačke pri 30 °C, pri otáčkach 100 ot./min. Hydrolyzát bol potom prevedený kvantitatívne, opäť pomocou etanolu, na fritu s veľkosťou pórov 30 μm (označenie S3) a prefiltrovaný. Fritu so zvyškom vzorky bola umiestnená do sušiarne a usušená za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcom prípade. Obsah celulózy bol následne vypočítaný s použitím nasledovných vzťahov:

$$\%_{\text{hrubá celulóza}} = \frac{(w_{\text{frita S4+vzorka}} - w_{\text{frita S4}})}{w_{\text{vzorka}}} \cdot 100$$
$$\%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}} = 100 - \left(\frac{m_{\text{frita S3.1+vzorka}} - m_{\text{frita S3.1}}}{m_{\text{frita S3.2+vzorka}} - m_{\text{frita S3.2}}} \cdot 100 \right)$$
$$\%_{\text{celulóza}} = \%_{\text{hrubá celulóza}} \cdot \%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}}$$

3.9.2 Stanovenie sušiny

Do napred zväženej, suchej misky boli navážené 2 g lepenky s presnosťou na 0,0001 g. miska bola následne umiestnená do sušiarne a sušená pri teplote 105 °C minimálne 4 hodiny. Po usušení bola miska vychladená v exikátore a zväžená na analytických váhach. Obsah sušiny bol potom určený podľa nasledovného vzťahu:

$$\%_{sušina} = \frac{(m_{miska+vzorka} - m_{miska})}{m_{vzorka}} \cdot 100$$

3.9.3 Sitová analýza veľkosti častíc

Pre lepšiu charakterizáciu substrátu vo forme jemného prachu, bola uskutočnená analýza veľkosti jeho častíc. Analýza prebiehala preosievaním cez sústavu sít s rôznou veľkosťou ôk. Po preosiatí predom zväženého množstva analyzovanej vzorky bol zaznamenaný zvyšok na každom z daných sít a zo získaných dát bol následne zostrojený graf hmotnostnej distribúcie častíc v závislosti na ich veľkosti.

3.10 Stanovenie počtu buniek a rastovej krivky

Aby mohla byť zabezpečená reprodukovateľnosť jednotlivých experimentov, bolo potrebné médium vždy zaočkovať bunkami v rovnakej fáze rastu a v rovnakom počte. Pre tieto účely bola zostavená rastová krivka *S. cerevisiae* a závislosť absorbancie na počte buniek.

3.10.1 Turbidimetrické stanovenie počtu buniek a rastovej krivky

Pre turbidimetrické stanovenie počtu buniek bol použitý denzitometer Cell density meter biowave WPACO 8000. Meranie prebiehalo pri vlnovej dĺžke 600 nm. Vzorky z média boli odoberané v pravidelných hodinových intervaloch po dobu, až sa zmena absorbancie ustálila. Ako blank slúžilo médium pred zaočkovaním kultúrou. Pri meraní boli vzorky s hodnotami absorbancie vyššími ako 0,90 zriedené destilovanou vodou. Získané hodnoty absorbancie boli použité pre zostavenie rastovej krivky a určenie počtu buniek v závislosti na absorbancii.

3.10.2 Stanovenie počtu buniek metódou výsevu na agarové platne

Pomocou metódy výsevu na agarové platne, bol určený počet buniek v inokule. Najskôr boli pripravené platne, podľa návodu v kapitole 3.7 na ktoré bola nanosená vzorka. Vzorky určené pre výsev na platne boli pripravené z 0,5 ml roztoku inokula odobraného v 12. hodine od zaočkovania média. Roztok inokula bol následne zriedený destilovanou vodou desiatkovým riedením až 10⁵ krát. Zriedená vzorka bol dôkladne premiešaný pomocou vortexu a po odobraní 0,5 ml vysiaty na platňu. Po umiestnení do termostatu nastaveného na 30 °C a uplynutí 48 hodín od výsevu, boli spočítané kolónie, ktoré na platniach vyrástli.

3.10.3 Stanovenie závislosti počtu buniek na turbidimetrickej absorbancii

V čase 12 hodín od zaočkovania bolo z inokulačného média, pripraveného podľa návodu v kapitole 3.7, odoberatých opakovane 0,5 ml roztoku. Tento roztok bol pomocou destilovanej vody nariedený 10, 12, 15, 20 a 30 krát. U takto nariedených roztokov boli určené hodnoty ich turbidimetrickej absorbancie.

Po zmeraní absorbancie bola každá vzorka zriedená 10⁵ krát destilovanou vodou a bol určený počet buniek v jednotlivých vzorkách podľa kapitoly 3.10.2. V závislosti počtu buniek na absorbancia bola zostavená zodpovedajúca kalibračná priamka, vďaka ktorej bolo možné ďalej určiť počet buniek na mililiter média [CFU/ml].

3.11 Overenie reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých v práci Ing. Lepaře

Za použitia fermentoru, s podmienkami uvedenými v práci Ing. Lepaře, vid'. kapitola 2.7.2, bola overená účinnosť hydrolýzy odpadnej lepenky.

3.11.1 Enzymatická hydrolýza

Odpadná lepenka, pomletá na jemný prach, bola navážená s presnosťou na 0,01 g a suspendovaná v 1,5 l 0,1 M citráto-fosforečnanového pufru s pH 4,8 tak, aby jej výsledná koncentrácia činila 8 % w/V. suspenzia bola následne preliata do fermentoru a vysterilizovaná v autokláve pri 121 °C po dobu 15 minút, aby sa zabránilo mikrobiálnej kontaminácii. Po schladení na 50 °C boli pridané enzýmové preparáty a to tak aby koncentrácia celulóзовého komplexu bola 6 % w/w na TS a β -glukozidázy 0,6 % w/w na TS. Hydrolýza trvala 96 h počas ktorých boli niekoľkokrát odobrané vzorky na analýzu vznikajúcich sacharidov pomocou HPLC. Vzorky boli odoberané v objeme 2 ml do skúmaviek Eppendorf. Každá bola následne krátko povarená vo vodnom kúpeli, aby sa zdenaturovali enzýmy a nedochádzalo k ďalšej hydrolýze. Vzorky boli pred samotnou analýzou skladované v mrazničke pri teplote - 18 °C.

3.11.2 Simultánna sacharifikácia a fermentácia

Najskôr bol pripravený fermentor so sterilným substrátom, ktorý bol pripravený podľa návodu v predošlej kapitole. Pre SSF bola ako najvhodnejšia určená, podľa kapitoly 2.7.2, teplota 40 °C. Po vychladení fermentoru na túto teplotu boli pridané enzýmové preparáty v množstve 6 % w/w na TS celulóзовý komplex a 0,6 % w/w na TS β -glukozidázy a vzápätí aj inokulačný roztok *S. cerevisiae*, v ktorom bol predom určený počet buniek. SSF prebiehala po dobu 48 h počas ktorých boli odoberané vzorky v objeme 2 ml, ktoré boli pred samotnou analýzou skladované v mrazničke pri - 18 °C.

3.12 Optimalizácia podmienok SSF

Pre dosiahnutie čo najvyšších koncentrácií etanolu v čo najkratšom čase bol optimalizované ďalšie parametre SSF. Konkrétne sa jednalo o čas zaočkovania média od počiatku hydrolýzy, ďalšia optimalizácia pridávaného množstva inokula a optimalizácia množstva a druhu pridávaných živín. Taktiež boli optimalizované podmienky pre prípadné použitie substrátu upraveného pomocou mikrovlňného žiarenia.

3.12.1 Optimalizácia času zaočkovania média

Optimalizácia vychádza z predpokladu, že v čase 0 h od začiatku hydrolýzy neobsahuje médium dostatočné množstvo glukózy a preto môže dochádzať k nechcenému úhynu kvasiniek.

Experiment prebiehal v Erlenmeyerových bankách v objeme 75 ml. Ako reakčné prostredie bol zvolený 0,1 M citráto-fosforečnanový pufo r s pH 4,8. Koncentrácia lepenky bola 8 % w/V a po sterilizácii a vytemperovaní na 40 °C boli dávkané enzýmy 6 % w/w na TS celulóзовý komplex a 0,6 % w/w na TS β -glukozidázy. Do takto pripravených baniek bolo dávkané inokulum vždy v rovnakom množstve, ale v rozdielnych časoch a to 0, 6, 12 a 24 h od počiatku hydrolýzy. Banky boli po celý čas umiestnené v termostate nastavenom na 40 °C. Z baniek boli priebežne odoberané vzorky v ktorých boli pomocou HPLC určené produkty hydrolýzy a fermentácie.

3.12.2 Optimalizácia množstva pridaného inokula

Po vyhodnotení najvhodnejšieho času inokulácie bolo stanovené optimálne množstvo pridávaného množstva inokula. Pre experiment boli zvolené rovnaké podmienky ako v predchádzajúcej kapitole, s tým rozdielom, že tentokrát bol čas inokulácie stále rovnaký, zatiaľ čo variovalo množstvo pridávaného inokula a to konkrétne 10, 15, 20, 25 a 30 % V/V. Opäť boli počas celého experimentu odoberané vzorky, ktoré boli následne analyzované a na množstvo vznikajúcich sacharidov a etanolu.

3.12.3 Optimalizácia množstva a druhu pridávaných živín

Pre efektívnu fermentáciu je potrebné lepenkový hydrolyzát, chudobný na živiny, fortifikovať živinami. V rámci optimalizácie boli pripravené Erlenmeyerove banky so 75 ml 0,1 M citráto-fosforečnanového pufru pH 4,8 so substrátom v množstve 8 % w/V a prídavkom živín jednak podľa tabuľky 3.3 a ďalšie s tým rozdielom, že miesto kvasničného extraktu bola pridaná močovina v množstve 0,5; 1,0; 1,5 a 2,0 g/l. Po sterilizácii a vytemperovaní na 40 °C boli do baniek pridané enzýmy v množstve 6 % w/w na TS celulázový komplex a 0,6 % w/w na TS β -glukozidázy. Samotná močovina bola pridávaná tiež po sterilizácii, inak by došlo k jej tepelnému rozkladu. Močovina bola pridávaná vo forme roztoku a prefiltrovaná cez 45 μ m filter. Následne boli pridané kvasinky a počas experimentu, ktorý prebiehal pri 40 °C a po dobu 48 h boli priebežne odoberané vzorky pre neskoršiu analýzu pomocou HPLC.

3.12.4 Optimalizácia substrátu

Pre túto optimalizáciu boli nastavené podmienky rovnako ako v kapitole 3.11.1. Hydrolýza ale prebiehala v Erlenmeyerových bankách v objeme 75 ml s použitím rôzne predupravených substrátov. Vždy sa jednalo o lepenku, ale s rôznou predúpravou. Konkrétne išlo o predúpravu pomocou mikrovlnného žiarenia skombinovaného s pôsobením hydroxidu sodného, alebo hydroxidu vápenatého, ďalšia banka obsahovala lepenku predupravenú vibračným mlynom. Taktiež bola použitá pre kontrolu banka s lepenkou, ktorá bola podrobená mikrovlnnému žiareniu vo vodnom prostredí.

3.13 HPLC analýza produktov hydrolýzy a SSF

Vzorky, ktoré boli odoberané v množstve 2 ml, boli pred analýzou rozmrazené a scentrifugované pri 10 000 otáčkach po dobu 10 minút. Následne bol supernatan prefiltrovaný cez 45 μ m filter, v prípade nutnosti zriedený deionizovanou vodou a nastreknutý na kolónu.

Na separáciu bola použitá kolóna WATREX 250x8 mm Polymer IEX H⁺ o rozmeroch 250 x4,6 mm a zrení 8 μ m. Separácia prebiehala izokraticky s použitím 1,3 mM kyseliny sírovej ako mobilnej fázy, pri 40 °C a prietoku 0,5 ml/min. na dávkovanie bol použitý autosampler HTA HT300a s dávkovacou slučkou o objeme 20 μ l. Pre detekciu bol použitý refraktometrický dektor RIDK 101. Každá zo vzoriek bola na kolónu nastreknutá trikrát.

Kvantitatívne vyhodnotenie zložiek vzoriek bolo prevedené pomocou použitia kalibrácie štandardov. Štandardy (glukóza, celobióza, xylóza a etanol) boli nariadené deionizovanou vodou a ich analýza prebehla rovnako ako analýza vzoriek pomocou metódy RP-HPLC/RID.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Vyhodnotenie obsahu jednotlivých látok pomocou HPLC

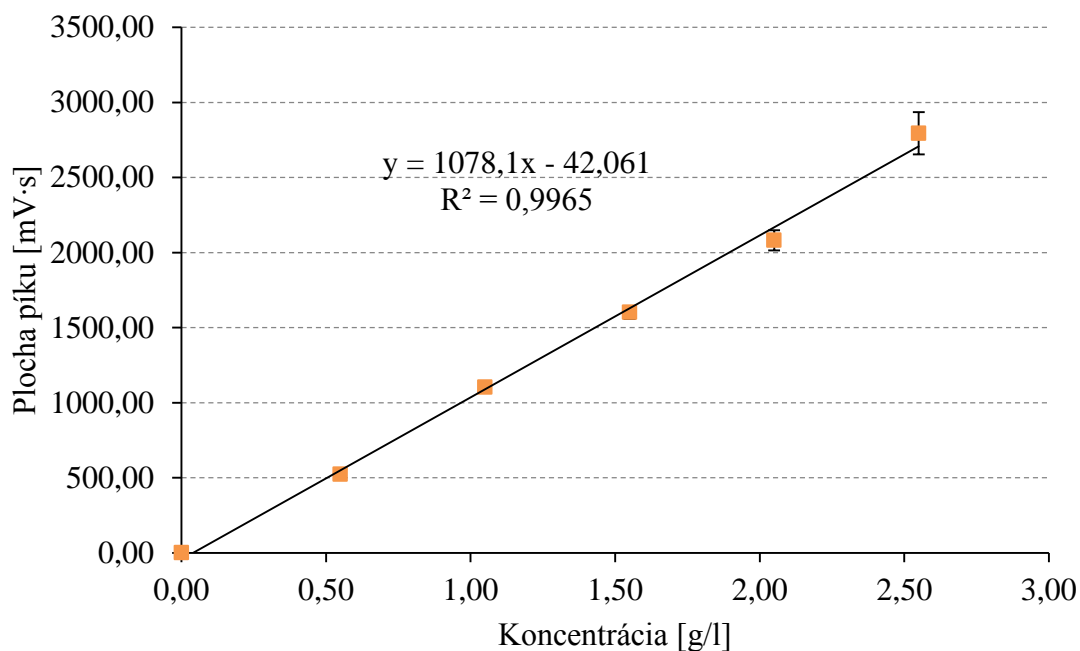
Jednotlivé vzorky získané pomocou rôznych postupov SSF boli vyhodnotené podľa návodu uvedeného v kapitole 3.13. Kvalitatívna analýza bola uskutočnená na základe porovnania retenčného času jednotlivých štandardov s retenčnými časmi zložiek hydrolyzátu.

Tabuľka 4.1 Retenčné časy jednotlivých štandardov

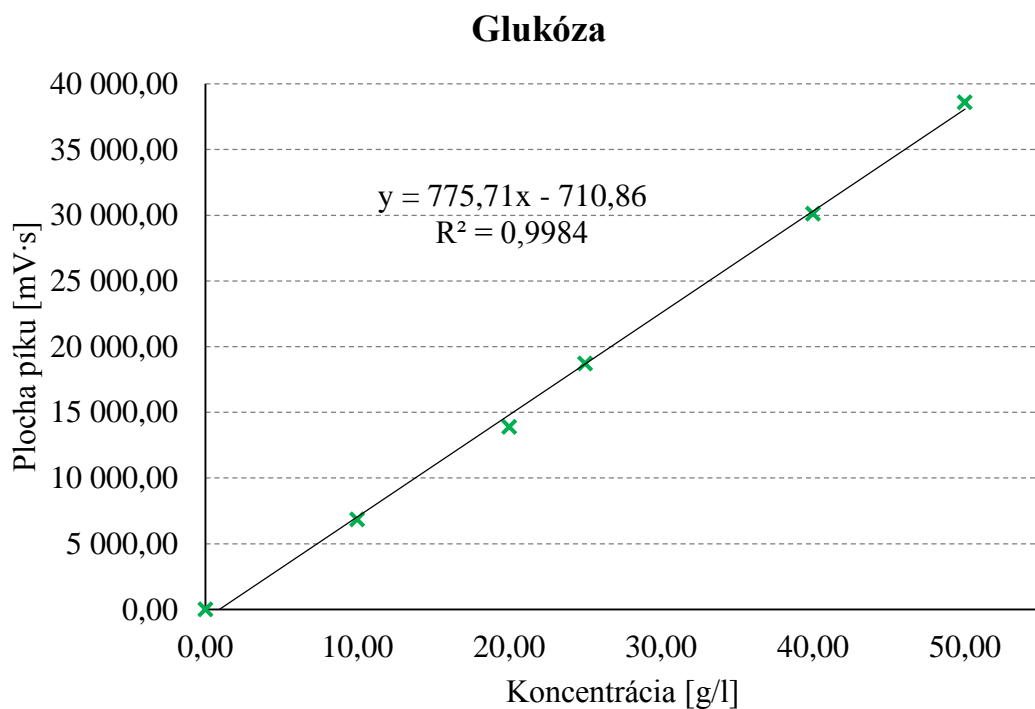
štandard	retenčný čas [min]
celobióza	$9,75 \pm 0,21$
glukóza	$11,50 \pm 0,01$
xylóza	$12,59 \pm 0,26$
etanol	$28,85 \pm 0,20$

Ďalej boli na základe závislosti plochy pík jednotlivých štandardov na ich koncentracii zostavené príslušné kalibračné priamky. Vďaka porovnaniu plochy píku, získaného z analyzovanej vzorky, s príslušnou kalibračnou priamkou, bolo následne možné určiť koncentráciu danej zložky vo vzorke.

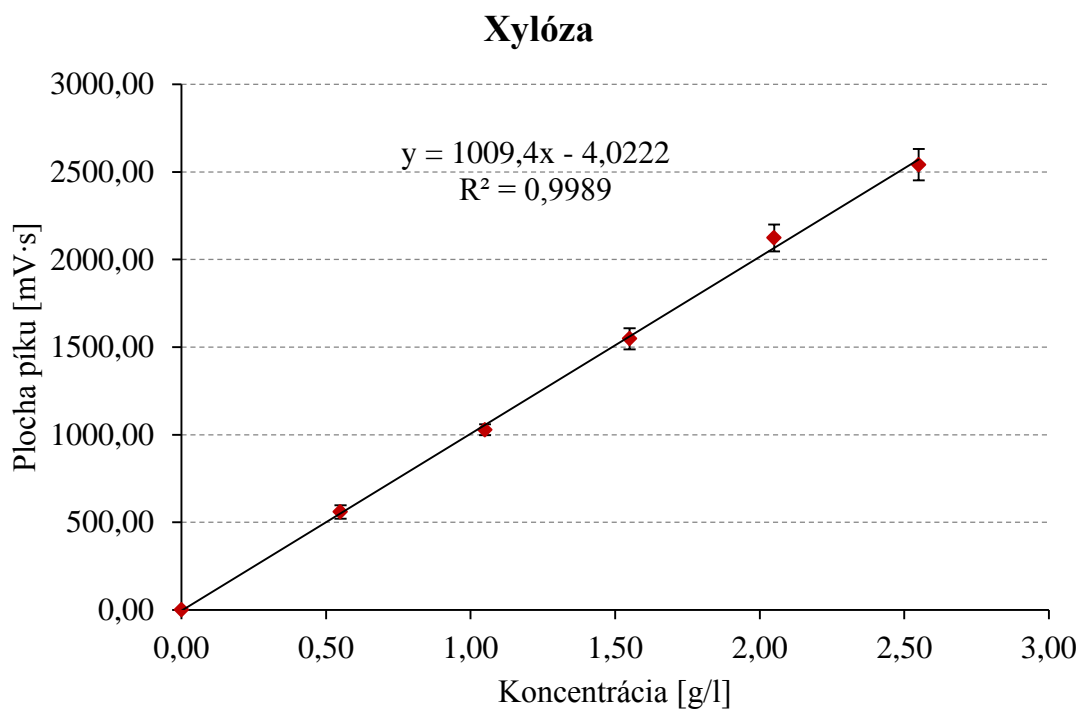
Celobióza



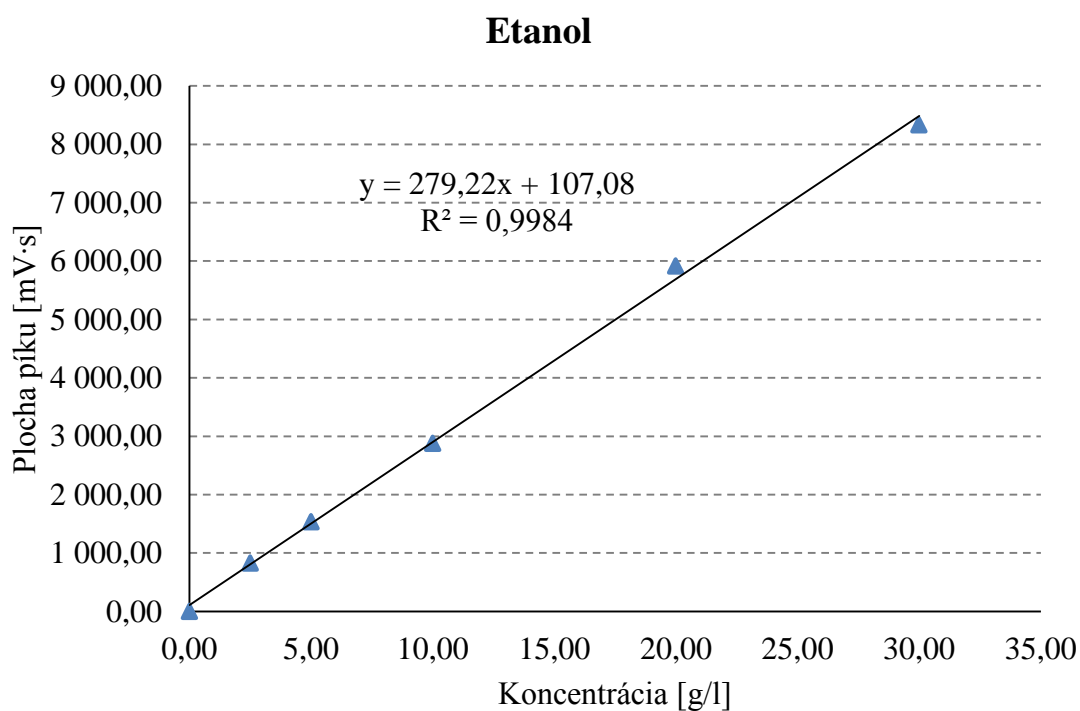
Graf 4.1 Kalibračná priamka celobiózy stanovená pomocou HPLC



Graf 4.2 Kalibračná priamka glukózy stanovená pomocou HPLC



Graf 4.3 Kalibračná priamka xylózy stanovená pomocou HPLC



Graf 4.4 Kalibračná priamka etanolu stanovená pomocou HPLC

Pri grafoch glukózy a etanolu prekrývajú značky jednotlivých bodov chybové úsečky. Rovnaký prípad nastal aj pri niektorých bodoch ostatných kalibračných závislostí.

4.2 Kompozičná analýza lepenky

4.2.1 Stanovenie sušiny v lepenkách rôznej predúpravy

Tabuľka 4.2 Označenie rôznych druhov predúpravy odpadnej lepenky

označenie spôsobu predúpravy	predúprava
1	mlyn + vibračný mlyn
2	mlyn + MW
3	mlyn + MW/NaOH
4	mlyn + MW/Ca(OH) ₂
5	mlyn + vibračný mlyn + MW/NaOH

Tabuľka 4.3 Výsledky stanovenia sušiny lepenky po rôznych druhoch predúpravy

lepenka s predúpravou č.	m_{miska} [g]	m_{vzorky} [g]	m_{m+v} [g]	sušina [%]	sušina _{priemer} [%]	IS
1	15,3807	1,0578	16,3866	95,09	95,25	0,23
	16,2351	1,1136	17,2989	95,53		
	15,8127	1,0365	16,7986	95,12		
2	15,9123	1,0235	16,8863	95,16	95,24	0,07
	16,1250	1,1231	17,1948	95,25		
	15,3459	1,0026	16,3015	95,31		
3	15,6845	1,1256	16,7739	96,78	96,72	0,13
	15,9624	0,9862	16,9147	96,56		
	16,2689	1,0913	17,3254	96,81		
4	15,5623	1,1598	16,6771	96,12	96,18	0,05
	16,1964	0,9965	17,1553	96,23		
	15,3289	1,0896	16,3771	96,20		
5	15,8432	1,0562	16,8535	95,65	95,69	0,04
	15,7962	1,0095	16,7627	95,74		
	16,0276	0,9926	16,9773	95,68		

Na základe návodu uvedeného v kapitole 3.9.2 bol stanovený obsah sušiny v rôzne predupravených lepenkách. Výsledky tohto stanovenia sú zhrnuté v tabuľke 4.3. Obsah sušiny bol vypočítaný podľa nasledovného vzťahu :

$$\%_{sušina} = \frac{(m_{miska+vzorka} - m_{miska})}{m_{vzorka}} \cdot 100$$

- pričom $m_{miska+vzorka}$ je hmotnosť misky so vzorkou danej predúpravy po vysušení

Obsah sušiny sa pri porovnaní rôznych druhov predúprav veľmi navzájom nelíši. Najvyšší podiel sušiny mala lepenka podrobená predúprave číslo 3 a to $96,72 \pm 0,13$ % za ňo nasledovali lepenky predupravené metódami 4 a 5 s podielom sušiny $96,18 \pm 0,05$ a $95,69 \pm 0,04$ % a najnižšie hodnoty boli namerané pri predúpravách 1 a 2 kde sušina činila $95,25 \pm 0,23$ % a $95,24 \pm 0,07$ %. Zmeny obsahu sušiny po rôznych predúpravách sú spôsobené zmenou kryštalickej štruktúry celulózy v materiály.

4.2.2 Stanovenie celulózy

Tabuľka 4.4 Výsledky stanovenia celulózy v lepenke rôznej predúpravy

lepenka s predúpravou č.	m_{vzorka}	$m_{\text{frita S4}}$ [g]	$m_{\text{frita S3}}$ [g]	$m_{\text{S4+v}}$ [g]	$m_{\text{S3+v}}$ [g]	celulóza [%]	celulóza _{priemer} [%]	IS
1	0,8025	34,7015	28,5143	35,2189	28,5418	61,05	61,05	0,09
	0,8295	34,8523	33,2523	35,3865	33,2809	60,95		
	0,8358	34,7263	33,1263	35,2676	33,1565	61,15		
2	0,8303	34,2689	30,2689	34,8202	30,2902	63,84	63,94	0,08
	0,8303	34,5690	32,5690	35,1258	32,5943	64,02		
	0,8328	35,1952	27,1952	35,7512	27,2186	63,95		
3	0,8501	34,2561	31,5894	34,8813	31,6083	71,32	71,34	0,09
	0,8525	33,9562	31,9562	34,5848	31,9757	71,45		
	0,8358	34,2684	31,6017	34,8817	31,6195	71,25		
4	0,8295	32,8346	24,8346	33,3771	24,8601	62,32	62,27	0,21
	0,8311	33,9437	32,3437	34,4854	32,3699	62,03		
	0,8311	34,5963	31,9296	35,1397	31,9538	62,47		
5	0,8425	33,9145	32,3145	34,6458	32,3243	85,64	85,61	0,03
	0,8525	35,1524	33,1524	35,8933	33,1637	85,58		
	0,8281	33,5194	31,5194	34,2373	31,5283	85,61		

V jednotlivých vzorkách lepenky po rôznej predúprave, bol určený obsah celulózy. Výsledky tohto stanovenia sú uvedené v tabuľke 4.4. Obsah celulózy bol pritom vypočítaný podľa nasledovných vzťahov:

$$\%_{\text{hrubá celulóza}} = \frac{(w_{\text{frita S4+vzorka}} - w_{\text{frita S4}})}{w_{\text{vzorka}}} \cdot 100$$

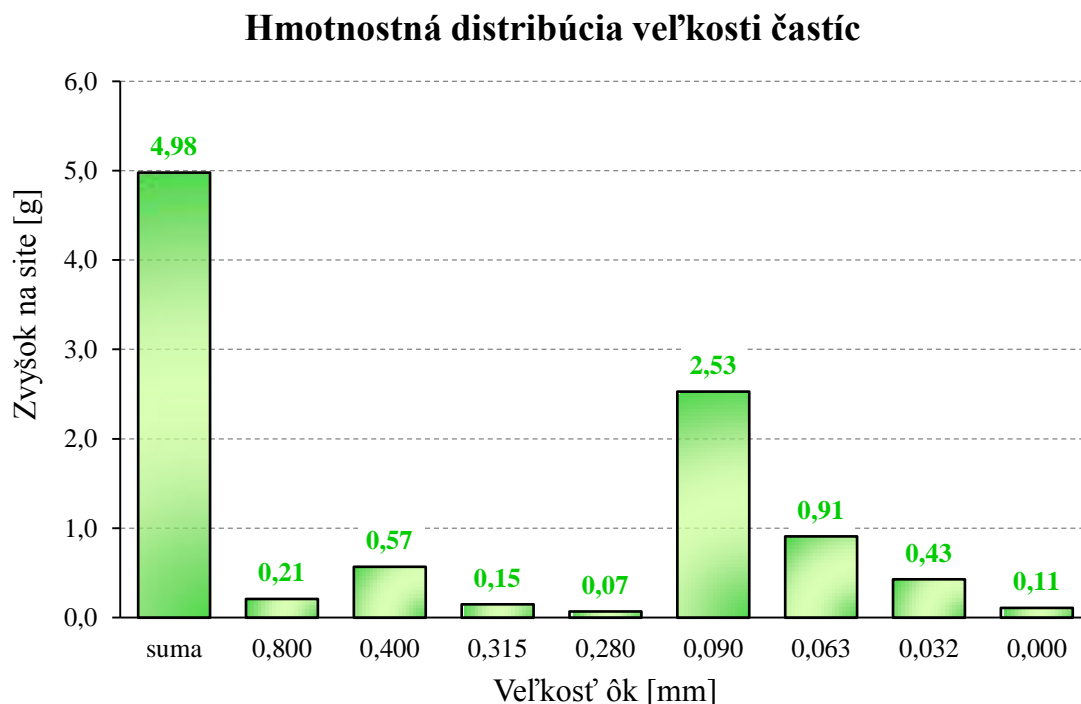
$$\%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}} = 100 - \left(\frac{m_{\text{frita S3.1+vzorka}} - m_{\text{frita S3.1}}}{m_{\text{frita S3.2+vzorka}} - m_{\text{frita S3.2}}} \cdot 100 \right)$$

$$\%_{\text{celulóza}} = \%_{\text{hrubá celulóza}} \cdot \%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}}$$

Najvyšší obsah celulózy vykazovala lepenka rozomletá na jemný prach podrobená kombinovanej predúprave MW/NaOH. Celkový obsah celulózy v takto predupravenej lepenke predstavoval $85,61 \pm 0,03$ %. Pôvodný lepenkový prach pritom obsahoval $61,05 \pm 0,09$ % celulózy. K navýšeniu obsahu celulózy o viac ako 20 % došlo hlavne kvôli rozpusteniu zvyškového lignínu a hemicelulóz v materiály v roztoku NaOH. Celý proces bol urýchlený pôsobením mikrovlnného žiarenia, ktorého energia pôsobí priamo na väzby materiálu, taktiež podporila zmeny v štruktúre lignocelulózového materiálu a tým lepšie uvoľnenie lignínu a hemicelulóz z jeho štruktúry. K nárastu obsahu celulózy došlo teda vo všetkých vzorkách podrobených mikrovlnnému žiareniu. V prípade predúpravy číslo 2 bol konečný obsah celulózy $63,94 \pm 0,08$ %. K tomuto miernemu nárastu došlo pravdepodobne vďaka autohydrolýze materiálu. Vo vodnom prostredí sa totiž pôsobením mikrovlnného žiarenia uvoľňuje z lignocelulózového materiálu acetát, ktorý práve autohydrolýzu podporuje. Nahrubo pomletá lepenka s predúpravou MW/NaOH mala konečný obsah celulózy $71,34 \pm 0,09$ %. Oproti tomu pomletá lepenka upravená pomocou MW/Ca(OH)₂ obsahovala $62,27 \pm 0,21$ % celulózy. Pri tejto predúprave došlo teda len k miernemu nárastu celulózy

v materiály. Predúprava s hydroxidom vápenatým bola testovaná hlavne kvôli predpokladu, že je ho možné po predúprave jednoducho recyklovať a nároky na bezpečnosť práce a rovnako aj ekonomické nároky sú pri jeho použití nižšie ako pri použití NaOH. Z uvedených výsledkov ale vyplýva, že nahradenie hydroxidu sodného hydroxidom vápenatým pri predúprave lepenky nie je vhodné.

4.2.3 Určenie veľkosti častíc lepenkového prachu



Graf 4.5 Hmotnosť zvyškov materiálu na jednotlivých sitách s rozdielnou veľkosťou ôk.

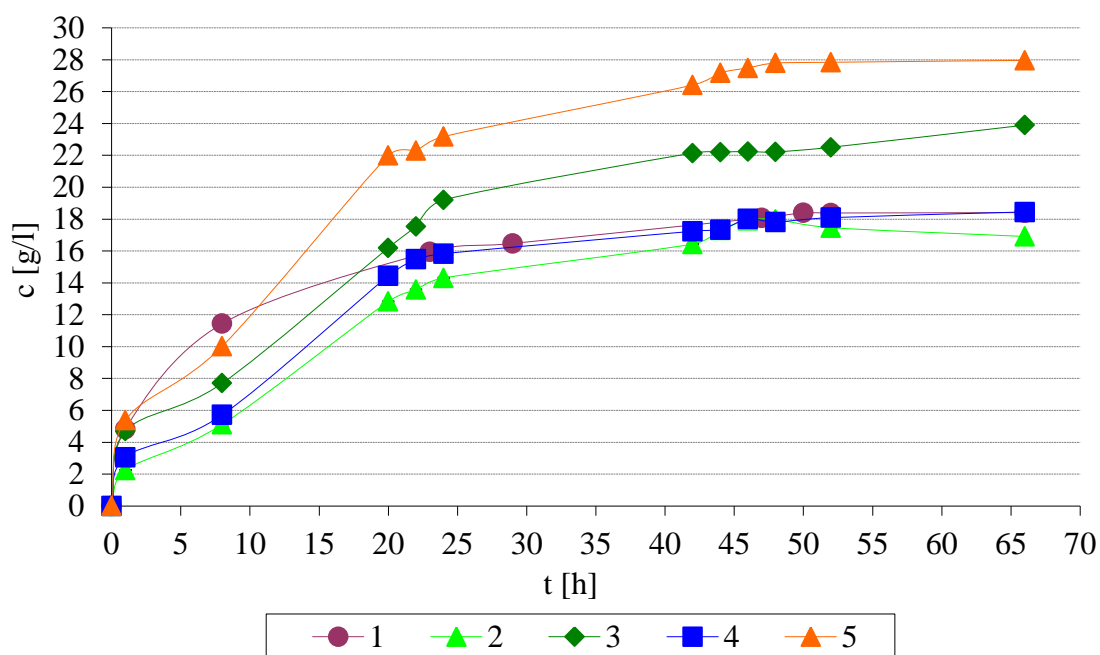
Stanovenie veľkosti častíc bolo uskutočnené pomocou sústavy sít ako bolo popísané v kapitole 3.9.3. Toto stanovenie bolo uskutočnené len pre jemný lepenkový prach získaný mletím na vibračnom mlyne.

5,00 g naváženeho analytu, s presnosťou 0,01 g, bolo umiestnených na sito s najväčším priemerom ôk a to 0,800 mm, pod ktorým sa nachádzali sítá s postupne klesajúcou veľkosťou ôk. Po dôkladnom preosiatí boli s presnosťou na 0,01 g zvážené zvyšky na jednotlivých sitách. Vďaka získaným údajom bol stanovený aj vážený priemer častíc daného materiálu, ktorý bol stanovený na 0,153 mm.

4.3 Optimalizácia použitého substrátu

Optimalizácia prebiehala podľa návodu uvedeného v kapitole 3.12.4. Výsledky experimentu sú znázornené v nasledujúcom grafe.

Hydrolyza predupravenej lepenky



Graf 4.6 Závislosť koncentrácie glukózy na čase pri použití rôznych druhov predupravenej lepenky. 1: mlyn + vibr. Mlyn; 2: mlyn + MW; 3: mlyn + MW/NaOH; 4: mlyn + MW/Ca(OH)₂; 5: mlyn + vibr. mlyn + MW/NaOH

Z grafu vyplýva že najvyššej konečnej koncentrácie glukózy sa dosiahlo pri použití lepenky s predúpravou číslo 5 ako substrátu. Koncentrácia glukózy pri použití takto predupraveného substrátu bola $27,96 \pm 0,12$ g/l. Druhej najvyššej koncentrácie $23,89 \pm 0,05$ g/l bolo dosiahnutých pri hydrolyze lepenky s predúpravou číslo 3. Pri použití predúpravy 4 bolo dosiahnutý veľmi podobný výsledok ako pri použití lepenkového prachu bez chemickej predúpravy, čiže predúprava č. 1, kde konečné koncentrácie glukózy boli $18,45 \pm 0,13$ g/l a $18,41 \pm 0,17$ g/l. Najnižší výtťažok bol potom dosiahnutý pri použití lepenky s predúpravou č. 2 a to $16,97 \pm 0,08$ g/l.

Tabuľka 4.5 Porovnanie experimentálnych výtťažkov glukózy získaných po hydrolyze rôzne predupravených lepeniek

substrát	c_{GLU} [g/l]	V_{puftru} [ml]	m_{GLU} [g]	m_{pap} [g]	m_{cel} [g]	teor. výtťažok GLU [g]	exp. výtťažok [%]	g_{GLU}/g_{papier}
lepenka č. 1	18,41	100	1,84	4,00	2,44	2,71	67,92	0,46
lepenka č. 2	16,97	100	1,70	4,00	2,56	2,84	59,78	0,42
lepenka č. 3	23,89	100	2,39	4,00	2,85	3,17	75,42	0,60
lepenka č. 4	18,45	100	1,85	4,00	2,49	2,76	66,73	0,46
lepenka č. 5	27,96	100	2,80	4,00	3,42	3,80	73,56	0,70

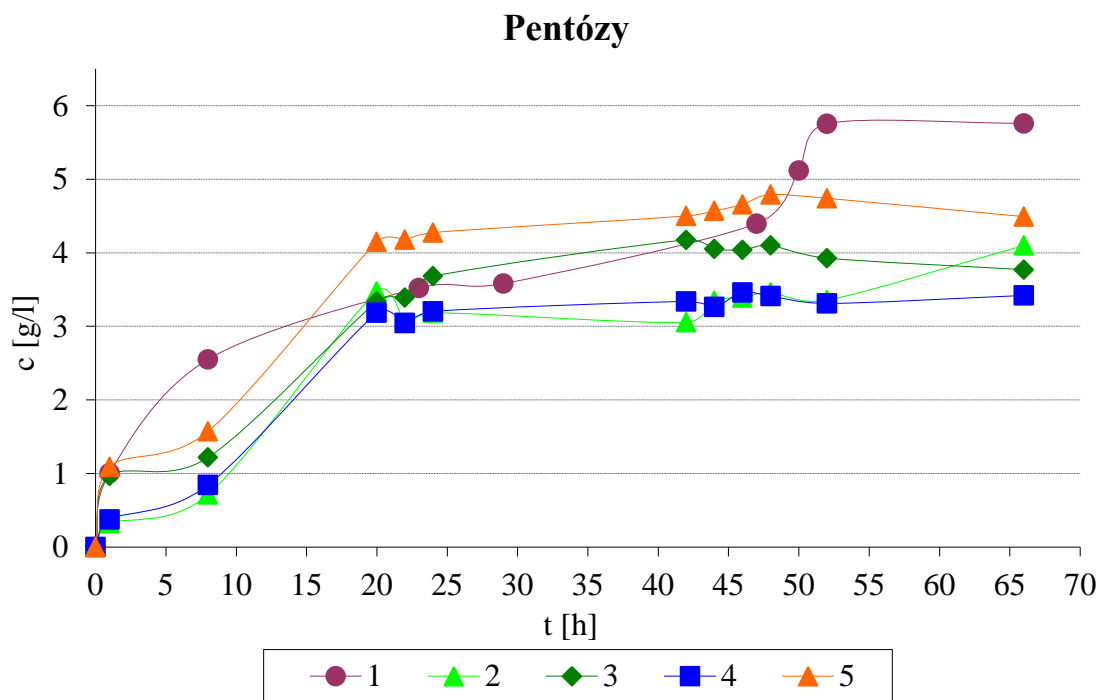
Z tabuľky 4.5 vyplýva, že najvyššieho experimentálneho výtťažku glukózy bolo dosiahnutého pri predúprave MW/NaOH. Experimentálny výtťažok pri tejto predúprave dosahoval 75,42 % z teoretického výtťažku. Teoretický výtťažok vychádza z predpokladu, že hydrolyzou 1 g celulózy získame 1,11 g glukózy. Druhý najvyšší experimentálny výtťažok bol

stanovený u lepenky č. 5 a to 73,56 %. Nasledovala lepenka č. 1 s 67,92 %, ďalej lepenka č. 4 s 66,73 % a nakoniec lepenka č. 2 s najnižším experimentálnym výťažkom glukózy 59,78 %.

Experiment prebiehal do ustálenia koncentrácie glukózy v médiu, t.j. 66 h, v objeme 100 ml. Kvôli charakteru substrátu predupraveného mikrovlnným žiarením musela byť zvolená koncentrácia 4 % w/V.

Pre SSF vo fermentore bola teda vybraná lepenka č. 3, vďaka najvyššiemu experimentálnemu výťažku a lepenka č. 1, z dôvodu možnosti overenia reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých Ing. Lepaňom.

Pri lepenkách predupravených pomocou mikrovlnného žiarenia bol pozorovaný menší prírastok pentóz počas hydrolýzy.



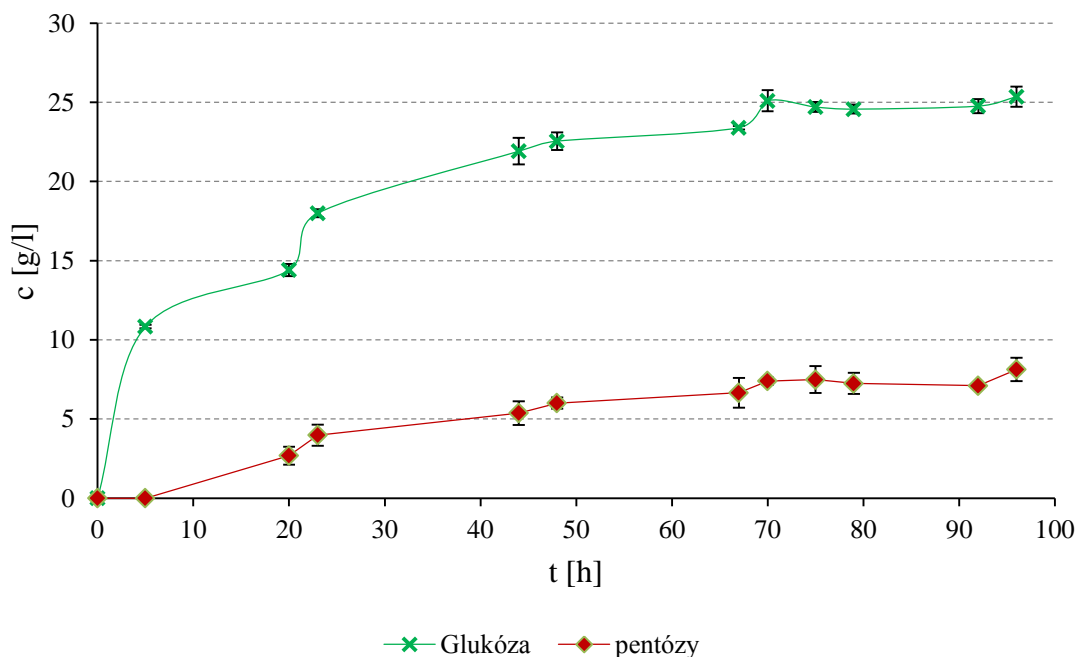
Graf 4.7 Prírastok koncentrácie pentóz v hydrolyzátoch rôzne predupravených druhov lepenky. 1: mlyn + vibr. Mlyn; 2: mlyn + MW; 3: mlyn + MW/NaOH; 4: mlyn + MW/Ca(OH)₂; 5: mlyn + vibr. mlyn + MW/NaOH

Zníženie koncentrácie pentóz súvisí z rozpustením a extrakciou hemicelulóz počas predúprav s použitím mikrovlnného žiarenia. Tento fakt podporuje teóriu a dochádza teda k lepšiemu sprístupneniu celulózy pre celulytické enzýmy, čo má ďalší dopad na zvýšenie účinnosti hydrolýzy substrátu.

4.4 Enzymatická hydrolýza odpadnej lepenky

Hydrolýza prebiehala vo fermentore tak ako bolo popísané v kapitole 3.11.1. Išlo hlavne o overenie reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých v práci Ing. Lepaře a prenesenie celého procesu do väčšieho pracovného objemu, taktiež s lepšou možnosťou kontroly teploty a miešania média. Pre proces boli použité poznatky z už spomínanej diplomovej práce a jeho výsledky sú znázornené pomocou nasledovného grafu.

Hydrolýza



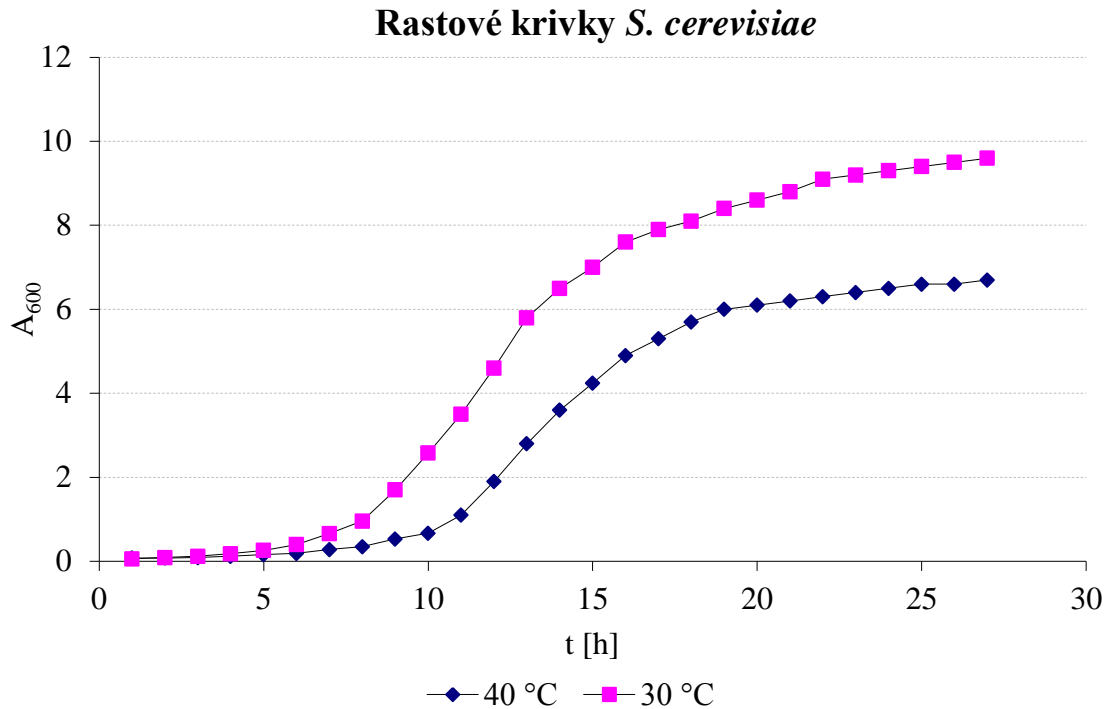
Graf 4.8 Hydrolýza odpadnej lepenky pomletej na jemný prach, pre overenie reprodukovateľnosti výsledkov dosiahnutých v práci Ing. Lepaře

Hydrolýza bola ukončená po 96 hodinách. Po tomto čase obsahoval hydrolyzát $25,36 \pm 0,52$ g/l glukózy a koncentrácia pentóz bola $8,13 \pm 0,64$ g/l. V predchádzajúcej práci bola dosiahnutá maximálna koncentrácia glukózy po 96 h $15,03$ g/l. Možno teda s určitou povedať že použitím fermentoru boli zabezpečené pre hydrolýzu optimálnejšie podmienky, vďaka čomu sa dosiahli značne vyššie výťažky glukózy. Išlo hlavne o lepšiu distribúciu teploty a dosiahnutie dôkladnejšieho premiešania celého objemu média oproti laboratórnej trepačke.

Z grafu je taktiež zrejмый dôležitý fakt a to ten, že k hlavnému nárastu koncentrácie glukózy dochádza v prvých 24 h, následne je nárast koncentrácie pozvoľnejší. Po uplynutí 48 h od začiatku hydrolýzy, keď koncentrácia glukózy dosahuje $22,55 \pm 0,56$ g/l, je už jej inhibičný efekt na enzýmy natoľko silný, že sa ďalšia glukóza už skoro netvorí. V ďalších 48 h je prírastok koncentrácie glukózy iba veľmi malý, necelé 3 g/l. Vychádzajúc z toho poznatku bol určený predpoklad, že najneskorší okamih pre zaočkovanie média kvasinkami, by mal byť práve čas 24 h od počiatku hydrolýzy. Kvasinky potom vďaka fermentácii glukózy uvoľnia väzbové miesta enzýmov pre ďalšiu hydrolýzu substrátu. Takýmto spôsobom môže byť dosiahnuté jeho efektívnejšie zhodnotenie.

4.5 Rastová krivka *S. cerevisiae* na štandardnom médiu

Na základe údajov v tabuľke 3.3 s prídavkom glukózy v množstve 100 g/l, bolo pripravené kultivačné médium pre *Saccharomyces cerevisiae*. Kultivácia prebiehala v termostate pri 30 a 40 °C. Na základe hodnôt absorbancie získaných turbidimetricky pri vlnovej dĺžke 600 nm bol zostrojený graf jej závislosti na čase, čo zodpovedá rastovej krivke.



Graf 4.9 Rastové krivky *S. cerevisiae* pri teplote 30 a 40 °C.

V grafe 4.9 je zreteľná lag fáza trvajúca pri kultivácii pri 30 °C, kultivačná teplota inokula, 5 hodín po ktorej nasleduje exponenciálna fáza trvajúca zhruba do 22 h. Inokulum bolo teda odoberané v čase 12 – 13 hodín od zaočkovania média. V tomto časovom rozpätí sa nachádza stred exponenciálnej fázy a bunky vykazujú tým pádom najvyššiu vitalitu a taktiež je po ich prenesení do produkčného média skrátaná následná lag fáza.

Pri teplote 40 °C je už síce nárast buniek pomalší a nedosahuje takých koncentrácií ako pri 30 °C, taktiež je predĺžená lag fáza na 7 h, ale kultúra je napriek tomu viditeľne vitálna. Rastová krivka pri tejto teplote bola zostrojená z toho dôvodu aby bolo možné určiť, či budú kvasinky životaschopné aj pri takýchto podmienkach kultivácie.

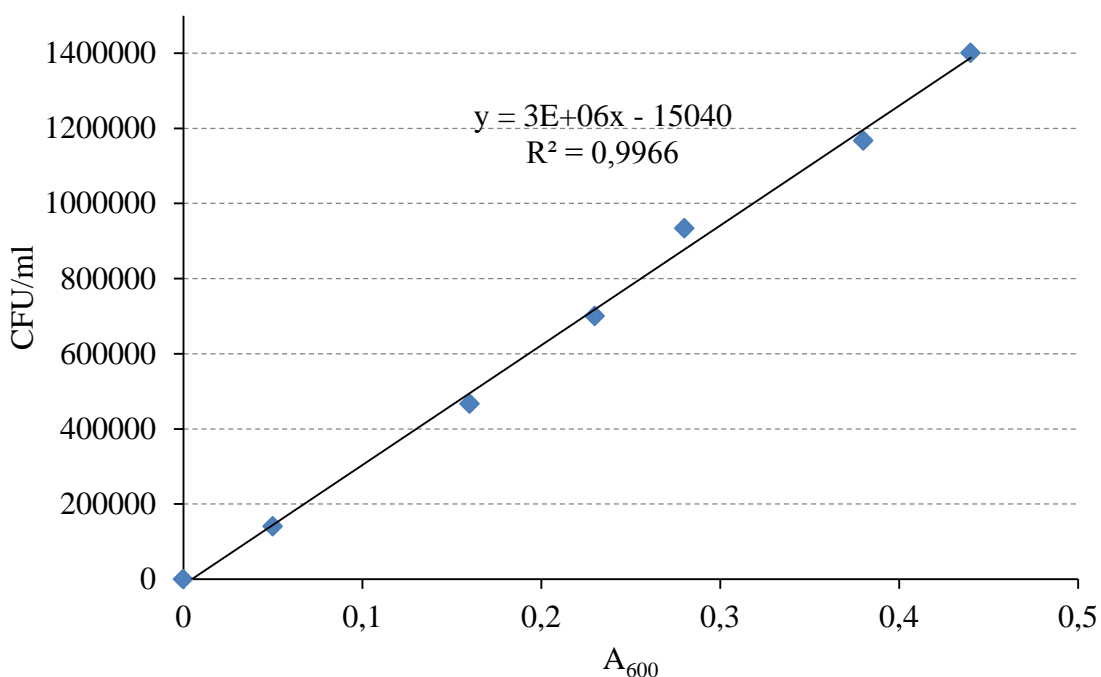
4.6 Stanovenie závislosti počtu buniek na optickej hustote

Počet buniek bol stanovený pomocou agarových platní obsahujúcich živiny podľa tabuľky 3.3 a 100 g/l glukózy. Vzorok odoberaný z média v čase 12 h boli zriedené podľa tabuľky 4.6. Pomocou turbidimetru bola určená ich turbidimetrická absorbancia a po spočítaní kolónií aj zodpovedajúci počet buniek. Na základe týchto dát bol zostrojený graf závislosti počtu buniek na optickej hustote.

Tabuľka 4.6 Závislosť počtu buniek na optickej hustote

riedenie	A ₆₀₀	CFU/ml
10	0,44	1400000,00
12	0,38	1166666,67
15	0,28	933333,33
20	0,23	700000,00
30	0,16	466666,67
100	0,05	140000,00

Počet buniek



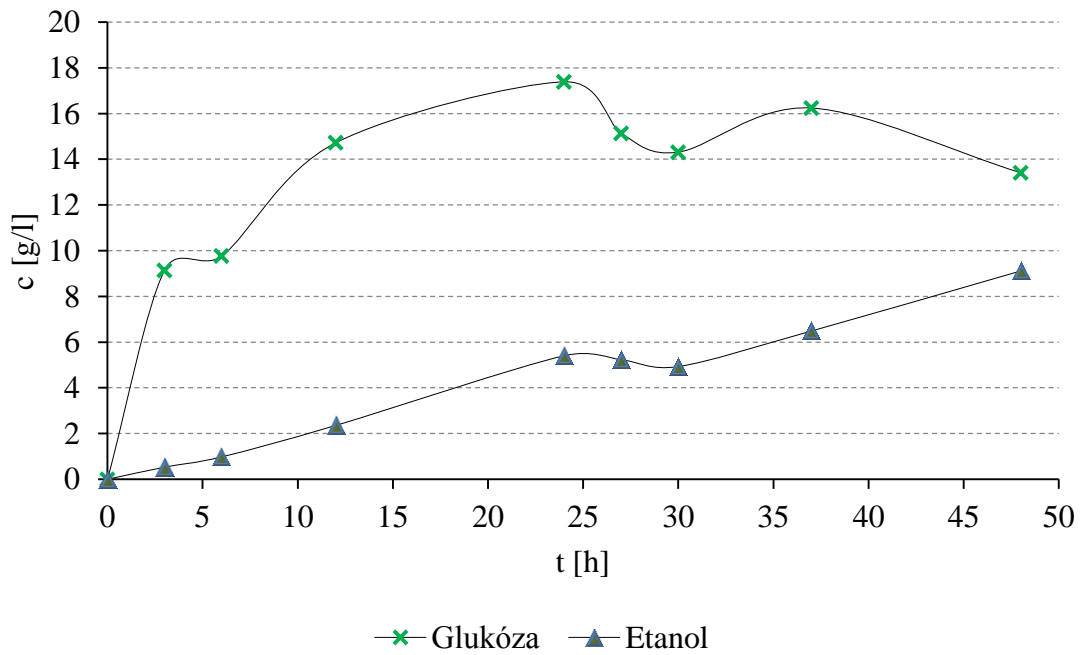
Graf 4.10 Závislosť počtu buniek na optickej hustote média.

4.7 Optimalizácia procesu SSF

4.7.1 Optimalizácia času zaočkovania produkčného média

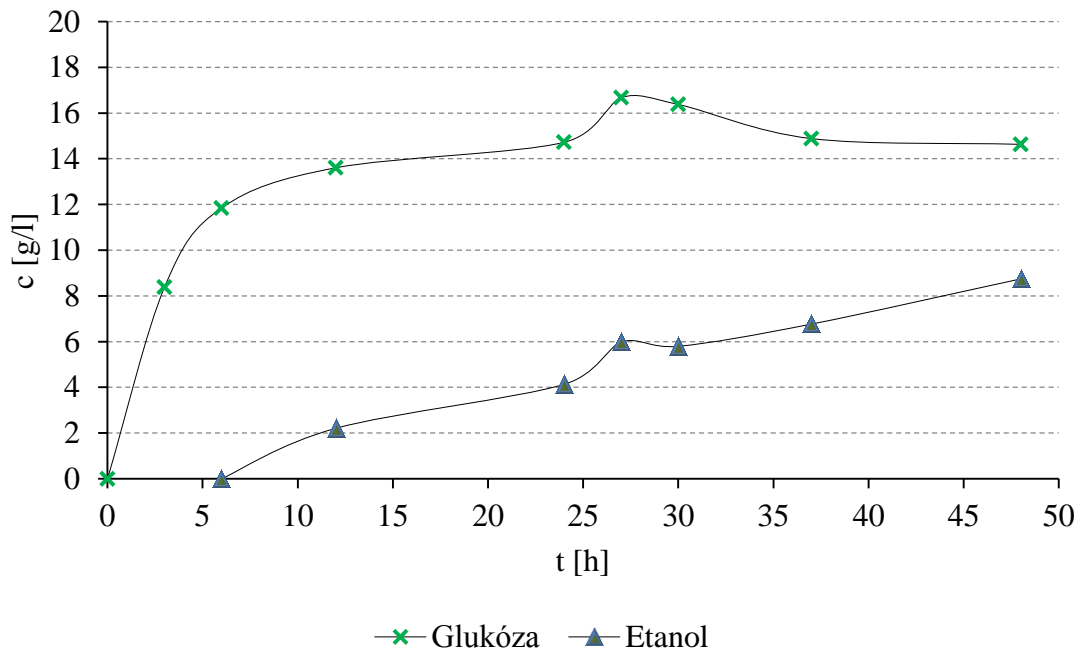
Z dôvodov uvedených v kapitole 3.12.1 bol optimalizovaný čas pridania inokula k produkčnému substrátu. Experimenty prebiehali v bankách o objeme 75 ml a množstvo buniek po pridaní inokula činilo $40 \cdot 10^6$ CFU/ml, tak ako bolo stanovené optimalizáciou v práci Ing. Lepaře. Výsledky sú zhrnuté v nasledovných grafoch.

Inokulácia 0 h

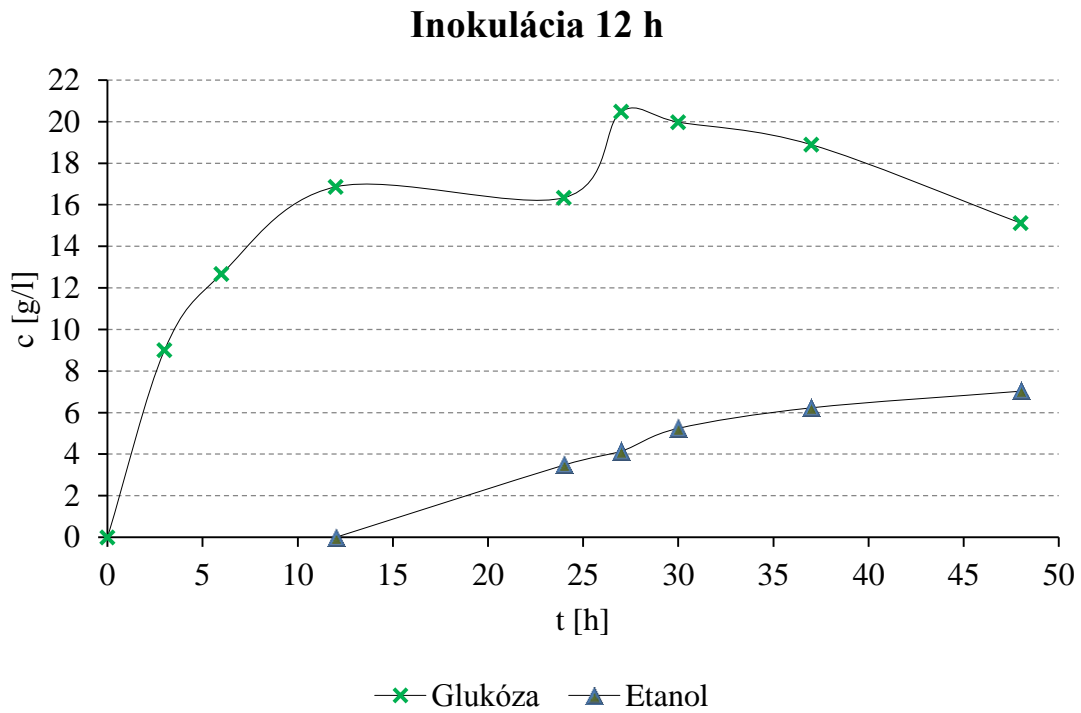


Graf 4.11 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média v čase 0 h od začiatku enzymatickej hydrolýzy.

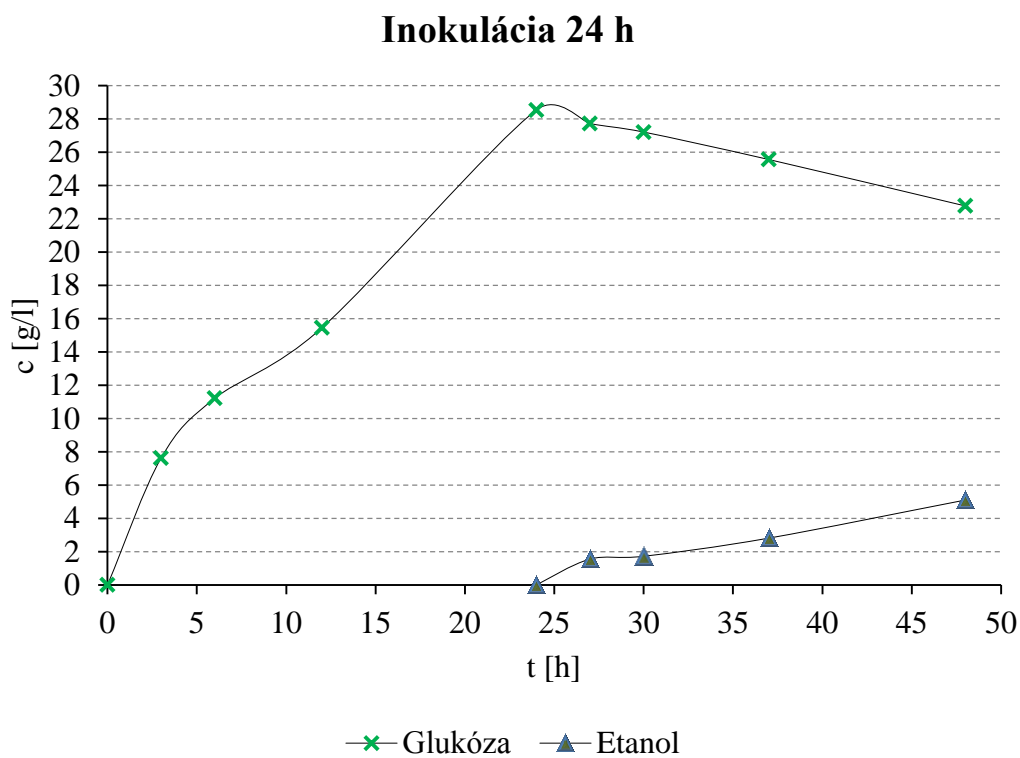
Inokulácia 6 h



Graf 4.12 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média v čase 6 h od začiatku enzymatickej hydrolýzy.



Graf 4.13 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média v čase 12 h od začiatku enzymatickej hydrolýzy.



Graf 4.14 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média v čase 24 h od začiatku enzymatickej hydrolýzy.

Z grafov vyplýva, že najlepšieho výsledku bolo dosiahnuté pri zaočkovaní produkčného média ihneď po pridaní enzýmov. Pri zaočkovaní v čase 0 h od počiatku bola dosiahnutá po 48 h koncentrácia etanolu 9,11 g/l a koncentrácia glukózy bola 13,41 g/l. Pri zaočkovaní v čase 6 h od počiatku hydrolýzy bola dosiahnutá koncentrácia etanolu 8,74 g/l a koncentrácia glukózy 14,63. Očkovanie v čase 12 h malo na konci 48 h koncentráciu etanolu 7,03 g/l a koncentráciu glukózy 15,12 g/l a najmenšieho výťažku etanolu bolo dosiahnuté pri očkovaní v čase 24 h a to 5,10 g/l a koncentrácia zvyškovej glukózy činila 22,77 g/l. Účinnosť premeny celulózy na etanol pri jednotlivých časoch je zhrnutá v tabuľke 4.7.

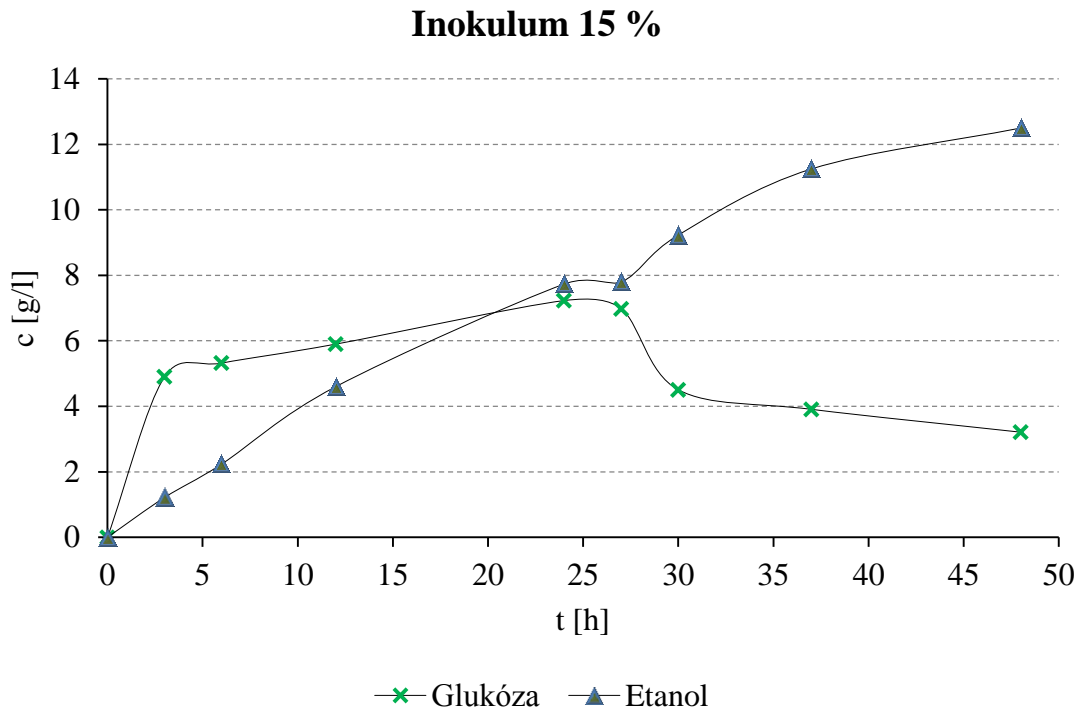
Tabuľka 4.7 Teoretické a experimentálne výťažky etanolu získané po SSF s rôznymi časmi zaočkovania.

čas zaočkovania produkčného média [h]	teoretický výťažok etanolu [g]	experimentálny výťažok etanolu [%]
0	2,08	32,93
6	2,08	31,59
12	2,08	25,90
24	2,08	16,43

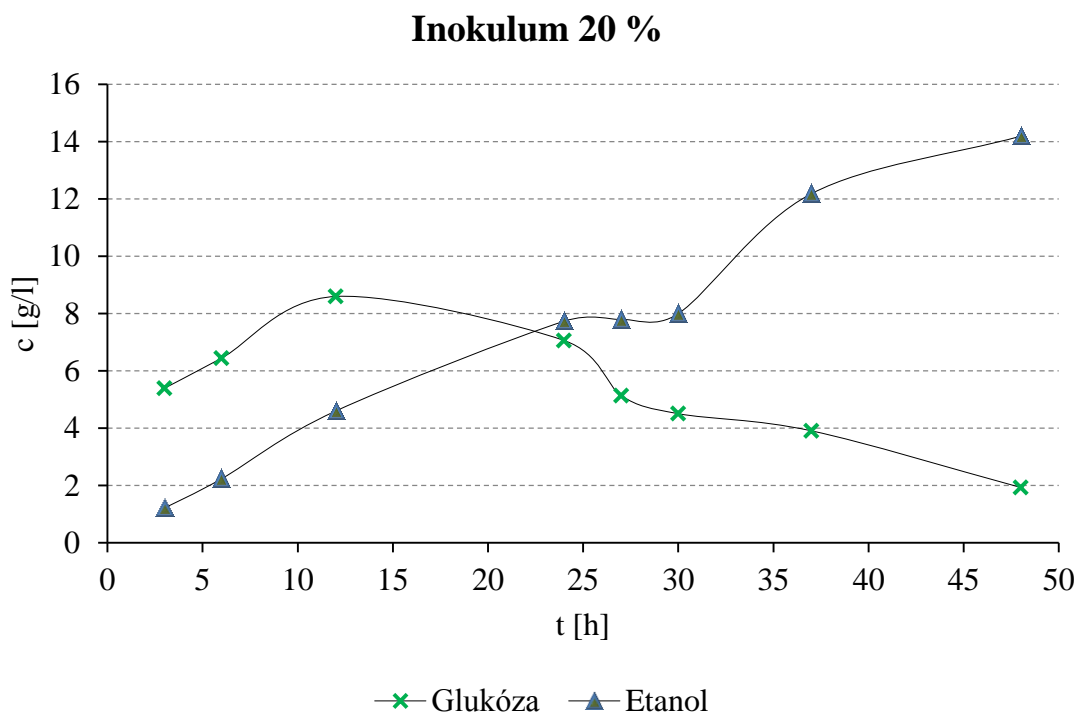
Ako vyplýva aj z tabuľky, nedošlo k predpokladanej limitácii kvasiniek a enzýmy boli schopné hneď od počiatku hydrolýzy produkovať dostatočné množstvo glukózy. V súlade s týmto zistením boli médiá pre SSF zaočkované vždy v čase 0 h. V médiu však ostávalo príliš veľa zvyškovej glukózy, preto boli optimalizované ďalšie parametre SSF a to množstvo inokula a príživie.

4.7.2 Optimalizácia množstva pridaného inokula

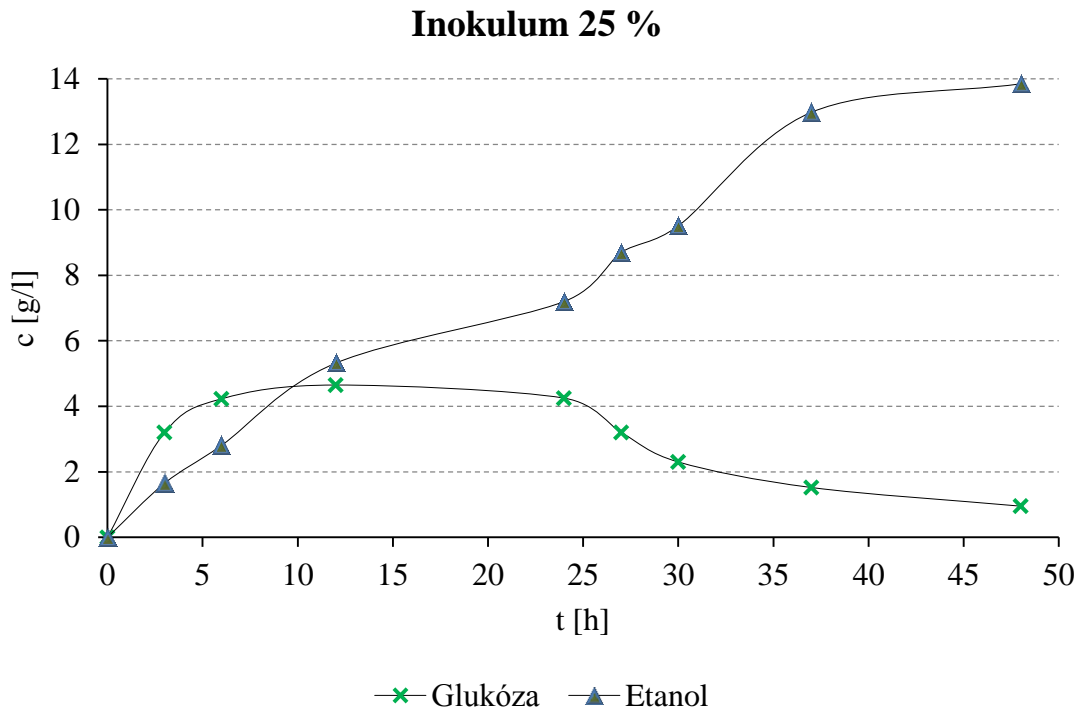
Optimalizácia prebiehala podľa návodu uvedeného v kapitole 3.12.2. Inokulum bolo pridávané tak aby činilo 10, 15, 20, 25 a 30 % V/V z celkového objemu produkčného média. Dosiahnuté výsledky sú znázornené v nasledovných grafoch.



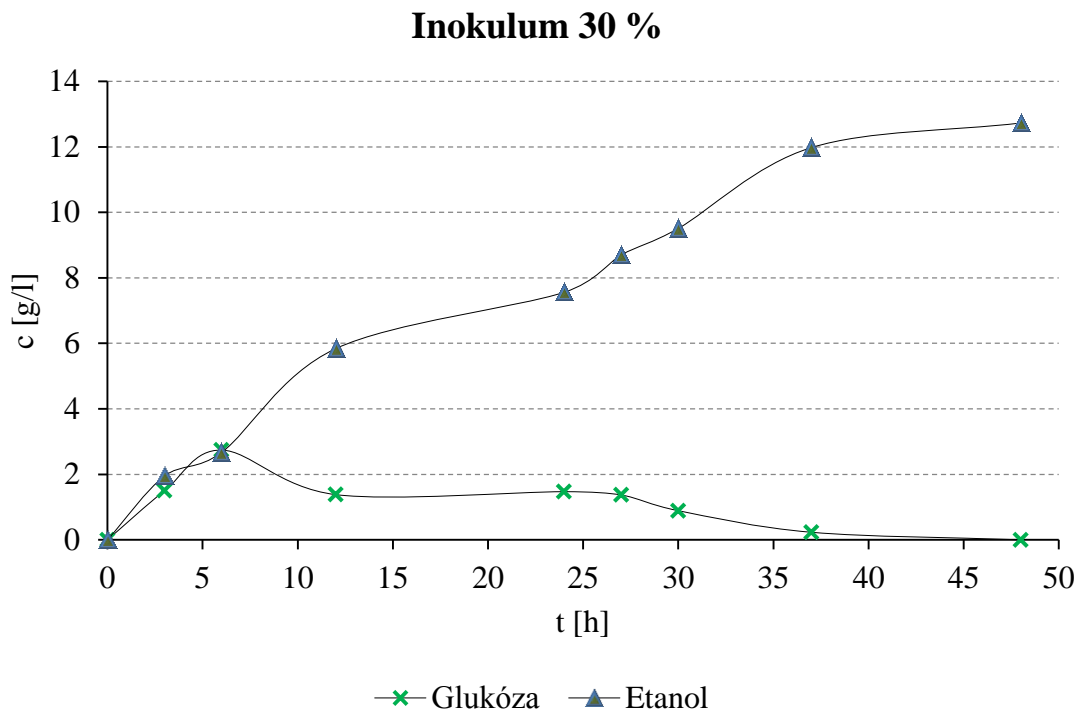
Graf 4.15 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média inokulum v množstve 15 % V/V vzhľadom k celkovému objemu média.



Graf 4.16 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média inokulum v množstve 20 % V/V vzhľadom k celkovému objemu média.



Graf 4.17 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média inokulom v množstve 25 % V/V vzhľadom k celkovému objemu média.



Graf 4.18 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média inokulom v množstve 30 % V/V vzhľadom k celkovému objemu média.

Medzi grafmi nie je uvedený graf zaznamenávajúci zmenu koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase, pri zaočkovaní produkčného média inokulom v množstve 10 % V/V vzhľadom k celkovému objemu média, z toho dôvodu, že tento graf je totožný s grafom 4.11, ktorý bol uvedený v prechádzajúcej kapitole. Pre lepšiu prehľadnosť výsledkov sú konečné koncentrácie etanolu spolu s experimentálnymi výt'ážkami uvedené v nasledovnej tabuľke.

Tabuľka 4.8 Koncentrácie etanolu a glukózy po 48 h SSF a experimentálne výt'ážky etanolu.

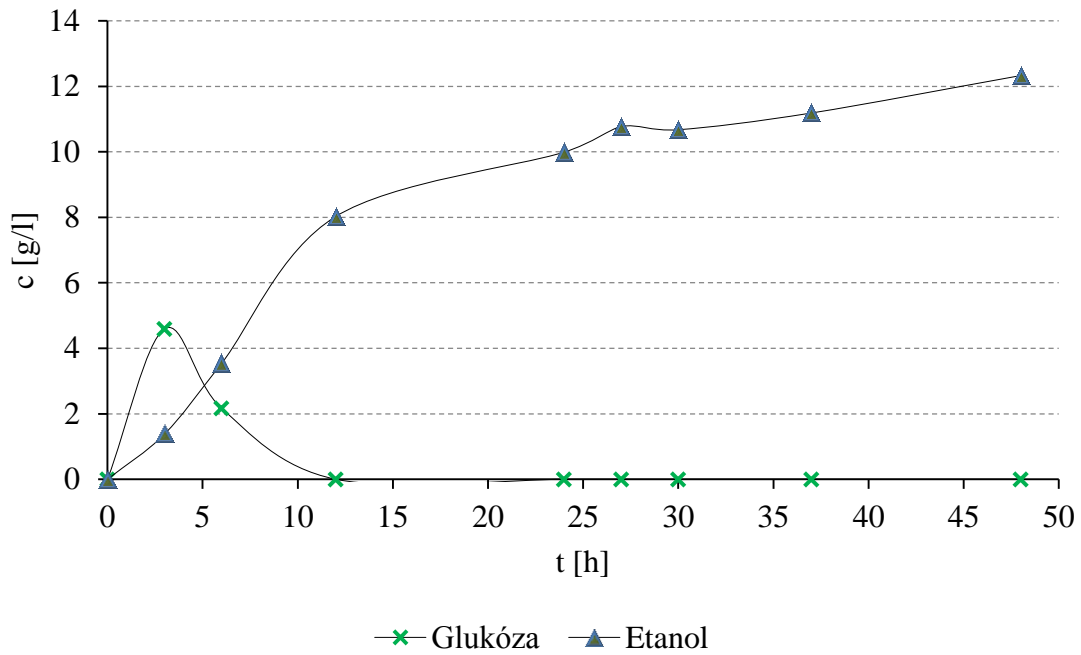
množstvo pridaného inokula [% V/V]	c_{EtOH} [g/l]	c_{GLU} [g/l]	teor. výt'ážok EtOH [g]	exp. výt'ážok EtOH [%]
10	9,11	13,41	2,08	32,91
15	12,50	3,21	2,08	45,16
20	14,19	1,93	2,08	51,26
25	13,85	0,95	2,08	50,04
30	12,73	0,00	2,08	45,99

Na základe výsledkov uvedených v tabuľke 4.8 je zrejmé, že najlepších výsledkov bolo dosiahnutých pri zaočkovaní média 20 % V/V inokula. Konečná koncentrácia etanolu v tomto prípade činila 51,26 %, čo zodpovedá experimentálnemu výt'ážku 51,26 %. Pri nižších dávkach inokula nedochádzalo k efektívnemu využitiu vznikajúcej glukózy a tým pádom zostávala nevyužitá v roztoku hydrolyzáta. Naopak pri vyšších koncentráciách inokula neboli enzýmy, v danom množstve, schopné produkovať dostatok glukózy pre kvasinky, ktoré sa dostávali do limitácie substrátom a tým pádom klesla ich produktivita. Na základe uvedených faktov bolo teda v ďalších experimentoch množstvo pridávaného inokula práve 20 % V/V vzhľadom k objemu média.

4.7.3 Optimalizácia množstva a druhu pridaných živín

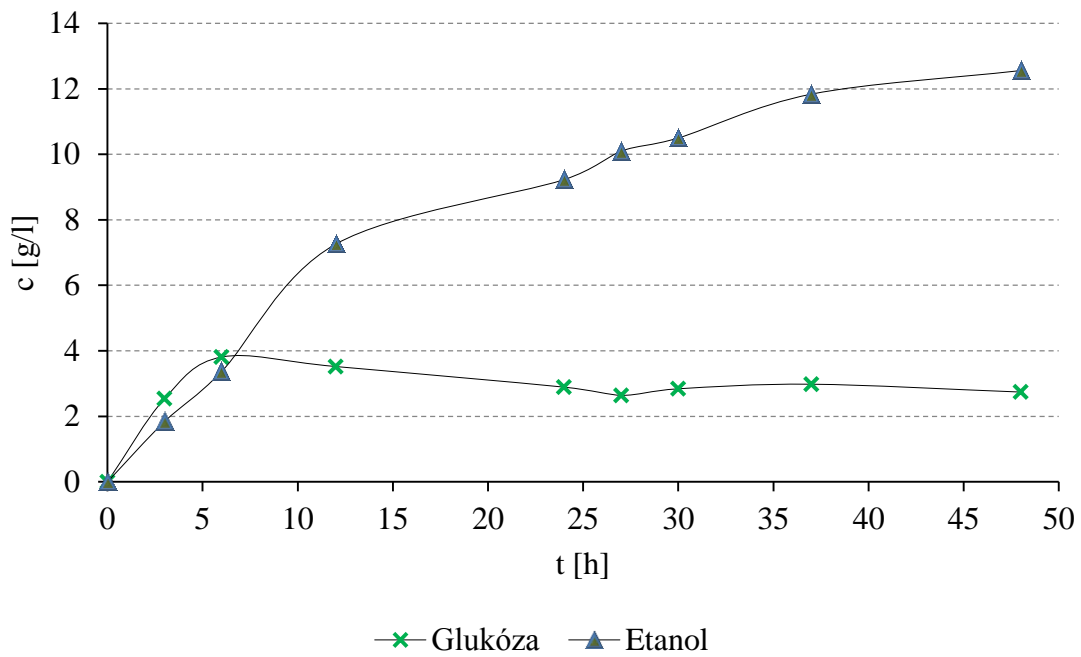
Ako už bolo spomenuté v kapitole 3.12.3, lepenka je substrátom, ktorý je pomerne chudobný na živiny a to hlavne čo sa týka dusíkatých živín a živín obsahujúcich fosfor a síru. Preto sa pristúpilo k pridaniu živín k médiu a to jednak v množstve a zložení ako bolo uvedené v tabuľke 3.3 a následne s nahradením kvasničného extraktu močovinou v rôznej koncentrácii. K tomuto nahradeniu došlo hlavne z ekonomických príčin. Močovina je totiž omnoho lacnejšia ako kvasničný extrakt. Výsledky experimentu prebiehajúceho podľa kapitoly 3.12.3 sú zaznamenané v nasledujúcich grafoch.

Výživa s kvasničným extraktom

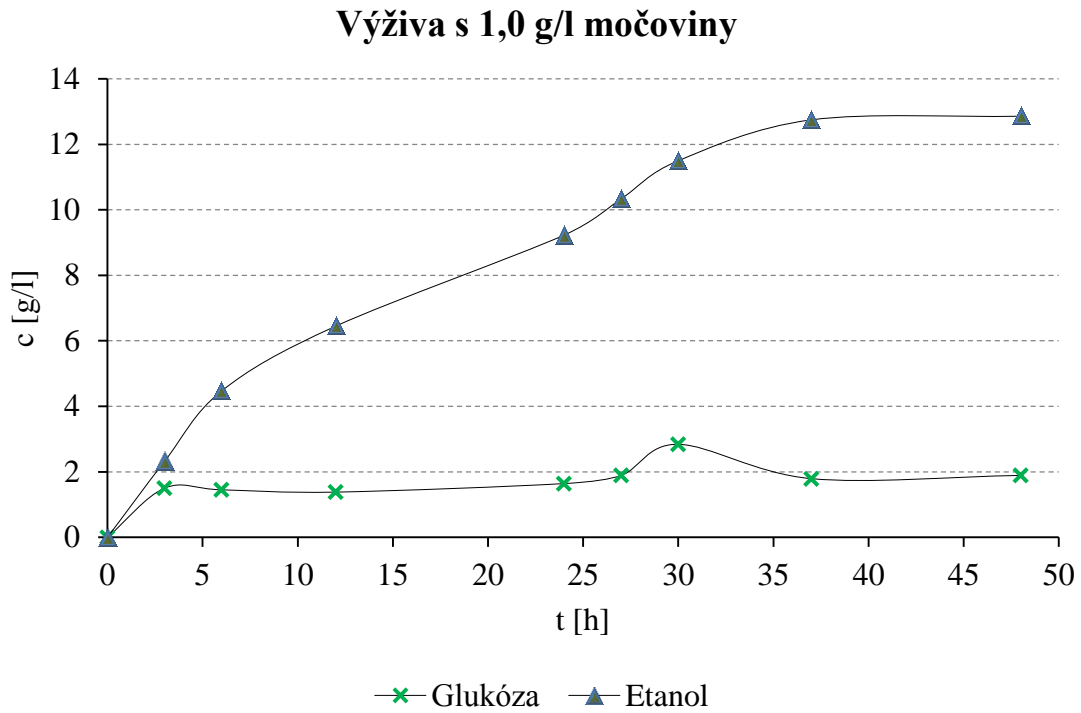


Graf 4.19 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase v produkčnom médiu s prídavkom živín.

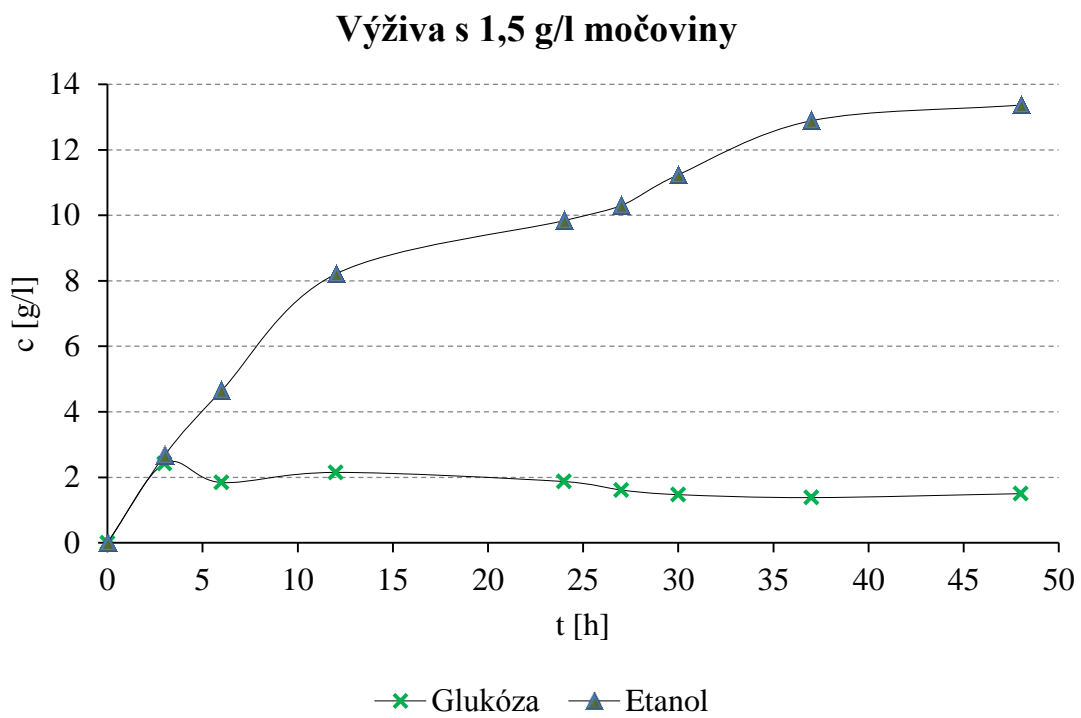
Výživa s 0,5 g/l močoviny



Graf 4.20 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase v produkčnom médiu s prídavkom živín a 0,5 g/l močoviny.

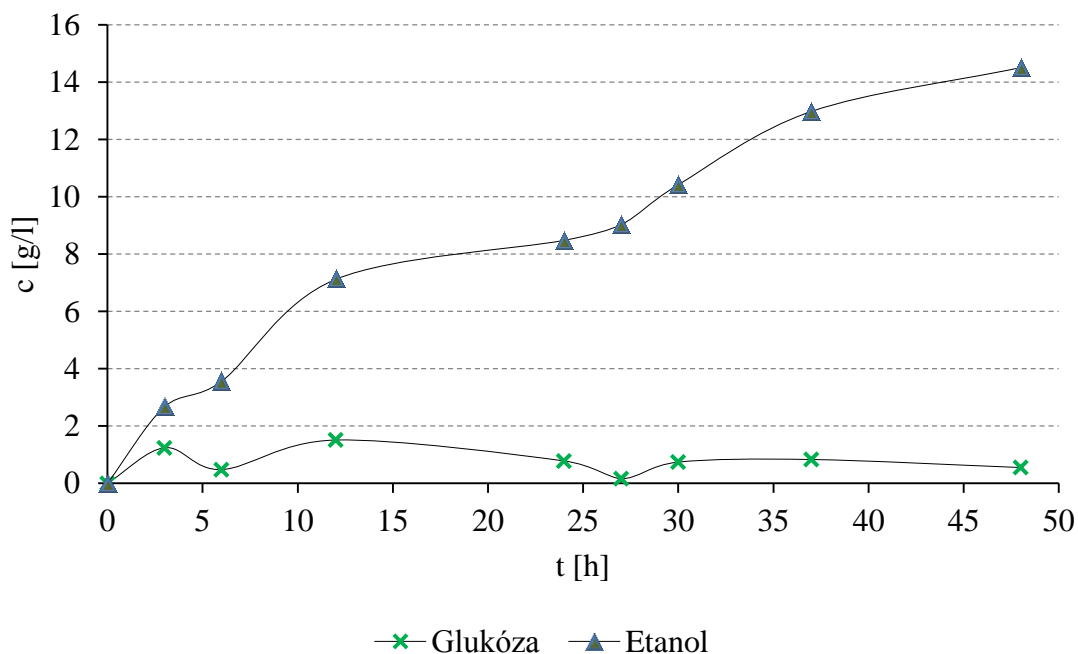


Graf 4.21 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase v produkčnom médiu s prídavkom živín a 1,0 g/l močoviny.



Graf 4.22 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase v produkčnom médiu s prídavkom živín a 1,5 g/l močoviny.

Výživa s 2,0 g/l močoviny



Graf 4.23 Zmena koncentrácie glukózy a etanolu v závislosti na čase v produkčnom médiu s prídavkom živín a 2,0 g/l močoviny.

Ako vidieť v grafoch 4.19 až 4.23 prídanie živín neprispelo k zvýšeniu obsahu etanolu až na výnimku s príživiením s prídavkom 2,0 g/l močoviny, ale ani v tomto prípade sa nejednalo o významný prírastok oproti médiu, ktoré nebolo doživené. Pri doživení totiž očividne dochádza k príliš rýchlemu nárastu biomasy, ktorá spotrebúva viac glukózy ako sú schopné vyprodukovať celulólytické enzýmy. Značnú limitáciu možno vidieť hlavne pri grafe 4.19, kedy nebolo možné od 12 h detegovať v médiu žiadnu glukózu a koncentrácia etanolu rástla len veľmi pomaly. Tabuľka 4.8 ukazuje pre lepšie porovnanie aj porovnanie experimentálnych výťažkov etanolu.

Tabuľka 4.9 Experimentálne výťažky etanolu a konečné koncentrácie glukózy a etanolu v médiu po 48 h SSF s prídavkom rôznych živín.

živiny	c_{EtOH} [g/l]	c_{GLU} [g/l]	teor. výťažok EtOH [g]	exp. výťažok EtOH [%]
podľa tabuľky 3.3	12,33	0,00	2,08	44,55
0,5 g/l močoviny	12,56	2,74	2,08	45,38
1,0 g/l močoviny	12,86	1,89	2,08	46,46
1,5 g/l močoviny	13,37	1,50	2,08	48,30
2,0 g/l močoviny	14,51	0,55	2,08	52,42

Na základe získaných výsledkov, bolo prídanie živín vyhodnotenú ako neekonomické. Inokulum vo vhodnom množstve dokáže totiž samo o sebe vyprodukovať porovnateľné množstvá etanolu za rovnaký čas bez dodatočného vyživenia. Navyše je nutné podotknúť, že experimenty prebiehali s inokulum, ktoré bolo pred prídáním do produkčného média prečistené od zvyškových živín premytím destilovanou vodou. Bolo by teda možné a ekonomicky výhodné pridávať nepremyté inokulum spolu so zvyškovými živinami. Pri

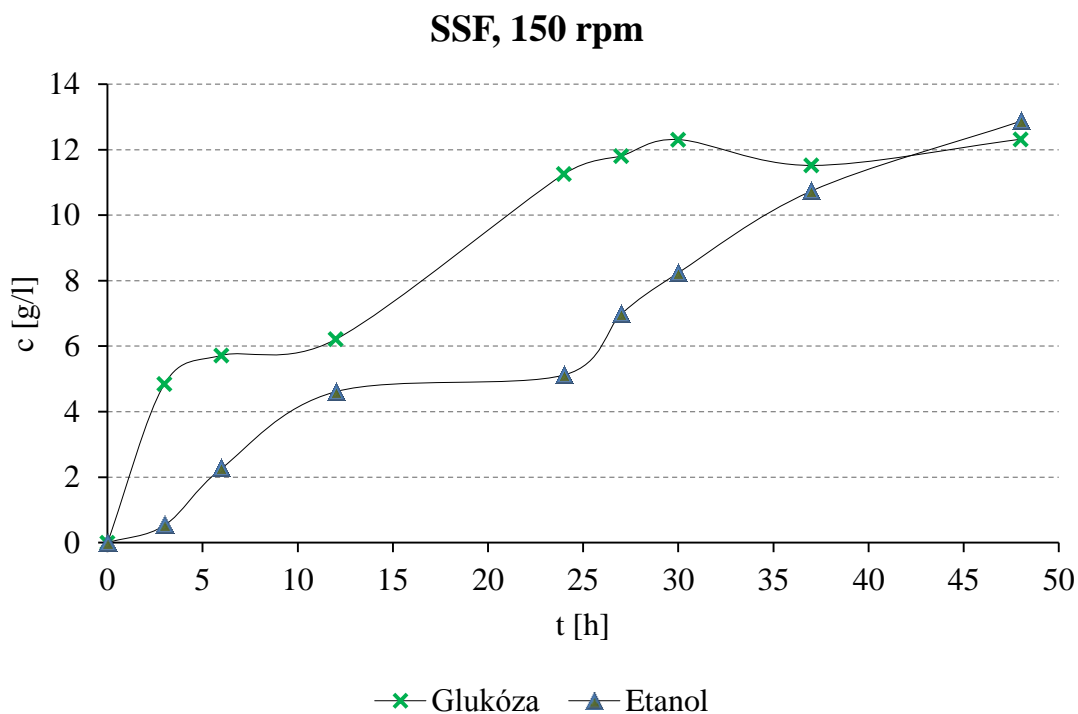
takomto postupe treba ale zväžiť možné problémy spojené s faktom, že by sa do produkčného média spolu s inokulom dostali okrem zvyškových živín aj zvyšky glukózy. Ak by koncentrácia takto pridanej glukózy bola totiž príliš vysoká, nad 10,0 g/l, mohla by spôsobiť nechcenú inhibíciu enzýmov a tým znížiť výťažky z lignocelulóзовého substrátu.

4.8 SSF odpadnej lepenky vo fermentore

Pri procese SSF uskutočnenom vo fermentore boli testované dva substráty a to lepenka predupravená pomocou vibračného mlynu a lepenka upravená pomocou kombinovanej predúpravy MW/NaOH. Experimenty prebiehali vo fermentore o objeme 2,0 l. Ako reakčné prostredie bol zvolený 0,1 M citráto-fosforečnanový pufoer s pH 4,8. Enzýmy boli dávkané vždy tak aby koncentrácia celulóзовého komplexu bola 6 % w/w na TS a β -glukozidázy 0,6 % w/w na TS. Celý proces prebiehal pri teplote 40 °C. Lepenkový prach bol dávkaný v množstve 8 % w/V a lepenka s predúpravou MW/NaOH v množstve 4 % w/V. Nižšia koncentrácia lepenky s touto predúpravou musela byť zvolená kvôli charakteru tohto materiálu. Jej suspenzia bola pri koncentrácii 8 % w/V tak viskózna, že bolo znemožnené jej efektívne premiešanie a tým pádom aj efektívne sprístupnenie celulóзовých vlákien pre enzymatickú hydrolyzu.

4.8.1 Substrát – lepenka predupravená vibračným mlynom

Dávkovanie lepenky a podmienky experimentu boli nastavené tak ako bolo popísané v predchádzajúcej kapitole. Pre efektívnu dispergáciu boli nastavené otáčky miešadla fermentoru na 150 rpm. Výsledky získané po 48 h SSF sú zhrnuté nižšie.

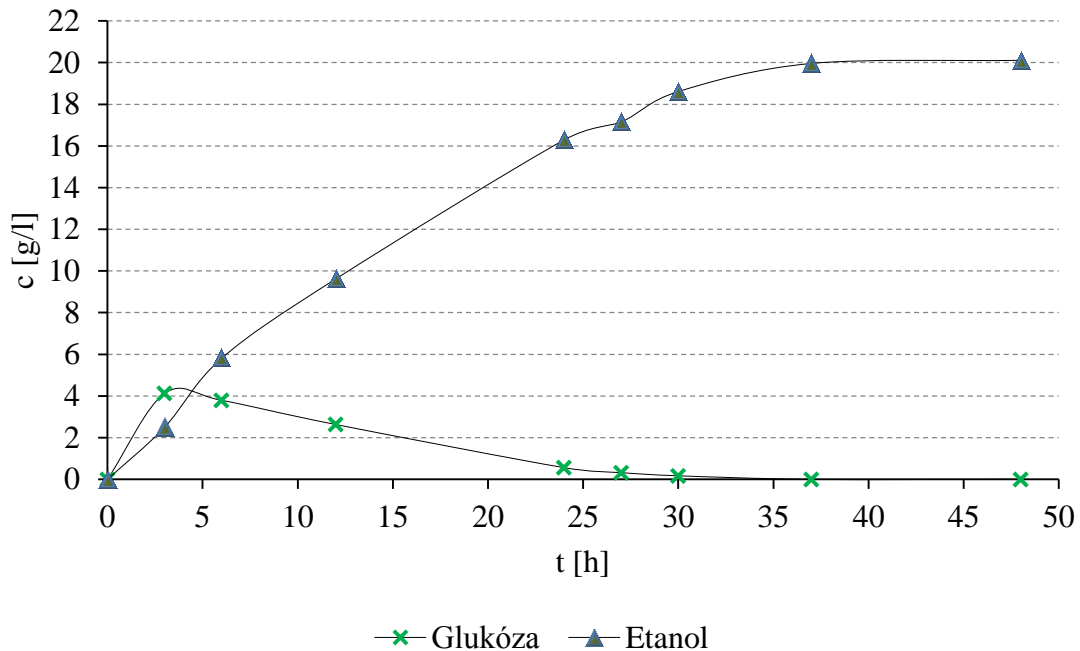


Graf 4.24 Závislosť zmeny koncentrácie etanolu a glukózy v médiu počas 1. pokusnej SSF.

Na základe grafu 4.24 bolo zistené, že otáčky miešadla boli nastavené na príliš vysokú hodnotu. S najväčšou pravdepodobnosťou pôsobili na kvasinky príliš veľké ťažné a strižné

sily čo viedlo k ich poškodeniu. Nebola tým pádom efektívne využitá vznikajúca glukóza a nevznikalo dostatočné množstvo etanolu, ktorého koncentrácia dosiahla iba 12,87 g/l. Z týchto dôvodov bolo zvolené miešanie minimálne a to 50 rpm.

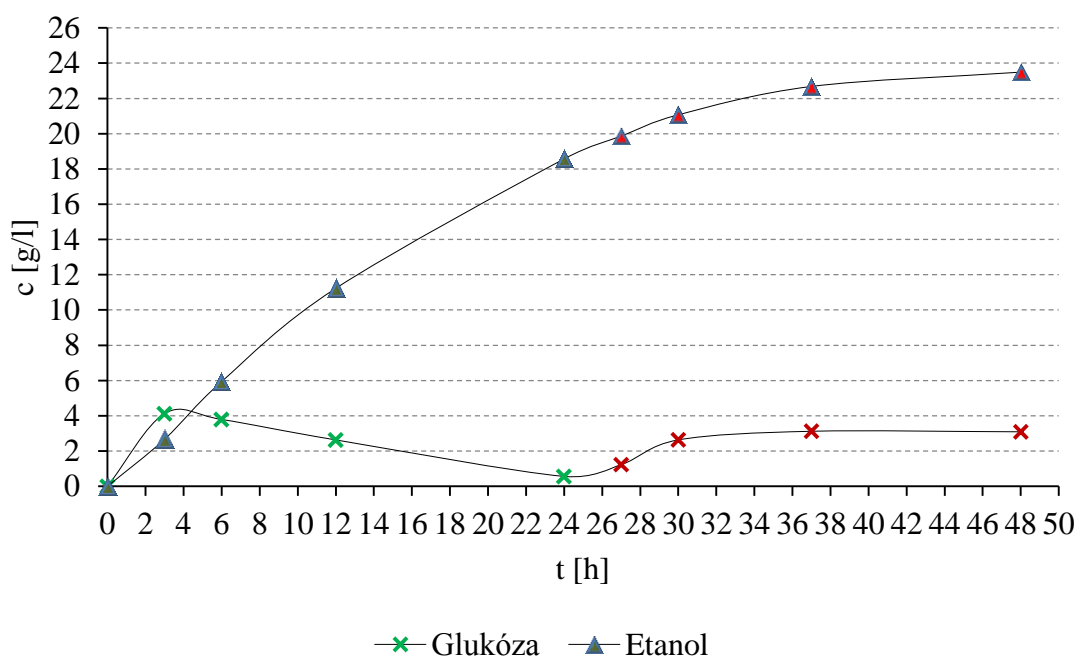
SSF, 50 rpm



Graf 4.25 Závislosť koncentrácie etanolu a glukózy v médiu pri SSF s otáčkami miešadla 50 rpm.

Otáčky 50 rpm sa už ukázali ako vhodné. Avšak spotreba glukózy kvasinkami bola príliš rapidná a došlo k limitácii substrátom, ktorá nastala v 37 h a koncentrácia etanolu kolísala okolo 20,00 g/l a zastavila sa na 20,11 g/l. Z tohto dôvodu bolo navrhnuté krátkodobé zvýšenie teploty média na 50 °C. Po dosiahnutí tejto teploty bola udržiavaná po dobu dvoch hodín. Zvýšenie teploty totiž zabezpečí optimálne podmienky pre enzymatickú hydrolýzu, čím sa získa viac glukózy a zároveň sa dočasne zníži vitalita kvasiniek, takže vznikajúca glukóza sa nevyužije okamžite na ich rast. Teplota bola po dvojhodinovej výdrži znížená späť na 40 °C a boli sledované vznikajúce produkty SSF. Tento predpoklad bol aplikovaný a overený v procese SSF, kedy bola teplota zvýšená podľa vyššie uvedeného v 24. hodine a priebeh tejto SSF je znázornený na grafe 4.25.

SSF, 50 rpm, krátkodobé zvýšenie teploty



Graf 4.26 Overenie predpokladu o krátkodobom zvýšení teploty média a výsledný vplyv na zmenu koncentrácie etanolu a glukózy. Hodnoty získané po tomto teplotnom výkyve majú zmenenú farbu na červenú.

Z grafu 4.26 je jasne zreteľné, že bol predpoklad o zvýšení teploty správny. Koncentrácia glukózy v médiu mierne stúpla a boli získané ďalšie 3,38 g/l etanolu. Konečná koncentrácia etanolu v médiu teda činila 23,49 g/l. Pre lepšie vyhodnotenie získaných výsledkov bola zostavená nižšie uvedená tabuľka.

Tabuľka 4.10 Konečné koncentrácie etanolu a glukózy v produkčnom médiu po prebehnutí SSF a experimentálne výtťažky etanolu.

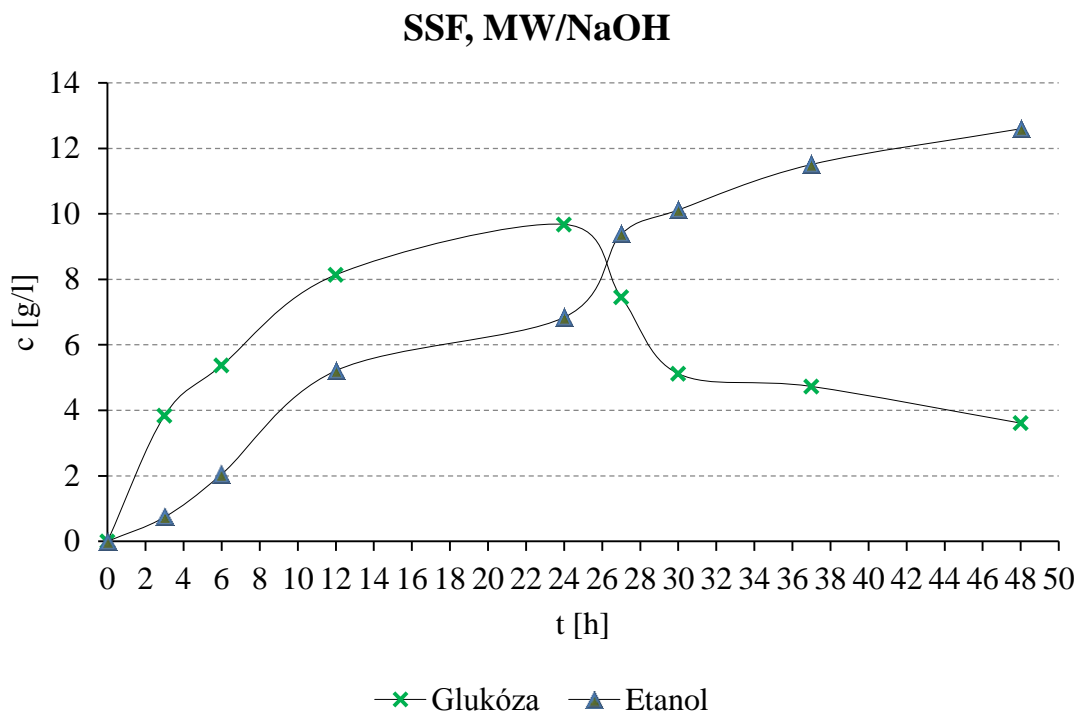
označenie SSF	c_{EtOH} [g/l]	c_{GLU} [g/l]	teor. výtťažok EtOH [g]	exp. výtťažok EtOH [%]
150 rpm	12,87	12,32	55,41	46,46
50 rpm	20,11	0,00	55,41	72,59
krátkodobé zvýšenie teploty	23,49	3,09	55,41	84,79

Najvyššieho experimentálneho výtťažku teda bolo dosiahnuté v procese SSF s krátkodobým zvýšením teploty a to 84,79 %. Napriek tomu nemožno tento proces jednoznačne odporučiť pretože sa pri jeho využití zvyšujú náklady vynaložené na priebeh procesu. Bolo by teda nutné uskutočniť ekonomickú analýzu, ktorá by stanovila či je zvýšenie koncentrácie etanolu dostatočne vysoké aby pokrylo už spomínané vyššie prevádzkové náklady.

4.8.2 Substrát – lepenka predupravená pomocou MW/NaOH

Dávkovanie lepenky a podmienky experimentu boli nastavené tak ako bolo popísané v kapitole 4.8. Otáčky miešadla fermentoru boli po predchádzajúcich skúsenostiach nastavené

na 50 rpm a hydrolýza prebiehala po dobu 48 h. Priebeh SSF, ktorá trvala 48 h, je zaznamenaný na nasledujúcom grafe.



Graf 4.27 Priebeh SSF pri použití lepenky predupravenej pomocou MW/NaOH ako substrátu.

Pri použití lepenky predupravenej pomocou mikrovlnného žiarenia za súčasného účinku NaOH bola dosiahnutá v 48 h procese SSF koncentrácia etanolu 12,60 g/l so zvyškovou koncentráciou glukózy v médiu 3,61 g/l. Experimentálny výťažok za daných podmienok dosahoval 77,85 %, bolo teda získaných 25,20 g etanolu z teoretického množstva 32,37 g, ktoré by vznikli pri 100% premene všetkej celulózy na etanol.

Aj keď je účinnosť tohto procesu, v porovnaní s predchádzajúcou kapitolou, pomerne vysoká, bolo nutné pri tomto druhu substrátu použiť jeho nižšie počiatkové koncentrácie. Táto skutočnosť viedla k tomu že napriek už spomínanému experimentálnemu výťažku, bola koncentrácia etanolu len 12,60 g/l. Takáto nízka koncentrácia by totiž pri ďalších downstream procesoch, hlavne destilácia, znamenala nechcené ekonomické straty.

5 Záver

V nadväznosti na diplomové práce Ing. Brummera a Ing. Lepaře, bola uskutočnená ďalšia optimalizácia využitia odpadnej lepenky ako substrátu pre proces SSF. Taktiež bol celý proces prenesený z malých testovacích objemov (50 – 100 ml), do objemu 2,0 l pri lepšom zabezpečení optimálnych podmienok pomocou riadenej SSF vo fermentore.

Pre enzymatickú hydrolýzu bol využitý testovací balíček Novozymes® Biomass kit poskytnutý firmou Novozymes®. Konkrétne boli z balíčku na proces SSF využité enzýmové preparáty NS50013 (celulolytický komplex) a NS50010 (β -glukozidáza). Fermentácia vznikajúcej glukózy bola zabezpečená kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*.

Pre možnosť vyhodnotenia priebehu procesu bola stanovená základná kompozičná analýza substrátov. Z tohto hľadiska bol najdôležitejší obsah celulózy. Ktorý sa pri lepenkách rôznych predúprav pohyboval v rozmedzí od 61,05 % do 85,61 %. Najvyššieho obsahu celulózy sa dosiahlo rozomletím lepenky na jemný prach a následnou dispergáciou tohto prachu v roztoku 3% NaOH, pričom bola suspenzia vystavená mikrovlnnému žiareniu o sile 700 W po dobu 5 minút (predúprava MW/NaOH).

Po kompozičnej analýze bola stanovená účinnosť hydrolýzy jednotlivých rôzne predupravených druhov lepenky. Experimentálne výťažky glukózy vzhľadom ku vstupnej celulóze kolísali v rozmedzí 59,78 – 75,42 %. Najvyššej účinnosti bolo opäť dosiahnuté pri lepenke s predúpravou MW/NaOH. Experimentálny výťažok pri použití lepenkového prachu, ktorý bol ďalej použitý pre možnosť porovnania s predchádzajúcimi výsledkami, bola 67,92 %.

Pri prenesení procesu hydrolýzy do fermentoru o objeme 2 l bola zistená omnoho lepšia účinnosť hydrolýzy substrátu nakoľko bola po 96 h dosiahnutá koncentrácia glukózy 25,36 g/l. Oproti tomu pri experimentoch Ing. Lepaře v 50 ml Erlenmeyerových bankách bolo dosiahnutých len 15,03 g/l glukózy za rovnaký čas. Zvýšenie koncentrácie o 10, 33 g/l je s najväčšou pravdepodobnosťou spojené s lepšou dispergáciou substrátu pomocou miešadla fermentoru, ale taktiež vďaka lepšej možnosti kontrolovania teploty média, ktorá mohla byť opäť vďaka miešaniu distribuovaná rovnomernejšie.

Pri pokusoch s optimálnym časom zaočkovania média pre SSF bolo zistené, že je najvhodnejšie médium zaočkovať okamžite po naštartovaní enzymatickej hydrolýzy. Pri tomto zaočkovaní sa obsah etanolu v testovacích bankách pohyboval okolo 9,11 g/l po 48 h SSF. Oproti tomu sa každé zaočkovanie v neskoršom čase odrazilo negatívne na konečnej koncentrácii etanolu v médiu.

Nakoľko ostávalo v médiu relatívne veľké množstvo nevyužitej glukózy, boli uskutočnené ďalšie optimalizácie týkajúce sa množstva inokula a druhu a množstva pridávaných živín. Experimenty ukázali že najlepšieho výťažku sa dosahuje pri pridaní inokula v množstve 20 % V/V vzhľadom k médiu, pričom je pridávané inokulum staré 12 – 13 h pre dosiahnutie čo najlepšej vitality buniek. Pri takomto prídavku inokula bola dosiahnutá konečná koncentrácia etanolu po 48 hodinách 14,19 g/l. Prídavanie ďalších živín k produkčnému médiu sa ukázalo ako nevýhodné nakoľko neprispelo k významnému zvýšeniu koncentrácie etanolu. Najvyššej koncentrácie sa dosiahlo pridaním nasledovných živín: močovina 2,0 g/l; KH_2PO_4 1,0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/l, kedy finálna koncentrácia etanolu dosahovala 14,51 g/l.

Nakoniec boli po zhrnutí všetkých optimalizácií testované procesy SSF vo fermentore, pri ktorých bola ako substrát použitá jednak lepenka predupravená pomocou vibračného mlynu, ale rovnako aj lepenka predupravená pomocou MW/NaOH. Pri použití jemného lepenkového

prachu získaného vibračným mlynom bola dosiahnutá koncentrácia etanolu 20,11 g/l, čo zodpovedá experimentálnemu výťažku 72,59 %. Tento výťažok môže byť ešte ďalej mierne zvýšený a to krátkodobým zvýšením teploty na 50 °C. Predíde sa tak limitácii kvasiniek substrátom, ktorá v procese nastáva okolo 37. hodiny od zaočkovania. Touto operáciou sa krátkodobo zvýši aktivita enzýmov a zároveň zníži rýchlosť fermentácie kvasiniek. Takto sa so substrátom môže uvoľniť viac glukózy a kvasinky môžu vyprodukovať vyššie koncentrácie etanolu. Pri tomto postupe bolo získaných 23,49 g/l etanolu, zodpovedajúcich experimentálnemu výťažku 84,79 %.

Lepenka predupravená metódou MW/NaOH poskytla konečnú koncentráciu etanolu 12,60 g etanolu došlo teda k premene 77,85 % dostupnej celulózy na finálny produkt etanol. Nižšia koncentrácia etanolu s vyšším experimentálnym výťažkom, pri druhom z uvedených substrátov, je zapríčinená tým že dávkovanie tohto substrátu bolo len 4 % w/V. Nižšie dávkovanie bol zvolené z dôvodu vysokej viskozity média pri vyšších koncentráciách tuhého podielu. Aj napriek nižšiemu experimentálnemu výťažku je však vhodnejším substrátom lepenka pomletá vibračným mlynom, pretože náklady na získanie etanolu z jeho koncentrovanejších roztokov sú menšie ako pri menej koncentrovaných fermentoch.

Celkovo možno na základe zistených údajov povedať, že by bola vhodná ďalšia optimalizácia procesu vo fermentore alebo väčšom reaktore, hlavne by bolo vhodné zvýšiť množstvo dávkovaného substrátu a tým získať vyššie koncentrácie etanolu. Pri zvýšení koncentrácie substrátu bude však s najväčšou pravdepodobnosťou potrebné znovu optimalizovať hlavne množstvo pridávaného inokula, nakoľko bude v médiu dostupná vyššia koncentrácia glukózy. Taktiež by bolo vhodné pre metódu SSF otestovať aj iné mikroorganizmy, hlavne také, ktoré dokážu zužitkovať aj pentózy vznikajúce pri hydrolýze. Z ekonomického hľadiska by potom stálo za zmienku použitie imobilizovaných MO a prípadne aj enzýmov, čím by sa umožnila ich jednoduchá recyklácia a znížili prevádzkové náklady.

6 Použitá literatura

- [1] WYMAN, Charles. Handbook on bioethanol: production and utilization. Washington, DC: Taylor, c1996, xvii, 424 p. ISBN 15-603-2553-4.
- [2] CLAASSEN, P. A. M., J. B. VAN LIER, A. M. LOPEZ CONTRERAS, E. W. J. VAN NIEL, L. SIJTSMA, A. J. M. STAMS, S. S. DE VRIES a R. A. WEUSTHUIS. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, roč. 52, č. 6, s. 741-755. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s002530051586. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s002530051586>
- [3] WHEALS, A. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in Biotechnology*. 1999, roč. 17, č. 12, s. 482-487. ISSN 01677799. DOI: 10.1016/S0167-7799(99)01384-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779999013840>
- [4] YANEZ, R, J.L ALONSO a J.C PARAJO. Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated cardboard. *Process Biochemistry*. 2004, roč. 39, č. 11, s. 1543-1551. ISSN 13595113. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00283-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002838>
- [5] CARPITA, Nicholas C. a David M. GIBEAUT. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*. 1993, roč. 3, č. 1, s. 1-30. ISSN 0960-7412. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- [6] VARROT, Annabelle, Torben P. FRANDBSEN, Ingemar VON OSSOWSKI, Viviane BOYER, Sylvain COTTAZ, Hugues DRIGUEZ, Martin SCHÜLEIN a Gideon J23Cel6A from *Humicola insolens*. *Structure*. 2003, roč. 11, č. 7, s. 855-864. ISSN 09692126. DOI: 10.1016/S0969-2126(03)00124-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212603001242>
- [7] BIDLACK, Jim, Mike MALONE a Russel BENSON. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. 1992, roč. 72, s. 51-56. ISSN 0078-4303. Dostupné z: http://digital.library.okstate.edu/oas/oas_pdf/v72/p51_56.pdf
- [8] FAN, Liang-tseng, Young-Hyun LEE a Mahendra Moreshwar GHARPURAY. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 1982, roč. 23, s. 157-187. ISSN 0724-6145. Dostupné z: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3540116982_4
- [9] O'SULLIVAN, ANTOINETTE C. Cellulose: The structure slowly unravels. *Cellulose*. 1997, roč. 4, č. 3, s. 173-207. ISSN 09690239. DOI: 10.1023/A:1018431705579. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1018431705579>
- [10] LARSSON, Per Tomas, Kristina WICKHOLM a Tommy IVERSEN. A CP/MAS13C NMR investigation of molecular ordering in celluloses. *Carbohydrate Research*. 1997, roč. 302, 1-2, s. 19-25. ISSN 00086215. DOI: 10.1016/S0008-6215(97)00130-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621597001304>
- [11] MOISER, Nathan S., Philip HALL, Christine M. LADISCH a Michael R. LADISCH. Reaction Kinetics, Molecular Action, and Mechanisms of Cellulolytic Proteins. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 1999, roč. 65, s. 23-40. ISSN 0724-6145. DOI: 10.1007/3-540-49194-5_2. Dostupné z: http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-49194-5_2

- [12] YAMAMOTO, Hiroyuki a Fumitaka HORN. In Situ crystallization of bacterial cellulose I. Influences of polymeric additives, stirring and temperature on the formation celluloses I and I as revealed by cross polarization/magic angle spinning (CP/MAS)¹³C NMR spectroscopy. *Cellulose*. 1994, roč. 1, č. 1, s. 57-66. ISSN 0969-0239. DOI: 10.1007/BF00818798. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00818798>
- [13] HON, David N a Nobuo SHIRAIISHI. *Wood and cellulosic chemistry*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, c2001, viii, 914 p. ISBN 08-247-0024-4.
- [14] DIETRICH FENGEL, Gerd Wegener. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. München: Kessel, 2003. ISBN 978-393-5638-395.
- [15] LLOYD, Todd A. a Charles E. WYMAN. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2005, roč. 96, č. 18, s. 1967-1977. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.01.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852405000647>
- [16] YANG, Bin a Charles E. WYMAN. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004-04-05, roč. 86, č. 1, s. 88-98. ISSN 0006-3592. DOI: 10.1002/bit.20043. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.20043>
- [17] DOUGLAS, Carl J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science*. 1996, roč. 1, č. 6, s. 171-178. ISSN 13601385. DOI: 10.1016/1360-1385(96)10019-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/1360138596100194>
- [18] MOONEY, Caitriona A., Shawn D. MANSFIELD, Maria G. TOUHY a John N. SADDLER. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology*. 1998, roč. 64, č. 2, s. 113-119. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/S0960-8524(97)00181-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852497001818>
- [19] MANSFIELD, S.D., C. MOONEY a J.N. SADDLER. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Progress*. 1999-10-01, roč. 15, č. 5, s. 804-816. ISSN 8756-7938. DOI: 10.1021/bp9900864. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp9900864>
- [20] LU, Yanpin, Bin YANG, David GREGG, John N. SADDLER a Shawn D. MANSFIELD. Cellulase Adsorption and an Evaluation of Enzyme Recycle During Hydrolysis of Steam-Exploded Softwood Residues. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98-100, 1-9, s. 641-654. ISSN 0273-2289. DOI: 10.1385/ABAB:98-100:1-9:641. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:98-100:1-9:641>
- [21] MCGINNIS, Gary D., Wilbur W. WILSON a Cliff E. MULLEN. Biomass pretreatment with water and high-pressure oxygen. The wet-oxidation process. *Industrial*. 1983, roč. 22, č. 2, s. 352-357. ISSN 0196-4321. DOI: 10.1021/i300010a036. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i300010a036>
- [22] HIMMEL, Michael E. *Biomass recalcitrance: Deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Oxford: Blackwell Pub., 2008, xviii, 505 p. ISBN 14-051-6360-7.
- [23] PAULOVÁ, L., E. PAVLOVÁ, V. OLŠAN, K. JAISAMUT, J. LIPOVSKÝ, M. RYCHTERA, K. MELZOCH. Využití odpadních materiálu na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. Chemagazín [online]. 2010, 20, 5, [cit. 2013-04-29]. Dostupný z WWW: <www.chemagazin.cz>.

- [24] RIVERS, Douglas B. a George H. EMERT. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal-solid-waste components. *Biotechnology and Bioengineering*. 1988, roč. 31, č. 3, s. 278-281. ISSN 0006-3592. DOI: 10.1002/bit.260310314. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bit.260310314>
- [25] Woodman, J. Pollution Prevention Technologies for the Bleached Kraft Segment of the U.S. Pulp and Paper Industry. U.S. Environmental Protection Agency. [online]. 2007 [cit. 2013-04-29]. Dostupný z WWW: <<http://www.p2pays.org/ref/02/01128/01128.pdf>>.
- [26] Kokrhelová, K., Jirout, T. Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv. STČ [online]. 2008 [cit. 2013-04-29]. Dostupný z WWW: <http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf>.
- [27] CELJAK, Ivo: Biomasa je nezbytná součást lidského života. Biom.cz [online]. 2008-12-22 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z WWW: <[http://biom.cz/cz/odborne-clanky/biomasa-enezbytna-soucast-lidskeho-zivota?sel_ids=1&ids\[x3c15a7e6482e265d3a7f63655b17e64b\]=1](http://biom.cz/cz/odborne-clanky/biomasa-enezbytna-soucast-lidskeho-zivota?sel_ids=1&ids[x3c15a7e6482e265d3a7f63655b17e64b]=1)>. ISSN: 1801-2655.
- [28] XIMENES, Eduardo, Youngmi KIM, Nathan MOSIER, Bruce DIEN a Michael LADISCH. Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*. Překlad John Bester. 2011, roč. 48, č. 1, s. 54-60. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2010.09.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022910001997>
- [29] ZHU, Shengdong, Yuanxin WU, Ziniu YU, Cunwen WANG, Faquan YU, Siwei JIN, Yigang DING, Ruïïan CHI, Jintao LIAO a Yan ZHANG. Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw: introducing Sinclair Ross's : a reader's guide. *Biosystems Engineering*. 2006, roč. 93, č. 3, s. 279-283. ISSN 15375110. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2005.11.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537511005002631>
- [30] ZHU, Shengdong, Yuanxin WU, Ziniu YU, Qiming CHEN, Guiying WU, Faquan YU, Cunwen WANG a Shiwei JIN. Microwave-assisted Alkali Pre-treatment of Wheat Straw and its Enzymatic Hydrolysis. *Biosystems Engineering*. 2006, roč. 94, č. 3, s. 437-442. ISSN 15375110. DOI: 10.1016/j.biosystemseng.2006.04.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537511006001413>
- [31] SUN, Ye a Jiayang CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, roč. 83, č. 1, s. 1-11. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
- [32] HRÁZSKÝ, Jaroslav a Pavel KRÁL. *Využití dřevních a jiných lignocelulózových odpadů*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999, 96 s. ISBN 80-715-7403-1.
- [33] HENRISSAT, B, T.T TEERI a R.A.J WARREN. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*. 1998, roč. 425, č. 2, s. 352-354. ISSN 00145793. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00265-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014579398002658>
- [34] V. ZVERLOV, S. MAHR, K. RIEDEL. Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from extreme thermophile 'Anaerocellum thermophilum' with separate glucosyl hydrolases family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology*. 1998, s. 457-465.
- [35] ERIKSSON, Torny, Johan KARLSSON a Folke TJERNELD. A Model Explaining Declining Rate in Hydrolysis of Lignocellulose Substrates with Cellobiohydrolase I (Cel7A) and Endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and*

- Biotechnology*. 2002, roč. 101, č. 1, s. 41-60. ISSN 0273-2289. DOI: 10.1385/ABAB:101:1:41. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1385/ABAB:101:1:41>
- [36] YAO, Mingjing, Zhilong WANG, Zhenqiang WU a Hanshi QI. Evaluating kinetics of enzymatic saccharification of lignocellulose by fractal kinetic analysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2011, roč. 16, č. 6, s. 1240-1247. ISSN 1226-8372. DOI: 10.1007/s12257-011-0283-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12257-011-0283-4>
- [37] BAYER, Edward A., Yuval SHOHAM a Raphael LAMED. Lignocellulose-Decomposing Bacteria and Their Enzyme Systems. *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, s. 215. DOI: 10.1007/978-3-642-30141-4_67. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-30141-4_67
- [38] KUHAD, Ramesh Chander, Ajay SINGH a Karl-Erik L. ERIKSSON. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. Springer Berlin Heidelberg, 1997, s. 45. DOI: 10.1007/BFb0102072. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BFb0102072>
- [39] SHALLOM, Dalia a Yuval SHOHAM. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, roč. 6, č. 3, s. 219-228. ISSN 13695274. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00056-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527403000560>
- [40] KIRBY, A.R., A.P. GUNNING, K.W. WALDRON, V.J. MORRIS a A. NG. Visualization of plant cell walls by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*. 1996, roč. 70, č. 3, s. 1138-1143. ISSN 00063495. DOI: 10.1016/S0006-3495(96)79708-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349596797084>
- [41] SZCZODRAK, Janusz a Jan FIEDUREK. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 1996, roč. 10, 5-6, s. 367-375. ISSN 09619534. DOI: 10.1016/0961-9534(95)00114-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096195349500114X>
- [42] WILSON, David B. Three Microbial Strategies for Plant Cell Wall Degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, roč. 1125, č. 1, s. 289-297. ISSN 00778923. DOI: 10.1196/annals.1419.026. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1419.026>
- [43] ZYL, Willem H., Lee R. LYND, Riaan HAAN a John E. MCBRIDE. Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, s. 205 [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1007/10_2007_061. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/10_2007_061
- [44] DRUZHININA, Irina S., Alex G. KOPCHINSKIY a Christian P. KUBICEK. The first 100 Trichoderma species characterized by molecular data. *Mycoscience*. 2006, roč. 47, č. 2, s. 55-64. ISSN 1340-3540. DOI: 10.1007/s10267-006-0279-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10267-006-0279-7>
- [45] HAMELINCK, Carlo N, Geertje van HOOIJDONK a André PC FAAIJ. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. 2005, roč. 28, č. 4, s. 384-410. ISSN 09619534. DOI: 10.1016/j.biombioe.2004.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953404001801>

- [46] D'AMORE, Tony a Graham G. STEWART. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology*. 1987, roč. 9, č. 6, s. 322-330. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/0141-0229(87)90053-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022987900536>
- [47] ROMANO, Patrizia, Angela CAPECE a Lene JESPERSEN. Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts: a review. *Yeasts in Food and Beverages*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, roč. 83, č. 1, s. 13. ISSN 09608524. DOI: 10.1007/978-3-540-28398-0_2. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-28398-0_2
- [48] KÁDÁR, Zs., Zs. SZENGYEL a K. RÁCZEY. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*. 2004, roč. 20, č. 1, s. 103-110. ISSN 09266690. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.12.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669004000135>
- [49] PRASAD, S., Anoop SINGH a H.C. JOSHI. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 2007, roč. 50, č. 1, s. 1-39. ISSN 09213449. DOI: 10.1016/j.resconrec.2006.05.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921344906001285>
- [50] PANAGIOTOU, G.; et al. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *Fusarium oxysporum* F3—growth characteristics and metabolite profiling. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 36: 693-699
- [51] BRUMMER, V. Enzymatická hydrolýza odpadní papíroviny – zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv. Brno, 2010. 93 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [52] LEPAŘ, P. Enzymatická hydrolýza odpadní papíroviny – zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv. Brno, 2011. 77 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [53] Novozymes® . Novozymes® biomass kit : Application Sheet. Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials.

7 Zoznam skratiek

A	– absorbanca
ATP	– Adenosintrifosfát
c	– koncentrácia
CBU	– cellobiase unit – celobiózová jednotka
CFU	– Colony-forming unit – kolónia vytvárajúca jednotka
EGU	– endo-glucanase unit – endoglukanázová jednotka
EtOH	– etanol
Exp.	– experimentálny
FCH VUT	– Fakulta chemická, Vysoké učení technické
FPU	– filter paper unit
GLU	– glukóza
hod.	– hodina
HPLC	– vysokotlaká kvapalinová chromatografia
IS	– interval spoľahlivosti
m	– hmotnosť
MO	– mikroorganismus, mikroorganizmy
MW/NaOH	– predúprava pomocou roztoku hydroxidu sodného v kombinácii s mikrovlnným žiarením
MW/Ca(OH)₂	– predúprava pomocou roztoku hydroxidu vápenatého v kombinácii s mikrovlnným žiarením
p.a.	– pro analysi (lat.) – označenie chemikálií k analytickým účelom
PE	– Polyethylene glycol
Ri	– refraktometrický detektor
rpm	– rotations per minute – otáčky za minútu
RS	– redukujúce sacharidy
SHF	– separate hydrolysis and fermentation – oddelená hydrolýza a fermentácia
SSF	– simultaneous saccharification and fermentation – simultánna sacharifikácia a fermentácia
TS	– total solids – súhrn tuhých častíc
V	– objem
% V/V	– objemových % na objemové %
% w/V	– hmotnostných % na objemové %
% w/w	– hmotnostných % na hmotnostné %