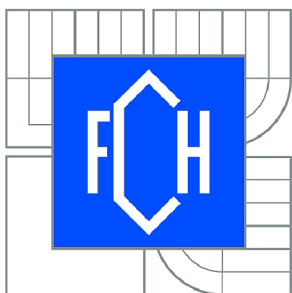




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA ODPADNÍ PAPIROVINY - ZDROJ SUROVINY PRO VÝROBU KAPALNÝCH BIOPALIV

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WASTE PAPER PULP - SOURCE OF RAW MATERIAL  
FOR PRODUCTION OF LIQUID BIOFUELS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VLADIMÍR BRUMMER

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. PETR GABRIEL

BRNO 2010



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0342/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Vladimír Brummer</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Petr Gabriel</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Enzymatická hydrolyza odpadní papíroviny - zdroj suroviny  
pro výrobu kapalných biopaliv

### Zadání diplomové práce:

- Literární rešerše - přehled a vývoj metod hydrolyzy lignocelulózových materiálů pro fermentační technologie.
- Zdroje lignocelulózové suroviny, kvantitativní a kvalitativní hodnocení jejich využitelnosti pro fermentační technologie.
- Proces enzymatické hydrolyzy, technologické předpoklady a návrh technologického postupu.
- Laboratorní ověření technologického procesu.
- Zhodnocení výsledků, diskuse a návrh dalšího postupu.
- Závěr.

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

-----  
Bc. Vladimír Brummer  
Student(ka)

-----  
Ing. Petr Gabriel  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Táto diplomová práca je zameraná na proces enzymatickej hydrolýzy lignocelulózového materiálu – odpadového papiera ako zdroj suroviny pre výrobu kvapalných biopalív.

V teoretickej časti práce sú zhrnuté doposiaľ používané metódy hydrolýzy a využívané lignocelulózové materiály pre proces hydrolýzy ako zdroj fermentovateľných sacharidov pre fermentačné technológie. Jednotlivé druhy odpadového papiera sú hodnotené zo stránky zloženia a využiteľnosti s ohľadom na proces výroby papiera s cieľom výberu vhodných druhov odpadového papiera pre proces enzymatickej hydrolýzy. V ďalšej časti práce sú naznačené technologické predpoklady a postupy pre predúpravu suroviny a následnú enzymatickú hydrolýzu takto predupravenej suroviny.

V experimentálnej časti boli optimalizované parametre enzymatickej hydrolýzy s použitím enzymatického balíčka firmy Novozymes<sup>®</sup>. Bola sledovaná enzýmová degradácia celulózy na základe prírastku redukujúcich sacharidov pomocou metódy Somogyiho – Nelsona. Pre overenie podmienok hydrolýzy boli použité modelové materiály s vysokým obsahom celulózy – buničina a filtračný papier. Podmienky, ktoré sa na modelových materiáloch javili ako najvýhodnejšie, boli overované na konkrétnych odpadových papierových materiáloch – ofset kartón, lepenka, recyklovanom papieri, papieri MYSol matný a pre porovnanie opäť na modelových materiáloch – buničine a filtračnom papieri. Najvyššie výťažky enzymatickej hydrolýzy boli dosahované s použitím lepenky, na ktorej boli ďalej testované rôzne kombinácie predúpravy materiálu s cieľom zvýšiť výťažky hydrolýzy.

## ABSTRACT

This master's thesis is aimed at process of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material – waste paper as a source of raw material for production of liquid biofuels.

In the theoretical part of this work are summarized previously used methods of hydrolysis and lignocellulosic materials used for the process of hydrolysis as a source of fermentable sugars for fermentation technology. The different types of waste paper are evaluated from the composition and usability with consideration to the papermaking process in order to select the appropriate type of waste paper for the enzymatic hydrolysis process. In the next part of this work are suggested technological premises and procedures for the preparation of raw materials and the subsequent enzymatic hydrolysis of these pre-treated materials.

In the experimental part were optimized parameters of enzymatic hydrolysis using the Novozymes<sup>®</sup> company enzyme package. Enzymatic degradation of cellulose to reducing sugars was observed using Somogyi – Nelson method. For the verification of hydrolysis conditions were used model materials with high cellulose content – pulp and filter paper. Conditions, which seems to be the best after testing on the model materials, were verified on specific waste paper materials – offset cardboard, recycled paper, matte MYSol paper and for comparison again on model materials – pulp and filter paper. The highest yields was achieved with the use of cardboard, which was further tested using various combinations of pretreatment to material for purpose of increase the yields of hydrolysis.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Enzymatická hydrolyza, odpadová papierovina, biopalivo, bioetanol, celuláza, papier, Novozymes.

## **KEYWORDS**

Enzymatic hydrolysis, waste paper pulp, biofuel, bioethanol, cellulase, paper, Novozymes.

BRUMMER, V. *Enzymatická hydrolyza odpadní papíroviny – zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 93 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. Diplomová 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

## POĎAKOVANIE

Chcel by som týmto poďakovať za odborné vedenie pri vypracovaní mojej diplomovej práce, cenné rady a pripomienky vedúcemu práce Ing. Petrovi Gabrielovi. Za odborné konzultácie a poskytnuté rady ďakujem Prof. Mojmírovi Rychterovi, MSc, PhD a doc. Ing. Jiřine Omelkovej, CSc.

Za dodanie testovacieho balíčka enzýmov Novozymes<sup>®</sup> Biomass kit ďakujem firme Novozymes<sup>®</sup>, za poskytnutie odpadových papierov firme Tlačiareň Brummer & Brummer s.r.o. a za poskytnutie technickej buničiny firme PENTA.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>DEFINÍCIA A VYMEDZENIE POJMOV</b> .....	<b>10</b>
2.1	BIOETANOL (BIOETHYLALKOHOL).....	10
2.2	BIOMASA .....	10
2.3	BIOPALIVO .....	10
2.4	KVAPALNÉ BIOPALIVO .....	10
2.5	PAPIEROVINA .....	10
2.6	LIGNOCELULÓZA .....	10
2.7	CELULÓZA .....	11
2.8	HEMICELULÓZA .....	11
2.9	LIGNÍN .....	11
2.10	ENZÝMY.....	11
2.11	HYDROLÝZA .....	11
<b>3</b>	<b>ZDROJE OBNOVITELNÝCH KVAPALNÝCH BIOPALÍV A MOŽNÉ SPÔSOBY ICH VÝROBY</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>PREHLAD A VÝVOJ METÓD HYDROLÝZY LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLOV PRE FERMENTAČNÉ TECHNOLOGIE</b> .....	<b>12</b>
4.1	HYDROLÝZA KONCENTROVANÝMI KYSELINAMI .....	12
4.2	HYDROLÝZA ZRIEDENÝMI KYSELINAMI .....	13
4.3	ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA .....	13
4.3.1	<i>Endo-<math>\beta</math>(1,4)-glukanázy</i> .....	14
4.3.2	<i>Exo-<math>\beta</math>-glukanázy</i> .....	14
4.3.3	<i><math>\beta</math>(1,4) glukozidázy</i> .....	14
4.3.4	<i>Mechanizmus enzymatickej hydrolýzy</i> .....	14
<b>5</b>	<b>ZDROJE LIGNOCELULÓZOVEJ SUROVINY</b> .....	<b>16</b>
5.1	ZLOŽENIE LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLOV.....	16
5.1.1	<i>Celulóza</i> .....	17
5.1.2	<i>Hemicelulóza</i> .....	18
5.1.3	<i>Lignín</i> .....	18
5.2	PRODUKCIA KOMUNÁLNYCH ODPADOV .....	19
5.3	PRODUKCIA ODPADOV Z OBALOV .....	19
5.4	TRIEDENÝ ZBER ODPADOV .....	20
5.5	ODPADOVÁ PAPIEROVINA .....	21
5.5.1	<i>Zberový papier</i> .....	21
<b>6</b>	<b>KVANTITATÍVNE A KVALITATIVNE HODNOTENIE VYUŽITELNOSTI SUROVINY PRE FERMENTAČNÉ TECHNOLOGIE</b> .....	<b>22</b>
6.1	POUŽITIE ZBEROVÉHO PAPIERA AKO SUROVINY .....	22
6.2	VÝBER VHODNÉHO CHEMICKÉHO ZLOŽENIA PAPIEROVINY PRE PROCES HYDROLÝZY S OHĽADOM NA PROCES VÝROBY PAPIERA .....	22

<b>7</b>	<b>PROCES ENZYMATICKEJ HYDROLÝZY, TECHNOLOGICKÉ PREDPOKLADY A NÁVRH TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU.....</b>	<b>25</b>
7.1	PREDÚPRAVA LIGNOCELULÓZOVÉHO MATERIÁLU .....	26
7.1.1	<i>Fyzikálna predúprava.....</i>	26
7.1.2	<i>Fyzikálno - chemická predúprava .....</i>	27
7.1.3	<i>Chemická predúprava .....</i>	27
7.1.4	<i>Biologická predúprava .....</i>	28
7.2	HYDROLÝZA PREDUPRAVENÉHO LIGNOCELULÓZOVÉHO MATERIÁLU A PROCES FERMENTÁCIE .....	28
7.2.1	<i>Fed-batch proces .....</i>	28
7.2.2	<i>SSF – simultánna sacharifikácia a fermentácia .....</i>	29
<b>8</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>30</b>
8.1	MATERIÁL A METÓDY .....	30
8.1.1	<i>Zoznam použitých prístrojov, chemikálií, softwaru a substrátov.....</i>	30
8.1.2	<i>Použité enzýmy .....</i>	31
8.1.3	<i>Príprava roztokov.....</i>	33
8.1.4	<i>Predúprava lignocelulózového materiálu.....</i>	34
8.1.5	<i>Základná kvantitatívna kompozičná analýza materiálu .....</i>	34
8.1.6	<i>Hrubá optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy.....</i>	36
8.1.7	<i>Použitie pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu .....</i>	36
8.1.8	<i>Enzymatická hydrolýza.....</i>	36
8.1.9	<i>Stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona.....</i>	37
8.1.10	<i>Stanovenie redukujúcich sacharidov (RS) metódou podľa Somogyiho a Nelsona.....</i>	37
8.1.11	<i>Stanovenie kalibračnej krivky bielkovín pri 550 nm .....</i>	38
8.1.12	<i>Stanovenie rozpustných bielkovín.....</i>	38
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>38</b>
9.1.1	<i>Stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona.....</i>	38
9.1.2	<i>Stanovenie kalibračnej krivky bielkovín pri 550 nm.....</i>	39
9.1.3	<i>Stanovenie rozpustných bielkovín.....</i>	40
9.1.4	<i>Hrubá optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy.....</i>	41
9.1.5	<i>Použitie pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu .....</i>	65
9.1.6	<i>Základná kvantitatívna kompozičná analýza materiálu .....</i>	67
9.1.7	<i>Enzymatická hydrolýza.....</i>	73
<b>10</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>81</b>
<b>11</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV .....</b>	<b>83</b>
<b>12</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV .....</b>	<b>89</b>
<b>13</b>	<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....</b>	<b>90</b>
<b>14</b>	<b>ZOZNAM PRÍLOH.....</b>	<b>91</b>
<b>15</b>	<b>PRÍLOHY.....</b>	<b>92</b>
15.1	PRÍLOHA Č. 1: PRODUKCIA ODPADOV PODĽA DRUHU ODPADU V ČR V ROKU 2007 [48].....	92
15.2	PRÍLOHA Č. 2: PRODUKCIA ODPADOVÉHO PAPIERA V JEDNOTLIVÝCH KRAJOCH ČR V TONÁCH [49] .....	93

15.3	PRÍLOHA Č. 3: SPOTREBA ODPADOVÉHO PAPIERA AKO DRUHOTNEJ SUROVINY V ČR [50] .....	93
------	--	----



# 1 ÚVOD

So zvyšujúcim sa počtom dopravných prostriedkov, vzrastá cestná premávka a množstvo spotrebovaných motorových palív. Dopravný sektor EU vykazuje viac ako 30 % konečnej spotreby energie a podlieha neustálemu rastu, pričom jeho závislosť na ropu dosahuje až 98 %. Aby bolo udržateľné dlhodobé zásobovanie nosičmi energie pre individuálnu dopravu, s prihliadnutím na politickú nestabilitu v zdrojových regiónoch, sa predpokladá maximálne úsporné zaobchádzanie s pohonnými hmotami a hlavne stredne a dlhodobá diverzifikácia energetických zdrojov používaných na výrobu pohonných hmôt so zahrnutím alternatívnych a obnoviteľných zdrojov. [1]

V EU sa predpokladá zvýšenie emisií CO<sub>2</sub> z dopravy o 50 % medzi rokmi 1990 až 2010. [2] Preto súčasťou globálneho úsilia EU na obmedzenie emisií skleníkových plynov o 20 % do roku 2020 je i snaha o širšie uplatňovanie biopalív v doprave. Do roku 2010 by malo dôjsť k navýšeniu množstva biopalív spotrebovávaných v doprave na 5,75 % a do roku 2020 na 10 % podiel podľa smernice 2003/30/EC o podpore využívania biopalív. [3, 4]

Z ekonomických a tiež ekologických dôvodov je vhodné využívať ako zdroj pre výrobu kvapalných biopalív odpadové suroviny. Tieto suroviny môžu byť podrobené enzymatickej hydrolýze, čo je jedna zatiaľ nie veľmi využívaná metóda, jedná sa však o veľmi ekologickú cestu a taktiež začína byť značne ekonomicky rentabilná, vzhľadom na nízke ceny vstupných surovín a ich veľmi vysokú dostupnosť a postupný pokles cien izolovaných enzýmov.

Enzymatická hydrolýza nezaťažuje životné prostredie, pretože nevzniká problém s veľkým množstvom odpadových vôd spojených s využitím kyslej alebo alkalickéj hydrolýzy. Taktiež nie je nutné použitie materiálov zariadení silne odolných proti korozívnym účinkom kyselín, prípadne zásad [5]. Procesy pri enzymatickej hydrolýze prebiehajú pri nižších teplotách, ide teda o menej energeticky náročný postup.

Pre výrobu prvých biopalív určených pre zážihové motory boli využívané ako suroviny poľnohospodárske plodiny so škrobnatým základom ako napr. kukurica a pšenica a suroviny s obsahom sacharózy ako cukrová trstina a cukrová repa. Podiel získanej energie z procesu k energii vložennej do procesu získavania takýchto biopalív je často nižší, než podiel energií vložených/získaných pre zisk palív z ropy. Etanolový program je však pre niektoré krajiny veľmi ekonomicky výhodný (napr. pre Brazíliu a ďalšie štáty Južnej a Strednej Ameriky), pretože znižuje závislosť krajiny na ropu, vytvára nové pracovné príležitosti a znižuje emisie. [6]

Efektivita technologického postupu záleží významne na použitej surovine a zvolenej technológii pre výrobu motorových palív. Energeticky nenáročné technológie využívajúce vznikajúce odpady pre paralelnú výrobu energií môžu byť značne výhodné. Napr. výroba bioetanolu z cukrovej trstiny produkuje vďaka súčasnému spaľovaniu odpadovej bagázy značné množstvo využiteľnej energie navyše.

V súčasnej dobe sa hľadajú iné „nové“ zdroje surovín pre biotechnologickú výrobu biopalív. Ako suroviny pre hydrolytickú produkciu fermentačne zkvasiteľných sacharidov sa zdajú byť značne perspektívne lignocelulózoové materiály. Medzi lignocelulózoové materiály môžeme zaradiť napr. slamu, piliny, drevné štiepky, rýchlo rastúce trávy, rôzne poľnohospodárske odpady a zbytky úrody, odpadovú papierovinu a ďalšie.

Výťažky enzymatickej hydrolýzy pre rôzne materiály sa líšia a závisia na použitej surovine (záleží na obsahu a hlavne dostupnosti celulózy v matrici), stupni mechanického rozrušenia,

fyzikálne-chemických faktoroch ako teplote, pH, dĺžke pôsobenia enzýmov, a ich počiatočnej koncentrácii, prítomnosti inhibítorov, koncentrácii substrátu a ďalších faktorov. Pre opätovné využitie enzýmov by bolo vhodné použiť niektorú z možností imobilizácie enzýmov, ale oddelenie enzýmov od nahromadeného produktu a tuhého zvyšku hydrolýzy komplikuje fakt, že substrát je nerozpustný materiál.

V spolupráci s firmou VUCHZ a.s. sa podarilo získať testovací balíček enzýmov firmy Novozymes<sup>®</sup>. Tento balíček bol overovaný na rôznych druhoch lignocelulózového materiálu, najmä na odpadovej papierovine. Cieľom bolo stanoviť vhodné technologické podmienky procesu hydrolýzy s dôrazom na efektívne získavanie čo najvyšších výťažkov fermentovateľných sacharidov.

## **2 DEFINÍCIA A VYMEDZENIE POJMOV**

Podľa platnej legislatívy [2, 7] sú definované použité pojmy takto:

### **2.1 Bioetanol (Bioethylalkohol)**

*Bioetanol* je etanol vyrábaný z biomasy a/alebo biologicky odbúrateľná časť odpadu používaná ako biopalivo. [2]

### **2.2 Biomasa**

Pojem *biomasa* zahŕňa biologicky rozložiteľné frakcie výrobkov, odpadu a zvyškov z poľnohospodárstva (vrátane rastlinných a živočíšnych látok), lesníctva a príbuzných odvetví, ako aj biologicky rozložiteľné frakcie priemyselného a komunálneho odpadu. [2, 7]

### **2.3 Biopalivo**

*Biopalivo* je kvapalné alebo plynné palivo určené pre dopravu vyrobené z biomasy. Za biopalivá sú pokladané tieto produkty: bioetanol, bionafta, bioplyn, biometanol, biodimetyléter, bio-ETBE (etyl-tercio-butyl-éter), bio-MTBE (metyl-tercio-butyl-éter), syntetické biopalivá, biovodík a čistý rastlinný olej. [2]

Podľa iných zdrojov môžeme definovať ďalšie používané pojmy takto:

### **2.4 Kvapalné biopalivo**

Kvapalným biopalivom rozumieme nositeľ energetického obsahu používaným predovšetkým na pohon motorových vozidiel. Medzi kvapalné biopalivá zaraďujeme biometanol, bioetanol, bionaftu, a čistý rastlinný olej. [6]

### **2.5 Papierovina**

Papierovina je súhrnným názvom pre vodnú suspenziu vlákien alebo zmesi vlákien a ostatných prísad (plnidiel, krížidiel, farbív, pomocných chemických prostriedkov a pod.), ktorá je vhodná pre výrobu papiera a nasávaných výrobkov. [8]

### **2.6 Lignocelulóza**

Lignocelulóza je hlavnou zložkou biomasy. Lignocelulóza sa vyznačuje značne premenlivým pomerom a obsahom prírodných polymérov ako sú celulóza, lignín a hemicelulóza. [1, 9]

## 2.7 Celulóza

Celulóza je štruktúrálny polysacharid tvorený reťazcami molekúl glukózy pospájanými  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykozidovými väzbami. [10]

## 2.8 Hemicelulóza

Hemicelulózy sú krátke reťazce glykozidicky spojených zvyškov cukrov, ktoré okrem glukózy môžu obsahovať aj iné cukry (manózu, xylózu, galaktózu apod.). Hemicelulózy majú mechanickú a zásobnú funkciu. [11]

## 2.9 Lignín

Lignín je komplexný prírodný fenolický polymér, ktorý plní ochrannú funkciu, funkciu mechanickej opory a funkciu vodného transportu v rastlinných tkanivách. [12]

## 2.10 Enzýmy

Enzýmy sú bielkoviny, ktoré katalyzujú chemické reakcie. Oproti anorganickým katalyzátorom sa vyznačujú väčším urýchlením reakčnej rýchlosti, väčšou špecifitou pre substrát a tým, že podliehajú regulácii. [13]

## 2.11 Hydrolýza

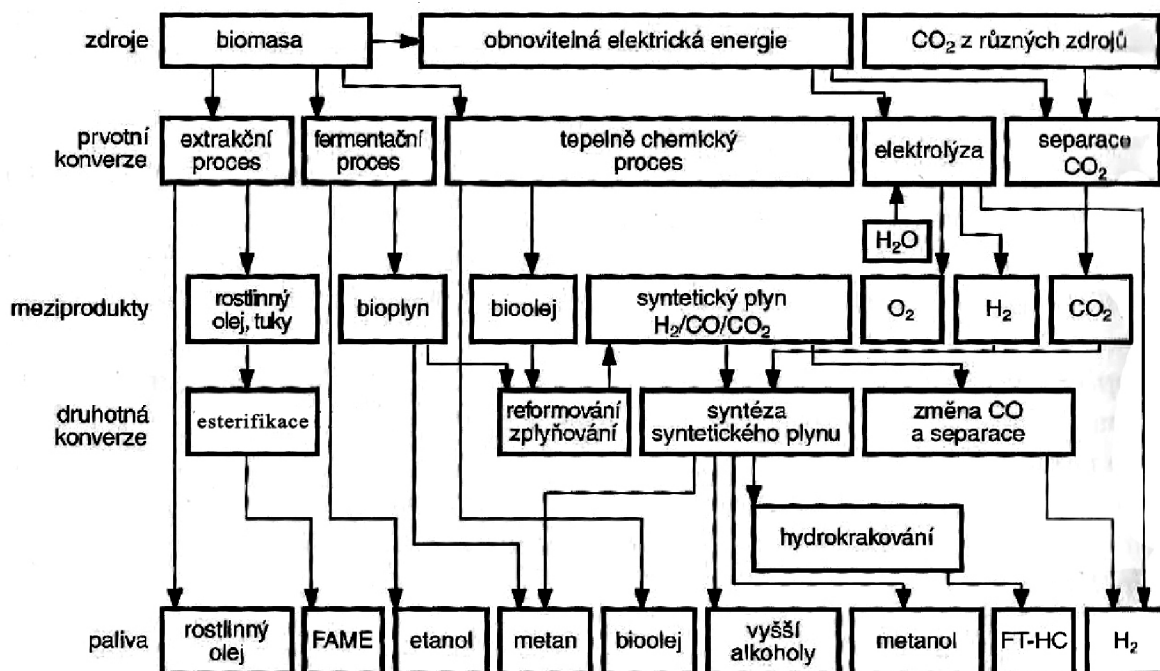
Hydrolýza je chemický proces, pri ktorom v prebytku vody a pôsobením vhodného katalyzátora dochádza k rozkladu substrátu na jeden alebo viacero nových produktov. [14]

# 3 ZDROJE OBNOVITEĽNÝCH KVAPALNÝCH BIOPALÍV A MOŽNÉ SPÔSOBY ICH VÝROBY

Biomasa je hlavným zdrojom obnoviteľných biopalív. Pri použití biomasy ako suroviny existujú tri hlavné spôsoby jej konverzie na palivo pre pohon motorov:

- extrakcia biooleja z olejní
- fermentácia plodín bohatých na škrob a sacharidy alebo celulóзовých produktov s premenou na alkohol, procesy hydrolýzy, anaeróbna fermentácia organických materiálov na bioplyn
- zplyňovanie biomasy, čistenie a využitie získaného plynu, prípadne jeho ďalšia syntéza [1]

Jednotlivé možnosti postupu výroby obnoviteľných palív sú znázornené na nasledujúcej schéme:



Obr. č. 1: Konverzní cesty výroby různých obnovitelných palív [1]

## 4 PREHLAD A VÝVOJ METÓD HYDROLÝZY LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLOV PRE FERMENTAČNÉ TECHNOLOGIE

Hydrolýza celulózy môže prebiehať nasledujúcimi cestami:

- hydrolýzou koncentrovanými kyselinami
- hydrolýzou zriedenými kyselinami
- enzymatickou hydrolýzou [1]

Pre postupy hydrolýzy kyselinami je spoločné, že pre korozívne vplyvy kyselín sú kladené vysoké požiadavky na materiál reaktorov, čo zvyšuje investičné náklady a tiež je problém so spracovaním odpadovej vody, ktoré je veľmi nákladné. [1] Problémom týchto postupov je tiež vznik degradačných produktov (furaldehydy), ktoré značne obmedzujú fermentovateľnosť hydrolyzátu.

### 4.1 Hydrolýza koncentrovanými kyselinami

Jedná sa o známy a už oddávna používaný spôsob spracovania lignocelulózy v rámci drevospracujúceho priemyslu. Používa sa kyselina sírová alebo chlór vodíková, zriedka fluorovodík. [1]

Pri hydrolýze koncentrovanými kyselinami je typicky používaný dvojfázový postup, pri ktorom je celulóza najskôr kompletne rozpustená v 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alebo 42 % HCl pri relatívne nízkych teplotách (10 – 45 °C). Celulóza je v tomto štádiu depolymerizovaná na oligosacharidy, z ktorých väčšinu tvorí celulotetraosa. V druhej fázi je oligomerická zmes s kyselinou zriedená na nižšie koncentrácie a zahrievaná na 100 – 200 °C počas 1 – 3 hodín. V tomto kroku sú oligometrické glukózové reťazce konvertované na monosacharidy. [10, 15]

Následne je nutné oddeliť vzniklé sacharidy od kyslého matečného lúhu a späťne získať a zkoncentrovať recyklovanú kyselinu aby bol proces ekonomicky efektívny. [1, 15]

Kinetika hydrolýzy celulózy koncentrovanými kyselinami nezávisí na štruktúrnych detailoch a kryštalinite celulóзовého substrátu a je možné touto cestou dosiahnuť viac ako 90 % výťažky glukózy. [15]

## 4.2 Hydrolýza zriedenými kyselinami

Tento postup bol už od konca 19. stor. používaný na výrobu etanolu z celulózy a je taktiež dvojfázový. V prvej fáze sa za miernych podmienok hydrolyzuje prevažne hemicelulóza, v druhej fáze prebieha hydrolýza rezistentnejších celulóзовých frakcií. Nerozpustné zbytkové látky, nerozložená celulóza a lignin sú z hydrolýzneho reaktora odstránené a spaľované, za účelom zisku vodnej pary alebo el. prúdu. [1]

Koncentrované kyseliny hydrolyzujú celulózu rýchlo a s malou alebo žiadnou nutnosťou predúpravy materiálu ale výťažky fermentovateľných sacharidov sú znižované degradáciou glukózy po jej uvoľnení z polyméru. Pri procesoch využívajúcich zriedené kyseliny vzniká menej degradačných produktov, ale na druhú stranu rýchlosť hydrolýzy je menšia, pretože zriedené kyseliny sú menej účinné v hydrolýze odolných kryštalických regiónov. Týmto spôsobom je možné dosiahnuť 65 – 80 % výťažky redukujúcich sacharidov. [15]

Celkové náklady spojené s procesmi využívajúcimi zriedené kyseliny sú nižšie než náklady pre postupy s použitím koncentrovaných kyselín. Z tohto dôvodu nie je nutná recyklácia kyseliny pre ekonomickú životaschopnosť procesu. [15]

Príkladom využitia hydrolýzy zriedenými kyselinami v ČR je kompletne spracovaná technológia výroby bioetanolu z pšeničnej slamy v tlakovom reaktore pri teplote hydrolýzy 198 °C, tlaku 1,5 MPa, expozíciou 11 min. s nástrikom 0,5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. [16]

## 4.3 Enzymatická hydrolýza

V súčasnej dobe javia firmy produkujúce hydrolytické enzýmy veľký záujem o výskum nových možností a lepších celulolytických preparátov pre hydrolýzu lignocelulóзовých materiálov. Jedná sa najmä o veľké biotechnologické firmy akými sú Novozymes<sup>®</sup> a Genencor<sup>®</sup>. Novozymes<sup>®</sup> sa chystá komerčne predstaviť v roku 2012 nový celulolytický preparát CELLIC<sup>®</sup> CTec2, ktorý sľubuje zlepšenie konverzie celulózy a nižšie nutné dávkovanie preparátu. [17] Firma Genencor<sup>®</sup> ponúka pre produkciu biopalív z lignocelulóзовých materiálov preparáty Accellerase<sup>®</sup>. [18]

Celulázy, mikrobiálne enzýmy schopné hydrolyzovať celulózu sú v skutočnosti skupinou niekoľkých, synergicky pôsobiacich komponentov. Celulázy sú inducibilné enzýmy produkované organizmami len v prítomnosti celulózy, celobiózy, laktózy, soforózy a iných glukanov obsahujúcich β-(1,4) glukozidické väzby. [15]

Výťažok enzymatickej hydrolýzy je ovplynený mnohými faktormi ako sú: typ predúpravy substrátu, inhibícia enzymatickej aktivity výslednými produktami biodegradácie (celobióza je silnejší inhibítor celuláz ako glukóza), termostabilitou enzýmov, ich koncentráciou a adsorpciou na substrát, dĺžkou hydrolýzy, pH média a koncentráciou substrátu v médiu a mierou miešania. Preto je nutné optimalizovať podmienky hydrolýzy aby bol dosiahnutý uspokojivý priebeh celého procesu hydrolýzy. [19]

Jav inhibície celuláz produktmi hydrolýzy viedol k záujmu o kontinuálne odstraňovanie týchto produktov počas ich formovania.

Celulázový komplex zahŕňa 3 základné časti, ktoré môžu byť reprezentované vo viacerých formách ako izoenzymy. Celulázový komplex môže byť klasifikovaný do týchto skupín: [15]

#### **4.3.1 Endo- $\beta$ -(1,4)-glukanázy**

táto skupina obsahuje viacero komponentov, ktoré sa líšia v stupni náhodnosti štiepenia  $\beta$ -(1,4) glukozidických väzieb v amorfnej oblasti mikrofibríl. Produktami činnosti tejto skupiny enzýmov je celobióza a glukooligosacharidy. [15]

#### **4.3.2 Exo- $\beta$ -glukanázy**

sú ďalej delené do dvoch skupín:

**$\beta$ -(1,4) glukanáza glukohydrolázy** – štiepia  $\beta$ -(1,4) glukozidické väzby od neredukujúceho konca celulózového reťazca za uvoľnenia glukózy.

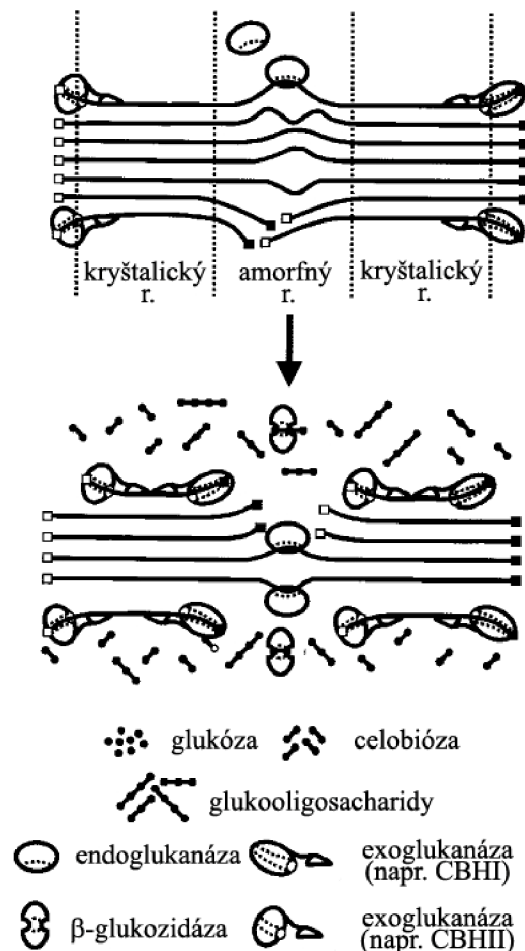
**$\beta$ -(1,4) glukan celobiohydrolázy** – štiepia  $\beta$ -(1,4) glukozidické väzby od neredukujúceho aj redukujúceho konca celulózového reťazca za uvoľnenia celobiózy. [15]

#### **4.3.3 $\beta$ -(1,4) glukozidázy**

Hydrolyzujú krátke reťazce glukooligosacharidov a celobiózu na glukózu. [15]

#### **4.3.4 Mechanizmus enzymatickej hydrolýzy**

Mechanizmus zahŕňa rozštiepenie vnútorných glykozidických väzieb pôsobením endo- $\beta$ -(1,4)-glukanázy nasledované synergickým pôsobením endo- a exo-glukanáz. Finálna hydrolýza oligosacharidov je katalizovaná  $\beta$ -(1,4) glukozidázou. Táto postupná asociácia medzi endo-glukanázou a exo-glukanázou bola dokázaná pomocou elektrónovej mikroskopie. Mechanizmus synergického pôsobenia celulázového komplexu znázorňuje obr. č. 2.



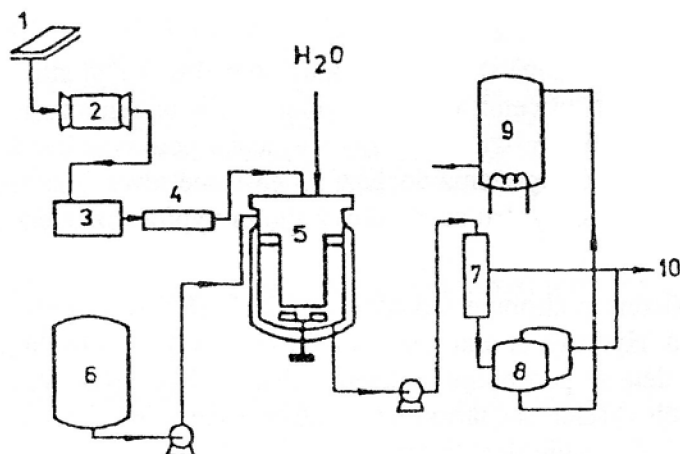
**Obr. č. 2:** Schématická reprezentácia enzymatickej hydrolýzy celulózy celulóзовým enzymatickým komplexom [20]

Mnoho mikroorganizmov (MO) má schopnosť hydrolyzovať natívnu celulózu. Producenti celuláz pre hydrolýzu lignocelulóзовých materiálov sú baktérie a vláknité huby. Tieto MO môžu byť aeróbne alebo anaeróbne, mezofilné alebo termofilné. [5] Za neprítomnosti rozpustených živín syntetizujú MO postupne enzýmy, ktoré odbúravajú nerozpustný substrát. [21]

Baktérie patriace do rodov: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia*, *Acetovibrio*, *Microbispora*, a *Streptomyces* sú schopné produkovať celulázy. [5]

Medzi vláknité huby, ktoré produkujú celulázy zaraďujeme napr. *Trichoderma viride*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma konigii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium irensii* a *Fusarium solani*. [21]

Proces enzymatickej hydrolýzy sa dá uskutočniť v zariadení, ktoré sa skladá z jednotky na prísun a úpravu suroviny, z jednotky na prípravu a skladovanie enzýmov, z bioreaktoru, v ktorom dochádza k hydrolytickému procesu a z aparátov na oddeľovanie a zpracovanie hydrolyzátu. [21]



**Obr. č. 3:** Poloprovozné zariadenie pre enzymatickú hydrolyzu novinového papiera  
 1 – zberový papier, 2 – kolový mlyn, 3 – kontrola množstva, 4 – dávkovač, 5 – reaktor,  
 6 – zásobník enzýmov, 7 – predfilter, 8 – filter, 9 – odparka, 10 – tuhý zbytok [21]

## 5 ZDROJE LIGNOCELULÓZOVEJ SUROVINY

### 5.1 Zloženie lignocelulózových materiálov

Bioenergetické suroviny je možné z chemického hľadiska vo väčšine prípadov zaradiť medzi lignocelulózové materiály. Pre každú surovinu je pomer prírodných polymérov a ich množstvo značne premenlivé. Obsah jednotlivých prírodných polymérov v rôznych surovinách je zhrnutý v tab. č. 1. [1] Okrem toho lignocelulózové materiály obsahujú malé množstvo minerálnych látok, tukov, rozpustných sacharidov a ďalších látok. [10]

**Tab. č. 1:** Orientačný obsah jednotlivých prírodných polymérov v rôznych surovinách [1, 5, 15, 22]

Surovina	Celulóza	Hemicelulóza	Lignin
ihličnaté stromy	40 – 50 %	20 – 30 %	25 – 35 %
listnaté stromy	40 – 50 %	30 – 40 %	15 – 20 %
cukrová trstina	40 %	30 %	20 %
kukuričné klasy	45 %	35 %	15 %
kukuričné stonky	35 %	25 %	35 %
pšeničná slama	30 %	50 %	15 %
trávy	25 – 40 %	35 – 50 %	10 – 30%
novinový papier	61 %	16 %	21%
odpadový papier z chemických buničín	60 – 70 %	10 – 20 %	5 – 10 %
biely kancelársky papier	65 %	15 %	10 %
mikrokryštalická celulóza	73 %	0 %	26 %

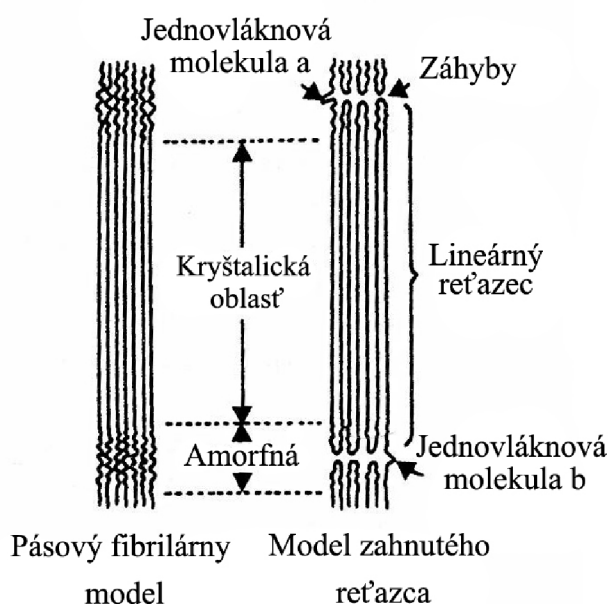


### 5.1.1 Celulóza

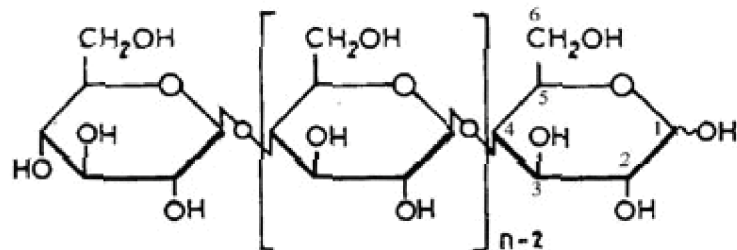
**Celulóza** je štruktúrally polysacharid – lineárny kondenzačný polymér obsahujúci molekuly D-anhydroglukopyranózy viazané  $\beta$ -(1→4) glykozidovými väzbami so stupňom polymerizácie 100 až 20 000. [23] Hoci má celulóza rovnaké chemické zloženie ako škrob, vzhľadom na rozdielne väzby medzi molekulami glukózy je jej štruktúra rozdielna, glukózové reťazce sú pevne späté, vytvárajúc vysoko kryštalickú a kompaktnú hmotu. Celulóza je vo vode nerozpustná a je výrazne odolná voči depolymerizácii. [10]

Veľkosť celulózových mikrofibril sa pohybuje v rozsahu 5 - 15 nm a vzdialenosť medzi mikrofibrilami v rozsahu 20 - 40 nm. [24] Medzi jednotlivými polymérnymi glukózovými reťazcami sa uplatňuje sieť vodíkových a Van der Waalsových síl. [24, 25]

Nie je to však primárna štruktúra, ktorá robí celulózu tak odolnou voči hydrolýze. Uplatňuje sa hlavne efekt sekundárnej a terciárnej štruktúry celulózového reťazca a tiež blízka asociácia s ďalšími protektívnymi polymérnymi štruktúrami nachádzajúcimi sa v stene rastlinných buniek, ako je lignín, hemicelulózy, pektín, škrob, proteíny a taktiež minerálne látky. Celulóza navyše vykazuje amorfné a kryštalické regióny s rôznym stupňom jednoduchosti degradácie v týchto oblastiach. Zhruba 15 % celulózového reťazca tvoria amorfné oblasti. Pokiaľ je celulóza vystavená pôsobeniu zriedených kyselín, dochádza k rýchlej hydrolýze týchto oblastí celulózy na glukózu. Zvyšných 85 % reťazca tvoria regióny s vysokou mierou usporiadania (kryštalinitou), ktoré sú značne rezistentné voči hydrolýze. Boli vypracované dva modely vysvetľujúce fibrilárne usporiadanie celulózy, ktoré je možné vidieť na obr. č. 4. [15]



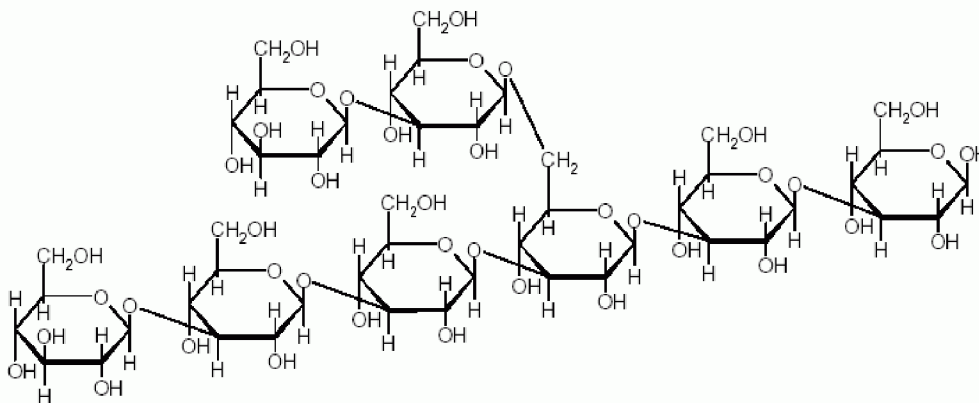
**Obr č. 4:** Teoretické modely vláknitého usporiadania celulózy [15]



Obr. č. 5: Celulóza – chemický vzorec [51]

### 5.1.2 Hemicelulóza

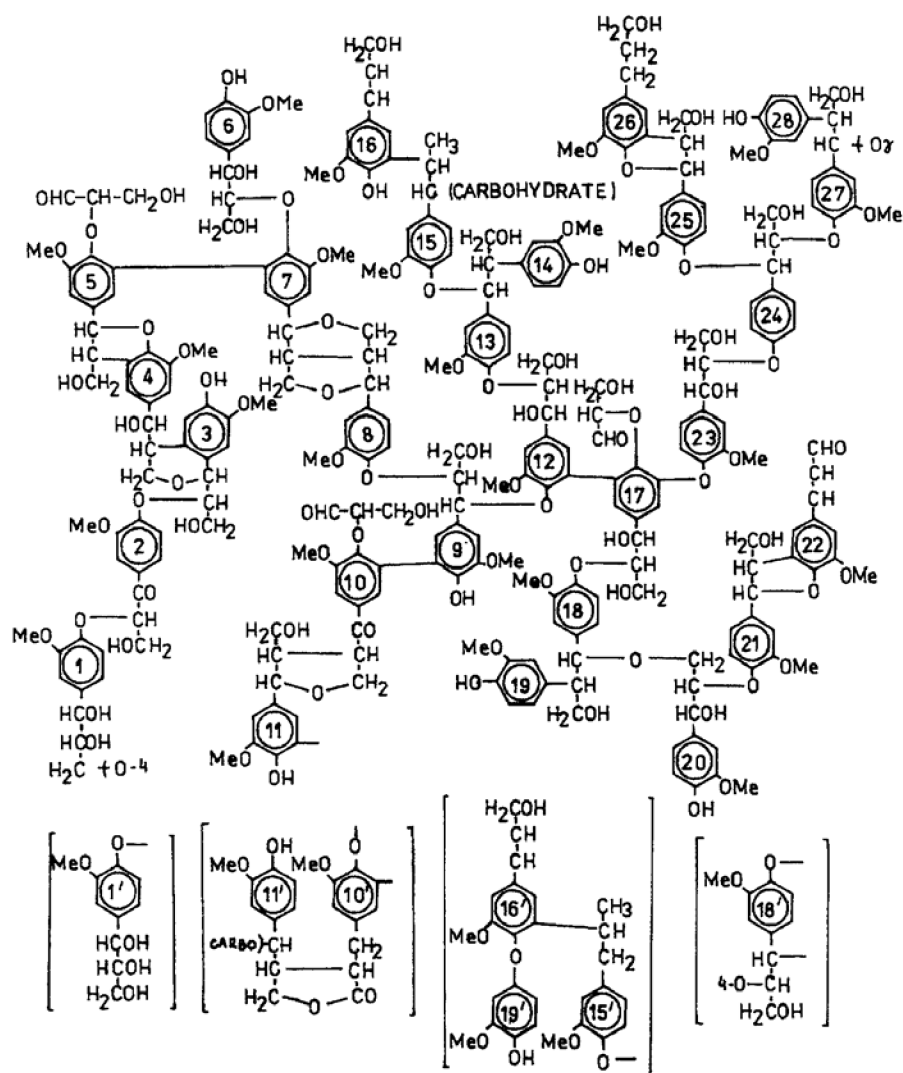
**Hemicelulóza** sa na celulózové mikrofibrily v inter-laminárnom priestore viaže vodíkovými väzbami, pričom vzniká sieť, ktorá je základom bunkovej steny rastlinných buniek. Molekuly hemicelulózy majú xylánovú, resp. glukánovú kostru s množstvom postranných reťazcov substituovaných rôznymi minoritnými sacharidmi, napr. manózou, fukózou, arabinózou, galaktózou, kyselinou glukurónovou apod. Stupeň vetvenia a zastúpenie jednotlivých sacharidov je závislé na rastline, z ktorej daný materiál pochádza. [10, 15]



Obr. č. 6:  $\beta$  – glukán – zložka hemicelulózy – chemický vzorec [52]

### 5.1.3 Lignín

Prítomnosť **lignínu** zvyšuje pevnosť bunkovej steny a zvyšuje odolnosť bunky voči chorobám a škodcom. [10] Je to makromolekula fenolického charakteru – dehydratačný produkt 3 monomerných alkoholov: trans-p-kumaryl alkoholu, trans-coniferyl alkoholu a trans-sinapyl alkoholu. Zastúpenie jednotlivých alkoholov variuje podľa zdroja lignocelulózy. [15] Lignín sa kovalentne viaže na postranné reťazce hemicelulózy esterovými väzbami cez kyselinu ferulovú a je vo veľkej miere zodpovedný za ťažkosti spojené s hydrolýzou celulózy pretože tvorí ochranný obal okolo celulózových mikrofibríl. [10, 15] Lignocelulóza je kompaktný materiál, ktorý svojou komplexnosťou a odolnosťou výrazne zvyšuje náklady na hydrolýzu v porovnaní so škrobom. [10]



Obr. č. 7: Štruktúrny model lignínu [53]

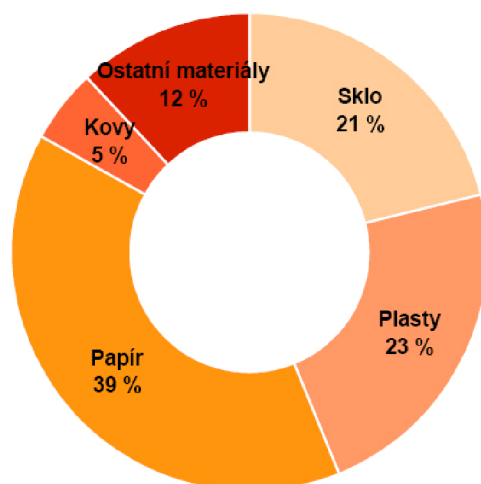
## 5.2 Produkcia komunálnych odpadov

Produkcia komunálnych odpadov sa v ČR pohybuje okolo 4,4 mil. t ročne. Produkcia komunálnych odpadov má klesajúci trend – znižuje sa množstvo separovateľných zložiek komunálnych odpadov (**papier**, sklo a pod.) vzhľadom k skvalitneniu zavádzania a prevádzky oddeleného zberu využiteľných zložiek komunálneho odpadu v obciach hlavne v zložkách **papier**, plasty a sklo. [26]

Hlavným spôsobom zberu využiteľných odpadov je donáškový zber do separačných nádob – farebných kontajnerov. V roku 2007 bolo na území ČR pre potreby triedeného zberu odpadov v obciach 162 tisíc kontajnerov (z toho 37 % pre plasty, 28 % pre farebné sklo a 25 % pre **papier**). [26]

## 5.3 Produkcia odpadov z obalov

V roku 2007 bolo v ČR uvedených na trh 874 180 t obalov na jedno použitie. Percentuálne zastúpenie jednotlivých materiálov používaných k výrobe jednocestných obalov sa v posledných rokoch prakticky nemení. Podiely jednotlivých materiálov na výrobu jednocestných obalov znázorňuje graf. č. 1. [26]

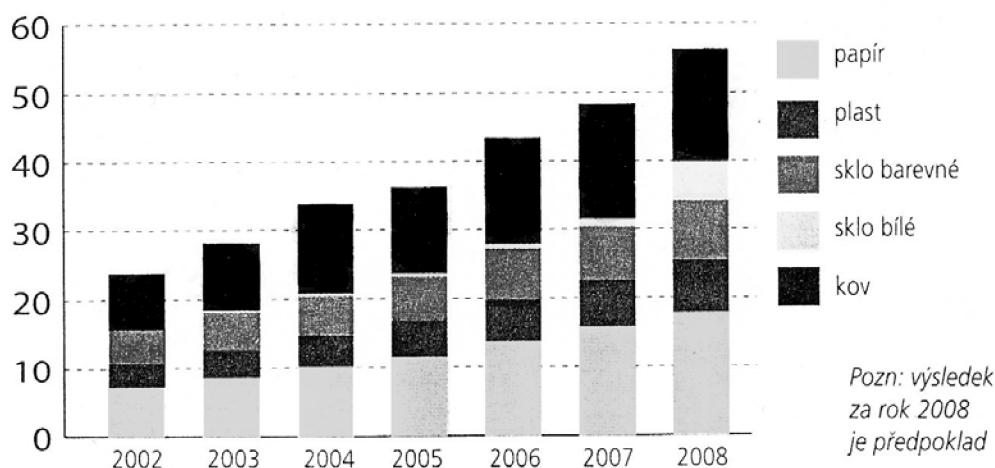


**Graf. č. 1:** Percentuálne zastúpenie jednotlivých materiálov používaných k výrobe jednocestných obalov v roku 2007 [26]

Z tohto kruhového grafu je zrejmé, že majoritný podiel používaných materiálov na výrobu jednocestných obalov je papier. Po použití týchto obalov vzniká teda veľké množstvo papierového odpadu, z ktorého by bolo možné vyselektovať materiál, ktorý by bol vhodný pre proces hydrolýzy, avšak nutný by bol nízky obsah inhibičných látok, ktoré by znižovali aktivitu enzýmov a bránili tak vzniku vysokých výťažkov a efektívnej produkcii.

#### 5.4 Triedený zber odpadov

Pre účel zaistenia spätného odberu a využitia obalov bol obalovým priemyslom založený systém EKO-KOM. [27, 28] Hlavnými partnermi pre rozvoj tohto systému sa už od počiatku stali obce. Na základe zmluvného vzťahu so systémom EKO-KOM vedú obce podrobnú evidenciu o zbere a ďalšom nakladaní s odpadmi, pričom táto evidencia je podkladom pre finančné odmeny pre obec. Motivačný princíp odmien výrazne napomohol k zvýšeniu výťažnosti triedeného zberu papiera, plastov, skla, nápojových kartónov a kovov z 9,3 kg/obyvateľa v roku 1999 na 56,6 kg/obyvateľa v roku 2008. Vývoj výťažnosti triedeného zberu je prezentovaný v graf. č. 2. [28]



**Graf. č. 2:** Vývoj výťažnosti triedeného zberu (kg/obyvateľa a rok) [28]

## 5.5 Odpadová papierovina

### 5.5.1 Zberový papier

Ekonomická kríza výrazne ovplyvnila trh so zberovým papierom. V poslednej dobe dochádza k poklesu záujmu o túto surovinu a klesá cena zberového papiera. Podľa domácich expertov a zahraničných odborných časopisov postihuje pokles cien spojený s poklesom záujmu o druhotné suroviny svet cyklicky každých 4 - 6 rokov. Trvanie tohto stavu je obvykle pol roku až 1 rok, potom sa trh vráti do pôvodného stavu. Momentálne je ale výkyv značnejší a je pravdepodobné, že ceny zberového papiera sa budú stabilizovať v dlhšom časovom horizonte. [29]

Český trh so zberovým papierom disponuje s viac ako 700-tisíc tonami ročne s nárastom 5 až 10 % ročne. Spotreba zberového papiera tuzemským papierenským priemyslom za účelom jeho recyklácie činí cca 400-tisíc ton a s časom sa výrazne nemení. Rozdiel sa exportuje do krajín ako je Nemecko, Rakúsko a Slovensko. Množstvo exportovaného papiera z ČR znázorňuje tab. č. 2. [29, 30]

**Tab. č. 2:** Množstvo exportovaného papiera z ČR [31]

druh papiera	množstvo papiera (tisíc ton)		
	rok 2005	rok 2007	rok 2009 (predpoklad)
zmiešaný papier	65	85	102
lepenky	17	38	48
noviny, časopisy	107	132	182
biele papiere	13	19	20
suma	202	274	352

Ceny rôznych druhov zberového papiera počas posledných mesiacov výrazne poklesli. Konkrétne cena 1 tony zmiešaného papiera klesla z 1 400 Kč v letných mesiacoch r. 2008 na 350 Kč alebo až takmer na nulu ku koncu roku 2008. Vlnitá lepenka sa predávala na začiatku roku 2008 za 2 600 Kč, na jar za 2 000, v lete za 1 800 v októbri za 1 000 Kč za 1 tonu. Niektoré druhy zberového papiera sa odoberajú bez úhrady prípadne zberové firmy musia dokonca platiť, ak sa chcú zbaviť takéhoto odpadu. [30]

Ďalší vývoj trhu sa dá len ťažko odhadnúť. Nízke ceny vstupnej suroviny pre výrobu biopalív – zberového papiera sú síce výhodou, ale ak poklesne odbyt zberového papiera ešte viac, bude to mať negatívny dopad na hospodárenie zberových a recyklačných firiem a naruší sa náročne budovaných systém triedenia odpadov. [30]

V roku 2002 bol zber papiera zavedený v 52 % obcí, čo pokrývalo 88 % populácie. V súčasnej dobe je do zberu papiera zapojených 81 % obcí, čo reprezentuje 96 % obyvateľov. [28]

## 6 KVANTITATÍVNE A KVALITATIVNE HODNOTENIE VYUŽITELNOSTI SUROVINY PRE FERMENTAČNÉ TECHNOLOGIE

### 6.1 Použitie zberového papiera ako suroviny

Každý druh odpadového papiera vykazuje inú mieru vhodnosti použitia ako vstupnej suroviny pre produkciu glukózy enzymatickou cestou. Je to dané rozdielnym zložením rôznych druhov papiera a tiež jeho znečistením, pretože sa jedná o odpadový materiál. Najčastejším znečistením je tlač, rôzne druhy lepidiel a podobne, ktoré sa v konečnom dôsledku môžu prejaviť inhibične s ohľadom na celulólytický komplex.

### 6.2 Výber vhodného chemického zloženia papieroviny pre proces hydrolýzy s ohľadom na proces výroby papiera

Pretože papiera sa vo svete vyrába veľké množstvo, musia byť suroviny pre jeho výrobu ľahko dostupné a lacné. Túto podmienku splňuje najlepšie drevo, ktoré neustále dorastá s minimálnymi nákladmi. Podľa druhu obsahuje drevo cca 50 – 60 % celulózy, cca 30 % lignínu, cca 10 – 20 % hemicelulózy a malý podiel živíc a ďalších doprevádzajúcich látok. [32]

Toto zloženie sa v priebehu výroby papiera výrazne mení. Delignifikáciou vzniká z dreva buničina. Pôsobením chemikálií, tlaku a vysokej teploty sa zníži podiel lignínu na 1,5 – 7 % z pôvodných 30 % a podiel hemicelulózy na 3 – 6 % z pôvodných 20 %. [32]

Pretože výsledná buničina je buď šedá (sulfitový spôsob) alebo hnedá (sulfátový a nátronový spôsob), používa sa pre výrobu tlačových papierov buničina bielená buď prostriedkami na báze chlóru ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ,  $\text{ClO}_2$  a pod.) alebo elementárnym kyslíkom a ozónom. Papiere bielené bez použitia zlúčenín chlóru sa označujú ako ECF (elementar chlorine free) a TCF (total chlorine free) [32, 33]

Drevovina, ktorá sa vyrába mechanicky obrusovaním odkôrneného dreva má prakticky rovnaké zloženie ako drevo a používa sa na výrobu lepeniek a pridáva sa tiež do menej kvalitných drevitých papierov. [32]

Podľa vlákňinového zloženia sa papiere rozdeľujú na:

**Tab. č. 3:** Rozdelenie papierov podľa vlákňinového zloženia [32]

Druh	Obsah drevoviny	Obsah buničiny
bezdrevné	max. 5 %	95 %
stredne jemné	50 %	50 %
drevité	viac než 50 %	menej než 50 %

Pre proces enzymatickej hydrolýzy je kľúčový, čo najvyšší podiel celulózy v odpadovej papierovine, pretože celulóza je substrátom pre enzymatický komplex. Obsah drevoviny a teda aj vyšší obsah lignínu a hemicelulózy v papieri negatívne ovplyvňuje hydrolýzu jednak znížením celkového podielu substrátu (celulózy) v materiáli, zvyšovaním odpadového množstva po ukončení hydrolýzy a zhoršenou dostupnosťou substrátu pre enzýmy.

Napriek tomu nie je nutné dosiahnuť takmer nulového obsahu lignínu a hemicelulózy v zdrojovej surovine aby bolo možné dosahovať vysoký konverzný pomer počas procesu enzymatickej hydrolýzy. [34]

Pred čerpaním na sito je papierovina upravovaná mletím, plnením, farbením, klížením atď.. Plnidlá sú zväčša biele minerálne látky (kaolín, krieda, titánová bieloba, baryt apod.) Niektoré druhy papiera obsahujú i viac ako 30 % plnidiel. Farbením sa medzi vlákna zanášajú nerozpustné, často organické pigmenty. Klížením sa dosahuje krátkodobá odolnosť voči vode. Väčšinou sa papiere klížia v hmote tak, že sa klíždila pridávajú do suspenzie papieroviny a fixujú sa na vlákna s prídavkom síranu hlinitého. Používajú sa jednak klíždila na bázi prírodných živíc a aj syntetické klíždila. [32] U klížených papierov môžeme očakávať prítomnosť niektorých z týchto látok: živice, parafín, montánný vosk, silikónové oleje, chromité komplexy kys. stearovej, kasein, škrob, želatína, latex, vodné sklo a pod. Rozdelenie papierov podľa stupňa plnenia znázorňuje tabuľka č. 4, rozdelenie papierov podľa stupňa zaklíženia tab. č. 5. [33]

**Tab. č. 4:** Rozdelenie papierov podľa stupňa plnenia [33]

<b>Druh</b>	<b>Obsah plnidiel</b>	<b>Papier</b>
neplnený	0 %	filtračný, elektroizolačný, pergamen, pauzovací, ai.
s malým obsahom plnidiel	do 5 %	novinový, písací, fotokartón, ai.
so stredným obsahom plnidiel	do 15 %	pre ofsetovú tlač, písací, litografický, ai.
s vysokým obsahom plnidiel	nad 15 %	pre hlbkotlač, na slovníky, ai.

**Tab. č. 5:** Rozdelenie papierov podľa stupňa zaklíženia [32]

<b>Druh</b>	<b>Podmienka</b>	<b>Označenie</b>	<b>Papier</b>
plne klížený	čiary hrúbky 1 mm sa nerozpíjajú, ani neprenikajú na druhú stranu	1/1	listový, zošitový, písací, litografický, svetlotlačový, ofsetový ai.
poloklížený	čiary sa začínajú rozpíjať v mieste kríženia, prípadne i mimo miesta kríženia	1/2	hlbokotlačový, pre obaly zošitov, baliaci, ai.
neklížený	čiary i malej hrúbky sa rozpíjajú a prerážajú do rubu		cigaretový, novinový, ai

Dôležitou vlastnosťou pre proces hydrolýzy je jeho nasiakavosť. Nasiakavosťou papiera rozumieme schopnosť prijímať kvapalinu (vodu) celým objemom a je vyjadrená % kvapaliny (vody), ktoré je ponorený papier schopný poňať. [32] Je možné vysloviť predpoklad, že v suspenzii vysoko nasiakavého papiera majú enzýmy celulólitického komplexu lepší prístup k substrátu, než by to bolo u málo nasiakavého papiera. Prídavkom plnidiel sa zvyšuje počet mikrokapilárnych priestorov v liste papiera a mení sa povrchová energia, čím sa nasiakavosť zvyšuje. [33]

Papier, ktorý by bol najvhodnejší ako surovina pre proces enzymatickej hydrolýzy by mal mať tieto vlastnosti:

- čo najväčší obsah celulózy
- nízky obsah lignínu a hemicelulózy
- bezdrevné vlákňinové zloženie
- nízke alebo žiadne klíženie
- nulový alebo malý obsah plnidiel
- nízke znečistenie farbami a lepidlami

**Tab. č. 6:** Vlastnosti nutné pre posúdenie vhodnosti druhu papiera pre proces hydrolýzy [33]

vlastnosť papiera	vhodnosť vlastnosti papiera pre proces enzymatickej hydrolýzy (++ = výborná, + = dobrá, ? = otázna (vlastnosť varuje), - = nevhodná, -- = veľmi nevhodná)						
	novinový papier	tlačový papier (ofset)	tlačový papier (hlbkotlač)	písací papier (konfekčný)	písací papier (knihový a zošitový)	lepenka vlnitá	kresliace kartóny
vlákňinové zloženie	--	?	?	++	++ (?)	--	++
obsah plnidiel	+	--	--	?	?	+	?
stupeň zaklíženia	+	+	++	?	-	++	--

Bolo vykonaných viacero štúdií zaoberajúcich sa efektívnosťou premeny rôznych odpadových papierových surovín na redukujúce sacharidy. Výsledky týchto štúdií sú zhrnuté v tabuľke č. 7.

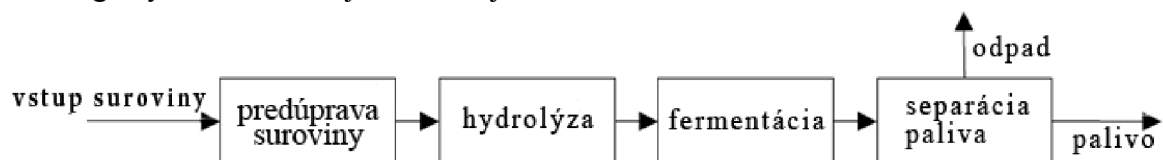


**Tab. č. 7:** Efektivita hydrolýzy rôznych druhov odpadového papiera na redukujúce sacharidy

autor, citácia	rok vydania	enzýmy z MO	efektivita enzymatickej hydrolýzy rôznych druhov odpadového papiera (1 = najlepšia, 5 = najhoršia, x = nebolo testované)					
			zošitový papier	filtračný papier	novinový papier	kancelársky papier	kartón / lepenka	MCC
van Wyk [35]	1999	Penicillium funiculosum	1	2	3	4	x	x
van Wyk [36]	1999	Penicillium funiculosum, Trichoderma reesei	1	2	4	5	x	3
van Wyk [37]	1998	Penicillium funiculosum, Trichoderma viride	1	2	3	x	x	4
van Wyk , Mohulatsi [38]	2003	Trichoderma viride	1	3	4	2	4	x
van Wyk , Mohulatsi [39]	2001	Penicillium funiculosum	1	2	3	5	x	4
			magazín	katalóg	novinový papier	kancelársky papier	kartón / lepenka	
Park, Ikeda, Okuda [40]	2002	3 rôzne druhy enzýmov	3	5	4	1	2	

## 7 PROCES ENZYMATICKEJ HYDROLÝZY, TECHNOLOGICKÉ PREDPOKLADY A NÁVRH TECHNOLOGICKÉHO POSTUPU

Samotný proces získavania bioetanolu môžeme jednoducho zhrnúť do základných technologických krokov v tejto blokovej schéme:



**Obr. č. 8:** Proces výroby bioetanolu [54]

Pre rozsah zadania diplomovej práce sú relevantné prvé dva kroky v hore uvedenej blokovej schéme výroby kvapalných biopalív, teda mechanická úprava vstupnej suroviny a následná enzymatická hydrolýza s cieľom dosiahnuť čo najväčší výťažok fermentovateľných

sacharidov. Pre postup SSF (simultánnej hydrolýzy a fermentácie) je dôležitý tiež následný fermentačný krok, ktorý je spojený s hydrolýzou.

## 7.1 Predúprava lignocelulózového materiálu

Pred samotnou hydrolýzou a fermentáciou je nutné lignocelulózový materiál predupraviť. Účelom predúpravy lignocelulózového materiálu je odstránenie lignínu a hemicelulózy a zvýšenie porézności materiálu. [5] Existencia pevných väzieb vo vnútri celulózovej molekuly a medzi jednotlivými celulózovými reťazcami, ktoré sú navyše zneprístupňované prítomnosťou lignínu, predstavuje tento krok najväčšiu obtiaž pri zpracovaní suroviny. [1] Predúprava je z ekonomického pohľadu jeden z najdrahších častí celého výrobného procesu. [10]

Pri predúprave musia byť splnené tieto požiadavky:

- zlepšenie dostupnosti celulózy pre proces hydrolýzy
- nesmie dochádzať k nežiadúcej degradácii a stratám polysacharidov
- nesmú vzniknúť vedľajšie produkty, ktoré by pôsobili inhibične na následné procesy hydrolýzy a fermentácie
- proces musí byť finančne efektívny [5]

K predúprave suroviny sa využívajú fyzikálne, fyzikálno-chemické, chemické a biologické procesy. [5]

### 7.1.1 Fyzikálna predúprava

#### 7.1.1.1 Mechanické rozmelňovanie

Pri mechanickom rozmelňovaní je celulóza zo štruktúry materiálu získavaná lámaním, drvením, mletím alebo kombináciou uvedených procesov. Výsledná veľkosť častíc materiálu je pri využití lámania 10 – 30 mm a pri použití mletia 0,2 – 2,0 mm. Energetické nároky sa líšia podľa využitej metódy a použitého materiálu. [5]

van Wyk dosahoval pomocou použitia homogenizácie u odpadového papiera 2 – 3 vyššie výťažky enzymatickej hydrolýzy než s použitím neupraveného materiálu. [35]

#### 7.1.1.2 Úprava teplotou

Jedná sa o použitie vodného refluxu pri 100 °C na materiál. Takáto predúprava je náročná na energiu a nie je efektívna. Napr. van Wyk pri použití tejto predúpravy nedosahoval zvýšenie výťažku hydrolýzy u odpadového papiera (s výnimkou mierneho zvýšenia výťažku u novinového papiera) [35]

#### 7.1.1.3 Pyrolýza

Pri pôsobení teploty vyššej ako 300 °C dochádza k rozloženiu celulózy na plynné produkty a uhlíkatý zvyšok. Po pôsobení teploty na materiál, je možné miernou kyslou hydrolýzou (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 97 °C, 2,5 h) dosiahnuť výťažku 80 - 85 % redukujúcich sacharidov s podielom glukózy viac ako 50 %. [5] Je treba podotknúť, že pyrolýza ako fyzikálna predúprava u lignocelulózových materiáloch nie je často používaná je na tomto mieste zmienená pre komplexné podanie informácií o možných fyzikálnych predúpravách.

## 7.1.2 Fyzikálno - chemická predúprava

### 7.1.2.1 Explózia vodnou parou

Jedná sa o jednu z najpoužívanejších metód predúpravy lignocelulóзовých materiálov. Rozmelená biomasa je podrobená prúdu vysokotlakej nasýtenej pary. Potom je tlak rýchlo znížený, čo spôsobuje explozívnu dekompresiu materiálu. Explózia vodnou parou je iniciovaná pri teplote 160 - 260 °C (korešpondujúci tlak 0,7 – 4,8 MPa) po niekoľko sekúnd až minút, potom je materiál vystavený atmosférickému tlaku. Konvenčné mechanické postupy vyžadujú o 70 % viac energie ako explózia vodnou parou pre dosiahnutie rovnakej redukcie veľkosti častíc, nevýhodou však je deštrukcia časti xylanovej frakcie a tvorba inhibičných látok pre mikroorganizmy používané v downstream procesoch. [5]

### 7.1.2.2 Explózia použitím CO<sub>2</sub>

Metóda je veľmi podobná explózii vodnou parou a použitím amoniaku. Dávkuje sa 4 kg na kg suchej hmoty za tlaku 5,6 MPa. Výťažky sú nižšie než u explózie vodnou parou a s použitím amoniaku, ale metóda je finančne efektívnejšia než s použitím amoniaku a nevznikajú inhibítory ako u explózii vodnou parou. [5]

### 7.1.2.3 Explózia použitím amoniaku (AFEX)

Lignocelulóзовý materiál je vystavený tekutému amoniaku za vysokej teploty a vysokého tlaku po určitú dobu a následne je tlak znížený. Dávkuje sa 1 - 2 kg amoniaku na 1 kg suchej biomasy (90 °C počas 30 min.) [5]

## 7.1.3 Chemická predúprava

### 7.1.3.1 Ozonolýza

Ozón sa používa na degradáciu lignínu a hemicelulóзов vo viacerých lignocelulóзовých materiáloch ako sú pšeničná slama, seno, borovica, drevné piliny a pod. Degradácia je obmedzená len na lignín a hemicelulóзу, celulóза zostáva nedotknutá. Výhodou tohto procesu je, že nevznikajú inhibičné látky a lignín je efektívne odstraňovaný. Nevýhodou je použitie veľkého množstva ozónu, čo zdražuje proces. [5]

### 7.1.3.2 Kyslá hydrolýza

Kyslá hydrolýza je použiteľná ako proces úpravy materiálu pred samotnou enzymatickou hydrolýzou. Je možné použiť jednak procesy s koncentrovanými kyselinami (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl a pod.) a procesy používajúce zriedené kyseliny. Na konci procesu musí byť neutralizované pH pre enzymatickú hydrolýzu a fermentáciu. Výhody a hlavne nevýhody týchto metód boli už zhrnuté v kapitole č. 4. Hoci predúprava zriedenými kyselinami môže významne zlepšiť proces hydrolýzy lignocelulóзовých materiálov, náklady tohto procesu sú zvyčajne vyššie než pri niektorých fyzikálno-chemických procesoch predúpravy materiálu. [5]

Nikolov a kol. v r. 2000 skúšali veľmi úspešne použitie H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ako činidla pre predúpravu odpadových celulóзовých vlákien (krátké vlákna, ktoré sú odpadom v papierenskom procese). Bez tejto predúpravy materiálu dosahoval stupeň degradácie po 48 hodinách len 14 %. Po optimalizácii použitej koncentrácie kyseliny a použitých podmienok predúpravy boli dosahované 80 - 85 % výťažky následnej enzymatickej hydrolýzy s použitím 0,25 %

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pri 20 °C počas 30 minút. Autori doporučujú použiť v kombinácii s H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2 % HNO<sub>3</sub> a NaOH [41]

### 7.1.3.3 Alkalickej hydrolýza

Účinnosť alkalickej hydrolýzy ako predúpravného procesu je závislá od obsahu lignínu v materiáli. [5] Pri alkalickej hydrolýze sa používajú sodné, draselné, vápenaté a amonné hydroxidy. [42]

Mechanizmus účinku alkalickej hydrolýzy súvisí so zmydelnením intramolekulárnych esterických väzieb viažucich sa na xylany hemicelulóz a ďalšie komponenty ako lignín a iné časti hemicelulóz. Použitím NaOH na tvrdé drevo bol znížený obsah lignínu v tomto dreve z 24 – 55% na 20 %. Táto metóda predúpravy bola efektívna pri použití na slamu s nízkym obsahom lignínu (10 – 18 %) ale pri použití tejto predúpravy na mäkké drevo s obsahom lignínu viac ako 26 % nebol pozorovaný žiadny pozitívny efekt. [5]

Použitie Ca(OH)<sub>2</sub> bolo tiež intenzívne študované. Jeho použitie na kukuričnú slamu a topoľové drevo je vhodné pri teplotách 85 – 150 °C počas 3 – 13 hodín. Jeho výhodou sú nízke nároky na bezpečnosť a nízke výdavky v porovnaní s NaOH a KOH a taktiež môže byť ľahko opätovne získaný z hydrolyzáta reakciou s CO<sub>2</sub>. [42]

### 7.1.3.4 Oxidatívna delignifikácia

Biodegradácia lignínu môže byť katalyzovaná peroxidázou za prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Pri použití tejto metódy na bagázu (odpad z cukrovej trstiny) bolo v podmienkach 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pri 30 °C počas 8 hodín solubilizovaných cez 50 % lignínu a následne bola dosiahnutá 95 % účinnosť produkcie glukózy z celulózy. [5]

## 7.1.4 Biologická predúprava

V procesoch biologickej predúpravy materiálu sú používané vláknité huby so schopnosťou degradovať lignín a hemicelulózy ako sú napr. *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete sordida*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Cyathus stercoreus*, *Penicillium chrysosporium* a ďalšie. Výhody biologického predčistenia sú nízke energetické nároky a mierne podmienky procesu. Avšak miera účinnosti takéhoto procesu predčistenia je veľmi nízka. [5]

## 7.2 Hydrolýza predupraveného lignocelulózového materiálu a proces fermentácie

### 7.2.1 Fed-batch proces

Cena glukózy, ktorá je vyprodukovaná z odpadovej papieroviny je značne závislá na cene enzýmového preparátu a preto je nutné optimalizovať podmienky hydrolýzy a zvoliť najvhodnejší typ hydrolýzy pre čo najväčšie využitie použitých enzýmov. Pre maximalizáciu využitia enzýmov sa v zásade používajú tieto dva prístupy: [43]

Prvým prístupom je zaradenie kroku pre opätovné získanie enzýmov na konci každého hydrolýzného procesu. Znovu získané enzýmy môžu byť opätovne použité na hydrolýzu novej dávky substrátu. [43]

Druhý prístup predpokladá periodické pridávanie substrátu počas fed-batch hydrolýzného procesu. Podľa odborných zdrojov je tento prístup efektívnejší a jeho použitie v praxi je jednoduchšie. [43]

Použitie techniky fed-batch umožňuje znížiť spotrebu enzýmov na gram substrátu v porovnaní s batch procesom. Produktivita je porovnateľná pre obe techniky hydrolýzy, ale dosahované hodnoty koncentrácií redukujúcich sacharidov na konci procesu sú zreteľne vyššie u fed-batch procesu než s použitím batch procesu, čo je výhodné pre proces fermentácie. [43]

### 7.2.2 SSF – simultánna sacharifikácia a fermentácia

Ďalšou možnosťou je spojenie kroku enzymatickej hydrolýzy s fermentáciou do jedného kroku. Metódou využívajúcou tento princíp je SSF - simultaneous saccharification and fermentation – simultánna sacharifikácia a fermentácia. V prípade klasickej fermentačnej metódy nasleduje kvasenie až po scukrení východzieho polysacharidu, ktoré prebieha za optimálnych podmienok pre činnosť enzýmov. Pri použití SSF prebiehajú oba procesy súčasne. [19]

Nevýhodou tejto metódy je nutná voľba podmienok, ktoré sú kompromisom medzi optimálnymi podmienkami pre hydrolýzu a optimálnymi podmienkami pre činnosť MO. Rozdiel je najmä v teplote optimálnej pre proces hydrolýzy (45 – 50 °C) a teplote vhodnej pre fermentáciu (28 – 35 °C). Volebná teplota pre SSF je teda nižšia, než teplota optimálna pre činnosť enzýmov. [19]

Dôležitá je tiež voľba fermentujúceho mikroorganizmu. Vhodný mikroorganizmus by mal byť schopný fermentovať široké spektrum sacharidov, pretože hydrolýzou odpadového papiera vznikajú v menšej miere aj iné sacharidy ako glukóza a celobióza, napr. xylolóza a arabinóza. MO taktiež nesmie produkovať do extracelulárneho prostredia proteolytické enzýmy a degradovať tak v suspenzii prítomné celulózy. Taktiež by mal MO vykazovať odolnosť voči etanolu a prítomným toxickým látkam, ktoré by mohli zostať v surovine po procese predúpravy. [19]

Metóda SSF podľa výsledkov poskytuje vyššiu výťažnosť etanolu až o 40 % pre lignocelulóзовé materiály odstránením inhibície konečným produktom scukrenia a eliminovaním potreby oddelených reaktorov pre sacharifikáciu a hydrolýzu. Ďalšou výhodou je znížená možnosť kontaminácie externou mikroflórou z dôvodu vysokej použitej teploty (35 – 38 °C), prítomnosti etanolu v médiu a anaeróbnych podmienok. [19]

## 8 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 8.1 Materiál a metódy

#### 8.1.1 Zoznam použitých prístrojov, chemikálií, softwaru a substrátov

##### 8.1.1.1 Použité prístroje

trepáčka Heidolph UNIMAX 1010 DT  
trepáčka Heidolph PROMAX 1020  
inkubátor Heidolph INKUBATOR 1000 heizmodul  
spektrofotometer Helios Epsilon  
centrifúga eppendorf Centrifuge 5417 R  
Laboratórny pH/mV meter inoLab<sup>®</sup> pH 720  
mixér / homogenizátor ETA 1.012  
mixér / homogenizátor Rohson MultiDuo R-536  
váhy SCALTEC SAS 50  
vortex Heidolph REAX top  
váhy HELAGO AND EK – 300i  
váhy OHAUS Pioneer<sup>™</sup>  
HANNA Combo pH & EC meter  
muflová pec VEB ELEKTRO BAD FRANKENHAUSEN

##### 8.1.1.2 Použité chemikálie

D – glukosa bezvodá p.a.  $C_6H_{12}O_6$ ,  $M = 180,16 \text{ g/mol}$   
octan sodný bezvodý p.a., Lach – Ner, s.r.o.,  $C_2H_3NaO$ ,  $M = 82,04 \text{ g/mol}$   
kyselina octová 99 % p.a., Lachema a.s.,  $CH_3COOH$ ,  $M = 60,05 \text{ g/mol}$   
hydrogén fosforečnan sodný (dodekahydrát), Lachema a.s.,  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ ,  
 $M = 358,14 \text{ g/mol}$   
molybdenan amonný tetrahydrát čistý, Lachema o.p.,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$ ,  
 $M = 1235,86 \text{ g/mol}$   
uhličitan sodný bezvodý p.a., Lachema o.p.,  $Na_2CO_3$ ,  $M = 105,99 \text{ g/mol}$   
hydrogénuhličitan sodný p.a., Lachema a.s.,  $NaHCO_3$ ,  $M = 84,01 \text{ g/mol}$   
vinan draselno – sodný tetrahydrát p.a., Lachema a.s.,  $C_4H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$ ,  
 $M = 282,23 \text{ g/mol}$   
síran meďnatý kryst., Spolek pro chemickou a hutní výrobu,  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ,  
 $M = 249,69 \text{ g/mol}$   
síran sodný bezvodý p.a., Lach – Ner, s.r.o.,  $Na_2SO_4$ ,  $M = 142,04 \text{ g/mol}$   
hydroxid sodný čistý, Lach – Ner, s.r.o.,  $NaOH$ ,  $M = 40,00 \text{ g/mol}$   
hydrogénarzeničnan disodný heptahydrát čistý,  $Na_2HAsO_4 \cdot 7 H_2O$ ,  $M = 312,014 \text{ g/mol}$   
fosforečnan sodný stredný čistý dodekahydrát, Lachema o.p.  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ ,  
 $M = 358,157 \text{ g/mol}$   
kyselina jantárová čistá, Lachema o.p.  $C_4H_6O_4$ ,  $M = 118,09 \text{ g/mol}$   
kyselina sírová koncentrovaná čistá, Lachema a.s.,  $H_2SO_4$ ,  $M = 98,079 \text{ g/mol}$   
kyselina citrónová monohydrát p.a., Lach – Ner, s.r.o.,  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ,  $M = 210,14 \text{ g/mol}$   
citrán sodný dihydrát neutr., Spolek pro chemickou a hutní výrobu,  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2 H_2O$ ,

M = 294,101 g/mol  
azid sodný p.a., Fluka chemic AG, N<sub>3</sub>Na, M = 65,01 g/mol

### 8.1.1.3 Použitý software

Microsoft Excel 2003  
Microsoft Word 2003  
Adobe Photoshop CS4

### 8.1.1.4 Použité substráty

Filtračný papier – Watman

Buničina (Celulóza pro nitraci, Šarže: 1502090210 - Pulp for production of dynamite; obsah celulózy min. 92 %, obsah vody max. 8 %, obsah popola max. 0,15 %) \*  
ofset kartón \*\*

Cyclus ofset - recyklovany papier (bez potlače) \*\*

Cyclus ofset - recyklovany papier s potlačou cca 10 % plochy \*\*

MYSol matný \*\*

lepenka vlnitá \*\*

\* poskytnutá firmou PENTA, Praha

\*\* jedná sa o odpadový materiál poskytnutý firmou Tlačiareň Brummer & Brummer, spol. s.r.o., Banská Bystrica

## 8.1.2 Použité enzýmy

### 8.1.2.1 Novozymes® Biomass Kit – NS50013 (celulázový komplex)

Celulázový preparát NS50013 katalyzuje rozklad celulózového materiálu na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy pričom hlavnými produktami reakcie sú celobióza a glukóza. Doporučuje sa preparát NS50013 kombinovať s preparátom NS50010 pre maximalizáciu výkonu. [44]

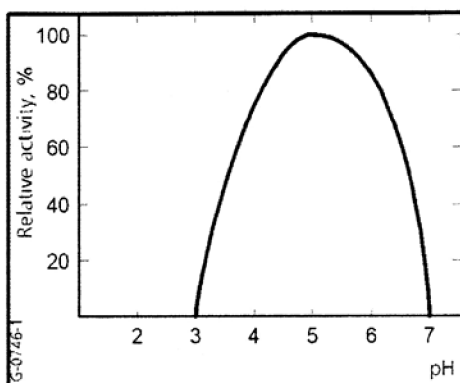
**Tab. č. 8:** Enzymová aktivita preparátu NS50013, doporučené pH, teplota a dávkovanie [44]

enzým	aktivita <sup>1</sup>	hustota <sup>2</sup> (g/ml)	pH (1)	teplota (°C)	dávkovanie % 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

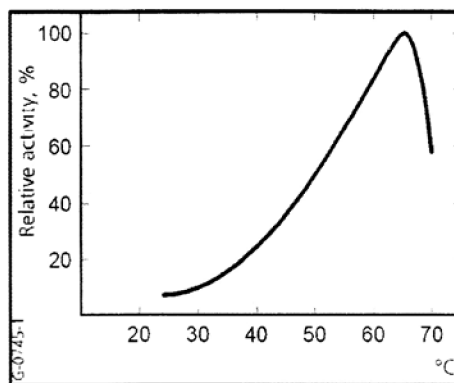
2 – hodnota hustoty je približná

3 – dávkovanie je závislé od typu suroviny, použitej predúpravy suroviny a ďalších podmienok spracovania, preto nutné dávkovanie môže byť značne variabilné



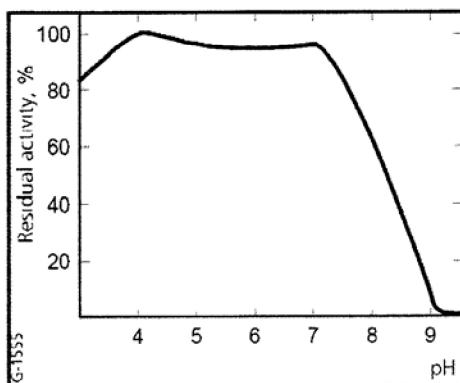
**Fig. 1. Influence of pH on the activity of NS50013.**

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



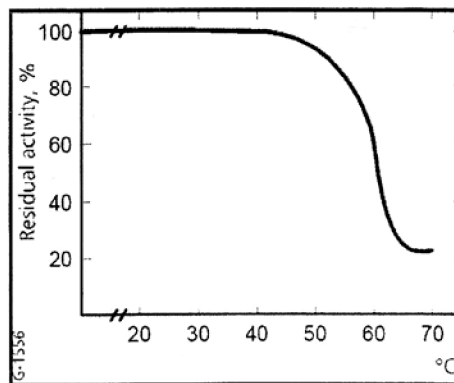
**Fig. 2. Influence of temperature on the activity of NS50013.**

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:	Mclvaine



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

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

**Grafy č. 3, 4, 5 a 6:** Vplyv pH a teploty na aktivitu a stabilitu preparátu NS50013 (celulázového komplexu) [44]

### 8.1.2.2 *Novozymes® Biomass Kit – NS50010 (β-glukozidáza)*

β - glukozidázový preparát hydrolyzuje celobiózu na glukózu. Doporučený prídavok preparátu NS50010 je 5 – 10 % (v/v) množstva enzýmového preparátu NS50013 pre kompletnú hydrolyzu dostupnej celulózy. [44]



**Tab. č. 9:** Enzymová aktivita preparátu NS50010, doporučené pH, teplota a dávkovanie [44]

enzým	aktivita <sup>1</sup>	hustota <sup>2</sup> (g/ml)	pH (1)	teplota (°C)	dávkovanie % 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 závislé od typu suroviny, použitej predúpravy suroviny a ďalších podmienok spracovania, preto nutné dávkovanie môže byť značne variabilné

### 8.1.3 Príprava roztokov

#### 8.1.3.1 Somogyiho činidlá

- **Somogyi I – 800 ml:**

12 g  $C_2H_4O_6KNa \cdot 4H_2O$ , 16 g  $NaHCO_3$  a 18 g  $Na_2CO_3$  sa nechá rozpustiť v 200 ml destil. vody. 144 g  $Na_2SO_4$  (bezvodý) sa pomaly pridáva za stáleho miešania do 600 ml teplej destilovanej vody. Po rozpustení všetkých látok sa roztoky následne zmiešajú

- **Somogyi II – 200 ml:**

4 g  $CuSO_4$ , 36 g  $Na_2SO_4$  (bezvodý) sa rozpustí v 200 ml destilovanej vody

- **Nelson roztok III – 496 ml:**

25 g  $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$  sa rozpustí v 460 ml destilovanej vody. 3 g  $Na_2HAsO_4 \cdot 7 H_2O$  sa rozpustia v 25 ml destilovanej vody a pomaly sa pridáva 21 ml koncentrovanej  $H_2SO_4$ . Oba roztoky sa zmiešajú a dajú temperovať 48 hod. v termostate pri 38 °C.

#### 8.1.3.2 25 % roztok $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ ( $M = 249,68$ g/mol):

6,24 g  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  sa nechá rozpustiť v 100 ml destilovanej vody

#### 8.1.3.3 10 mol/l roztok NaOH ( $M = 40$ g/mol):

40 g NaOH sa nechá rozpustiť v 100 ml destilovanej vody

#### 8.1.3.4 roztok albumínu o koncentrácii 4 mg/ml:

40 mg albumínu sa nechá rozpustiť v 10 ml destilovanej vody

#### 8.1.3.5 Príprava tlmivých roztokov

Vypočítali sa návažky jednotlivých solí pre cieľový objem a požadované molarity tlmivých roztokov. Navážené soli sa rozpustili v 60 % cieľovom objeme destilovanej vody. Pripravili sa 0,4 M roztoky jednotlivých kyselín. Roztoky požadovaných molarít solí sa temperovali na požadovanú teplotu enzymatickej reakcie a boli titrované na požadované pH roztokmi kyselín. Roztoky sa doplnili na požadované objemy destilovanou vodou. Pred použitím sa pripravené roztoky tlmivých roztokov uchovávali v chlade pri 4 °C.

#### 8.1.4 Predúprava lignocelulózového materiálu

Pred samotnou hydrolýzou je nutné materiál predupraviť pre zlepšenie dostupnosti celulózy pre celulázový enzymatický komplex.

Bola použitá fyzikálna predúprava surovín mechanickým rozmelňovaním mletím nasledujúcim postupom. Papier (resp. buničina) bola predmletá vlhkým mletím s destilovanou vodou v homogenizátore / mixéri. Surovina bola sfiltrovaná a premytá destilovanou vodou. Filtračný koláč bol usušený pri 80 °C na tenkej vrstve v sušiarňi. Následne bol usušený materiál opätovne mletý nasucho v homogenizátore / mixéri pre dosiahnutie menšej veľkosti častíc. Ďalej boli použité rôzne kombinácie fyzikálnej predúpravy a chemickej predúpravy materiálu. Použité kombinácie predúpravy materiálu znázorňuje tabuľka č. 10.

**Tab. č. 10:** Použité kombinácie fyzikálnej a chemickej predúpravy materiálu

označenie predúpravy	fyzikálna predúprava	chemická predúprava č. 1	chemická predúprava č. 2
1	mletie	žiadna	žiadna
2	mletie	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	žiadna
3	mletie	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2 % HNO <sub>3</sub>
4	mletie	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	2 % NaOH

Pri použití kyslej predúpravy suroviny 0,25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> sa postupovalo nasledovne. Usušený a pomletý materiál (cca 5 % w/v) bol suspendovaný v 0,25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> do 300 ml Erlenmeyerových baniek a umiestnený na temperovanú trepačku pri 25 °C a 250 rpm počas 30 minút. Následne bola surovina sfiltrovaná a premytá destilovanou vodou. Filtračný koláč bol usušený pri 80 °C na tenkej vrstve v sušiarňi. Následne bol usušený materiál opätovne mletý nasucho v homogenizátore / mixéri.

Pri použití kombinovanej predúpravy č. 3 a 4 nebol filtračný koláč po úprave materiálu 0,25 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> usušený, ale resuspendoval sa v činidle (2 % HNO<sub>3</sub> pre predúpravu č. 3 a 2 % NaOH pre predúpravu č. 4) do 500 ml guľatej zábrusovej banky (cca 5 % w/v materiálu) a refluxoval sa 40 minút na topnom hniezde pri 100 °C. Následne bol pevný podiel sfiltrovaný, premytý 1 % roztokom NaOH v prípade predúpravy č. 3 a 1 % roztokom CH<sub>3</sub>COOH v prípade predúpravy č. 4. Následne bol materiál premytý viacnásobne destilovanou vodou do neutrálnej reakcie (kontrolované pH papierikmi). Filtračný koláč bol usušený pri 80 °C na tenkej vrstve v sušiarňi. Následne bol usušený materiál opätovne mletý nasucho v homogenizátore / mixéri.

#### 8.1.5 Základná kvantitatívna kompozičná analýza materiálu

Pre vyhodnotenie efektivity hydrolýzy jednotlivých druhov papiera a efektivity rôznych druhov predúprav materiálu bolo nutné vykonať aspoň základnú analýzu zloženia materiálu. V jednotlivých materiáloch po rôznych predúpravách boli analyzované obsah celulózy, popola a sušiny. Stanovenia obsahu sušiny a celulózy v materiáloch slúžili na vyhodnotenie výťažkov enzymatickej hydrolýzy a teda aj pre vyhodnotenie účinnosti predúpravy konkrétnych materiálov. Stanovenie popola má informatívny charakter, obsah popola podáva informácie najmä o obsahu plnidiel v materiáli. Použité postupy pre jednotlivé stanovenia sú nasledovné:

### 8.1.5.1 Stanovenie sušiny

Do suchého a predom zväženého kelímku sa navážil papier (resp. buničina) s presnosťou na 0,000 1 g. Kelímok sa umiestnil do sušiarne a sušil sa pri 105 °C minimálne 4 hodiny. Kelímok so vzorkom sa vybral zo sušiarne a nechal sa vychladnúť v exikátore. Vychladnutý kelímok sa zväžil na analytických váhach. Obsah sušiny sa vypočítal podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\%_{\text{sušina}} = \frac{(w_{\text{kelimok+vzorok}} - w_{\text{kelimok}})}{w_{\text{vzorok}}} \cdot 100$$

$w_{\text{kelimok+vzorok}}$  - hmotnosť kelímku so vzorkom po danej úprave

### 8.1.5.2 Stanovenie popola

Do vyžíhaného kelímka (aspoň 30 min. pri 550 °C) sa navážilo cca 2 g papiera (resp. 1 g u buničiny) s presnosťou na 0,000 1 g. Kelímok sa pomocou klieští držal nad kahanom dovtedy, kým materiál nevyhorel. Potom sa kelímok umiestnil do pece na min. 3 hodiny pri 550 °C. Kelímok sa následne vybral z pece, nechal sa vychladnúť v exikátore a zväžil sa na analytických váhach. Obsah popola sa vypočítal podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\%_{\text{popol}} = \frac{(w_{\text{kelimok+vzorok}} - w_{\text{kelimok}})}{w_{\text{vzorok}}} \cdot 100$$

$w_{\text{kelimok+vzorok}}$  - hmotnosť kelímku so vzorkom po danej úprave

### 8.1.5.3 Stanovenie celulózy [45]

Do 100 ml Erlenmayerovej banky sa navážilo približne 0,8 g vzorku s presnosťou 0,000 1 g. Pridalo sa 30 ml zmesi kyseliny octovej a kyseliny dusičnej (80 % kys. octová : konc. kys. dusičná = 10 : 1). Banka sa nechala 1 hodinu ponorená vo vriacom vodnom kúpeli a pre zníženie odparu bolo hrdlo banky prikryté malým filtračným lievikom. Potom bola celá suspenzia kvantitatívne prevedená pomocou stričky s ethanolom do napred zväzenej frity s veľkosťou pórov 15 μm (označenie frity S4) a zfiltrovaná. Frita s materiálom bola premytá ethanolom a umiestnená do sušiarne a minimálne 4 hod sušená pri 105 °C. Následne sa frita nechala vychladnúť v exikátore a zväžila sa. Vzorek sa vyjme z frity po zmočení ethanolom pomocou špachtle do 100 ml Erlenmayerovej banky a následne sa naleje do banky ešte malé množstvo ethanolu. Banka s ethanolom a vzorkom z frity sa umiestni do vriaceho vodného kúpeľa dovtedy, kým sa všetok ethanol neodparí. Následne sa do banky pridalo 20 ml 72 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a vzorek sa nechal sa 1 hodinu hydrolyzovať pri 30 °C v temperovanej trepačke za miernych otáčok (100 rpm). Potom sa zvyšok suspenzie previedol pomocou stričky s ethanolom do frity s veľkosťou pórov 30 μm (označenie frity S3) a zfiltroval sa. Frita so vzorkom sa usušila a zväžila ako v predchádzajúcom postupe. Obsah celulózy vo vzorku sa vypočítal podľa nasledujúcich vzťahov:

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

$$\%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}} = 100 - \left( \frac{(w_{\text{frita S3+vzorok}} - w_{\text{frita S3}})}{(w_{\text{frita S4+vzorok}} - w_{\text{frita S4}})} \cdot 100 \right)$$

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

### **8.1.6 Hrubá optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy**

Boli optimalizované nasledujúce parametre enzymatickej hydrolýzy: druh tlmivého roztoku, pH, teplota, koncentrácia suroviny, koncentrácia enzýmov a miešanie. Pri optimalizovaní jedného parametru sa menilo nastavenie tohto parametru a ostatné parametre hydrolýzy boli konštantné, pričom sa volili nastavenia už optimalizované. Ak ešte neboli nastavenia optimalizované, tak sa zvolila hodnota z doporučeného intervalu z manuálu poskytnutého k sade enzýmov. [44]

Z dôvodu veľkého množstva testovaných substrátov boli podmienky hydrolýzy optimalizované na modelových surovinách - filtračnom papieri a buničine. pH bolo optimalizované pre každú surovinu, pretože jednotlivé suspenzie odpadových papierov a modelových surovín vykazovali rôzne pH z dôvodu obsahu plnidiel a ďalších látok v materiáli. Pre lepenku s rôznymi predúpravami bol použitý skrátenejší test pH s nasledovným postupom:

Do 50 ml Erlenmeyerových baniek bol navážený suchý predupravený materiál s presnosťou na 0,01 g. Boli pripravené octanové tlmivé roztoky 0,05 M pH 4,0 a pH 4,5. Materiály (použitá koncentrácia 8 % w/v bola totožná s koncentráciou použitou pri hydrolýze) boli suspendované v tlmivých roztokoch, suspenzie sa nechala inkubovať 15 minút a následne bolo zmerané pH výluhu. Pomocou zmeraného pH bolo vyhodnotené vhodné pH tlmivého roztoku pre hydrolýzu.

Pre hrubú optimalizáciu podmienok enzymatickej hydrolýzy bol použitý nasledovný postup:

Suchý a pomletý materiál bol navážený s presnosťou na 0,01 g a umiestnený do 100 ml Erlenmeyerových baniek (všetky stanovenia boli vykonané trojmo). Boli pripravené tlmivé roztoky (postup vid'. odstavec 8.1.3.6). Tlmivé roztoky boli v požadovanom objeme pipetované nedelenou pipetou do Erlenmeyerových baniek s naváženým substrátom. Pre zabránenie mikrobiálnej kontaminácie počas procesu hydrolýzy boli Erlenmeyerove banky uzavreté zátkami z buničiny, obsah bol 10 minút povarený vo vriacom vodnom kúpeli a po vychladnutí bola suspenzia suplementovaná konzervačným činidlom azidom sodným (na výslednú koncentráciu azidu 0,02 % w/v). Erlenmeyerove banky boli 10 minút temperované pri požadovanej teplote v temperovanej trepačke a boli pridané enzýmy v požadovanom množstve. Bol poznačený čas začiatku hydrolýzy a v časových intervaloch (najčastejšie po 2, 4, 6, a 24 hodinách) boli vykonané odbery pre stanovenie RS.

### **8.1.7 Použitie pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu**

Bola testovaná možnosť použitia pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu nasledujúcim postupom:

Suchá a pomletá buničina bola navážená s presnosťou na 0,01 g a umiestnená do 100 ml Erlenmeyerových baniek (stanovenia boli vykonané trojmo). Boli pripravené dva octanové 0,05 M tlmivé roztoky o pH 4,5, jeden s použitím destilovanej vody a jeden s použitím prevarenej pitnej vody. Ďalej sa postupovalo obdobne ako pri optimalizácii podmienok enzymatickej hydrolýzy, ale bol vykonaný len odber pre stanovenie RS v 24 hodinách.

### **8.1.8 Enzymatická hydrolýza**

Po vykonaní hrubej optimalizácie podmienok hydrolýzy bolo prikrôčené k testovaniu modelových surovín – filtračného papiera a technickej buničiny a odpadových surovín ofsetového kartónu, lepenky, recyklovaného papiera v dvoch kvalitách (s potlačou a bez

potlače) a papiera MYsol matný ako substrátov pre enzymatickú hydrolýzu. Bol použitý Fed – batch proces. Postup pre hydrolýzu bol analogický ako pri optimalizácii podmienok hydrolýzy s tým rozdielom, že pokus trval 96 h a pre stanovenie RS boli vykonané odbery v časových intervaloch 2, 4, 6, 24, 48, 50, 52, 72, a 96 hodín. Na začiatku bol navážený substrát v koncentrácii 8 % w/v a v čase 48 hodín bola pridaná ďalšia dávka sterilizovaného substrátu (4 % w/v). Do jednej 100 ml Erlenmayerovej banky nebol navážený substrát ale napipetoval sa tlmivý roztok a táto banka slúžila na meranie odparu vody. Počas 96 hodín pokusu dochádzalo k merateľnému úbytku vody odparom. Voda nebola počas pokusu dopĺňaná ale s odparom vody sa počítalo pri vyhodnocovaní výsledkov.

Analogicky prebiehala enzymatická hydrolýza s rôznymi kombináciami predupravených materiálov.

### **8.1.9 Stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona**

Pre zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý základný roztok glukózy o koncentrácii 0,5 g/l. Z tohto roztoku bola pripravená riedením kalibračná rada glukózy s koncentráciami v jednotlivých vzorkoch: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40 g/l.

Do každej skúmavky bolo pipetovaných po 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v pomere 4:1) a následne 0,5 ml vzorku kalibračnej rady. Skúmavky boli 10 minút povarené vo vriacom vodnom kúpeli a následne ochladené na laboratórnu teplotu. Potom bolo do skúmaviek pridaných po 0,5 ml Nelsonovho roztoku - činidla III a po 3,5 ml destilovanej vody. Skúmavky boli dobre premiešané (zvortexované) a bola meraná absorbanca vzorkov na spektrofotometre proti blanku pri vlnovej dĺžke 530 nm. Blank obsahoval 0,5 ml destilovanej vody namiesto vzorku. Navážka glukózy pre základný roztok bola  $m_{\text{GLU}} = 0,5014 \text{ g}$  na 1 liter roztoku.

### **8.1.10 Stanovenie redukujúcich sacharidov (RS) metódou podľa Somogyiho a Nelsona**

Očakávané produkty hydrolýzy tvoria glukóza, celobióza, a minoritné sacharidy ako xylulóza a arabinóza. Všetky tieto sacharidy sú sacharidy redukujúce. Preto je možné použiť stanovenie redukujúcich sacharidov metódou podľa Somogyiho a Nelsona na stanovenie celkového produktu hydrolýzy. Pre stanovenie redukujúcich sacharidov metódou podľa Somogyiho a Nelsona bol použitý nasledujúci postup:

Pri každom odbere bolo odpipetovaných 0,5 ml z každého vzorku do 2 ml Eppendorfiiek. Vzorky boli okamžite povarené na vriacom vodnom kúpeli po dobu 5 minút pre ukončenie reakcie (denaturácia enzýmov). Následne boli vzorky centrifugované (8000 rpm po dobu 5 minút) pre odstránenie pevného podielu.

Do každej skúmavky bolo pipetovaných po 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v pomere 4:1) a následne 0,5 ml 100-krát (resp. 200-krát alebo 400-krát) zriedeného supernatantu. Skúmavky boli 10 minút povarené vo vriacom vodnom kúpeli a následne ochladené na laboratórnu teplotu. Potom bolo do skúmaviek pridaných po 0,5 ml Nelsonovho roztoku - činidla III a po 3,5 ml destilovanej vody. Skúmavky boli dobre premiešané (zvortexované) a bola zmeraná absorbanca vzorkov na spektrofotometre proti blanku pri vlnovej dĺžke 530 nm. Blank obsahoval 0,5 ml destilovanej vody namiesto vzorku. Množstvo redukujúcich sacharidov prítomných vo vzorku bolo vypočítané z rovnice regresnej priamky získanej z kalibračnej krivky glukózy.

### 8.1.11 Stanovenie kalibračnej krivky bielkovín pri 550 nm

Pre zostrojenie kalibračnej krivky bielkovín bol použitý základný roztok albumínu o koncentrácii 4 mg/ml. Z tohto roztoku bola pripravená kalibračná rada albumínu s koncentráciami v jednotlivých vzorkoch: 1,6; 3,2; 4,8; 6,4; 8,0; 16,0 mg/ml podľa tabuľky č. 12. Skúmavky boli 10 minút povarené vo vriacom vodnom kúpeli a následne ochladené na laboratórnu teplotu. Potom k nim bolo pridaných 0,25 ml 25 % roztoku  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , obsah skúmaviek bol premiešaný a následne sfiltrovaný. Absorbancia bola meraná na spektrofotometre proti blanku pri 550 nm. Blank obsahoval namiesto vzorku 0,5 ml destilovanej vody.

### 8.1.12 Stanovenie rozpustných bielkovín

Pre stanovenie obsahu bielkovín pri 550 nm v jednotlivých použitých enzýmových preparátoch bol použitý nasledovný postup:

Do skúmaviek bolo napipetovaných po 0,5 ml 10 M NaOH a 3,8 ml destilovanej vody. Následne bolo pridaných 0,2 ml vzorku. Skúmavky boli 10 minút povarené vo vriacom vodnom kúpeli a následne ochladené na laboratórnu teplotu. Potom k nim bolo pridaných 0,25 ml 25 % roztoku  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ , obsah skúmaviek bol premiešaný a následne zfiltrovaný. Absorbancia bola meraná na spektrofotometre proti blanku pri 550 nm.

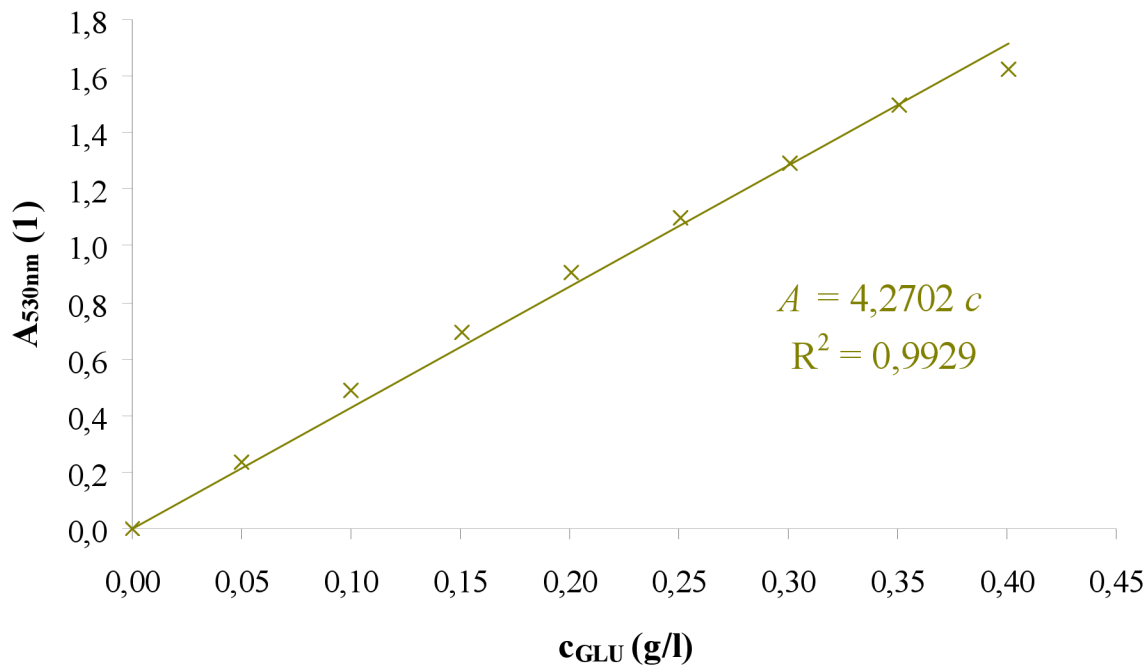
## 9 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 9.1.1 Stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona

**Tab. č. 11:** Príprava kalibračnej rady roztokov pre stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona

$V_{\text{voda}}$ (ml)	$V_{\text{st}}$ (ml)	$c_{\text{GLU}}$ (g/l)	$c_{\text{GLU}}$ skutočná (g/l)	$A_{530\text{nm}}$ (l)	
10	0	0,00	0,000 0	0,000	
9	1	0,05	0,050 1	0,235	
8	2	0,10	0,100 3	0,492	
7	3	0,15	0,150 4	0,692	
6	4	0,20	0,200 6	0,907	
5	5	0,25	0,250 7	1,099	
4	6	0,30	0,300 8	1,292	
3	7	0,35	0,351 0	1,500	0,750*
2	8	0,40	0,401 1	1,626	0,813*
1	9	0,45	0,451 3	1,678	0,839*
0	10	0,50	0,501 4	1,624	0,812*

\* hodnoty absorbancií pre 2-násobné riedenie vzorkov



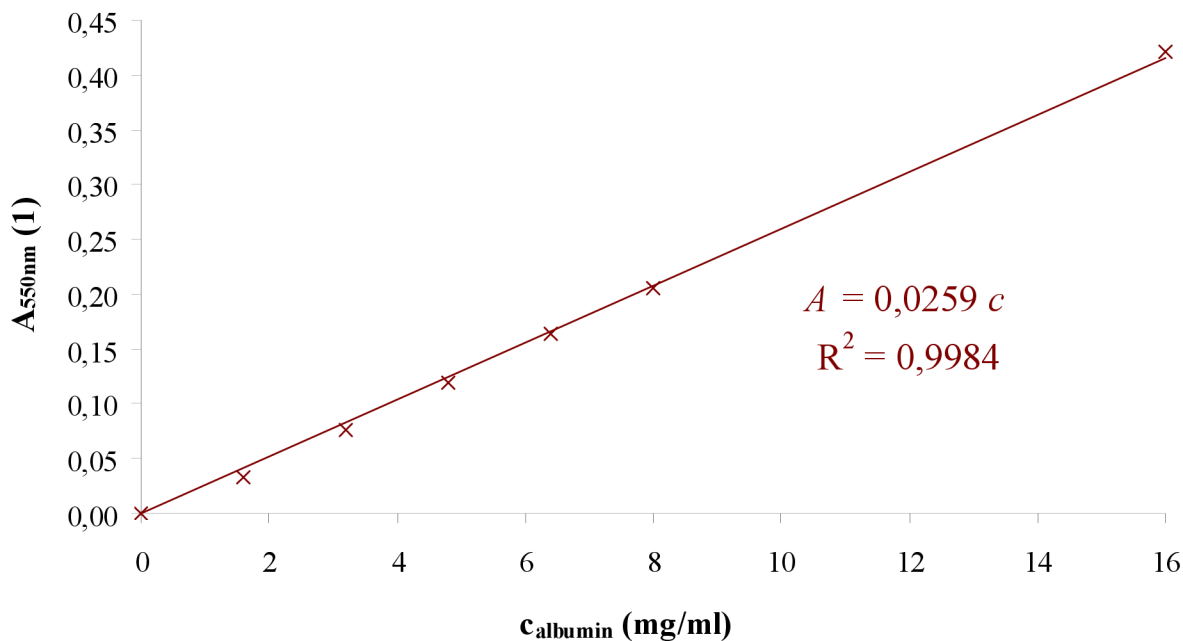
**Graf č. 7:** Stanovenie kalibračnej krivky glukózy metódou podľa Somogyiho a Nelsona

Bola stanovená rovnica kalibračnej krivky glukózy, ktorá má tvar :  $A = 4,2702 c$  nutná k stanoveniam RS metódou podľa Somogyiho a Nelsona.

### 9.1.2 Stanovenie kalibračnej krivky bielkovín pri 550 nm

**Tab. č. 12:** Zostrojenie kalibračnej krivky albumínu pri 550 nm

skúmavka č.	1	2	3	4	5	6	blank
V <sub>albumín</sub> (ml)	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	4,0	0,0
V <sub>voda</sub> (ml)	3,6	3,2	2,8	2,4	2,0	0,0	4,0
V <sub>10 M NaOH</sub> (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
c <sub>albumín</sub> (mg/ml)	1,6	3,2	4,8	6,4	8,0	16,0	0,0



**Graf č. 8:** Kalibračná krivka albumínu pre stanovenie bielkovín pri 550 nm

Bola stanovená rovnica kalibračnej krivky albumínu pri 550 nm, ktorá má tvar :  $A = 0,0259 c$  nutná k stanoveniu obsahu bielkovín v enzýmových preparátoch NS50013 a NS50010.

### 9.1.3 Stanovenie rozpustných bielkovín

Bolo stanovené množstvo rozpustných bielkovín v enzýmových preparátoch NS50013 (celulázový komplex) a NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza) nutné pre výpočet špecifickej hodnoty aktivity enzýmov. Množstvo rozpustných bielkovín v preparáte NS50013 (celulázový komplex) bolo  $136 \pm 20$  mg / ml a v preparáte NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza)  $52 \pm 22$  mg / ml.

**Tab. č. 13:** Stanovenie rozpustných bielkovín v preparáte NS50013 (celulázový komplex) – výsledky

vzorok č.	A <sub>550nm</sub> (1)	riedenie	c (mg/ml)	c <sub>priemer</sub> (mg/ml)	smerodat. odchýlka	IS
1	0,276	15	159,8	136,3	17,2	19,5
2	0,206	15	119,3			
3	0,224	15	129,7			



**Tab. č. 14:** Stanovenie rozpustných bielkovín v preparáte NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza) – výsledky

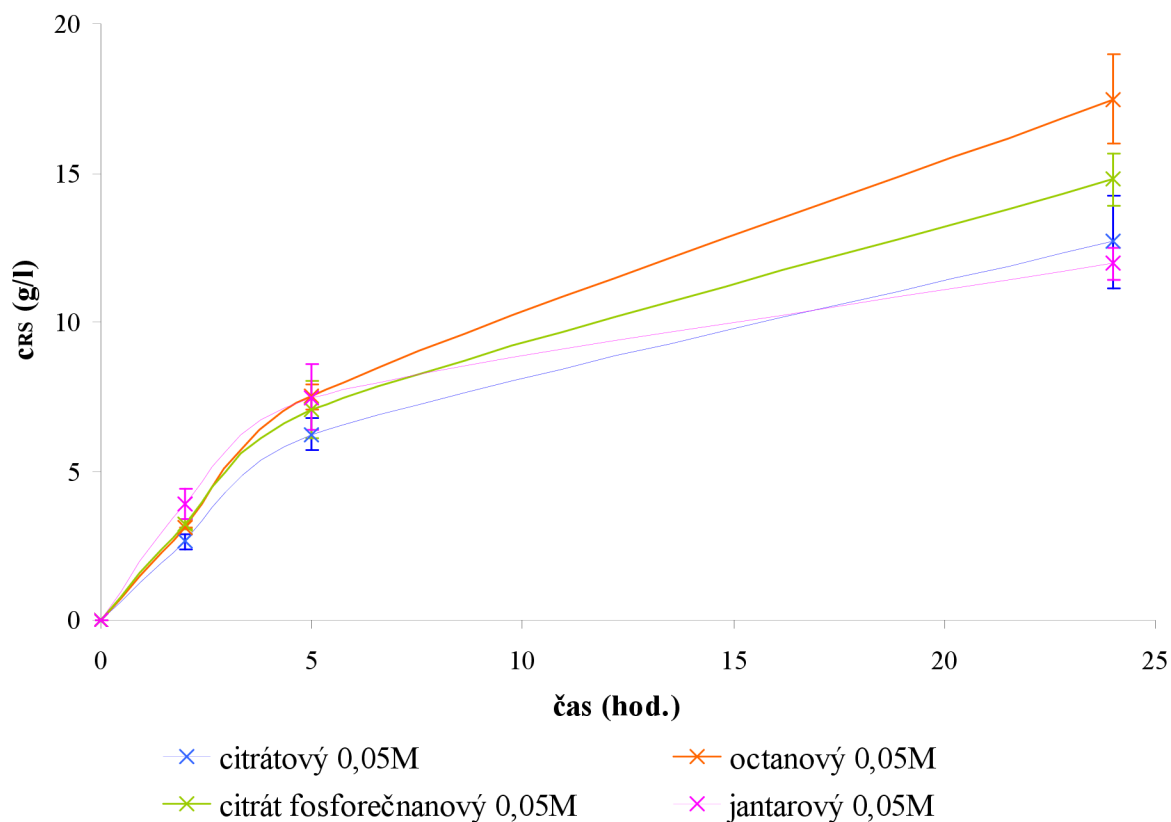
vzorok č.	$A_{550\text{nm}}$ (1)	riedenie	c (mg/ml)	$c_{\text{priemer}}$ (mg/ml)	smerodat. odchýlka	IS
1	0,065	15	37,6	51,7	19,1	21,6
2	0,067	15	38,8			
3	0,136	15	78,8			

#### 9.1.4 Hrubá optimalizácia podmienok enzymatickej hydrolýzy

##### 9.1.4.1 Optimalizácia tlmivých roztokov

**Tab. č. 15:** Podmienky použité pri optimalizácii tlmivých roztokov

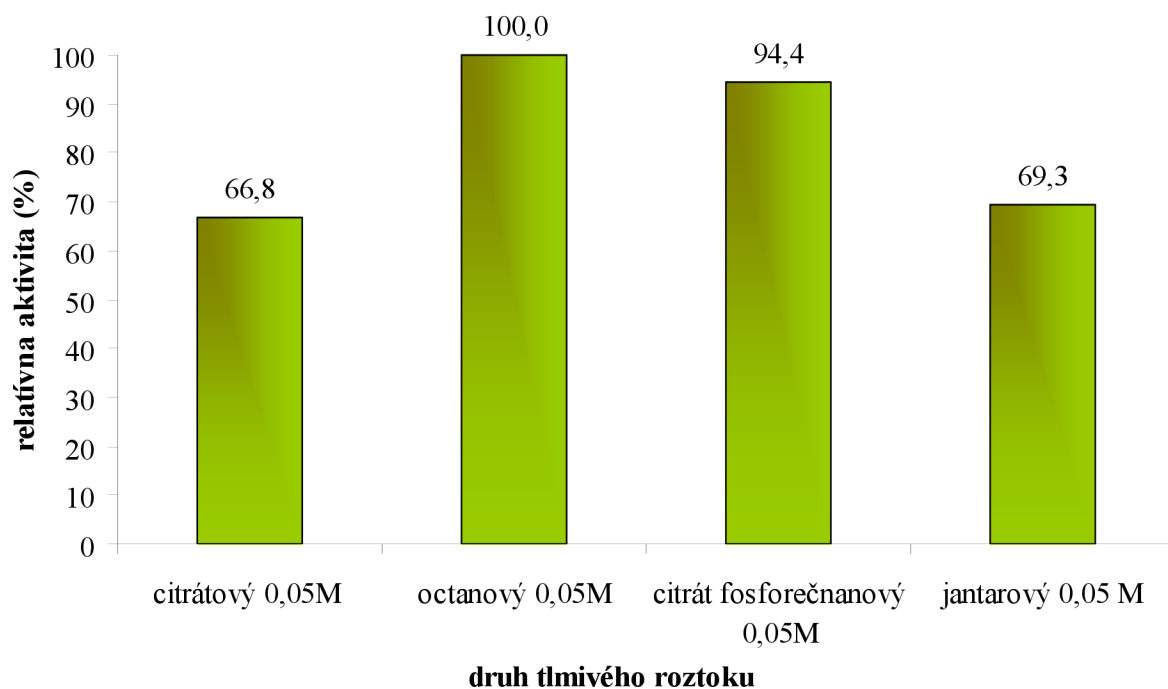
substrát	$c_s$ (% w/v)	$m_{\text{substrát}}$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celulolyt. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	miešanie (rpm)	pH
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu\text{l}$ )	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu\text{l}$ )			
filtračný papier	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	45	192	5,0



**Graf č. 9:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôznych tlmivých roztokov

**Tab. č. 16:** Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov

tlmivý roztok	$c_{RS} / 24$ h (g/l)	V (ml)	$m_{RS}$ (g)	$n_{GLU}$ (mol)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
citrátový 0,05M	14,10	39	0,43	2,41E-03	27,93	1,85	66,8
octanový 0,05M	11,15	39	0,65	3,61E-03	41,83	2,77	100,0
citrát fosforečnanový 0,05M	15,76	39	0,61	3,41E-03	39,49	2,62	94,4
jantarový 0,05 M	11,57	39	0,45	2,50E-03	28,99	1,92	69,3



**Graf č. 10:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na druhu tlmivého roztoku (substrát - filtračný papier)

Pre optimalizáciu tlmivého roztoku boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 15. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat (aktivitu 1 katal má také množstvo enzýmu, ktoré premení 1 mol substrátu za 1 sekundu) a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmu pri použití rôznych tlmivých roztokov. Tieto aktivity slúžili ako podklad pre vyjadrenie relatívnych aktivít v %, ktoré boli kľúčovým faktorom pre porovnanie účinnosti hydrolýzy s použitím rôznych tlmivých roztokov. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 16.

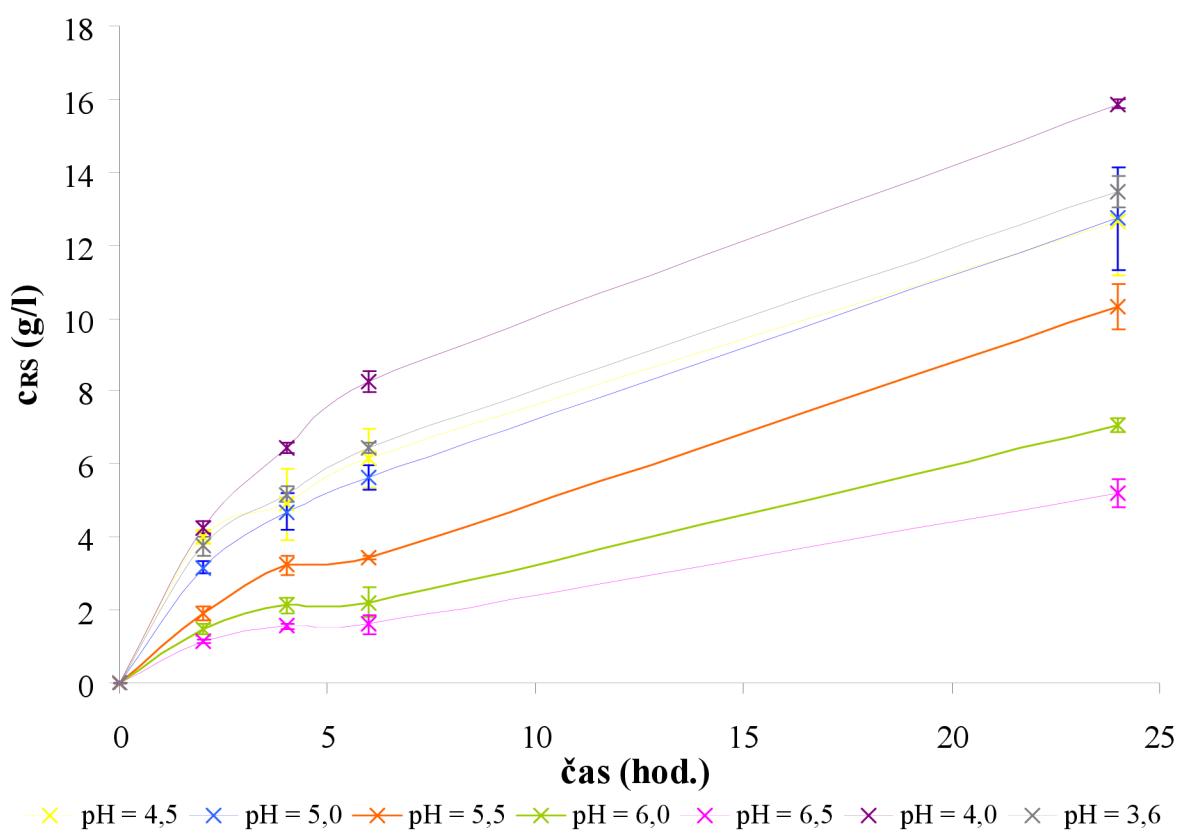
Podľa výsledkov sa pre hydrolýzu javí najlepšie použitie octanového tlmivého roztoku (špecifická aktivita enzýmov 2,77 nkat/mg) a citrát fosforečnanového tlmivého roztoku (špecifická aktivita enzýmov 2,62 nkat/mg, relatívna aktivita 94,4 %) vid' graf č. 10. Menej vhodné je použitie citrátového a jantárového tlmivého roztoku (špecifické aktivity 1,85 nkat/mg a 1,92 nkat/mg a prislúchajúce relatívne aktivity 66,8 % a 69,3 %).

Po vyhodnotení výsledkov bol pre všetky ďalšie experimenty používaný octanový tlmivý roztok pre udržiavanie požadovaného pH.

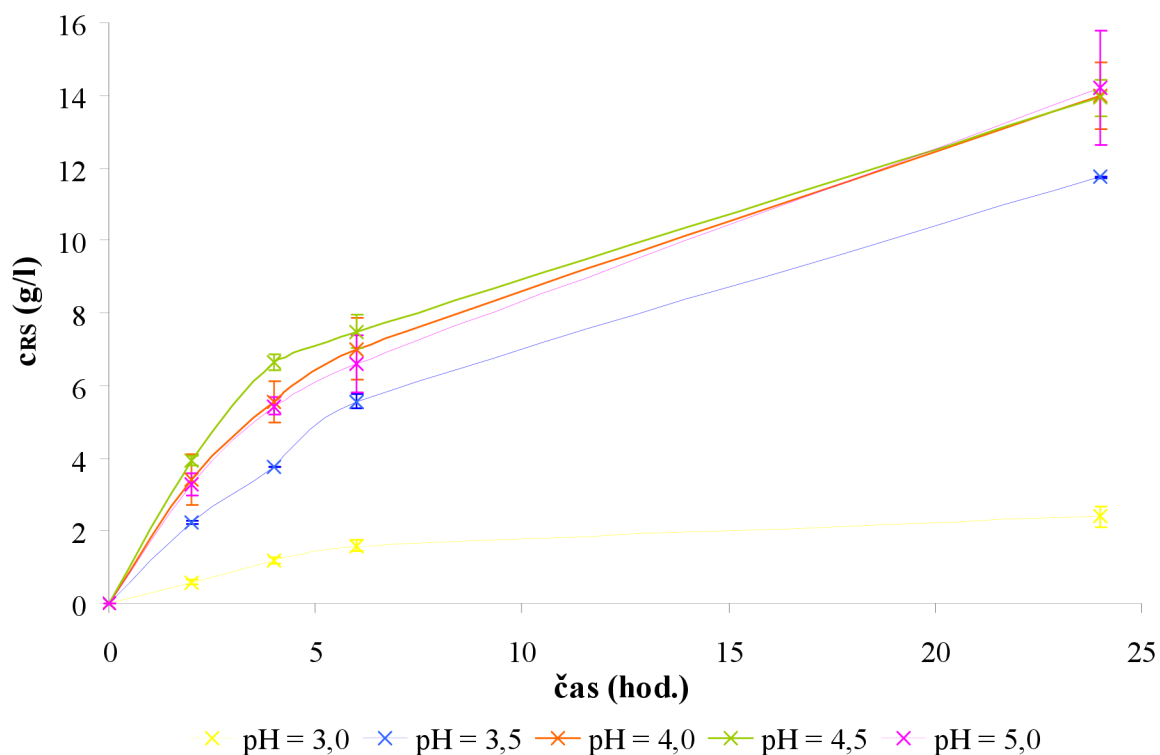
### 9.1.4.2 Optimalizácia pH – substrát filtračný papier a buničina

**Tab. č. 17:** Podmienky použité pri optimalizácii pH tlmivého roztoku – substrát filtračný papier a buničina

substrát	$c_s$ (% w/v na TS)	$m_{\text{substrát}}$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	miešanie (rpm)	tlmivý roztok
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzy m}}$ ( $\mu\text{l}$ )	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzym}}$ ( $\mu\text{l}$ )			
filtračný papier	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	45	192	octanový 0,05M
buničina	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	50	194	citrátový 0,05M



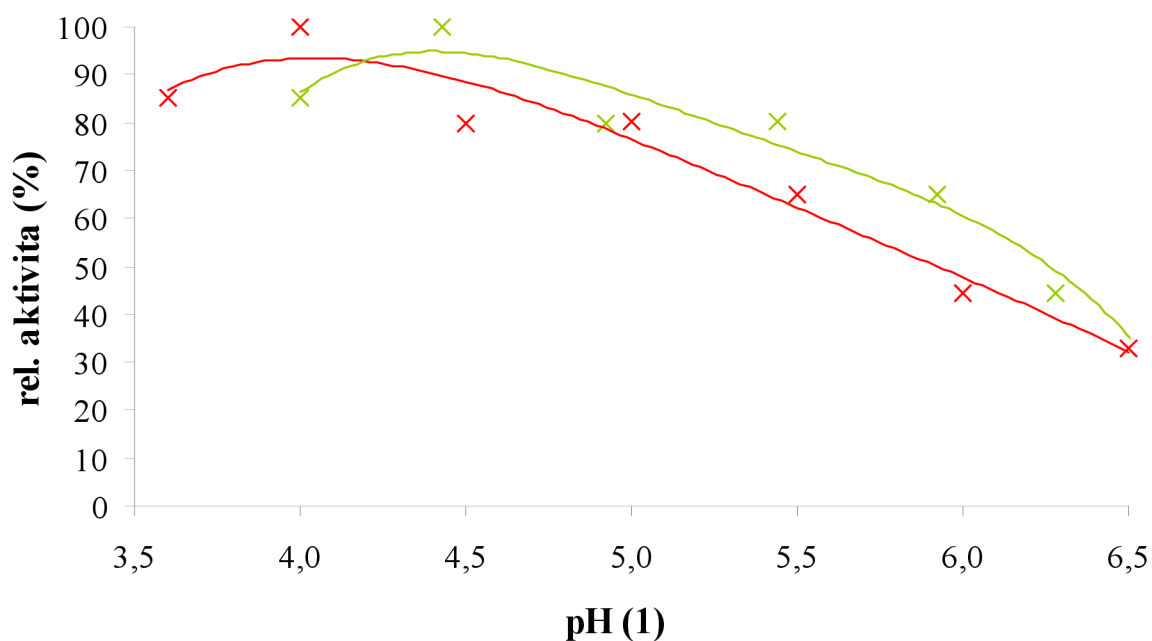
**Graf č. 11:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolyzy pri použití rôzneho pH tlmivých roztokov – substrát filtračný papier



**Graf č. 12:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôzneho pH tlmivých roztokov – substrát buničina

**Tab. č. 18:** Výsledky optimalizácie pH tlmivých roztokov – substrát filtračný papier

pH <sub>pufri</sub> (l)	pH <sub>výluh</sub> (l)	c <sub>RS</sub> (g/l) / 24 h	V (ml)	m <sub>RS</sub> (g)	n <sub>GLU</sub> (mol)	v <sub>0</sub> (mol/s = kat)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
3,60	4,00	13,47	38,5	0,52	2,88E-03	1,77E-07	33,32	2,21	85,0
4,00	4,43	15,85	38,5	0,61	3,39E-03	1,82E-07	39,21	2,60	100,0
4,50	4,92	12,65	38,5	0,49	2,70E-03	2,08E-07	31,30	2,07	79,8
5,00	5,44	12,73	38,5	0,49	2,72E-03	1,35E-07	31,49	2,09	80,3
5,50	5,92	10,30	38,5	0,40	2,20E-03	6,31E-08	25,49	1,69	65,0
6,00	6,28	7,05	38,5	0,27	1,51E-03	6,25E-08	17,43	1,16	44,5
6,50	6,56	5,21	38,5	0,20	1,11E-03	5,00E-08	12,90	0,85	32,9

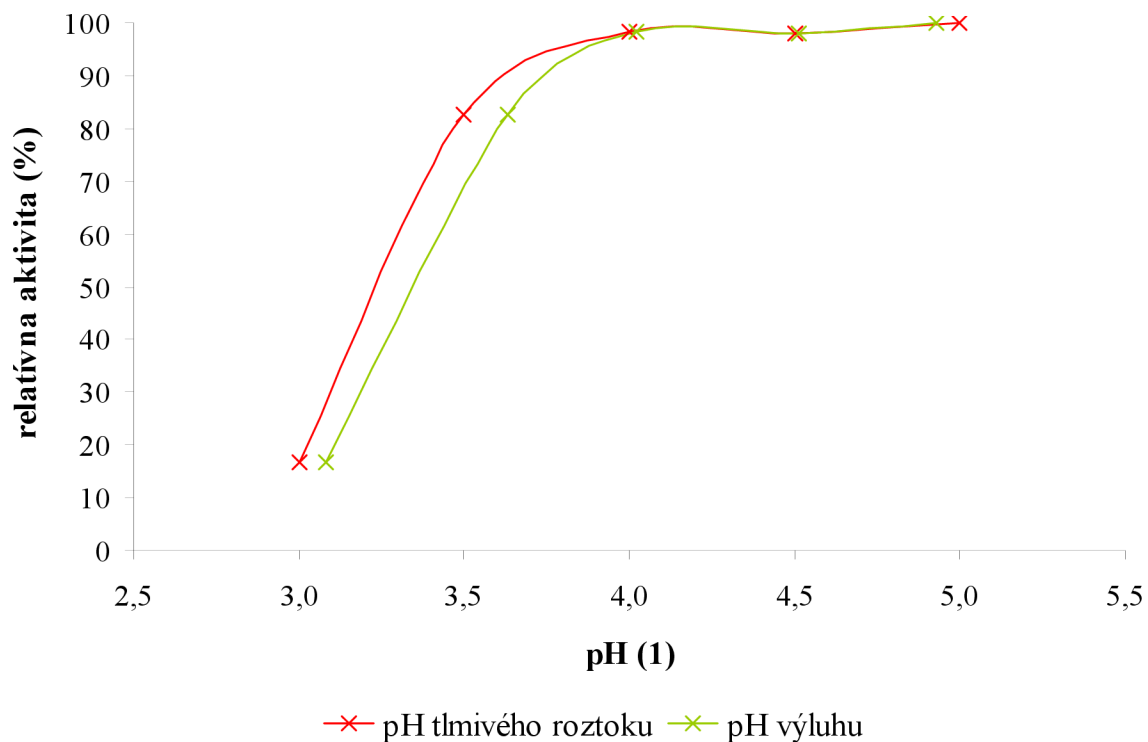


x pH tlmivého roztoku    x pH výluhu    — pH tlmivého roztoku    — pH výluhu

**Graf č. 13:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na pH tlmivých roztokov a pH výluhu (substrát - filtračný papier)

**Tab. č. 19:** Výsledky optimalizácie pH tlmivých roztokov – substrát buničina

pH <sub>pufr</sub>	pH <sub>výluh</sub>	c <sub>RS</sub> (g/l) / 24 h	V (ml)	m <sub>RS</sub> (g)	n <sub>GLU</sub> (mol)	v <sub>0</sub> (mol/s = kat)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
3,00	3,08	2,39	38,5	0,09	5,10E-04	1,66E-08	5,91	0,39	16,8
3,50	3,63	11,74	38,5	0,45	2,51E-03	9,12E-08	29,04	1,92	82,6
4,00	4,02	13,98	38,5	0,54	2,99E-03	1,32E-07	34,58	2,29	98,4
4,50	4,51	13,93	38,5	0,54	2,98E-03	1,35E-07	34,44	2,28	98,0
5,00	4,93	14,21	38,5	0,55	3,04E-03	1,22E-07	35,14	2,33	100,0



**Graf č. 14:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na pH tlmivých roztokov a pH výluhu - substrát buničina

Pre optimalizáciu pH tlmivých roztokov boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 17. Podľa manuálu k enzýmom [44] je doporučený rozsah pH pre celulólytický komplex (NS50013) 4,5 – 6,5 a pre  $\beta$ -glukozidázu (NS50010) 2,5 – 6,5, optimum pH pre tieto enzýmy by sa teda malo nachádzať v tejto oblasti.

Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmu pri použití tlmivých roztokov o rôznom pH. Tieto aktivity slúžili ako podklad pre vyjadrenie relatívnych aktivít v %, ktoré boli kľúčovým faktorom pre porovnanie účinnosti hydrolýzy s použitím tlmivých roztokov s rôznym pH. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 18 a 19. V grafe č. 13 boli body preložené polynómom 4. stupňa, ktorý sa ukázal ako najvhodnejší k preloženiu bodov.

Pre dokreslenie bola vyjadrená tiež hodnota počiatkovej rýchlosti  $v_0$  s pomocou metódy vychádzajúcej z Newtonovho rozvoja pre ekvidistantne narastajúce prírastky. [46] Pre výpočet  $v_0$  boli použité hodnoty koncentrácie RS v čase 2, 4 a 6 hodín. Stanovenie  $v_0$  len pomocou troch bodov nie je presné, preto hodnoty  $v_0$  majú iba informatívny charakter.

Po 24 hodinách bola hydrolýza ukončená a bolo zmerané pH dekantovaného výluhu. Bolo zistené, že pH výluhu v prípade substrátu buničiny sa výraznejšie nelíšilo od pH použitých tlmivých roztokov, v prípade použitia filtračného papiera ako substrátu boli rozdiely pH medzi použitými tlmivými roztokmi a výluhmi markantnejšie. pH sa posúvalo smerom k alkalickému oblasti, nikdy však nie viac ako o hodnotu 0,44. Tento posun je daný charakterom substrátu, hlavne jeho obsahovým zložením.

Pre substrát filtračný papier bolo vyhodnotené ako najlepšie použitie 0,05 M tlmivého roztoku s pH 4,00 s nameraným prislúchajúcim pH výluhu 4,43 (enzýmy mali špecifickú aktivitu 2,60 nkat/mg) vid' tab. č. 18.

Pre substrát buničinu bolo vyhodnotené ako najlepšie použitie 0,05 M tlmivého roztoku s pH 5,00 s nameraným prislúchajúcim pH výluhu 4,93 (enzýmy mali špecifickú aktivitu 2,33 nkat/mg) vid' tab. č. 19. Špecifické aktivity enzýmov pri použití 0,05 M tlmivého roztoku s pH 4,00 a 4,50 (pH výluhov 4,02 a 4,51) boli taktiež vysoké 2,29 nkat/mg a 2,28 nkat/mg vyjadrením relatívnymi aktivitami 98,4 % a 98,0 %.

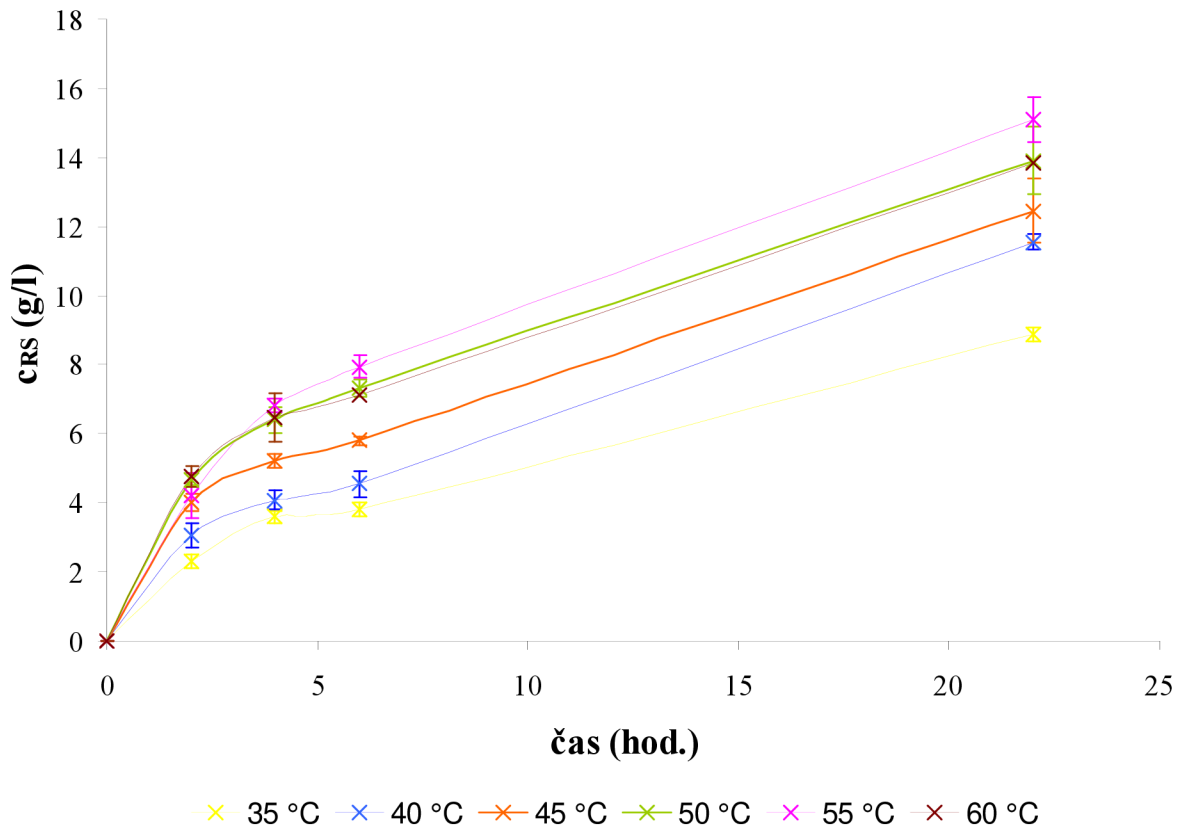
Podľa nameraných výsledkov optimálne pH pre činnosť používaných celulólytických enzýmov leží v intervale 4,43 – 4,93 a výber pH a sily tlmivých roztokov závisí od konkrétnej použitej suroviny.

#### 9.1.4.3 Optimalizácia teploty

**Tab. č. 20:** Podmienky použité pri optimalizácii teploty

substrát	c <sub>s</sub> (% w/v)	m <sub>substrát</sub> (g)	V <sub>pufr</sub> (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – β-glukozidáza		tlmivý roztok	pH	miešanie (rpm)
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzým</sub> (μl)	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzým</sub> (μl)			
filtračný papier	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	octanový 0,05M	4,5	194

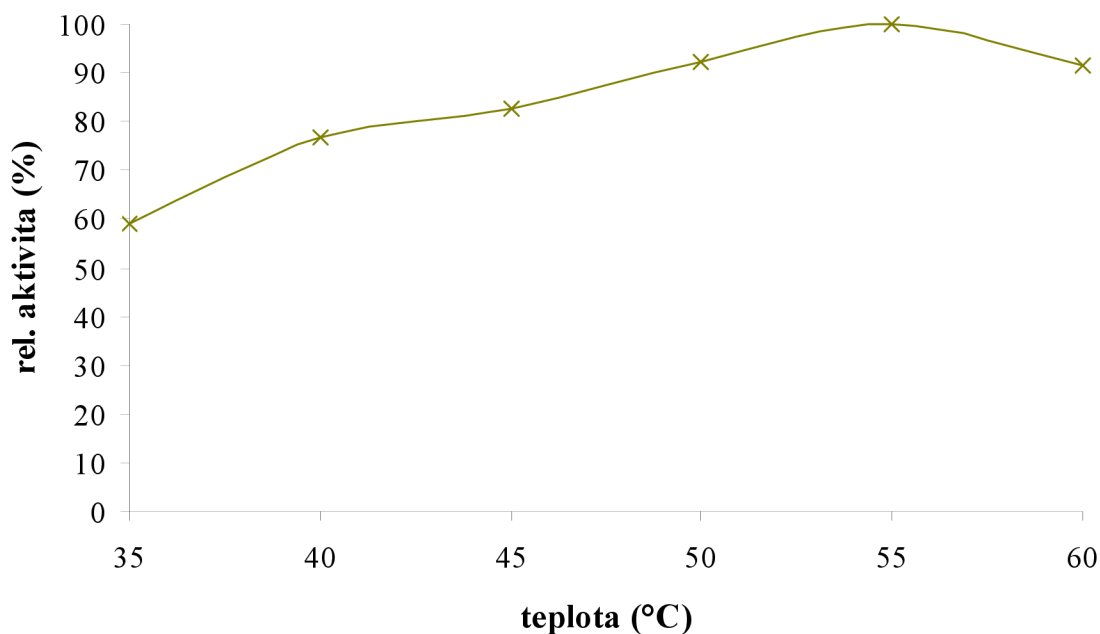




**Graf č. 15:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôznych teplôt inkubácie – substrát filtračný papier

**Tab. č. 21:** Výsledky optimalizácie teploty – substrát filtračný papier

teplota (°C)	$c_{RS}$ (g/l) / 22 h	V (ml)	$m_{RS}$ (g)	$n_{GLU}$ (mol)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
35	8,89	38,5	0,34	1,90E-03	23,99	1,59	59,0
40	11,55	38,5	0,44	2,47E-03	31,17	2,07	76,6
45	12,46	38,5	0,48	2,66E-03	33,62	2,23	82,6
50	13,90	38,5	0,54	2,97E-03	37,51	2,49	92,2
55	15,08	38,5	0,58	3,22E-03	40,69	2,70	100,0
60	13,82	38,5	0,53	2,95E-03	37,30	2,47	91,7



**Graf č. 16:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na použitej teplote – substrát filtračný papier

Pre optimalizáciu teploty boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 20. Podľa manuálu k enzýmom [44] je doporučený rozsah teploty pre celulólytický komplex (NS50013) 45 – 50 °C a pre  $\beta$ -glukozidázu (NS50010) 45 – 70 °C, optimum teploty pre činnosť týchto enzýmov by sa teda malo nachádzať v tejto oblasti.

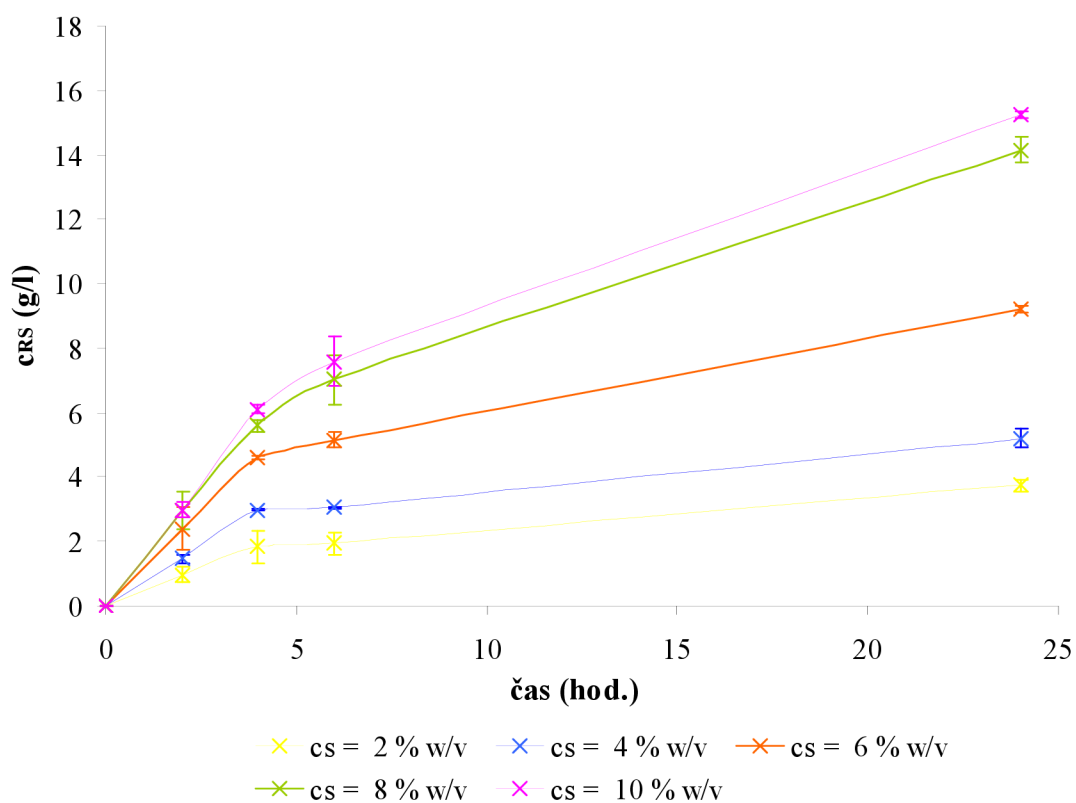
Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 22 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmu pri použití rôznych teplôt. Tieto aktivity slúžili ako podklad pre vyjadrenie relatívnych aktivít v %, ktoré boli kľúčovým faktorom pre porovnanie účinnosti hydrolýzy s použitím rôznych teplôt. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 21.

Aktivita enzýmov vykazovala rast s rastúcou teplotou do teploty 55 °C, pri vyššej teplote aktivita klesala z dôvodu silnejšie sa prejavujúcej denaturácie enzýmov (viď graf č. 16). Maximum aktivity bolo po 22 hodinách namerané pri použití teploty 55 °C (špecifická aktivita 2,70 nkat / mg), druhá najväčšia aktivita bola nameraná pri teplote 50 °C (špecifická aktivita 2,49 nkat / mg, relatívna aktivita 92,2 %). Napriek tomu, že najlepšie výsledky po 22 hodinách vykazovalo meranie pre teplotu 55 °C, 22 hodín môže byť príliš krátkym časovým intervalom a pri 55 °C by sa počas dlhšieho časového úseku hydrolýzy (trvanie hydrolýzy odpadového papiera v ďalších experimentoch bolo 96 hodín) začala výraznejšie prejavovať denaturácia enzýmov, čo by sa prejavilo na poklese aktivity enzýmov. Preto bola ako optimalizovaná hodnota teploty zvolená teplota 50 °C, ktorá leží v doporučenom intervale teplôt z manuálu k celulólytickým enzýmom.

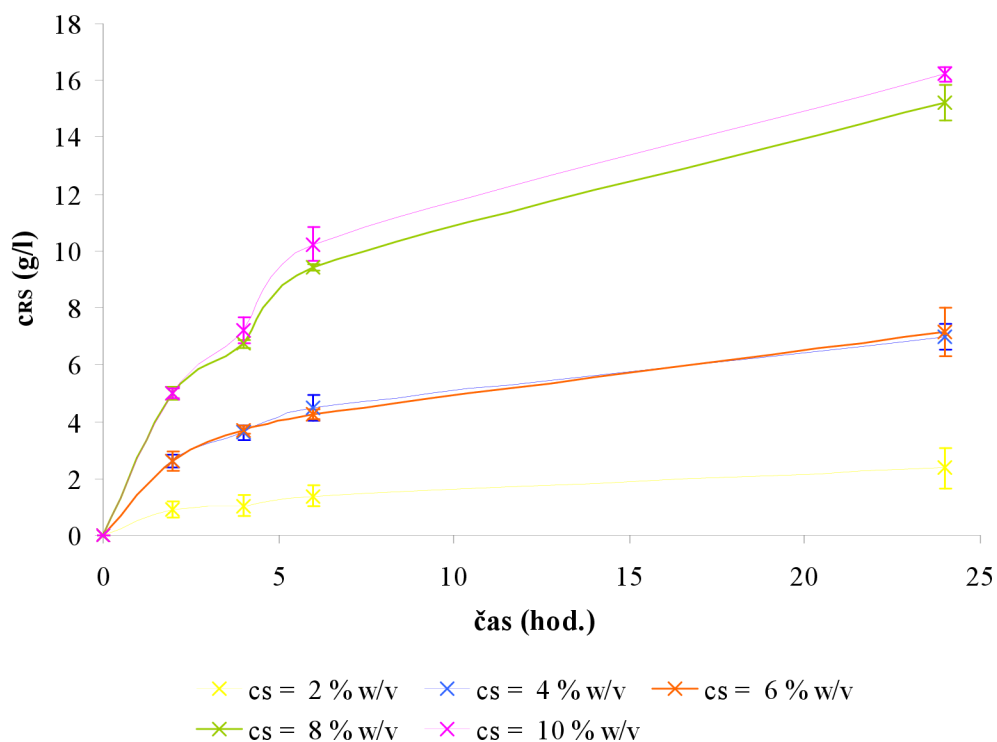
### 9.1.4.4 Optimalizácia koncentrácie substrátu a enzýmov

Tab. č. 22: Podmienky použité pri optimalizácii koncentrácie substrátu a enzýmov

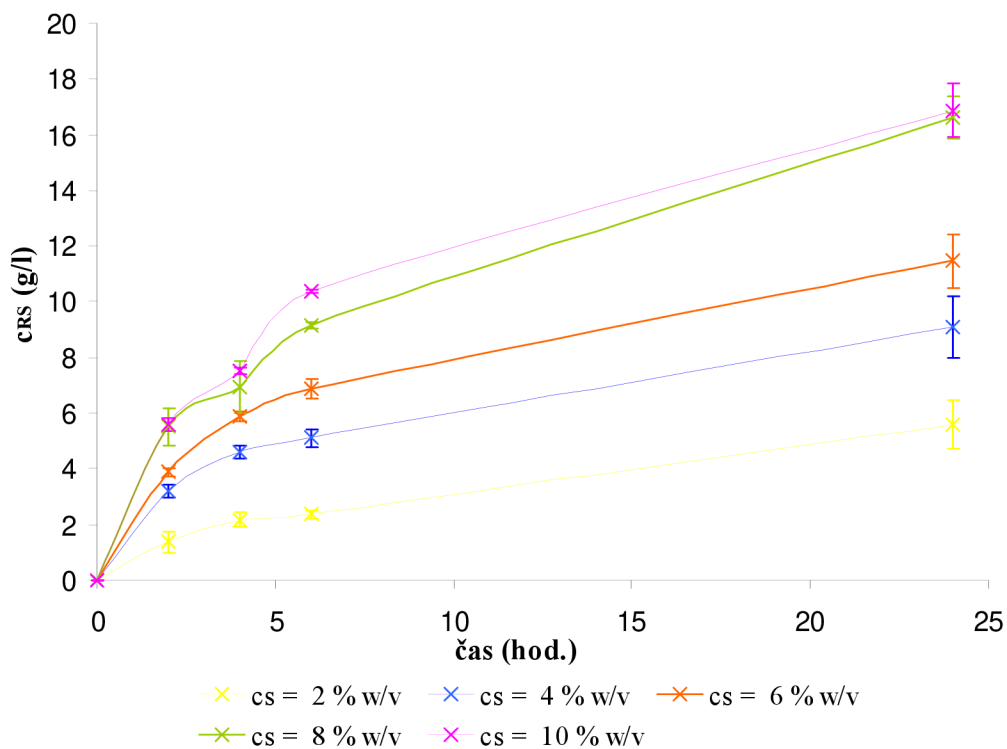
substrát	$c_s$ (% w/v)	$m_{\text{substrát}}$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		tlmivý roztok	pH	miešanie (rpm)	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu\text{l}$ )	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu\text{l}$ )				
buničina	2 - 10	0,8 - 4,0	40	2 - 10	13 - 200	0,2 - 1	1,3 - 20	octanový 0,05M	4,5	194	50



Graf č. 17: Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôznych koncentrácií substrátu – substrát buničina, dávkovanie NS50013 2 % w/w na TS



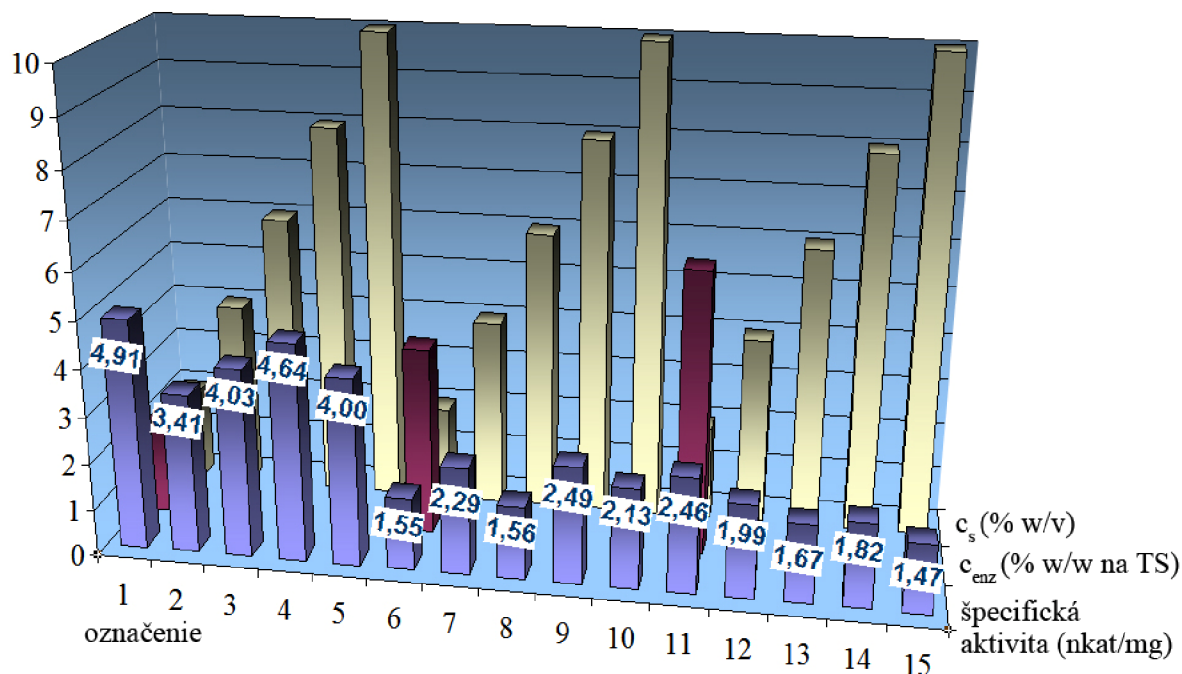
**Graf č. 18:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôznych koncentrácií substrátu – substrát buničina, dávkovanie NS50013 4 % w/w na TS



**Graf č. 19:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití rôznych koncentrácií substrátu – substrát buničina, dávkovanie NS50013 6 % w/w na TS

**Tab. č. 23:** Výsledky optimalizácie koncentrácie substrátu a enzýmov – substrát buničina

č.	koncentrácia enzýmu (% w/w na TS)	koncentrácia substrátu (% w/v)	$c_{RS}$ (g/l) / 24 h	V (ml)	$m_{RS}$ (g)	$n_{GLU}$ (mol)	aktivita (nkat)	rozpustné bielkoviny enzýmov (mg)	špecifická aktivita (nkat/mg)
1	2	2	3,75	38,5	0,14	8,01E-04	9,27	1,9	4,91
2	2	4	5,20	38,5	0,20	1,11E-03	12,86	3,8	3,41
3	2	6	9,21	38,5	0,35	1,97E-03	22,78	5,7	4,03
4	2	8	14,16	38,5	0,55	3,03E-03	35,02	7,5	4,64
5	2	10	15,24	38,5	0,59	3,26E-03	37,69	9,4	4,00
6	4	2	2,36	38,5	0,09	5,04E-04	5,83	3,8	1,55
7	4	4	6,97	38,5	0,27	1,49E-03	17,24	7,5	2,29
8	4	6	7,13	38,5	0,27	1,52E-03	17,65	11,3	1,56
9	4	8	15,21	38,5	0,59	3,25E-03	37,63	15,1	2,49
10	4	10	16,23	38,5	0,62	3,47E-03	40,14	18,9	2,13
11	6	2	5,62	38,5	0,22	1,20E-03	13,90	5,7	2,46
12	6	4	9,10	38,5	0,35	1,95E-03	22,51	11,3	1,99
13	6	6	11,47	38,5	0,44	2,45E-03	28,38	17,0	1,67
14	6	8	16,61	38,5	0,64	3,55E-03	41,09	22,6	1,82
15	6	10	16,86	38,5	0,65	3,60E-03	41,70	28,3	1,47



**Graf č. 20:** Závislosť špecifickej aktivity enzýmov na použitej koncentrácii substrátu ( $c_s$  v % w/v) a dávkovaní enzýmov (% w/w na TS) – substrát buničina

Pre optimalizáciu koncentrácie substrátu a enzýmov boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 22. Podľa manuálu k enzýmom [44] je doporučený rozsah dávkovania enzýmov celulolytického komplexu (NS50013) 2 – 6 % w/w na celkový tuhý podiel (TS) s prídavkom 5 – 10 % v/v  $\beta$ -glukozidázy (NS50010) na množstvo preparátu NS50013. Prídavok  $\beta$ -glukozidázy bol vždy 10 % v/v množstva použitých celulolytických enzýmov. Dávkovanie substrátu bolo zvolené v rozsahu 2 – 10 % w/v buničiny, pričom pri použití dávkovania 10 % bola suspenzia buničiny už len obtiažne miešateľná.

Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmu pri použití rôznych koncentrácií enzýmov a substrátu. Účinnosť hydrolýzy bola posúdená porovnaním špecifických aktivít enzýmov pri rôznych použitých koncentráciách enzýmov a substrátu. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 23.

Na grafe č. 18 a č. 19 si možno všimnúť, že krivky priebehu hydrolýzy pre koncentráciu substrátu 6 a 8 % w/v nemajú typický tvar. Je to spôsobené tým, že pri vysokej koncentrácii substrátu je spočiatku miešanie suspenzie obtiažne, ale vďaka vysokému dávkovaniu enzýmov došlo po 4 hodinách k rýchlemu zlepšeniu miešateľnosti vplyvom účinku enzýmov, čo sa prejavilo v lepšej dostupnosti substrátu pre enzýmy a teda v konečnom dôsledku aj k rapídnejšiemu nárastu koncentrácie RS v 6 hodinách.

Na grafe č. 20 je zreteľne vidno, že najvyššie špecifické aktivity boli dosahované pri použití 2 % w/w na TS dávkovaní NS50013, nižšie hodnoty boli pri použití pri dávkovaniach 4 % a 6 %. Zmeny v špecifických aktivitách s nárastom koncentrácie substrátu nie sú pravidelné, iba pri použití 6 % dávkovania NS50013 je možné sledovať pokles špecifických aktivít s nárastom koncentrácie substrátu.

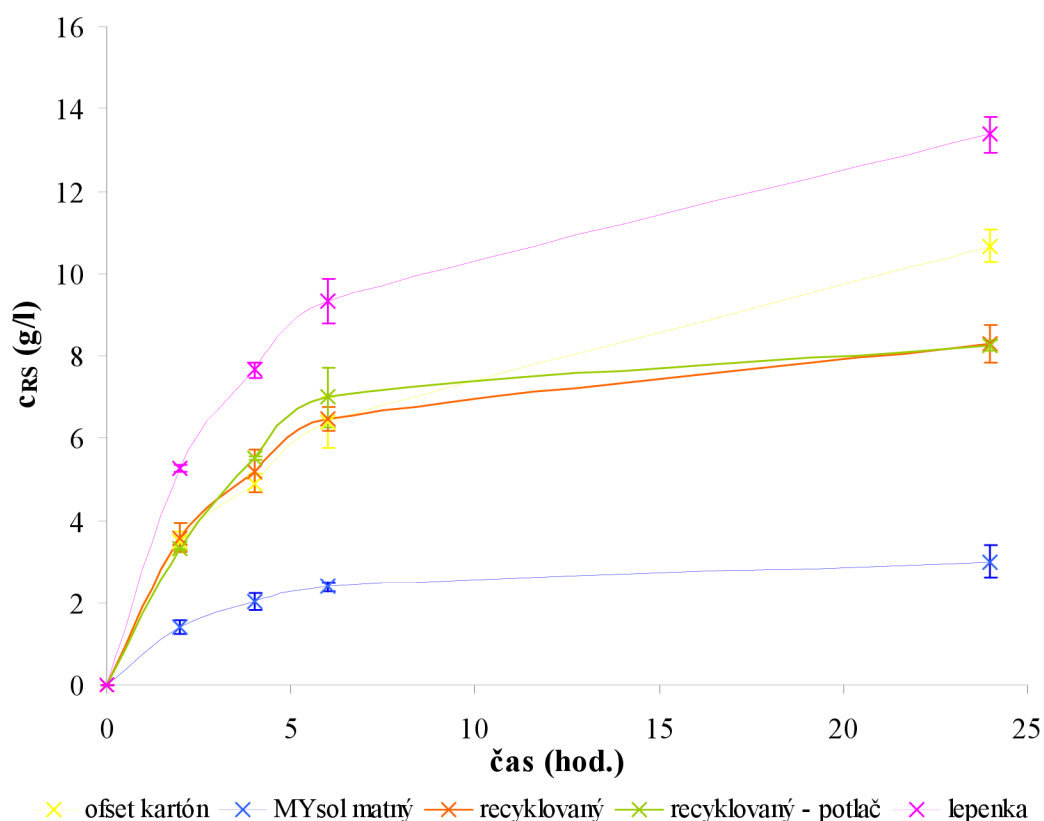
Najvyššia hodnota špecifickej aktivity enzýmov 4,91 nkat / mg bielkoviny bola dosiahnutá pri použití dávkovania 2 % w/w na TS NS50013 a koncentrácie substrátu 2 % a druhá najvyššia hodnota špecifickej aktivity 4,64 nkat / mg bielkoviny bola dosiahnutá pri použití dávkovania 2 % w/w na TS NS50013 a koncentrácie substrátu 8 %. Pre potreby priemyselnej veľkovýroby je nutné dosahovať vysoké finálne koncentrácie RS pre proces fermentácie preto je lepšie zvoliť vyššiu koncentráciu substrátu. Napriek tomu, že najvyššie hodnoty špecifickej aktivity boli dosahované pri 2 % dávkovaní celuláz, toto dávkovanie nemusí byť dostatočné pre dlhodobější proces fed-batch hydrolýzy, pretože s časom dochádza k parciálnej denaturácii enzýmov a čiastočnej ireverzibilnej fixácii enzýmov na substrát, čoho dôsledkom je pokles aktivity enzýmov. Treba brať ohľad aj na to, že experiment bol vykonaný na modelovej surovine – buničine, ktorá sa líši svojim správaním v suspenzii a tiež zložením od odpadových surovín, taktiež je treba brať do úvahy inhibičný účinok produktu na činnosť celuláz, ktorý by mohol byť potlačený pomocou SSF, ale v tomto štádiu sa k použitiu tohto postupu nesiahlo.

V tejto fáze bolo vyhodnotené použitie dávkovanie NS50013 2 % w/w na TS (s prídavkom 0,2 % w/w NS50010 na TS) a s koncentráciou substrátu 8 % ako najlepšie.

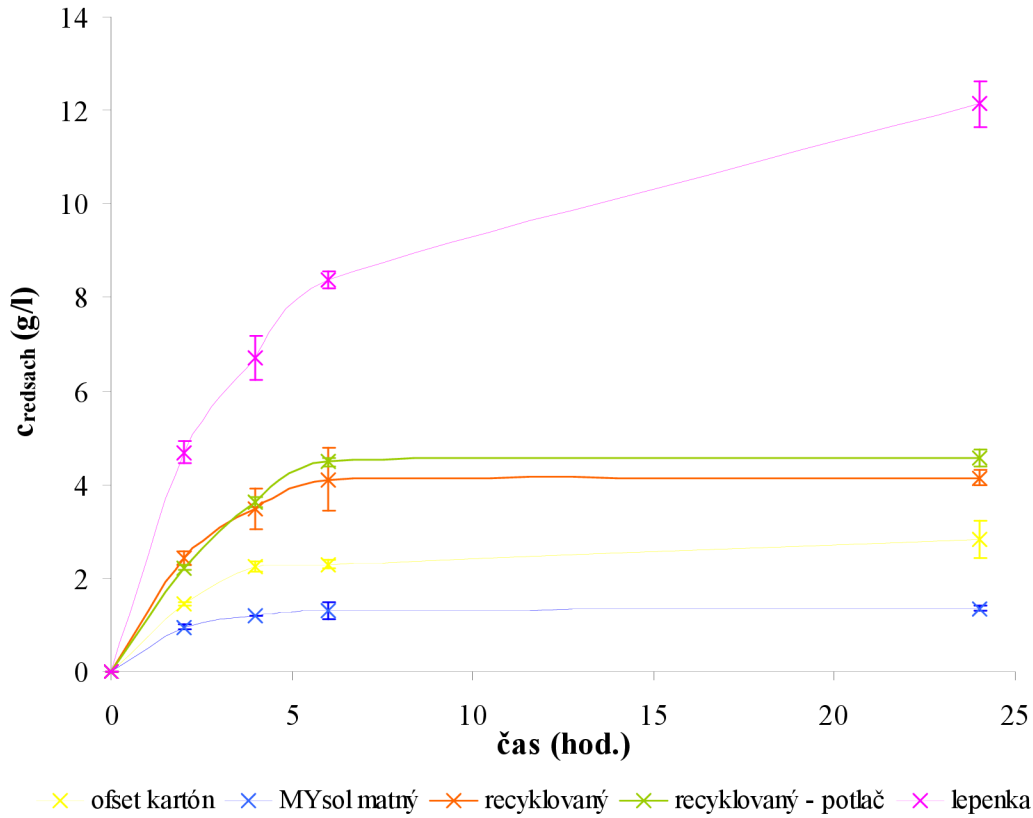
### 9.1.4.5 Optimalizácia pH a sily tlmivého roztoku – substrát odpadové papiere časť 1

**Tab. č. 24:** Podmienky použité pri optimalizácii pH a sily tlmivého roztoku – substrát odpadové papiere časť 1

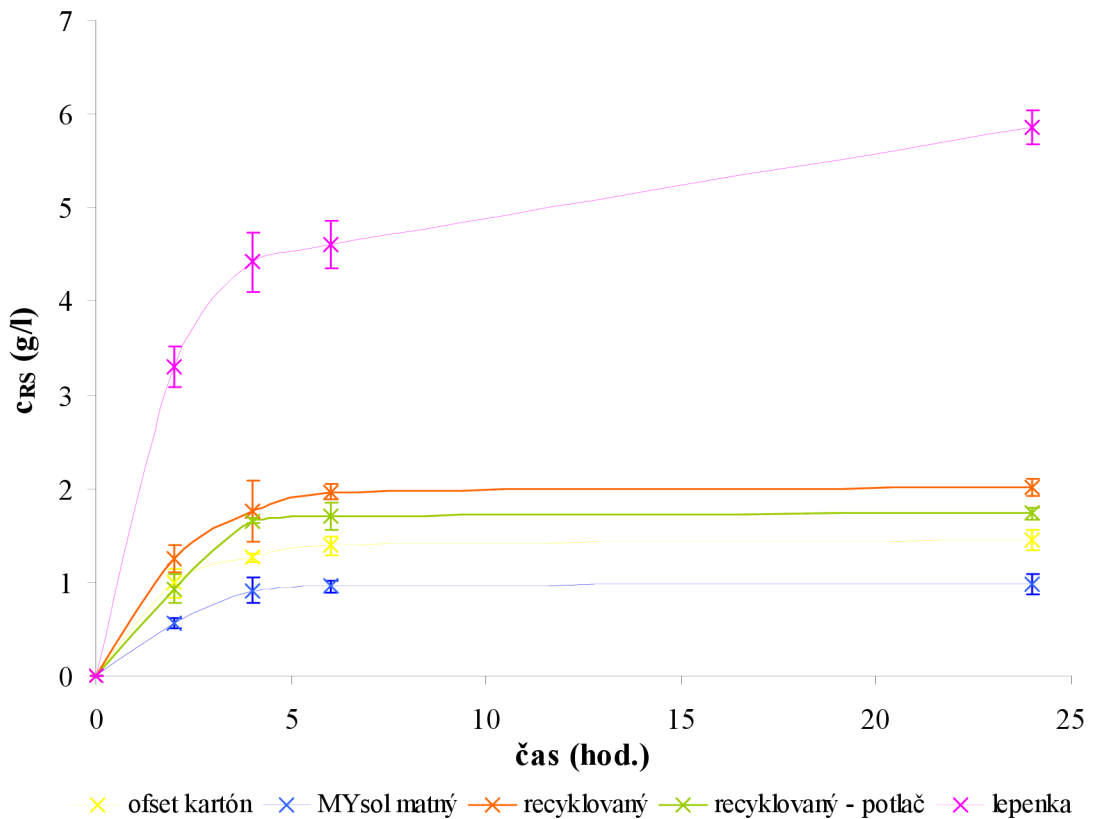
substrát	$c_s$ (% w/v)	$m_s$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	mieš. (rpm)	tlmivý roztok	pH
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzym}}$ ( $\mu\text{l}$ )	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzym}}$ ( $\mu\text{l}$ )				
odpad. papiere	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	50	194	oct. 0,05M	3,7
odpad. papiere	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	50	194	oct. 0,05M	4,0
odpad. papiere	8	3,2	40	4	107	0,4	10,7	50	194	oct. 0,05M	4,5



**Graf č. 21:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,05 M octanového tlmivého roztoku pH 3,7 – substrát odpadové papiere



**Graf č. 22:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,05 M octanového tlmivého roztoku pH 4,0 – substrát odpadové papiere

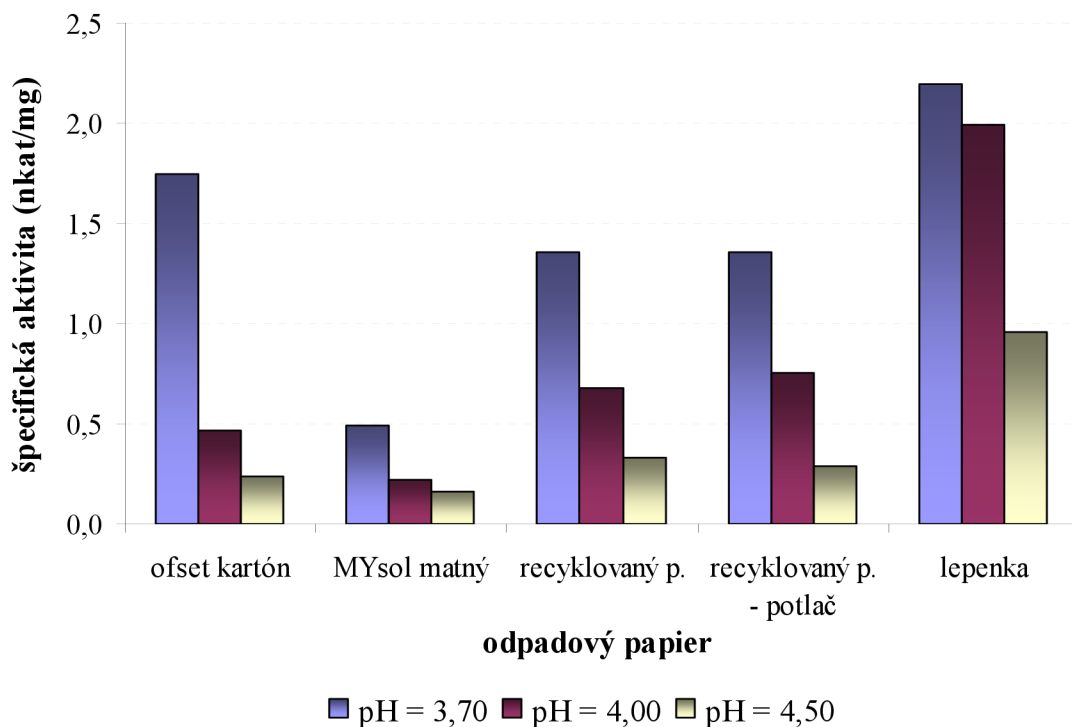


**Graf č. 23:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,05 M octanového tlmivého roztoku pH 4,5 – substrát odpadové papiere



**Tab. č. 25:** Výsledky optimalizácie pH a sily tlmivých roztokov – substrát odpadové papiere časť 1

substrát	pH <sub>pufr</sub>	pH <sub>výluh</sub>	c <sub>RS</sub> (g/l) / 24 h	V (ml)	m <sub>RS</sub> (g)	n <sub>GLU</sub> (mol)	v <sub>0</sub> (mol/s = kat)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)
ofset kartón	3,70	5,59	10,66	38,5	0,41	2,28E-03	1,63E-07	26,37	1,75
	4,00	6,78	2,83	38,5	0,11	6,06E-04	5,43E-08	7,01	0,46
	4,50	6,87	1,44	38,5	0,06	3,09E-04	4,79E-08	3,57	0,24
MYsol matný	3,70	6,71	2,99	38,5	0,12	6,39E-04	6,13E-08	7,39	0,49
	4,00	6,83	1,36	38,5	0,05	2,90E-04	4,71E-08	3,36	0,22
	4,50	6,88	0,98	38,5	0,04	2,09E-04	2,05E-08	2,41	0,16
recyklovaný p.	3,70	6,02	8,27	38,5	0,32	1,77E-03	1,58E-07	20,47	1,36
	4,00	6,75	4,15	38,5	0,16	8,87E-04	1,08E-07	10,27	0,68
	4,50	6,99	2,01	38,5	0,08	4,30E-04	5,58E-08	4,98	0,33
recyklovaný p. - potlač	3,70	5,99	8,25	38,5	0,32	1,76E-03	1,24E-07	20,41	1,35
	4,00	6,70	4,58	38,5	0,18	9,79E-04	8,53E-08	11,33	0,75
	4,50	6,87	1,73	38,5	0,07	3,70E-04	2,74E-08	4,29	0,28
lepenka	3,70	4,50	13,38	38,5	0,52	2,86E-03	2,32E-07	33,09	2,19
	4,00	5,26	12,14	38,5	0,47	2,59E-03	2,11E-07	30,02	1,99
	4,50	6,26	5,86	38,5	0,23	1,25E-03	1,49E-07	14,50	0,96



**Graf č. 24:** Závislosť špecifickej aktivity enzýmov na pH octanových 0,05M tlmivých roztokov – substrát odpadové papiere časť 1

Pre optimalizáciu pH a molarity tlmivých roztokov pre odpadové papiere (časť 1) boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 24. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmu pri použití tlmivých roztokov o rôznej sile a pH. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Boli stanovené hodnoty  $v_0$  ako v predchádzajúcich meraniach. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 25.

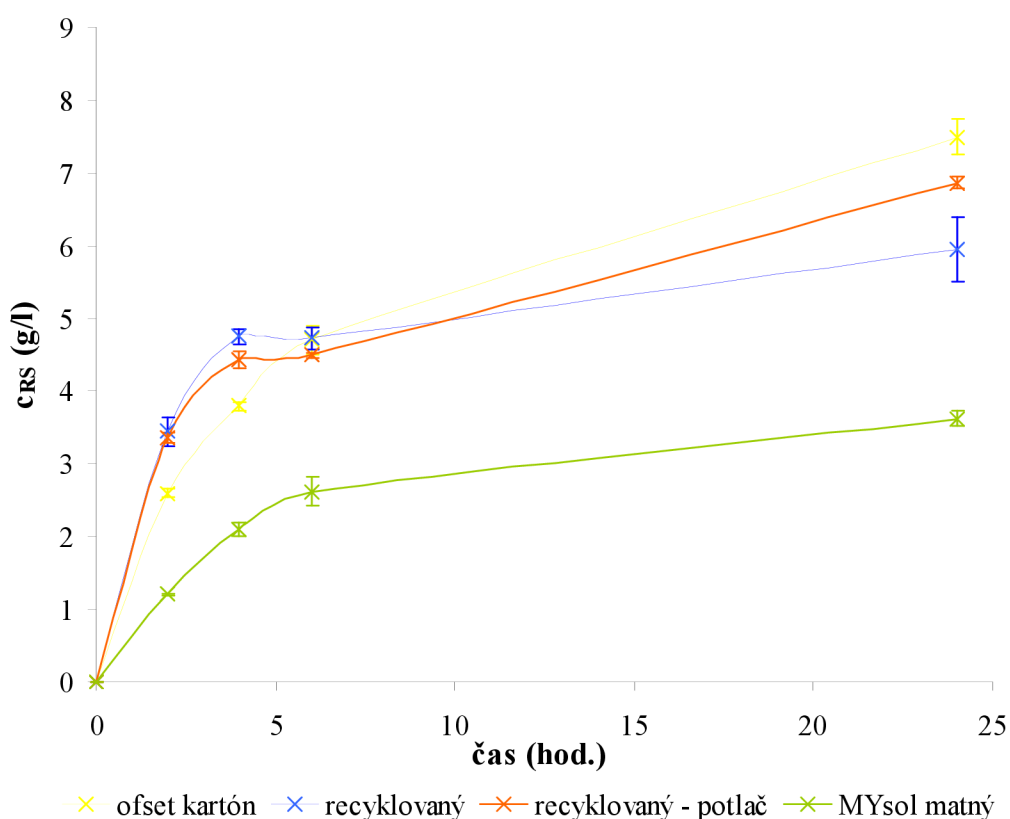
Po 24 hodinách bola hydrolýza ukončená a bolo zmerané pH dekantovaného výluhu. Bolo zistené, že pH výluhu sa u všetkých odpadových papieroch výrazne líšilo od pH použitých tlmivých roztokov. pH sa posúvalo smerom k alkalickému oblasti. Tento posun je daný obsahovým zložením odpadových papierov, najmä obsahom plnidiel, ktorý je značný v prípade ofsetových papierov a recyklovaných papierov, lepenka obsahuje menej plnidiel, preto bol posun pH výluhu nižší. Vhodnosť rôznych pH tlmivých roztokov pre rôzne odpadové papiere bola vyhodnotená nasledovne: pH 0,05 M tlmivého roztoku sa ukázalo ako vhodné pre daný papier vtedy, keď hodnota pH výluhu po hydrolýze bola v intervale 4,43 – 4,93 optimálnom pre činnosť celulólytického komplexu.

V tomto kroku sa podarilo optimalizovať pH a silu tlmivého roztoku len pre lepenku. Vhodným octanovým tlmivým roztokom pre lepenku bol 0,05 M roztok s pH = 3,7, pH výluhu bolo 4,50 a špecifická aktivita enzýmov 2,19 nkat/mg (viď tab. č. 25 a graf č. 24). Pre ostatné papiere bolo nutné optimalizáciu opakovať so silnejšími tlmivými roztokmi pre dosiahnutie optimálneho pH výluhu.

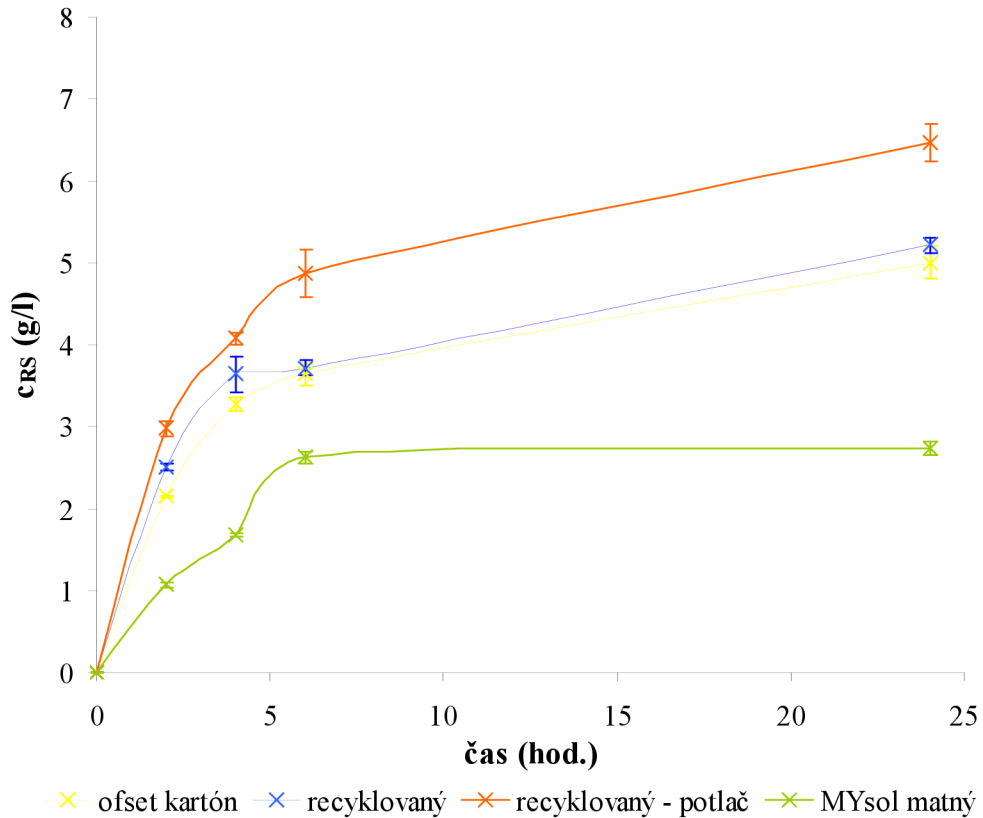
### 9.1.4.6 Optimalizácia pH a sily tlmivého roztoku – substrát odpadové papiere časť 2

**Tab. č. 26:** Podmienky použité pri optimalizácii pH a sily tlmivého roztoku – substrát odpadové papiere časť 2

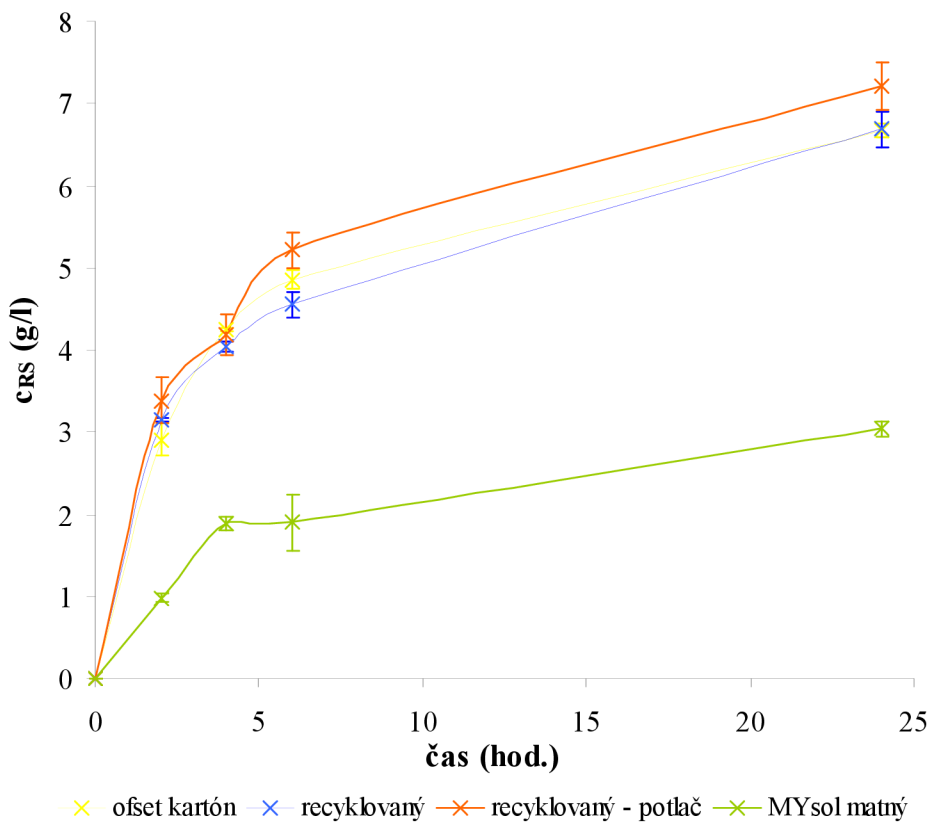
substrát	$c_s$ (% w/v)	$m_s$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		teplota (°C)	miešanie (rpm)	tlmivý roztok	pH
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzym}}$ ( $\mu$ l)	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzym}}$ ( $\mu$ l)				
odp. papiere	8	4,0	50	2	67	0,2	6,7	50	194	octanový 0,2M	4,0
odp. papiere	8	4,0	50	2	67	0,2	6,7	50	194	octanový 0,2M	3,8
odp. papiere	8	4,0	50	2	67	0,2	6,7	50	194	octanový 0,1M	3,6



**Graf č. 25:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,2 M octanového tlmivého roztoku pH 4,0 – substrát odpadové papiere



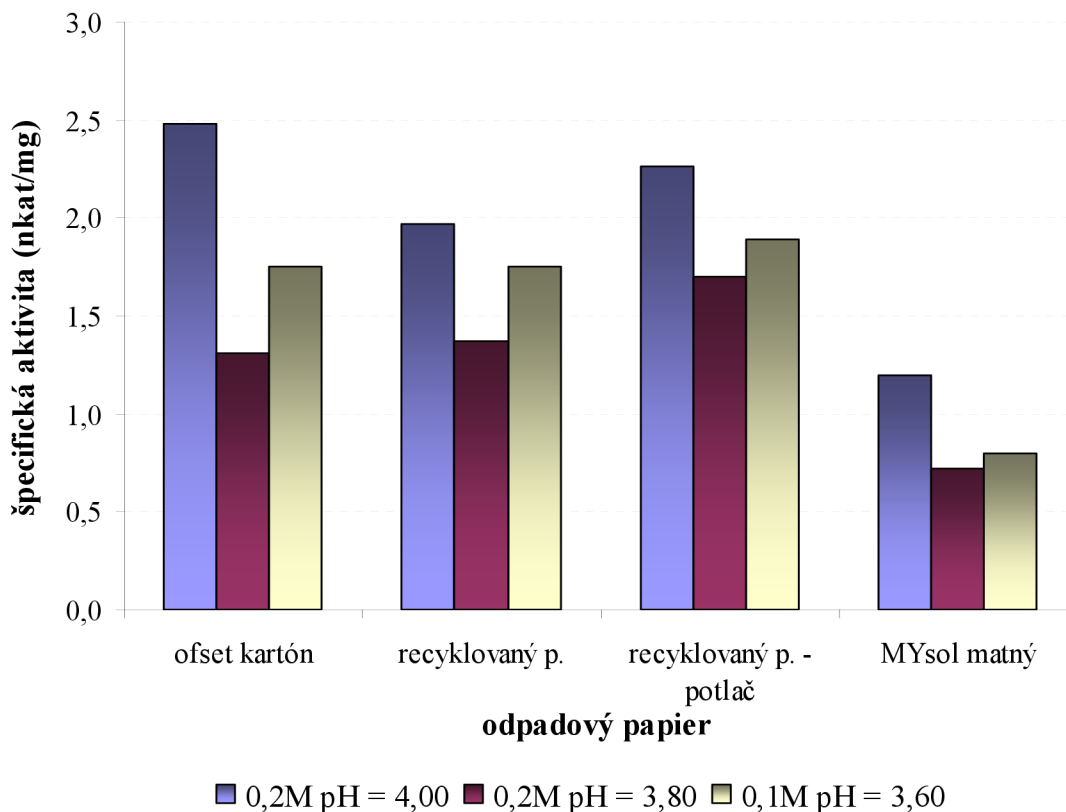
**Graf č. 26:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,2 M octanového tlmivého roztoku pH 3,8 – substrát odpadové papiere



**Graf č. 27:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri použití 0,1 M octanového tlmivého roztoku pH 3,6 – substrát odpadové papiere

**Tab. č. 27:** Výsledky optimalizácie pH a sily tlmivých roztokov – substrát odpadové papiere časť 2

substrát	tlmivý roztok	pH <sub>pufr</sub>	pH <sub>výluh</sub>	c <sub>RS</sub> (g/l) / 24 h	V (ml)	m <sub>RS</sub> (g)	n <sub>GLU</sub> (mol)	v <sub>0</sub> (mol/s = kat)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)
ofset kartón	oct. 0,2M	4,00	4,53	7,49	38,5	0,36	2,02E-03	1,43E-07	23,35	2,48
	oct. 0,2M	3,80	4,12	5,00	38,5	0,19	1,07E-03	8,53E-08	12,38	1,31
	oct. 0,2M	3,60	4,14	6,67	38,5	0,26	1,43E-03	1,23E-07	16,51	1,75
recyklovaný p.	oct. 0,2M	4,00	4,56	5,95	38,5	0,29	1,60E-03	1,86E-07	18,53	1,97
	oct. 0,2M	3,80	4,16	5,21	38,5	0,20	1,11E-03	1,03E-07	12,90	1,37
	oct. 0,2M	3,60	4,32	6,69	38,5	0,26	1,43E-03	1,52E-07	16,55	1,75
recyklovaný p. – potlač	oct. 0,2M	4,00	4,59	6,86	38,5	0,33	1,85E-03	1,91E-07	21,38	2,27
	oct. 0,2M	3,80	4,20	6,47	38,5	0,25	1,38E-03	1,39E-07	16,01	1,70
	oct. 0,2M	3,60	4,21	7,21	38,5	0,28	1,54E-03	1,74E-07	17,84	1,89
MYsol matný	oct. 0,2M	4,00	4,85	3,62	38,5	0,18	9,75E-04	5,27E-08	11,29	1,20
	oct. 0,2M	3,80	4,35	2,74	38,5	0,11	5,68E-04	4,86E-08	6,78	0,72
	oct. 0,2M	3,60	4,40	3,04	38,5	0,12	6,49E-04	2,37E-08	7,51	0,80



**Graf č. 28:** Závislosť špecifickej aktivity enzýmov na pH a sile octanových tlmivých roztokov – substrát odpadové papiere časť 2

Pre optimalizáciu pH tlmivých roztokov pre odpadové papiere (časť 2) boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 26. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmov pri použití tlmivých roztokov o rôznej sile a pH. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Boli stanovené hodnoty  $v_0$  ako v predchádzajúcich meraniach. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 27.

Po 24 hodinách bola hydrolýza ukončená a bolo zmerané pH dekantovaného výluhu. Vhodnosť rôznych pH tlmivých roztokov pre rôzne odpadové papiere bola vyhodnotená obdobne ako v predchádzajúcej časti (viď. 9.1.4.5). Pokiaľ bolo viac hodnôt pH výluhu po hydrolýze v intervale 4,43 – 4,93, bol vhodnejší tlmivý roztok vybraný porovnaním špecifických aktivít pri použití týchto tlmivých roztokov.

Podarilo sa optimalizovať pH a silu tlmivých roztokov pre všetky použité odpadové papiere. Pre offset kartón, MYSol matný p., recyklovaný papier s potlačou aj bez potlače bol najvhodnejší 0,2 M octanový tlmivý roztok s pH 4,00 (pH výluhov bolo: offset kartón 4,53; recyklovaný p. 4,56; recyklovaný p. s potlačou 4,59 a MYSol matný 4,85 a špecifické aktivity pre offset kartón 2,48 nkat/mg; recyklovaný p. 1,97 nkat/mg; recyklovaný p. s potlačou 2,27 nkat/mg a MYSol matný 1,20 nkat/mg viď tab. č. 27).

#### 9.1.4.7 Optimalizácia pH a sily tlmivého roztoku – substrát lepenka s rôznou predúpravou

**Tab. č. 28:** Výsledky optimalizácie pH a sily tlmivých roztokov – substrát lepenka s rôznou predúpravou

č. predúpravy	chemická predúprava	pH <sub>puf</sub> r	pH <sub>výluh</sub>
2	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	4,00	4,28
2	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	4,50	4,93
3	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 2 % HNO <sub>3</sub>	4,00	4,05
3	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 2 % HNO <sub>3</sub>	4,50	4,49
4	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 2 % NaOH	4,00	4,21
4	0,25 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> + 2 % NaOH	4,50	4,75

Pre nájdenie vhodného pH 0,05 M tlmivého roztoku pre enzymatickú hydrolyzu preupravených lepeniek bol použitý skratený test pH, pretože sa predpokladalo, že predupravené lepenky budú mať podobné vlastnosti v suspenzii ako lepenka nepredupravená. Boli pripravené octanové tlmivé roztoky o pH 4,00 a 4,50, z ktorých boli vytvorené suspenzie predupravených lepeniek, ktoré sa nechali inkubovať 15 minút a následne sa zmeralo pH dekantovaného výluhu. pH výluhov slúžilo k vyhodnoteniu vhodného pH tlmivého roztoku. Pre všetky predupravené lepenky bol vyhodnotený ako vhodnejší tlmivý roztok o pH 4,50, pretože pH výluhov pri použití tohto pH tlmivého roztoku sa nachádzali v intervale 4,43 – 4,93, vid' tab. č. 28.

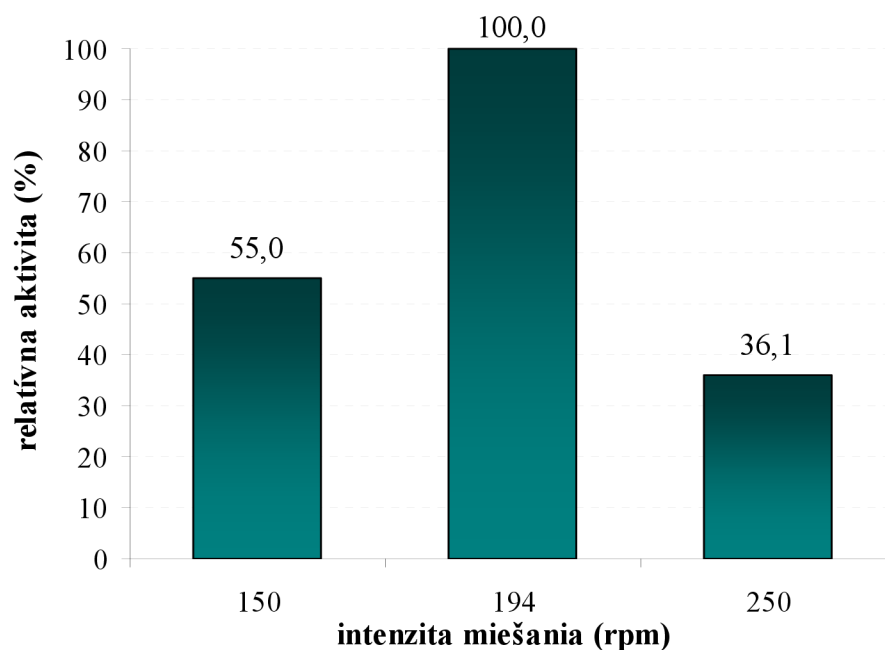
#### 9.1.4.8 Optimalizácia intenzity miešania

**Tab. č. 29:** Podmienky použité pri optimalizácii intenzity miešania – substrát buničina

substrát	c <sub>s</sub> (%) w/v)	m <sub>substrát</sub> (g)	V <sub>puf</sub> r (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – β-glukozidáza		tlmivý roztok	pH	teplota (°C)
				dávkovanie enzýmu (%) w/w na TS)	V <sub>enzym</sub> (ml)	dávkovanie enzýmu (%) w/w na TS)	V <sub>enzym</sub> (ml)			
buničina	8	4	50	2	67	0,2	6,7	octanový 0,05M	4,5	50

**Tab. č. 30:** Výsledky optimalizácie intenzity miešania – substrát buničina

miešanie (rpm)	$C_{RS}$ (g/l) / 24 h	V (ml)	$m_{RS}$ (g)	$n_{GLU}$ (mol)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
150	7,78	50	0,38	2,10E-03	24,25	2,57	55,0
194	14,16	50	0,69	3,81E-03	44,12	4,68	100,0
250	5,11	50	0,25	1,38E-03	15,93	1,69	36,1



**Graf č. 29:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na intenzite miešania – substrát buničina

Pre optimalizáciu intenzity miešania boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 29. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmov pri použití rôznej intenzity miešania. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 30.

Nebol sledovaný priebeh hydrolýzy (neboli vykonané odbery v 2, 4 a 6 hodinách), pretože pre porovnanie rôznych podmienok miešania to nie je nutné, preto chýba graf priebehu hydrolýzy. Miešanie prebiehalo na temperovanej trepačke – krúživým pohybom dna trepačky, Erlenmeierove banky boli z boku fixované držiakmi.

Najvhodnejšia intenzita miešania za použitých podmienok bola 194 rpm (enzýmy mali špecifickú aktivitu 2,57 nkat/mg.) Intenzita miešania 150 rpm sa ukázala ako málo intenzívna (rel. aktivita 55,0 %), intenzita 250 rpm ako prehnaná (rel. aktivita 36,1 %), pri 250 rpm zrejme dochádzalo k čiastočnej denaturácii enzýmov vplyvom strihových síl (viď graf č. 29).

Je nutné podotknúť, že keďže pokusy prebiehali vo veľmi malých objemoch, miešanie na trepačke nebolo vždy optimálnou cestou, najmä pri použití vysokých koncentrácií substrátu (10 % w/v) a nízkych koncentrácií enzýmov (2 % w/w na TS) dochádzalo k sedimentácii



substrátu na dne baniek a styk enzýmov a substrátu nebol najlepší. Priebeh hydrolýzy by bolo možné zrejme vylepšiť dostatočne intenzívnym miešaním napr. s použitím vhodného typu mechanického miešadla, čo však v tak malých testovacích objemoch nie je možné.

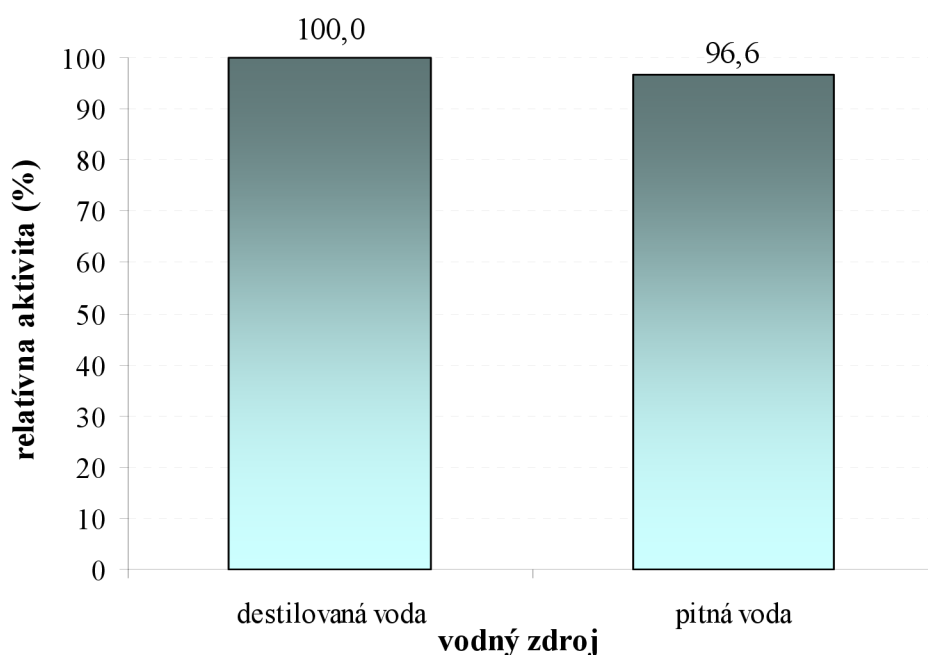
### 9.1.5 Použitie pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu

**Tab. č. 31:** Podmienky použité pri testovaní vhodnosti použitia pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu – substrát buničina

substrát	$c_s$ (% w/v)	$m_{\text{substrát}}$ (g)	$V_{\text{pufr}}$ (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – $\beta$ -glukozidáza		tlmivý roztok	miešanie (rpm)	pH	teplota (°C)
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu$ l)	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	$V_{\text{enzým}}$ ( $\mu$ l)				
buničina	8	4	50	2	67	0,2	6,7	oct. 0,05M	150	4,5	50

**Tab. č. 32:** Výsledky testovania vhodnosti použitia pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu – substrát buničina

použitá voda	$c_{RS}$ (g/l) / 24 h	V (ml)	$m_{RS}$ (g)	$n_{GLU}$ (mol)	aktivita (nkat)	špecifická aktivita (nkat/mg)	rel. aktivita (%)
destilovaná voda	7,78	48,5	0,38	2,10E-03	24,25	2,57	100,0
pitná voda	7,52	48,5	0,36	2,02E-03	23,42	2,48	96,6



**Graf č. 30:** Závislosť relatívnej aktivity enzýmov na použítom zdroji vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu – substrát buničina

Pre testovanie použiteľnosti pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 31. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 24 hodín boli použité pre výpočet aktivít enzýmov v nkat a špecifických aktivít v nkat / mg bielkoviny enzýmov pri použití destilovanej vody a prevarenej pitnej vody ako vodného prostredia. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Výsledky optimalizácie tlmivých roztokov sú zhrnuté v tab. č. 32.

Nebol sledovaný priebeh hydrolýzy (neboli vykonané odbery v 2, 4 a 6 hodinách), pretože pre porovnanie to nebolo nutné. Pre potreby experimentu bola použitá pitná voda z budovy FCH VUT Brno.

Porovnaním relatívnych aktivít (viď graf č. 30) je zrejme, že použitie pitnej vody ako vodného prostredia pre enzymatickú hydrolýzu výrazne neznižuje aktivitu enzýmov (rel. aktivita enzýmov s použitím pitnej vody bola 96,6 %). Konkrétne výsledky budú zrejme záležať na zdroji použitej pitnej vody.

## 9.1.6 Základná kvantitatívna kompozičná analýza materiálu

### 9.1.6.1 Stanovenie sušiny

Tab. č. 33: Výsledky stanovenia sušiny odpadových papierov

papier	vzorok č.	m <sub>miska</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>m+v</sub> (g)	sušina (%)	sušina <sub>priemer</sub> (%)	smerodat. odchýlka	IS
ofset kartón	01	22,782 5	3,202 6	25,835 5	95,33	95,36	0,025	0,03
	02	24,007 6	3,063 2	26,929 6	95,39			
	03	24,012 8	3,323 5	27,181 9	95,35			
recyklovaný papier	11	23,362 5	3,422 9	26,636 7	95,66	95,65	0,004	0,01
	12	23,422 2	2,850 2	26,148 3	95,65			
	13	23,155 7	2,632 5	25,673 6	95,65			
recyklovaný papier - potlač	21	23,058 6	1,871 3	24,857 3	96,12	96,20	0,068	0,08
	22	24,157 8	2,376 6	26,443 9	96,19			
	23	24,309 1	2,194 4	26,422 0	96,29			
MYsol matný	31	23,744 5	1,772 4	25,462 6	96,94	96,90	0,030	0,03
	32	23,725 5	2,436 1	26,085 2	96,86			
	33	24,010 8	1,896 0	25,848 1	96,90			
lepenka	41	23,410 0	1,466 2	24,811 6	95,59	95,62	0,031	0,04
	42	23,310 9	1,772 5	25,006 5	95,66			
	43	23,640 9	1,665 0	25,232 6	95,60			
filtračný papier	51	23,084 3	2,185 1	25,171 6	95,52	95,52	0,070	0,08
	52	23,078 6	2,223 2	25,200 3	95,43			
	53	23,654 5	2,046 3	25,610 9	95,61			
buničina	61	23,880 5	1,176 1	25,008 2	95,88	95,88	0,060	0,07
	62	23,442 1	1,243 2	24,633 2	95,81			
	63	23,233 6	1,231 6	24,415 4	95,96			

**Tab. č. 34:** Výsledky stanovenia sušiny predupravených lepeniek

lepenka s predúpravou č.	vzorok č.	m <sub>miska</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>m+v</sub> (g)	sušina (%)	sušina <sub>priemer</sub> (%)	smerodat. odchýlka	IS
2	01	22,780 1	1,086 6	23,823 3	96,01	95,99	0,011	0,02
	02	24,005 8	1,130 2	25,090 6	95,98			
3	11	23,360 9	1,053 1	24,380 8	96,85	96,93	0,083	0,12
	12	23,420 2	0,998 1	24,388 5	97,01			
4	21	23,055 6	1,332 2	24,339 3	96,36	96,37	0,015	0,02
	22	24,156 3	1,190 9	25,304 2	96,39			

Bol stanovený obsah sušiny v jednotlivých odpadových materiáloch a modelových surovinách upravených len mechanickou predúpravou mletím, výsledky vid'. tab. č. 33. Ďalej bol stanovený obsah sušiny v lepenke s rôznymi kombináciami predúpravy lepenky (použité kombinácie fyzikálnej a chemickej predúpravy sú zhrnuté v tab. č. 10). Výsledky stanovenia sušiny predupravených lepeniek sú v tab. č. 34.

Obsah sušiny sa vypočítal podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\%_{sušina} = \frac{(w_{kelimok+vzorok} - w_{kelimok})}{w_{vzorok}} \cdot 100$$

$w_{kelimok+vzorok}$  - hmotnosť kelímku so vzorkom po danej úprave

Obsahy sušiny v jednotlivých odpadových papieroch boli značne podobné. Obsah sušiny v ofset kartóne bol  $95,36 \pm 0,03$  % (najnižšia hodnota), v recyklovanom papieri  $95,65 \pm 0,01$  % v recyklovanom papieri s potlačou  $96,20 \pm 0,08$  % v papieri MYSol matný  $96,90 \pm 0,03$  % (najvyššia hodnota), v lepenke  $95,62 \pm 0,04$  %, vo filtračnom papieri  $95,52 \pm 0,08$  % a v buničine  $95,88 \pm 0,07$  % (čo korešponduje s údajom získaným od firmy PENTA, že buničina má obsahovať max. 8 % vody).

Obsahy sušiny v predupravenej lepenke č. 2, 3 a 4 boli mierne vyššie než v lepenke bez chemickej predúpravy ( $95,62 \pm 0,04$  %) a to:  $95,99 \pm 0,02$  % pre lepenku s predúpravou č. 2,  $96,93 \pm 0,12$  % pre lepenku s predúpravou č. 3 a  $96,37 \pm 0,02$  % pre lepenku s predúpravou č. 4.

### 9.1.6.2 Stanovenie popola

**Tab. č. 35:** Výsledky stanovenia popola odpadových papierov

papier	vzorok č.	m <sub>miska</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>m+v</sub> (g)	popol (%)	popol <sub>priemer</sub> (%)	smerodat. odchýlka	IS
ofset kartón	01	21,781 5	2,654 6	22,309 5	19,89	20,14	0,183	0,21
	02	20,418 8	1,753 6	20,773 5	20,23			
	03	16,919 9	2,541 6	17,436 2	20,31			
recyklovaný papier	11	19,578 8	2,209 9	20,111 3	24,10	24,06	0,080	0,09
	12	16,590 4	2,598 7	17,217 5	24,13			
	13	15,903 4	2,336 9	16,463 0	23,95			
recyklovaný papier - potlač	21	18,330 1	2,150 3	18,844 2	23,91	23,72	0,130	0,15
	22	17,609 7	1,804 6	18,036 2	23,63			
	23	18,831 0	2,185 2	19,347 4	23,63			
MYsol matný	31	20,088 5	2,302 0	21,001 1	39,64	39,65	0,251	0,28
	32	20,873 0	2,001 9	21,660 6	39,34			
	33	21,369 2	2,171 6	22,236 9	39,96			
lepenka	41	17,194 1	1,614 6	17,424 2	14,25	14,02	0,177	0,20
	42	19,661 5	1,473 4	19,867 4	13,97			
	43	18,806 9	1,853 5	19,063 1	13,82			
filtračný papier	51	21,231 4	1,785 2	21,235 9	0,25	0,23	0,014	0,02
	52	20,176 7	1,839 5	20,181 0	0,23			
	53	20,526 1	1,654 8	20,529 7	0,22			
buničina	61	19,156 4	1,235 0	19,156 9	0,04	0,05	0,009	0,01
	62	21,272 3	1,138 2	21,272 9	0,05			
	63	20,152 5	1,126 3	20,153 2	0,06			

**Tab. č. 36:** Výsledky stanovenia popola predupravených lepeniek

lepenka s predúpravou	vzorok č.	m <sub>miska</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>m+v</sub> (g)	popol (%)	popol <sub>priemer</sub> (%)	smerodat. odchýlka	IS
2	01	21,781 2	1,108 2	21,887 7	9,61	9,73	0,117	0,16
	02	20,418 8	0,822 9	20,499 8	9,84			
3	11	19,579 1	1,012 3	19,646 3	6,64	6,54	0,094	0,13
	12	16,590 5	1,015 5	16,656 0	6,45			
4	21	18,330 7	1,134 9	18,420 4	7,90	7,88	0,027	0,04
	22	17,610 4	1,037 0	17,691 8	7,85			

Bol stanovený obsah popola v jednotlivých odpadových materiáloch a modelových surovinách upravených len mechanickou predúpravou mletím, výsledky vid'. tab. č. 35. Ďalej bol stanovený obsah popola v lepenke s rôznymi kombináciami predúpravy lepenky (použit

kombinácie fyzikálnej a chemickej predúpravy sú zhrnuté v tab. č. 10). Výsledky stanovenia popola predupravených lepeniek sú v tab. č. 36.

Obsah popola sa vypočítal podľa nasledujúceho vzťahu:

$$\%_{\text{popol}} = \frac{(w_{\text{kelimok+vzorok}} - w_{\text{kelimok}})}{w_{\text{vzorok}}} \cdot 100$$

$w_{\text{kelimok+vzorok}}$  - hmotnosť kelímku so vzorkom po danej úprave

Obsah popola v jednotlivých materiáloch podáva informáciu o obsahu plnidiel v papieri, čím kvalitnejší je papier, tým väčší je obsah plnidiel. Všeobecne možno povedať, že ofsetové papiere a recyklované papiere sú značne plnené, lepenka neobsahuje veľké množstvo plnidiel, čo dokumentujú aj výsledky tohto stanovenia. Najnižší obsah popola bol v modelových surovinách:  $0,05 \pm 0,01 \%$  pre buničinu (čo korešponduje s údajom získaným od firmy PENTA, že buničina má obsahovať max  $0,15 \%$  popola) a  $0,23 \pm 0,02 \%$  pre filtračný papier. Najnižší obsah popola spomedzi odpadových surovín mala lepenka (obsah popola  $14,02 \pm 0,20 \%$ ) nasledovaná ofset kartónom (obsah popola  $20,14 \pm 0,21 \%$ ), recyklovaným papierom s potlačou (obsah popola  $23,72 \pm 0,15 \%$ ) a recyklovaným papierom (popol  $24,06 \pm 0,09 \%$ ). Najvyšší obsah popola  $39,65 \pm 0,28 \%$  mal papier MYsol matný.

Pri použití chemických predúprav lepenky dochádzalo k zníženiu obsahu popola v chemicky predupravenej lepenke v porovnaní s lepenkou upravenou len mletím. Pri použití predúpravy  $0,25 \%$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  (predúprava č. 2) došlo k zníženiu obsahu popola z  $14,02 \pm 0,20 \%$  na  $9,73 \pm 0,16 \%$ , pri použití kombinácie  $0,25 \%$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $2 \%$   $\text{HNO}_3$  (predúprava č. 3) k zníženiu obsahu popola na  $6,54 \pm 0,13 \%$  a použitie kombinácie  $0,25 \%$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $2 \%$   $\text{NaOH}$  (predúprava č. 4) k zníženiu obsahu popola na  $7,88 \pm 0,04 \%$ . Pri použití predúprav č. 3 a 4 teda došlo k značnejšiemu zníženiu obsahu popola ako pri použití predúpravy č. 2.

### 9.1.6.3 Stanovenie celulózy [45]

**Tab. č. 37:** Výsledky stanovenia obsahu celulózy v odpadových papieroch

papier	VZ č.	m <sub>fritaS4</sub> (g)	m <sub>fritaS3</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>fS4+v</sub> (g)	m <sub>fS3+v</sub> (g)	hrubá celul. (%)	celulózy v hrubej celulóze (%)	celul. (%)	celul. <sub>pr</sub> iemer (%)	IS
ofset kartón	01	13,212 5	29,002 7	0,774 0	13,739 8	29,014 2	68,13	97,82	66,64	66,60	0,06
	02	13,512 5	28,956 2	0,821 3	14,072 9	28,970 0	68,23	97,54	66,55		
recykl. p.	11	10,563 8	29,540 5	0,837 1	11,079 8	29,606 8	61,64	87,15	53,72	53,75	0,05
	12	12,365 8	28,665 4	0,813 0	12,865 9	28,728 2	61,51	87,44	53,79		
rec. p. - potlač	21	11,359 9	24,377 6	0,835 5	11,889 1	24,469 1	63,34	82,71	52,39	52,39	0,01
	22	11,409 8	24,523 0	0,823 5	11,932 0	24,613 7	63,41	82,63	52,40		
MYsol matný	31	21,307 5	27,161 2	0,803 0	21,694 3	27,239 5	48,17	79,76	38,42	38,45	0,04
	32	21,462 3	27,110 2	0,799 6	21,848 3	27,188 5	48,27	79,72	38,48		
lepenka	41	13,772 6	27,285 7	0,806 4	14,293 7	27,337 8	64,62	90,00	58,16	58,15	0,01
	42	14,005 2	27,285 7	0,822 3	14,536 5	27,338 9	64,61	89,99	58,14		
filtračný p.	51	12,397 5	27,838 9	0,777 4	13,120 8	27,845 5	93,04	99,09	92,19	92,23	0,05
	52	11,288 5	26,953 2	0,796 3	12,030 0	26,960 0	93,12	99,08	92,26		
buničina	61	11,584 5	28,533 1	0,811 9	12,353 5	28,546 3	94,72	98,28	93,09	93,10	0,02
	62	11,456 3	28,344 7	0,835 2	12,247 4	28,358 1	94,72	98,31	93,12		

**Tab. č. 38:** Výsledky stanovenia obsahu celulózy v predupravených lepenkách

lepenka s predúp.	VZ č.	m <sub>fritaS4</sub> (g)	m <sub>fritaS3</sub> (g)	m <sub>vzorok</sub> (g)	m <sub>fS4+v</sub> (g)	m <sub>fS3+v</sub> (g)	hrubá celul. (%)	celul. v hrubej celul. (%)	celul. (%)	celulóza priemer (%)	IS
2	01	47,928 7	47,913 7	0,756 5	48,426 8	47,958 5	65,84	91,00	59,92	59,88	0,06
	02	46,910 1	46,906 2	0,817 4	47,442 2	46,949 2	65,10	91,92	59,84		
3	11	24,384 0	24,383 0	0,710 0	24,917 7	24,436 6	75,17	89,96	67,62	67,68	0,08
	12	29,547 8	29,542 4	0,750 1	30,105 9	29,592 4	74,40	91,04	67,74		
4	21	27,838 6	27,839 6	0,779 9	28,423 7	27,897 1	75,02	90,17	67,65	66,68	1,34
	22	27,172 5	27,153 1	0,783 3	27,733 2	27,199 1	71,58	91,80	65,71		

Bol stanovený obsah celulózy v jednotlivých odpadových materiáloch a modelových surovinách upravených len mechanickou predúpravou mletím, výsledky vid'. tab. č. 37. Ďalej bol stanovený obsah celulózy v lepenke s rôznymi kombináciami predúpravy lepenky (použité kombinácie fyzikálnej a chemickej predúpravy sú zhrnuté v tab. č. 10). Výsledky stanovenia celulózy predupravených lepeniek sú v tab. č. 38.

Obsah celulózy sa vypočítal podľa nasledujúcich vzťahov:

$$\begin{aligned} \%_{\text{hrubá celulóza}} &= \frac{(w_{\text{frita S4+vzorok}} - w_{\text{frita S4}})}{w_{\text{vzorok}}} \cdot 100 \\ \%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}} &= 100 - \left( \frac{(w_{\text{frita S3+vzorok}} - w_{\text{frita S3}})}{(w_{\text{frita S4+vzorok}} - w_{\text{frita S4}})} \cdot 100 \right) \\ \%_{\text{celulóza}} &= \%_{\text{hrubá celulóza}} \cdot \%_{\text{celulózy v hrubej celulóze}} \end{aligned}$$

Modelové suroviny – obsahovali najviac celulózy zo všetkých sledovaných materiálov. Najviac,  $93,10 \pm 0,02$  % celulózy obsahovala buničina čo korešponduje s údajom získaným od firmy PENTA, že buničina má obsahovať min. 92 % celulózy. Filtračný papier obsahoval  $92,23 \pm 0,05$  % celulózy. Z odpadových papierov najviac celulózy obsahoval ofset kartón –  $66,60 \pm 0,06$  % nasledovaný lepenkou, obsah celulózy  $58,15 \pm 0,01$  %, recyklovaným papierom s obsahom celulózy  $53,75 \pm 0,05$  % a recyklovaným papierom s potlačou, obsah celulózy  $52,39 \pm 0,01$  % a najmenší obsah celulózy  $38,45 \pm 0,04$  % mal papier MYsol matný.

V procese chemickej predúpravy lepeniek došlo k navýšeniu obsahu celulózy v materiáli v porovnaní s materiálom upraveným len mechanicky. Pri použití predúpravy  $0,25$  %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (predúprava č. 2) došlo k zvýšeniu obsahu celulózy z  $58,15 \pm 0,01$  % na  $59,88 \pm 0,06$  %, pri použití kombinácie  $0,25$  %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $2$  %  $\text{HNO}_3$  (predúprava č. 3) k zvýšeniu obsahu celulózy na  $67,68 \pm 0,08$  % a použití kombinácie  $0,25$  %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a  $2$  %  $\text{NaOH}$  (predúprava č. 4) k zvýšeniu obsahu celulózy na  $66,68 \pm 1,34$  %. Pri použití predúprav č. 3 a 4 teda došlo k značnejšiemu zvýšeniu obsahu celulózy ako pri použití predúpravy č. 2.

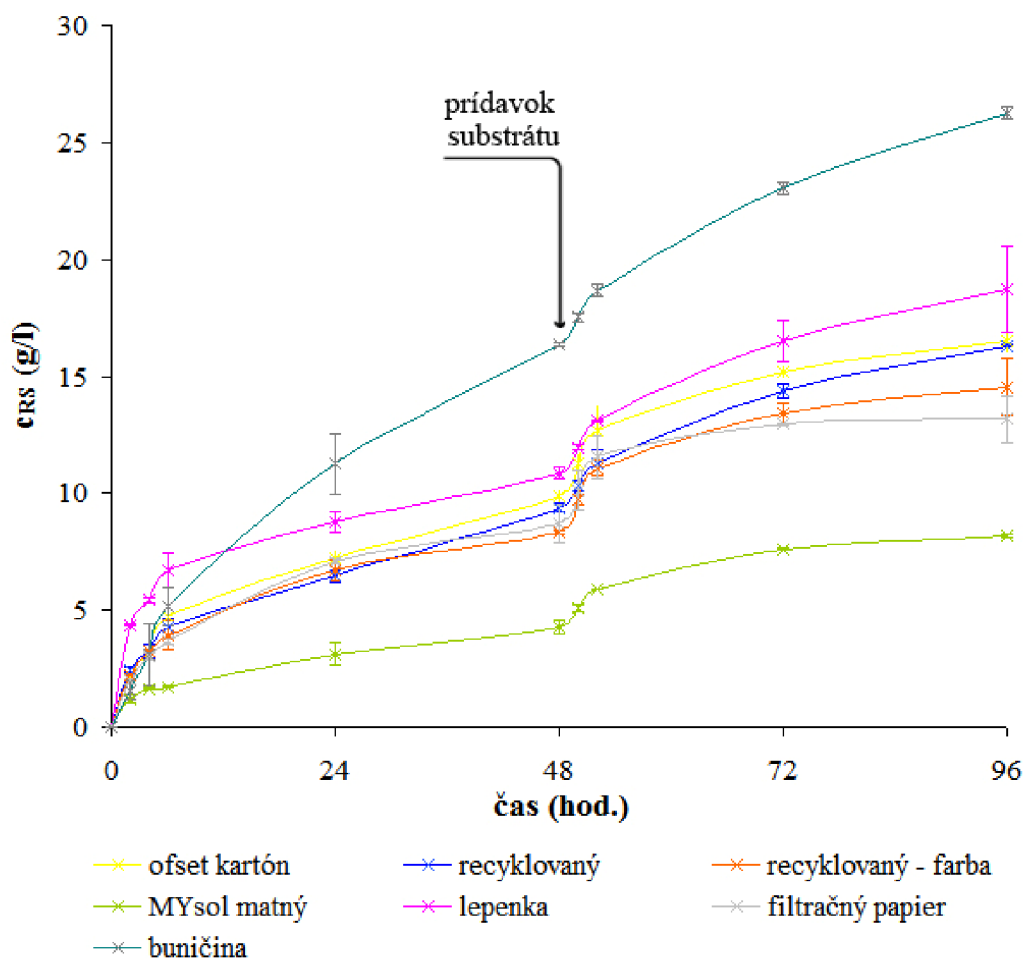


## 9.1.7 Enzymatická hydrolýza

### 9.1.7.1 Testovanie odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu

**Tab. č. 39:** Podmienky použité pri testovaní odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu – fed-batch proces, 96 hodín

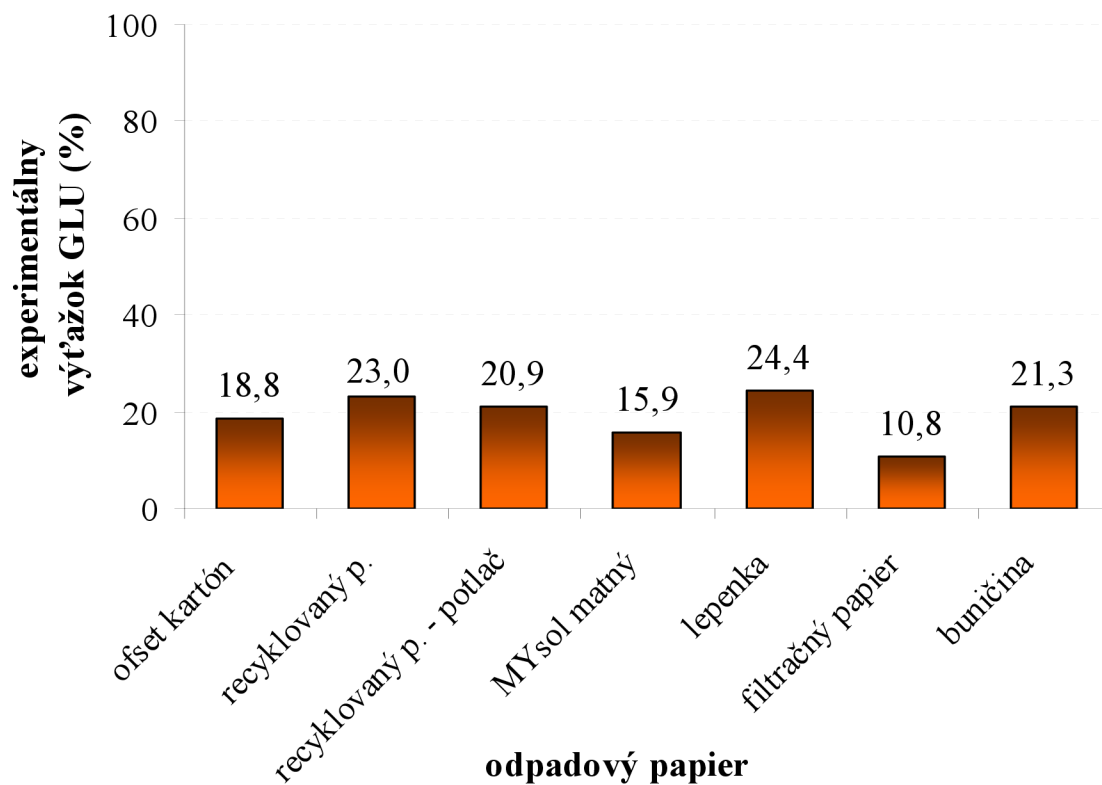
substrát	c <sub>s</sub> (% w/v)	m <sub>substrát</sub> (g)	V <sub>pufr</sub> (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – β-glukozidáza		tlmivý roztok	pH	teplota (°C)	mieš. (rpm)
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzým</sub> (μl)	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzým</sub> (μl)				
ofset kartón	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,2M	4,0	50	194
recykl. p.	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,2M	4,0	50	194
recykl. p. - potlač	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,2M	4,0	50	194
MYsol matný	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,2M	4,0	50	194
lepenka	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,05M	3,7	50	194
filtračný papier	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,05M	4,0	50	194
buničina	8	5,6 + 2,8	70	2	93	0,2	9,3	oct. 0,05M	4,5	50	194



**Graf č. 31:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri testovaní odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu – Fed-batch proces, 96 hodín

**Tab. č. 40:** Výsledky testovania odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu – fed-batch proces, 96 hodín

substrát	$c_{RS}$ (g/l) / 96 h	V (ml)	$m_{GLU}$ (g) / 96 h	$m_{papier}$ (g)	$m_{sušina}$ (g)	$m_{celul}$ (g)	teor. výťažok GLU (g)	exp. výťažok GLU (%)	$g_{GLU} /$ g papiera	$g_{GLU} /$ g sušiny	$g_{GLU} /$ g celul.
ofset kartón	16,51	67,5	1,11	8,4	8,01	5,33	5,93	18,8	0,13	0,14	0,21
recykl. p.	16,32	67,5	1,10	8,4	8,03	4,32	4,80	23,0	0,13	0,14	0,26
recykl. p. - potlač	14,55	67,5	0,98	8,4	8,08	4,23	4,70	20,9	0,12	0,12	0,23
MYsol matný	8,18	67,5	0,55	8,4	8,14	3,13	3,48	15,9	0,07	0,07	0,18
lepenka	18,73	67,5	1,26	8,4	8,03	4,67	5,19	24,4	0,15	0,16	0,27
filtračný papier	13,16	67,5	0,89	8,4	8,02	7,40	8,22	10,8	0,11	0,11	0,12
buničina	26,26	67,5	1,77	8,4	8,05	7,50	8,33	21,3	0,21	0,22	0,24



**Graf č. 32:** Závislosť experimentálneho výťažku enzymatickej hydrolýzy v % na použitom odpadovom papieri

Pri testovaní odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 39. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 96 hodín boli použité pre výpočet experimentálnych výťažkov GLU pri použití rôznych materiálov ako substrátu. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Ďalej boli vyhodnotené hmotnostné výťažky GLU na gram papiera, na gram sušiny papiera a na gram celulózy papiera. Výsledky testovania odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu sú zhrnuté v tab. č. 40.

Jednalo sa o fed-batch proces, na začiatku bolo dávkovaných 8 % w/v materiálu a po uplynutí 48 hodín bolo dávkovaných ďalších 4 % w/v substrátu (ako prídavok pevnej fáze). V dobe 48 h boli doplnené do každej banky 4 ml tlmivého roztoku, ktoré sa odparili v priebehu 48 hodín (zistené meraním objemu odparu). Na grafe č. 31 je možné vidieť typický priebeh hydrolýzy fed-batch procesu, kde po prídavku ďalšieho substrátu v čase 48 hod. sa výraznejšie zvýšila koncentrácia RS v priebehu krátkeho časového intervalu, čo dokumentujú stanovenia koncentrácie RS v časoch 50 a 52 hodín.

Najväčší experimentálny výťažok bol dosiahnutý u lepenky a bol 24,4 %, druhý najväčší výťažok s použitím recyklovaného papiera bol 23,0 %. Tretí najväčší výťažok bol dosiahnutý pri použití buničiny a bol 21,3 %. Najhoršie výťažky boli dosahované s použitím papiera MYsol matný (15,9 %) a filtračného papiera (10,8 %).

Porovnaním výťažkov pre dve varianty recyklovaných papierov (jedná sa o totožný papier, len jeden variant mal na cca 10 % povrchu farebnú potlač) je možné získať predstavu o účinku prítomnosti tlačiarenských farbív na činnosť enzýmov. Tlačiarenské farbivá spolu s lepidlami tvoria najčastejšie znečistenie odpadového papiera. S nepotlačeným variantom recyklovaného papiera sa podarilo dosiahnuť výťažok 23,0 %, s potlačeným 20,9 %. Rozdiel medzi dosiahnutými výťažkami za daných podmienok u týchto variant je 2,1 %, čo nie je veľa a teda prítomnosť farbív v odpadovej surovine má síce inhibičný účinok ale tento účinok nie je veľmi významný. V konkrétnych podmienkach to samozrejme bude závisieť od typu farbív a ich obsahu v odpadovom papieri.

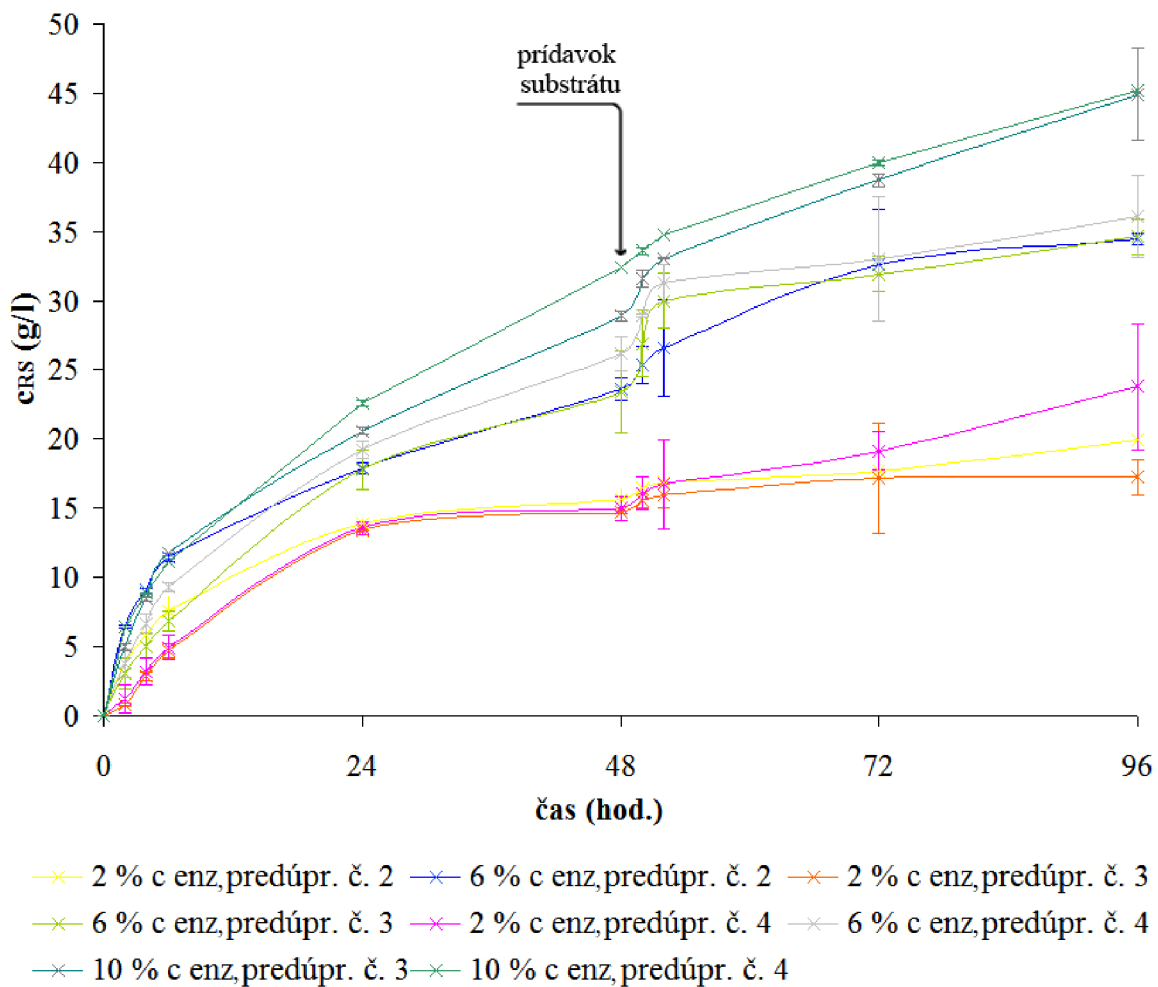
Výťažky enzymatickej hydrolýzy boli vo všeobecnosti nízke, je možné to pripísať nedostatočnej použitej koncentrácii enzýmov (2 % w/w na TS) s čím súvisel nedostatočný prístup enzýmov k substrátu z dôvodu nedostatočného miešania – materiál sedimentoval na dno baniek a premiešavaná bola len vrchná časť suspenzie. Podľa odbornej literatúry [5, 41, 47] je možné výťažky tiež navýšiť použitím predúpravy materiálu.

Pretože najvyšší exp. výťažok bol dosiahnutý s použitím lepenky, jedná sa zrejme o najperspektívnejší materiál z testovaných odpadových papierov. V ďalšom experimente bola použitá rôzne predupravená lepenka ako substrát s použitím vyšších koncentrácií enzýmov s cieľom zlepšiť výťažky hydrolýzy.

**9.1.7.2 Testovanie rôzne predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov**

**Tab. č. 41:** Podmienky použité pri testovaní rôzne predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov – fed-batch proces, 96 hodín

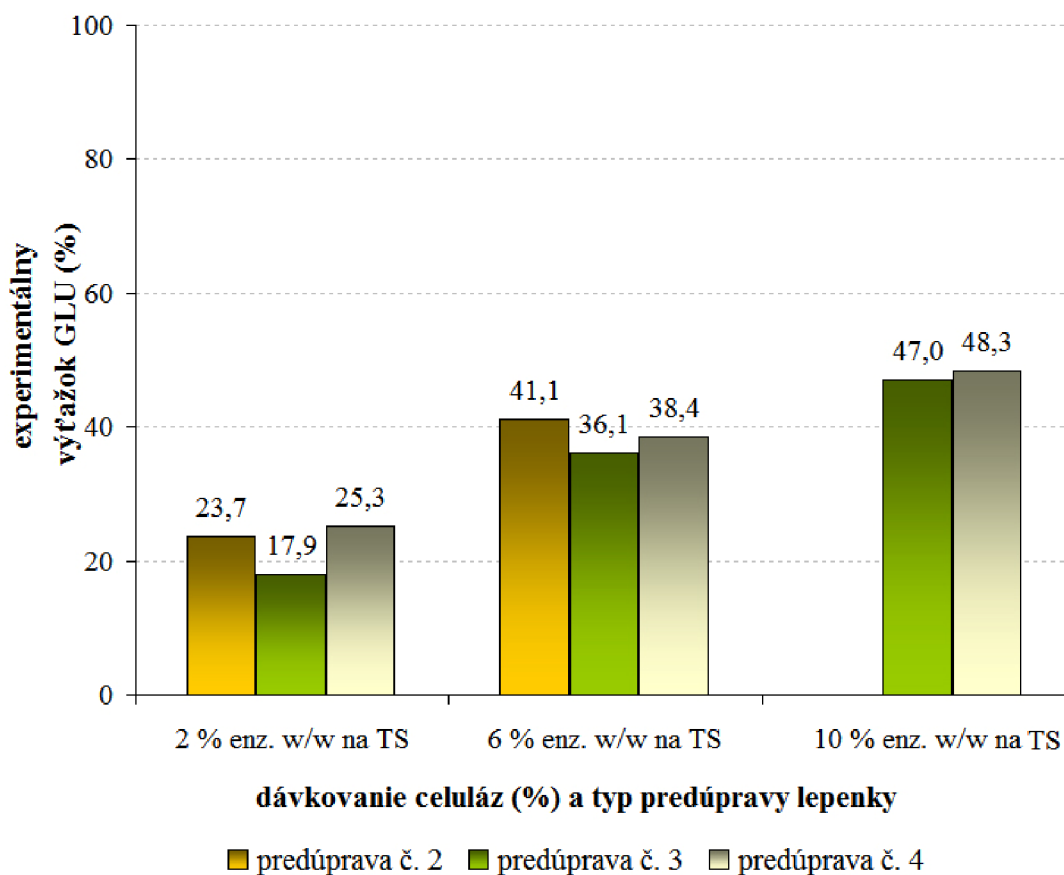
lepenka s predúpr. č.	c <sub>s</sub> (% w/v)	m <sub>substrát</sub> (g)	V <sub>puf</sub> (ml)	NS50013 – celul. komplex		NS50010 – β-glukozidáza		tlmivý roztok	pH	teplota (°C)	mieš. (rpm)
				dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzym</sub> (μl)	dávkovanie enzýmu (% w/w na TS)	V <sub>enzym</sub> (μl)				
2	8	4,8 + 2,4	60	2	80	0,2	8	oct. 0,05M	4,5	50	194
2	8	4,8 + 2,4	60	6	240	0,6	24	oct. 0,05M	4,5	50	194
3	8	4,8 + 2,4	60	2	80	0,2	8	oct. 0,05M	4,5	50	194
3	8	4,8 + 2,4	60	6	240	0,6	24	oct. 0,05M	4,5	50	194
4	8	4,8 + 2,4	60	2	80	0,2	8	oct. 0,05M	4,5	50	194
4	8	4,8 + 2,4	60	6	240	0,6	24	oct. 0,05M	4,5	50	194
3	8	4,8 + 2,4	60	10	400	1,0	40	oct. 0,05M	4,5	50	194
4	8	4,8 + 2,4	60	10	400	1,0	40	oct. 0,05M	4,5	50	194



**Graf č. 33:** Závislosť koncentrácie RS na čase prebiehajúcej enzymatickej hydrolýzy pri testovaní rôzne predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov – fed-batch proces, 96 hodín

**Tab. č. 42:** Výsledky testovania rôzne predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov – fed-batch proces, 96 hodín

lepenka s predúpr. č.	$c_{RS}$ (g/l) / 96 h	V (ml)	$m_{GLU}$ (g) / 96 h	$m_{papier}$ (g)	$m_{sušina}$ (g)	$m_{celul}$ (g)	teor. výťažok GLU (g)	exp. výťažok GLU (%)	$g_{GLU} / g$ papiera	$g_{GLU} / g$ sušiny	$g_{GLU} / g$ celul.
2	19,95	54,6	1,09	7,2	6,91	4,14	4,60	23,7	0,15	0,16	0,26
2	34,47	54,8	1,89	7,2	6,91	4,14	4,60	41,1	0,26	0,27	0,46
3	17,24	54,6	0,94	7,2	6,98	4,72	5,25	17,9	0,13	0,13	0,20
3	34,61	54,8	1,90	7,2	6,98	4,72	5,25	36,1	0,26	0,27	0,40
4	23,79	54,6	1,30	7,2	6,94	4,63	5,14	25,3	0,18	0,19	0,28
4	36,06	54,8	1,98	7,2	6,94	4,63	5,14	38,4	0,27	0,28	0,43
3	44,92	54,9	2,47	7,2	6,98	4,72	5,25	47,0	0,34	0,35	0,52
4	45,15	54,9	2,48	7,2	6,94	4,63	5,14	48,3	0,34	0,36	0,54



**Graf č. 34:** Závislosť experimentálneho výťažku enzymatickej hydrolýzy v % na použití rôznych predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov

Pri testovaní rôzne predupravených odpadových lepeniek ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu s použitím rôznych koncentrácií enzýmov boli použité podmienky zhrnuté v tabuľke č. 41. Hodnoty koncentrácií RS získané za časový úsek 96 hodín boli použité pre výpočet experimentálnych výťažkov GLU pri použití rôznych materiálov ako substrátu. Pre potreby výpočtu bola použitá aproximácia, že koncentrácia RS sa rovná koncentrácii glukózy, pretože koncentrácia glukózy nebola stanovovaná. Ďalej boli vyhodnotené hmotnostné výťažky GLU na gram papiera, na gram sušiny papiera a na gram celulózy papiera. Výsledky testovania odpadových a modelových materiálov ako substrátu pre enzymatickú hydrolýzu sú zhrnuté v tab. č. 42.

Jednalo sa opäť o fed-batch proces, na začiatku bolo dávkaných 8 % w/v materiálu a po uplynutí 48 hodín bolo dávkaných ďalších 4 % w/v substrátu (ako pevná fáza). Počas pokusu neboli dopĺňané odparené objemy tlmivých roztokov. Na grafe č. 33 je možné vidieť typický priebeh hydrolýzy fed-batch procesu, kde po prídavku ďalšieho substrátu v čase 48 hod. sa výraznejšie zvýšila koncentrácia RS v priebehu krátkeho časového intervalu, čo dokumentujú stanovenia koncentrácie RS v časoch 50 a 52 hodín.

Pomocou hodnôt experimentálnych výťažkov hydrolýzy pri dávkaní celulózy 2 % w/w na TS je možné porovnať účinnosť jednotlivých predúprav pre lepenku. Experimentálny výťažok pri použití predúpravy č. 1 (mletie) bol 24,4 %. Vyšší výťažok sa podarilo dosiahnuť len

s použitím predúpravy č. 4 (0,25 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2 %  $\text{NaOH}$ ) a to 25,3 %. Výťažok pri použití predúpravy č. 2 (0,25 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) bol 23,7 %, najmenší výťažok bol dosahovaný s použitím predúpravy č. 3 0,25 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$  a 2 %  $\text{HNO}_3$  a to 17,9 %. Chemická predúprava materiálu teda nespĺnila očakávanie radikálnejšieho zvýšenia výťažkov hydrolýzy, pri 2 % dávkovaní celulózy sa podarilo zvýšiť výťažok oproti mechanicky predupravenej lepenke len s použitím predúpravy č. 4 a to len o 0,9 %.

Dávkovanie celulózy 2 % w/w na TS sa ukázalo ako nedostatočné pri dlhodobejšej enzymatickej hydrolýze. Zvýšenie výťažkov sa podarilo dosiahnuť zvýšením dávkovania celulózy na 6 a 10 % w/w na TS. Najvyšší výťažok bol dosiahnutý pri 10 % dávkovaní celulózy s použitím predúpravy č. 4 (pozn. pri 10 % dávkovaní neboli overované predúpravy č. 1 a 2) a bol 48,3 %. Jedná sa však o stále veľmi neuspokojivý výťažok a pokiaľ by mal byť proces enzymatickej hydrolýzy ekonomicky zaujímavou cestou, je nutné dosahovať značne vyššie výťažky hydrolýzy.



## 10 ZÁVER

Firmou Novozymes<sup>®</sup> bol poskytnutý testovací balíček enzýmov Novozymes<sup>®</sup> Biomass kit. Z tohto balíčka boli testované enzýmové preparáty NS50013 (celulolytický komplex) a NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza) pre proces enzymatickej hydrolýzy s použitím odpadových papierov ako substrátu.

Najskôr bolo nutné vybrať najvhodnejšie parametre hydrolýzy, bola vykonaná hrubá optimalizácia typu a sily tlmivých roztokov, pH, koncentrácie substrátu a enzýmov, teploty a intenzity miešania pomocou modelových substrátov – filtračného papiera a buničiny. Vhodné pH a sila tlmivých roztokov museli byť vyhodnotené pre všetky typy používaných predupravených materiálov.

Vo všeobecnosti sa javí najlepšie použitie **octanového tlmivého roztoku** s pH a silou nastavenou tak aby **pH** dekantovaného **výluhu** po hydrolýze spadalo do oblasti **4,43 – 4,93**. Pre konkrétne používané materiály bolo najlepšie použitie octanových tlmivých roztokov zhrnutých v tabuľke č. 43.

**Tab. č. 43:** Najvhodnejšie pH a molarity octanových tlmivých roztokov pre jednotlivé použité predupravené materiály

materiál	predúprava č.	molarita (mol/l)	pH
ofset kartón	1	0,20	4,0
recyklovaný p.	1	0,20	4,0
recyklovaný p. - potlač	1	0,20	4,0
MYsol matný	1	0,20	4,0
filtračný papier	1	0,05	4,0
buničina	1	0,05	4,5
lepenka	1	0,05	3,7
lepenka	2	0,05	4,5
lepenka	3	0,05	4,5
lepenka	4	0,05	4,5

Najvhodnejšia intenzita miešania na používanej temperovanej trepačke bola **194 rpm**. Pri použití iného typu miešania je nutné znovu overiť vplyv intenzity miešania na výsledky hydrolýzy.

Bolo usúdené, že najvhodnejšou použitou teplotou je **50 °C**. Najvhodnejšia **koncentrácia substrátu** bola **8 % w/v** (testované na buničine). Pre dávkovanie enzýmov sa po porovnaní špecifických aktivít enzýmov ako najlepšia javila hodnota 2 % w/w na TS preparátu NS50013 (celulolytický komplex) s prídavkom 0,2 % w/w na TS preparátu NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza), ktorá sa však v 96 hodinových procesoch hydrolýzy ukázala ako nedostatočná. Zreteľne vyššie výťažky boli dosahované pri dávkovaní enzýmov 6 a 10 % w/w na TS preparátu NS50013 (celulolytický komplex) s prídavkom 0,6 a 1,0 % w/w na TS preparátu NS50010 ( $\beta$ -glukozidáza).

Po získaní predstavy o vhodných podmienkach pre činnosť celulolytického komplexu bolo možné prikočiť k testovaniu jednotlivých odpadových papierov v procese enzymatickej hydrolýzy.

Pre vyhodnotenie procesu hydrolýzy bolo nutné vykonať základnú kompozičnú analýzu použitých substrátov. **Obsah sušiny** sa pohyboval u všetkých použitých materiáloch v oblasti **95,36 – 96,93 %** a výrazne sa nelíšil u jednotlivých papierov.

**Obsah popola**, ktorý súvisí s obsahom plnidiel v papieri sa pohyboval u odpadových papierov v rozmedzí **14,02 – 39,65 %**. Najnižší obsah popola bol u lepenky, najvyšší u papiera MYSol matný. U chemicky predupravenej lepenky klesol obsah popola pri použití predúpravy 0,25 %  $H_3PO_4$  (predúprava č. 2) z  $14,02 \pm 0,20 \%$  na  $9,73 \pm 0,16 \%$ , pri použití kombinácie 0,25 %  $H_3PO_4$  a 2 %  $HNO_3$  (predúprava č. 3) a na  $6,54 \pm 0,13 \%$  a použití kombinácie 0,25 %  $H_3PO_4$  a 2 %  $NaOH$  (predúprava č. 4) na  $7,88 \pm 0,04 \%$ .

**Obsah celulózy** sa pohyboval u všetkých chemicky neupravovaných použitých odpadových materiáloch v oblasti **38,45 – 66,60 %**. Najvyšší obsah celulózy bol u ofset kartónu, najnižší u papiera MYSol matný. U chemicky predupravenej lepenky stúpol obsah celulózy pri použití predúpravy 0,25 %  $H_3PO_4$  (predúprava č. 2) z  $58,15 \pm 0,01 \%$  na  $59,88 \pm 0,06 \%$ , pri použití kombinácie 0,25 %  $H_3PO_4$  a 2 %  $HNO_3$  (predúprava č. 3) na  $67,68 \pm 0,08 \%$  a použití kombinácie 0,25 %  $H_3PO_4$  a 2 %  $NaOH$  (predúprava č. 4) na  $66,68 \pm 1,34 \%$ .

Bola vykonaná **Fed-batch enzymatickú hydrolýza s 2 % w/w** na TS dávkovaním preparátu **NS50013** s použitím mletím predupravených odpadových papierov. **Najvyšší experimentálny výťažok 24,4 %** bol dosiahnutý u **lepenky**, ktorá bola vyhodnotená ako najperspektívnejší materiál z testovaných odpadových papierov. Na základe porovnania experimentálnych výťažkov potlačeného (20,9 %) a nepotlačeného (23,0 %) recyklovaného papiera bolo usúdené, že **prítomnosť farbív** v odpadovej surovine **má síce inhibičný účinok** ale tento účinok **nie je veľmi významný**.

Lepenka bola podrobená rôznym kombináciám chemickej predúpravy a takto predupravené materiály slúžili ako substrát pre **Fed-batch enzymatická hydrolýzu s 2 %, 6 % a 10 % w/w** na TS dávkovaním preparátu NS50013. Chemická predúprava materiálu nespĺnila očakávaní radikálnejšieho zvýšenia výťažkov hydrolýzy, pri 2 % dávkovaní celuláz sa podarilo zvýšiť výťažok oproti mechanicky predupravenej lepenke len s použitím predúpravy č. 4 a to len o 0,9 %. **Zvýšenie výťažkov** sa podarilo dosiahnuť **zvýšením dávkovania celuláz na 6 a 10 % w/w na TS**. **Najvyšší výťažok** bol dosiahnutý pri **10 % dávkovaní celuláz** s použitím **predúpravy č. 4** (pozn. pri 10 % dávkovaní neboli overované predúpravy č. 1 a 2) a bol **48,3 %**.

Je nutné podotknúť, že experimenty prebiehali len v malých objemoch a pre prevedenie výsledkov do praxe je nutné vykonanie ďalších experimentov vo väčších objemoch reaktorov a najmä s použitím vhodného a dostatočného intenzívneho miešania suspenzie.

Pre vyhodnotenie najvhodnejšieho dávkovania enzýmov by bolo nutné vytvoriť ekonomický model, porovnať náklady pri rôznych dávkovaniach so ziskami získanými z predaja etanolu po procese fermentácie, pretože cena enzýmov tvorí značnú časť nakladov v procese enzymatickej hydrolýzy odpadového papiera.

Pre priemyselné použitie je nutné dosiahnuť značne vyšších výťažkov. Zvýšenie výťažkov by zrejme bolo možné dosiahnuť spojením hydrolýzneho kroku s krokom fermentačným použitím simultánnej sacharifikácie a fermentácie (SSF). Použitím SSF dochádza k redukcii inhibície celulolytických enzýmov produktom, pretože produkt je kontinuálne utilizovaný vhodným typom najlepšie termofilného MO za tvorby etanolu. Proces výberu vhodného MO sa musí riadiť pH a teplotou procesu, MO musí mať vysokú produkčnú schopnosť etanolu a musí byť odolný voči jeho vyšším koncentráciám.

## 11 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

[1] Pastorek, Z., Kára, J., Jevič, P. *Biomasa : obnovitelný zdroj energie*. Praha : FCC Public, 2004. 288 s. ISBN 80-86534-06-5.

[2] Directive 2003/30/EC of the european parliament and of the council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport. *Official Journal of the European Union* [online]. 2003 [cit. 2008-02-15], s. L 123/42-L 123/46. Dostupný z WWW: <[http://ec.europa.eu/energy/res/legislation/doc/biofuels/en\\_final.pdf](http://ec.europa.eu/energy/res/legislation/doc/biofuels/en_final.pdf)>.

[3] Pražák, V. Motorová paliva a biopaliva. *Konference REOTRIB 2007* [online]. 2007 [cit. 2008-02-10]. Dostupný z WWW: <[http://www.ceskarafinerska.cz/data/publications/motorova\\_paliva\\_a\\_biopaliva.pdf](http://www.ceskarafinerska.cz/data/publications/motorova_paliva_a_biopaliva.pdf)>.

[4] Piccolo, Ch., Bezzo, F. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2008 [cit. 2009-02-13]. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V22-4TSC3W4-1-1&\\_cdi=5690&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=10%2F26%2F2008&\\_sk=999999999&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=c1e08409a1b2498aeba742f616b45a77&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V22-4TSC3W4-1-1&_cdi=5690&_user=640830&_orig=search&_coverDate=10%2F26%2F2008&_sk=999999999&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=c1e08409a1b2498aeba742f616b45a77&ie=/sdarticle.pdf)>.

[5] Sun, Y., Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* [online]. 2002, no. 83 [cit. 2008-02-13], s. 1-11. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-44NM064-2-8&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=05%2F31%2F2002&\\_sk=999169998&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkzV&md5=8589acd5f475b6d07edc4b0a32b588f6&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-44NM064-2-8&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=05%2F31%2F2002&_sk=999169998&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkzV&md5=8589acd5f475b6d07edc4b0a32b588f6&ie=/sdarticle.pdf)>.

[6] Petráš, P. Biomasa : Kvapalné biopalivá [online]. 14.11.2006 [cit. 2009-07-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.zdruzeniepcola.org/view.php?cisloclanku=2006111409>>.

[7] Directive 2001/77/EC of the european parliament and of the council of 27 September 2001 on the promotion of electricity produced from renewable energy sources in the internal electricity market. *Official Journal of the European Communities* [online]. 2001 [cit. 2008-02-15], s. L 283/33-L 283/40. Dostupný z WWW: <[http://www.erneuerbare-energien.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/richtlinie\\_erneuerbare\\_en.pdf](http://www.erneuerbare-energien.de/files/pdfs/allgemein/application/pdf/richtlinie_erneuerbare_en.pdf)>.

[8] Ministerstvo životního prostředí ČR. Směrnice č. 23 - 2006 s požadavky pro propůjčení ochranné známky : Výrobky nasávané z papíroviny [online]. 2006 [cit. 2009-07-10]. Dostupný z WWW: <[http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/\\$pid/MZPMSFHMV9DV/\\$FILE/c23-2006%20\\_vyrobky\\_nasavane\\_z\\_papiroviny.pdf](http://www.cenia.cz/web/www/web-pub2.nsf/$pid/MZPMSFHMV9DV/$FILE/c23-2006%20_vyrobky_nasavane_z_papiroviny.pdf)>.

- [9] M., Bajus. Biofuels second generation : Biopalivá druhej generácie. *Petroleum & Coal* [online]. 2008, vol. 3, no. 50, [cit. 2010-05-03]. Dostupný z WWW: <[http://www.vurup.sk/pc/vol50\\_2008/issue3/pdf/pc\\_3\\_2008\\_bajus.pdf](http://www.vurup.sk/pc/vol50_2008/issue3/pdf/pc_3_2008_bajus.pdf)>. ISSN 1337-7027.
- [10] Šulák, M., Šmogrovičová, D. Bioetanol : súčasné trendy vo výskume a v praxi. *Chem. Listy* [online]. 2008, č. 102 [cit. 2008-02-18], s. 108-115. Dostupný z WWW: <[http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_02\\_108-115.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_02_108-115.pdf)>.
- [11] *Bunková stena : Chemické zloženie bunkovej steny* [online]. c2009 [cit. 2010-05-03]. Bioweb. Dostupný z WWW: <<http://www.bioweb.genezis.eu/?cat=2&file=bunkstena>>.
- [12] M. M., Campbell; R. R., Sederof. Variation in lignin content and composition : Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol* [online]. 1996, no. 110, [cit. 2010-05-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/110/1/3.pdf>>.
- [13] Obšil, T. Struktura proteinů a funkce enzymů [online]. [2005] [cit. 2009-07-19]. Dostupný z WWW: <<http://www.otvorenaveda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Chemie/28obsil.pdf>>.
- [14] V., Horváthová; A., Godány; E., Šturdík. Hydrolyza kukuričného škrobu rekombinantnou termostabilnou  $\alpha$ -amylázou z *thermococcus hydrothermalis*. *Nova Biotechnologica* [online]. 2004, č. 1, [cit. 2010-05-03]. Dostupný z WWW: <[http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/journal\\_nova\\_biotechnologica/revue\\_nova\\_biotechnologica\\_4\\_1/09\\_Horvathova.pdf](http://fpv.ucm.sk/katedry/biotechnolog/journal_nova_biotechnologica/revue_nova_biotechnologica_4_1/09_Horvathova.pdf)>.
- [15] *Biotechnology : A multi volume comprehensive treatise*. Ed. by H.-J. Rehm and G. Reed. 2nd completely rev. edition. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH, 1996. 739 s. ISBN 3-527-28310-2.
- [16] Váňa, J., Kratochvíl, Z.: Vývoj technologie výroby bioetanolu ze slámy v České republice úspěšně ukončen. *Biom.cz* [online]. 2002-08-19 [cit. 2010-05-03]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyvoj-technologie-vyroby-bioetanolu-ze-slamy-v-ceske-republice-uspesne-ukoncen>>. ISSN: 1801-2655.
- [17] Novozymes<sup>®</sup>. *Novozymes<sup>®</sup> : Cellic product brochure* [online]. c2009 [cit. 2010-05-03]. The key to Novozymes' cellulosic ethanol inovations. Dostupné z WWW: <[http://www.bioenergy.novozymes.com/files/documents/Final%20Cellic%20Product%20Brochure\\_29Jan2010.pdf](http://www.bioenergy.novozymes.com/files/documents/Final%20Cellic%20Product%20Brochure_29Jan2010.pdf)>.
- [18] Genencor. *Genencor Introduces Accellerase<sup>®</sup> DUET* [online]. 2010-15-02 [cit. 2010-05-03]. Products & Services. Dostupné z WWW: <[http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/products\\_and\\_services/new\\_s/pressrelease\\_509\\_en.htm](http://www.genencor.com/wps/wcm/connect/genencor/genencor/products_and_services/new_s/pressrelease_509_en.htm)>.

- [19] Szczodrak, J., Fiedurek, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy* [online]. 1996, vol. 10, no. 5/6 [cit. 2009-02-19], s. 367-375. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V22-3VTWBFC-G-3&\\_cdi=5690&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=12%2F31%2F1996&\\_sk=99989994&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=8f7077462675c6ab48134bb2c602bc00&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V22-3VTWBFC-G-3&_cdi=5690&_user=640830&_orig=search&_coverDate=12%2F31%2F1996&_sk=99989994&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=8f7077462675c6ab48134bb2c602bc00&ie=/sdarticle.pdf)>.
- [20] Lynd, L. R., et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* [online]. 2002, vol. 66, no. 3 [cit. 2009-12-16], s. 506-577. Dostupný z WWW: <<http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/66/3/506?view=long&pmid=12209002>>.
- [21] Hrázský, J., Král, P. *Využití dřevních a jiných lignocelulozových odpadů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. 98 s. ISBN 80-7157-403-1.
- [22] T., Foyle; L., Jennings; P., Mulcahy. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology* [online]. 2007, 98, [cit. 2010-03-25]. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6V24-4MGVJ12-1&\\_user=640830&\\_coverDate=11%2F30%2F2007&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1267079148&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000032308&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=640830&md5=38d0f46093934e1787756e014cc9b0bb](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6V24-4MGVJ12-1&_user=640830&_coverDate=11%2F30%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1267079148&_rerunOrigin=google&_acct=C000032308&_version=1&_urlVersion=0&_userid=640830&md5=38d0f46093934e1787756e014cc9b0bb)>.
- [23] Zhang, Y. - H. P., Himmel, M. E., Mielenz, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* [online]. 2006, no. 24 [cit. 2010-02-19], s. 452-481. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6T4X-4JK4DBC-1-D&\\_cdi=4986&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=10%2F31%2F2006&\\_sk=999759994&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=a60b0adda0a31e7153da7e4911927325&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T4X-4JK4DBC-1-D&_cdi=4986&_user=640830&_orig=search&_coverDate=10%2F31%2F2006&_sk=999759994&view=c&wchp=dGLzVtz-zSkWb&md5=a60b0adda0a31e7153da7e4911927325&ie=/sdarticle.pdf)>.
- [24] Marga, F., et al. Cell wall extension results in the coordinate separation of parallel microfibrils: evidence from scanning electron microscopy, *Plant Journal*, 2005, Vol. 43, pp. 181-190
- [25] Deguchi, S., Tsujii, K., Horikoshi, K.: Cooking cellulose in hot and compressed water, *Chemical Communications*, 2006, Vol. 31, pp. 3293-3295
- [26] *Zpráva o životním prostředí České republiky v roce 2007*. Ministerstvo životního prostředí České republiky. 2007-. Dostupný z WWW: <[http://www.env.cz/C1257458002F0DC7/cz/zprava\\_zp\\_cr\\_07/\\$FILE/OPZP-Zprava\\_o\\_ZP\\_2007\\_plne\\_zneni-20081023.pdf](http://www.env.cz/C1257458002F0DC7/cz/zprava_zp_cr_07/$FILE/OPZP-Zprava_o_ZP_2007_plne_zneni-20081023.pdf)>.

- [27] *Eko-kom : Průvodce systémem sdruženého plnění povinností zpětného odběru a využití odpadu z obalů*. Praha : [s.n.], 2007. 15 s. Dostupný z WWW: <[www.ekokom.cz/assets/Klienti/Pr\\_vodce\\_2006\\_novela.doc](http://www.ekokom.cz/assets/Klienti/Pr_vodce_2006_novela.doc)>.
- [28] Obce a průmysl: spolupráce při recyklaci obalových odpadů. *Odpady*. 2009, únor, s. 16.
- [29] Slábnoucí trh odpadů ohrožuje komunální systémy. *Odpady*. 2009, leden, s. 17.
- [30] Finanční krize dopadla i na odpady!. *Odpady*. 2009, leden, s. 10-11.
- [31] J., Tymich. Prohlubuje se rozdíl nabídky a poptávky. *Odpady*. 2009, leden, s. 21.
- [32] Kocman, J. H. *Médium papír*. Brno : VUTIUM, 2004. 87 s. ISBN 80-214-2374-2.
- [33] Hrázský, J., Král, P. *Výroba vláknin a papíru*. 1. vyd. Brno : MZLU, 1999. 218 s. ISBN 80-7157-355-8.
- [34] Mussatto, S. I., et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2008, no. 43 [cit. 2009-10-13], s. 124-129. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6TG1-4R5F1V5-3-5&\\_cdi=5241&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=08%2F05%2F2008&\\_sk=999569997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWA&md5=6405d5a3df50ff18df70cbcffd3a0d2e&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TG1-4R5F1V5-3-5&_cdi=5241&_user=640830&_orig=search&_coverDate=08%2F05%2F2008&_sk=999569997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWA&md5=6405d5a3df50ff18df70cbcffd3a0d2e&ie=/sdarticle.pdf)>.
- [35] van Wyk, J.P.H. Hydrolysis of pretreated paper materials by different concentrations of cellulase from *Penicillium funiculosum*. *Bioresource Technology* [online]. 1999, no. 69 [cit. 2009-04-18], s. 269-273. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-3XM8NFV-C-1&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=09%2F30%2F1999&\\_sk=999309996&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWb&md5=195df591c4725678165f234f1ed4595f&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-3XM8NFV-C-1&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=09%2F30%2F1999&_sk=999309996&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWb&md5=195df591c4725678165f234f1ed4595f&ie=/sdarticle.pdf)>.
- [36] van Wyk, J.P.H. Saccharification of paper products by cellulase from *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma reesei*. *Biomass and Bioenergy* [online]. 1999, no. 16 [cit. 2009-04-18], s. 239-242. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V22-3VY0BKK-6-5&\\_cdi=5690&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=03%2F31%2F1999&\\_sk=999839996&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=77afa4069be7662adb8fb1db6f4cb5b5&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V22-3VY0BKK-6-5&_cdi=5690&_user=640830&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F1999&_sk=999839996&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=77afa4069be7662adb8fb1db6f4cb5b5&ie=/sdarticle.pdf)>.
- [37] van Wyk, J.P.H. Paper Hydrolysis by Cellulase from *Penicillium Funiculosum* and *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology* [online]. 1998, no. 63 [cit. 2009-04-18], s. 275-277. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-3SYR74-T-1&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=03%2F31%2F1998&\\_sk=999369](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-3SYR74-T-1&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F1998&_sk=999369)>.

996&view=c&wchp=dGLbVlb-  
zSkWb&md5=55f1a8a6f8ac1abcb223b9c21f121461&ie=/sdarticle.pdf>.

[38] van Wyk, J.P.H., Mohulatsi, M. Biodegradation of wastepaper by cellulase from *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology* [online]. 2003, no. 86 [cit. 2009-04-18], s. 21-23. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-46RKN57-1-3&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=01%2F31%2F2003&\\_sk=999139998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=ccc923290a3f1c9224356bc41495e1c5&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-46RKN57-1-3&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=01%2F31%2F2003&_sk=999139998&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkzS&md5=ccc923290a3f1c9224356bc41495e1c5&ie=/sdarticle.pdf)>.

[39] van Wyk, J.P.H., Mohulatsi, M. Utilization of used paper materials as a renewable resource for bioproduct development. *Australasian Biotechnology* [online]. 2001, vol. 11, no. 5 [cit. 2009-04-18], s. 38-39. Dostupný z WWW: <<http://www.bioline.org.br/request?au01065>>.

[40] Park, E. Y., Ikeda, Y., Okuda, N. Empirical evaluation of cellulase on enzymatic hydrolysis of waste office paper. *Biotechnol. Bioprocess* [online]. 2002, no. 7 [cit. 2009-10-13], s. 268-274. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/545w701346314518/>>.

[41] T., Nikolov, et al. An effective method for bioconversion of delignified waste-cellulose fibers from the paper industry with a cellulase complex. *Bioresource Technology* [online]. 2000, no. 71, [cit. 2010-04-26]. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-3XDHGD0-1-3&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=01%2F31%2F2000&\\_sk=999289998&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWb&md5=e78c0b2a3d9847f8ae6c25b3bc6af4ab&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-3XDHGD0-1-3&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=01%2F31%2F2000&_sk=999289998&view=c&wchp=dGLbVtz-zSkWb&md5=e78c0b2a3d9847f8ae6c25b3bc6af4ab&ie=/sdarticle.pdf)>.

[42] P., Alvira, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. *Bioresource Technology* [online]. 2010, no. 101, [cit. 2010-04-26]. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-4Y1WK1B-2-1&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_pii=S0960852409015983&\\_orig=search&\\_coverDate=07%2F31%2F2010&\\_sk=998989986&view=c&wchp=dGLbVlz-zSkzS&md5=a88af892a4201e4cac1a4e3770c22e7f&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-4Y1WK1B-2-1&_cdi=5692&_user=640830&_pii=S0960852409015983&_orig=search&_coverDate=07%2F31%2F2010&_sk=998989986&view=c&wchp=dGLbVlz-zSkzS&md5=a88af892a4201e4cac1a4e3770c22e7f&ie=/sdarticle.pdf)>.

[43] O. F., Castellanos; A. P., Sinitsyn; E. YU., Vlasenko. Evaluation of hydrolysis conditions of cellulosic materials by penicillium cellulase. *Bioresource Technology* [online]. 1995, 52, [cit. 2010-04-06]. Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MIimg&\\_imagekey=B6V24-3YXC0D0-G-1&\\_cdi=5692&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=12%2F31%2F1995&\\_sk=999479997&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=fbf5ddd998ece1b5bdec4b3093862ba4&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6V24-3YXC0D0-G-1&_cdi=5692&_user=640830&_orig=search&_coverDate=12%2F31%2F1995&_sk=999479997&view=c&wchp=dGLbVlb-zSkWb&md5=fbf5ddd998ece1b5bdec4b3093862ba4&ie=/sdarticle.pdf)>.

[44] Novozymes<sup>®</sup>. Novozymes<sup>®</sup> biomass kit : Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.

[45] Rivers, D. B., et al. Determination of cellulose in municipal solid wastes contaminated with synthetic materials . *Biotechnology Letters* [online]. 1983, vol. 5, no. 11, [cit. 2010-04-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.springerlink.com/content/t4r71305031j6132/>>. ISSN 0141-5492 (Print) 1573-6776 (Online).

[46] A., Kotyk; J., Horák. *Enzymová kinetika*. Praha : Academia, 1977. 272 s.

[47] M. J., Taherzadeh; K., Karimi. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production : A Review. *Int. J. Mol. Sci.* [online]. 2008, no. 9, [cit. 2010-05-02]. Dostupný z WWW: <[www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/pdf](http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/pdf)>.

[48] Český statistický úřad. *Český statistický úřad* [online]. 2007 [cit. 2010-05-03]. Produkce odpadů dle druhu odpadu v roce 2007 (v kg). Dostupné z WWW: <[http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/D4003A6A4B/\\$File/20010815.pdf](http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/D4003A6A4B/$File/20010815.pdf)>.

[49] Valta, J., et al. Produkce a nakládání s odpady. *Odpadové fórum*. 23.7.2009, roč. 2009, č. 7-8, s. 16-19.

[50] Český statistický úřad. *Český statistický úřad* [online]. 2007 [cit. 2010-05-03]. Spotřeba odpadů jako druhotných surovin. Dostupné z WWW: <[http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/D4003A6A48/\\$File/20010812.pdf](http://www.czso.cz/csu/2008edicniplan.nsf/t/D4003A6A48/$File/20010812.pdf)>.



## 12 ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV

- Obr. č. 1:** [1] Pastorek, Z., Kára, J., Jevič, P. *Biomasa : obnovitelný zdroj energie*. Praha : FCC Public, 2004. 288 s. ISBN 80-86534-06-5.
- Obr. č. 2:** [20] Lynd, L. R., et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* [online]. 2002, vol. 66, no. 3 [cit. 2009-12-16], s. 506-577. Dostupný z WWW: <<http://mmbr.asm.org/cgi/content/full/66/3/506?view=long&pmid=12209002>>.
- Obr. č. 3:** [21] Hrázský, J., Král, P. *Využití dřevních a jiných lignocelulózových odpadů*. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. 98 s. ISBN 80-7157-403-1.
- Obr. č. 4:** [15] *Biotechnology : A multi volume comprehensive treatise*. Ed. by H.-J. Rehm and G. Reed. 2nd completely rev. edition. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH, 1996. 739 s. ISBN 3-527-28310-2.
- Obr. č. 5:** [51] Dostupný z WWW: <<http://www.fibersource.com/FTUTOR/Images/Cell.GIF>>.
- Obr. č. 6:** [52] VESPÁLCOVÁ, M. Polysacharidy rostlin. In *Chemie potravin II* . a.r. 2008/2009 [cit. 2010-05-04]. (nepublikovaný dokument)
- Obr. č. 7:** [53] Dostupný z WWW: <[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MImg&\\_imagekey=B6WFV-45GMS96-16-4&\\_cdi=6804&\\_user=640830&\\_orig=search&\\_coverDate=07%2F31%2F1999&\\_sk=999729997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWb&md5=fd5d3a0deba1463aaac19e5a3d8ba346&ie=/sdarticle.pdf](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MImg&_imagekey=B6WFV-45GMS96-16-4&_cdi=6804&_user=640830&_orig=search&_coverDate=07%2F31%2F1999&_sk=999729997&view=c&wchp=dGLbVtb-zSkWb&md5=fd5d3a0deba1463aaac19e5a3d8ba346&ie=/sdarticle.pdf)>.
- Obr. č. 8:** [54] Kokrhelová, K., Jirout, T. Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv. *STČ* [online]. 2008 [cit. 2009-04-17]. Dostupný z WWW: <[http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova\\_Kvetoslava\\_12118.pdf](http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf)>.

### 13 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

**ai** – a iné

**apod** – a podobne

**c enz** – koncentrácia enzýmov

**CBU** – cellobiase unit

**cs** – koncentrácia substrátu

**ČR** – Česká republika

**ECF** – elementar chlorine free

**EGU** – endo-glucanase unit

**ETBE** – etyl–tercio–butyl–éter

**EU** – Európska únia

**FCH VUT** – Fakulta chemická, Vysoké učení technické

**FPU** – filter paper unit

**GLU** – glukóza

**h** – hodín

**IS** – interval spoľahlivosti

**kat** – katal, jednotka aktivity enzýmov, aktivitu 1 katal má také množstvo enzýmu, ktoré premení 1 mol substrátu za 1 sekundu

**kol** – kolektív

**MCC** – mikrokryštalická celulóza

**MO** – mikroorganizmus, mikroorganizmy, mikroorganizmov

**MTBE** – metyl–tercio–butyl–éter

**rpm** – revolutions per minute – otáčky za 1 minútu

**RS** – redukujúce sacharidy

**SSF** – simultaneous saccharification and fermentation – simultánna sacharifikácia a fermentácia

**TCF** – total chlorine free

**TS** – total solids – súhrn tuhých častíc

## **14 ZOZNAM PRÍLOH**

- Príloha č. 1:** Produkcia odpadov podľa druhu odpadu v ČR v roku 2007 [48]
- Príloha č. 2:** Produkcia odpadového papiera v jednotlivých krajoch ČR v tonách [49]
- Príloha č. 3:** Spotreba odpadového papiera ako druhotnej suroviny v ČR [50]

## 15 PRÍLOHY

### 15.1 Príloha č. 1: Produkcia odpadov podľa druhu odpadu v ČR v roku 2007 [48]

Druh odpadu	Produkcia odpadu celkom (kg)	spôsob nakladania na strane pôvodca odpadu					
		využitie celkom (kg)	odstraňovanie celkom (kg)	z toho		ostatné spôsoby celkom (kg)	z toho zostatok na sklade k 31.12. 2007 (kg)
				skládkovanie (kg)	spaľovanie na pevnine (kg)		
Výmet z odp. papiera	18 230 072	0	370 660	305 200	0	17 859 412	569 360
Odp. z tried. papiera	69 669 331	0	0	0	0	69 669 331	2 079 530
Papierový, lepenkový obal	344 049 254	1 184 477	563 606	96 220	3 626	342 301 171	1 788 557
Papier a lepenka	30 602 910	45 360	163 880	163 880	0	30 393 670	1 163 067
Papier a/alebo lepenka	180 065 401	3 589 058	8 314	1 300	7 014	176 468 029	1 072 264

**15.2 Príloha č. 2: Produkcia odpadového papiera v jednotlivých krajoch ČR v tonách [49]**

<b>Kraj (mesto)</b>	<b>Rok</b>	
	2006	2007
Praha	130 712	131 870
Stredočeský kraj	61 617	77 660
Jihočeský kraj	25 262	22 902
Plzeňský kraj	56 576	62 466
Karlovarský kraj	8 656	15 726
Ústecký kraj	36 719	41 826
Liberecký kraj	28 604	26 289
Královohradecký kraj	21 597	28 258
Pardubický kraj	39 329	46 298
Vysočina	19 905	28 237
Jihomoravský kraj	66 141	79 164
Olomoucký kraj	54 185	54 360
Zlínský kraj	22 158	30 282
Moravskoslezský kraj	54 905	40 899
<b>Celkom</b>	<b>626 366</b>	<b>686 237</b>

**15.3 Príloha č. 3: Spotreba odpadového papiera ako druhotnej suroviny v ČR [50]**

rok	2004	2005	2006	2007
odpadový papier, kartón a lepenka (t)	293 580	276 870	302 974	330 082