

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

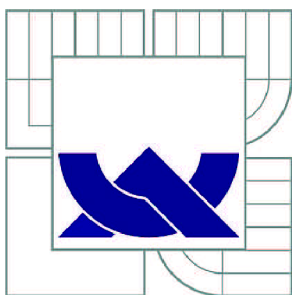
OPTIMALIZACE PRODUKCE BIOETHANOLU S VYUŽITÍM  
ZYMOMONAS MOBILIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE  
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

Bc. KATEŘINA ANDRLOVÁ

BRNO 2013



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# OPTIMALIZACE PRODUKCE BIOETHANOLU S VYUŽITÍM ZYMOMONAS MOBILIS

OPTIMIZATION OF BIOETHANOL PRODUCTION BY ZYMOMONAS MOBILIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. KATEŘINA ANDRLOVÁ

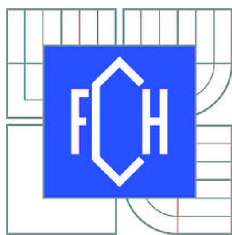
VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2013





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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0733/2012</b>	Akademický rok: <b>2012/2013</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Kateřina Andrllová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

### Název diplomové práce:

Optimalizace produkce bioethanolu s využitím *Zymomonas mobilis*

### Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) zpracování metodické části
- 3) provedení optimalizací fyzikálně-chemických faktorů vzhledem k produkci ethanolu metodou SHF i SSF
- 4) analytické stanovení využitím HPLC
- 5) diskuse, vyhodnocení, závěr

### Termín odevzdání diplomové práce: 3.5.2013

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

-----  
Bc. Kateřina Andrllová  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 31.1.2013

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

## ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o využití *Zymomonas mobilis* pro produkci bioethanolu z odpadního papíru. Byly použity tři druhy substrátu (lepenka, výkres a kancelářský papír) za účelem optimalizace produkce bioethanolu. Jednotlivé papíry byly podrobeny stejným předúpravám, a to mletí, kombinaci mikrovlnného záření a NaOH, kombinaci mikrovlnného záření a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a kombinaci mikrovlnného záření, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. Po předúpravě byl substrát rozložen enzymatickou hydrolýzou k vyhodnocení nejlepší předúpravy. Poté bylo provedeno SSF pro každý substrát (dvě nejlepší předúpravy). V průběhu hydrolýzy a SSF byly odebrány vzorky, které byly stanoveny pomocí HPLC.

Byly sestrojeny růstové křivky *Zymomonas mobilis*, jako nejvhodnější pro SSF byla zvolena teplota 40 °C, při které exponenciální fáze probíhala v čase 6 - 15 hodin. Při hydrolýze byla sledována koncentrace glukózy v roztoku. Maximální koncentrace glukózy byla u lepenky (mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH) 16,46 g·dm<sup>-3</sup>, u výkresu (mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH) 31,78 g·dm<sup>-3</sup> a u kancelářského papíru (mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 25,04 g·dm<sup>-3</sup>. Koncentrace ethanolu během SSF byly nejvyšší ve stejných případech jako při hydrolýze. U lepenky byla maximální koncentrace bioethanolu 9,50 g·dm<sup>-3</sup>, u výkresu 16,1 g·dm<sup>-3</sup> a u kancelářského papíru 12,13 g·dm<sup>-3</sup>.

## ABSTRACT

Diploma thesis deals with use of *Zymomonas mobilis* for the production of bioethanol from waste paper. There were used three kinds of substrate (cardboard, drawing and office paper) to optimize of bioethanol production. Individual papers were subjected to the same pre-treatment, namely a milling, a combination of microwave irradiation and NaOH, a combination of microwave irradiation and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and combination microwave irradiation, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and NaOH. The substrates were decomposed by enzymatic hydrolysis after pre-treatment to evaluate the best pre-treatment. Simultaneous saccharification and fermentation was carried out for each substrate (with two of the best pre-treatment). The samples were taken during the hydrolysis and the simultaneous saccharification and fermentation, and were determined by HPLC.

Growth curves of *Zymomonas mobilis* were constructed, as the most appropriate for SSF was chosen temperature of 40 °C in which the exponential phase took place at the time of 6 - 15 hours. During hydrolysis was monitored glucose concentration in the solution. The maximum concentration of glucose was in the cardboard (microwaves + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH) 16.46 g·dm<sup>-3</sup>, a drawing (microwaves + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH) 31.78 g·dm<sup>-3</sup>, and office paper (microwaves + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 25.04 g·dm<sup>-3</sup>. The concentration of ethanol for SSF was highest in the same cases as in the hydrolysis. The cardboard was the maximum concentration of bio-ethanol 9.5 g·dm<sup>-3</sup>, for the drawing 16.1 g·dm<sup>-3</sup> and for the office paper 12.13 g·dm<sup>-3</sup>.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bioethanol, *Zymomonas mobilis*, lignocelulózový materiál, celulázy, hydrolyza, simultánní sacharifikace a fermentace.

## **KEYWORDS**

Bioethanol, *Zymomonas mobilis*, lignocellulosic material, cellulase, hydrolysis, simultaneous saccharification and fermentation.

ANDRLOVÁ, K. *Optimalizace produkce bioethanolu s využitím Zymomonas mobilis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013. 92 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### ***Poděkování:***

*Děkuji vedoucímu své diplomové práce Ing. Mgr. Liborovi Babákovi, Ph.D. za zájem a věcné připomínky k tvorbě a organizaci práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Ing. Petře Šupinové za pomoc s experimentální částí a cenné rady při sepisování samotné práce.*

# OBSAH

<b>ÚVOD .....</b>	<b>9</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
1.1 VYMEZENÍ ZÁKLADNÍCH POJMŮ .....	10
1.1.1 Biopalivo.....	10
1.1.2 Bioethanol.....	10
1.1.3 Biomasa .....	10
1.1.4 Papírovina.....	11
1.1.5 Lignocelulóza .....	11
1.1.6 Hydrolýza .....	11
1.1.7 Enzymy .....	11
1.1.8 Fermentace.....	11
1.2 LIGNOCELULÓZOVÁ BIOMASA .....	11
1.2.1 Celulóza .....	12
1.2.2 Hemicelulóza .....	12
1.2.3 Lignin.....	13
1.3 PŘEDÚPRAVA LIGNOCELULÓZOVÉHO MATERIÁLU .....	14
1.3.1 Fyzikální předúpravy .....	14
1.3.2 Fyzikálně-chemické předúpravy.....	15
1.3.3 Chemické předúpravy .....	16
1.3.4 Biologická předúprava.....	17
1.4 METODY HYDROLÝZY LIGNOCELULÓZOVÉHO MATERIÁLU .....	19
1.4.1 Kyselá hydrolýza .....	19
1.4.2 Enzymatická hydrolýza .....	19
1.5 PRŮMYSLOVÉ VYUŽITÍ LIGNOCELULÓZOVÉ BIOMASY .....	21
1.6 METODY KONVERZE LIGNOCELULÓZOVÝCH MATERIÁLŮ NA ETHANOL .....	22
1.6.1 Simultánní sacharifikace a fermentace - SSF .....	22
1.6.2 Separovaná hydrolýza a fermentace - SHF .....	23
1.6.3 Přímá mikrobiální konverze - DCM.....	23
1.7 PAPÍR - MOŽNÝ SUBSTRÁT PRO VÝROBU ETHANOLU .....	23
1.7.1 Výroba papíru .....	24
1.8 BIOINŽENÝRSKÉ CHARAKTERISTIKY .....	25
1.8.1 Růstová křivka mikroorganismů.....	25
1.8.2 Vsádkový systém (batch kultivace) .....	27
1.9 MIKROORGANISMY VHODNÉ PRO METODU SSF A ETHANOLOVÉ KVAŠENÍ.....	28
1.9.1 Saccharomyces cerevisiae .....	28
1.9.2 Zymomonas mobilis .....	28
1.10 ANALYTICKÉ METODY .....	30
1.10.1 Turbidimetrie .....	30
1.10.2 Stanovení sušiny biomasy .....	31
1.10.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC.....	31
<b>2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>33</b>
2.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJE .....	33
2.1.1 Enzymy pro hydrolýzu lignocelulózových materiálů.....	33

2.1.2	Chemikálie.....	34
2.1.3	Kultura.....	35
2.1.4	Substrát.....	35
2.1.5	Přístroje.....	35
2.1.6	Software.....	35
2.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	36
2.2.1	Kultivační médium pro <i>Zymomonas mobilis</i> .....	36
2.2.2	Fyziologický roztok.....	36
2.2.3	Roztoky na stanovení celulózy.....	36
2.2.4	Roztoky na předúpravu substrátu (papíru).....	36
2.2.5	Tlumivý roztok (pufr).....	37
2.2.6	Mobilní fáze pro přístroj HPLC.....	37
2.2.7	Roztoky pro kalibrační křivky.....	37
2.3	KULTIVACE A STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY.....	37
2.4	POSTUP PŘI PŘEDÚPRAVĚ SUBSTRÁTU (PAPÍRU).....	38
2.4.1	Fyzikální předúprava.....	38
2.4.2	Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a NaOH.....	39
2.4.3	Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	39
2.4.4	Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH.....	39
2.5	KVANTITATIVNÍ A KOMPOZIČNÍ ANALÝZA SUBSTRÁTU.....	39
2.5.1	Stanovení gramáže papíru.....	39
2.5.2	Stanovení sušiny.....	39
2.5.3	Stanovení popelu.....	39
2.5.4	Stanovení celulózy.....	40
2.6	HYDROLÝZA SUBSTRÁTU (PAPÍRU).....	40
2.7	SIMULTÁNNÍ SACHARIFIKACE A FERMENTACE - SSF.....	41
2.8	STANOVENÍ VZORKŮ POUŽITÍM PŘÍSTROJE HPLC.....	41
2.9	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	42
<b>3</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>43</b>
3.1	KULTIVACE A STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY.....	43
3.2	KVANTITATIVNÍ A KOMPOZIČNÍ ANALÝZA SUBSTRÁTU.....	45
3.2.1	Stanovení plošné hmotnosti papíru.....	45
3.2.2	Stanovení sušiny.....	46
3.2.3	Stanovení popelu.....	46
3.2.4	Stanovení celulózy.....	47
3.3	KALIBRAČNÍ KŘIVKY - HPLC.....	49
3.4	HYDROLÝZA SUBSTRÁTU.....	50
3.4.1	Srovnání účinnosti hydrolýzy pro různé předúpravy jednotlivých substrátů... ..	53
3.4.2	Srovnání účinnosti hydrolýzy pro různé substráty u jednotlivých způsobů předúpravy.....	56
3.4.3	Srovnání koncentrace glukózy získané hydrolýzou - různé koncentrace substrátů.....	62
3.5	SIMULTÁNNÍ SACHARIFIKACE A FERMENTACE - SSF.....	62
3.5.1	Lepenka.....	63
3.5.2	Výkres.....	68
3.5.3	Kancelářský papír.....	73

<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>79</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>87</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN.....</b>	<b>88</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>89</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>90</b>
<b>SEZNAM GRAFŮ.....</b>	<b>91</b>

## ÚVOD

Využití fosilních paliv jako je ropa, uhlí a zemní plyn v dopravě a průmyslu dramaticky zhoršila skleníkový efekt. Množství komunálního odpadu různého původu celosvětově narůstá v důsledku zvýšení počtu obyvatel a rychlosti výroby. Likvidace tohoto odpadu je nákladná a obvykle má negativní vliv na životní prostředí. Proto je rozvoj alternativních obnovitelných zdrojů energie z odpadních materiálů možností, jak zmírnit skleníkový efekt.[1]

Lignocelulózový odpadní materiál získaný z energetických plodin, dřevařského průmyslu a zemědělských zbytků jsou hojné po celém světě. Představují nejvýznamnější obnovitelný zdroj energie. Sacharidy v lignocelulózových zbytcích lze využít různými způsoby pro energetické účely, ovšem největší zájem je o produkci ethanolu.[1]

Lignocelulózový materiál lze využít konverzí na užitečné produkty fyzikálně-chemickým či biologickým způsobem. Zatím nejčastěji používané technologie jsou chemické, ale bohužel dost drahé a zanechávají po sobě další odpad. Proto se zvažují biologické metody na využití lignocelulózových odpadů, které jsou zaměřeny na mikrobiální nebo enzymatické přeměny.[2]

Alternativní zdroj energie jsou biopaliva první a druhé generace. Biopaliva první generace jsou vyráběna z cukrové třtiny, cukrové řepy, kukuřice, řepky atd. Biopaliva druhé generace jsou původem z lignocelulózových materiálů vzniklých v zemědělství, lesním průmyslu, ale také z nepotravinových plodin. V současné době se mluví o biopalivech třetí generace vzniklých z mikroorganismů a řas, což je považováno za životaschopnou alternativu energetického zdroje.[3]

Ethanol se používá ve směsi s benzínem a zvyšuje oktanové číslo, tzn., že snižuje tvorbu oxidu uhelnatého a těkavých organických sloučenin. Kromě palivového využití bioethanolu je o něj zájem i v potravinářském průmyslu. Vyrábí se fermentační technologií využitím cukerných a škrobnatých rostlin, ovšem nejrozšířenější forma cukru je právě celulóza a hemicelulóza.[4]

V EU byla přijata směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/30/ES, o podpoře využívání biopaliv nebo jiných obnovitelných paliv v dopravě, a to s minimálním obsahem 2 %. Do 31. 12. 2010 se hodnota obsahu bioethanolu v palivech zvýšila na 5,75 %.[5]

Zpracování lignocelulózového materiálu musí být však dostatečně efektivní. Musí být zvolena vhodná předúprava, která zvýší výtěžnost cukrů z těchto materiálů a zároveň bude ekonomicky přijatelná. Rozhodující je i správná volba mikroorganismů. Nejvyužívanějšími mikroorganismy jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Zymomonas mobilis*, u nichž se uvažuje o genetické modifikaci, která by zajistila využití pentóz, především xylózy, za produkce ethanolu. Nebo naopak do mikroorganismů fermentujících pentózy vnést gen, který umožní využití hexóz těmito mikroorganismy.[6,7]

Cílem práce bylo studium produkce bioethanolu pomocí *Zymomonas mobilis* z lignocelulózového substrátu (lepenka, výkres, kancelářský papír). Bylo však nutné optimalizovat teplotu vyhovující bakteriím i enzymům pro maximální zisk biethanolu metodou simultánní sacharifikace a fermentace. Sledován byl i vliv předúpravy na zisk glukózy při hydrolýze u jednotlivých substrátů.



# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Vymezení základních pojmů

### 1.1.1 Biopalivo

Biopalivo je kapalné nebo plynné palivo, které je vyrobené z přírodních materiálů, určené pro dopravu. Podle platné legislativy jsou mezi biopaliva řazeny: bioethanol, biodiesel, bioplyn, biomethanol, biodimethylether, bio-ETBE (ethyl-tercio-butyl-ether), bio-MTBE (methy-tercio-butyl-ether), syntetické biopalivo, biovodík a čistý rostlinný olej.[8]

Biopalivo má vyšší oktanové číslo než palivo vyrobené z ropy, tzn., že produkuje při spalování menší množství oxidu uhelnatého, a tudíž úzce souvisí s ochranou životního prostředí.[2]

#### *Plynná biopaliva*

Bioplyn vzniká při rozkladu biomasy v uzavřených nádržích. Obsahuje energeticky cenný methan a má poměrně vysokou výhřevnost. Nejčastěji se používá k výrobě elektřiny a tepla (čističky odpadních vod, bioplynové stanice), ale i jako pohonná látka.[9]

#### *Kapalná biopaliva*

Rozlišují se kapalná biopaliva na bázi alkoholu (např. bioethanol), biooleje (např. bionafta), zkapalněna mohou být také plynná biopaliva. Kapalná biopaliva jsou využívána především v dopravě, ale lze je využít i pro výrobu tepla (např. topidla na bioláh). Existují směrnice, které udávají povinný podíl biosložky v pohonných hmotách v rámci EU (pro rok 2010 je to cca 6% z celkové spotřeby pohonných hmot).[9]

### 1.1.2 Bioethanol

Bioethanol je ethanol vyrobený alkoholovým kvašením cukerné nebo škrobnaté složky biomasy nebo biologicky odbouratelného odpadu. Představuje obnovitelný zdroj energie a je tedy využíván jako biopalivo.[2]

### 1.1.3 Biomasa

Pojem biomasa označuje veškerou organickou hmotu vzniklou prostřednictvím fotosyntézy nebo hmotu živočišného původu. Tímto pojmem je často označovaná rostlinná biomasa využitelná pro energetické účely jako obnovitelný zdroj energie.[10]

#### *Odpadní biomasa*

Odpadní biomasa představuje odpady z lesního hospodářství a papírenského, dřevařského a nábytkářského průmyslu, rostlinný odpad zemědělské výroby, komunální bioodpad a odpady z potravinářského průmyslu.[10]

#### *Pěstovaná biomasa*

Jsou to energetické byliny (např. řepka olejnatá, slunečnice a různé obilniny) a rychle rostoucí dřeviny (např. Kanadský topol).[10]

### **1.1.4 Papírovina**

Pojem papírovina označuje suspenzi vlákniny nebo směsi vláken, která je upravená mlécími stroji na vhodnou velikost vláken a vhodné odvodňovací vlastnosti. Bývá opatřena plnidly, klíždily, barvivy a ostatními pomocnými prostředky pro výrobu papíru požadované jakosti.[11]

### **1.1.5 Lignocelulóza**

Hlavní složka rostlinné biomasy, nejvíce rozšířena v přírodě. Její hlavní složky tvoří lignin, hemicelulóza a celulóza. Jedná se o komplexní strukturu, ve které je celulóza obklopena monovrstvou hemicelulózy a zakotvena v matici hemicelulózy a ligninu. Navíc lignin vytváří překážku proti působení enzymů a spolu s hemicelulózou tvoří ochranu kolem celulózy. Tato struktura lignocelulózy má velký vliv na inhibici degradace celulózy na monomerní cukry, které jsou nezbytné pro efektivní přeměnu biomasy na ethanol.[12]

### **1.1.6 Hydrolýza**

Pod pojmem hydrolýza se myslí energeticky výhodné štěpení molekul (např. glykosidů, esterů, amidů, anhydridů atd.) reakcí s vodou. Aktivační energie těchto reakcí jsou vysoké, proto hydrolýza mnoha biologicky důležitých látek za běžných teplot a pH neprobíhá. Existuje mnoho významných hydroláz, které hydrolýzu umožňují a kineticky řídí.[13]

### **1.1.7 Enzymy**

Enzymy jsou biokatalyzátory se strukturou biopolymeru bílkovinné povahy, které urychlují metabolicky významné reakce. Největší rozdíl mezi enzymy a chemickými katalyzátory je ve specifitě enzymové katalázy. Enzym vždy katalyzuje jen přeměnu určité skupiny substrátů (specifita substrátová) a jen určitý typ reakce (specifita účinku). Enzymy stejně jako chemické katalyzátory neovlivňují energetiku reakce, tzn., že urychlují průběh reakcí oběma směry a v rovnovážných systémech neovlivňují výtěžek reakce. Enzymy mají v současné době široké uplatnění, používají se ve všech odvětvích potravinářského průmyslu, v textilním, papírenském a farmaceutickém průmyslu i v zemědělství.[13]

### **1.1.8 Fermentace**

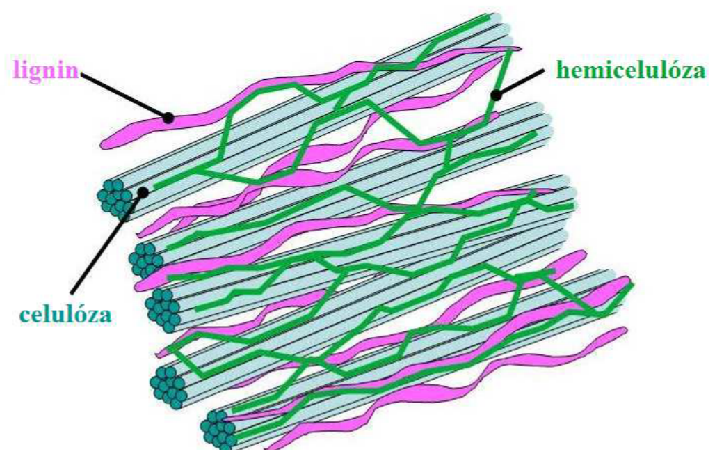
Z mikrobiologického hlediska je fermentace proces probíhající v bioreaktoru. Dochází buďto k produkci žádaných metabolitů metabolickou činností mikroorganismů nebo naopak k rozkladu nežádoucích látek pomocí mikroorganismů za vzniku plynů.[13]

## **1.2 Lignocelulózová biomasa**

Lignocelulózová biomasa je v přírodě zdaleka nejrozšířenější surovinou. Lze ji zařadit do čtyř skupin podle typu zdroje:

- lesní zbytky,
- tuhý komunální odpad,
- papírový odpad,
- zbytky rostlin.

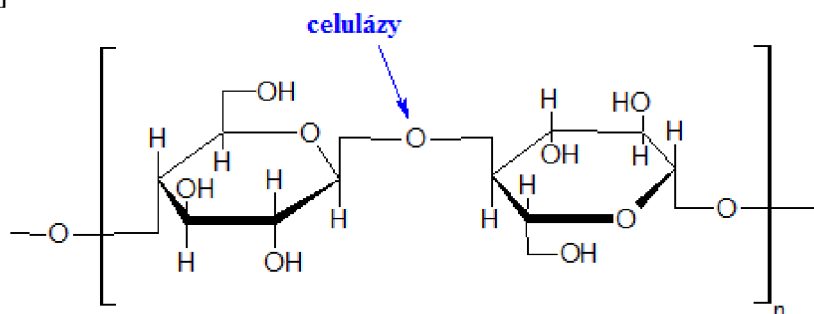
Lignocelulóza je strukturálně složitější materiál než škrob, proto také náklady spojené se zpracováním lignocelulózových materiálů je podstatně více nákladné. Hlavními složkami lignocelulózy jsou polymery celulózy a hemicelulózy, na které je pevně vázán lignin, a to především vodíkovými vazbami, ale zřídka i kovalentními.[15, 16, 17]



**Obrázek 1:** Struktura lignocelulózy [17]

### 1.2.1 Celulóza

Lignocelulóзовý materiál obsahuje především celulózu, která patří k nejrozšířenějším látkám v přírodě. Je to vysokomolekulární homopolysacharid, tedy polysacharid, tvořený stejnými sacharidickými podjednotkami, a sice anhydridy  $\beta$ -D-glukózy (viz Obrázek 2). Ty jsou vzájemně spojeny  $\beta$ -(1,4)-glykosidickými vazbami. Řetězec celulózy je lineární a převládá u ní krystalický charakter. Obsahuje totiž i amorfni úseky, které jsou s krystalickou formou přítomny v poměru 1:3. Celulóza má obvykle ve svém řetězci 800 - 17 000 glukózových jednotek. Jednotlivé řetězce celulózy jsou vázány k sobě prostřednictvím vodíkových vazeb a tvoří tzv. fibrily (vlákna), fibrilární svazky a ty tvoří stěny rostlinných buněk.[15, 18, 19]



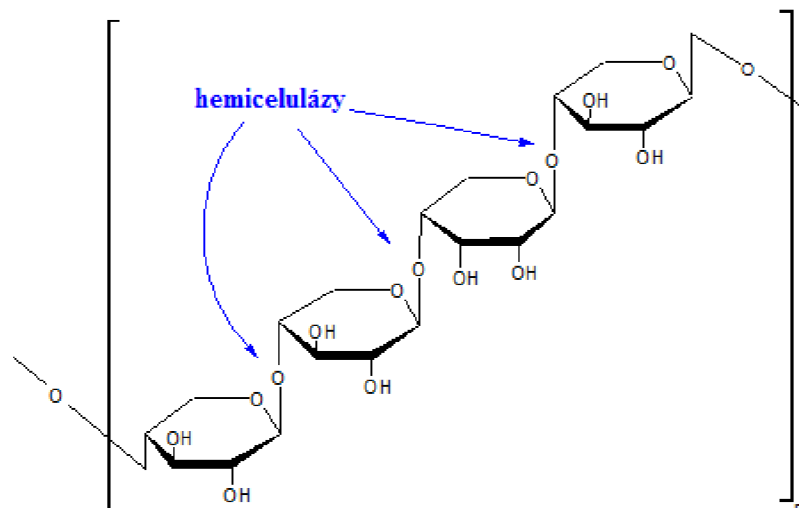
**Obrázek 2:** Struktura celulózy [20]

### 1.2.2 Hemicelulóza

Hemicelulóza je z hlediska zastoupení v lignocelulóзовých materiálech na druhém místě. Jakožto heteropolysacharid, je tvořena různými cukernými monomery: pentózy (xylózy a arabinózy), hexózy (manózy, glukózy, galaktózy) a cukerné kyseliny (kyselina uronová). Dominantní složkou hemicelulózy z tvrdého dřeva a zemědělských rostlin je xylan (polysacharid složený z D-xylóz), pro měkké dřevo je dominantní glukomanan (polysacharid primárně složený z manózy a glukózy).[18]

Hemicelulóza je tvořená 150 - 200 cukernými podjednotkami a rozvětvená, obsahuje krátké postranní řetězce složené z různých monomerů sacharidů, které snadno podléhají hydrolyze. Hemicelulóza slouží jako spojení mezi ligninem a celulóзовými vlákny, dodává tak pevnost lignocelulóзовým materiálům.[18]

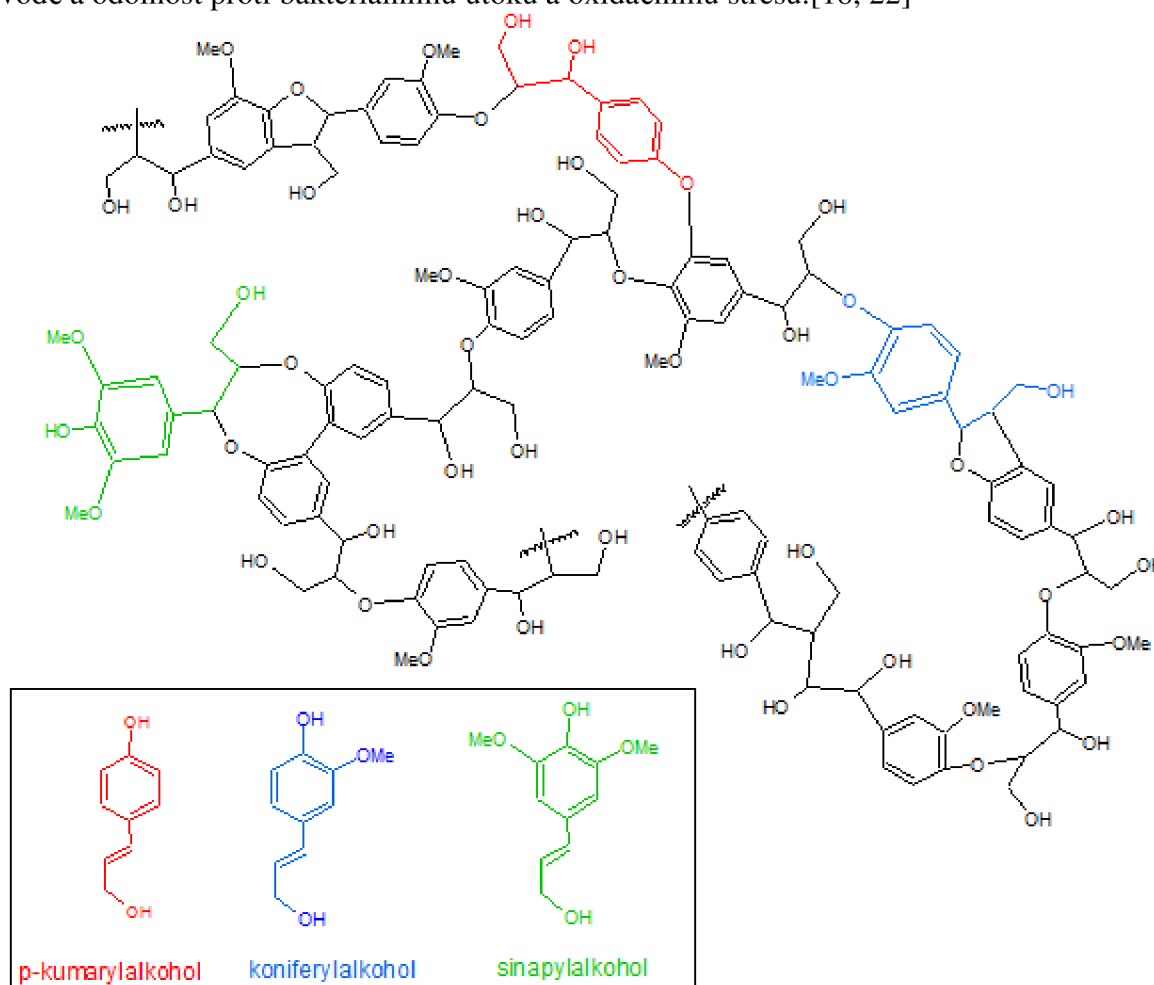
Nejvíce tepelně-chemicky citlivé složky lignocelulóзовých materiálů jsou hemicelulózy. Během tepelně-chemické předúpravy nejprve reagují postranní řetězce a poté hlavní řetězec.[18]



Obrázek 3: Struktura hemicelulózy [21]

### 1.2.3 Lignin

Lignin je po celulóze a hemicelulóze jeden z nejhojněji se vyskytujících polymerů ve volné přírodě a je přítomen v buněčné stěně. Je to amorfní heteropolymer složený ze tří různých typů fenylypropanových jednotek: p-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol (viz Obrázek 4). Hlavní funkcí ligninu je poskytnout rostlině strukturální podporu, nerozpustnost ve vodě a odolnost proti bakteriálnímu útoku a oxidačnímu stresu.[18, 22]



Obrázek 4: Struktura ligninu [23]

### 1.3 Předúprava lignocelulóзовého materiálu

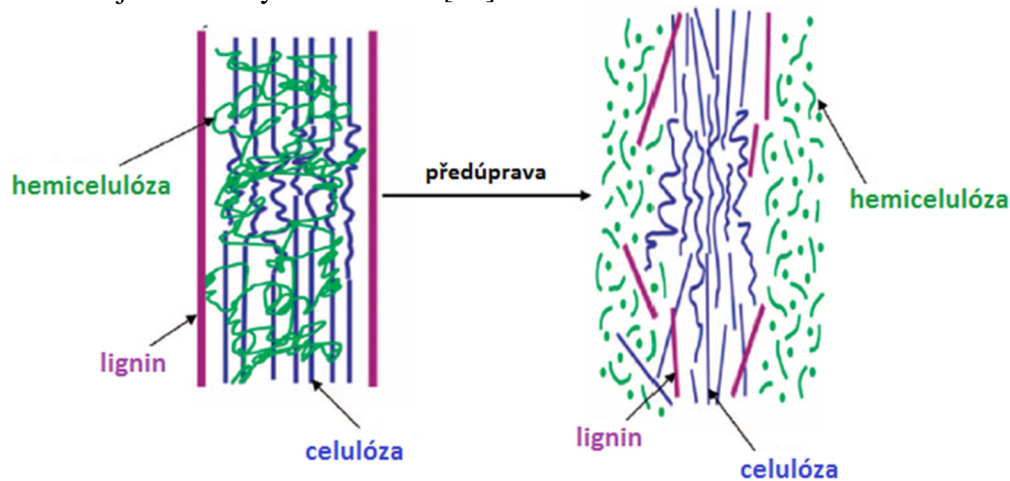
Předúprava je proces, kdy dochází k předběžné úpravě substrátu, a to buď fyzikální nebo chemickou cestou, častou jsou využívány i kombinace těchto metod.

Účinná metoda na předúpravu lignocelulóзовých materiálů závisí na několika kritériích. Je nutno snížit velikost částic biomasy, odstranění ligninu a snížení krystalinity celulózy (viz Obrázek 5). V procesu jsou využívány pro předúpravu přídatné látky nebo energie, v mnoha případech se jedná o jejich kombinaci.[24, 25]

Předúprava biomasy musí splňovat tyto požadavky:

- zvýšení tvorby cukrů nebo schopnost tvořit cukry v procesu hydrolýzy,
- zabránění rozkladu sacharidů, a to i pentóz, jelikož některé mikroorganismy mají enzymové vybavení na jejich využití,
- zabránění vzniku vedlejších produktů, které inhibují funkci enzymů či růst a produkci mikroorganismů,
- nákladová efektivnost spojená s cenou biomasy i energetikou procesu.[24, 25]

Metody předúpravy lze rozdělit do několika kategorií: fyzikální, fyzikálně-chemické, chemické, biologické. Nejčastěji bývají využity kombinace těchto metod. Výhody a nevýhody vybraných metod jsou shrnuty v Tabulce 1.[24]



Obrázek 5: Vliv předúpravy na lignocelulóзовý materiál [24]

#### 1.3.1 Fyzikální předúpravy

##### *Mletí*

Hlavní význam mechanicky založených předúprav je snížit velikost částic a krystalinity, aby se zvětšil specifický povrch a snížil stupeň polymerace lignocelulóзовé biomasy. Provádí se na základě kombinace sekání, mletí a drcení. Energie potřebná na tento proces závisí na požadované velikosti částic. Při mechanické úpravě na velmi malé částice (prášek) je nákladnost procesu nevýhodná. Při mechanickém mletí lignocelulóзовé biomasy nedochází k odstraňování ligninu, ale pouze k jeho depolymerizaci prostřednictvím štěpení nekondenzovaných vazeb aryletherů.[24,26,27,28]

##### *Ozáření*

Záření (např.  $\gamma$ -záření, elektronový paprsek a mikrovlnné záření) zlepšují enzymatickou hydrolýzu lignocelulóзовých materiálů. Díky ozáření degradují jak křehká vlákna celulózy, tak i nízkomolekulární oligosacharidy. Dochází zde k disociaci glykosidických vazeb v řetězci celulózy, ovšem pouze v přítomnosti ligninu. Při velmi intenzivním záření může docházet k rozkladu oligosacharidů a cyklické struktury glukózy. Předúpravy metodou

ozařování jsou drahé, tudíž mají problémy v průmyslové aplikaci zpracování lignocelulózových materiálů.[29]

### ***Předúprava teplem***

Během předúpravy teplem dochází k zahřívání lignocelulózové biomasy na teplotu 150 - 180 °C. Části lignocelulózového materiálu, především hemicelulózy, ale i ligninu, se začínají rozpouštět. Hemicelulóza je při tepelném působení hydrolyzována a vznikají kyseliny, které katalyzují další hydrolýzu hemicelulózy. Při teplotách vyšších jak 160 °C dochází k rozpouštění i ligninu za vzniku fenolických sloučenin, které působí inhibičně na bakterie i kvasinky. Je nutné velmi reaktivní sloučeniny vzniklé z ligninu odstranit.[30]

### **1.3.2 Fyzikálně-chemické předúpravy**

#### ***Amoniakální exploze (AFEX)***

V této fyzikálně chemické metodě předúpravy je využíván kapalný amoniak při teplotách 60 - 100 °C a vysokém tlaku působícím různě dlouhou dobu. Tlak poklesne, čímž amoniak přechází do skupenství plynného a tak způsobuje bobtnání a fyzikální narušení vláken biomasy a částečnou dekrystalizaci celulózy. Výsledkem metody AFEX je pouze předupravený pevný materiál bez kapalného podílu, což snižuje náklady na proces. Krystalinita celulózy je snížena a vazby mezi ligninem a polysacharidy rozrušeny. Dochází také k odstraňování acetylových skupin z lignocelulózového materiálu. Stravitelnost biomasy pro enzymy se zvyšuje a enzymatická hydrolýza tak vede k vyšším výnosům cukrů.[27]

V průběhu metody AFEX se netvoří inhibitory biologických procesů, i když některé fenolické fragmenty ligninu a další extrakty buněčných stěn rostlin mohou zůstat na povrchu celulózy. Při optimálních podmínkách lze dosáhnout více než 90% konverze celulózy a hemicelulózy na zkvasitelné cukry ze široké škály lignocelulózových materiálů.[27]

#### ***Exploze CO<sub>2</sub>***

Metoda je založena na využití CO<sub>2</sub>, jakožto superkritické tekutiny. Za těchto podmínek lze dosáhnout účinného odstranění ligninu, čímž vzroste stravitelnost substrátu. Delignifikace může být zvýšena přidávkem ethanolu do směsi.[27]

Molekuly CO<sub>2</sub> jsou srovnatelné velikosti s vodou či amoniakem a mohou tedy pronikat stejně malými póry lignocelulózy, což je ještě usnadněno působením vysokého tlaku. Po explozivním poklesu tlaku dojde k narušení struktury celulózy a hemicelulózy a tím ke zvětšení plochy substrátu pro enzymy. Při nízkých teplotách nedochází v této metodě k degradaci monosacharidů, a přesto výtěžky cukrů jsou nižší než u metody AFEX.[27]

#### ***Exploze vodní parou***

Jedná se o hydrotermální předúpravu lignocelulózového materiálu, který je vystaven nasycené páře pod vysokým tlakem při teplotách 160 - 260 °C a pak dojde k rychlému poklesu tlaku na atmosférický. V této předúpravě se kombinuje mechanická síla s chemickými účinky, jelikož dochází k autohydrolýze acetylových skupin přítomných v hemicelulóze. Voda se při vysokých teplotách chová jako slabá kyselina. Mechanické účinky způsobí oddělení vláken v důsledku explozivní dekomprese. V kombinaci s částečnou hydrolýzou hemicelulózy je lignin uvolněn ze struktury a do určité míry odstraněn z materiálu. Odstranění hemicelulózy zvyšuje dostupnost celulózy pro celulolytické enzymy při enzymatické hydrolýze. Mezi hlavní faktory mající vliv na účinnost parní exploze jsou velikost částic materiálu, teplota a doba působení vysokého tlaku.[26, 27]

### ***Parní exploze s přidavkem SO<sub>2</sub> nebo CO<sub>2</sub>***

Přídavek H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SO<sub>2</sub>) nebo CO<sub>2</sub> snižuje dobu působení vysokého tlaku a teplotu parní exploze. Zlepšuje hydrolyzu, jelikož vede k úplnému odstranění (zkapalnění) hemicelulózy a snižuje tvorbu inhibičních látek. Množství přidávaného H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (SO<sub>2</sub>) nebo CO<sub>2</sub> se pohybuje v rozmezí 0,3 - 3 % w/w.[24, 26]

### ***Předúprava horkou vodou***

Horká voda v kapalném skupenství je jedním z hydrotermálních předúprav, která využívá rychlou dekompresi a nepoužívá žádný katalyzátor ani chemikálie. Tlak je regulován tak, aby voda zůstala v kapalném stavu při teplotách 160 - 240 °C, ale vyvolávala změny ve struktuře ligninocelulózy. Doba působení vysokého tlaku je většinou v řádu několika minut a pak následuje dekomprese na atmosférický tlak.[26, 27]

Cílem je rozpustit hemicelulózu, čímž dojde ke zpřístupnění celulózy enzymům a zabránění tvorbě inhibitorů. Tato metoda je poměrně účinná na odstraňování hemicelulózy, z celulózy se odstraní až 80 %. Lignin je částečně depolymerizován a rozpuštěn v horké vodě použité na předúpravu, ale úplné delignifikace působením pouze horko vodou dosáhnout nelze. Předúprava horkou vodou je atraktivní z hlediska ekonomického.[26, 27]

## **1.3.3 Chemické předúpravy**

### ***Alkalická předúprava***

Alkalické předúpravy zvyšují dostupnost celulózy pro enzymy a účinně rozpouští lignin. Provádí se při pokojové teplotě v rozmezí několika sekund až dní. Dochází k degradaci cukru, ale ne v takové míře jako při působení kyselin nebo hydrotermálních procesech. Na alkalické předúpravy se nejčastěji používají tyto zásady: NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub>, NH<sub>4</sub>OH.[27]

Hydroxid sodný způsobuje bobtnání vláken, zvýšení vnitřního povrchu celulózy a snižuje stupeň polymerace a krystalinity, což vyvolává narušení struktury ligninu. Zvyšuje stravitelnost tvrdého dřeva ze 14 % na 55 % a snížení ligninu z 55 % na 20 %.[27]

Hydroxid vápenatý odstraňuje amorfnní látky jako je lignin, čímž se zvyšuje index krystalinity. Odstranění ligninu vede ke zvýšení efektivity enzymů tím, že se odstraní neproduktivní místa absorpce alepší se přístup k celulóze. Dochází také k odstranění acetylové skupiny z hemicelulózy. Předúprava ligninocelulózy biomasy působením Ca(OH)<sub>2</sub> se provádí při teplotách 85 - 150 °C po dobu 3 - 13 hodin. Ve srovnání s NaOH či KOH vyžaduje předúprava s Ca(OH)<sub>2</sub> nižší náklady na proces, jelikož může být znovu získán a použit, a menší požadavky na bezpečnost při práci.[27]

### ***Kyselá předúprava***

Hlavním cílem předúpravy pomocí kyselin je rozpuštění hemicelulózy a tím dosažení přístupu enzymů k celulóze. Tuto metodu lze provádět zředěnými i koncentrovanými kyselinami.[27]

Koncentrované kyseliny jsou méně využívány pro úpravu biomasy za účelem tvorby ethanolu, protože dochází ke vzniku inhibičních látek, jako je furfural, hydroxymethylfurfural a aromatické sloučeniny uvolněné z ligninu. Kromě toho, koncentrovaná kyselina působí korozivně na aparatury (reaktory), ve kterých je předúprava prováděna.[27]

Předúprava zředěnými kyselinami je pro průmyslové aplikace výhodnější a lze ji využít pro širokou škálu ligninocelulózy materiálů. Provádí se při vysoké teplotě 180 °C po krátkou dobu, nebo při nižší teplotě, např. 120 °C, po delší dobu (30 - 90 minut). Při této



předúpravě dochází k rozpouštění hemicelulózy a vzniklý xylan je převáděn na zkvasitelné cukry. Nicméně, díky vysoké teplotě působící při této metodě dochází k degradaci cukrů na furfural, hydroxymethylfurfural a aromatické sloučeniny z ligninu (stejně jako u koncentrovaných kyselin).[26, 27]

Nejvíce používanou kyselinou je kyselina sírová, ale lze použít i kyselinu chlorovodíkovou, fosforečnou a dusičnou. Bylo zjištěno, že kombinace zásady s kyselinou má nejvyšší účinky na předúpravu a dostupnost celulózy pro enzymy.[26, 27]

### **Ozonolýza**

Ozon je silný antioxidant, který vykazuje vysokou účinnost delignifikace lignocelulóзовých materiálů. Předúprava se provádí většinou při pokojové teplotě a normálním tlaku. Nevznikají zde žádné inhibiční látky, které by negativně ovlivnily proces hydrolýzy a fermentace. Velkým nedostatkem je použití velkého množství na účinnou předúpravu, což je v běžném provozu zcela neekonomické.[27]

### **Peroxid vodíku**

Biodegradace ligninu může být katalyzována enzymem peroxidázou v přítomnosti peroxidu vodíku. Při aplikaci této metody předúpravy bylo rozpuštěno asi 50 % ligninu a většina hemicelulózy působením 2% roztoku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> při teplotě 30 °C a čase působení 8 hodin. V procesu zcukření takto upraveného lignocelulóзовého materiálu bylo získáno 95 % glukózy z celulózy za 24 hodin při 45 °C.[24]

### **Předúprava s organickými rozpouštědly**

Z úspěšnou je také považována metoda předúpravy působením organických rozpouštědel na lignocelulóзовý materiál. Mohou být použity mnohé organické nebo vodné směsi rozpouštědel jako je methanol, ethanol, aceton, ethylenglykol a tetrahydrofurfurylalkohol. Rozpouštějí lignin a poskytují snadný přístup enzymům k celulóze. Touto metodou lze získat relativně čistý lignin jako vedlejší produkt.[24, 27]

Organická rozpouštědla lze kombinovat s kyselinami (kyselina chlorovodíková, sírová, šřavelová, salicylová), které působí katalyticky a štěpí vazby v řetězci hemicelulózy. Přitom dochází k minimálním ztrátám celulózy, které činí méně než 2 %. Pro odstranění rozpouštědel ze systému je nejčastěji využíváno odpařování. Rozpouštědla musí být odseparována ze směsi, jelikož působí inhibičně na enzymy i mikroorganismy. Kvůli ekonomice procesu jsou nejběžněji využívány ethanol a methanol, jakožto nízkomolekulární alkoholy s nižším bodem varu.[24,27]

### **1.3.4 Biologická předúprava**

Biologická předúprava lignocelulóзовého materiálu využívá vyšších a vláknitých hub, které rozkládají lignin a hemicelulózu, celulózu jen velmi málo, jelikož její struktura je odolnější. Využívají se druhy vyšších hub: *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ceriporia lacerata*, *Pleurotus ostreatus*. Vykazují vysokou účinnost delignifikace lignocelulóзовého materiálu.[27]

Působením vláknitých hub na lignocelulózu lze dosáhnout degradace ligninu a hemicelulózy. Nejúčinnější jsou pro biologickou předúpravu basidiomycety, jako např. *Aspergillus terreus*, *Trichoderma spp.*, *Penicillium camemberti*, *Phanerochaete chrysosporum*, které se kultivují při teplotě 25 - 35 °C po dobu 3 - 22 dnů. Při jejich použití došlo k úbytku ligninu o 65 - 80 % a hemicelulózy o 45 - 75 %.[26]



Tyto procesy jsou velmi výhodné z hlediska investičních nákladů (nízká spotřeba energie), další výhodou jsou mírné podmínky prostředí. Nevýhodou této předúpravy je pomalý průběh.[27]

*Tabulka 1: Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých způsobů předúpravy [24]*

	<b>metoda</b>	<b>výhody</b>	<b>inhibice a nevýhody</b>
<b>Fyzikální</b>	mletí	snížení krystalinity celulózy	vyšší spotřeba energie než je energie získaná z biomasy
	ozáření	zlepšení výnosnosti enzymatické hydrolýzy	intenzivní záření rozkládá oligosacharidy a glukózu; vysoké náklady
	úprava teplem	katalýza hydrolýzy hemicelulózy z ní vzniklými kyselinami	tvorba inhibičních produktů
<b>Fyzikálně-chemické</b>	AFEX	zvětšení měrného povrchu, odstranění ligninu a hemicelulózy, neprodukuje inhibitory pro následující procesy	není efektivní pro biomasu s vysokým obsahem ligninu
	exploze CO <sub>2</sub>	zvětšení měrného povrchu, nákladově efektivní, nezpůsobuje vznik inhibičních látek	nemění lignin ani hemicelulózu
	parní exploze	degradace hemicelulózy a přeměna ligninu; nákladově efektivní	neúplné narušení vazeb mezi ligninem a polysacharidy; vznik sloučenin inhibujících mikroorganismy
	horká voda (LHW)	odstranění hemicelulózy, zvětšení měrného povrchu, nákladově efektivní	neúplná delignifikace
<b>Chemické</b>	alkalická	odstranění hemicelulózy a ligninu, zvětšení měrného povrchu	dlouhá doba působení, tvorba nerozpustných solí a jejich začlenění do struktury biomasy
	kyselá	hydrolýza hemicelulózy na xylózu a jiné cukry, změna struktury ligninu	vysoké náklady na zařízení proti korozi, tvorba toxických látek
	ozonolýza	snížení obsahu ligninu, netvoří toxické látky	potřebné velké množství ozonu, vysoké náklady na provoz
	peroxid vodíku	vysoká výnosnost glukózy po hydrolýze	neúplná delignifikace
	organická rozpouštědla	hydrolýza ligninu a hemicelulózy	nutnost odstranění rozpouštědel z reaktoru (odpaření, kondenzace), vysoké náklady
<b>Biologické</b>		rozklad ligninu a hemicelulózy, nízká energetická náročnost	velmi nízká rychlost hydrolýzy

## 1.4 Metody hydrolýzy lignocelulóзовého materiálu

Uhlovodíkové polymery v lignocelulóзовých materiálech musí být převedeny na jednotlivé cukry v procesu nazývaném hydrolýza, aby mohly být využity mikroorganismy. Mezi nejčastěji používané metody patří kyselá a enzymatická hydrolýza. Existují i metody hydrolýzy jako je např. působení  $\gamma$ -záření, ozařování elektronovým paprskem či působení mikrovlnného záření, ovšem tyto metody jsou komerčně nevýznamné. Srovnání kyselé a enzymatické hydrolýzy je uvedeno v Tabulce 2.[16]

### 1.4.1 Kyselá hydrolýza

Zředěné či koncentrované kyseliny rozkládají celulóзовé a hemicelulóзовé polymery lignocelulóзовé biomasy na jednotlivé molekuly sacharidů. Ty mohou být fermentovány na ethanol.[31]

#### *Hydrolýza zředěnými kyselinami*

Kyselá hydrolýza lignocelulóзовých materiálů se provádí jako tzv. dvoustupňový proces s použitím zředěné  $H_2SO_4$  nebo minerálních kyselin (1 - 5% w/v roztok kyselin). Metoda zředěnými kyselinami je nejstarší technologie využívaná pro konverzi celulóзы na ethanol.[16]

V první fázi dochází k hydrolýze hemicelulóзы, ovšem z cukrů mohou vznikat jiné chemické látky vlivem vysokých teplot, především furfural. Degradace cukru snižuje celkový výnos sacharidů a krom toho, furfural a další vedlejší nežádoucí produkty inhibují proces fermentace. Z tohoto důvodu je první fáze prováděna za mírných podmínek, čímž je dosaženo vzniku pětiuhlíkatých cukerných jednotek. V druhé fázi tohoto procesu probíhá hydrolýza celulóзы, která je odolnější, tudíž je zapotřebí působení vyšších teplot (200 - 400 °C). Vznikají šestiuhlíkaté cukerné jednotky - glukóзы.[16]

Oba stupně hydrolýzy mají krátkou dobu působení. Výnosy manóзы a galaktóзы jsou poměrně vysoké, ovšem glukóзы je v hydrolyzátu pouze asi 50 %. Hydrolyzáty vzniklé v obou krocích jsou neutralizovány, např.  $Na_2SO_3$ , a fermentovány na alkohol.[19, 31, 32]

#### *Hydrolýza koncentrovanými kyselinami*

Nejčastěji používanými kyselinami pro tuto metody hydrolýzy jsou  $H_2SO_4$  a halogenové kyseliny, zejména HCl. Hydrolyzují celulóзу a hemicelulóзу za mírné teploty, a proto je degradace cukrů minimální. Výtěžnost ethanolu po fermentaci takto hydrolyzované celulóзы jsou poměrně vysoké, což je z ekonomického hlediska rozhodující. Na druhou stranu, koncentrované kyseliny jsou docela drahé, takže je žádoucí, aby byly zpětně vráceny do provozu po skončení hydrolýzy. Jednou z hlavních výhod této metody je efektivní využitelnost pro širokou škálu vstupní biomasy při přeměně na cukry a následně na ethanol.[16, 31]

### 1.4.2 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza je proces štěpení  $\beta$ -1,4-glukosidických vazeb působením enzymů, nazývaných celulóзы. Celulóзы mají schopnost odbourávat polymery celulóзы a hemicelulóзы za nízkých teplot na oligosacharidy až monosacharidy. Jsou to mikrobiální enzymy složené z několika synergických složek, které lze souhrnně označit jako celulóзовý komplex. Ten zahrnuje tři hlavní složky, endo-1,4- $\beta$ -glukanáza, exo-1,4- $\beta$ -glukanáza,  $\beta$ -1,4-glukosidáza, které mají svou funkci.[33, 34]

Výnosnost enzymatické hydrolýzy závisí na těchto faktorech, které je nutno optimalizovat k dosažení maximálního výtěžku v procesu zcukření:[2]

- typ předúpravy substrátu,
- inhibice enzymatické aktivity koncovým produktem,
- termostabilita enzymů,
- koncentrace enzymů,
- adsorpce enzymů na substrát,
- doba hydrolýzy,
- pH média,
- koncentrace substrátu v médiu,
- rychlost míchání.

### ***Endo-1,4-β-glukanáza***

Hlavní funkcí je snížení polymerace celulóзовého substrátu. Endo-1,4-β-glukanázy štěpí náhodně β-(1,4)-glykosidické vazby uvnitř amorfni části celulóзовého řetězce a tím dávají vznik oligosacharidům s různými počty sacharidických jednotek. Vznikají nové řetězce celulózy, jejichž konce jsou citlivé na působení exo-1,4-β-glukanázy.[35]

### ***Exo-1,4-β-glukanáza***

Exo-1,4-β-glukanáza je enzym štěpící celulózu od konce jejího řetězce za vzniku oligosacharidu celobiózy tvořeného dvěma molekulami glukózy spojenými β-(1,4)-glykosidickými vazbami. Občas, a to zejména v počáteční fázi hydrolýzy, může exo-1,4-β-glukosidáza odštěpovat z celulóзовého řetězce glukózu (monosacharid) a celotriózu (trisacharid).[36]

### ***β-1,4-glukosidáza***

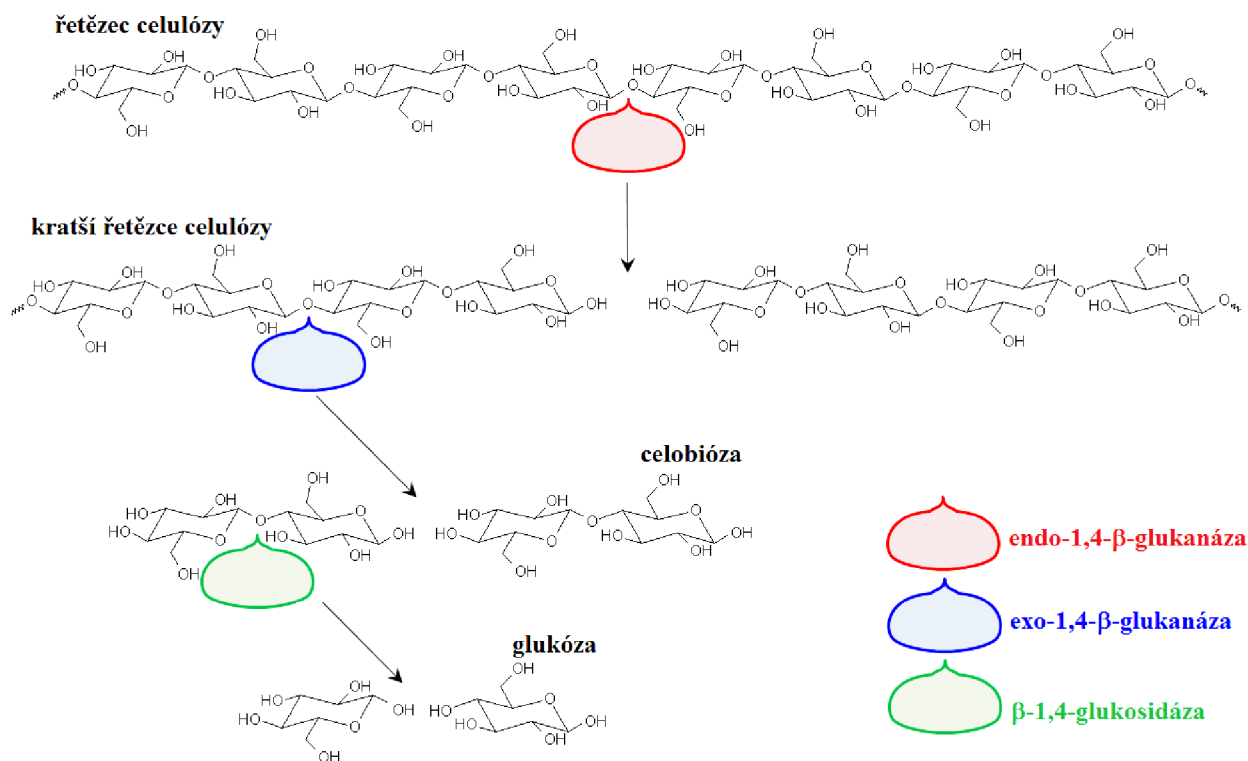
Enzym β-1,4-glukosidáza hydrolyzuje celobiózu a krátké oligosacharidy celulózy, vzniklé štěpením, na glukózu. Odstranění, nebo alespoň snížení koncentrace, celobiózy z hydrolyzátu je důležité z hlediska inhibičního působení celobiózy na endo-1,4-β-glukosidázu a exo-1,4-β-glukosidázu.[37, 38]

**Tabulka 2: Srovnání kyselá a enzymatické hydrolýzy [16, 31]**

<b>Kyselá hydrolýza</b>	<b>Enzymatická hydrolýza</b>
Nespecifická katalýza i delignifikace biomasy a hydrolýza celulózy	Specifická katalýza, nutno provést fyzikální a chemické předúpravy, pro dobrý výtěžek hydrolýzy
Rozklad hemicelulózy na látky inhibující hydrolýzu celulózy	Vznik čirého roztoku cukrů vhodného pro anaerobní fermentaci
Drsné reakční podmínky - nutnost zvýšení nákladů na zařízení vzhledem ke korozi zařízení a vysokým teplotám	Provoz za mírných podmínek - 50 °C, pH 4,8 a atmosférický tlak
Relativně nízké výtěžky glukózy	Vysoké výtěžky glukózy

### Mechanismus enzymatické reakce

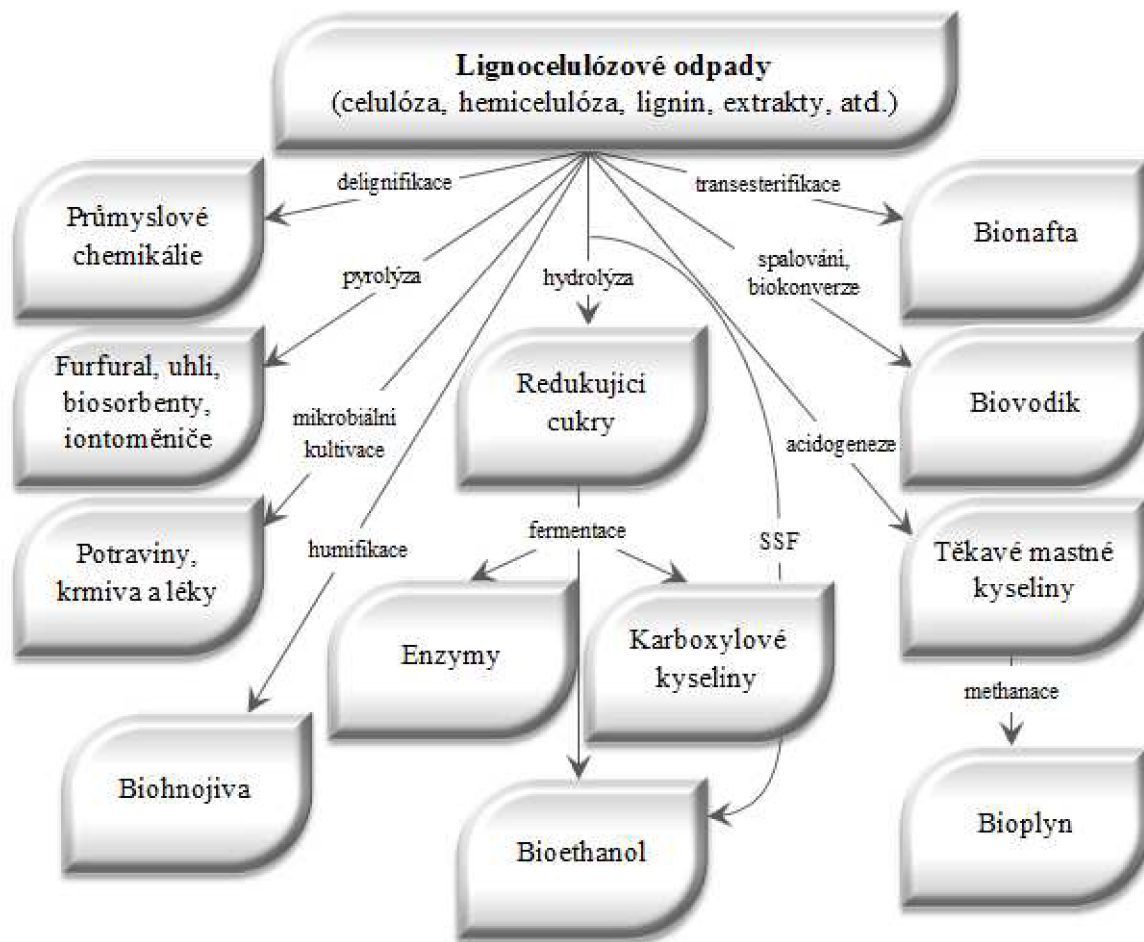
Hydrolýza celulózy probíhá za účasti celulózového komplexu. Enzym endo-1,4- $\beta$ -glukanáza štěpí celulózu kdekoli v řetězci za vzniku kratších fragmentů celulózy. Na ně nasedá enzym exo-1,4- $\beta$ -glukanáza, který napadá glykosidickou vazbu mezi druhou a třetí sacharidickou jednotkou na konci řetězce celulózy. Odštěpuje se disacharid celobióza, ze kterého vzniká glukóza činností enzymu  $\beta$ -1,4-glukosidáza.[31]



Obrázek 6: Mechanismus enzymatické hydrolýzy celulózy [31]

### 1.5 Průmyslové využití lignocelulóзовé biomasy

Lignocelulózová biomasa představuje obnovitelný zdroj potenciálně zkvasitelných sacharidů. Většina dále využitelného odpadu se získává ze zemědělství a potravinářského průmyslu. Vzhledem k jejich množství a obnovitelnosti se zvyšuje zájem jejich využití na výrobu mnoha produktů. Mezi hlavní patří enzymy, redukující cukry, furfural, ethanol, bílkoviny a aminokyseliny, sacharidy, lipidy, organické kyseliny, fenoly, aktivní uhlí, rozložitelné plastové kompozity, kosmetické výrobky, biosorbenty, pryskyřice, léky, potraviny a krmiva, methan, biopesticidy, sekundární metabolity, tenzidy, hnojiva a jiné.[26]



Obrázek 7: Schéma využití lignocelulózových odpadů [26]

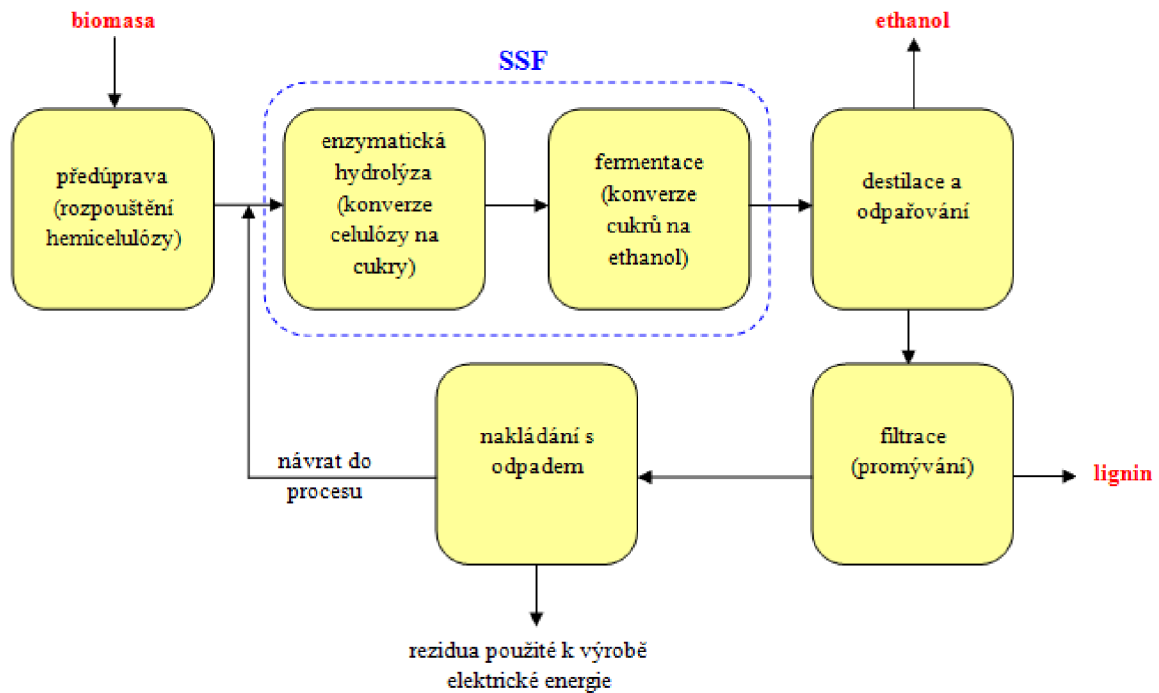
## 1.6 Metody konverze lignocelulózových materiálů na ethanol

### 1.6.1 Simultánní sacharifikace a fermentace - SSF

SSF je významná metoda v procesu výroby bioethanolu z lignocelulózové biomasy. Tento proces je účinný v kombinaci s předúpravou lignocelulózového materiálu zředěnou kyselinou nebo horkou vodou. V SSF jsou řetězce polysacharidů převáděny pomocí celuláz na zkvasitelné cukry. Tyto enzymy jsou však citlivé na inhibici koncovým produktem, tedy glukózou, xylózou, celobiózou a dalšími oligosacharidy. V tomto procesu je rychlost hydrolýzy vyšší, náklady na enzymy nižší, což vede k vyšším výtěžkům bioethanolu.[16, 39]

Metoda SSF vyžaduje stejné podmínky hydrolýzy a fermentaci vzniklých cukrů mikroorganismy. Musí být stejné pH, teplota a optimální koncentrace substrátu. Pro většinu celuláz je pH optimum 4,5 - 5,0 a teplotní optimum 50 - 55 °C v závislosti na kmeni, který tyto enzymy produkuje. Fermentace probíhá 5 - 7 dnů, záleží na dostupnosti celulózy enzymům. Hlavní nevýhodou je různé teplotní a pH optimum pro hydrolýzu a fermentaci. Hlavní výhody SSF jsou:

- zvýšení rychlosti hydrolýzy, které jinak inhibují aktivitu celulázy,
- nižší požadované množství enzymů,
- vyšší výtěžky produktu,
- nižší požadavky na sterilizaci, protože glukóza je převáděna rovnou na ethanol,
- kratší doba trvání procesu,
- menší objem reaktoru.[16]



**Obrázek 8:** Schematické znázornění konverze biomasy na ethanol za použití SSF [40]

### 1.6.2 Separovaná hydrolýza a fermentace - SHF

Enzymatická hydrolýza je v této metodě prováděna odděleně od fermentačního kroku. Z reaktoru po proběhnutí hydrolýzy je kapalný podíl převáděn do reaktoru, kde probíhá fermentace hydrolyzátu.[16]

Výhodou je možnost provádět každý krok za podmínek pro něj optimálních, které se mnohdy od sebe liší. Nevýhodou je inhibice celulózy a  $\beta$ -glukosidázy glukózou vzniklou při hydrolýze. Je tedy nutné vyšší množství enzymů, což znamená i vyšší náklady na proces.[16]

### 1.6.3 Přímá mikrobiální konverze - DCM

Přímá mikrobiální konverze zahrnuje výrobu celulolytických enzymů, hydrolýzu a fermentaci glukózy v jednom kroku. Tento proces je výhodný v tom, že snižuje počet potřebných reaktorů a usnadňuje tak obsluhu procesu. Při použití DCM nevznikají náklady či kapitálové investice na speciální enzymy, substrát je využíván i mikroorganismy produkujícími enzymy. Nevýhodou jsou nízké výnosy bioethanolu způsobené vznikem vedlejších produktů, jako je acetát či laktát, nízká tolerance mikroorganismů vůči ethanolu a omezený růst v hydrolyzátu.[16]

## 1.7 Papír - možný substrát pro výrobu ethanolu

Na produkci ethanolu využitím mikroorganismů jsou používány různé substráty, záleží však na tom, k jakým účelům bude ethanol použit. Pro potravinářský průmysl musí být substrátem suroviny, které splňují stanovená kritéria lišící se od požadavků na vstupní suroviny na výrobu palivového ethanolu. Jelikož náklady na substrát pro produkci palivového ethanolu tvoří asi jednu třetinu celkových nákladů, je nutné jej zvolit spolu s produkčním mikroorganismem tak, aby byly výtěžky ethanolu co nejvyšší. Je tedy nutné, aby produkční mikroorganismus maximálně využil složky substrátu a produkoval minimální množství vedlejších a zároveň nežádoucích produktů. Typ substrátu se volí v závislosti na vybraném produkčním mikroorganismu, přičemž při výrobě ethanolu jsou nejžádanější cukerné složky.

Ty jsou většinou produktem hydrolýzy škrobnatých surovin, v současné době je hojně využíván i lignocelulózový materiál, což papír bezesporu je.[26]

### 1.7.1 Výroba papíru

Na výrobu papíru se používá dřevo (nejčastěji ze smrku, ale i z jedle a listnatých stromů) a jiné lignocelulózové hmoty, které nelze zpracovávat v původním stavu na papír. Musí být nejprve rozvlákněn, a to buď mechanickým nebo chemickým způsobem.[41]

#### **Mechanický způsob**

Dezintegrace dřevnaté hmoty pomocí proti sobě se otáčejících kotoučů dává vznik tzv. dřevovině, což je suspenze vláken a inkrustujících látek. Mechanické rozvlákňování dává dřevovině nažloutlý či šedý tón s vysokou neprůhledností a hladkým povrchem.[41]

#### **Chemický způsob**

Třísky dřeva jsou vařené s chemikáliemi pod vysokým tlakem. Tím dojde k odstranění ligninu a hemicelulózy a je získána buničina (směs celulózových vláken). Výsledná suspenze obsahuje volná, ale neporušená vlákna. Existují tři různé způsoby:

1. *sulfitový způsob* - působení  $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$  a  $\text{H}_2\text{SO}_3$  za vyšší teploty a tlaku, což má za následek poměrně vysoký výnos buničiny,
2. *sulfátový způsob* - působení  $\text{Na}_2\text{S}$  a  $\text{NaOH}$  při teplotě  $150\text{ }^\circ\text{C}$  a  $0,7\text{ MPa}$  po dobu několika hodin, jedná se o šetrný způsob využívaný k degradaci celulózy, vznikají delší vlákna, což zajišťuje větší pevnost papíru,
3. *natronový způsob* - působení  $\text{NaOH}$  za vzniku méně kvalitní buničiny, dnes již nevyužívaný způsob díky nedostatečným parametrům.[42]

#### **Bělení buničiny**

Tradičními bělicími prostředky jsou:

- elementární chlor,
- chlornany (např.  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ),
- oxid chloričitý.

Buničiny se bělí vícestupňovými procesy, které se skládají z chlorace, alkalické extrakce a oxidačního dobřelování.[43]

#### **Plnění papíroviny**

Úkolem plnidel je zajistit potřebnou pórovitost papíru. Lze tak zvýšit hladkost papíru, lesk, bělost, neprůhlednost, tiskovou měkkost, zmenšit hygroskopičnost atd. Množství plnidel je možné určit podle obsahu popela.

Podle obsahu plnidel dělíme papíry do 4 skupin:

- *papíry neplněné* - např. elektroizolační, filtrační, pauzovací papíry
- *papíry s malým obsahem plnidel* (do 5 %) - např. novinový papír, některé druhy psacích papírů atd.
- *papíry se středním obsahem plnidel* (do 15 %,.) - např. papíry pro ofsetový tisk, psací papír, litografický atd.
- *papíry s vysokým obsahem plnidel* (nad 15 %) - např. papíry pro hloubkový tisk aj.[43]

### ***Další úpravy papíroviny***

Klížení papíru je nejstarším způsobem zušlechťování papíru, jehož cílem je hydrofobizovat povrch jednotlivých vláken do té míry, aby byl odolný vůči vsakování vody či vodného roztoku barev. Ke klížení se používají přírodní pryskyřice, parafín, silikonové oleje, škrob, latexy, syntetické pryskyřice aj. [43]

Barvení vlákniny je proces, kterým jsou dodávány papíru požadované barvy. Kromě barvení se používá také tónování pomocí nepatrného množství modré, fialové či červené barvy, které potlačují nežádoucí nažloutlý odstín papíru. Barviva používaná v papírenském průmyslu jsou např. nitrozobarviva, azobarviva, xantenová barviva, thiazinová barviva, ftalocyaniny atd.[43]

### ***Zplstnatění papíroviny a tvorba papíru***

Z pomletých papírových vláken obsahujících klíždla, plnidla a barviva se vytvoří 1% suspenze ve vodě a následně se přebytečná voda odstraní. Odvodnění musí být postupné, aby měla vlákna příležitost vzájemně se proplést, neboli "zplstit", což zajistí soudržnost a pevnost hotového papíru. Zplstnatění probíhá na sítích. Papírovina se zpracovává na papír na různých typech papírenských strojů. Na strojích s podélným sítím se vyrábějí papíry a kartóny, zatímco na strojích s vřícovými sítí většinou lepenky. Na těchto strojích dochází k odstranění zbytku vody a sušení papíru na obsah vody 3 - 8 %.[44]

## **1.8 Bioinženýrské charakteristiky**

### **1.8.1 Růstová křivka mikroorganismů**

Růst mikroorganismů je ovlivněn fyzikálními a výživovými faktory přítomnými v médiu (resp. v prostředí). Fyzikálními faktory je např. pH, teplota, osmotický tlak, hydrostatický tlak a obsah vody v médiu, v němž mikroorganismy rostou. Jako živiny vyžadují především uhlík, dusík, síru, fosfor a v některých případech ještě některé stopové prvky.[45, 46]

Růstová křivka je tedy znázornění průběhu růstu mikroorganismů, které vychází ze stanovení počtu buněk nebo koncentrace buněk (optická hustota) v médiu. Na osu  $x$  se vynáší čas (nejčastěji v hodinách), na osu  $y$  nárůst buněk. Počet buněk se stanovuje mikroskopicky v počítacích komůrkách nebo také kultivací na pevném médiu v Petriho miskách. Optická hustota ("optical density" = OD) se stanovuje turbidimetricky, přičemž je zaznamenáván nárůst buněčné hmoty. Růst mikroorganismů lze rozdělit do několika fází.[45, 46]

#### ***Lag fáze***

Tato fáze nastává po zaočkování kultury do média. Délka jejího trvání závisí na rychlosti adaptace daného mikroorganismu na nové prostředí. Zrychluje se jejich metabolismus, vytvářejí enzymy potřebné k využití nového média, ale zatím nejsou schopny reprodukce, pouze začínají zvětšovat svůj objem.[45, 46]

#### ***Fáze zrychleného růstu***

Lze ji označit za přechod mezi lag-fází a fází exponenciálního růstu, se kterou bývá většinou spojována. Buňky rychle zvětšují svůj objem a začínají se množit.[45, 46]



### **Exponenciální fáze**

Dochází k maximálnímu zkrácení generační doby, což je čas potřebný ke zdvojení počtu generací. Buňky se množí velkou rychlostí a stejně tak i zvětšují svůj objem. To znamená, že kromě zkrácení generační doby se snižuje také doba zdvojení, tj. čas, za který se zvýší hmotnost biomasy dvojnásobně. Zvyšování počtu buněk je v této fázi exponenciální. Tato fáze je významná z hlediska tvorby primárních metabolitů, jako je např. ethanol, kyselina mléčná, kyselina octová atd. [45,46]

V exponenciální fázi probíhá intenzivní (exponenciální) nárůst buněk, který lze sledovat jako koncentraci buněk nebo biomasy:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X , \quad (1)$$

kde  $\mu$  ... měrná růstová rychlost mikroorganismů [ $\text{h}^{-1}$ ],  $X$  ... koncentrace biomasy [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ],  $t$  ... čas [h]. [45, 46]

### **Fáze zpomaleného růstu**

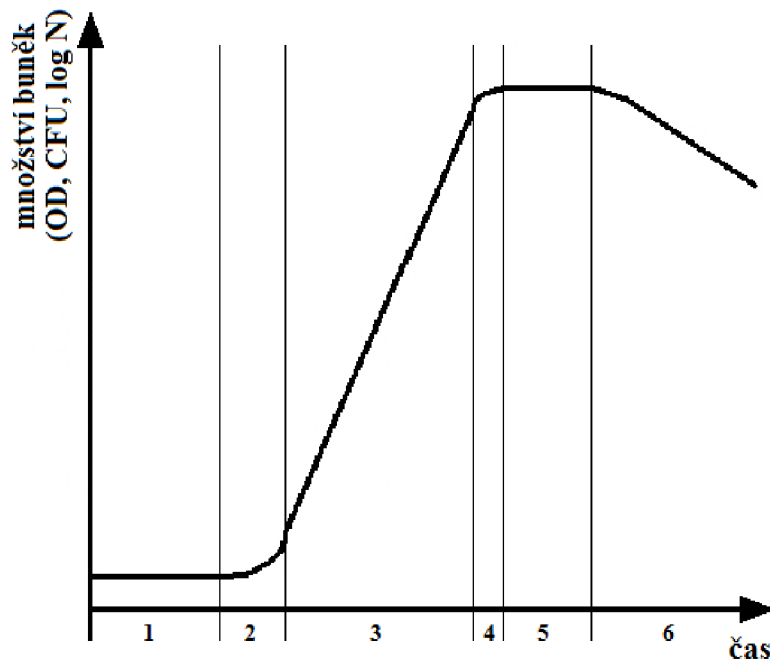
V této fázi se snižuje rychlost růstu a dělení buněk. Dochází totiž k vyčerpání živin a k inhibici vzniklými metabolity. [45, 46]

### **Stacionární fáze**

Buňky už nerostou, ani se nemnoží, tudíž koncentrace mikroorganismů v médiu je konstantní. Limitace některými živinami má za následek tvorbu sekundárních metabolitů, což má velký význam z průmyslového hlediska. [45, 46]

### **Fáze odumírání**

Během této fáze dochází k postupnému odumírání, buňky hynou a koncentrace živých buněk klesá. To je zřetelné pouze v počítacích komůrkách pod mikroskopem po obarvení mrtvých buněk, protože při turbidimetrickém stanovení se měří zákal, který vytváření jak mrtvé, tak i živé buňky. [45, 46]



Obrázek 9: Růstová křivka [45]

### 1.8.2 Vsádkový systém (batch kultivace)

Vsádkové uspořádání je pro většinu maloobjemových mikrobiálních a tkáňových reaktorů nejběžněji používané. Do reaktoru se vloží fermentační médium a inokulum, nastaví se reakční podmínky, kdy roste biomasa nebo kdy dochází k tvorbě žádaných metabolitů. Vždy záleží na tom, za jakým účelem je fermentace prováděna. Jakmile je dosaženo buďto zisku biomasy, produkce metabolitů nebo dojde ke spotřebování substrátu, proces musí být přerušeno. Po vyprázdnění je připraven pro novou vsádku.[47]

Vsádkové uspořádání nese spoustu výhod, ale i nevýhod. Výhodou je snadná sterilizovatelnost média a nižší riziko kontaminací či mutací biomasy, jelikož do vsádkového systému není během fermentace zasahováno. Lze měnit velmi snadno reakční podmínky jednotlivých vsádek. Zejména při výzkumu, ale i v provozu dochází k relativně malé spotřebě drahého média či inokula, což je velmi žádoucí. Při výrobě sekundárních metabolitů lze řízeně oddělit fázi růstu mikroorganismů od produkční fáze. Naopak nevýhodou je, že při vsádkovém provozu vznikají časové ztráty, protože je nutné reaktor vyprázdnit, vyčistit a znovu napustit. Před použitím nové vsádky musí dojít k její sterilizaci a musí se počítat i s časovými ztrátami v důsledku lag-fáze mikroorganismů, kdy probíhá jejich adaptace na substrát a dané reakční podmínky.[47]

#### *Vyjádření jednotlivých rychlostí procesu*

Je-li objem reaktoru konstantní, je možno jednotlivé rychlosti procesu (změny proměnných s časem) vyjádřit pomocí vztahů, kde  $X$ ,  $P$ ,  $S$ ,  $C$ ,  $C_L$  a  $\Delta H$  vyjadřují koncentrace dané veličiny a  $t$  je čas:[45]

- rychlost růstu mikroorganismů:  $r_x = \frac{dX}{dt}$ , (2)

- rychlost tvorby produktu:  $r_p = \frac{dP}{dt}$ , (3)

- rychlost spotřeby substrátu:  $r_s = \frac{dS}{dt}$ , (4)

- rychlost produkce oxidu uhličitého:  $r_c = \frac{dC}{dt}$ , (5)

- rychlost spotřeby rozpuštěného kyslíku v kapalině:  $r_{C_L} = \frac{dC_L}{dt}$ , (6)

- rychlost produkce tepla:  $r_{\Delta H} = \frac{d(\Delta H)}{dt}$ . (7)

Využití těchto rovnic je běžné pouze v bilančních rovnicích, pro popis biologického procesu jsou významnější tzv. měrné (specifické) rychlosti tvorby a spotřeba látek. Tyto rychlosti jsou vždy vztaženy na koncentraci mikroorganismů a v mikrobiologických a bioinženýrských vztazích mají nejčastěji rozměr  $h^{-1}$ . Jsou tedy získány vztahy, kde  $X$ ,  $P$ ,  $S$ ,  $C$ ,  $C_L$  a  $\Delta H$  vyjadřují koncentrace dané veličiny a  $t$  je čas: [45]

- měrná rychlost růstu mikroorganismů:  $\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$ , (8)

- měrná rychlost syntézy produktu:  $\pi_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$ , (9)

- měrná rychlost spotřeby substrátu:  $\sigma_s = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$ , (10)

- měrná rychlost produkce oxidu uhličitého:  $\pi_c = \frac{1}{X} \cdot \frac{dC}{dt}$ , (11)

- měrná rychlost spotřeby kyslíku:  $\sigma_{C_L} = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dC_L}{dt}$ , (12)

- měrná rychlost produkce tepla:  $\pi_{\Delta H} = \frac{1}{X} \cdot \frac{d(\Delta H)}{dt}$ . (13)

## 1.9 Mikroorganismy vhodné pro metodu SSF a ethanolové kvašení

Velké množství mikroorganismů, především bakterie a kvasinky, má schopnost produkovat zvýšené množství ethanolu ze sacharidických substrátů. Jako bakteriální producenty ethanolu lze označit mikroorganismy z rodu *Zymomonas*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Thermoanaerobacterium*, *Zymobacter* a *Leuconostoc*. Kvasinky a vláknité houby produkující ethanol patří do těchto rodů: *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Monascus*, *Zygoascus*, *Aureobasidium*, *Torulaspota*, *Chrysosporium*, *Pichia* a další.[6]

Z těchto zmíněných mikroorganismů jsou nejlepšími producenty ethanolu *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Zymomonas mobilis*. [6]

### 1.9.1 *Saccharomyces cerevisiae*

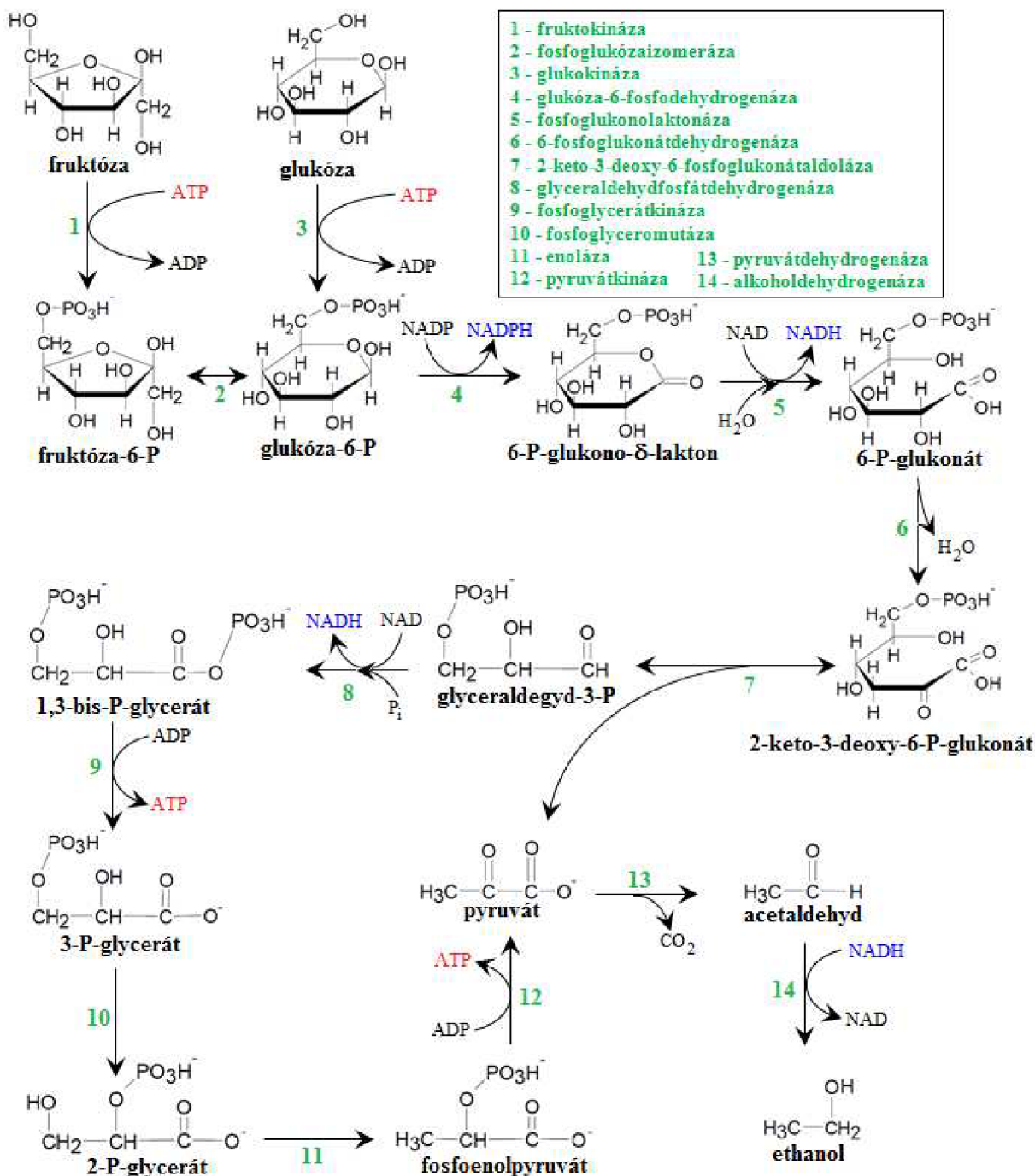
Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou nejpoužívanějšími mikroorganismy v lihovarnictví a pivovarnictví. Patří do třídy *Ascomycetes*, jejich vegetativní rozmnožování se vyznačuje multilaterálním pučením, což má za následek bohatě rozvětvené pseudomycelium.[6]

Nejčastějším substrátem pro ethanolovou fermentaci *Saccharomyces cerevisiae* jsou hexózy (glukóza, galaktóza), ale využívají i sacharózu (glukóza a fruktóza), maltózu (dvě glukózové jednotky spojeny  $\alpha$ -(1,4)-glykosidickou vazbou) a rafinózu (glukóza, fruktóza a galaktóza). Glukózu využívá a metabolizuje přes Embdenovu-Meyerhofovu-Parnasovu dráhu (EMP), která bývá označována také jako hexózodifosfátová dráha.[6, 7]

### 1.9.2 *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* je gramnegativní, chemoorganotrofní, fakultativně anaerobní prokaryotický mikroorganismus. Optimální teplota jejich růstu je 30 °C a hodnota pH 5. Poprvé byly bakterie *Zymomonas mobilis* izolovány z alkoholických nápojů, což značí jejich toleranci vůči polyolům, ale nejsou tolerantní k vyšším koncentracím iontů.[6]

*Zymomonas mobilis* zkvašují pouze glukózu, fruktózu a sacharózu. Glukózu metabolizují přes glykolytickou Entnerovu-Doudoroffovu dráhu (ED), která je běžně přítomná u aerobních mikroorganismů. Tato dráha je pro fermentaci ethanolu velkou výhodou, neboť vysoké koncentrace glukózy neinhibují enzymy Entner-Doudoroffovy dráhy, jelikož konverze glukózy na ethanol probíhá velmi rychle. Enzymy této dráhy jsou vysoce tolerantní také vůči ethanolu, což je spjato s obsahem mastných kyselin (především kyselina myristová, palmitová, cis-vakcenová) v plazmatické membráně *Zymomonas mobilis*. Plazmatická membrána těchto bakterií obsahuje také hopanoidy (pentacyklické triterpenové lipidy). Předpokládá se, že právě díky hopanoidům a kyselině cis-vakcenové jsou *Zymomonas mobilis* vysoce tolerantní vůči ethanolu.[6, 7]



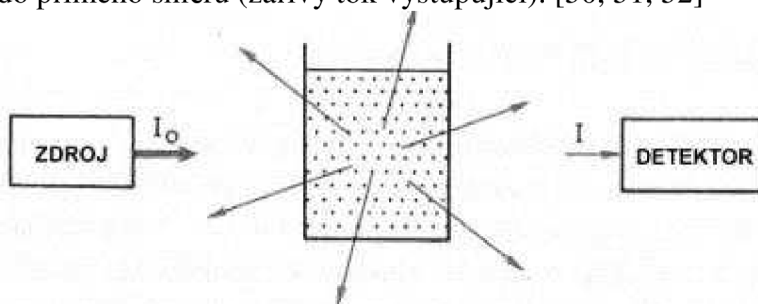
Obrázek 10: Entnerova-Doudoroffova dráha [48, 49]

Z hlediska fyziologie a metabolismu jsou bakterie *Zymomonas mobilis* výhodnější pro produkci ethanolu. Rostou mnohem rychleji než kvasinky, mají nižší produkci biomasy, jsou velmi ethanol tolerantní a osmotolerantní, mají vysokou specifickou rychlost přijímání substrátu, vyšší specifickou produkční rychlost a menší produkci vedlejších metabolitů. Na druhou stranu, ethanol vyprodukovaný pomocí *Zymomonas mobilis* nelze využít pro potravinářské účely z důvodu přítomnosti nežádoucích sirných a hnilobných pachů a příchutí.[6, 7]

## 1.10 Analytické metody

### 1.10.1 Turbidimetrie

Pojmem turbidimetrie se označuje optická metoda využívaná k měření koloidních nebo zakalených roztoků ve směru primárního záření. Záření dopadá na kyvetu analogicky jako u klasické spektrofotometrie (viz Obrázek 11). Měří se propustnost záření roztokem, jehož výsledkem je absorpce primárního i sekundárního záření v přímém směru (zářivý tok vstupující), rozptyl záření do všech stran (mimo přímý směr; zářivý tok absorbovaný) a rozptyl záření do přímého směru (zářivý tok vystupující). [50, 51, 52]



**Obrázek 11:** Dráha paprsku primárního záření [53]

Množství rozptýleného světla závisí na: [54]

- koncentraci částic
  - v širokém rozsahu koncentrací jde o závislost lineární, tudíž lze využít Lambert-Beerova zákona, stejně jako u fotometrických metod
- velikosti částic
  - množství rozptýleného světla je přibližně nepřímo úměrné molekulové hmotnosti částice
- vlnové délce světla
  - v praxi se jako nejvhodnější používají vlnové délky od 340 do 450 nm, přičemž kratkovlnnější světlo bývá pohlceno bílkoviny, které jsou zpravidla přítomny v biologických vzorcích

Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální:

$$I_t = I_0 \cdot e^{-\tau l}, \quad (14)$$

kde  $I$  = intenzita prošlého záření,  $I_0$  = intenzita světelného zdroje,  $\tau$  = turbiditní koeficient,  $l$  = optická dráha kyvety. [55]

Tato rychlá a účinná metoda se využívá také pro odhad počtu buněk v tekutém médiu, hlavně stanoví-li se velký počet kultur najednou. V případě měření zákalu kultury se používá veličina optická hustota (značení OD, z anglického optical density). Optická hustota by měla být přepočítána na množství buněk. Na velkých částicích může docházet k zeslabení intenzity paprsku především rozptylem záření. Využívají se kolorimetry nebo spektrofotometry. Slepý vzorek k nastavení 100% transmittance je nezaočkované kultivační médium. Podle barvy roztoku se mění vlnové délky: [56, 57]

- 420 nm pro čiré roztoky
- 540 nm pro světle žluté roztoky
- 600-625 nm pro žluté až hnědé roztoky

### 1.10.2 Stanovení sušiny biomasy

Stanovení sušiny buněk je přímou cestou ke stanovení buněčné hmoty v daném objemu. Kultura je odstraněna z média (např. centrifugací), poté je sediment promyt, vysušen a zvážen. Nevýhodami této metody je časová náročnost a poměrně malá citlivost. Chyba 1 mg při vážení může představovat i  $5 \cdot 10^{12}$  buněk. V potravinářském průmyslu se nejčastěji využívá sušení při 105 °C a probíhá až do konstantního úbytku hmotnosti, kdy dojde k srovnání parciálního tlaku odpařované vody na povrchu materiálu a parciálním tlakem sušícího média. Z vnitřních vrstev buněk se voda na povrch dostane pomocí difúze. Sušení a jeho rychlost je ovlivněno vlastnostmi vzorku (povaha vzorku, tvar částic, množství navážky), teplotou, vlhkostí, rychlostí a směrem proudění sušícího média. [58, 59]

### 1.10.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie - HPLC

HPLC je zkratkou anglického High Performance Liquid Chromatography, což lze přeložit jako vysokoučinná kapalinová chromatografie. Chromatografie je řazena mezi separační metody, jelikož se separují, tedy oddělují, jednotlivé složky obsažené v analyzovaném vzorku. Tento vzorek se vnáší mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, které jsou označovány jako mobilní a stacionární fáze. [50]

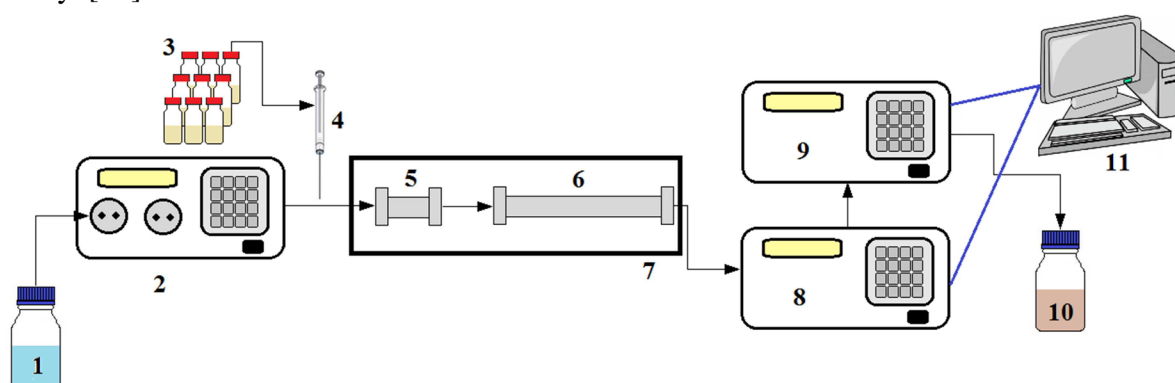
Mobilní fáze je pohyblivá, což znamená, že neustále protéká kolonou a unáší tak analyzovaný vzorek. Mobilní fáze může být po celou dobu analýzy konstantní, tento jev nazýváme jako izokratickou eluci. Naopak při gradientové eluci je měněno složení mobilní fáze, ve většině případů jde o zesilování její polarity. Rozpouštědla seřazená podle rostoucí polarity tvoří tzv. eluotropní řadu (Tabulka 3). Ty, která jsou umístěná v eluotropní řadě blízko sebe, jsou dobře mísitelná, rozpouštědla z protilehlých konců jsou nemísitelná. [50]

Stacionární fáze je nepohyblivá a tvoří náplň kolony, kde se zachytávají jednotlivé molekuly látek na základě různých fyzikálních a chemických interakcí. V systému normálních fází je stacionární fáze polární. V tomto případě se jako stacionární fáze nejčastěji používá siligel (silica), a to s různě upravenými vlastnostmi, dále pak oxid hlinitý (alumina). Jako chemicky vázané polární stacionární fáze jsou nejběžnější aminopropyl, kyanopropyl a diol, méně používané jsou pentafluorfenylpropyl a nitrofenyl. Systém obrácených fází má stacionární fázi nepolární a je běžně u chromatografických metod používána. Nepolární stacionární fáze jsou většinou tvořeny uhlím, polyamidy, polystyreny a potom také nepolární chemicky vázané fáze, které vznikají chemickou modifikací silikagelu (tj. kovalentní vazbou hydrofobních skupin na silanové skupiny povrchu). Nejčastěji používané typy jsou oktadecylovaný silikagel ( $\text{SiC}_{18}$ ), oktylovaný silikagel ( $\text{SiC}_8$ ), silikagel hydrofobizovaný vazbou fenylové skupiny ( $\text{SiPhe}$ ). [50]

**Tabulka 3:** Eluotropní řada (systém s normálními fázemi) [54]

nepolární (lipofilní) rozpouštědlo	n-hexan	1-butanol	polární (hydrofilní) rozpouštědlo
	cyklohexan	pyridin	
	chlorid uhličitý	aceton	
	benzen	propanol	
	dichlormetan	metanol	
	chloroform	formamid	
	dietyléter	voda	

Přístroje HPLC (viz Obrázek 12) se skládají z několika částí, jejichž funkce je důležitá pro přesnou analýzu vzorků. Na začátku jsou zásobníky s mobilní fází, což jsou zpravidla skleněné láhve s přívodní kapilárou z PTFE (polytetrafluorethylen) a filtrační fritou na jejím konci. Mobilní fázi je nutné probublávat heliem pro odstranění rozpuštěných plynů. Následuje vysokotlaké čerpadlo, které zajistí konstantní průtok kolonou. Analyzovaný vzorek je nastříkovan pomocí injektoru do předkolony, která chrání kolonu před látkami s velmi silnou retencí. Z předkolony vzorek putuje do kolony, kde je unášen mobilní fází a různě silně zadržován stacionární fází. Jednotlivé složky putují kolonou různou rychlostí až k detektoru, který průběžně měří analytický signál (index lomu, absorpenci, vodivost,...). Ten putuje do vyhodnocovacího zařízení, kde je zpracován a zakreslen do chromatogramu. Stejně jako u všech chromatografických metod lze stanovit jak kvalitu, tak i kvantitu jednotlivých složek. Kvalita se určuje na základě retenčních časů, kvantita potom plochou píku příslušné složky. [50]



**Obrázek 12:** Schematické znázornění HPLC přístroje;

1 - zásobní láhev s mobilní fází, 2 - čerpadlo, 3 - auto-sampler, 4 - injektor, 5 - předkolona, 6 - kolona, 7 - termostat, 8 - detektor (např. UV/VIS), 9 - detektor (např. RID), 10 - odpadní láhev, 11 - PC (sběr a analýza dat)

Na popis doby složky analytu strávené v koloně se používají retenční charakteristiky, respektive veličina označená jako retenční faktor  $k$ , vyjadřující poměr časů, který sloučenina stráví ve fázi stacionární a mobilní.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (15)$$

kde  $t_R$  = retenční čas (čas, který uplyne od nástřiku vzorku po maximum příslušného píku),  $t_M$  = mrtvý retenční čas (čas, za který projde kolonou mobilní fáze, tedy nezadržovaná složka). [50]



## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

#### 2.1.1 Enzymy pro hydrolýzu lignocelulózových materiálů

Firma Novozymes s partnery se snaží plně pochopit zásadní vztah mezi procesy a enzymy, aby mohli vytvořit roztoky umožňující získat energii z obnovitelných zdrojů. Ethanol z celulosových zdrojů může být v budoucnu hlavním zdrojem udržitelné energie. Mnoho surovin (např. kukuřičné klasy, pšeničná sláma, biomasa ze dřeva a komunální odpad) je snadno dostupných. Oproti palivům vyráběných z ropy může použití ethanolu snížit emise CO<sub>2</sub> až o 90%. Maximální výtěžek enzymatické hydrolýzy je dosažen použitím optimální směsi, která se liší dle složení jednotlivých frakcí (celulóza, hemicelulóza a lignin) v substrátu. I když mají používané enzymy docela velký teplotní rozsah, záleží jejich aktivita na této teplotě. Nižší teploty aktivitu snižují, příliš vysoké teploty zas mohou způsobit denaturaci enzymu. Pro enzymatickou hydrolýzu byly použity dva enzymy z produktové řady *Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit*. [60]

##### 2.1.1.1 NS22086 - Celulázový komplex

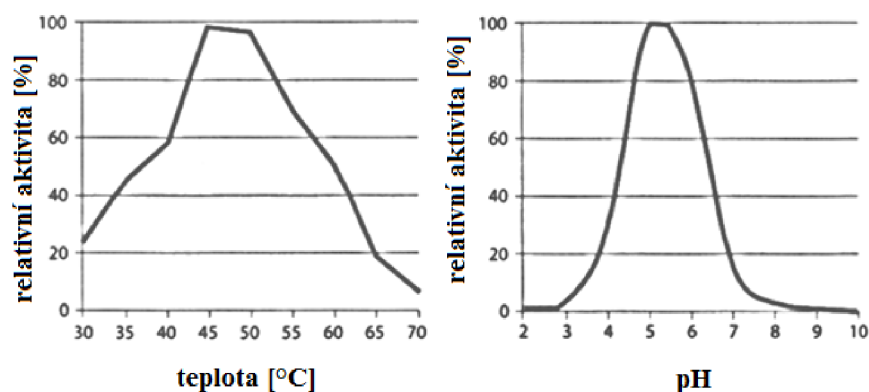
Využívá se hlavně k hydrolýze lignocelulózových materiálů, které jsou rozkládány hlavně na glukózu a celobiózu. Mohou se vyskytnout i vyšší polymery složené z glukózy. Tento komplex může být použit také ke snížení viskozity nebo ke zvýšení výtěžků extrakce různých produktů rostlinného původu. Použití v kombinaci s NS22118 (β-glukosidáza) a NS22083 (xylanáza) může jejich účinnost ještě zvýšit. [60]

**Tabulka 4:** Klasifikace a vlastnosti celulázového komplexu NS22086 [60]

aktivita	hustota [kg·dm <sup>-3</sup> ]	pH	teplota [°C]	dávkování % w/w [TS]
1,000 BHU(2)*g	1,15	5,0 - 5,5	45 - 50	1 - 5 %

\*BHU(2) - jednotka hydrolýzy biomasy

Obrázek 13 znázorňuje aktivitu NS22086 při různých teplotách a hodnoty pH. Jako substrát zde byla použita promytá a pomocí kyseliny předupravená kukuřičná píce. Pro praktické aplikace jsou optimální podmínky asi 45 - 50 ° C a pH 5,0. [60]



**Obrázek 13:** Aktivita NS22086 při různých teplotách a hodnotách pH [60]



### 2.1.1.2 NS22118 - $\beta$ -glukosidáza

Tento enzym je znám také jako celobiáza, která hydrolyzuje celobiózu na glukózu. Používá se jako doplněk NS22086, aby byla zvýšena výtěžnost z kvasitelných cukrů. Množství tohoto enzymu by mělo být vzhledem ke komplexu NS22086 přibližně 0 - 4% (v/v). [60]

**Tabulka 5:** Klasifikace a vlastnosti  $\beta$ -glukosidázy NS22118 [60]

aktivita	hustota [ $\text{kg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	pH	teplota [ $^{\circ}\text{C}$ ]	dávkování % w/w [TS]
250 CBU*/g	1,2	2,5 - 6,5	45-70	0,2 - 0,6 %

\*CBU - celobiázová jednotka

## 2.1.2 Chemikálie

### 2.1.2.1 Příprava kultivačních médií

- kvasničný extrakt - pro bakteriologii, Carl Roth
- síran amonný - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- dihydrogenfosforečnan draselný - p.a. Lach-Ner s.r.o.,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- síran hořečnatý heptahydrát - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{MgSO}_4\cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- D-glukóza monohydrát - p.a., PENTA,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6\cdot\text{H}_2\text{O}$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.2 Příprava fyziologického roztoku

- chlorid sodný - p.a., PENTA,  $\text{NaCl}$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.3 Příprava roztoků na stanovení celulózy

- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- kyselina octová 99,8% - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$
- kyselina dusičná 65% - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{HNO}_3$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.4 Příprava roztoků na úpravu papíru

- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- hydroxid sodný - čistý, PENTA,  $\text{NaOH}$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.5 Příprava tlumivých roztoků

- hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
- kyselina citrónová monohydrát - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot\text{H}_2\text{O}$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.6 Příprava kalibračních roztoků pro HPLC

- D-glukóza bezvodá - p.a., Lach-Ner s.r.o.,  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- ethanol absolutní - p.a., Merck s.r.o.,  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
- destilovaná voda,  $\text{H}_2\text{O}$

### 2.1.2.7 Ostatní

- methanol HPLC pro analýzu - Lach-Ner s.r.o., CH<sub>4</sub>O
- kyselina sírová 96% - p.a., Lach-Ner s.r.o., H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### 2.1.3 Kultura

V této práci byla používána kultura gramnegativních bakterií *Zymomonas mobilis* LMG457 pořízená ze sbírky mikroorganismů ústavu biotechnologie a potravinářství na Slovenské technické univerzitě v Bratislavě.

### 2.1.4 Substrát

Vlnitá lepenka - odpadní obalový materiál, v této práci byla použita lepenka pouze bez potisku. Výkres a kancelářský papír zakoupený v papírnictví.

### 2.1.5 Přístroje

- analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- centrifuga EBA 20 Hettich MANEKO
- centrifuga Eppendorf 5417 R
- elektrický vařič ETA dvouplotýnkový
- elektrický vařič Rohson jednoplotýnkový
- HPLC
  - detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
  - diferenciální refraktometr RID K 101
  - pumpa ECOM s.r.o.
  - auto-sampler HT 300
  - termostat kolonový LCO 101 ECOM s.r.o.
- mikroskop MBL 2100 trinokulární
- mikrovlnná trouba Daewoo KOR-6L15, výkon 700 W
- minitřepačka lab dancer vario IKA
- mixér ROHNSON Multi Duo R-536, 750W
- muflová pec VEB ELEKTRO BAD FRANKENHAUSEN
- pH metr pH 211 HANNA
- sušárna UM 500 Memmert
- temperovaná třepačka
  - třepačka Heidolph UNIMAX 1010
  - inkubátor Heidolph 1000
- trouba elektrická MORA 524
- turbidimetr Ultrospec 10 AP Czech
- ultrapur DeltaChrom
- ultrazvuková čisticka Ultrasound
- váhy elektronické Helago EK-300
- váhy elektronické OHAUS

### 2.1.6 Software

- Microsoft Word 2007, Microsoft Excel 2007
- Clarity Chromatography Station 2.6.6.574
- Malování, Microsoft Office Picture Manager 2007, ChemSketch (úprava a výroba obrázků)

## 2.2 Příprava roztoků

### 2.2.1 Kultivační médium pro *Zymomonas mobilis*

Kultivační médium bylo připraveno rozpuštěním příslušného množství živin v destilované vodě dle Tabulky 6. Množství jednotlivých živin byly přepočítány vždy na požadovaný objem.

Stejným způsobem byly připravovány i inokulační média pro bakterie *Zymomonas mobilis*.

*Tabulka 6: Navážky jednotlivých složek média na 1000 ml destilované vody*

složka média	m [g]
kvasničný extrakt	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7 H <sub>2</sub> O	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
glukóza	100

### 2.2.2 Fyziologický roztok

Jako fyziologický roztok pro dlouhodobější úchovu mikroorganismů se používá roztok NaCl. V tomto případě byl připraven v koncentraci 8,5 g·dm<sup>-3</sup>. Do 500 ml odměrné baňky bylo kvantitativně převedeno a v destilované vodě rozpuštěno 4,25 g NaCl navážených na předvážkách. Odměrná baňka byla doplněna po rysku destilovanou vodou a řádně promíchána.

### 2.2.3 Roztoky na stanovení celulózy

Nejdříve byla připravena 80% kyselina octová naředěním 99,8% kyseliny octové destilovanou vodou. Množství kyseliny koncentrované kyseliny bylo vypočítáno na 864,5 ml do 1000 ml roztoku. Naředěná kyselina octová byla dále míchána s kyselinou dusičnou v poměru 10:1 (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> : HNO<sub>3</sub>). Takže 1000 ml C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> bylo smícháno se 100 ml koncentrované HNO<sub>3</sub>.

Dále bylo vypočítáno ředění pro přípravu 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z koncentrované, tedy 96%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Do odměrné baňky o objemu 1000 ml s destilovanou vodou bylo přidáno 667,7 ml koncentrované kyseliny a doplněno na rysku podle dolního menisku.

### 2.2.4 Roztoky na předúpravu substrátu (papíru)

Podle [61] byly zvoleny roztoky zředěné kyseliny i zásady, tedy 2% w/v roztok H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2% w/v roztok NaOH, jelikož při těchto koncentracích byly v této studii dosaženy nejlepší výsledky.

Byla vypočítána navážka NaOH odpovídající 2% w/v roztoku, což je 20 g NaOH na 1000 ml destilované vody. Navážka NaOH byla rozpuštěna v kádince s vodou, následně převedena do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněna na rysku tak, že dolní meniskus se dotýkal rysky.

Obdobným způsobem byl připraven i roztok 2% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Do 1000 ml odměrné baňky s destilovanou vodou bylo napipetováno 11 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a doplněno destilovanou vodou po rysku, přičemž rysky se dotýkal dolní meniskus.

### 2.2.5 Tlumivý roztok (pufr)

Podle Tabulky 7 byly vypočítány navážky pro dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného a pro monohydrát kyseliny citronové odpovídající pH 4,8. Bylo tedy rozpuštěno 17,77 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a 5,29 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v destilované vodě, převedeno do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněno po rysku tak, aby splývala s dolním meniskem. Po promíchání bylo ověřováno pH a naměřena hodnota  $\text{pH } 4,81 \pm 0,02$ .

**Tabulka 7:** Hodnoty  $x$  odpovídají 2 M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  a  $y$  1 M roztoku  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  udávané v ml na 100 ml roztoku

$x$	$y$	pH	$x$	$y$	pH
44,6	5,4	2,6	24,3	25,7	5,0
42,2	7,8	2,8	23,3	26,7	5,2
39,8	10,2	3,0	22,2	27,8	5,4
37,7	12,3	3,2	21,0	20,0	5,6
35,9	11,1	3,4	19,7	30,3	5,8
33,9	16,1	3,6	17,9	32,1	6,0
32,3	17,7	3,8	16,9	33,1	6,2
30,7	19,3	4,0	15,4	34,6	6,4
29,4	20,6	4,2	13,6	36,4	6,6
27,8	22,2	4,4	9,1	40,9	6,8
26,7	23,3	4,6	6,5	43,6	7,0
25,2	24,8	4,8			

### 2.2.6 Mobilní fáze pro přístroj HPLC

Jako mobilní fáze pro analýzu sacharidů a ethanolu byl zvolen 1,3 mM roztok  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Do 1000 ml odměrné baňky s deionizovanou vodou bylo napipetováno 72,58  $\mu\text{l}$ . Po doplnění na rysku byl roztok důkladně promíchán a zfiltrován přes nitrocelulózový membránový filtr s velikostí pórů  $0,40 \pm 0,06 \mu\text{m}$ . Tím byla mobilní fáze zbavena případných nečistot a po převedení do zásobní láhve vložena na ultrazvuk po dobu 30 minut, kde došlo k odplynění.

### 2.2.7 Roztoky pro kalibrační křivky

Byly připraveny kalibrační roztoky glukózy a ethanolu. Nejdříve byly namíchány roztoky o nejvyšší koncentraci těchto látek a postupným ředěním přichystáno 10 roztoků o rostoucí koncentraci, dle Tabulky 8.

**Tabulka 8:** Příprava kalibrační řady jednotlivých složek

	c [g/l]									
glukóza	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
ethanol	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

### 2.3 Kultivace a stanovení růstové křivky

Biomasa byla rozkultivována v 100 ml kultivačního média (viz. 2.2.1), které bylo zaočkováno 10 ml zamražené kultury. Baňka byla umístěna na temperovanou třepačku s nastavenou teplotou  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a 150 otáčkami za minutu. Kultivace probíhala bez vnějších

zásahů 2 dny. Po jejím ukončení byly buňky centrifugovány 10 minut při 6000 otáčkách za minutu. Sediment byl promyt sterilním fyziologickým roztokem (viz. 2.2.2) a opět centrifugován za stejných podmínek. Poté byl sediment opět rozsuspendován pomocí vortexu ve sterilním fyziologickém roztoku, ve kterém byl dále uchováván pro další použití.

Dle Tabulky 6 bylo připraveno ke studiu růstových křivek vždy 100 ml kultivačního média, které bylo zaočkováno 1 ml suspenze biomasy ve fyziologickém roztoku. Byly studovány změny růstu při teplotách 30 °C, 35 °C, 40 °C a 45 °C. Ostatní podmínky kultivace byly stejné jako u počátečního rozkultivování.

V průběhu kultivace byly v hodinových intervalech odebrány vzorky a optická hustota byla měřena pomocí turbidimetru Ultrospec 10 (přednastavená vlnová délka 600 nm). Jako blank bylo použité nezaočkované kultivační médium. Každý vzorek byl stanoven třikrát. Při výsledné absorbanci vyšší než 1 byl blank i vzorek ředěn.

Pro přepočítání optické hustoty na koncentraci sušiny biomasy byla sestrojena kalibrační křivka. Opět bylo připraveno 100 ml kultivačního média, které bylo zaočkováno 1 ml bakteriální suspenze. Kultivace probíhala 2 dny na temperované třepačce při teplotě 40 °C a míchání 150 otáčkách za minutu. Po ukončení byla biomasa centrifugována 10 minut při 6000 otáčkách za minutu, sediment byl promyt vodou, opětovně centrifugován. Promytý sediment byl rozsuspendován pomocí vortexu ve vodě a suspenze byla naředěna na optickou hustotu okolo 1. Takto upravená suspenze byla rozpipetována do zkumavek na výsledný objem 10 ml a optické hustoty okolo hodnot 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a 1. Po změření byla biomasa z roztoků oddělena centrifugací po dobu 10 minut při 6000 otáčkách za minutu a byla stanovena koncentrace sušiny biomasy. Sediment byl protřepán s malým množstvím vody a kvantitativně převeden do předem zvážené a vysušené odpařovací misky, kde byl dále sušen při 105 °C. Po vysušení byla miska i se vzorkem zvážena na analytických vahách a z rozdílu hmotností bylo stanoveno množství sušiny.

## 2.4 Postup při předúpravě substrátu (papíru)

Pro předúpravu substrátu byly zvoleny čtyři různé způsoby:

1. fyzikální předúprava - mletí
2. chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a NaOH
3. chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
4. chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH

K chemické úpravě byla použita mikrovlnná trouba o výkonu 700 W. Množství substrátu 2% w/v bylo zvoleno experimentálně. Při větším množství docházelo k bouřlivé reakci a nadměrnému pění. Po ochlazení suspenze z mikrovlnné trouby byla kvantitativně převedena na Büchnerovu nálevku. Filtrační koláč byl promýván destilovanou vodou do neutrální reakce. Při předúpravě pro hydrolýzu a SSF byl koláč převeden rovnou do Erlenmeyerových baněk. V případě kvantitativní a kompoziční analýzy byl filtrační koláč sušen v sušárně při 70 °C do druhého dne a poté nasucho pomlet na mixéru.

### 2.4.1 Fyzikální předúprava

Každý typ papíru byl nastříhán a rozmočen v destilované vodě. Přebytečná voda byla vymačkána a papír byl vnesen do mixéru s přídatkem čisté destilované vody. Po rozemletí byla suspenze přefiltrována přes čtyřikrát přeloženou gázu upevněnou na velké kádince. Tento krok umožnil oddělení větší části vody od suspenze. Papír byl následně sušen při 70 °C v sušárně do druhého dne pro úplné vysušení. Následovalo mletí nasucho pro dosažení dobré dezintegrace papíru, která je žádoucí při enzymatické hydrolýze. Takto předupravený substrát

byl použit k enzymatické hydrolyze a také jako základ pro následné chemické úpravy v mikrovlnné troubě.

#### 2.4.2 Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a NaOH

Do kádinky o objemu 600 ml bylo pomocí odměrného válce převedeno 150 ml 2% w/v NaOH. K roztoku byly přidány 3 g fyzikálně upraveného papíru, čímž byla vytvořena suspenze 2% w/v substrátu. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na plný výkon a ohřev trval 10 minut.

#### 2.4.3 Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Do kádinky o objemu 600 ml bylo pomocí odměrného válce převedeno 150 ml 2% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. K roztoku byly přidány 3 g fyzikálně upraveného papíru, čímž byla vytvořena suspenze 2% w/v substrátu. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na plný výkon a ohřev suspenze trval 8 minut.

#### 2.4.4 Chemická předúprava - kombinace mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH

Do kádinky o objemu 600 ml bylo pomocí odměrného válce převedeno 150 ml 2% w/v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. K roztoku byly přidány 3 g fyzikálně upraveného papíru, čímž byla vytvořena suspenze 2% w/v substrátu. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na plný výkon a ohřev suspenze trval 8 minut. Po ochlazení byla suspenze přefiltrována pomocí Büchnerovy nálevky a promývána destilovanou vodou do neutrální reakce. Vzniklý koláč byl kvantitativně převeden do čisté kádinky o objemu 600 ml, kde bylo předem odměřeno 150 ml 2% w/v NaOH. Mikrovlnná trouba byla zapnuta na plný výkon a ohřev trval 10 minut.

### 2.5 Kvantitativní a kompoziční analýza substrátu

#### 2.5.1 Stanovení gramáže papíru

Pro stanovení gramáže papíru byl vystřižen čtverec o straně 10 cm a zvážen na analytických vahách, tedy s přesností na 0,0001 g. Od každého typu papíru byly vystřiženy 3 různé čtverce se stejnými rozměry a z těchto hodnot vypočítána gramáž pro jednotlivé typy papíru.

#### 2.5.2 Stanovení sušiny

Žíhací kelímek byl sušen v sušárně při 105 °C po dobu 1 hodiny a po vychladnutí v exsikátoru zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Do kelímku byl navážen papír o přibližné hmotnosti 0,5 g a následně zvážen na analytických vahách. Na 4 hodiny byly kelímky vloženy do sušárny vyhřáté na 105 °C a po vychladnutí v exsikátoru zváženy opět na analytických vahách. K výpočtu množství sušiny byl použit vzorec:

$$\% \text{sušina} = \frac{(w_{\text{kelímek+vzorek}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100, \quad (16)$$

kde  $w_{\text{kelímek+vzorek}}$  ... hmotnost kelímku s vysušeným papírem,  $w_{\text{kelímek}}$  ... hmotnost kelímku,  $w_{\text{vzorek}}$  ... hmotnost nevysušeného papíru

#### 2.5.3 Stanovení popelu

Žíhací kelímky byly na 30 minut vloženy do muflové pece vyhřáté na 550 °C. Poté byly kelímky přeneseny rovnou do exsikátoru a do vychlazených a zvážených kelímků byl vložen 1 g papír, přičemž přesná hmotnost byla odečtena na analytických vahách. Papír v kelímcích

byl žíhán nad kahanem do úplného shoření a poté opět vložen do muflové pece s teplotou 550 °C, kde byl ponechán po dobu minimálně 3 hodin. Z pece směřovaly kelímky rovnou do exsikátoru, ze kterého byly po vychladnutí zváženy na analytických vahách. Procentuální množství popela bylo vypočítáno dle vztahu:

$$\% \text{ popel} = \frac{(w_{\text{kelímek+vzorek}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100, \quad (17)$$

kde  $w_{\text{kelímek+vzorek}}$  ... hmotnost kelímku s papírem,  $w_{\text{kelímek}}$  ... hmotnost kelímku,  $w_{\text{vzorek}}$  ... hmotnost popelu

#### 2.5.4 Stanovení celulózy

Do erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml bylo naváženo asi 0,8 g papíru s přesností na 0,0001 g a přidáno 30 ml směsi kyselin, 80% CH<sub>3</sub>COOH a koncentrované HNO<sub>3</sub> v poměru 10:1 (viz. 2.2.3). Hrdla erlenmeyerových baněk byly přikryty malými nálevkami pro menší únik par a ponořeny do vroucí vodní lázně po dobu 60 minut. Po vychladnutí byly jednotlivé suspenze filtrovány přes nuč s fritou s označením S4, které byly předem zváženy na analytických vahách. Po odfiltrování původního roztoku byl pevný podíl dostatečně promýván ethanolem a následovalo sušení při teplotě 105 °C minimálně 4 hodiny. V exsikátoru vychladlé frity se vzorky byly zváženy s přesností na 4 desetinná místa. Poté byl vzorek smočený ethanolem a z každé frity kvantitativně převeden do čisté 100 ml erlenmeyerovy baňky a s malým množstvím ethanolu povařen do jeho úplného odpaření. Do vychladnutých erlenmeyerových baněk bylo předáno 20 ml 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (viz. 2.2.3). Suspenze na temperované třepačce při 30 °C a 150 otáčkách za minutu setrvávala minimálně 60 minut. Na filtraci byly použity filtrační kelímky s označením S3, které byly předem zváženy na analytických vahách. Pevný podíl ve fritě byl promýván ethanolem a opět sušen při teplotě 105 °C v sušárně minimálně 4 hodiny a poté vloženy do exsikátoru odkud byly po vychladnutí zváženy, taktéž na analytických vahách.

Obsah celulózy byl vypočítán dle vztahu:

$$\% \text{ celulózy} = \frac{(m_{S4+vzorek} - m_{S4}) - (m_{S3+vzorek} - m_{S3})}{m_p} \cdot 100 \quad (18)$$

$m_{S4}$  ... hmotnost frity S4,  $m_{S4+vzorek}$  ... hmotnost frity S4 se vzorkem,  $m_{S3}$  ... hmotnost frity S3,  $m_{S3+vzorek}$  ... hmotnost frity S3 se vzorkem,  $m_p$  ... množství navážky papíru

#### 2.6 Hydrolýza substrátu (papíru)

Na hydrolýzu byly připraveny 6% w/v suspenze papíru v pufru. Papír byl upraven fyzikálně i chemicky (viz 2.4). Hydrolýza byla prováděna ve 12 erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml, pro všechny 3 typy papíru, které byly předupraveny všemi 4 způsoby uvedenými v kapitole 2.4.

Předupravené papíry o hmotnosti 3 g byly v erlenmeyerových baňkách sterilizovány ve vroucí vodní lázni po dobu 15 minut, stejně tak i citrát-fosforečnanový pufr s pH 4,8. Po vychladnutí byl pufr v množství 50 ml přidán do každé erlenmeyerovy baňky. Enzymy potřebné k hydrolýze byly použity v množství 6% w/w pro celulázový komplex a 0,6% w/w pro β-glukosidázu. Tato množství byla přepočtena na objem:

- celulázový komplex – 156,5 μl,
- β-glukosidáza - 15 μl.

Erlenmeyerovy baňky obsahující papír, pufr a enzymy byly vloženy na temperovanou třepačku s teplotou 40 °C a 180 otáček za minutu po dobu 82 hodin, přičemž hydrolyzát byl odebrán ihned po přidání enzymu a potom v časových intervalech 2, 4, 8, 12, 24, 28, 34, 48, 52, 58, 72, 76 a 82 hodin.

Stejným způsobem byla prováděna hydrolyza 4% w/v suspenze papíru v citrát-fosforečnanovém pufru. Objem tlumivého roztoku zůstal stejný, množství použitého papíru se snížilo na 2 g. Procentuální množství enzymu zůstalo stejné, z něj byl vypočítán objem jednotlivých enzymů:

- celulázový komplex - 104  $\mu$ l,
- $\beta$ -glukosidáza - 10  $\mu$ l.

Po odběru byly vzorky centrifugovány na chlazené eppendorf centrifuze, převedeny do vialek přes stříkačkový nylonový filtr s velikostí pórů 0,45  $\mu$ m. Sacharidy v hydrolyzátu byly stanoveny metodou HPLC.

## 2.7 Simultánní sacharifikace a fermentace - SSF

Pro simultánní sacharifikaci a fermentaci byly vybrány papíry s úpravami s nejlepšími výtěžky glukózy při hydrolyze, a to od každého papíru dva druhy předúpravy v 6% w/v suspenzi papíru v tlumivém roztoku. Tlumivý roztok byl v této metodě doživen dle Tabulky 6. Simultánní sacharifikace a fermentace byla prováděna se dvěma různými množstvím inokula, označené sada 1 a sada 2.

Byly použity papíry s těmito úpravami:

- lepenka
  - mletí
  - mikrovlnná úprava s  $H_2SO_4$  a NaOH
- výkres
  - mikrovlnná úprava s  $H_2SO_4$
  - mikrovlnná úprava s  $H_2SO_4$  a NaOH
- kancelářský papír
  - mikrovlnná úprava s  $H_2SO_4$
  - mikrovlnná úprava s  $H_2SO_4$  a NaOH.

Bylo vypěstováno 12 hodinové inokulum bakteriálního kmene *Zymomonas mobilis* LMG457 o optické hustotě  $0,58 \pm 0,01$ . Do první sady erlenmeyerových baněk bylo přidáno 27 ml inokula a do druhé sady 36 ml inokula, které bylo následně centrifugováno a supernatant slit. Sediment rozpuštěn pro sadu 1 v 6 ml fyziologického roztoku, pro sadu 2 v 8 ml stejného roztoku. Simultánní sacharifikace a fermentace probíhala při teplotě 40 °C bez míchání po dobu 144 hodin, přičemž byly prováděny odběry v časových intervalech 0, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36, 48, 52, 56, 60, 72, 76, 80, 96, 120 a 144 hodin. Tyto vzorky byly centrifugovány na eppendorf centrifuze a převedeny do vialek stejným způsobem jako u vzorků získaných z hydrolyzy. Bylo stanovováno množství sacharidů a ethanolu ve vzorcích pomocí přístroje HPLC.

## 2.8 Stanovení vzorků použitím přístroje HPLC

Vzorky odebrané při hydrolyze a simultánní sacharifikaci a fermentaci byly analyzovány na přístroji HPLC s použitím 1,3 mM roztoku  $H_2SO_4$  (viz 2.2.6) jako mobilní fáze. Velikost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na hodnotu 1 ml $\cdot$ min<sup>-1</sup> a byla stejná po celou dobu měření. Doba analýzy jednoho vzorku byla 16 minut.



Kalibrační křivky byly sestrojeny pro roztoky glukózy a ethanolu (viz 2.2.7) v deseti různých koncentracích uvedených v Tabulce 8 a po analýze byly stanoveny retenční časy pro píky jednotlivých látek a sestaveny kalibrační křivky na základě plochy příslušných píků. Koncentrace složek v odebraných vzorcích byly stanoveny přepočtem přes rovnici lineární regrese, která byla získaná z kalibračních křivek.

## **2.9 Statistické zpracování výsledků**

Všechny získané hodnoty byly stanoveny třikrát. U těchto hodnot byl vypočítán průměr pomocí funkce PRŮMĚR, vždy pro tři měření, a hodnota intervalu spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE v programu Microsoft Excel 2007. Byla zvolena hladina statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ . Všechny výsledky, které byly statisticky vyhodnocené, jsou uvedeny v tabulkách v kapitole Výsledky a diskuze. Vypočítané intervaly spolehlivosti nebyly do grafů vyneseny jako chybové úsečky, protože jejich hodnota byla na rozsah osy  $y$  příliš malá (byly špatně viditelné).

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

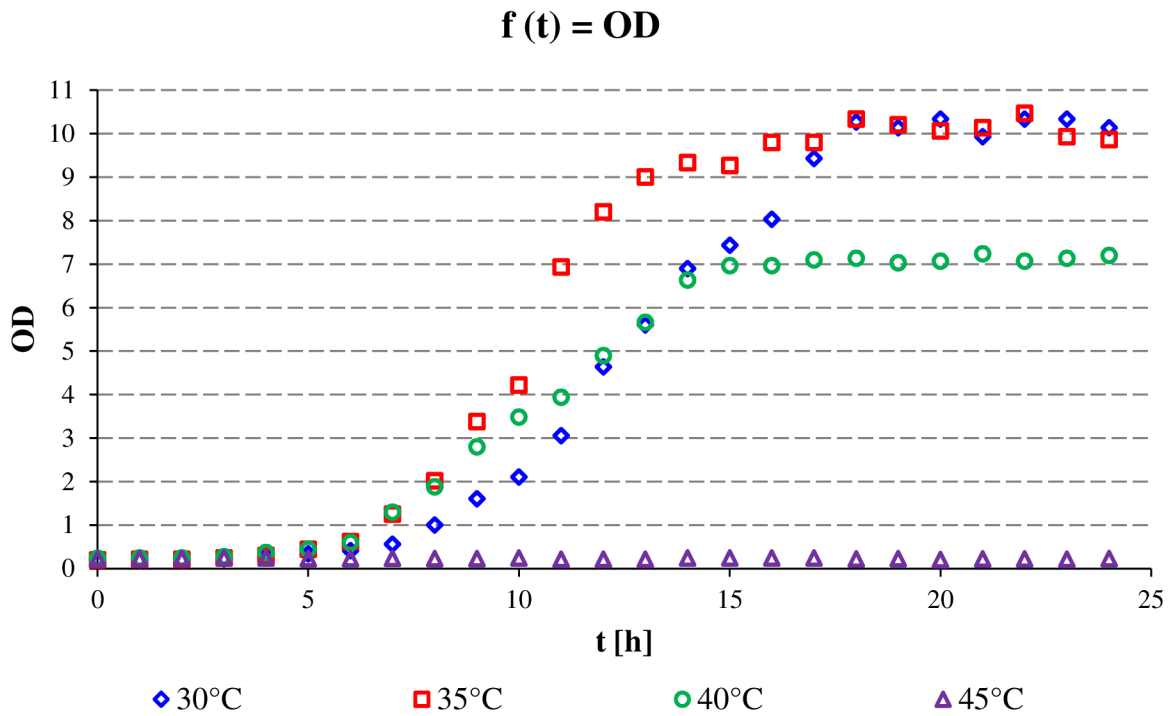
#### 3.1 Kultivace a stanovení růstové křivky

Byl studován růst *Zymomonas mobilis* LMG457 za podmínek uvedených v kapitole 2.3. Růst byl sledován jako závislost hodnoty optické hustoty (OD), která byla měřena turbidimetricky při 600 nm. Z naměřených hodnot (Tabulka 9) byl sestrojen graf růstových křivek (Graf 1).

*Tabulka 9: Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace při různých teplotách*

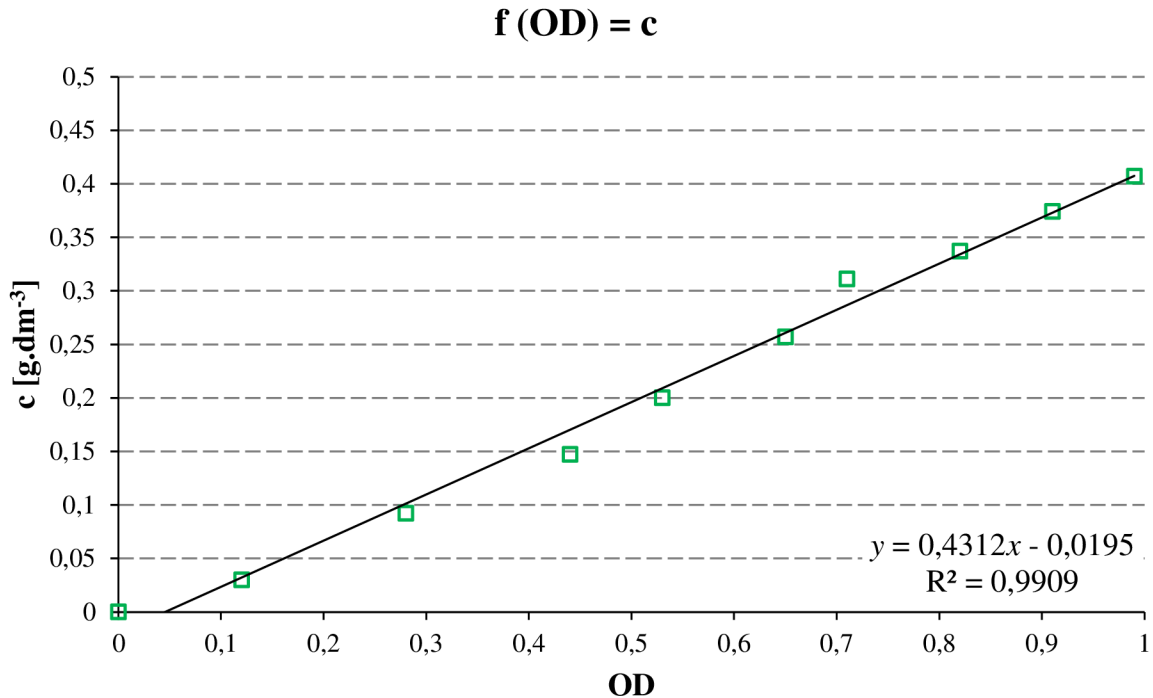
t [h]	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
0	0,203 ± 0,005	0,200 ± 0,009	0,240 ± 0,009	0,22 ± 0,01
1	0,19 ± 0,01	0,213 ± 0,005	0,24 ± 0,01	0,233 ± 0,005
2	0,197 ± 0,005	0,217 ± 0,005	0,247 ± 0,005	0,240 ± 0,009
3	0,227 ± 0,005	0,243 ± 0,005	0,277 ± 0,005	0,25 ± 0,03
4	0,277 ± 0,005	0,307 ± 0,005	0,373 ± 0,005	0,24 ± 0,01
5	0,343 ± 0,005	0,443 ± 0,005	0,440 ± 0,009	0,230 ± 0,009
6	0,417 ± 0,005	0,617 ± 0,005	0,600 ± 0,009	0,233 ± 0,005
7	0,563 ± 0,005	1,250 ± 0,005	1,300 ± 0,005	0,237 ± 0,005
8	1,00 ± 0,02	2,020 ± 0,005	1,880 ± 0,005	0,233 ± 0,005
9	1,61 ± 0,02	3,380 ± 0,005	2,800 ± 0,005	0,23 ± 0,01
10	2,11 ± 0,02	4,22 ± 0,01	3,480 ± 0,009	0,24 ± 0,01
11	3,1 ± 0,1	6,93 ± 0,01	3,94 ± 0,01	0,22 ± 0,02
12	4,6 ± 0,1	8,20 ± 0,02	4,90 ± 0,01	0,22 ± 0,02
13	5,6 ± 0,2	9,00 ± 0,02	5,660 ± 0,005	0,214 ± 0,007
14	6,90 ± 0,09	9,33 ± 0,01	6,63 ± 0,01	0,25 ± 0,01
15	7,4 ± 0,1	9,267 ± 0,005	6,97 ± 0,02	0,24 ± 0,01
16	8,0 ± 0,1	9,80 ± 0,02	6,967 ± 0,005	0,25 ± 0,02
17	9,43 ± 0,05	9,800 ± 0,009	7,100 ± 0,009	0,24 ± 0,01
18	10,3 ± 0,1	10,33 ± 0,01	7,133 ± 0,005	0,22 ± 0,02
19	10,13 ± 0,01	10,20 ± 0,02	7,033 ± 0,005	0,23 ± 0,02
20	10,33 ± 0,01	10,067 ± 0,005	7,067 ± 0,005	0,21 ± 0,02
21	9,933 ± 0,005	10,133 ± 0,005	7,23 ± 0,01	0,22 ± 0,02
22	10,333 ± 0,005	10,467 ± 0,005	7,07 ± 0,01	0,22 ± 0,02
23	10,33 ± 0,01	9,93 ± 0,01	7,133 ± 0,005	0,22 ± 0,01
24	10,13 ± 0,01	9,87 ± 0,01	7,200 ± 0,009	0,232 ± 0,008

**Graf 1:** Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace při různých teplotách



Pro výpočet koncentrace sušiny biomasy (Graf 3) byla sestrojena kalibrační křivka (Graf 2) jako závislost koncentrace sušiny biomasy na optické hustotě.

**Graf 2:** Kalibrační křivka - koncentrace sušiny biomasy

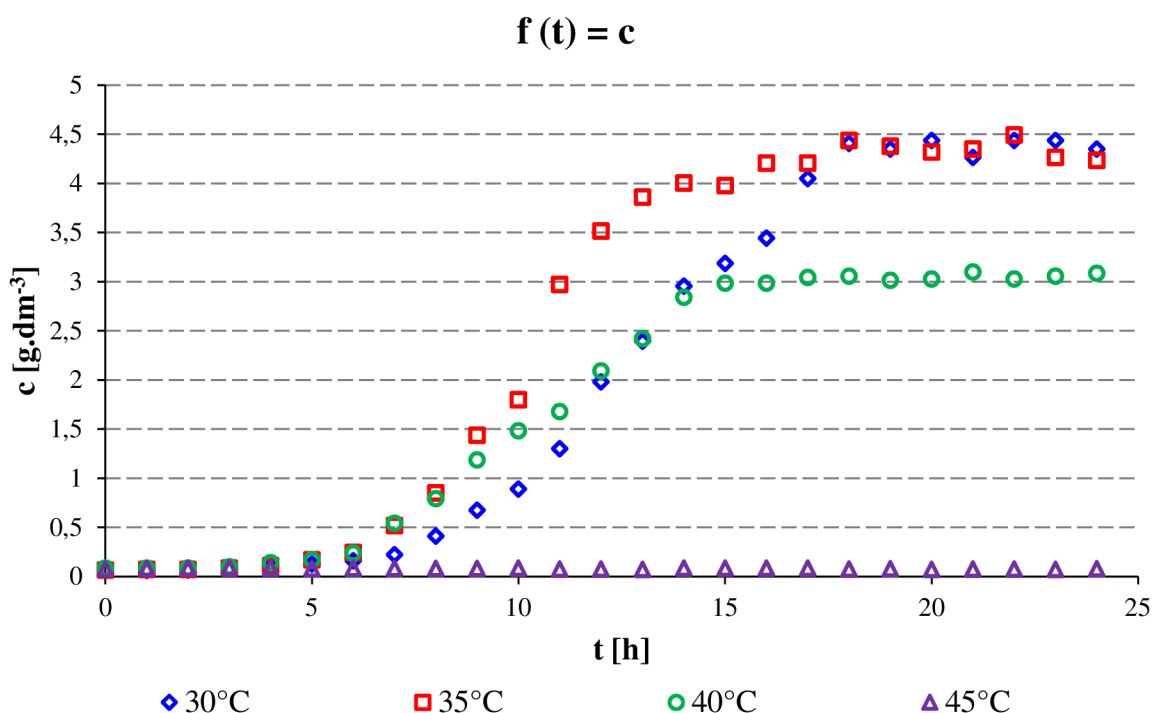


Výpočet koncentrace sušiny pro čas t = 0 h a teplotu 30 °C:

$$y = 0,4312 \cdot x - 0,0195 \Rightarrow c = 0,4312 \cdot OD - 0,0195$$

$$c = 0,4312 \cdot 0,203 - 0,0195 = \underline{\underline{0,0682 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}}}$$

**Graf 3:** Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase během kultivace při různých teplotách



Růstové křivky při různých teplotách byly stanoveny z důvodu optimalizace teploty růstu a optimální teploty aktivity enzymů. Při teplotě 45 °C nebyl růst pozorován. V Tabulce 10 jsou shrnuty odhady časových intervalů hlavních fází růstu u všech ostatních teplot. I když je výsledná koncentrace sušiny biomasy při teplotě 40 °C menší než u nižších teplot, byla tato teplota zvolena pro další experimenty jako kompromis mezi růstem a optimální teplotou enzymů viz kapitola 2.1.

**Tabulka 10:** Odhady časových intervalů hlavních fází růstu

Teplota	Lag-fáze	Exponenciální fáze	Stacionární fáze
30 °C	0 – 7 h	7 - 18 h	18 - 24 h
35 °C	0 – 6 h	6 - 16 h	16 - 24 h
40 °C	0 – 6 h	6 - 15 h	15 - 24 h

### 3.2 Kvantitativní a kompoziční analýza substrátu

U každého typu substrátu (lepenka, kancelářský papír, výkres) byla stanovena plošná hmotnost, sušina, popel a množství celulózy. Výsledky jsou shrnuty v Tabulkách 11 – 14 a na Grafech 4 – 6.

#### 3.2.1 Stanovení plošné hmotnosti papíru

Jako plošná hmotnost papíru je udávána hmotnost jednoho metru čtverečního (tedy jedné A0). U každého typu substrátu byla stanovena dle postupu uvedeného v kapitole 2.5.1. Statisticky zpracované výsledky jsou uvedeny v Tabulce 11.

**Tabulka 11:** Plošná hmotnost papíru jednotlivých typů substrátů

Typ substrátu	Plošná hmotnost [g·m <sup>-2</sup> ]
Lepenka	438,8 ± 0,04
Výkres	219,3 ± 0,2
Kancelářský papír	79,98 ± 0,05

Z Tabulky 11 je zřejmé, že nejnižší hmotnost vztaženou na plochu má papír kancelářský, který je nejtěsnější z použitých substrátů. Plošná hmotnost běžného kancelářského papíru je uváděna na  $80 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . [62] Tohoto výsledku bylo dosaženo i při našem vážení. U výkresu (kreslicího kartonu) prodejci uvádějí plošnou hmotnost cca  $220 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ , což taktéž odpovídá našemu měření. [63] Se standardní plošná hmotnost lepenky je to složitější, každá lepenka je vyrobena jinak. Obecně se ale uvádí, že její plošná hmotnost je nad  $250 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ . Námí použitá měla plošnou hmotnost asi  $438,8 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$ .

### 3.2.2 Stanovení sušiny

Další analýzou bylo stanovení sušiny u všech typů substrátu. Zde již byl sledován i vliv způsobu předúpravy. Ke stanovení byl použit pracovní postup uvedený v kapitole 2.5.2. Statistické zhodnocení výsledků je možno vidět v Tabulce 12. Vzorový výpočet (lepenka, mletí):

$$\% \text{ sušina} = \frac{(w_{\text{kelímek+vzorek}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100$$

$$\% \text{ sušina} = \frac{(31,3524 - 30,8885)}{0,4935} \cdot 100$$

$$\% \text{ sušina} = \underline{\underline{94,00 \%}}$$

**Tabulka 12:** Závislost sušiny na typu substrátu a způsobu předúpravy

Typ substrátu	Metoda předúpravy	Sušina [%]
Lepenka	mletí	$96 \pm 2$
	mikrovlny + NaOH	$96,84 \pm 0,07$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$96,660 \pm 0,004$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	$96,70 \pm 0,02$
Výkres	mletí	$96 \pm 2$
	mikrovlny + NaOH	$97,9 \pm 0,6$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$96,0 \pm 0,7$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	$98,0 \pm 0,3$
Kancelářský papír	mletí	$97 \pm 2$
	mikrovlny + NaOH	$98 \pm 1$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	$95,8 \pm 0,2$
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	$97,41 \pm 0,01$

Jak je možno vidět v Tabulce 12, tak rozdíl v sušině u jednotlivých typů substrátů není významný. Na sušinu nemá vliv ani způsob předúpravy.

### 3.2.3 Stanovení popelu

Dle kapitoly 2.5.3 bylo stanoveno množství popelu u všech papírů předupravených všemi způsoby. Výsledky množství s vypočítanými intervaly spolehlivosti jsou v Tabulce 13 a grafické znázornění na Grafu 5. Vzorový výpočet (lepenka, mletí):

$$\% \text{ popel} = \frac{(w_{\text{kelímek+vzorek}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100$$

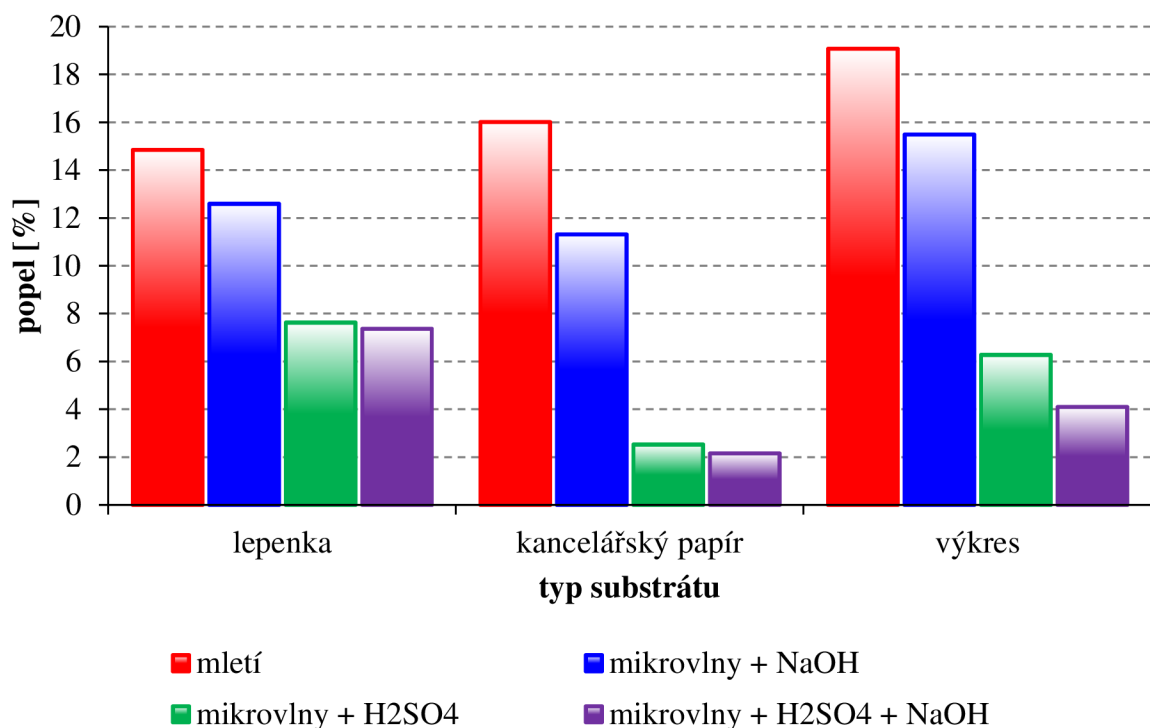
$$\% \text{ popel} = \frac{(39,0821 - 38,9271)}{0,9900} \cdot 100$$

$$\% \text{ popel} = \underline{\underline{15,66 \%}}$$

**Tabulka 13:** Závislost množství popelu na typu substrátu a způsobu předúpravy

Typ substrátu	Metoda předúpravy	Popel [%]
Lepenka	mletí	15 ± 1
	mikrovlny + NaOH	12,6 ± 0,1
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7,62 ± 0,04
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	7,4 ± 0,2
Výkres	mletí	16 ± 3
	mikrovlny + NaOH	11,3 ± 0,1
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,52 ± 0,08
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	2,16 ± 0,05
Kancelářský papír	mletí	19,08 ± 0,07
	mikrovlny + NaOH	15,5 ± 0,4
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6,27 ± 0,09
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	4,1 ± 0,1

**Graf 4:** Závislost množství popelu na typu substrátu a způsobu předúpravy



Díky obsahu popelu v jednotlivých materiálech získáme informaci o obsahu plnidel v papíru. Obecně platí, že čím je papír kvalitnější, tím více plnidel obsahuje. Tento fakt je potvrzen našimi výsledky při mletí, kdy největší množství popelu bylo u výkresu. Při použití chemických předúprav docházelo ke snížení obsahu popelu, což mohlo být způsobeno rozpuštěním plnidel, převážně kyselinou sírovou.

### 3.2.4 Stanovení celulózy

Byl stanovený obsah celulózy v jednotlivých materiálech předupravených všemi uvedenými způsoby dle kapitoly 2.5.4. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 14 a na Grafu 6. Vzorový výpočet (lepenka, mletí):

$$\% \text{ celulóza} = \frac{(m_{S4+vzorek} - m_{S4}) - (m_{S3+vzorek} - m_{S3})}{m_p} \cdot 100$$

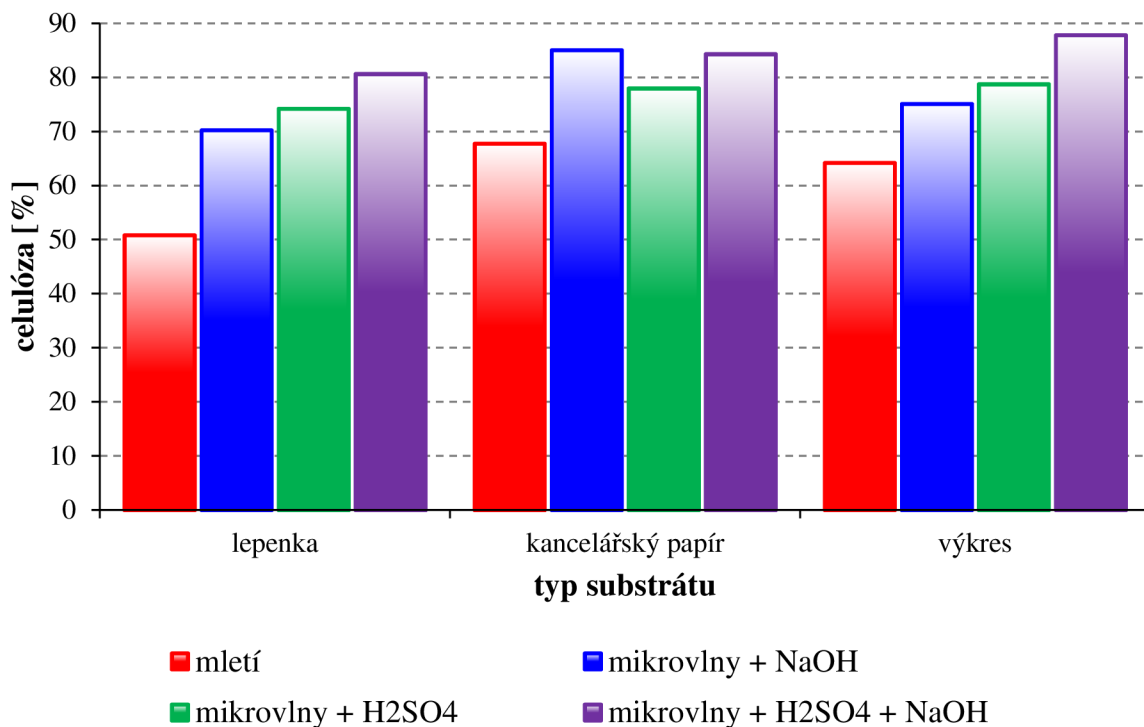
$$\% \text{ celulóza} = \frac{(34,0127 - 33,4848) - (31,4623 - 31,3360)}{0,8025} \cdot 100$$

$$\% \text{ celulóza} = \underline{\underline{50,04 \%}}$$

**Tabulka 14:** Závislost obsahu celulózy na typu substrátu a způsobu předúpravy

Typ substrátu	Metoda předúpravy	celulóza [%]
Lepenka	mletí	50,8 ± 0,6
	mikrovlny + NaOH	70,2 ± 0,2
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	74,19 ± 0,09
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	80,5 ± 0,4
Výkres	mletí	67,7 ± 0,5
	mikrovlny + NaOH	84,1 ± 0,3
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78,00 ± 0,09
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	85,3 ± 0,4
Kancelářský papír	mletí	64,3 ± 0,5
	mikrovlny + NaOH	75,1 ± 0,3
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78,7 ± 0,1
	mikrovlny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaOH	87,7 ± 0,2

**Graf 5:** Závislost obsahu celulózy na typu substrátu a způsobu předúpravy



Porovnáním obsahu celulózy v jednotlivých vzorcích bylo zjištěno, že všechny předúpravy zvyšují procentuální podíl dostupné celulózy ve vzorku, ovšem ne stejně. U lepenky a kancelářského papíru byl nárůst pozorován v pořadí mletí, kombinace mikrovlnné trouby a NaOH, kombinace mikrovlnné trouby a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a nejvyšší obsah byl dosažen při použití předúpravy pomocí kombinace mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. U výkresu bylo ve všech

případech dosaženo vyššího podílu celulózy než u lepenky. U kancelářského papíru byl nejnižší obsah při mletí, vyšší byl u kombinace mikrovlnné trouby a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Při předúpravě kombinací mikrovlnné trouby a NaOH a kombinací mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH bylo dosaženo skoro stejných výsledků obsahu celulózy. Vzniklý rozdíl mezi chemicky nepředupraveným a předupraveným substrátem je pravděpodobně způsoben částečným rozpuštěním hemicelulóz působením zředěné kyseliny a také částečným odstraněním hemicelulóz a ligninu působením hydroxidu, což koresponduje s informacemi v kapitole 1.3.3 teoretické části.

### 3.3 Kalibrační křivky - HPLC

Kalibrační křivky pro glukózu a ethanol byly stanoveny metodou HPLC pomocí RI detektoru podle postupu uvedeného v kapitole 2.2.7 a 2.8. Každý vzorek byl proměřen třikrát a ze získaných hodnot byl vypočítán interval spolehlivosti (viz Tabulka 15 a 16). Kalibrační křivky, rovnici lineární regrese, pomocí které byly vypočítány koncentrace jednotlivých látek, a hodnota spolehlivosti jsou uvedeny v Grafech 7 a 8.

*Tabulka 15: Kalibrační křivka - glukóza*

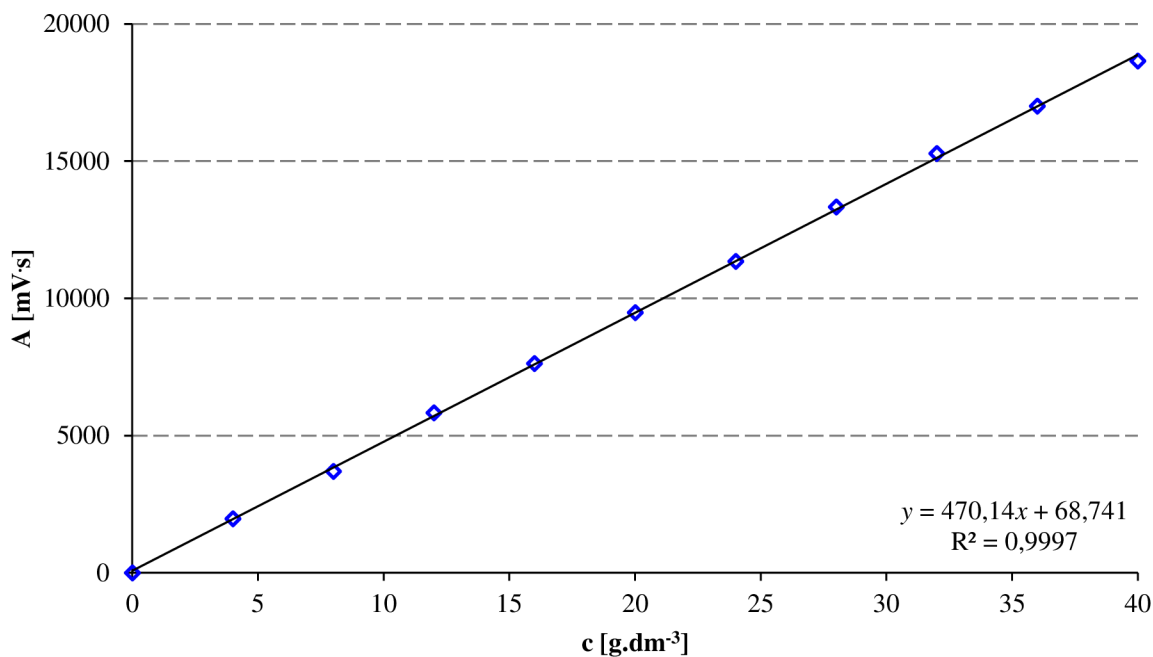
c [g·dm <sup>-3</sup> ]	A [mV's]
0	0
4	1961 ± 41
8	3691 ± 97
12	5830 ± 17
16	7628 ± 24
20	9484 ± 58
24	11341 ± 102
28	13324 ± 7
32	15281 ± 95
36	17004 ± 73
40	18644 ± 12

*Tabulka 16: Kalibrační křivka - ethanol*

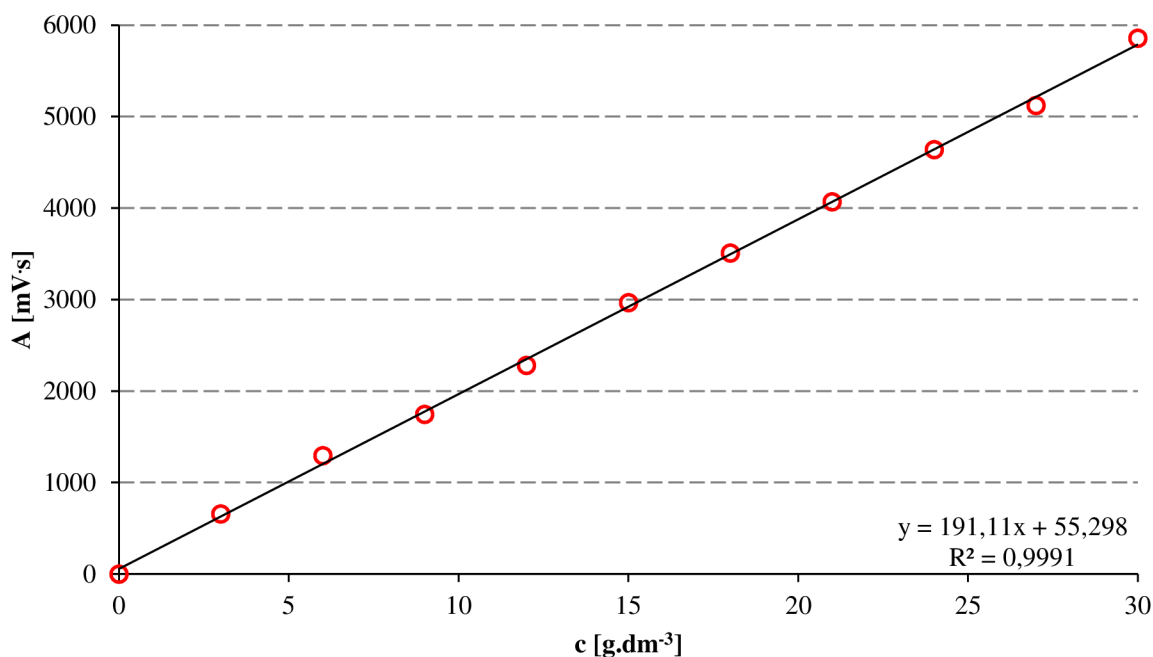
c [g·dm <sup>-3</sup> ]	A [mV's]
0	0
3	656 ± 8
6	1294 ± 83
9	1745 ± 29
12	2281 ± 102
15	2966 ± 15
18	3510 ± 91
21	4069 ± 45
24	4640 ± 54
27	5121 ± 4
30	5859 ± 56



**Graf 6:** Kalibrační křivka - glukóza



**Graf 7:** Kalibrační křivka - ethanol



Podle tabulek 15 a 16 byly vyneseny kalibrační křivky do grafů 7 a 8. U obou grafů byla zjištěna rovnice lineární regrese a podle nich byly vypočítány koncentrace glukózy při hydrolýze a SSF a ethanolu při SSF.

### 3.4 Hydrolýza substrátu

Za podmínek uvedených v kapitole 2.6 byla provedena enzymatická hydrolýza námi zvolených substrátů předupravených všemi uvedenými způsoby pro srovnání účinnosti předúpravy na výtěžek glukózy z celulózy při hydrolýze. V Tabulce 17 a 18 jsou shrnuty výsledky průběhů tvorby glukózy při použití 4 % w/v a 6 % w/v substrátu. Výsledky jsou poté v dalších podkapitolách zpracovány graficky z různých hledisek.

**Tabulka 17: Průběh tvorby glukózy při hydrolyze 4 % w/v substrátu**

substrát	čas [h]	c <sub>1</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>2</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>3</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>4</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]
lepenka	0	0,682 ± 0,004	0,50 ± 0,01	0,792 ± 0,007	1,06 ± 0,01
	2	1,70 ± 0,06	1,46 ± 0,05	1,73 ± 0,02	2,98 ± 0,03
	4	2,4 ± 0,1	1,88 ± 0,06	3,69 ± 0,06	4,42 ± 0,03
	8	4,486 ± 0,001	2,692 ± 0,005	7,9 ± 0,7	7,5 ± 0,5
	12	4 ± 1	3,40 ± 0,06	8,11 ± 0,07	8,980 ± 0,005
	24	6,78 ± 0,02	5,08 ± 0,01	9,06 ± 0,04	9,51 ± 0,03
	28	7,4 ± 0,1	5,16 ± 0,06	8,29 ± 0,04	10,49 ± 0,08
	34	8,8 ± 0,1	5,43 ± 0,05	9,25 ± 0,05	11,45 ± 0,04
	48	8,6 ± 0,7	4,90 ± 0,04	8,6 ± 0,1	11,57 ± 0,05
	52	9,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	9,3 ± 0,6	11,4 ± 0,1
	58	9,6 ± 0,1	5,07 ± 0,03	8,26 ± 0,07	13,0 ± 0,1
	72	9,00 ± 0,04	5,3 ± 0,1	9,8 ± 0,2	12,5 ± 0,1
	76	9,1 ± 0,2	5,47 ± 0,05	10,35 ± 0,03	11,89 ± 0,03
	82	8,4 ± 0,2	4,43 ± 0,02	9,8 ± 0,3	12,10 ± 0,03
výkres	0	0,68 ± 0,03	0,36 ± 0,01	0,402 ± 0,009	0,93 ± 0,01
	2	1,74 ± 0,04	1,17 ± 0,09	1,76 ± 0,05	2,60 ± 0,09
	4	2,145 ± 0,007	1,91 ± 0,05	2,583 ± 0,008	3,80 ± 0,02
	8	3,4 ± 0,2	1,95 ± 0,04	5,8 ± 0,2	8,3 ± 0,1
	12	3,48 ± 0,05	1,98 ± 0,01	6,2 ± 0,2	10,396 ± 0,006
	24	4,0 ± 0,2	2,10 ± 0,02	8,84 ± 0,02	13,50 ± 0,04
	28	4,36 ± 0,06	3,2 ± 0,1	9,40 ± 0,03	13,71 ± 0,08
	34	4,22 ± 0,09	1,91 ± 0,04	10,56 ± 0,02	13,82 ± 0,07
	48	4,60 ± 0,04	1,785 ± 0,003	10,2 ± 0,6	15,8 ± 0,1
	52	4,48 ± 0,01	1,90 ± 0,02	11,17 ± 0,07	15,8 ± 0,1
	58	4,91 ± 0,05	1,66 ± 0,05	10,20 ± 0,06	16,834 ± 0,009
	72	5,24 ± 0,06	1,87 ± 0,03	9,2 ± 0,1	15,82 ± 0,07
	76	4,44 ± 0,05	1,89 ± 0,02	9,10 ± 0,03	15,13 ± 0,05
	82	4,53 ± 0,01	2,06 ± 0,04	9,286 ± 0,002	16,027 ± 0,007
kancelářský papír	0	0,76 ± 0,03	0,61 ± 0,04	0,629 ± 0,001	0,642 ± 0,004
	2	1,77 ± 0,06	1,72 ± 0,06	2,1 ± 0,1	1,76 ± 0,09
	4	2,703 ± 0,007	2,23 ± 0,03	3,42 ± 0,02	2,726 ± 0,008
	8	2,756 ± 0,009	2,45 ± 0,03	7,297 ± 0,007	4,8 ± 0,1
	12	3,07 ± 0,08	2,3 ± 0,1	7,62 ± 0,04	6,1 ± 0,2
	24	2,93 ± 0,09	2,21 ± 0,02	8,99 ± 0,01	7,6 ± 0,1
	28	3,04 ± 0,01	2,13 ± 0,03	8,94 ± 0,02	8,6 ± 0,1
	34	3,40 ± 0,07	2,24 ± 0,05	9,93 ± 0,03	9,22 ± 0,02
	48	3,51 ± 0,01	2,383 ± 0,008	10,47 ± 0,05	10,43 ± 0,06
	52	4,1 ± 0,3	2,313 ± 0,001	8,9 ± 0,2	11,02 ± 0,07
	58	3,1 ± 0,1	2,18 ± 0,05	9,6 ± 0,1	13,02 ± 0,04
	72	3,9 ± 0,3	2,20 ± 0,09	8,517 ± 0,007	12,28 ± 0,03
	76	3,6 ± 0,3	2,11 ± 0,03	8,576 ± 0,008	11,43 ± 0,03
	82	3,9 ± 0,1	2,19 ± 0,01	9,80 ± 0,02	11,96 ± 0,02

\* c<sub>1</sub> - mletí, c<sub>2</sub> - kombinace mikrovln a NaOH, c<sub>3</sub> - kombinace mikrovln a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, c<sub>4</sub> - kombinace mikrovln, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH)

**Tabulka 18: Průběh tvorby glukózy při hydrolýze 6 % w/v substrátu**

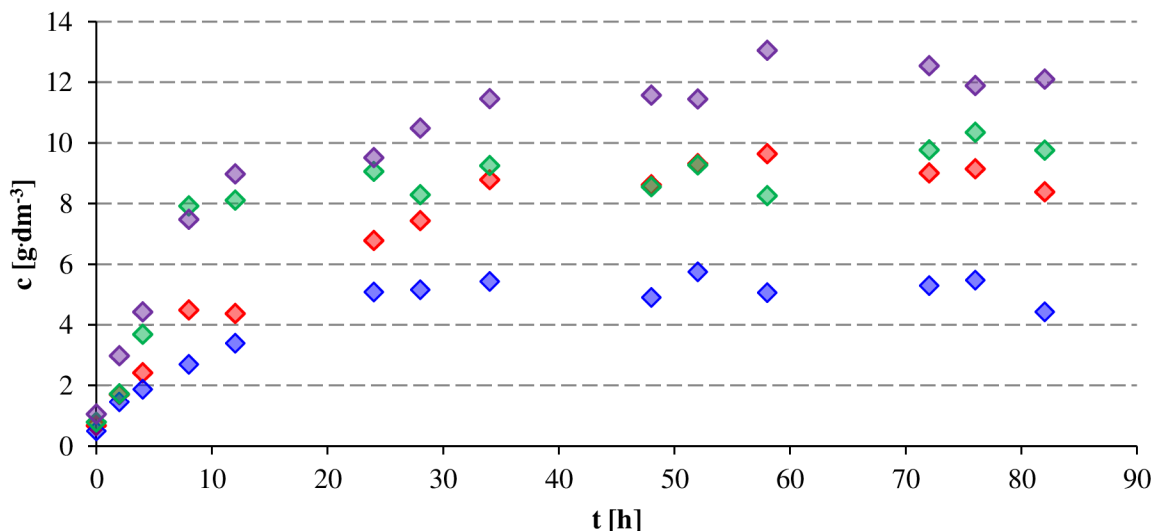
substrát	čas [h]	c <sub>1</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>2</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>3</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]	c <sub>4</sub> * [g·dm <sup>-3</sup> ]
lepenka	0	0,711 ± 0,008	0,33 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,05 ± 0,02
	2	3,345 ± 0,006	2,2 ± 0,1	2,879 ± 0,001	2,76 ± 0,04
	4	4,9 ± 0,3	3,15 ± 0,05	3,865 ± 0,004	3,69 ± 0,03
	8	6,63 ± 0,04	5,03 ± 0,04	5,712 ± 0,006	6,29 ± 0,02
	12	8,4 ± 0,2	6,04 ± 0,05	6,7 ± 0,2	7,3 ± 0,1
	24	11,1 ± 0,2	8,56 ± 0,03	7,84 ± 0,02	11,49 ± 0,05
	28	11,63 ± 0,02	9,8 ± 0,05	10,44 ± 0,04	13,19 ± 0,09
	34	12,37 ± 0,04	10,55 ± 0,04	11,59 ± 0,03	14,0 ± 0,2
	48	13,08 ± 0,08	10,63 ± 0,02	11,60 ± 0,02	14,00 ± 0,06
	52	13,97 ± 0,04	11,10 ± 0,09	12,1 ± 0,2	16,0 ± 0,1
	58	13,8 ± 0,1	10,99 ± 0,02	12,9 ± 0,2	16,46 ± 0,05
	72	13,5 ± 0,1	13,0 ± 0,3	13,994 ± 0,008	16,6 ± 0,1
	76	15,1 ± 0,1	13,889 ± 0,001	15,672 ± 0,002	16,98 ± 0,03
	82	14,1 ± 0,1	12,30 ± 0,05	12,94 ± 0,04	16,46 ± 0,06
výkres	0	0,299 ± 0,002	0,287 ± 0,001	0,066 ± 0,002	0,11 ± 0,01
	2	2,4 ± 0,1	1,76 ± 0,07	2,9 ± 0,1	4,39 ± 0,02
	4	3,74 ± 0,09	2,62 ± 0,04	3,89 ± 0,05	6,41 ± 0,02
	8	3,865 ± 0,001	6,362 ± 0,001	8,13 ± 0,01	11,960,02
	12	4,54 ± 0,06	7,272 ± 0,003	9,79 ± 0,04	14,3 ± 0,1
	24	4,1 ± 0,1	7,46 ± 0,09	11,10 ± 0,05	23,5 ± 0,1
	28	4,48 ± 0,04	6,8 ± 0,1	15,920 ± 0,001	26,05 ± 0,04
	34	4,66 ± 0,03	7,24 ± 0,01	16,70 ± 0,05	26,5 ± 0,4
	48	4,6 ± 0,1	7,59 ± 0,09	18,08 ± 0,06	28,6 ± 0,3
	52	4,40 ± 0,02	7,4 ± 0,2	22,0 ± 0,2	31,3 ± 0,1
	58	3,95 ± 0,02	7,80 ± 0,09	25,99 ± 0,03	30,21 ± 0,06
	72	4,59 ± 0,04	8,32 ± 0,05	26,1 ± 0,2	32,57 ± 0,03
	76	4,7 ± 0,1	7,51 ± 0,01	28,23 ± 0,03	32,22 ± 0,02
	82	4,2 ± 0,1	8,18 ± 0,05	26,2 ± 0,5	31,78 ± 0,03
kancelářský papír	0	0,51 ± 0,03	1,249 ± 0,001	0,28 ± 0,01	0,11 ± 0,02
	2	2,71 ± 0,04	1,85 ± 0,07	5,454 ± 0,004	3,1 ± 0,1
	4	2,87 ± 0,02	2,8 ± 0,1	6,98 ± 0,04	5,04 ± 0,05
	8	3,31 ± 0,05	5,07 ± 0,07	12,890 ± 0,004	9,44 ± 0,02
	12	3,34 ± 0,09	5,23 ± 0,06	14,69 ± 0,02	13,5 ± 0,5
	24	3,61 ± 0,08	5,33 ± 0,06	18,86 ± 0,01	18,20 ± 0,02
	28	3,99 ± 0,03	5,1 ± 0,2	22,90 ± 0,06	19,731 ± 0,007
	34	4,2 ± 0,1	5,44 ± 0,06	23,26 ± 0,02	18,60 ± 0,07
	48	4,01 ± 0,01	5,34 ± 0,07	20,0886 ± 0,0002	21,7 ± 0,2
	52	4,382 ± 0,009	4,72 ± 0,08	24,9 ± 0,1	20,1 ± 0,2
	58	3,99 ± 0,04	4,7 ± 0,2	24,38 ± 0,02	21,55 ± 0,04
	72	4,52 ± 0,03	5,11 ± 0,09	23,25 ± 0,03	22,33 ± 0,07
	76	4,26 ± 0,02	5,0 ± 0,1	23,73 ± 0,03	21,393 ± 0,006
	82	4,01 ± 0,01	5,5 ± 0,3	25,04 ± 0,01	22,88 ± 0,09

\* c<sub>1</sub> - mletí, c<sub>2</sub> - kombinace mikrovln a NaOH, c<sub>3</sub> - kombinace mikrovln a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, c<sub>4</sub> - kombinace mikrovln, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH)

### 3.4.1 Srovnání účinnosti hydrolýzy pro různé předúpravy jednotlivých substrátů

Z Tabulek 17 a 18 byly sestrojeny grafy pro jednotlivé typy papíru. V každém grafu je uvedena koncentrace glukózy vznikající v průběhu hydrolýzy z celulózy pro všechny způsoby předúprav. Grafy 9 - 11 obsahují experimentální data získaná pro 4% w/v substrát a Grafy 12 - 14 pro 6% w/v substrát.

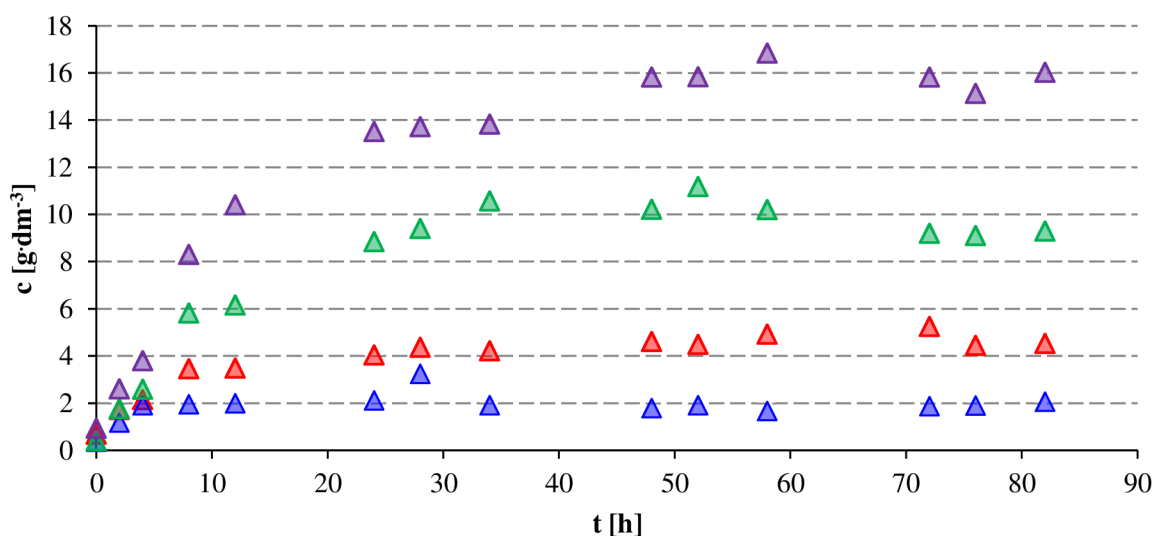
**Graf 8:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v lepenky



◆ fyzikální předúprava   ◆ mikrovlny + NaOH   ◆ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>   ◆ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

Pro 4% w/v suspenzi lepenky vyšel nejvyšší výtěžek glukózy při předúpravě kombinací mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. Nejnižších výtěžků bylo dosaženo při použití mikrovlnné trouby a NaOH. Rozdíl ve výtěžcích byl asi 8 g·dm<sup>-3</sup>.

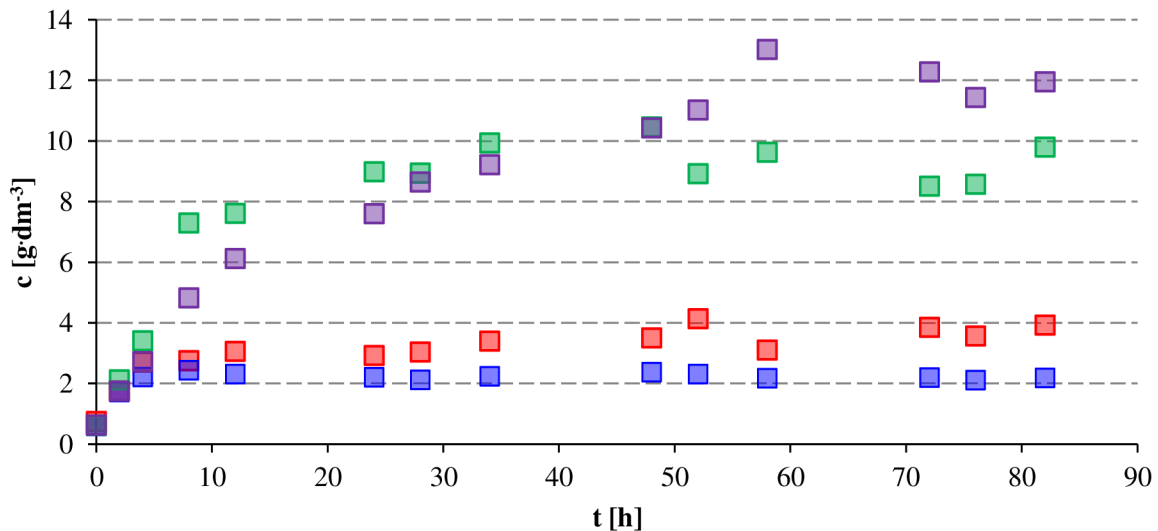
**Graf 9:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v výkresu



▲ fyzikální předúprava   ▲ mikrovlny + NaOH   ▲ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>   ▲ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

Vliv předúpravy při použití 4% w/v výkresu je rozdílnost štěpení celulózy na glukózu výraznější než u lepenky. I zde ale bylo dosaženo nejlepších výsledků při předúpravě pomocí kombinace mikrovlnné trouby,  $H_2SO_4$  a NaOH. Rozdíl koncentrací glukózy mezi nejlepší a nejhorsí přeúpravou se zde lišil již o asi  $14 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Z výsledků je zřejmé, že kyselina rozpouští více složky obsažené ve výkresu a tím uvolňuje dostupnost celulózy enzymům.

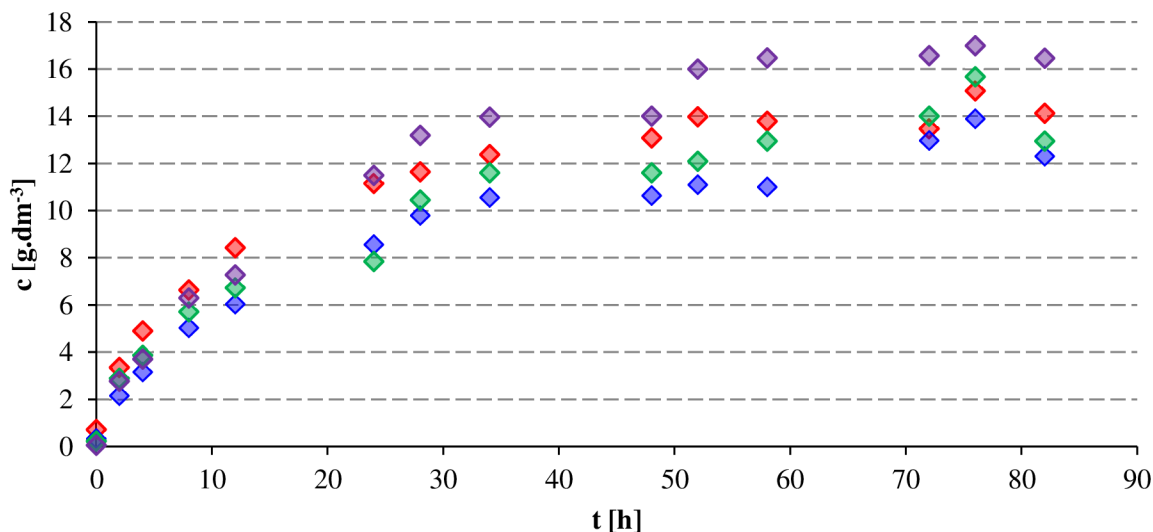
**Graf 10:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v kancelářského papíru



■ fyzikální předúprava ■ mikrovlny + NaOH ■ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ■ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

Z počátku měření koncentrace glukózy při hydrolýze 4 % w/v kancelářského papíru by se dalo usuzovat, že největších výtěžků bude dosaženo při předúpravě pomocí mikrovlnné trouby a  $H_2SO_4$ . Ovšem po cca 28 hodinách se začala koncentrace glukózy pohybovat zhruba kolem jedné hodnoty. V té době se stále zvyšovala výtěžnost při hydrolýze 4% w/v suspenze předupravené pomocí kombinace mikrovlnné trouby,  $H_2SO_4$  a NaOH, která i zde vyšla jako nejlepší. Nejmenších výtěžků bylo dosaženo opět při kombinaci mikrovlnné trouby a NaOH. Konečný rozdíl zde byl cca  $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

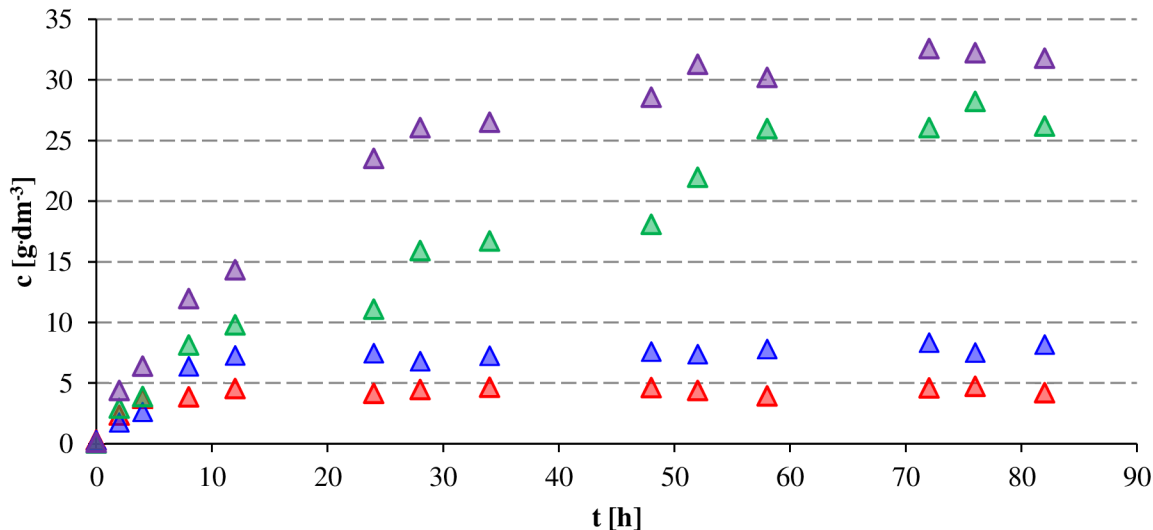
**Graf 11:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v lepenky



◆ fyzikální předúprava    ◆ mikrovlny + NaOH    ◆ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>    ◆ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

Při 6% w/v suspenzi výkresu bylo dosaženo u všech předúprav podobných výtěžků glukózy. Koncentrace se pohybovaly v rozmezí okolo 12 - 17 g·dm<sup>-3</sup>. Jako ve všech předchozích případech byla jako nejlepší předúprava vyhodnocena kombinace mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH.

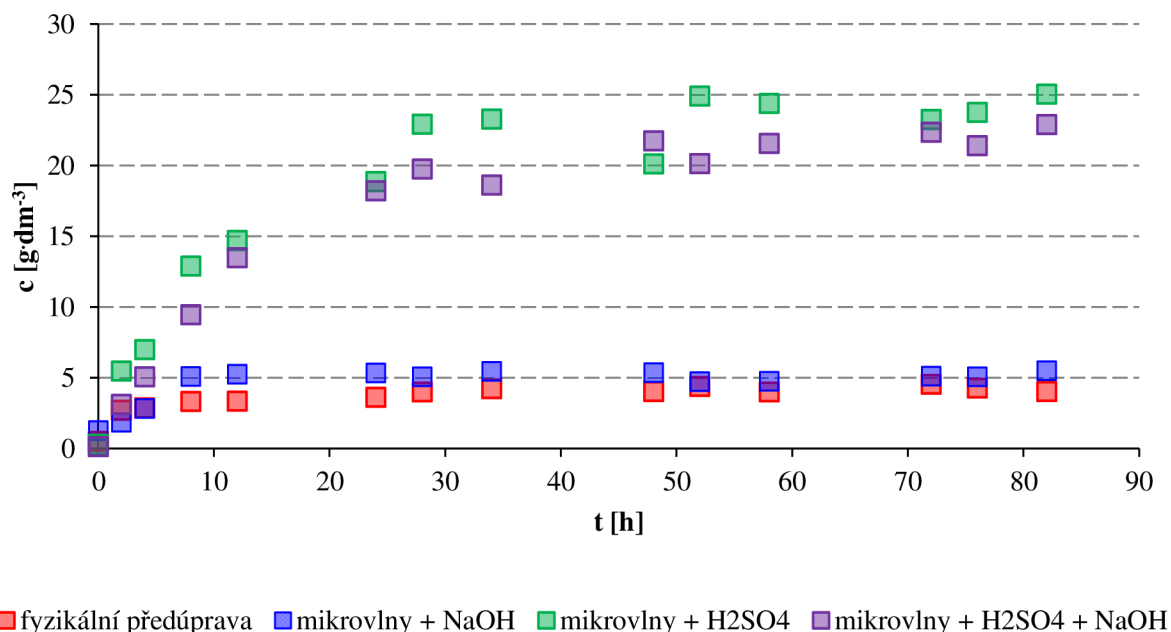
**Graf 12:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v výkresu



▲ fyzikální předúprava    ▲ mikrovlny + NaOH    ▲ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>    ▲ mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

Na konci hydrolýzy suspenze obsahující 6 % w/v výkresu byla jako nejlepší předúprava opět vyhodnocena kombinace mikrovlnné trouby, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. Oproti suspenzi obsahující pouze 4 % w/v tohoto substrátu byl vzrůst koncentrace glukózy zhruba dvojnásobný. Jako nejméně výtěžná byla vyhodnocena mletí, která se nepříliš lišila od výsledků získaných při předúpravě pomocí mikrovlnné trouby a NaOH. Rozdíl výtěžnosti je zde nejvíce zřetelný, a to až okolo 27 g·dm<sup>-3</sup>.

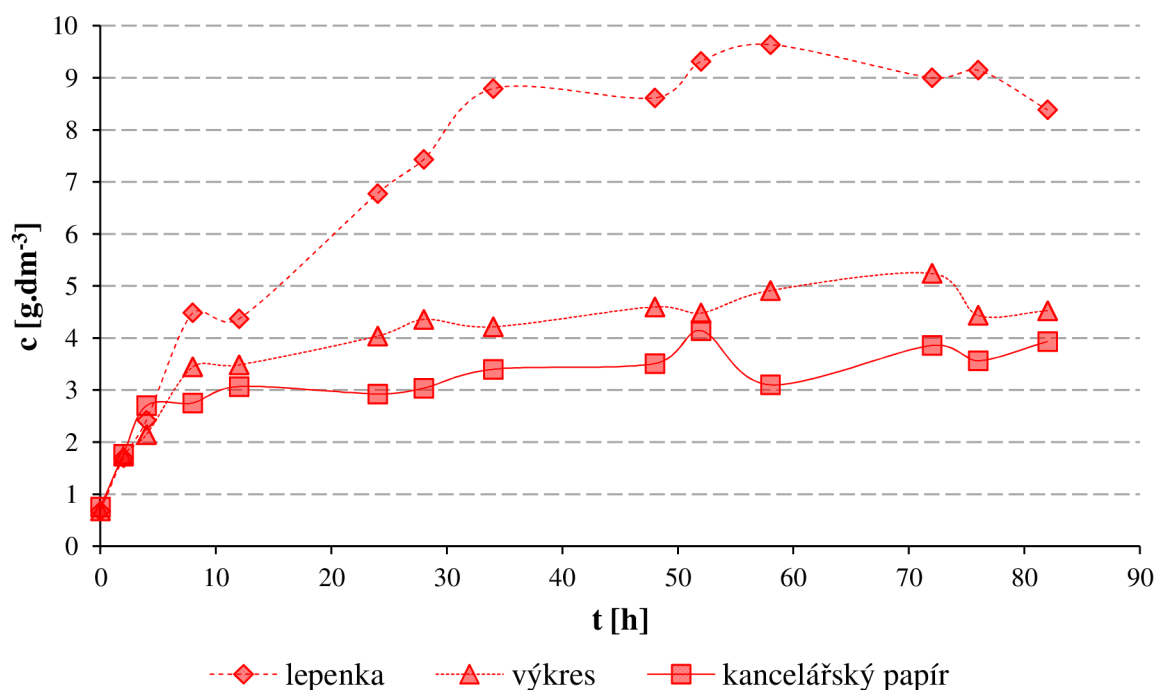
**Graf 13:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolyze 6 % w/v kancelářského papíru



Stejně jako u použití výkresu jako substrátu o koncentraci 6 % w/v byly u kancelářského papíru dosaženy nejnižší koncentrace glukózy u mletí a předúpravy kombinací mikrovlnné trouby a NaOH. Vliv předúpravy mikrovlnnou troubou a H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a mikrovlnnou troubou, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH nejde zhodnotit, protože výsledné koncentrace glukózy jsou velmi podobné. I zde je velký rozdíl mezi nejhorší a nejlepší předúpravou, a to asi 20 g·dm<sup>-3</sup>.

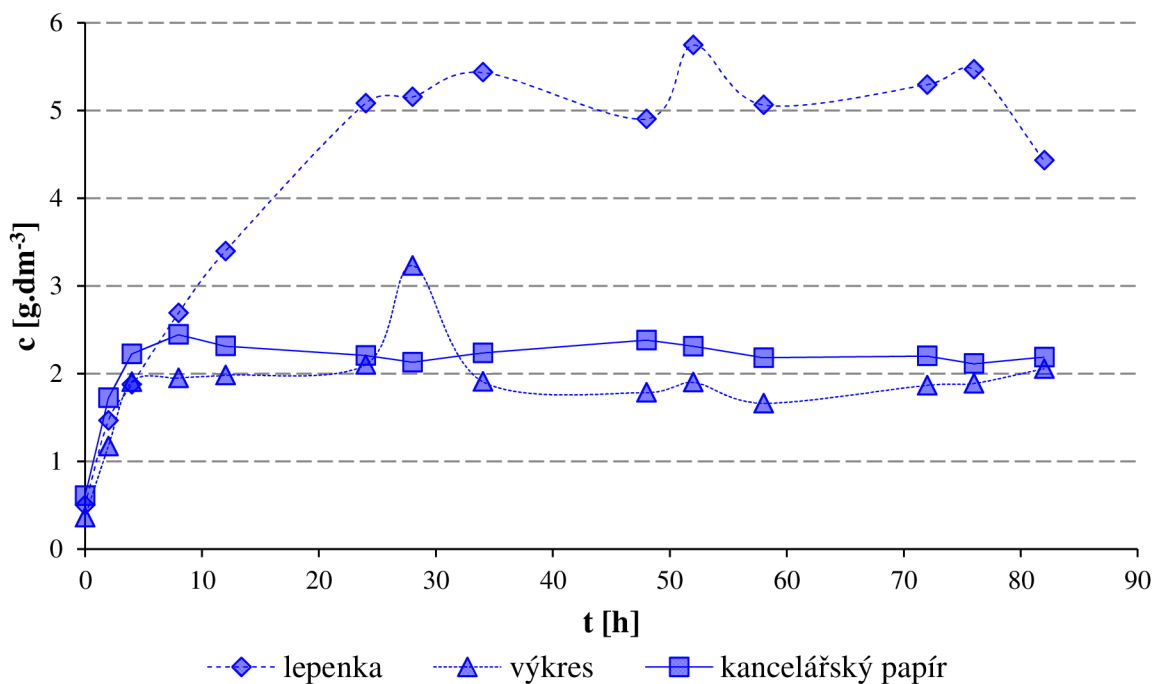
### 3.4.2 Srovnání účinnosti hydrolyzy pro různé substráty u jednotlivých způsobů předúpravy

**Graf 14:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolyze 4 % w/v všech typů papírů pro mletí



Použití mletí bylo neúčinnější v případě lepenky, u výkresu a kancelářského papíru jsou koncentrace glukózy při této předúpravě téměř srovnatelné. Konec hydrolýzy lze odhadnout na dobu mezi 34 a 48 hodinami, jelikož v tomto čase nebyly vzorky odebrány a poté už lze koncentraci glukózy považovat za konstantní.

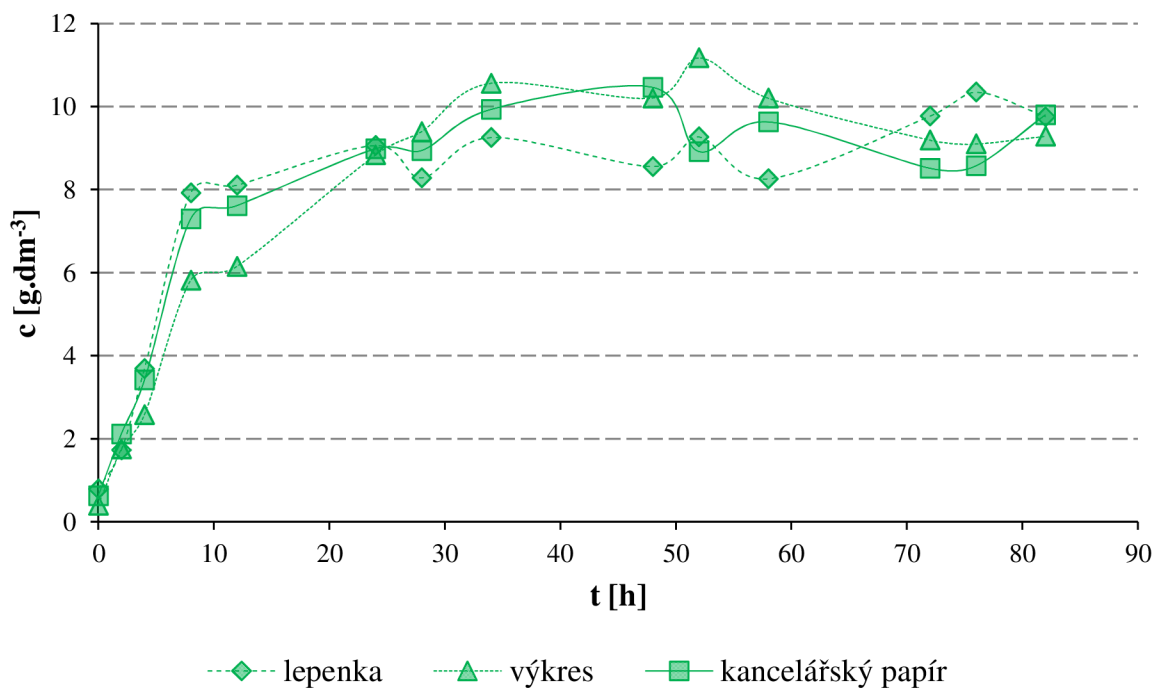
**Graf 15:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s NaOH



Stejně jako u předúpravy mletím, i zde je patrné, že koncentrace glukózy jsou nejvyšší u lepenky. Ovšem, koncentrace získané glukózy klesla, ve srovnání s mletím (Graf 13), a to u všech typů papíru. To je zapříčiněno vznikem nerozpustných solí, které při alkalické předúpravě mohou vznikat a začleňovat se do struktury celulózy, čímž se sníží její využitelnost enzymy (viz Tabulka 1).

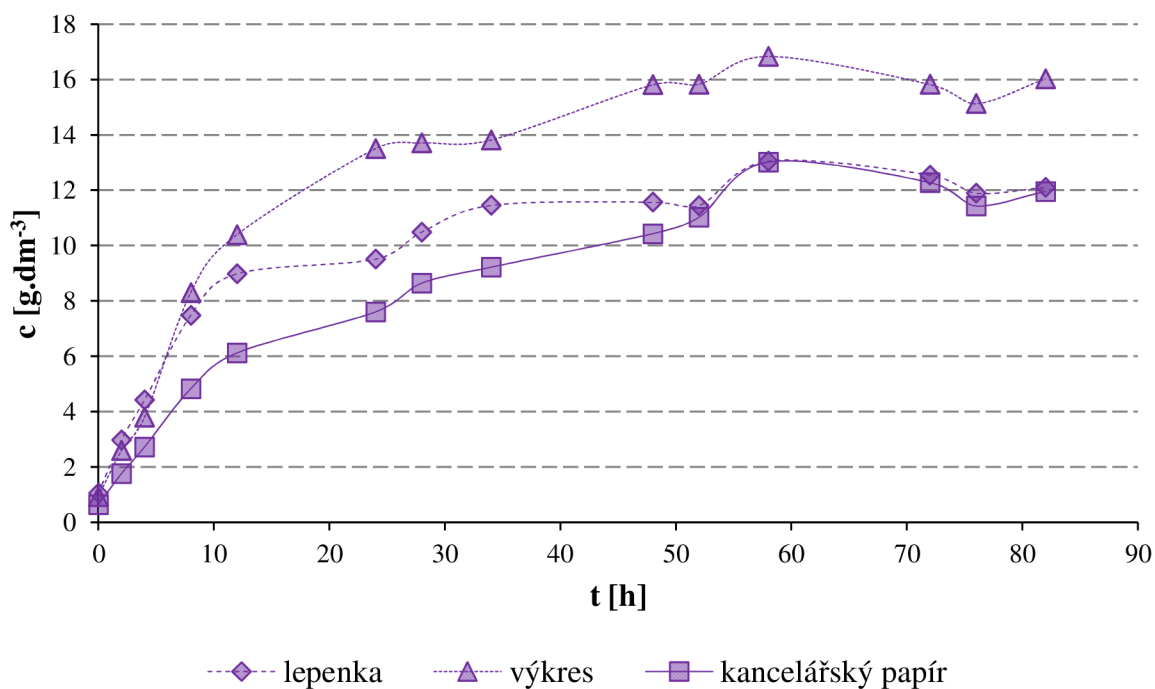


**Graf 16:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$



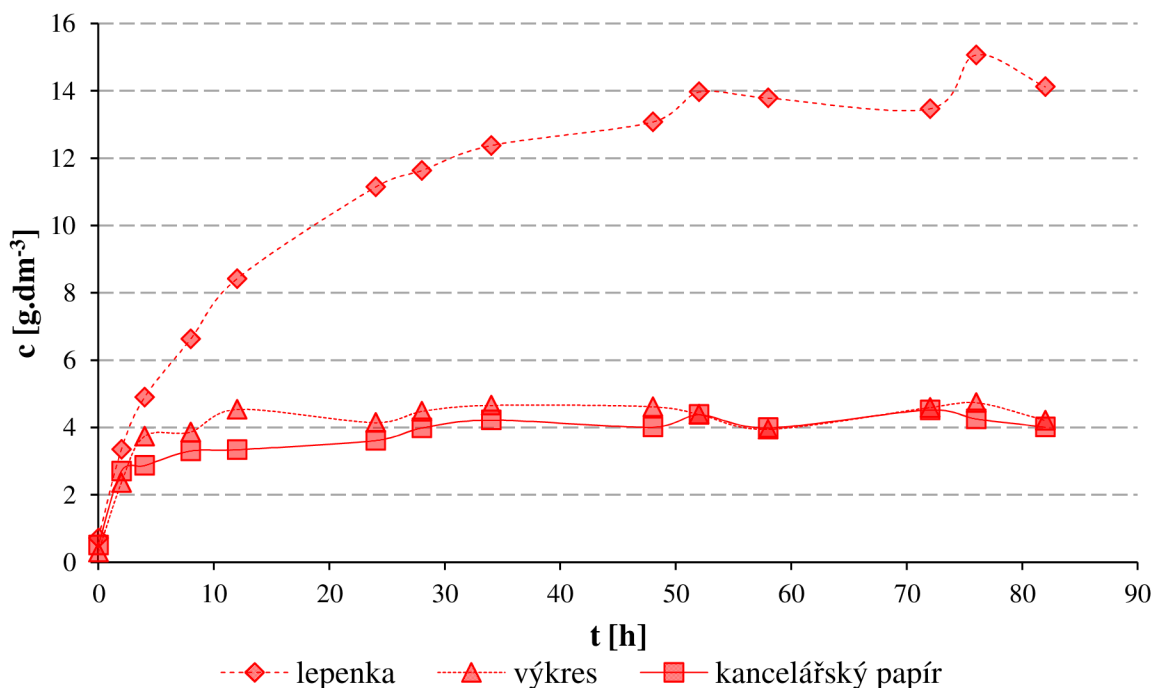
Při mikrovlnné předúpravě v kombinaci s  $H_2SO_4$  je patrné, že koncentrace glukózy při hydrolýze vzrostly u výkresu a kancelářského papíru výrazně, u lepenky pouze nepatrně ve srovnání s mletím. Konec hydrolýzy lze odhadnout na 36. hodinu, kdy koncentrace glukózy už dále nerostla.

**Graf 17:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$



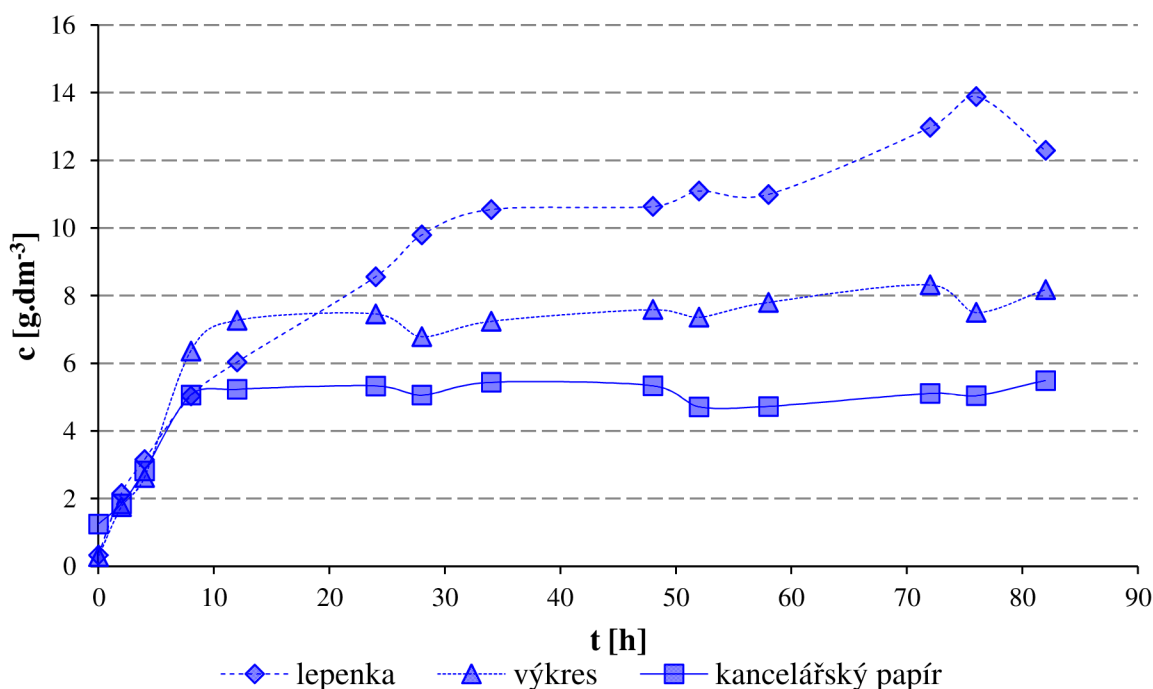
Tento typ předúprav je neúčinnější u všech typů papíru. Došlo k největšímu zisku glukózy v průběhu enzymatické hydrolýzy, která probíhala až asi do 58. hodiny. Největší vliv na proces hydrolýzy má předúprava mikrovlnná s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  u výkresu. Konečné výtěžky glukózy pro lepenku a kancelářský papír jsou srovnatelné, ovšem průběh hydrolýzy lepenky je strmější než u kancelářského papíru.

**Graf 18:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mletí



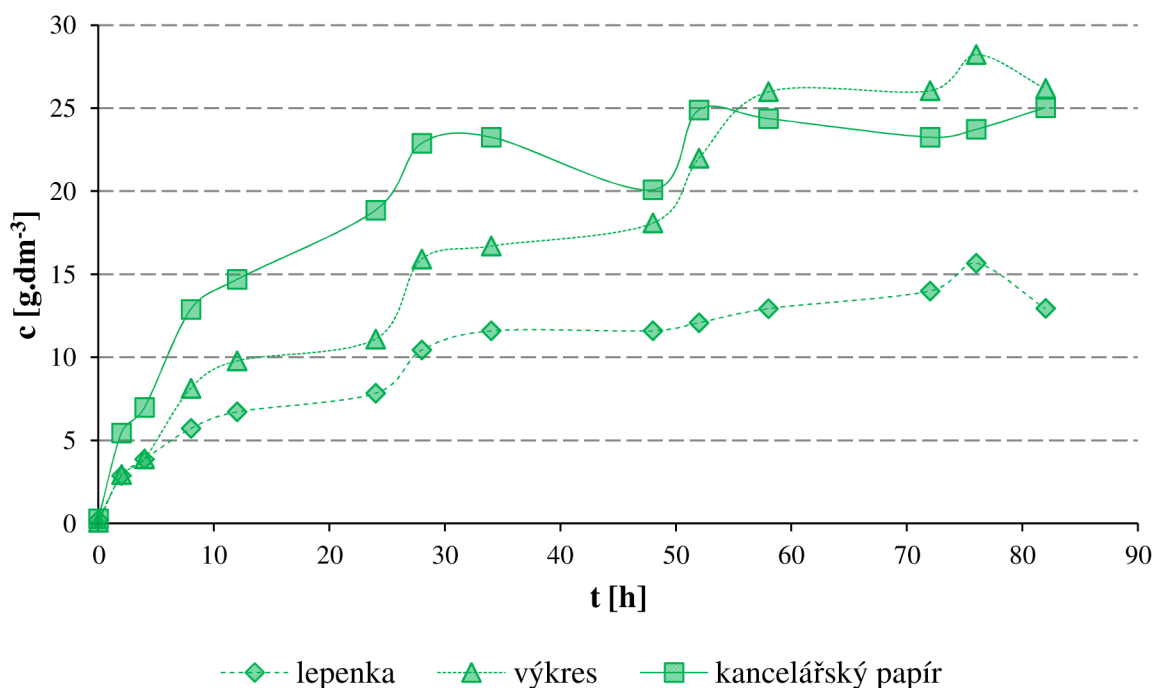
Účinnost mletí lze pozorovat pouze u lepenky, kde je nárůst glukózy velice výrazný. Dosahuje více jak dvojnásobné množství glukózy získané v procesu hydrolýzy u takto předúpraveného výkresu a kancelářského papíru. Vysoký obsah plnidel (především tedy bělidel) v těchto papírech je docela výrazný a negativně ovlivňuje průběh hydrolýzy inhibičním působením na enzymy. Předpokládaný konec hydrolýzy je u výkresu a kancelářského papíru mezi 12. a 24. hodinou, u lepenky zůstala koncentrace glukózy konstantní až kolem 50. hodiny.

**Graf 19:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s NaOH



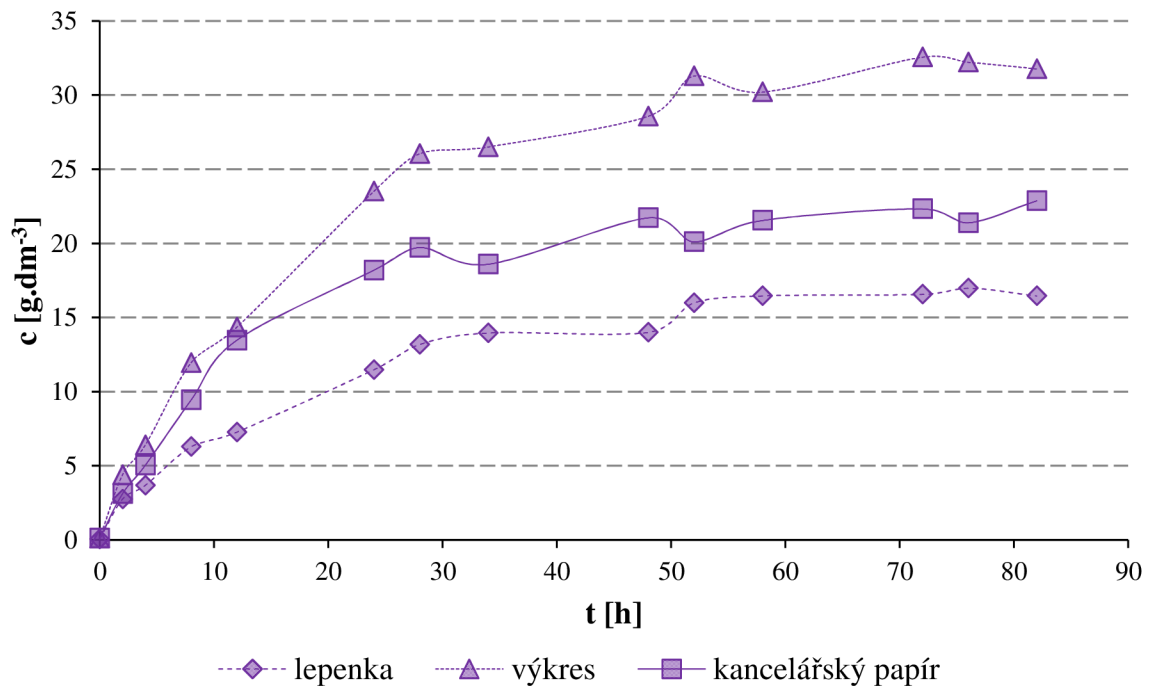
Předúprava mikrovlnná s NaOH zvýšila koncentraci glukózy v roztoku u výkresu a kancelářského papíru, ovšem na lepenku tento typ předúpravy při 6 % w/v substrátu vliv neměla. Výsledná koncentrace je srovnatelná s výsledky získanými při použití mletí jako předúpravy. Hydrolýza byla v případě lepenky ukončena až mezi 58 a 72 hodinami, u výkresu a kancelářského papíru již ve 12. hodině.

**Graf 20:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Mikrovlnná předúprava s  $H_2SO_4$  výrazně zvýšila koncentraci vzniklé glukózy v případě výkresu a kancelářského papíru, a to ve srovnání s mletím až několikanásobně. U lepenky se koncentrace glukózy po hydrolýze pohybovala okolo stejných hodnot jako v předešlých dvou metodách předúpravy. Hydrolýza u takto předupravených substrátů probíhala až do 58. hodiny, poté byla ukončena.

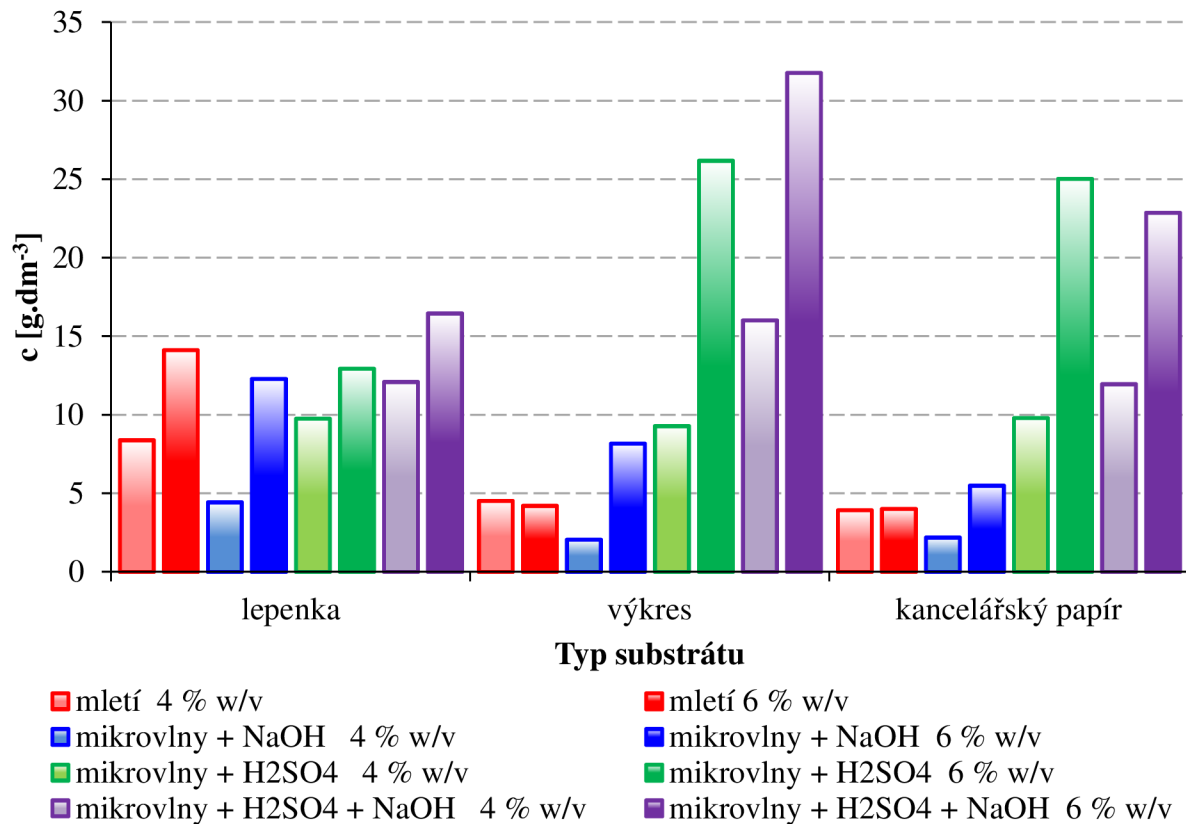
**Graf 21:** Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a NaOH



Kombinace  $H_2SO_4$  a NaOH při mikrovlnné předúpravě vedla k nejvyšším ziskům glukózy v procesu hydrolýzy, a to u všech typů papíru. Z lepenky bylo získáno nejmenší množství glukózy, největší množství z výkresu, kde se koncentrace glukózy pohybovala okolo  $32 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Při této předúpravě došlo zřejmě k odstranění největšího množství plnidel (viz kapitola 2.3 v teoretické části), čímž byla získána čistá celulóza.

### 3.4.3 Srovnání koncentrace glukózy získané hydrolýzou - různé koncentrace substrátů

Graf 22: Srovnání koncentrace glukózy vzniklé hydrolýzou u všech typů papíru a všech předúprav při použití 4% w/v a 6% w/v suspenze substrátu



Zisk glukózy při enzymatické hydrolýze se u různých typů papíru liší typem předúpravy, která má vliv na přístupnost celulózy enzymům. Lepenka předupravená pouze mletím dosahuje nepatrně vyšší koncentrace glukózy než předúprava mikrovlnného záření a NaOH a také s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Nejvyšší koncentrace byla zaznamenána u mikrovlnné úpravy s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH a mletí. U výkresu mají různé typy předúprav velice rozdílný vliv na konečné koncentrace glukózy při enzymatické hydrolýze. Jako nejlepší byla zvolena předúprava mikrovlnná, a to s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a s kombinací H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. U kancelářského papíru byly pro SSF zvoleny stejné typy předúprav jako u výkresu, pouze s tím rozdílem, že nejvyšší koncentrace glukózy bylo získáno při použití mikrovlnné předúpravy s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ovšem i když pro kancelářský papír jsou tyto dvě předúpravy jako nejlepší, nebylo u něj dosaženo v procesu hydrolýzy takových koncentrací glukózy jako u výkresu.

Dvě nejlepší předúpravy pro každý typ papíru, viz výše, byly zvoleny pro metodu simultánní sacharifikace a fermentace.

### 3.5 Simultánní sacharifikace a fermentace - SSF

Simultánní sacharifikace a fermentace byla provedena za podmínek uvedených v kapitole 2.7 u substrátů s nejvyšší koncentrací glukózy, respektive od každého typu papíru byly zvoleny dva typy předúprav. U těchto substrátů byla sledována tvorba ethanolu a spotřeba glukózy v procesu současné hydrolýzy a fermentace a dále byly srovnávány různé množství přidané biomasy - sada 1, sada 2 (viz kapitola 2.7).

### 3.5.1 Lepenka

**Tabulka 19:** Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na lepence (sada 1)

t [h]	sada 1			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,764 ± 0,003	0	0,12 ± 0,02	0
4	4,0 ± 0,3	0	3,60 ± 0,08	0
8	5,30 ± 0,08	0	5,6 ± 0,9	0,156 ± 0,006
12	5,4 ± 0,1	0	5,51 ± 0,04	0,7 ± 0,2
24	3,70 ± 0,09	0,24 ± 0,01	3,2 ± 0,4	1,3 ± 0,6
28	3,26 ± 0,05	0,33 ± 0,08	2,094 ± 0,008	2,56 ± 0,08
32	2,2 ± 0,5	0,388 ± 0,006	1,8 ± 0,7	3,07 ± 0,04
36	2,1 ± 0,1	0,86 ± 0,03	1,7 ± 0,5	3,6 ± 0,8
48	2,16 ± 0,07	1,9 ± 0,1	1,56 ± 0,06	4,3 ± 0,6
52	2,03 ± 0,06	2,73 ± 0,08	1,60 ± 0,04	5,7 ± 0,3
56	1,99 ± 0,08	4,47 ± 0,04	1,50 ± 0,01	7,0 ± 0,5
60	1,75 ± 0,01	5,87 ± 0,09	1,27 ± 0,01	8,0 ± 0,8
72	1,6 ± 0,1	7,0 ± 0,6	1,50 ± 0,03	7,86 ± 0,03
76	1,84 ± 0,06	6,99 ± 0,08	1,36 ± 0,05	7,98 ± 0,06
80	1,7 ± 0,2	7,1 ± 0,4	1,6 ± 0,6	8,1 ± 0,8
96	1,567 ± 0,008	7,0 ± 0,8	1,3 ± 0,1	8,1 ± 0,9
120	1,68 ± 0,06	7,2 ± 0,1	1,3 ± 0,8	8,19 ± 0,07
144	1,64 ± 0,02	7,11 ± 0,01	1,46 ± 0,09	8,0 ± 0,7

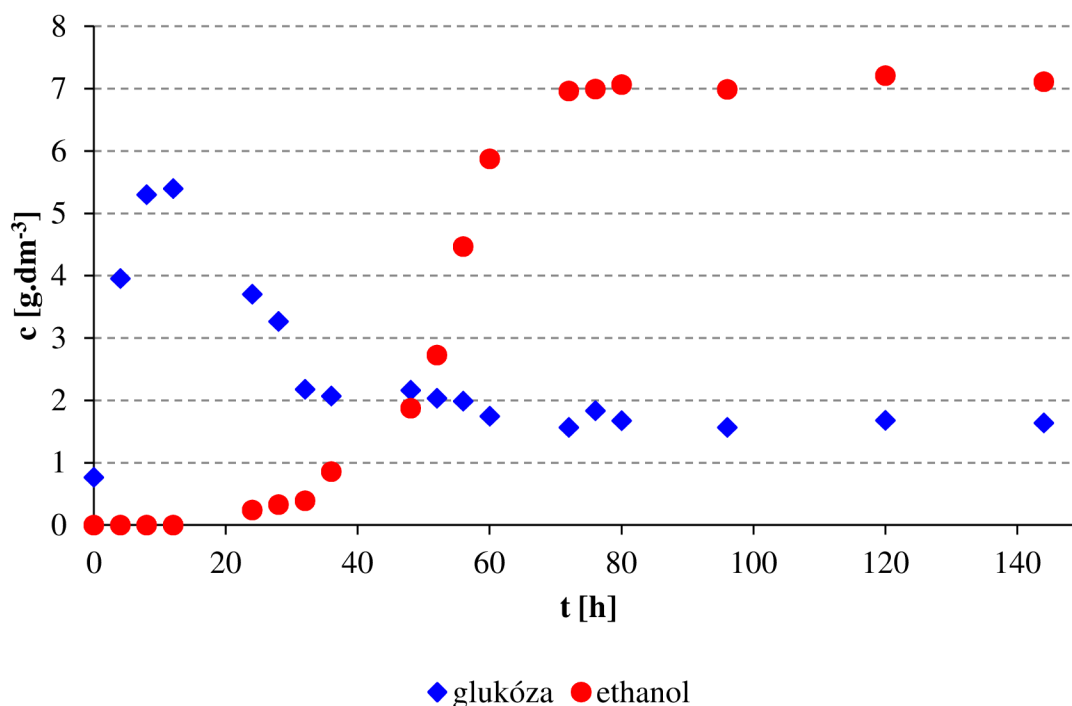
\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

**Tabulka 20:** Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na lepence (sada 2)

t [h]	sada 2			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,71 ± 0,05	0	0,14 ± 0,01	0
4	4,0 ± 0,1	0	3,264 ± 0,006	0
8	6,2 ± 0,9	0	4,9 ± 0,3	0,16 ± 0,03
12	6,6 ± 0,8	0	4,3 ± 0,5	0,68 ± 0,08
24	5,69 ± 0,08	0,254 ± 0,006	3,56 ± 0,09	1,00 ± 0,04
28	3,97 ± 0,02	0,3 ± 0,1	2,17 ± 0,05	1,9 ± 0,6
32	1,1 ± 0,1	0,32 ± 0,08	1,8 ± 0,1	2,6 ± 0,1
36	0,96 ± 0,03	0,42 ± 0,05	1,7 ± 0,1	3,06 ± 0,04
48	0,80 ± 0,03	0,87 ± 0,06	1,57 ± 0,06	4,00 ± 0,06
52	0,69 ± 0,07	1,26 ± 0,05	1,60 ± 0,08	4,26 ± 0,02
56	0,744 ± 0,009	1,9 ± 0,2	1,48 ± 0,04	5,00 ± 0,06
60	0,70 ± 0,01	2,01 ± 0,07	1,25 ± 0,05	5,4 ± 0,5
72	0,70 ± 0,05	4,4 ± 0,2	1,17 ± 0,07	7,2 ± 0,8
76	0,74 ± 0,02	6,5 ± 0,9	0,86 ± 0,09	8,0 ± 0,9
80	0,67 ± 0,07	7,85 ± 0,03	0,79 ± 0,01	8,90 ± 0,08
96	0,68 ± 0,04	8,00 ± 0,09	1,0 ± 0,5	9,0 ± 0,1
120	0,6 ± 0,1	8,5 ± 0,6	0,456 ± 0,004	9,60 ± 0,07
144	0,6 ± 0,1	8 ± 1	0,84 ± 0,08	9,5 ± 0,2

\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

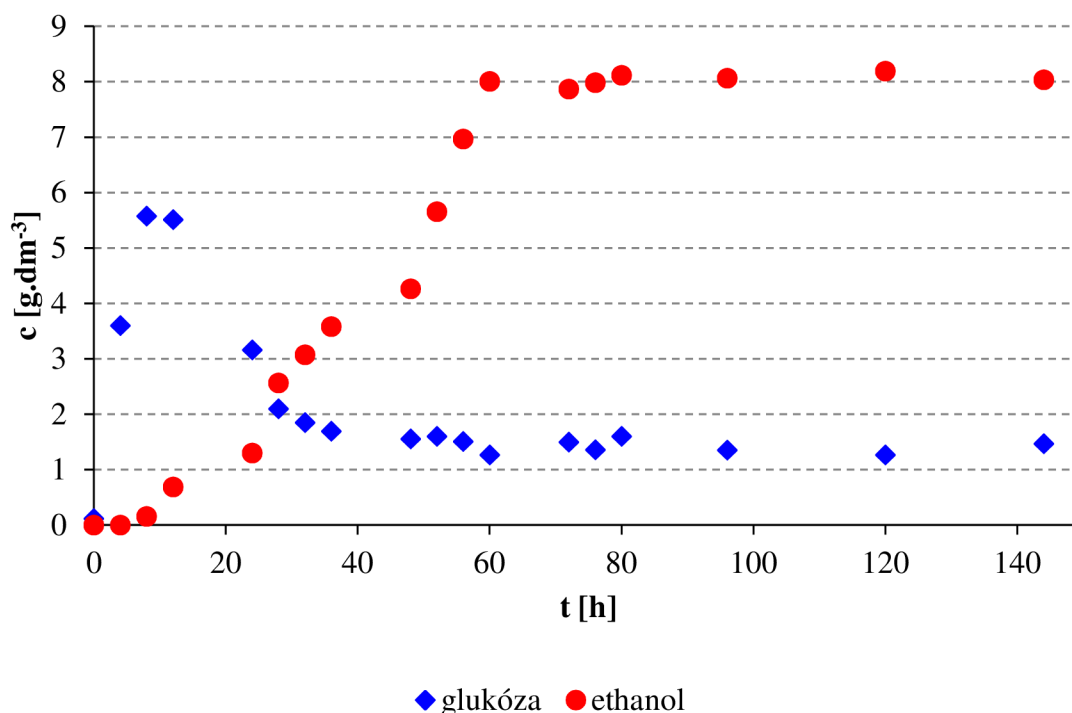
**Graf 23:** Vyhodnocení metody SSF pro lepenku předupravenou mletím (sada 1)



Koncentrace glukózy v médiu nejdříve rostla, protože zatím nedocházelo k tvorbě ethanolu, až do 12. hodiny, kdy odpovídala hodnotě necelých  $5,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Mezi 12. a 24. hodinou nastal pokles v koncentraci glukózy, jelikož došlo k využití glukózy na její přeměnu v ethanol pomocí bakterií *Z. mobilis*. Výtěžek ethanolu u lepenky předupravené mletím v průběhu metody SSF dosáhl koncentrace okolo  $7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tvořit se začal kolem 24. hodiny procesu, přičemž koncentrace glukózy v médiu klesala až na hodnotu  $1,5 - 2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace glukózy i ethanolu zůstala téměř neměnná od zhruba 72. hodiny.

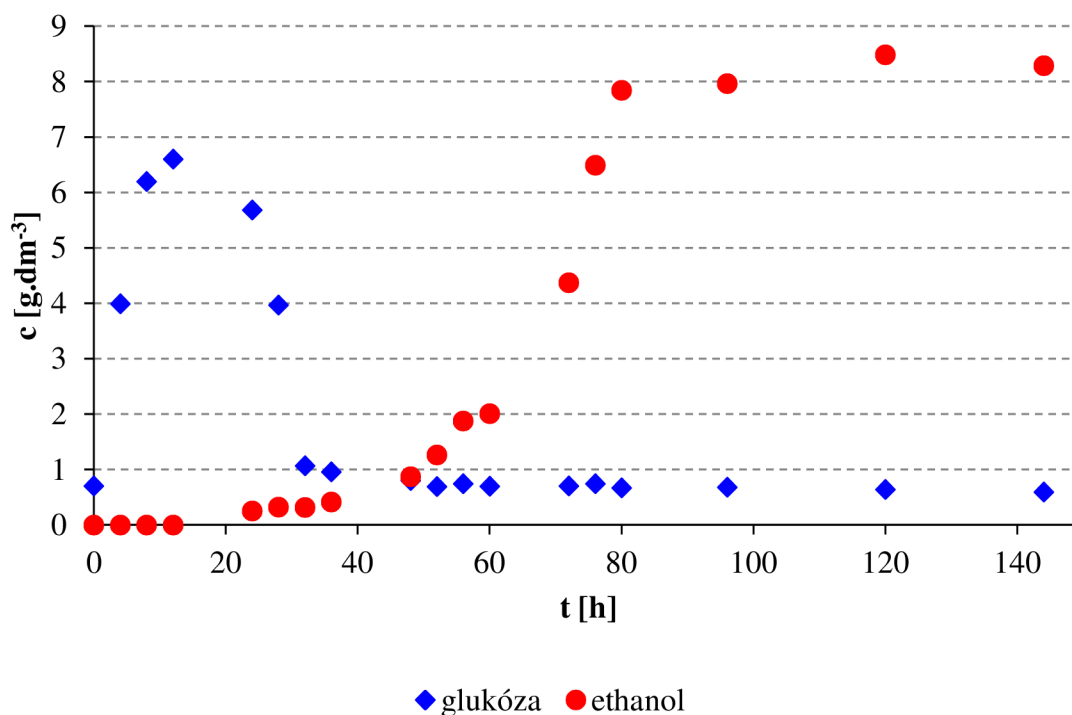


**Graf 24:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a NaOH lepenky (sada 1)



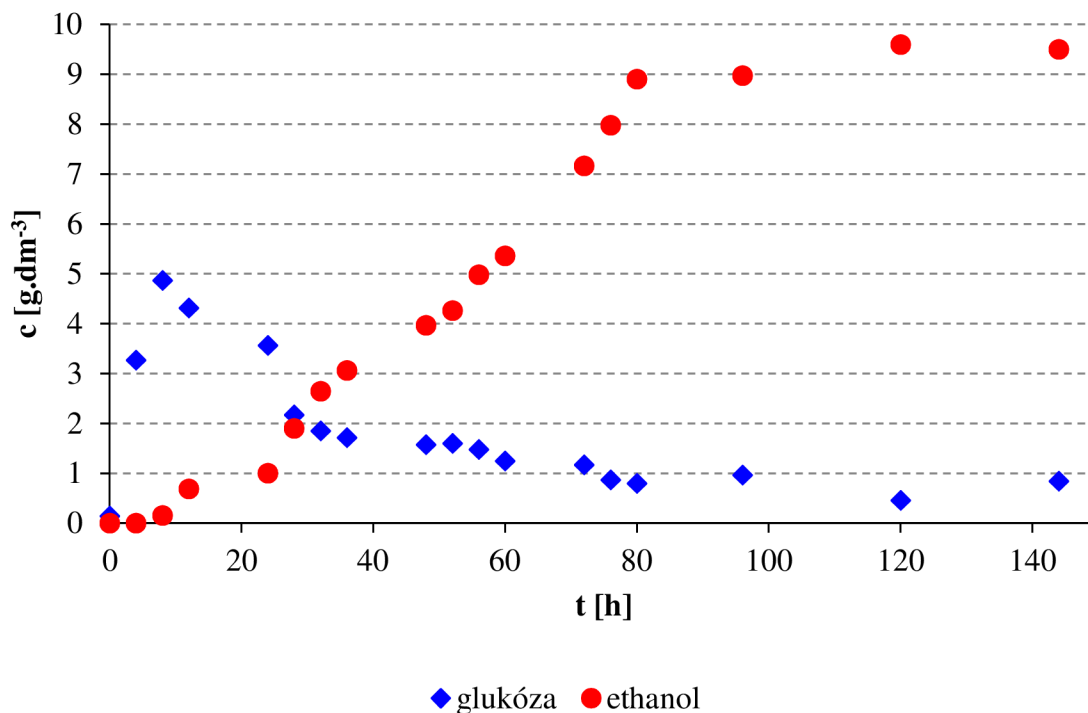
Jelikož je u mikrovlnné úpravy s  $H_2SO_4$  a NaOH vyšší zisk glukózy, došlo také ke vzniku vyšší koncentrace ethanolu. Ethanol se začal tvořit v 8. hodině, ovšem pouze v nepatrném množství, kdy pokles glukózy nebyl ještě znatelný. Po překročení 12 hodin došlo prudkému poklesu glukózy a také rychlejšímu nárůstu ethanolu v médiu. Ukončení kvašení lze připsat 60. hodině, kdy byla koncentrace ethanolu téměř konstantní, tedy okolo  $8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace glukózy se držela na hodnotě okolo  $1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Graf 25:** Vyhodnocení metody SSF pro lepenku předupravenou mletím (sada 2)



Koncentrace glukózy v médiu rostla, dokud nedošlo k tvorbě ethanolu, což bylo asi ve 24. hodině procesu. Množství glukózy začalo prudce klesat a v 32. hodině byla koncentrace asi  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a klesla velmi nízkou konečnou koncentrací, a sice asi  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V čase 60 až 80 hodin došlo k rychlé produkci ethanolu až na koncentraci okolo  $8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , což byl konečný výtěžek ethanolu v průběhu této metody.

**Graf 26:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaOH}$  lepenky (sada 2)



V průběhu metody SSF u mikrovlnně předupravené lepenky s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaOH}$  byl výnos ethanolu vyšší, i když ne o závratné množství. Koncentrace glukózy vyšplhala pouze na necelých  $5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , jelikož poté došlo ke vzniku ethanolu spotřebováním glukózy. Ta po 8. hodině začala klesat a postupně se spotřebovávala až do vzniku konstantního množství ethanolu, kdy koncentrace glukózy odpovídala  $0,5 - 1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Ethanol byl produkován do 80. hodiny procesu, kdy se jeho množství v médiu pohybovalo okolo  $9 - 9,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

### 3.5.2 Výkres

**Tabulka 21:** Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na výkresu (sada 1)

t [h]	sada 1			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,105 ± 0,004	0	0,207 ± 0,002	0
4	3,6 ± 0,3	0	6,7 ± 0,5	0
8	7,90 ± 0,06	0	8,3 ± 0,4	0,57 ± 0,06
12	7,68 ± 0,04	0	6,32 ± 0,06	1,70 ± 0,04
24	6,51 ± 0,02	0,30 ± 0,07	5,8 ± 0,2	1,95 ± 0,03
28	4,85 ± 0,02	0,52 ± 0,01	5,11 ± 0,09	2,97 ± 0,08
32	3,1 ± 0,3	1,06 ± 0,09	5,0 ± 0,1	3,067 ± 0,009
36	2,691 ± 0,009	1,48 ± 0,03	4,147 ± 0,009	4,5 ± 0,5
48	2,68 ± 0,05	3,36 ± 0,04	3,84 ± 0,04	7,1 ± 0,6
52	2,06 ± 0,08	5,046 ± 0,007	2,92 ± 0,03	8,1 ± 0,1
56	1,89 ± 0,01	7,0 ± 0,5	2,32 ± 0,05	9,2 ± 0,2
60	1,47 ± 0,05	9,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	10,06 ± 0,07
72	1,66 ± 0,03	10,99 ± 0,09	1,31 ± 0,07	11,56 ± 0,06
76	0,942 ± 0,006	10,06 ± 0,04	1,51 ± 0,09	11,47 ± 0,09
80	1,197 ± 0,001	11,1 ± 0,2	1,674 ± 0,002	12,1 ± 0,5
96	1,39 ± 0,05	11,5 ± 0,6	1,065 ± 0,003	13,4 ± 0,1
120	1,440 ± 0,003	11,04 ± 0,08	1,44 ± 0,03	12,45 ± 0,09
144	1,24 ± 0,08	10,2 ± 0,9	1,364 ± 0,008	12,82 ± 0,07

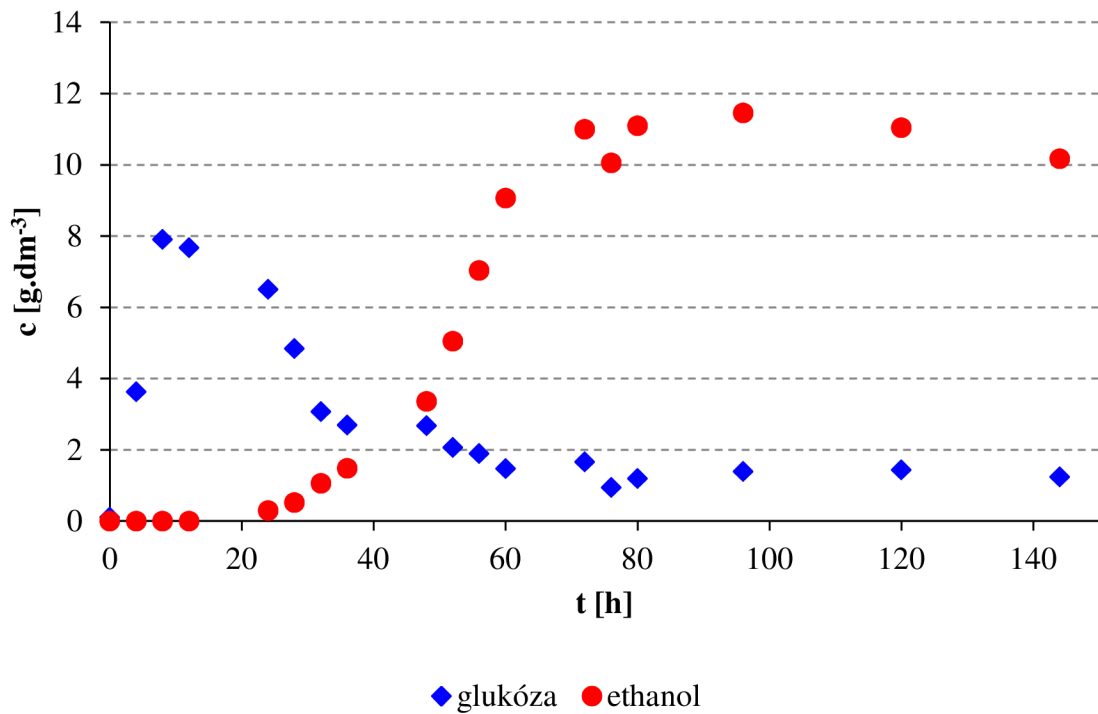
\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

**Tabulka 22:** Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na výkresu (sada 2)

t [h]	sada 2			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,10 ± 0,04	0	0,127 ± 0,001	0
4	3,7 ± 0,3	0	6,30 ± 0,05	0
8	8,0 ± 0,7	0	7,1 ± 0,1	0,190 ± 0,003
12	7,75 ± 0,09	0,196 ± 0,008	7,16 ± 0,06	0,648 ± 0,007
24	5,46 ± 0,06	0,4 ± 0,1	6,46 ± 0,08	1,7 ± 0,2
28	3,8 ± 0,1	0,487 ± 0,006	5,07 ± 0,03	2,65 ± 0,05
32	3,09 ± 0,02	0,98 ± 0,08	4,5 ± 0,1	3,12 ± 0,01
36	2,74 ± 0,08	1,70 ± 0,05	3,8 ± 0,5	4,6 ± 0,6
48	2,31 ± 0,07	3,10 ± 0,09	2,26 ± 0,09	5,1 ± 0,4
52	2,11 ± 0,06	5,0 ± 0,4	1,670 ± 0,002	7,47 ± 0,05
56	1,7 ± 0,1	6,8 ± 0,8	1,20 ± 0,07	8,96 ± 0,08
60	1,85 ± 0,03	7,47 ± 0,03	1,04 ± 0,04	10,16 ± 0,09
72	1,98 ± 0,03	9,05 ± 0,04	1,60 ± 0,02	12,65 ± 0,02
76	1,47 ± 0,05	11,98 ± 0,02	0,961 ± 0,006	13,0 ± 0,5
80	1,08 ± 0,03	13,8 ± 0,1	1,016 ± 0,004	13,8 ± 0,3
96	0,924 ± 0,007	14,5 ± 0,9	0,8 ± 0,2	15,65 ± 0,06
120	0,8 ± 0,1	14,68 ± 0,6	0,55 ± 0,06	15,766 ± 0,007
144	0,91 ± 0,01	14,40 ± 0,09	0,38 ± 0,06	16,1 ± 0,8

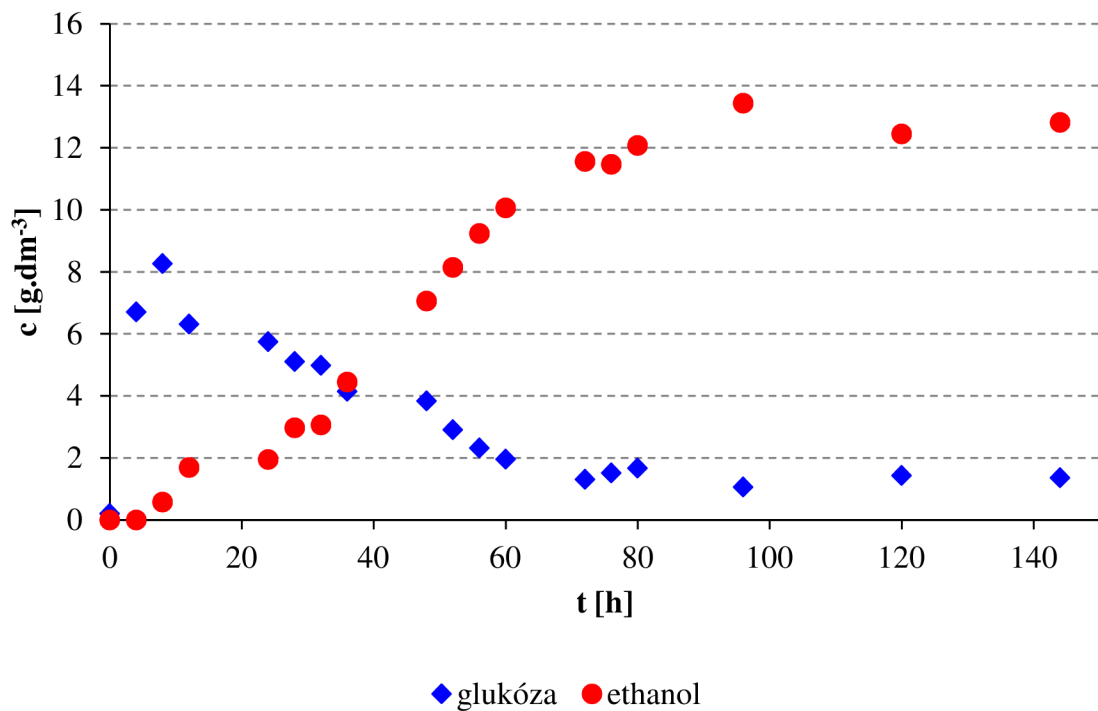
\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

**Graf 27:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  výkresu (sada 1)



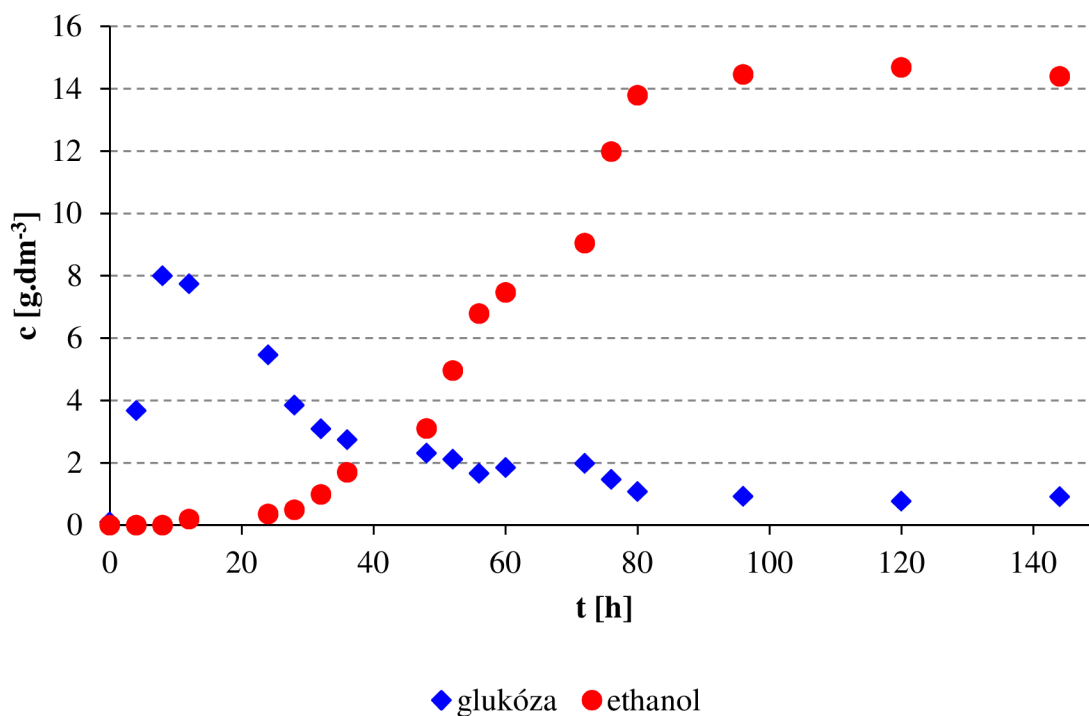
V průběhu SSF u výkresu předúpraveného pomocí mikrovlnného záření a  $H_2SO_4$ , byl pokles glukózy od 8. hodiny procesu postupný. K tvorbě ethanolu došlo až po 24. hodině a jeho koncentrace prudce rostla až na hodnotu okolo  $11 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , které bylo dosaženo v kolem 80. hodiny. Naopak koncentrace glukózy byla od 60. hodiny téměř neměnná, držela se na koncentraci kolem  $1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Graf 28:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  výkresu (sada 1)



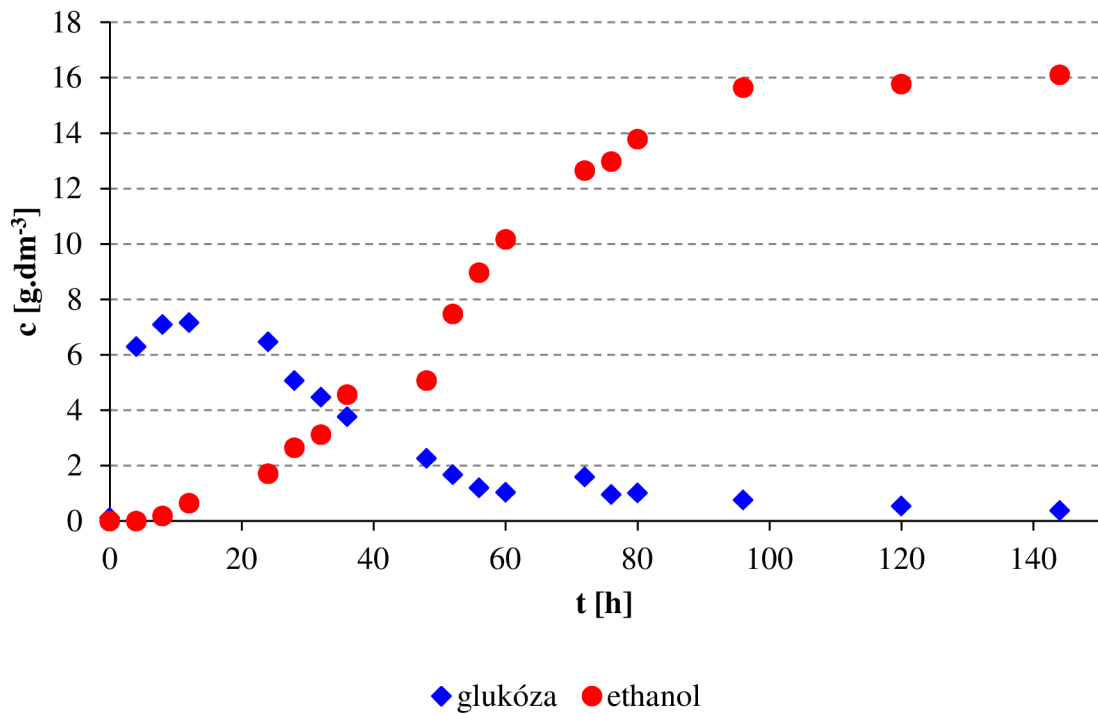
Výtěžnost ethanolu u takto upraveného výkresu byla vyšší než u úpravy mikrovlnného záření a  $H_2SO_4$ , a to zhruba o  $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Celková koncentrace ethanolu tedy činila kolem  $13 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tvořit se začal přibližně v 8 hodině a jeho koncentrace rostla až do 80. - 96. hodiny za současného postupného poklesu glukózy. Konečná koncentrace glukózy byla stanovena na  $1 - 1,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Graf 29:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  výkresu (sada 2)



Z počátku průběhu SSF došlo k nárůstu koncentrace glukózy v médiu na asi  $8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v 8. hodině a poté začala postupně klesat, čímž došlo k přeměně glukózy na ethanol. Detekovatelné množství ethanolu bylo zaznamenáno ve 12. hodině. Koncentrace ethanolu rostla současně s úbytkem glukózy. Tvorba ethanolu probíhala intenzivně do 80. hodiny, kdy bylo přítomno v médiu necelých  $14 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a konečná koncentrace byla jen nepatrně vyšší, tedy kolem  $14,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V tomto okamžiku dosahovala glukóza množství kolem  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v médiu.

**Graf 30:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  výkresu (sada 2)



Jak u sady 1, tak u sady 2 se předúprava kombinací mikrovlnného záření s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  osvědčila jako lepší, tedy z hlediska konečné výtěžnosti ethanolu z výkresu metodou SSF. Koncentrace glukózy v médiu rostla stejně jako u všech provedených SSF do 8. hodiny, ovšem v tomto případě klesala velmi pozvolna až do 56. hodiny. V tomto okamžiku bylo v médiu přítomno obtojně množství ethanolu, okolo  $9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Konečná hodnota ethanolu se vyšplhala na  $16 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , přičemž koncentrace glukózy byla velmi nízká, jen necelého  $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

### 3.5.3 Kancelářský papír

*Tabulka 23: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na kancelářském papíru (sada 1)*

t [h]	sada 1			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,28 ± 0,08	0	0,16 ± 0,05	0
4	4,69 ± 0,01	0	4,5 ± 0,1	0
8	6,56 ± 0,07	0,49 ± 0,05	9,09 ± 0,06	0
12	5,87 ± 0,05	0,7 ± 0,1	6,30 ± 0,09	0,594 ± 0,003
24	5,26 ± 0,05	1,04 ± 0,06	3,0 ± 0,4	1,9 ± 0,1
28	4,1 ± 0,5	1,27 ± 0,08	2,06 ± 0,07	2,07 ± 0,06
32	3,8 ± 0,1	2,0 ± 0,4	1,64 ± 0,08	2,4 ± 0,2
36	3,09 ± 0,08	2,06 ± 0,05	1,10 ± 0,07	2,98 ± 0,08
48	2,06 ± 0,09	3,00 ± 0,01	0,82 ± 0,03	4,33 ± 0,09
52	2,04 ± 0,09	4,2 ± 0,3	1,02 ± 0,06	5,5 ± 0,2
56	1,89 ± 0,03	5,9 ± 0,1	1,19 ± 0,04	6,08 ± 0,09
60	1,92 ± 0,09	6,8 ± 0,1	0,548 ± 0,008	7,0 ± 0,3
72	1,62 ± 0,04	10,65 ± 0,08	0,65 ± 0,07	9,9 ± 0,8
76	1,5 ± 0,1	11,10 ± 0,09	1,0 ± 0,1	10,6 ± 0,4
80	1,761 ± 0,009	11,49 ± 0,04	1,01 ± 0,05	10,4 ± 0,6
96	1,06 ± 0,07	11,7 ± 0,5	0,86 ± 0,01	10,09 ± 0,08
120	1,46 ± 0,05	12,0 ± 0,9	0,7 ± 0,3	10,60 ± 0,08
144	1,64 ± 0,02	11,81 ± 0,08	0,98 ± 0,07	10,8 ± 0,7

\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

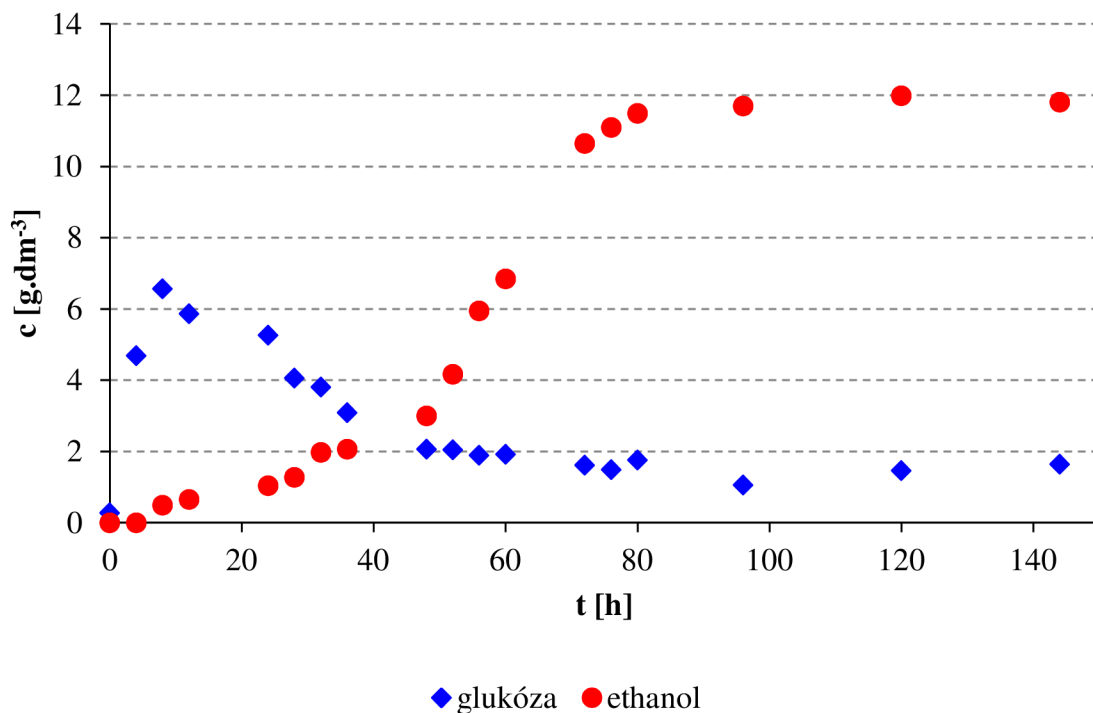


**Tabulka 24:** Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na kancelářském papíru (sada 2)

t [h]	sada 2			
	předúprava 1*		předúprava 2*	
	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}]$
0	0,28 ± 0,08	0	0,16 ± 0,03	0
4	4,69 ± 0,01	0	4,5 ± 0,8	0
8	6,56 ± 0,07	0,364 ± 0,001	7,1 ± 0,4	0
12	5,87 ± 0,05	0,55 ± 0,05	8,3 ± 0,1	0,299 ± 0,005
24	5,26 ± 0,05	1,10 ± 0,06	3,96 ± 0,06	1,92 ± 0,09
28	4,1 ± 0,5	1,156 ± 0,009	2,06 ± 0,08	2,10 ± 0,02
32	3,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,1
36	3,09 ± 0,08	1,73 ± 0,04	1,10 ± 0,09	4,1 ± 0,9
48	2,06 ± 0,09	2,06 ± 0,06	0,82 ± 0,02	6,95 ± 0,05
52	2,04 ± 0,09	3,2 ± 0,3	1,02 ± 0,07	7,57 ± 0,07
56	1,89 ± 0,03	4,06 ± 0,08	1,19 ± 0,06	9,0 ± 0,8
60	1,92 ± 0,09	5,8 ± 0,04	0,55 ± 0,08	10,0 ± 0,4
72	1,62 ± 0,04	8,1 ± 0,4	0,655 ± 0,008	12,1 ± 0,3
76	1,5 ± 0,1	9,65 ± 0,09	0,96 ± 0,04	12,565 ± 0,006
80	1,761 ± 0,009	10,7 ± 0,1	1,01 ± 0,01	12,3 ± 0,2
96	1,06 ± 0,07	13,1 ± 0,9	0,86 ± 0,01	12,01 ± 0,08
120	1,46 ± 0,05	13,5 ± 0,2	0,746 ± 0,003	12,06 ± 0,09
144	1,64 ± 0,02	13 ± 1	0,98 ± 0,05	12,13 ± 0,09

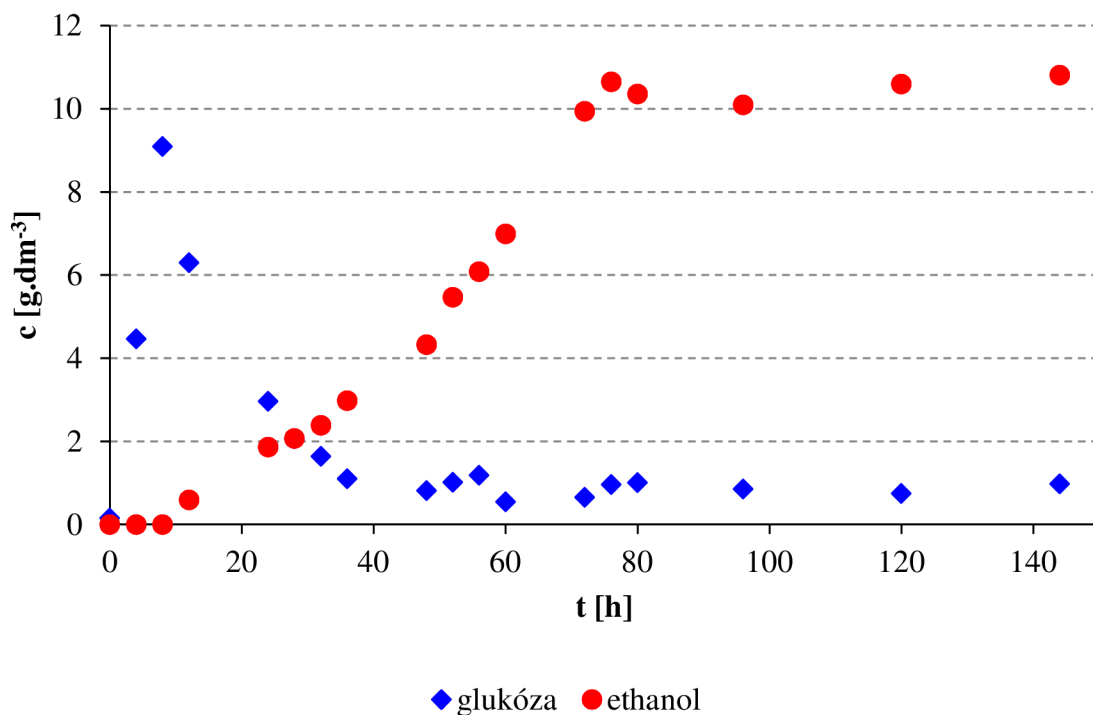
\* předúprava 1 = mletí (pro lepenku); předúprava 1 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pro výkres a kancelářský papír); předúprava 2 = mikrovlnná předúprava s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH; sada 1, sada 2 = různé množství biomasy

**Graf 31:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  kancelářského papíru (sada I)



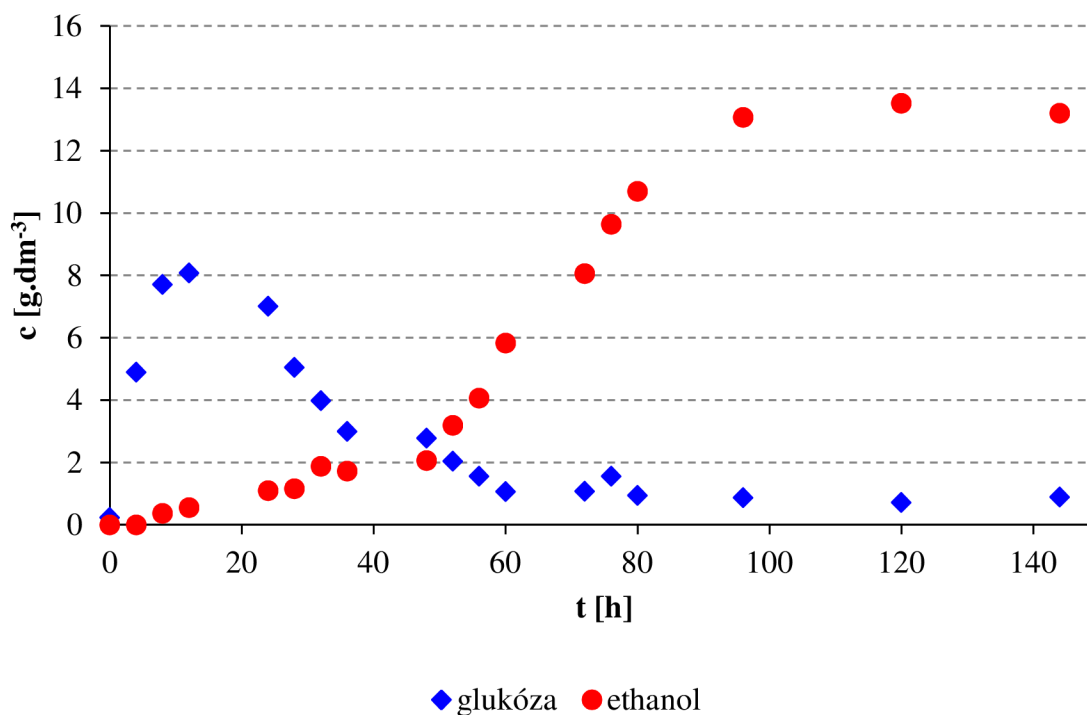
V průběhu metody SSF došlo nejdříve k nárůstu koncentrace glukózy v médiu na koncentraci téměř  $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , což bylo v 8. hodině. V tomto čase začala mírně stoupat koncentrace ethanolu v médiu a rostla až do 80. hodiny, kdy už byla produkce ethanolu ukončena, tedy na koncentraci necelých  $12 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Glukóza v této době byla také téměř konstantní.

**Graf 32:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  kancelářského papíru (sada I)



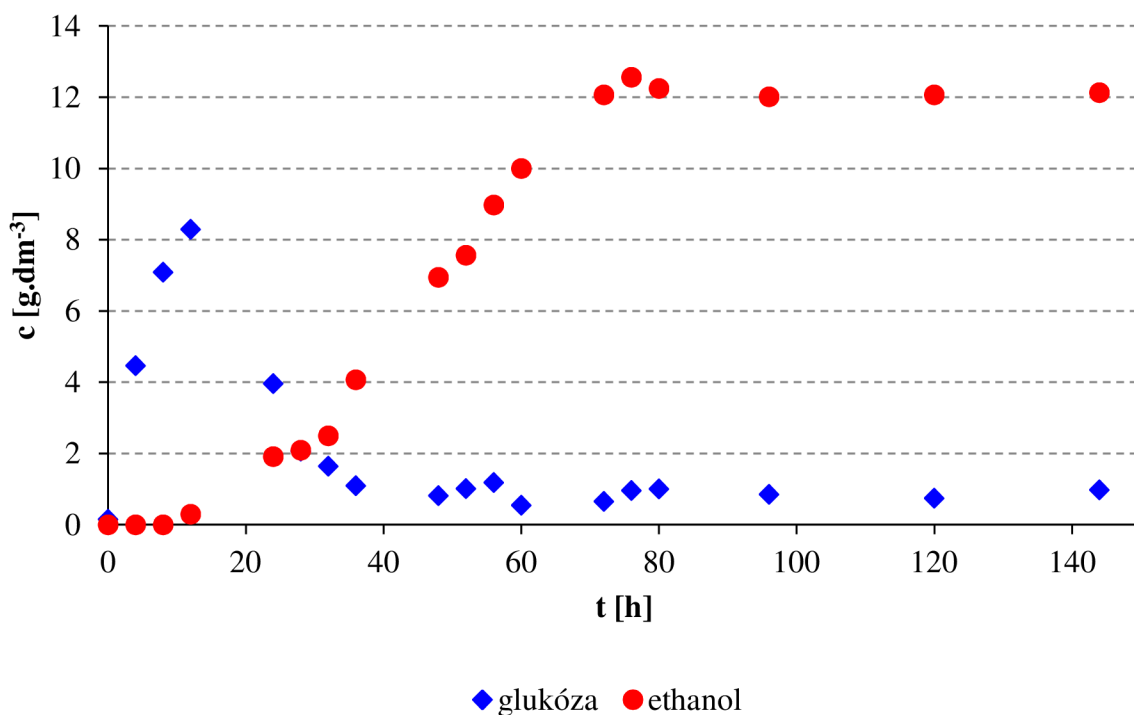
Koncentrace glukózy rostla až do 8 hodiny, poté prudce klesla a zůstala na koncentraci okolo  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . S poklesem koncentrace glukózy došlo k nárůstu ethanolu v médiu, který vznikl za současné spotřeby glukózy. Konečná koncentrace ethanolu byla kolem  $10 - 10,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Tvorba ethanolu byla ukončena v 76. hodině průběhu SSF.

**Graf 33:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kancelářského papíru (sada 2)



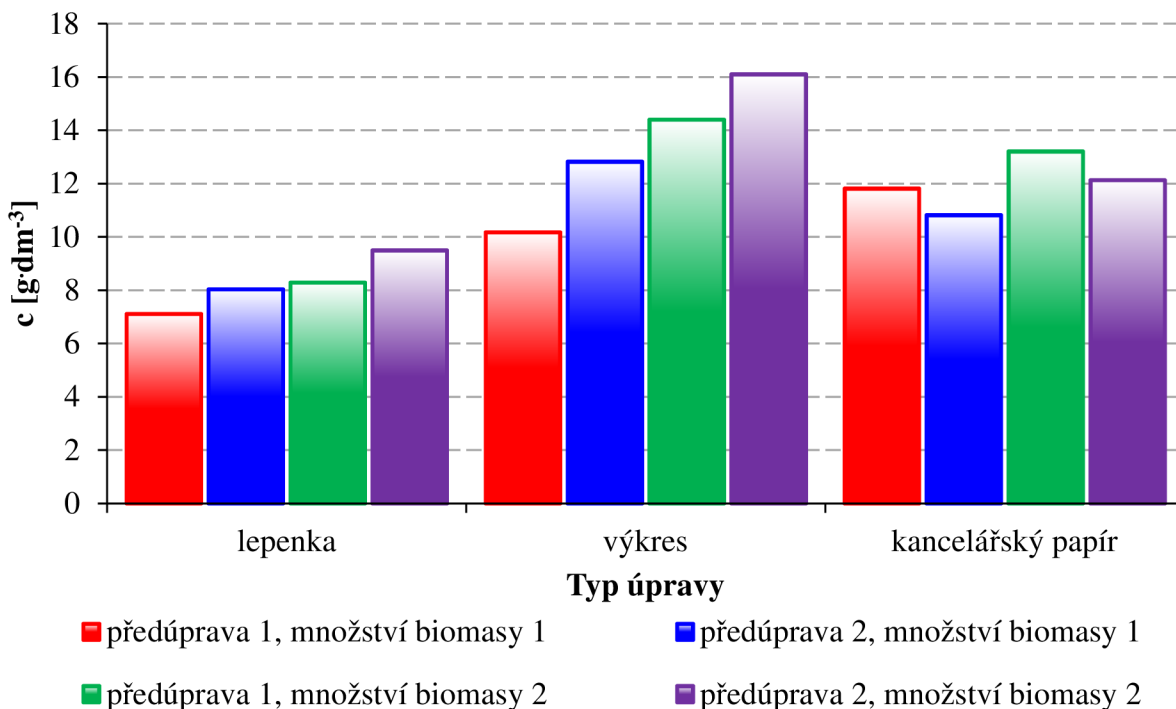
V průběhu metody SSF došlo k poklesu glukózy, která byla spotřebována mikroorganismy na produkci ethanolu. Ethanol se začal tvořit od 8. hodiny a jeho koncentrace v médiu rostla až do doby mezi 80. a 96. hodinou. Již v této době se koncentrace ethanolu pohybovala kolem  $13 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a tato koncentrace byla do konce trvání metody neměnná. Glukóza od 12. hodiny začala postupně klesat a od 60. hodiny byla její koncentrace do konce průběhu metody necelý  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Graf 34:** Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$  kancelářského papíru (sada 2)



Koncentrace glukózy zpočátku průběhu metody rostla, jelikož docházelo k hydrolyze substrátu a využití teprve malého množství vzniklé glukózy. Mezi 12 a 24 hodinami došlo k využití glukózy mikroorganismy k produkci ethanolu. Jeho koncentrace v médiu vystoupala až přes  $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , a to v 72. hodině procesu. Dále už ethanol nevznikal.

**Graf 35:** Srovnání konečné koncentrace ethanolu vzniklého během SSF



\* předúprava 1 (lepenka) - mletí; předúprava 1 (výkres, kancelářský papír) - mikrovlnná předúprava s  $H_2SO_4$ , předúprava 2 (pro všechny typy) - mikrovlnná předúprava s  $H_2SO_4$  a  $NaOH$ ; sada 1 - menší množství biomasy mikroorganismů, sada 2 - větší množství biomasy mikroorganismů

Z Grafu 34 je patrné, že u většího množství biomasy, kterou bylo médium zaočkováno, byly získány vyšší koncentrace ethanolu. U lepenky a výkresu se projevila předúprava mikrovlnného záření s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $\text{NaOH}$  jako nejlepší z hlediska výtěžnosti ethanolu. V případě kancelářského papíru byly výtěžnosti srovnatelné, ovšem lepší se projevila předúprava mikrovlnná s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  s větším množstvím biomasy.

U lepenky a kancelářského papíru se však výtěžnosti ethanolu sady 1 a sady 2 lišily o zhruba  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . U výkresu jsou tyto rozdíly větší, zejména potom u předúpravy 1, kdy rozdíly výtěžnosti ethanolu při SSF pro sadu 1 a 2 se liší o téměř  $4,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

## ZÁVĚR

V této práci byly testovány enzymy NS22086 (celulázový komplex) a NS22118 ( $\beta$ -glukosidáza) poskytnuté firmou Novozymes<sup>®</sup>. Dále byla provedena studie na možnosti průmyslového využití bakterie *Zymomonas mobilis* LMG457 při výrobě bioethanolu na třech typech substrátu (lepenka, výkres, kancelářský papír), jakožto odpadních surovin.

Vzhledem k tomu, že optimální teplota enzymů je poměrně vysoká (50 - 55°C), byly provedeny teplotní optimalizace růstu ve snaze zajistit nejbližší teplotní možnosti *Z. mobilis*. Byly stanoveny růstové křivky při čtyřech teplotách, a to při 30, 35, 40 a 45 °C. Teplota 45 °C by byla pro enzymatickou hydrolýzu nevhodnější, ovšem nebyl zaznamenán růst při této teplotě. Proto byla za nejlepší teplotu zvolena teplota 40 °C, i když nárůst biomasy při této teplotě nebyl nejvyšší. Teplota 40 °C byla používána dále při hydrolýze substrátu a simultánní sacharifikaci a fermentaci.

Kompoziční a kvantitativní analýza byla provedena za účelem zjištění množství celulózy, obsahu plnidel (popel) a sušiny (vázání vzdušné vlhkosti). Procentuální množství sušiny se nelišilo výrazně u žádného substrátu, dokonce ani po provedení různých předúprav. Na množství popela již předúpravy měly vliv, u lepenky upravené mletím a upravené mikrovlnným zářením s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH byl rozdíl kolem 7,5 % w/w, u výkresu byla rozdílnost těchto předúprav na množství popela necelých 14 % w/w a u kancelářského papíru asi 15 % w/w. Obsah celulózy ovlivnili chemické předúpravy taktéž příznivě. Nejvyšší procentuální množství celulózy bylo u lepenky předúpravou mikrovlnného záření s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH stejně jako u kancelářského papíru. Pro výkres byla nejúčinnější předúprava mikrovlnného záření s NaOH, výtěžek celulózy byl 85,3 ± 0,4 % w/w.

Bylo provedeno srovnání koncentrace glukózy získané při hydrolýze s použitím 4 % w/w a 6 % w/w, a to u všech typů papíru modifikovaných všemi zmíněnými způsoby předúpravy. Hydrolýza probíhala při 40 °C s množstvím enzymů 6% w/w celulázového komplexu a 0,6 %  $\beta$ -glukosidázy. Jako pufr byl zvolen citrát-fosforečnanový pufr s pH 4,8, dle práce Ing. Lukačkové [64]. Koncentrace získané glukózy byly stanoveny na přístroji HPLC, přičemž nejdříve musely být stanoveny kalibrační křivky pro glukózu a ethanol k vyhodnocení metody SSF. Vyšší koncentrace glukózy byly stanoveny při 6 % w/w substrátu, i když ze začátku hydrolýzy nebyl substrát řádně promícháván z důvodu velmi husté suspenze papíru. Proto byla prováděna hydrolýza i se 4 % w/w substrátu, bylo testováno, zda příliš hustá suspenze nebránila dostupnosti celulóze enzymům, ale neprojevila se jako výhodnější. Koncentrace glukózy byla stanovena jako nejvyšší v případě výkresu předupraveného mikrovlnného záření s H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a NaOH. Dosaženo bylo koncentrace glukózy necelých 33 g·dm<sup>-3</sup>. U každého papíru předupraveného čtyřmi způsoby byly vybrány dvě s nejvyšší koncentrací glukózy získané při hydrolýze a použity při SSF. Vybrány byly:

- lepenka + mletí
- lepenka + mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH
- výkres + mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- výkres + mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH
- kancelářský papír + mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- kancelářský papír + mikrovlny + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + NaOH

SSF s těmito papíry bylo prováděno se dvěma množstvím inokula, přičemž médium bylo dožíváno [64]. Jako lepší se projevilo větší množství biomasy při zaočkování, bylo při nich dosaženo vyšší koncentrace ethanolu. Stejně jako u hydrolýzy byl jako nejlepší, z hlediska

zisku koncentrace ethanolu, vyhodnocen výkres + mikrovlny +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + NaOH, kdy bylo dosaženo koncentrace asi  $16 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . U lepenky v obou typech předúprav bylo dosaženo ze všech použitých substrátů nejnižší koncentrace ethanolu, maximálně necelých  $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . U kancelářského papíru bylo dosaženo kolem  $13 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a to při mikrovlnné úpravě s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a NaOH.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] TALEBNIA, Farid a Mohammad J. TAHERZADEH. Utilization of carbohydrates content of paper tube residuals for ethanol production. *Carbohydrate Polymers*. roč. 87, č. 3, s. 2149-2153. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.10.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711009441>
- [2] SZCZODRAK, Janusz a Jan FIEDUREK. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. 1996, č. 10, 367 - 375. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096195349500114X>
- [3] NIGAM, Poonam Singh a Anoop SINGH. Production of liquid biofuels from renewable resources. *Progress in Energy and Combustion Science*. roč. 37, č. 1, s. 52-68. ISSN 03601285. DOI: 10.1016/j.pecs.2010.01.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128510000353>
- [4] HAMELINCK, Carlo N, Geertje van HOOIJDONK a André PC FAAIJ. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. roč. 28, č. 4, s. 384-410. ISSN 09619534. DOI: 10.1016/j.biombioe.2004.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953404001801>
- [5] HROMÁDKO, Jan, Jiří HROMÁDKO, Vladimír HÖNIG a Pavel ŠTĚRBA. Výroba bioethanolu. 267 - 270. Dostupné z: [http://www.cukr-listy.cz/on\\_line/2010/PDF/267-271.PDF](http://www.cukr-listy.cz/on_line/2010/PDF/267-271.PDF)
- [6] REBROŠ, Martin, Michal ROSENBERG, Ludmila KRIŠTOFÍKOVÁ a Radek STLOUKAL. Mikrobiálna produkcia palivového ethanolu: Bakterie alebo kvasinky?. *Chemické listy*. 2005, 402 - 409. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_06\\_402-409.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_06_402-409.pdf)
- [7] ŠULÁK, Martin a Daniela ŠMOGROVIČOVÁ. Bioethanol: Súčasný trendy vo výskume a v praxi. *Chemické listy*. 2008, 108 - 115. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_02\\_108-115.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_02_108-115.pdf)
- [8] 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. 2013-04-29], 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)
- [9] Biopaliva. In: *Nazeleno.cz* [online]. 2008 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.nazeleno.cz/biopaliva.dic>
- [10] Biomasa. In: *Biopaliva.cz* [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.biopalivo.cz/biomasa.php>
- [11] *Nové universum: všeobecná encyklopedie A-Ž*. 1. vyd. V Praze: Knižní klub, 2003, 1303 s. ISBN 80-242-1069-X.



- [12] Structure of lignocellulose. Nature.com [online]. Nature Education, 2013 [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.nature.com/scitable/content/structure-of-lignocellulose-14464273>
- [13] KODÍČEK, Milan. Biochemické pojmy: výkladový slovník : elektronická interaktivní verze [online]. Verze 2.0, 2007. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007 [cit. 2013-04-29]. ISBN 978-80-7080-669-2.
- [14] LEE, Jeewon. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: Review article. *Journal of Biotechnology*. 1997, č. 56, s. 1-24. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165697000734>
- [15] OLSSON, Lisbeth a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. roč. 18, č. 5, s. 312-331. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00157-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995001573>
- [16] BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. roč. 52, č. 2, s. 858-875. ISSN 01968904. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410003791>
- [17] Struktura lignocelulózy. In: [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: [http://www.mpg.de/6699705/Schueth\\_Abb\\_I\\_neu\\_jpg.jpg](http://www.mpg.de/6699705/Schueth_Abb_I_neu_jpg.jpg)
- [18] HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. roč. 100, č. 1, s. 10-18. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>
- [19] VON SIVERS, Margareta a Guido ZACCHI. Ethanol from lignocellulosics: A review of the economy. *Bioresource Technology*. roč. 56, 2-3, s. 131-140. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/0960-8524(96)00018-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0960852496000181>
- [20] Struktura celulózy. In: [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://leccos.com/index.php/clanky/celulosa>
- [21] Struktura hemicelulózy. In: [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://wdict.net/word/hemicellulose/>
- [22] VANHOLME, R., B. DEMEDTS, K. MORREEL, J. RALPH a W. BOERJAN. Lignin Biosynthesis and Structure. *PLANT PHYSIOLOGY*. roč. 153, č. 3, s. 895-905. ISSN 0032-0889. DOI: 10.1104/pp.110.155119. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.110.155119>
- [23] Struktura ligninu. In: [online]. [cit. 2013-04-29]. Dostupné z: <http://www.lignoworks.ca/content/what-lignin>

- [24] KUMAR, Parveen, Diane M. BARRETT, Michael J. DELWICHE a Pieter STROEVE. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial*. roč. 48, č. 8, s. 3713-3729. ISSN 0888-5885. DOI: 10.1021/ie801542g. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801542g>
- [25] MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. roč. 96, č. 6, s. 673-686. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2004.06.025. Dostupné z: [http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524\(04\)00253-6](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960-8524(04)00253-6)
- [26] Y.S. MTUI, Godliving. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products: review. *Academic Journals*. 2009, 1398 - 1415. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- [27] ALVIRA, P., E. TOMÁS-PEJÓ, M. BALLESTEROS a M.J. NEGRO. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. roč. 101, č. 13, s. 4851-4861. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409015983>
- [28] SÁNCHEZ, Óscar J. a Carlos A. CARDONA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. roč. 99, č. 13, s. 5270-5295. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407009376>
- [29] TAHERZADEH, Mohammad J. a Keikhosro KARIMI. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. roč. 9, č. 9, s. 1621-1651. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms9091621. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/>
- [30] HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. roč. 100, č. 1, s. 10-18. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>
- [31] WYMAN, Charles E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresource Technology*. roč. 50, č. 1, s. 3-15. ISSN 09608524. DOI: 10.1016/0960-8524(94)90214-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0960852494902143>
- [32] VANE, Leland M. A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. *Journal of Chemical Technology*. roč. 80, č. 6, s. 603-629. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1002/jctb.1265. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1265>
- [33] GALBE, M. a G. ZACCHI. A review of the production of ethanol from softwood. *Academic Journal*. 2002, roč. 59, č. 6.

- [34] GUSAKOV, Alexander V., Arkady P. SINITSYN, Alejandro G. BERLIN, Alexander V. MARKOV a Natalie V. ANKUDIMOVA. Surface hydrophobic amino acid residues in cellulase molecules as a structural factor responsible for their high denim-washing performance. *Enzyme and Microbial Technology*. roč. 27, č. 9, s. 664-671. ISSN 01410229. DOI: 10.1016/S0141-0229(00)00264-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022900002647>
- [35] LYND, L. R., P. J. WEIMER, W. H. VAN ZYL a I. S. PRETORIUS. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2002, roč. 66, č. 4, s. 739-739 [cit. 2013-04-29]. ISSN 1092-2172. DOI: 10.1128/MMBR.66.4.739.2002. Dostupné z: <http://mmbr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.66.4.739.2002>
- [36] TEERI, Tuula T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* [online]. 1997, roč. 15, č. 5, 160–167 [cit. 2013-04-29]. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01032-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779997010329>
- [37] DUFF, Sheldon J.B. a William D. MURRAY. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource technology: biomass, bioenergy, biowastes, conversion technologies, biotransformations, production technologies* [online]. 1996, roč. 55, č. 1, s. 1-33 [cit. 2013-04-29]. ISSN 0960-8524. DOI: 10.1016/0960-8524(95)00122-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0960852495001220>
- [38] TOLAN, Jeffrey S. a Brian FOODY. Cellulase from Submerged Fermentation. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics [online]. Berlin [u.a.]: Springer, 1999, č. 65, s. 41-67 [cit. 2013-04-29]. ISSN 978-3-540-65577-0. DOI: 10.1007/3-540-49194-5\_3. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/3-540-49194-5\\_3](http://www.springerlink.com/index/10.1007/3-540-49194-5_3)
- [39] LIN, Yan a Shuzo TANAKA. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2006, roč. 69, č. 6, s. 627-642 [cit. 2013-04-29]. ISSN 0175-7598. DOI: 10.1007/s00253-005-0229-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0229-x>
- [40] HAHN-HÄGERDAL, B., M. GALBE, M.F. GORWA-GRAUSLUND, G. LINDÉN a G. ZACCHI. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology* [online]. 2006, roč. 24, č. 12, s. 549-556 [cit. 2013-04-29]. ISSN 01677799. DOI: 10.1016/j.tibtech.2006.10.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016777990600254X>
- [41] Making paper. *European Paper & Packaging Industries* [online]. 2013 [cit. 2013-04-30]. Dostupné z: <http://www.paperonline.org/>
- [42] ŠIMKO, P.: Balení potravin - přednášky . [online]. VUT Brno, 2011. [cit. 2013-04-30]. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/>>.
- [43] HRÁZSKÝ, Jaroslav a Pavel KRÁL. Výroba vláknin a papíru. Vyd. 1. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999, 216 s. ISBN 80-715-7355-8.

- [44] KOCMAN, Jiří H. Médium papír. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2000, 87 s. ISBN 80-214-1551-7.
- [45] RYCHTERA, Mojmir a Jan PÁČA. Bioinženýrství kvasných procesů. Praha: SNTL, 1985.
- [46] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [47] KAŠTÁNEK, František. Bioinženýrství. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [48] CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. FEMS Microbiology Letters [online]. 1992, roč. 103, č. 1, s. 1-27 [cit. 2013-04-30]. ISSN 03781097. DOI: 10.1016/0378-1097(92)90334-K. Dostupné z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(92\)90334-K](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(92)90334-K)
- [49] Entner-Doudoroff Pathway. In: Intermediary metabolism [online]. 2001 [cit. 2013-04-30]. Dostupné z: <http://www.udel.edu/chem/white/C643/Entner-Doudoroff-Pathway.gif>
- [50] SOMMER, Lumír. Základy analytické chemie. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000, 199 s. ISBN 80-214-1300-X
- [51] Turbidity. In: ExpertGlossary [online]. 2009 [cit. 2013-04-30]. Dostupné z: <http://www.expertglossary.com/water/definition/turbid>
- [52] Bacterial Growth Curve. In: Virtual Armita Laboratories Universalizing Education [online]. 2013 [cit. 2013-04-30]. Dostupné z: <http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=73&sim=1105&cnt=1>
- [53] Dráha paprsku primárního záření v turbidimetrii. In: Datový standard MZ ČR [online]. 2006 [cit. 2013-05-01]. Dostupné z: [http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD\\_DS4/hypertext/JVABU\\_soubory/image002.jpg](http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVABU_soubory/image002.jpg)
- [54] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Instrumentální a strukturní analýza. 2011. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/course/view.php?id=121802>
- [55] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. Klinick. biochemie a metabolismus [online]. 2006, roč. 14, no. 3 [cit. 2013-03-05], s. 146-151. Dostupný z WWW: <<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>>.
- [56] ODVOZENÍ LAMBERTOVA - BEEROVA ZÁKONA. In: KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie [online]. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005 [cit. 2013-05-01]. ISBN 80-7080-586-2. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-586-2/pdf/049.pdf](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pdf/049.pdf)
- [57] Bacterial enumeration. In: Western Washington University [online]. 2013 [cit. 2013-05-01]. Dostupné z: [http://fire.biol.wvu.edu/brodham/biol346\\_S07/labman\\_week4.pdf](http://fire.biol.wvu.edu/brodham/biol346_S07/labman_week4.pdf)
- [58] DOELLE, H. Microbial process development [online]. River Edge, NJ: World Scientific, c1994 [cit. 2013-05-01]. ISBN 98-102-1515-0.

- [59] PRÍBELA, Alexander. Analýza potravín: Cvičenie. 2. vyd. Bratislava: STU, 1993, 394 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [60] Novozymes®. Novozymes® biomass kit: Application Sheet. Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials.
- [61] KESHWANI, Deepak R. a Jay J. CHENG. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnology Progress* [online]. 2010, vol. 26, issue 3, s. 644-652 [cit. 2013-05-01]. ISSN 87567938. DOI: 10.1002/btpr.371. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.371>
- [62] Vlastnosti papíru a jeho degradace – teoretická část. In: VŠCHT [online]. 2009 [cit. 2013-05-01]. Dostupné z: [http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res\\_vlastnosti\\_papiru/teorie.htm](http://www.vscht.cz/met/stranky/vyuka/labcv/labor/res_vlastnosti_papiru/teorie.htm)
- [63] Kreslíci karton. PapírNovotný [online]. 2012 [cit. 2013-05-01]. Dostupné z: <http://www.papirnovotny.cz/vyhledavani/?query=kresl%C3%ADc%C3%AD+karton&search=Ok%21>
- [64] LUKAČKOVÁ, Adéla. Studium růstu a optimalizace produkce vybraných metabolitů *Zymomonas mobilis*. Brno, 2012. Diplomová práce. VUT.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ETBE .....	ethyl-tercio-butyl-ether
MTBE .....	methyl-tercio-butyl-ether
AFEX .....	amoniakální exploze
LHW .....	předúprava horkou vodou
SSF .....	simultánní sacharifikace a fermentace
SHF .....	separovaná hydrolýza a fermentace
DCM .....	přímá mikrobiální konverze
OD .....	optická hustota
EMP .....	Embden-Meyerhof-Parnas
ED .....	Entner-Doudoroff
HPLC .....	vysokoučinná kapalinová chromatografie
PTFE .....	polytetrafluorethylen
UV/VIS .....	ultrafialové a viditelné spektrum
RID .....	refraktometrický detektor
ATP .....	adenosintrifosfát
NAD, NADH, NAD <sup>+</sup> .....	nikotinamid adenin dinukleotid
D izomer .....	pravotočivý izomer

## SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN

$\mu$ .....	měrná růstová rychlost	$[\text{h}^{-1}]$
$X$ .....	koncentrace biomasy	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$t$ .....	čas	$[\text{h}]$
$r_X$ .....	rychlost růstu mikroorganismů	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$r_P$ .....	rychlost tvorby produktu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$r_S$ .....	rychlost tvorby substrátu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$r_C$ .....	rychlost produkce oxidu uhličitého	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$r_{cL}$ .....	rychlost spotřeby kyslíku v kapalině	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$r_{\Delta H}$ .....	rychlost produkce tepla	$[\text{J} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}]$
$P$ .....	koncentrace produktu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$S$ .....	koncentrace substrátu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$C$ .....	koncentrace oxidu uhličitého	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$c_L$ .....	koncentrace kyslíku rozpuštěného v kapalině	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$\Delta H$ .....	teplo vzniklé při fermentaci	$[\text{J} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$\tau$ .....	turbiditní koeficient	$[-]$
$\pi_P$ .....	měrná rychlost syntézy produktu	$[\text{h}^{-1}]$
$\sigma_S$ .....	měrná rychlost spotřeby substrátu	$[\text{h}^{-1}]$
$\pi_C$ .....	měrná rychlost produkce oxidu uhličitého	$[\text{h}^{-1}]$
$\sigma_{cL}$ .....	měrná rychlost spotřeby kyslíku	$[\text{h}^{-1}]$
$\pi_{\Delta H}$ .....	měrná rychlost produkce tepla	$[\text{h}^{-1}]$
$I_0$ .....	intenzita vstupujícího záření	$[-]$
$I$ .....	intenzita vystupujícího záření	$[-]$
$l$ .....	optická dráha kyvety	$[\text{cm}]$
$k$ .....	retenční faktor	$[-]$
$t_R$ .....	retenční čas	$[\text{min}]$
$t_M$ .....	mrtvý retenční čas	$[\text{min}]$

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Struktura lignocelulózy [17] .....	12
<b>Obrázek 2:</b> Struktura celulózy [20].....	12
<b>Obrázek 3:</b> Struktura hemicelulózy [21].....	13
<b>Obrázek 4:</b> Struktura ligninu [23].....	13
<b>Obrázek 5:</b> Vliv předúpravy na lignocelulóзовý materiál [24] .....	14
<b>Obrázek 6:</b> Mechanismus enzymatické hydrolýzy celulózy [31].....	21
<b>Obrázek 7:</b> Schéma využití lignocelulóзовých odpadů [26] .....	22
<b>Obrázek 8:</b> Schematické znázornění konverze biomasy na ethanol za použití SSF [40] .....	23
<b>Obrázek 9:</b> Růstová křivka [45].....	26
<b>Obrázek 10:</b> Entnerova-Doudoroffova dráha [48, 49].....	29
<b>Obrázek 11:</b> Dráha paprsku primárního záření [53] .....	30
<b>Obrázek 12:</b> Schematické znázornění HPLC přístroje .....	32
<b>Obrázek 13:</b> Aktivita NS22086 při různých teplotách a hodnotách pH [60].....	33



## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Shrnutí výhod a nevýhod jednotlivých způsobů předúpravy [24].....	18
<b>Tabulka 2:</b> Srovnání kyselé a enzymatické hydrolýzy [16, 31].....	20
<b>Tabulka 3:</b> Eluotropní řada (systém s normálními fázemi) [54].....	31
<b>Tabulka 4:</b> Klasifikace a vlastnosti celulózy NS22086 [60].....	33
<b>Tabulka 5:</b> Klasifikace a vlastnosti $\beta$ -glukosidázy NS22118 [60] .....	34
<b>Tabulka 6:</b> Navážky jednotlivých složek média na 1000 ml destilované vody.....	36
<b>Tabulka 7:</b> Hodnoty x odpovídají 2 M roztoku $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a y 1 M roztoku $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ udávané v ml na 100 ml roztoku.....	37
<b>Tabulka 8:</b> Příprava kalibrační řady jednotlivých složek .....	37
<b>Tabulka 9:</b> Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace při různých teplotách.....	43
<b>Tabulka 10:</b> Odhady časových intervalů hlavních fází růstu.....	45
<b>Tabulka 11:</b> Plošná hmotnost papíru jednotlivých typů substrátů.....	45
<b>Tabulka 12:</b> Závislost sušiny na typu substrátu a způsobu předúpravy.....	46
<b>Tabulka 13:</b> Závislost množství popelu na typu substrátu a způsobu předúpravy .....	47
<b>Tabulka 14:</b> Závislost obsahu celulózy na typu substrátu a způsobu předúpravy .....	48
<b>Tabulka 15:</b> Kalibrační křivka - glukóza .....	49
<b>Tabulka 16:</b> Kalibrační křivka - ethanol.....	49
<b>Tabulka 17:</b> Průběh tvorby glukózy při hydrolýze 4 % w/v substrátu .....	51
<b>Tabulka 18:</b> Průběh tvorby glukózy při hydrolýze 6 % w/v substrátu .....	52
<b>Tabulka 19:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na lepence (sada 1).....	63
<b>Tabulka 20:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na lepence (sada 2).....	64
<b>Tabulka 21:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na výkresu (sada 1) .....	68
<b>Tabulka 22:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na výkresu (sada 2) .....	69
<b>Tabulka 23:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na kancelářském papíru (sada 1).....	73
<b>Tabulka 24:</b> Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu při metodě SSF prováděné na kancelářském papíru (sada 2).....	74

## SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace při různých teplotách.....	44
<b>Graf 2:</b> Kalibrační křivka - koncentrace sušiny biomasy .....	44
<b>Graf 3:</b> Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase během kultivace při různých teplotách.....	45
<b>Graf 4:</b> Závislost množství popelu na typu substrátu a způsobu předúpravy.....	47
<b>Graf 5:</b> Závislost obsahu celulózy na typu substrátu a způsobu předúpravy .....	48
<b>Graf 6:</b> Kalibrační křivka - glukóza .....	50
<b>Graf 7:</b> Kalibrační křivka - ethanol .....	50
<b>Graf 8:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v lepenky .....	53
<b>Graf 9:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v výkresu .....	53
<b>Graf 10:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v kancelářského papíru.....	54
<b>Graf 11:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v lepenky .....	55
<b>Graf 12:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v výkresu .....	55
<b>Graf 13:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v kancelářského papíru.....	56
<b>Graf 14:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mletí.....	56
<b>Graf 15:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s NaOH .....	57
<b>Graf 16:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	58
<b>Graf 17:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 4 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH.....	58
<b>Graf 18:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mletí.....	59
<b>Graf 19:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s NaOH .....	60
<b>Graf 20:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	60
<b>Graf 21:</b> Koncentrace vznikající glukózy při hydrolýze 6 % w/v všech typů papírů pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH.....	61
<b>Graf 22:</b> Srovnání koncentrace glukózy vzniklé hydrolýzou u všech typů papíru a všech předúprav při použití 4% w/v a 6% w/v suspenze substrátu .....	62
<b>Graf 23:</b> Vyhodnocení metody SSF pro lepenku předupravenou mletím (sada 1).....	65
<b>Graf 24:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH lepenky (sada 1).....	66
<b>Graf 25:</b> Vyhodnocení metody SSF pro lepenku předupravenou mletím (sada 2).....	66
<b>Graf 26:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH lepenky (sada 2).....	67
<b>Graf 27:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> výkresu (sada 1).....	70
<b>Graf 28:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> a NaOH výkresu (sada 1).....	70
<b>Graf 29:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> výkresu (sada 2).....	71

<b>Graf 30:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s $H_2SO_4$ a NaOH výkresu (sada 2).....	72
<b>Graf 31:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s $H_2SO_4$ kancelářského papíru (sada 1) .....	75
<b>Graf 32:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s $H_2SO_4$ a NaOH kancelářského papíru (sada 1) .....	75
<b>Graf 33:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s $H_2SO_4$ kancelářského papíru (sada 2) .....	76
<b>Graf 34:</b> Vyhodnocení metody SSF pro mikrovlnnou předúpravu s $H_2SO_4$ a NaOH kancelářského papíru (sada 2) .....	77
<b>Graf 35:</b> Srovnání konečné koncentrace ethanolu vzniklého během SSF .....	77