

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

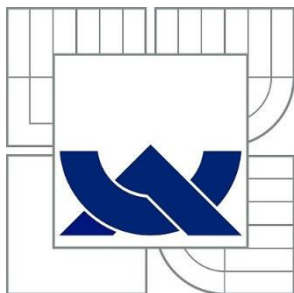
VYUŽITÍ KLUYVEROMYCES MARXIANUS K PRODUKCI
BIOETHANOLU Z ODPADNÍHO PAPIRU

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ANDREA TOMEČKOVÁ

BRNO 2014



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

VYUŽITÍ KLUYVEROMYCES MARXIANUS K PRODUKCI BIOETHANOLU Z ODPADNÍHO PAPÍRU

USE OF KLUYVEROMYCES MARXIANUS TO BIOETHANOL PRODUCE FROM WASTE PAPER

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. ANDREA TOMEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na možnosti produkce bioethanolu z odpadního papíru za použití kvasinky *Kluyveromyces marxianus*. Jako zdroj odpadního papíru byla využita lepenka upravená různými způsoby pro zvýšení účinnosti konverze celulózy obsažené v lepence na etanol při následných metodách fermentace. Byla provedena optimalizace srovnání dvou metod fermentace, kterými byly simultánní sacharifikace a fermentace (SSF) a separovaná hydrolýza a fermentace (SHF) Bylo optimalizované zejména pH fermentací jejichž hodnoty byly v rozmezí pH 4,8-7. Simultánní sacharifikace a fermentace probíhala při 45°C. U separované hydrolýzy a fermentace byla hydrolýza provedena při 50°C a samotná fermentace při 25°C.

Vyhodnocení produkce etanolu a spotřeby glukózy bylo stanoveno pomocí metody HPLC.

Z výsledků analýz vyplývá, že nejvyšší koncentrace glukózy u hydrolýzy bylo dosaženo u lepenky předupravené mikrovlnami a 2% H₂SO₄ a 2% NaOH při pH 4,8. Nejvyšší produkce etanolu byla u metody SHF lepenky předupravené mikrovlnami, 2% H₂SO₄ a 2% NaOH při pH 5,4. Metoda SHF byla více efektivní pro produkci etanolu než metoda SSF.

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on production possibilities of bioethanol from waste paper by yeast *Kluyveromyces marxianus*. Waste cardboard was used as a potential substrate for bioethanol production. Several methods for cardboard preparation were introduced and compared as well as methods of fermentation.

Simultaneous sacharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation of preprepared cardboard paper were performed in different pH buffer (4,8-7). Simultaneous sacharification and fermentation was held at a temperature of 45°C. Hydrolysis in separate hydrolysis and fermentation was performed at 50°C and fermentation at 25°C.

Procedures outputs were obtained by sampling in specific time intervals and samples were analyzed by HPLC for presence and concentration glucose and ethanol.

The results of the analysis have shown that the highest concentration of glucose produced by enzymatic hydrolysis was achieved by using microwaves, 2% H₂SO₄ and 2% NaOH pretreated paperboard at pH 4,8. The highest yield of ethanol was obtained by separate hydrolysis and fermentation of pulp pretreated by microwaves, 2% H₂SO₄ and 2% NaOH in pH 5,4 buffer. The method SHF proved to be more effective for the production of ethanol than SSF.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioethanol, *Kluyveromyces marxianus*, lignocelulózový materiál, celulázy, hydrolýza, simultánní sacharifikace a fermentace, separovaná hydrolýza a fermentace.

KEYWORDS

Bioethanol, *Kluyveromyces marxianus*, lignocellulosic material, cellulase, hydrolysis, simultaneous saccharification and fermentation, separate hydrolysis and fermentation.

TOMEČKOVÁ, A. *Využití Kluyveromyces marxianus k produkci bioethanolu z odpadního papíru*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 90 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 diplomové práce, stejně tak jako své konzultantce Ing. Petře Šupinové za pomoc s experimentální částí a užitečné rady při sepisování samotné práce. Dále bych chtěla poděkovat také své rodině a přátelům, kteří mě k uskutečnění této práce nedílnou součástí pomohli.

OBSAH

ÚVOD	7
1. TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1 VYMEZENÍ ZÁKLADNÍCH POJMŮ	8
1.1.1 Biopalivo	8
1.1.2 Biomasa	8
1.1.3 Lignocelulózová biomasa	8
1.1.4 Hydrolýza	8
1.1.5 Enzymy	8
1.1.6 Fermentace	9
1.1.7 Bioethanol	9
1.2 LIGNOCELULÓZOVÁ BIOMASA	9
1.2.1 Zdroje lignocelulózové biomasy	9
1.2.2 Chemické složení lignocelulózových materiálů	10
1.2.3 Předúprava lignocelulózového materiálu	13
1.2.4 Hydrolýza lignocelulózového materiálu	18
1.2.5 Enzymatická hydrolýza	19
1.3 KONVERZE LIGNOCELULÓZOVÉ BIOMASY NA ETANOL	22
1.3.1 Etanolové kvašení	22
1.3.2 Organismy schopné etanolového kvašení	23
1.3.3 Kvasinka – <i>Kluyveromyces marxianus</i> (<i>Candida kefir</i>)	23
1.3.4 Kultivace a fermentace	24
1.4 ETANOLOVÁ PURIFIKACE A PRODUKTOVÁ SEPARACE	27
1.5 ETANOL	28
1.5.1 Syntetická výroba etanolu	29
1.5.2 Výroba bioetanolu	29
1.5.3 Použití bioetanolu jako paliva	31
1.6 ANALYTICKÉ METODY	33
1.6.1 Stanovení pH roztoků	33
1.6.2 Stanovení sušiny a biomasy	33
1.6.3 Turbidimetrie	33
1.6.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)	34
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
2.1 POUŽITÝ MATERIÁL, CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	37
2.1.1 Kultura	37
2.1.2 Chemikálie pro inokulum, hydrolýzu a fermentaci	37
2.1.3 Další chemikálie použité při analýzách	37
2.1.4 Enzymy pro přípravu lignocelulózového materiálu	38
2.1.5 Přístroje	38
2.1.6 Programy použité k vyhodnocení	40

2.2	PŘÍPRAVA POUŽITÝCH ROZTOKŮ.....	40
2.2.1	Kultivační médium.....	40
2.2.2	Roztoky pro stanovení celulózy.....	40
2.2.3	Roztoky pro přípravu substrátu.....	41
2.2.4	Pufr.....	41
2.2.5	Složení mobilní fáze pro HPLC.....	42
2.2.6	Roztoky pro kalibrační křivky.....	43
2.2.7	Stanovení počtu buněk počítáním Bürkerovy komůrky.....	43
2.2.8	Stanovení počtu buněk z růstové křivky.....	43
2.3	PŘEDÚPRAVA PAPIRU NA SUBSTRÁT.....	43
2.3.1	Mechanická úprava.....	43
2.3.2	Chemická úprava.....	43
2.3.3	Enzymatická hydrolýza.....	44
2.4	KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ ZHODNOCENÍ SUBSTRÁTU.....	45
2.4.1	Stanovení sušiny u předupraveného papíru.....	45
2.4.2	Stanovení popelu.....	45
2.4.3	Stanovení celulózy.....	46
2.5	SIMULTÁNNÍ SACHARIFIKACE A FERMENTACE – SSF.....	46
2.6	SEPAROVANÁ ENZYMATICKÁ HYDROLÝZA A FERMENTACE – SHF.....	47
2.7	STANOVENÍ CUKRU A ETANOLU POMOCÍ METODY HPLC.....	47
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	49
3.1	STANOVENÍ VLASTNOSTÍ SUBSTRÁTU.....	49
3.1.1	Stanovení sušiny u předupraveného papíru.....	49
3.1.2	Stanovení popelu u předupraveného papíru.....	50
3.1.3	Stanovení celulózy u předupraveného papíru.....	51
3.2	STANOVENÍ RŮSTOVÉ KŘIVKY.....	52
3.2.1	Odhad intervalu fází růstu.....	56
3.3	HPLC VYHODNOCENÍ.....	57
3.3.1	Kalibrační křivky pro HPLC vyhodnocení.....	58
3.3.2	Enzymatická hydrolýza.....	59
3.3.3	Simultánní sacharifikace a fermentace.....	67
3.3.4	Separovaná hydrolýza a fermentace.....	73
3.3.5	Srovnání fermentačních metod SSF a SHF.....	79
4	ZÁVĚR.....	81
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	83
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	86
8	SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN.....	87
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	88
10	SEZNAM TABULEK.....	90

ÚVOD

Fosilní paliva, kterými jsou benzín, nafta a zemní plyn, nejsou dlouhodobě udržitelné zdroje energie. Jejich zásoby se rok od roku ztenčují a jejich cena drasticky roste. Při využívání fosilních paliv dochází k uvolňování skleníkových plynů, jako jsou CO_2 , CH_4 a N_2O , a způsobují tím globální oteplování. Z těchto důvodů je kladen velký důraz na vývoj biopaliv, která budou pocházet z obnovitelných zdrojů, a jejich spalováním nebude docházet k uvolňování takového množství skleníkových plynů. Na rozdíl od fosilních paliv biopaliva v celkovém důsledku neporušují rovnováhu oxidu uhličitého v přírodě. Biopaliva jsou totiž vyrobena z biomasy, která CO_2 zutilizovala z atmosféry jako zdroje uhlíku pro výstavbu buněčné biomasy. [1] [2]

Celosvětově nevyužívanějším biopalivem je v současné době bioetanol. Protože právě bioetanol se jeví jako jeden z nejvhodnějších možných obnovitelných paliv hlavně z hlediska jednoduchosti jeho produkce, obnovitelnosti a velkou výtěžností. [3]

Bioetanol se může řadit mezi paliva první nebo druhé generace, kde první generace je produkována z biomasy, u něž je konkurenční užití ve výrobě potravin nebo krmiv a druhá generace, která pochází z nepotravinářské biomasy. Takovou biomasou jsou různé odpadní látky pocházející jak ze zemědělského, tak potravinářského průmyslu a jiné průmyslové výroby. [4]

Jako zajímavý substrát pro výrobu bioetanolu se v dnešní době jeví odpadní papír, protože obsahuje velké množství celulózy. Celulóza může být hydrolyzována na zkvasitelné cukry a ty lze použít pro výrobu bioetanolu. [1]

Tato práce byla zaměřena na optimalizaci produkce etanolu z odpadní lepenky pomocí metody simultánní sacharifikace a fermentace (SSF) a metody separované hydrolyzy a fermentace (SHF). Pro dosažení co nejefektivnější konverze celulózy obsažené v lepence na etanol byly použity různé způsoby předúpravy lepenky. Dále bylo provedeno stanovení optimálního pH kultivace kvasinky *Kluyveromyces Marxianus* u metody SSF i SHF.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Vymezení základních pojmů

1.1.1 Biopalivo

Jedná se o palivo vyrobené z obnovitelných zdrojů. Může být produkováno z biomasy pocházející z rostlin nebo organického odpadu. Biopaliva mohou být v kapalně, tuhé nebo plynné formě. Podle původu můžeme rozlišit biopaliva na dvě generace:

1. První generace biopaliv se vyrábí fermentováním pěstovaných plodin, jako je cukrová řepa, kukuřice a další.
2. Druhá generace biopaliv vzniká zkvašováním odpadních látek, například z odpadních materiálů vznikající při výrobě potravin nebo odpadního papíru. [4]

1.1.2 Biomasa

Termín biomasa popisuje jakýkoliv biologický materiál, jak živočišného tak rostlinného původu. Tento může být použit jako zdroj energie nebo jako zdroj v něm obsažených chemikálií. [6] [7] Můžeme rozlišit dva druhy biomasy podle původu, a to odpadní biomasu a pěstovanou biomasu. [2]

1.1.3 Lignocelulózová biomasa

Lignocelulózová biomasa je tvořena ze směsi polymerních struktur celulózy, hemicelulózy, ligninu a dalších organických sloučenin a anorganických solí. Celulóza je hlavní složkou ve většině lignocelulózové biomasy. Tato biomasa pochází ze dřeva a rychle rostoucích rostlin, jako je tráva nebo jiné plodiny. Lignocelulózou se také může rozumět již upravená lignocelulózová biomasa nebo odpadní produkt z výše uvedených surovin. [2] [6]

1.1.4 Hydrolýza

Hydrolýzou se rozumí chemický proces, jenž rozkládá nebo štěpí molekuly adicí vody. [7]

1.1.5 Enzymy

Enzymy jsou biopolymery bílkovinné povahy soužící jako biokatalyzátory. Účastní se většiny metabolických reakcí. Jsou substrátově specifické, protože katalyzují přeměnu jen určité skupiny substrátů. Enzymy, neovlivňují energetiku reakce, ale snižují aktivační potenciál reakce. Urychlují průběh reakcí oběma směry a v rovnovážných systémech neovlivňují výtěžek. [7] [8] [9]

1.1.6 Fermentace

Je to katabolický proces, ve kterém se tvoří z glukózy množství ATP za vzniku určitého produktu. Tímto produktem je většinou etanol nebo kyselina mléčná. [7] Rozlišujeme aerobní a anaerobní fermentaci. [4]

1.1.7 Bioethanol

Bioetanolem se označuje etanol vyrobený alkoholovým kvašením obnovitelné biomasy, které mohou být cukerné složky rostlin, jakými jsou např. cukrová třtina, kukuřice, pšenice, cukrové řepy, odpadu ze zemědělské výroby, obilné slámy, traviny a odpadu z dřevozpracujícího průmyslu. [2] [4]

1.2 Lignocelulózová biomasa

Lignocelulózová biomasa je tvořená z celulózy, hemicelulózy a ligninu. Je to levný a hojně se vyskytující zdroj fermentabilní biomasy. Je největší využitelný obnovitelný zdroj uhlíku. Nevýhodou lignocelulózové biomasy je její velká stálost a odolnost vůči chemické i mikrobiální degradaci.

1.2.1 Zdroje lignocelulózové biomasy

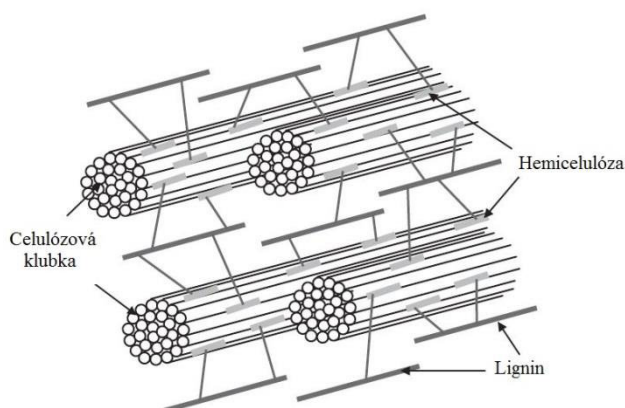
- Odpad ze zemědělské produkce - kukuřičná píce, pšeničné slámy, rýžové slámy, trávy, vojtěšky, řepky, čiroku, vylisované cukrové třtiny a řepy.
- Odpad z lesního průmyslu – odpad z těžby dřeva např. větve, kůra, listy, kořeny a piliny.
- Průmyslový odpad – sulfítové výluhy z papírové výroby, odpadní papír, noviny, a obalové materiály.
- Další - odpad z domácností a zahrad – tráva, listí, slupky. [10] [11] [12] [13]

Odpadní papír jako zdroj lignocelulózové biomasy

Lepenkový papír je běžný obalový materiál dostupný ve velkém množství po celém světě. Vyrábí se z odpadního papíru a tkanin. Gramáž lepenkového papíru se typicky pohybuje mezi 220 - 600 g.m². Lepenka typicky obsahuje více než 50 % celulózy. Struktura lepenky je vhodná pro produkci bioetanolu, jelikož je již odstraněno nebo sníženo množství látek zamezujících snadné dekrystalizaci celulózy. Často však bývá lepenkový papír potažen vrstvou LD-PE a to zamezuje jeho degradaci. [14] [15]

1.2.2 Chemické složení lignocelulózových materiálů

Sušina lignocelulózy se typicky skládá z 35–50 % celulózy, 20–35 % hemicelulózy a 10–25 % ligninu. [16] Lignocelulózová biomasa dále obsahuje další látky v závislosti na jejím původu, což jsou například pryskyřice, fenolové látky, minerály (Ca, Mg, K) a mnoho dalších. Jejich obsah je velmi závislý na plodině a místě pěstování plodiny. Tyto chemické látky mohou ovlivňovat další zpracování lignocelulózy zahrnující katalytickou konverzi. [6]



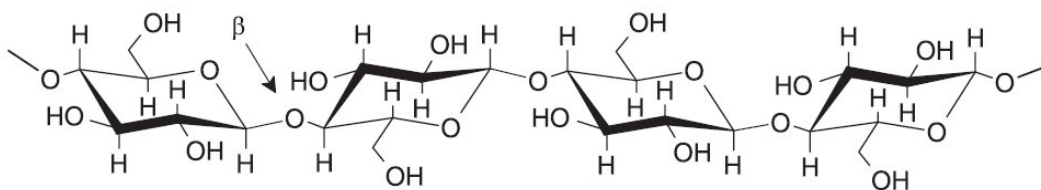
Obrázek č. 1: Zobecněné zastoupení komponent ve stěně rostlinné buňky [6]

Celulóza

Celulóza je nejčastěji se vyskytující polymer na Zemi a je také základní komponentou pro buněčné stěny vyšších rostlin a hlavní komponenta dřeva a bavlny. [2] [17] [18]

Na rozdíl od škrobu rozpustného ve vodě, jenž obsahuje α -D-glukózové jednotky, se celulóza jako vysokomolekulární polysacharid skládá z β -D-glukózových jednotek spojených 1 – 4 glykosidickou vazbou do dlouhých řetězců. Je vázána vodíkovými můstky do fibril. Její sumární vzorec je $(C_6H_{10}O_5)_n$, kde n je počet monomerních jednotek. Jedna molekula vzniká spojením asi 1400 až 10000 glukózových jednotek, přičemž jejich počet v řetězci stejně jako i molekulová hmotnost se liší podle druhu rostliny. Molekulová hmotnost celulózy kolísá od hodnot $2 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$ g.mol⁻¹. [17] [19]

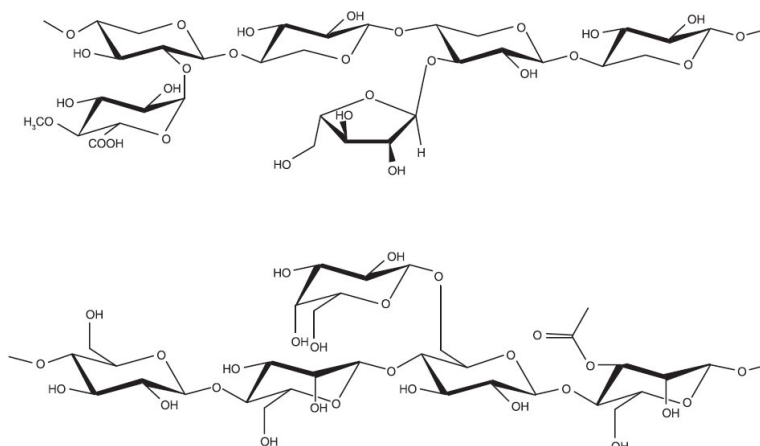
Díky své lineární polymerní struktuře se celulóza vyznačuje schopností tvořit krystaly, které negativně ovlivňují její rozpustnost hlavně ve vodných roztocích. Pro velké enzymy je, proto ještě složitější proniknout nebo difundovat do struktury celulózy a hydrolyzovat ji. V organických rozpouštědlech však celulóza částečně rozpustná je. [6]



Obrázek č. 2: Struktura celulózy se znázorněním štěpení celulózami [2]

Hemicelulóza

Hemicelulóza je vysoce rozvětvený polymer pětiuhlíkatých a šestiuhlíkatých cukrů (obvykle D-xylózy, L-arabinózy, D-galaktózy, D-glukózy a D-manózy). Hemicelulóza obsahuje také i uronové kyseliny. V travách a tvrdém dřevě dominují pentózy ve formě xylanů, zatímco u měkkého dřeva převládá hexózový glukomannan. [2] [6] Kvůli rozvětvenosti struktury není možná tvorba vodíkových můstků, a proto se nevytváří krystalické struktury. Toto dělá hemicelulózu více náchylnou k hydrolyze glykosidické vazby. Hemicelulóza je v roztoku snadně hydrolyzovatelná jako škrob. [2]



Obrázek č. 3: Hemicelulózové struktury: xylan a glukomannan [2]

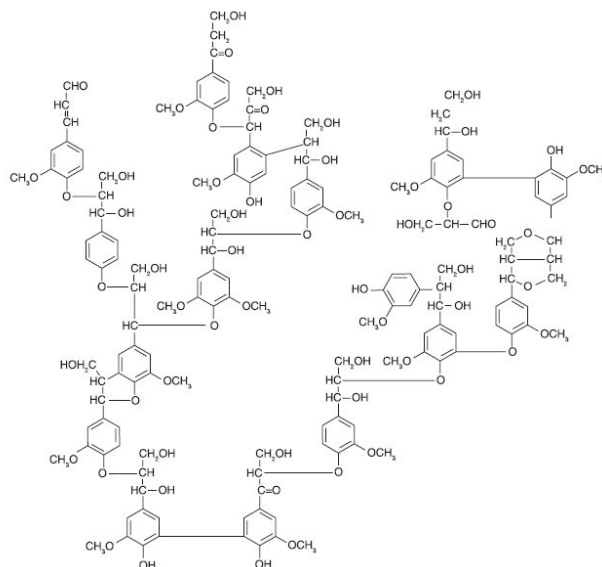
Lignin

Lignin je třetím nejrozšířenějším polymerem na zemi. Má komplexní polymerní strukturu aromatických jednotek (p-hydroxy-fenyl-propanoidových jednotek), které jsou zesíťovány různými chemickými vazbami. Tato struktura zajišťuje malou biochemickou degradabilitu, a proto lignin má adhezní funkci mezi vlákny celulózy. Množství ligninu se mění v závislosti na druhu lignocelulózového materiálu. [2] [20]

Fenylový kruh v monomerní struktuře ligninu na sebe může a nemusí mít navázány jednu, nebo dvě metoxy skupiny. V travách převažuje monomer bez metoxy skupiny, v tvrdém dřevě je směs všech tří monomerů a v měkkém dřevě převládá mono a dimetoxy monomer. [2]

Obsah ligninu v lignocelulóze velmi ovlivňuje degradovatelnost a stabilitu celulózy.

Hlavním cílem předúprav je právě odstranění této složky z lignocelulóзовé biomasy a umožnění dekrystalizace celulózy. [14]



Obrázek č. 4: Struktura ligninu [2]

Tabulka č. 1: Lignocelulotický materiál a jeho složení [10]

Lignocelulóзовý materiál	Celulóza	Hemicelulóza	Lignin
Tvrdé dřevo	40–55	24–40	18–25
Měkké dřevo	45–50	25–35	25–35
Ořechové skořápky	25–30	25–30	30–40
Kukuřičné klasy	45	35	15
Trávy	25–40	35–50	10–30
Papír	85–99	0	0–15
Pšeničná sláma	30	50	15
Tříděný odpad	60	20	20
Bavlníkové chlupy	80–95	5–20	0
Noviny	40–55	25–40	18–30
Odpadní papír z chemických vláknin	60–70	10–20	5–10
Pevná složka odpadní vody	8–15	0	24–29
Prasečí kal	6	0	28
Proso	45	31	12

Tabulka č. 2: Prvková analýza termodekompozicí papíru [21]

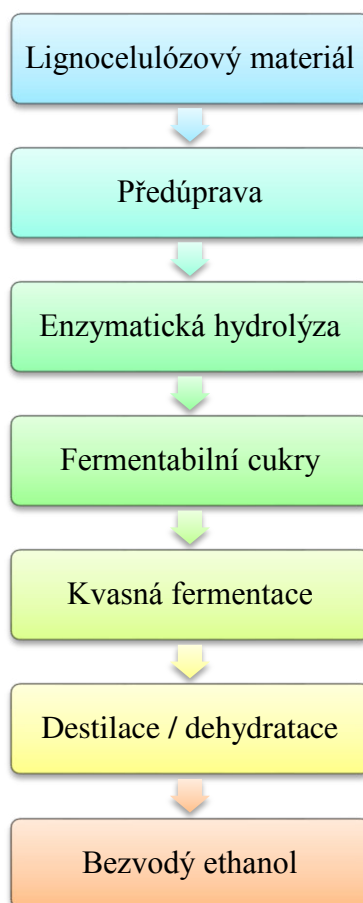
Prvek	Kancelářský papír (%)	Lepenka (%)
Síra	0,0015	0,0094
Uhlík	34,9	43,00
Vodík	4,40	5,40
Dusík	0,14	0,16
Kyslík	31,3	41,7

1.2.3 Předúprava lignocelulózového materiálu

Některé formy předúpravy jsou nezbytné pro dosažení dostatečných výnosů při enzymatické hydrolyze biomasy. Předúprava je obvykle používána pro redukci krystaliny celulózy a pro uvolnění průměrného stupně polymerizace celulózy a lignin-hemicelulózového pláště, který obklopuje celulózu. Redukcí krystaliny se zpřístupní dříve nedostupný povrch, a tím se zvýší jeho degradabilita. Většina metod pro předúpravu není určena, aby hydrolyzovala celulózu na solubilní cukry, ale spíše generovala předupravenou celulózu s vyšším podílem amorfnní složky, která je ochotněji hydrolyzována celulázovými enzymy než nativní biomasa. [1] [6]

Metody předúpravy lignocelulózových materiálů:

- Mechanická předúprava - pro zmenšení velikosti částic (mletí, sekání, obrušování)
- Předúprava sonifikací
- Předúprava zářením
- Předúprava explozí vodní parou (nekatalyzovaná, nebo s kyselou hydrolyzou)
- Předúprava amoniakální explozí (AFEX)
- Předúprava mikrovlnami spojená s alkalickou nebo kyselou hydrolyzou
- Předúprava organickými rozpouštědly
- Předúprava ionickým ztekucením [2] [6] [10] [15] [22] [23] [24]



Obrázek č. 5: Jednotlivé kroky procesu výroby etanolu z lignocelulotické biomasy [2]

Mechanická úprava

Známe několik postupů mechanické desintergrace, například kulové a válcové frézování, rotační nebo vibrační mletí a sekání. Běžná velikost částic po sekání je 10–30 mm a po mletí 0,2–2 mm. Tyto metody zvětšují aktivní povrch pro působnost enzymu, je však vyžadováno velké množství energie pro mechanickou úpravu. Výhodou je, že nevzniká zápach a metody jsou snadno implementovatelné. [6] [10] [22]

Ozáření

Předúprava radiálními metodami elektronovým paprskem nebo mikrovlnami zajišťují depolymerizaci chemických struktur v materiálu, a tím usnadňují jeho rozklad. Jsou používány pro separaci celulózy a hemicelulózy z ligninu. Elektronový paprsek má efekt na mastné a pryskyřičných kyseliny dřeva a mění tím fyzické vlastnosti pilin. Tyto metody se v běžné komerční produkci nevyžívají. [2]

Sonifikace

Předúprava sonifikací mechanicky rozrušuje biomasu. Hlavním efektem ultrazvukového působení je redukce velikosti částic, pro kterou se používají frekvence 20 – 40 kHz. Při použití větší frekvence dochází k formaci radikálů $\text{OH}\cdot$, $\text{HO}_2\cdot$, $\text{H}\cdot$. Vytváření těchto radikálů má za následek oxidaci pevné složky. [22]

Exploze vodní parou

U předúpravy explozí vodní parou se využívá působení vysokého tlaku nasycené páry o teplotě 200 C. [5] Následující rychlá redukce tlaku způsobuje u biomasy explozivní dekompresi. Tímto procesem se degradují hemicelulózy a dochází k částečné změně ve struktuře polymerního ligninu (autohydrolýza). Vznikají také organické kyseliny, které dále slouží jako katalyzátory a samotná celulóza se proto stane dostupnější pro následující enzymatickou hydrolýzu. [2] [1] [23]

Biomasou zde může být rozemletý lignocelulózový materiál, jako je například odpad z dřevařského průmyslu nebo sběrný papír. [2] Jednoduchá parní exploze se může doplnit přídavkem SO_2 nebo CO_2 . [1]

Amoniakální exploze (AFEX)

Amoniakální exploze je jednou z dalších metod pro úpravu biomasy. Lignocelulolytický materiál vystaví tekutému amoniaku při vysokých teplotách a tlaku po určitou dobu, a poté se tlak rychle sníží jako u exploze vodní parou. [10] Podmínky reakce záleží na povaze substrátu. Kukuřičná píce vyžaduje pouze mírné podmínky pro dosažení vysoké konverze cukrů, a to 1 g amoniaku na 1 g biomasy při teplotě 100 C po dobu 5 – 15 minut. Naproti tomu dřevní materiály potřebují přibližně 2 g amoniaku na 1 g biomasy a teplotu 200 °C po dobu 30 minut. [25]

Tato metoda může být použita pro mnoho různých materiálů, včetně kukuřičné píce, pšeničné slámy, měkkého dřeva, novin, trávy, vojtěšky atd. Na rozdíl od kyselé exploze předúprava významně nerozpouští hemicelulózy, ale umožňuje dosažení vysokého stupně hydrolýzy po užití této předúpravy. Nevýhodou metody je, že přehřátá pára amoniaku se musí recyklovat, aby nedošlo k poškození životního prostředí. [10]

Předúprava mikrovlnami spojená s alkalickou nebo kyselou hydrolýzou

Použití mikrovlnného rozkladu se jeví jako vhodný způsob předúpravy lignocelulózového materiálu. Tato metoda zapojuje tři rozhodující faktory pro zajištění snadnější dekrystalizace celulózy, a to teplo, mikrovlnné záření a kyselou i alkalickou hydrolýzu. Důsledkem působení

změny magnetického a elektrického pole dochází k rozvibrování molekul, což urychluje hydrolýzu lignocelulózového materiálu. Bylo prokázáno, že použitím mikrovln dojde k lepšímu rozkladu než při použití pouze tepelné úpravy. [22] [24] Nevýhodou této metody jsou vysoké energetické náklady na produkci mikrovlnného záření a práce s nezřetěnými kyselinami a zásadami. [24]

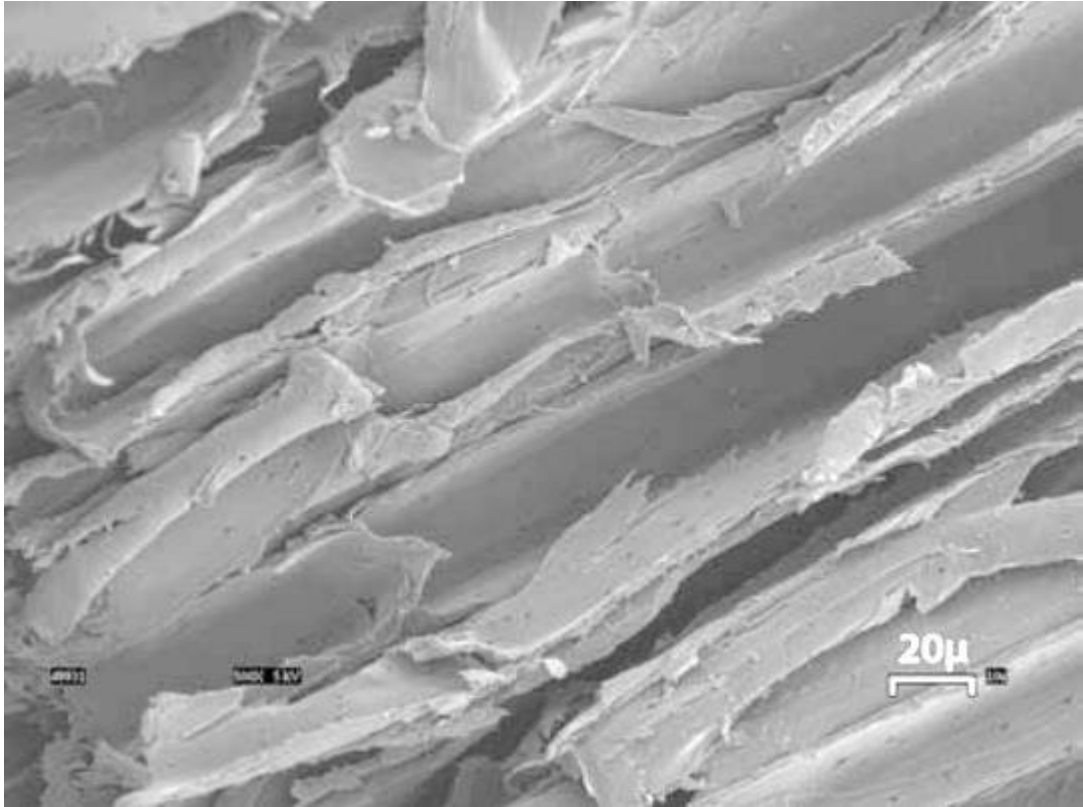
Předúprava organickými rozpouštědly

Organická rozpouštědla jsou v tomto případě využita pro rozpuštění a odstranění ligninu a hemicelulózy. Hlavní výhodou je odstranění a produkce vysoce kvalitního ligninu, vhodného pro další zpracování a možnost snadné recyklace rozpouštědla. Tímto způsobem je zamezeno znečištění vody.

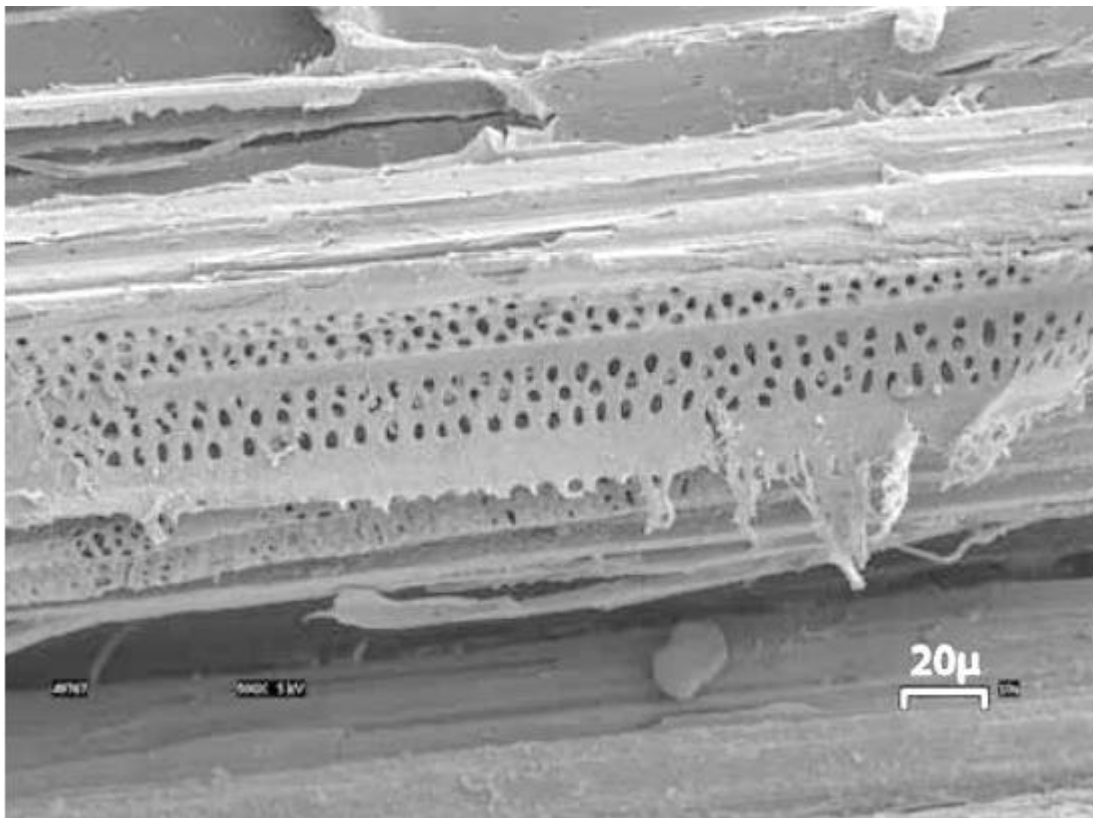
Tato organická rozpouštědla mohou být: etanol, butanol nebo metanol. Organické rozpouštědlo je většinou odděleno evaporací (destilací) a lignin je pak dále precipitován [6]

Předúprava ionickým ztekucením

Předúprava ionickým ztekucením je relativně nový způsob rozpuštění (používá se od roku 2002). Nezatěžuje životní prostředí a je vhodnou alternativou organických rozpouštědel. Ionické ztekucení využívá rozpouštědla s obsahem kationtů a aniontů, jejichž struktury nejsou koordinovány. Existují tisíce druhů těchto rozpouštědel, jejichž rozpouštěcí schopnost při hydrogenaci, esterifikaci, syntéze nanomateriálů, biokatalýze a selektivní extrakci aromatických látek je prokazatelně účinná. Nejvíce efektivní jsou rozpouštědla obsahující chloridové ionty. Bylo zjištěno, že enzymy mohou účinněji hydrolyzovat amorfni celulózu, která je produkována právě ionickým ztekucením. [6]



Obrázek č. 6: Snímek elektronové mikroskopie zobrazující neupravenou enzymaticky hydrolyzovanou kukuřičnou píci. [13]



Obrázek č. 7: Snímek elektronové mikroskopie zobrazující enzymaticky hydrolyzovanou kukuřičnou píci předupravenou horkou vodou. [13]

1.2.4 Hydrolýza lignocelulózového materiálu

Stupeň hydrolýzy lignocelulózového materiálu je ovlivněn typem předúpravy a její kvalitou – zejména záleží na přístupnosti lignocelulosy. Lignocelulózu lze převést do roztoku enzymatickou nebo chemickou hydrolýzou. [1] Chemická hydrolýza může být provedena jak kyselou, tak zásaditou hydrolýzou. [6]

Alkalická hydrolýza

Při předúpravě alkalickou hydrolýzou dochází k solvataci a zmýdelnění biomasy. V důsledku toho se zvýší specifická povrchová plocha nabobtnáním a substráty jsou snadno přístupné pro enzymy. Rozpustnost se zvyšuje prostřednictvím různých simultánních reakcí, jako je například zmýdelnění uronové kyseliny a acetylových esterů stejně tak, jako neutralizace různých kyselin vzniklých degradací částic. [22] [23] Při použití silné zásady je možné, že celulóza bude hydratována na nižší cukry než u kyselé hydrolýzy. Výhodou je vyšší degradace, avšak může docházet ke ztrátám uhlovodíků, jelikož cukry budou vymyty po hydrolýze. [23]

Kyselá hydrolýza

Kyselá hydrolýza umožňuje provedení jak předúpravy, tak samotné hydrolýzy lignocelulózového materiálu v jednom kroku. Používají se většinou dva typy kyselé hydrolýzy, a to hydrolýza koncentrovanou nebo zředěnou kyselinou. [1] [23]

Chemická hydrolýza koncentrovanou kyselinou

Tento typ procesu je založen na faktu, že koncentrovaná kyselina je schopná dekrystalizovat molekulu celulózy, a to následně umožňuje hydrolýzu celulózy zředěnou kyselinou. [15] Solubilizace hemicelulózy a precipitace solubilního ligninu je více efektivní v porovnání s hydrolýzou ředěnou kyselinou. [23]

Chemická hydrolýza zředěnou kyselinou

Při hydrolýze zředěnou kyselinou je ve většině případů využívána zředěná kyselina sírová. [21] Předúprava zředěnou kyselinou zajistí rozklad hemicelulózy, a tím zlepšuje dekrystalizaci a depolymeraci celulózy. [21] U typického systému je lignocelulózový odpad mlet na malé části. Pro chemickou hydrolýzu je nejlepší poměr tuhé a tekuté složky 10:1. Hydrolýza celulózy probíhá při teplotě 180-230 °C a hlavním produktem jsou jednoduché cukry. Za těchto podmínek dochází k hydrolýze celulózy na cukry, ale kyselina nemá žádný vliv na přítomný lignin. Produkce glukózy je různá v závislosti na povaze suroviny. Je možné získat 84–86 % celulózy ze sulfátového papíru nebo 38–53 % celulózy z odpadního papíru a dále ji konvertovat na glukózu. [6]

1.2.5 Enzymatická hydrolýza

Enzymy se chovají jako katalyzátory snížením aktivační energie chemické reakce. Na aktivitu enzymů mají vliv různé faktory, jakými jsou změny v pH, přítomnost solí a teplota. Malé změny v teplotě reakce mohou velmi ovlivnit jeho 3D strukturu enzymu, a tím i jeho aktivitu. Teplota může funkci enzymu ovlivnit natolik, že se enzym stane zcela nefunkční v důsledku jeho denaturace. Dalším faktorem ovlivňujícím aktivitu enzymu je přítomnost solí. Příliš vysoká koncentrace může způsobit denaturaci enzymu, avšak tato denaturace je obvykle reverzibilní. Výjimkou jsou soli těžkých kovů, které nezvratně změni strukturu. Pro tento jev se používají jako fixativa v histologii. [26] [27]

Enzymatickou katalýzu ovlivňují následující faktory:

- vztah mezi množstvím enzymu a substrátu (inhibice přebytkem nebo nedostatkem substrátu)
- vztah mezi množstvím enzymu a produktu (tzv. inhibice katalytické aktivity produktem)
- pH
- teplota
- viskozita roztoku
- mechanické nečistoty, které mohou být i bílkovinné povahy, svou přítomností fyzikálně blokuji aktivní centra biokatalyzátoru
- hydrodynamické podmínky v okolí komplexu enzym-substrát
- záření (světelné, gama)
- elektrické i magnetické pole [27][28]

Kinetické rovnice enzymatické přeměny

Stupeň ztráty enzymové aktivity lze vyjádřit vztahem:

$$L = \frac{A}{B} \quad (1)$$

Kde L = stupeň ztráty enzymové aktivity je A = množství vyplaveného enzymu při odstraňování zbytků, B = množství enzymu na začátku hydrolýzy. [6]

Stupeň sacharifikace v procentech D_s lze vyjádřit vztahem:

$$D_s = \frac{C}{D} \cdot 100 \quad (2)$$

Kde C = získané množství redukujících cukrů, D = potenciální množství redukujících cukru v substrátu. [29]

Teoretický vztah pro spotřebu substrátu a tvorbu produktu Y

$$Y = \frac{dX/dt}{-dS/dt} = -\frac{dy}{dS} \quad (3)$$

Kde X = produkt, S = substrát.

Vztah tvorby specifického produktu

$$q_p = Y_{p/s} \cdot q_s \quad (4)$$

Kde q_p – množství vytvořeného specifického produktu, q_s – množství spotřebovaného substrátu, $Y_{p/s}$ – stechiometrický poměr produkt-substrát. [15] [30]

Enzymatická hydrolýza lignocelulózového materiálu

Předúprava lignocelulózového materiálu pomocí enzymatické hydrolýzy vyžaduje odstranění ligninu a jiných látek, které by mohly inhibovat hydrolýzu. Pro usnadnění přístupu enzymu k tomuto substrátu je nutné zvýšit jeho poréznost. [1]

Biochemický proces rozkladu celulózy není přes intenzivní studium v posledních desetiletích detailně objasněn. Začíná hydrolýzou polymeru působením exoenzymů, které jsou označovány jako celulózy. Celulózy katalyzují přeměnu nerozpustné celulózy přes nízkomolekulární ve vodě rozpustné sloučeniny a na disacharid celobiózu. Celobióza se dále rozkládá za účasti enzymu celobiázy na 2 molekuly glukózy. [19] Hydrolýza krystalizované celulózy předurčujícím krokem rychlosti reakce, protože vodný roztok enzymu problematicky afinuje k nerozpustné, nepropustné, vysoce strukturalizované celulóze. [6]

Hemicelulóza jako vysoce komplexní molekula a vyžaduje pro rozklad multienzymový systém obsahující endoxylanázy, exoxylanázy, β -xylanázu, α -arabinofuranozidázu, α -glucuronidázu, acetyl xylan esterázu a esterázu kyseliny fleuronové. [1]

Enzymy použitelné pro hydrolýzu lignocelulózového materiálu

Celulózy

Existuje několik druhů celuláz, které se od sebe liší jak reakcemi, které katalyzují, tak svoji strukturou. Enzymová schopnost se různí od enzymů schopných štěpit rozpustné deriváty až po enzymy štěpící samotný celulóзовý komplex. [6]

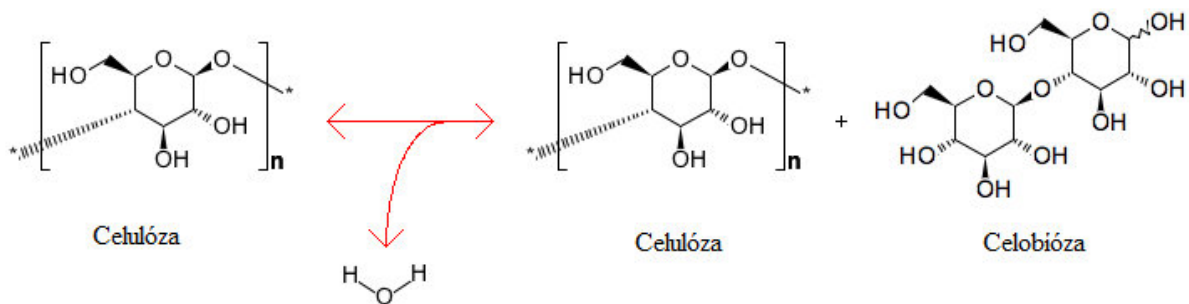
Endo-1,4- β -glukanáza

Endo-1,4- β -glukanáza atakuje regiony celulózy s nízkým stupněm krystaliny. Jedná se o endotermickou reakci při níž se štěpí 1,4 vazba mezi glukózovými jednotkami celulózy. Celulóza se naštěpí na kratší polysacharidové řetězce. Tento krok předurčuje rychlost procesu hydrolýzy celulózy na monosacharidy.

Exo-1,4- β -glukanázy

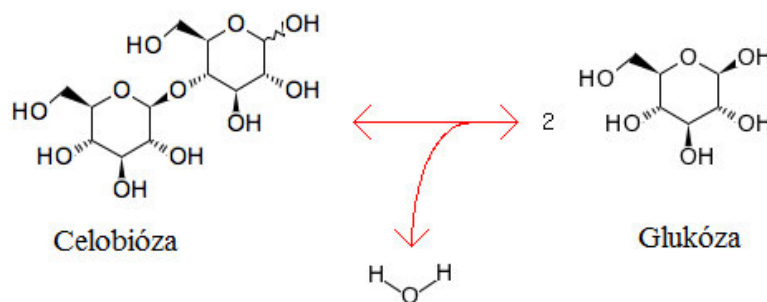
Exocelulázy hydrolyzují 1,4 glykosidickou vazbu celulózy, která již byla hydrolyzována na menší polysacharidy endo-1,4- β -glukanázou, a tím vytváří disacharidy a tetrasacharidy, jako například celobiózu.

1. **exo-1,4- β -glukan cellobiozidáza (CBH-I)** štěpí celulózu z redukujícího konce celulózy.
2. **exo-1,4- β -glukozidáza (CBH-II)** štěpí celulózu z neredukujícího konce celulózy. [2] [6]



Obrázek č. 8: Štěpení *exo-* a *endo-* celulázami [31]

β -1,6-glukosidáza konvertuje produkty získané štěpením celulózy pomocí exocelulázy na glukozové jednotky. β -glukosidáza štěpí celooligosacharidy z terminálního neredukujícího konce a disacharidy celobiózy. Produktem štěpení je D-glukóza. [2] [6]



Obrázek č. 9: Štěpení β -1,6-glukosidázou [32]

Kromě těchto základních skupin enzymů existují i enzymy atakující hemicelulózy tvořící cca. 25 % dřevěné hmoty. Jsou jimi například: glukuronáza, acetyleráza, xylanáza, β -xylosidáza, galaktomannáza a glukomannáza. [2] Ve většině případů enzymový komplex štěpí celulózu na β -glukózu. [6] Tyto enzymy při štěpení celulózy a hemicelulózy pracují

synergicky. Použití enzymů při hydrolýze je efektivnější než použití anorganických katalyzátorů, protože enzymy jsou vysoce specifické a mohou pracovat za mírných procesních podmínek. Naproti jejich výhodám je využití enzymů v průmyslovém odvětví stále limitováno vysokými náklady na jejich produkci. [2] [11] Celulázy jsou produkovány celou řadou hub a bakterií. Komerčně dostupné enzymy jsou především enzymy produkové plísněmi rodu z *Aspergillus sp.* a *T. reesei*.

Hemicelulázy

Hemicelulázy jsou enzymy štěpící hemicelulózu na několik typů cukrů (glukóza, arabinóza, manóza a galaktóza). Tyto enzymy jsou často přidávány k lignocelulotické biomase, protože rozkladem hemicelulózy uvolňují prostor pro celulótické enzymy, a tím jejich přístup k celulóze. Hemicelulotická hydrolýza může být využita také v předúpravné fázi. [15]

1.3 Konverze lignocelulózové biomasy na etanol

Předúpravou lignocelulózového materiálu s následnou enzymatickou hydrolýzou celulózy se získá zkvasitelná glukóza, která se dále zkvašuje.

1.3.1 Etanolové kvašení

Samotná glukóza difunduje přes buněčné membrány, a v buňkách dochází při glykolýze k zisku dvou molekul pyruvátu z jedné molekuly glukózy. Za aerobních podmínek se pyruvát odbourá v citrátovém cyklu na vodu a CO₂, ale za anaerobních podmínek se pyruvát štěpí na molekulu CO₂ a acetaldehydu, který se následně redukuje pomocí NADH na etanol. [33]

Endotermická rovnice přeměny glukózy na etanol



$$\Delta H^\circ_{298} = 92.3 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

Výtěžek reakce odpovídá cca. 16 kcal [6] [15]

Teoretické maximum přeměny glukózy na etanol je 51 %. Lze ji vypočítat podle následujícího vztahu, který vychází ze stechiometrické rovnice přeměny glukózy na etanol:

$$P_{max} = 2 \cdot \frac{Mr_{etanol}}{Mr_{glukóza}} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde P_{max} = teoretické maximum přeměny glukózy na etanol, Mr_{etanol} = molekulární hmotnost ethanolu, $Mr_{glukóza}$ = molekulární hmotnost glukózy. [6] [15]

Z každé molekuly glukózy můžou vzniknout dvě molekuly ethanolu, ale v praxi konverze proběhne přibližně u 90 – 95 % teoretického množství. [2] [6] Některé molekuly glukózy jsou

použity pro výstavbu buněk a pro jiné metabolické produkty než je etanol. V praxi je však běžně přeměněno okolo 40 – 48 % glukózy. *Saccharomyces cerevisiae* (s 46% efektivností přeměny glukózy) je schopna (při 20 C) vyprodukovat z 1000 kilogramů fermentabilního cukru asi 583 litrů čistého etanolu. [6] Pro zamezení kontaminace bakteriemi u kultivace kvasinkami jsou přidávána antibiotika. Při reakci vzniká CO₂, který může být zachycován a dále použit pro chemické syntézy nebo jiné aplikace. [15]

1.3.2 Organismy schopné etanolového kvašení

Existují tři typy organismů schopné fermentace a to kvasinky, bakterie a plísně. Tyto mikroorganismy jsou velmi selektivní ve svých fermentačních charakteristikách a jsou schopny zkašovat pouze některé cukry. Je známo využití několika odlišných mikroorganismů pro produkci bioetanolu jako je *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Escherichia coli* a *Zymomonas mobilis*. [4]

Fermentace využívající kvasinky se ukázaly jako nejvhodnější pro konverzi cukrů nebo škrobů na etanol, protože mají schopnost zkvašovat různé sacharidy a některé jsou dokonce schopny zkvašovat jak pentózy, tak hexózy. [2] [4]

Za účelem dosažení optimální fermentace je zde několik aspektů, které se musí brát v úvahu; například teplotní rozsah, rozsah pH (3,5 – 5,0 pro kvasinky a 6,5 – 7,0 pro bakterie), alkoholová tolerance, růstová aktivita, genetická stabilita, tolerance vůči inhibitorům, výnosnost a další.

1.3.3 Kvasinka – *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*)

Taxonomické zařazení Kluyveromyces marxianus

Říše: *Fungi*

Kmen: *Ascomycota*

Podkmen: *Saccharomycotina*

Třída: *Saccharomycetes*

Řád: *Saccharomycetales*

Rod: *Saccharomycetaceae*

Podrod: *Kluyveromyces*

Druh: *K. marxianus* [34]

Označuje se také jako *Saccharomyces fragilis* Jorgensen, *teleomorph*, *Candida kefir* (Beijerinck) van Uden & Buckley, *Kluyveromyces cicerisporus* van der Walt et al., *Saccharomyces marxianus* Hansen [35]

Kmeny patřící do skupiny *Kluyveromyces* byly izolovány z rozsáhlého množství zdrojů, a proto zde existuje značná metabolická rozdílnost a signifikantní variabilita polymorfismů. Díky tomuto byly kvasinky použity v rozsáhlých biotechnologických oblastech. Je součástí mléčných produktů a je schopna odstranit pektinový zákal, který se tvoří při výrobě vína. Na druhou stranu bylo identifikováno, že způsobuje měkkou hnilobu u cibule. [36]

V porovnání s modelovým organismem *Kluyveromyces lactis* je znalost o druhu *K. marxianus* omezena a také jsou popsány jen některé rozdílné kmeny. [37]

K. marxianus je schopna růst na širokém spektru substrátů, zkvašuje sacharózu, glukózu, laktózu, galaktózu, xylózu a rafinózu. Odolává vyšším teplotám v porovnání s ostatními kvasinkami. [36] [38]

V biotechnologii může být *Kluyveromyces marxianus* použita jako alternativa *S. cerevisiae*. Je schopna exkretovat enzymy, a proto ji lze i využít pro produkci β -galaktosidázy, β -glukosidázy, polygalakturonázy, inulinázy nebo pektinázy. [38]

Díky své termotoleranci je schopna produkce etanolu z cukernatých složek při teplotě nad 40 °C a účinností 85-90 %, avšak v porovnání se *S. cerevisiae* má nižší etanolovou toleranci. Kromě cukerných roztoků je *K. marxianus* schopna zutilizovat a převézt na etanol škrob, inulin a xylózy. [36] [39] Byly popsáno také využití *K. marxianus* pro degradaci barviv a vychytávání těžkých kovů z odpadních vod. [40] [41]

1.3.4 Kultivace a fermentace

Známe dva druhy kultivace: aerobní a anaerobní. Prostředí velmi ovlivňuje kinetiku reakcí. Pro optimální produkci se média i podmínky kultivace mohou měnit v závislosti na velikosti systému. [21]

Balanční rovnice přeměny při buněčném růstu

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (6)$$

Kde X = koncentrace buněk, μ = specifický růstový faktor mikrobiální kultury. [30]

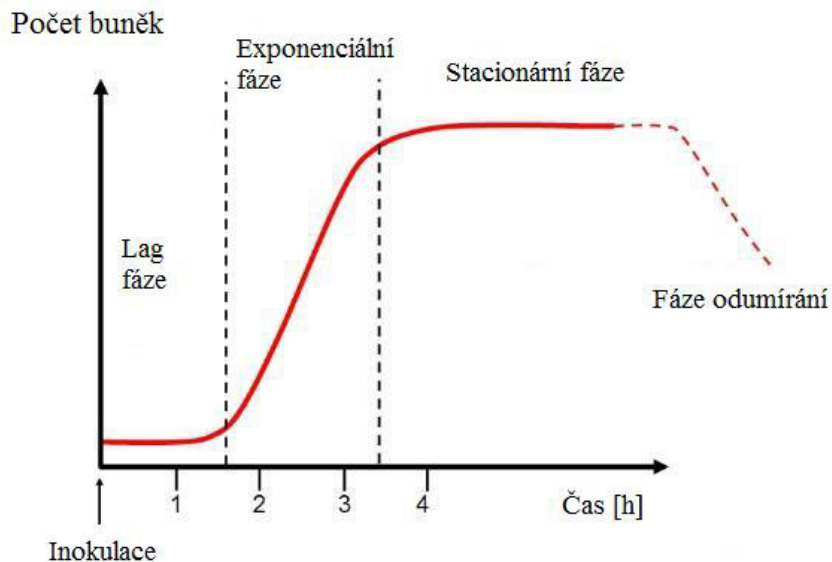
Růst buněk na limitovaném substrátu s limitovanou enzymatickou reakcí. Tento model nebere v úvahu produkci toxických odpadních látek. (Monodův model)

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \quad (7)$$

Kde μ_{\max} = maximální růst, S = koncentrace limitovaného substrátu, K_S – afinitní konstanta limitovaného substrátu. [15] [42]

Růstová křivka

Růstová křivka zobrazuje události v čase, kdy je inokulováno čerstvé médium buňkami. Zaznamenává množství vitálních buněk v kultuře. Poměr vitálních a mrtvých buněk vyjadřujeme jako viabilitu. [43] [44] Růstovou křivku rozdělujeme na 4 odlišné fáze:



Obrázek č. 10: Růstová křivka [45]

I. lag fáze

Buněčný metabolismus je zrychlený a organismus se adaptuje na nové prostředí. Následkem je biosyntéza buněčných makromolekul, primárně enzymy pro přípravu do další fáze a zvětšují svůj objem. Nedochozí k většímu dělení buněk. Některé buňky mohou odumřít následkem šoku z přenesení do jiného prostředí. Složení prostředí ovlivňuje délku lag fáze. [28][44][43]

II. fáze exponenciální (logaritmická)

Při vhodných růstových podmínkách je kultura plně přizpůsobena podmínkám prostředí, buňky se začínají dělit a rychlost dělení narůstá. S každou generací se počet buněk zdvojnásobuje intenzivním množením. V této fázi je kultura velmi náchylná na změny prostředí. Úmrtnost buněk je minimální. Substrát se rychle spotřebovává. [44] [43]

III. fáze ustálená (stacionární)

Kvůli velké spotřebě substrátu ve fázi exponenciální je dostupnost nižší a dochází k hromadění odpadních látek, zbrzdění množení a celkového metabolismu. Počet živých buněk se vyrovnává s buňkami mrtvými. [26] [44]

VI. fáze odumírání

Pokud živiny v prostředí zůstávají limitovány a jejich množství je nízké, populace vstoupí do fáze odumírání. Buňky se dále nedělí. Pro většinu kultur odumřou v konečné fázi všechny buňky. Některé bakteriální kultury jsou však schopny vstoupit do vegetativního stavu. [15] [11] [43]

Fermentační postupy

Existuje mnoho druhů kultivačních postupů, které jsou komerčně využívány. Jejich použití záleží na daném mikroorganismu, jeho původu a substrátu, který zkvašuje (fermentuje). [15]

Fermentace je metabolický proces zkvašování cukerných složek na kyseliny, plyny nebo alkoholy. Fermentace využívá ke konverzi látek mikroorganismy a jejich enzymatické pochody. [15] [44] Po předúpravě a degradační fázi, ve které se uvolní cukernaté složky, je možná konverze uhlovodíků na etanol a jiné produkty. [2]

Fermentační procesy

- Batch (Vsádkové)
- Feed–batch (Přítokové)
- Kontinuální (Průtokové)
- Kontinuální s recyklací

Batch proces je nejjednodušší typ fermentace. Jde o uzavřený systém s konstantním objemem. Jediné, co se může po zahájení fermentace dodávat je vzduch. U Feed batch je systém stejný jako batch, ale dodává se substrát. U kontinuálního procesu se nepřerušovaně odstraňuje obsah fermentoru. Přidávání substrátu a odebírání produktu je v rovnováze tak, že objem ve fermentoru je konstantní. Kontinuální proces s recyklací je forma kontinuálního procesu, ale recyklují se buňky (popř. enzymy) vyplavené s produktem z reaktoru. Recyklace může být částečná nebo celková. [2] [15]

Simultánní sacharifikace a fermentace (SSF)

Operační cena SSF je oproti SHF většinou nižší. Pracuje se pouze simultánně v jednom reaktoru, kde zároveň probíhá hydrolýza a fermentace. Doba hydrolýzy a fermentace je velice závislá na velikosti systému. [6]

Tento proces má několik výhod:

- použití nižšího množství enzymu,
- kratší procesní doba,
- menší riziko kontaminace v porovnání se SHF.

Hlavní nevýhody

- rozdílné optimální podmínky pro enzymatickou přeměnu a viabilitu daného organismu [1]

Enzym může být recirkulován odstraněním z kapalně fáze nebo jsou enzymy vychytány recyklací nezreagované pevné fáze. Nevýhodou je přítomnost ligninu v pevné fázi, který se nedá hydrolyzovat. Recyklace enzymů je vhodné provádět při nižších teplotách než při kultivaci, protože bude enzym méně vázán na celulózu. [6]

Separovaná hydrolýza a fermentace (SHF)

U toho přístupu je každý krok prováděn zvlášť, tím jsou zajištěny optimální podmínky jak pro enzym, tak pro mikroorganismus. Nevýhodou je, že konečný produkt hydrolýzy inhibuje enzymy, a proto se typicky používá vyšší koncentrace enzymu tak, aby se omezila jeho inhibice produktem. Tímto přístupem se však zvýší náklady pro hydrolýzu.

Celý proces většinou probíhá ve dvou reaktorech. První reaktor slouží pouze pro hydrolýzu substrátu a druhý pro jeho fermentaci. [1] [6]

Další nevýhodou tohoto procesu je udržení sterility. Existuje zde velké riziko kontaminace během převodu hydrolyzátu do druhého reaktoru, proto se někdy přistupuje k hydrolýze a následné fermentaci ve stejném reaktoru bez odstranění enzymů a pevných složek, aby se toto riziko zmenšilo. [6] V závislosti na postupu mohou být enzymy záměrně denaturovány působením vyšších teplot. [46]

Proces bez denaturace enzymů můžeme označit jako SFF (saccharification, followed by fermentation – sacharifikace následována fermentací), HHF (hybridní hydrolýza a fermentace) [6], nebo také NSSF (neizotermní SSF). [47]

Hybridní hydrolýza a fermentace (HHF)

Je proces odvozený od SHF. Do budoucna se jeví jako nejekonomičtější řešení pro produkci etanolu z lignocelulotické biomasy. Začíná separovanou prehydrolýzou a končí simultánní sacharifikací (hydrolýzou) a fermentací. V prvním kroku je obvykle nastavena vyšší teplota optimální pro enzymovou aktivitu a ve druhém kroku dochází k zaočkování a snížení teploty na optimum organismu. Tímto postupem se umožní zajistit optimální podmínky pro enzym i mikroorganismus a rapidně se sníží riziko kontaminace. [5]

1.4 Etanolová purifikace a produktová separace

Během fermentačních procesů je důležité separovat vyprodukovaný etanol z původního roztoku a kvůli tomu, že některé organismy nejsou schopny přežít vysoké koncentrace etanolu

(více než 15 – 20 %). Zbýlý roztok obsahuje etanol a vodu (asi 80 %) a další rozpustné složky. Etanol z něj může být separován destilací nebo superkritickou fluidní technologií. [2]

Separace etanolu a vody je velmi energeticky náročný proces, který je velice závislý na poměru koncentrací separovaných složek. [1]

Konvenčními postupy destilace za atmosférického tlaku je možné dosáhnout maximální koncentrace etanolu 90 – 95 %, jelikož systém voda-etanol tvoří azeotropickou směs 95,63 % (w/w) etanolu a 4,37 % vody s bodem varu 78,2 C. [1] [6]

Etanol může být dále purifikován až na 99 % pomocí přísadků sušících agentů. Nicméně 99 % etanol je hygroskopický a může během skladování absorbovat vodu z okolního prostředí. Purifikační kroky jsou nezbytné pro výrobu směsí s benzínem, jelikož při vyšší koncentraci vody se etanol špatně mísí s benzínem. [2]

Etanol lze přecistit azeotropickou destilací, extrakční destilací, kapalino-kapalinovou extrakcí, adsorpcí, membránovou separací nebo pomocí molekulových sít. [1]

Separace na molekulových sítích je velmi dlouho známá technika pro svoje sušící schopnosti (i do 90 C). Existuje několik forem molekulových sít, které jsou založeny na otevření pórů (3A, 4A, 5A a 13X). Komerční molekulová síta jsou typicky dostupná v prášku, kuličkách, granulích nebo extrudované formě. [6]

1.5 Etanol

Etanol s chemickým vzorcem C_2H_5OH , je bezbarvá, těkavá a hořlavá kapalina. Má omamnou vůni a neomezeně se mísí s vodou. Teplota varu je 78 °C pro 96% etanol a 80 °C pro 100% etanol. [2] [6] [48]

Etanol je vysoce hořlavý a jeho plamen je málo viditelný. Je rozpustný ve vodě a spolu s ní tvoří azeotropickou směs, u které je obtížné dosáhnout 100% koncentrace při společné destilaci. [2]

Etanol je dnes ve světě nejrozšířenější biologicky produkováné transportní palivo. Hlavní výrobní průmysl etanolu vznikl během osmdesátých let devatenáctého století v Brazílii a Spojených státech, kdy vláda obou zemí jeho produkci začala signifikantně podporovat. Etanol je možno syntetizovat z prekurzorů, jako například ethylen nebo produkovat z cukru nebo z materiálů bohatých na polysacharidy (škrob a celulótické materiály) za použití enzymatické hydrolýzy nebo kyselí hydrolýzy. Tyto metody jsou přibližně stejně nákladné, ale metoda založená na enzymatické hydrolýze bude pravděpodobně v budoucnu nejméně nákladná. [17] [15]

1.5.1 Syntetická výroba etanolu

Světová výroba je asi 3 miliony tun ročně. Výroba syntetického lihu je založena na rozdílných metodách výroby etanolu na přímé a nepřímé hydrataci ethylenu. [48]

Přímá hydratace

Tato metoda je více rozšířená. Je založena na hydrataci ethylenu vodou katalyzované kyselinou fosforečnou na křemelině při teplotě 300 až 350°C a tlaku asi 7 MPa. Pro reakci je potřebné použít vysoce čistý ethylen. [48]

Nepřímá hydratace

Dnes méně oblíbená metoda je nepřímá hydratace ethylenu přes kyselinu ethylsírovou při teplotě 60°C a tlaku asi 2 MPa hydrolýzou. Při této reakci vznikne etanol a menší množství diethyletheru jako vedlejší produkt. [49]

1.5.2 Výroba bioetanolu

Světová výroba bioetanolu markantně převyšuje výrobu syntetického a jeho produkce je asi 50 milionů tun (2006) a asi 60 milionů tun (2008). [48]

Hlavním ekologickým cílem výroby bioetanolu je udržení rovnováhy CO₂ v atmosféře, jelikož jeho spalováním se neuvolňuje CO₂ z fosilních paliv, ale z biomasy, která utilizovala CO₂, jenž již byl v atmosféře přítomen. [4]

Výroba etanolu – enzymatická z primárních surovin

Výroba bioetanolu se provádí zkvašováním cukerných roztoků získaných buď loužením cukernatých surovin (ovoce, řepa), hydrolýzou škrobu (brambory, rýže, žito), a hydrolýzou celulózy obsažené v lignocelulóзовých materiálech. [48] Takový etanol vždy obsahuje menší množství metanolu (norma je max. 4 ml na 1 litr lihu u konzumního lihu). Nevýhodou produkce etanolu z primárních surovin je fakt, že se využívají stejné surovinu jako pro produkci potravin, a tím ovlivňují jejich cenu a dostupnost. [4]

Enzymatická výroba etanolu z melasy

Tato metoda je v Evropě nejrozšířenější pro výrobu jak potravinového, tak technického lihu. [50]

Technologická příprava začíná přípravou melasového roztoku tak, že se melasa ředí vodou na sacharizaci asi 30 %, přidává se roztok superfosfátu a síranu amonného, roztok se kyselinou upravuje na pH asi 5. V kultivačních kvasných tancích se připraví zákvas lihovarských kvasnic (obvykle *Saccharomyces cerevisiae*). Upravená melasová zápara se spolu se zákvasem čerpá do kvasných tanků, kde probíhá kvašení při teplotě 25 °C po dobu

asi 24 hodin. Ihned po prokvašení zápary se čerpá část zápary (asi 10 %) na destilaci. Pak se hlavní podíl kvasného tanku odvádí na separaci do odstředivek, kde se oddělí kvasničné mléko od zápary. Kvasničné mléko se regeneruje v propagačním tanku po několik hodin v lázni okyselené kyselinou sírovou na pH 2, aby se potlačil rozvoj nežádoucích infekčních mikroorganismů. Preparované kvasnice se přivádějí místo zákvasu zpět do kvasných tanků s čerstvou melasovou záparou. Prokvašená odseparovaná zápara se čerpá do sběrného tanku a odvádí se k destilaci. Dnes se v moderních zařízeních využívá kontinuálního kvašení, ale pro výrobu etanolu mohou být méně vhodné z důvodu snadné kontaminace. [48]

Enzymatická výroba etanolu ze sulfitových výluhů

Sulfitové výluhy vznikají při výrobě celulózy. Jde v podstatě o odpadní vodu, která obsahuje velké množství solí 15 – 24 % Na_2O , Na_2S a jiné. [18] Sulfitové výluhy také obsahují až 3,5 % sacharidů (glukózy, fruktózu, manózu a galaktózu), z nichž první tři hexózy jsou zkvasitelné. pH se pohybuje okolo 10, a proto je nutné jej upravit před dalším zpracováním. Sulfitové výluhy se nejprve odplyněním zbaví SO_2 , neutralizují vápenným mlékem a nechají se usadit kaly. Hlavní kvašení probíhá v uzavřených fermentorech za mírného přetlaku oxidu uhličitého kontinuálním postupem intenzifikovaným mírnou cirkulací zápary a s pomocí vratné separace kvasinek používaných jako zákvas. Jako živiny se používají superfosfát a síran amonný. Po 24 hodinách kontinuálního kvašení se prokvašená sulfitová zápara čerpá k destilaci. Nečistoty melasové zápary i jiných zkvašovaných surovin tvoří nízkovroucí složky především acetaldehyd a etylacetát). Výševroucím podílem nečistot je přiboudlina, jejíž hlavní součástí je isoamylalkohol. Odpad z destilace je lutr. Čistý etanol se získává destilací a rektifikací. Destilační aparáty pracují periodicky i kontinuálně. [48]

Enzymatická výroba etanolu z kukuřice

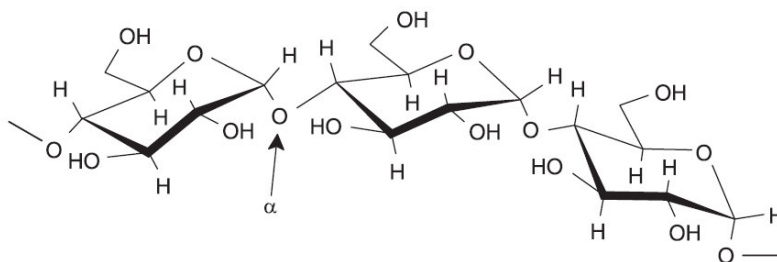
V USA produkce etanolu vyrobeného z kukuřice vzrůstá z méně než 3 miliardy galonů v roce 2003 na více než 10 miliard galonů v roce 2012 (1 galon = 3,785 l). [51]

Komerčně produkováný etanol z kukuřice je získáván dvěma způsoby, a to pomocí mletí za sucha nebo mletí za mokra. Mletí za mokra zahrnuje separaci složek jaderného zrna (klíčky, vlákninu, bílkovinu a škrob) před samotným zkvašováním. Kukuřice se máčí 24 – 48 hodin ve vodě při teplotě 50 – 52°C. Během této doby se relativní vlhkost zrn zvýší z 15 na 45 % (hmotnostně). Do vody se přidává 0,1 % kyselina sírová, která zamezuje mikrobiologickému růstu. Jak zrna bobtnají a změkčují se, začne se uvolňovat škrob. Poté se oddělují klíčky v cyklónových separátorech. Z klíčků se dále extrahuje olej (85 % z celého kukuřičného semene), který se dále zpracovává.

Po odstranění klíčků se biomasa opět mele a dochází k dalšímu uvolnění škrobu a lepku.

Vláknina je zfiltrována a rozsuspendována pro uvolnění dalších látek. Tento filtrát se nachází využití jako krmivo pro zvířata. Dalšími kroky se získá kukuřičná vláknina, která je konvertována na kukuřičný sirup. Ztekucení se provádí enzymatickou nebo kyselou hydrolýzou. Vzniká roztok směsi cukrů (hlavně glukóza a maltóza). Cukerný sirup se dále fermentuje v kontinuálních nebo batch reaktorech. [6] [15]

Na druhou stranu u suchého mletí nedochází k separaci a celá rozemletá biomasa je zkvašována. Škrob je přeměněn na etanol během fermentace, vytváří oxid uhličitý a jiné vedlejší produkty. Hlavním rozdílem je, že se rozsuspendovaná kukuřičná mouka temperuje na 82 – 88 °C po dobu 30 – 60 minut (redukce viskozity), poté primární ztekucování v tlakovém vařiči 105 °C 5 minut, s následující sekundárním ztekucením při 82 – 85 °C 1 – 2 hodiny za použití alfa amylázy a později glukoamylázy. Vzniklý cukerný roztok je následně fermentován 50 – 60 hodin. Výsledkem je asi 15% etanol. [6]



Obrázek č. 11: Struktura škrobu se znázorněním štěpení amylázami [2]

Výroba etanolu – enzymatická ze sekundárních surovin

Záměrem dnešní doby je maximální využití všech surovin. K výrobě etanolu se nyní používají především primární suroviny, které by byl jinak člověk schopen využít pro svoji potravu. Vzhledem ke zvyšujícímu se množství papírových odpadů a odpadů z rostlinné výroby by bylo výhodné je využít pro výrobu lihu. V praxi se zatím běžně nedělá kvůli vysokým nákladům a malé efektivitě produkce, ale nese značný příslib do budoucnosti. [2]

1.5.3 Použití bioetanolu jako paliva

Etanol jako palivo

Z historického hlediska Oxilin byl první český autobenzín na bázi benzinové frakce ropy a kvasného lihu (státem dotovaného kvasného lihu), který se ale pro nedostatek kvasného lihu v letech 2000 a 2005 prakticky nevyráběl pro veřejnost. [48]

Etanol jako palivo má jak výhody, tak nevýhody závislé na typu motoru, ve kterém se používá. [2] Může být použit jak v existující infrastruktuře, tak využít v alternativní již existující technologii aut jakou je FFV (Flexible fuel vehicle). [4]

Etanol může být spalován jako čisté palivo nebo smíchán s benzínem či naftou. Má nižší energetickou hustotou (asi o 34 %) a nižší tenzi par než benzín, a proto použití za nízkých teplot může být obtížné. Etanol je méně toxický než nafta, benzín nebo metanol, a tím je enviromentálně výhodnější jeho využití. [2]

Nejdůležitější charakteristikou etanolu, jenž umožňuje jeho použití jako paliva v Ottově motoru (čtyřtákní plynový zážehový motor), je vysoké oktanové číslo. Oktanové číslo je numerické vyjádření odolnosti paliva proti samozapálení při zvýšení tlaku. Definice nulového oktanového čísla se míní to, že samozápalnost paliva je ekvivalentní 0 % podílu n-heptanu a 100 % iso oktanu (přesněji 2,2,4-trimetyl pentanu). Z toho vyplývá, že běžný benzín s označením natural 95 má oktanové číslo 95 a je ekvivalentní 95 % podílu n-heptanu a 5 % isooktanu.

Kapalná paliva s vysokým oktanovým číslem mají lepší vlastnosti během zážehu motoru. Pro etanol s vysokým oktanovým číslem 113 – 129 je možné, aby bylo stlačeno více paliva ve směsi se vzduchem do válce motoru (vyšší kompresní poměr umožňuje vyšší účinnost a menší spotřebu paliva) bez rizika nekontrolovaného samovznícení, které může způsobit tzv. "klepání" a následkem je poškození motoru. [2] [6]

Nevýhodou etanolu jako paliva je jeho nízké centanové číslo 8, a proto může být využit v naftových motorech pouze za předpokladu přidání příslušných aditiv, jako například ditercbutyl peroxidy. Tyto druhy aditiv jsou nákladné, ale vyskytují se na trhu i komerčně dostupné alternativy. [2]

Dalším nedostatkem je, že se etanol s naftou špatně mísí. Další volbou je použití přeplňovacích motoru se samostatným přívodem etanolu a nafty z oddělených palivových nádrží. [6]

Centanové číslo je numerické vyjádření vznětlivé rychlosti. Definice centanového čísla 15 je heptametylnonan a 100 pro n-hexadekan. Pro další paliva se využívá porovnání se směsí těchto dvou sloučenin, podobně jako u oktanového čísla. Z toho vyplývá, že nízké centanové číslo značí dlouhou dobu vznětlivosti a zapříčiňuje nízký výkon motoru. [2]

Je technicky možné přidat nejméně 10 % etanolu do benzínu bez potřeby změnit konstrukci motoru. Překážkou použití vyšší koncentrace etanolu v benzínu je, že automobilový výrobci ve většině případů negarantují použití etanolových směsí s více než 5 – 10 % etanolu, [2] přestože u nemodifikovaných motorů je možné využít až cca 20 % přídavek etanolu do benzínu. V případě využití koncentrovanějších směsí jsou nutné modifikace některých částí motoru. [6]

Existují dva druhy speciálních aut využívající etanolové motory. První je flexible fuel

vehicle (FFV) ve kterém je možné použít až 85 % etanolu v benzínu nebo naopak v případě potřeby čistý benzín. Výhodou FFV je, že je možné použití jak klasického benzínu, tak směsi s etanolem. Druhými jsou motory využívající čistý samotný 99% etanol. [2] [6] [3]

1.6 Analytické metody

1.6.1 Stanovení pH roztoků

pH roztoku se stanovuje spektrálně či elektrochemicky. Spektrální metoda je založena na vyvolání změny struktury u některých organických sloučenin, a to se projeví změnou spektrálních vlastností (absorpce či fluorescenci). Druhá, elektrochemická metoda je založena na změně potenciálu vhodné elektrody v závislosti na pH roztoku, do kterého je vnořena. Výhradně se pro měření používá skleněná elektroda. [52]

1.6.2 Stanovení sušiny a biomasy

Stanovení sušiny a biomasy je základní analytická metoda v biotechnologii a slouží k odhadu množství pevné složky v suspenzi bez vody jeho sušením. Využívá se teplot 95 - 105 °C. [43]

1.6.3 Turbidimetrie

Koncentraci částic v suspenzi lze odhadnout měřením zákalu suspenze. Měří se útlum paprsku světla putujícího přes suspenzi způsobenou rozptylem a absorpcí světla částicemi. Míra rozptylu a absorpce je závislá na velikosti částic a jejich koncentraci v suspenzi. Průměrná velikost částic pro měření se nachází v rozsahu od 0,035 – 50 μm . Výhodou použití turbidimetrické metody je nízká nákladnost, reprodukovatelnost, snadné použití a nedestruktivnost bez použití kalibrace. Může být použita jak u offline, tak u online analýz.

Používá se pro detekci suspenzí látek, které nepohlcují specifickou vlnovou délku. Jednotkou absorpce záření u turbidimetrie je turbidita (cm^{-1}). [53] [54]

Turbiditu $\tau_{\lambda 0}$ můžeme vyjádřit vztahem

$$\tau_{\lambda 0} = \frac{1}{l} \ln \frac{I_0}{I} \quad (8)$$

Kde l = délka optické dráhy, I_0 = počáteční intenzita světla, I = intenzita světla po průchodu optickým polem [53]

Turbidita nedisperzních roztoků (s částicemi o stejné velikosti)

$$\tau_{\lambda 0} = \frac{\pi D^2}{4} K_{ext} \quad (9)$$

Kde N – počet částic v 1 cm^3 , D – průměr částice, K_{ext} – extinkční koeficient v λ_0 (extinkční koeficient je roven součtu K_{abs} a K_{scat} tj. absorpance a rozptyl) [54]

Pro správné měření musíme zvolit takovou vlnovou délku, aby zvolená vlnová délka nebyla absorbována médiem nebo kapalinou, ve které se dispergované částice nachází. Z toho lze odvodit, že můžeme použít vlnové délky:

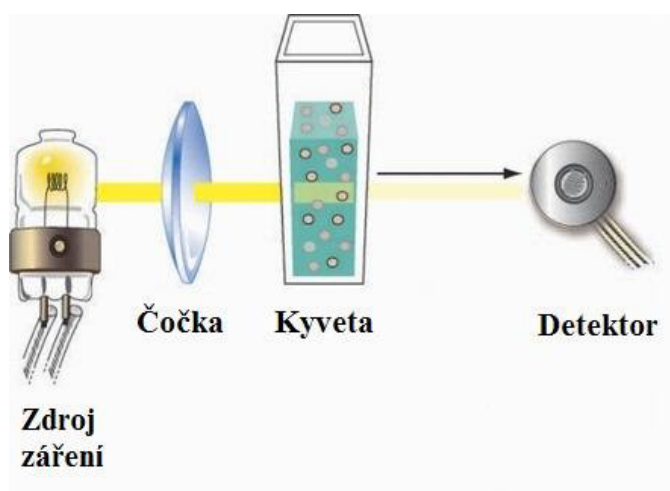
- 420 nm pro čiré roztoky
 - 540 nm pro světle žluté roztoky
 - 600 – 625 nm pro žluté až hnědé roztoky
- [54]

Lambert – Beerův zákon

Pro praktické využití pro měření známých roztoků s částicemi o známém průměru lze využít Lambert–Beerova zákona.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (10)$$

Kde A = absorpance, ε = konstanta úměrnosti, c = koncentrace roztoku, l = délka optické dráhy. [52]



Obrázek č. 12: Schéma turbidimetru [61]

1.6.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Chromatografie obecně

Chromatografie patří mezi separační techniky a slouží ke stanovení přítomnosti a koncentrace látek ve vzorcích. Princip chromatografie je založen na distribuci složek mezi dvěma fázemi označovanými jako fáze mobilní a fáze stacionární. Mobilní fáze je kapalina nebo plyn a stacionární fáze může být velmi rozdílná v závislosti na typu chromatografie.

Během chromatografie dochází k opakovanému transportu složek z mobilní fáze do stacionární a nazpět. Rozdělení mezi dvě fáze se blíží rovnováze, a proto jej můžeme popsat distribuční neboli rozdělovací konstantou.

$$K = \frac{[A]_x}{[A]_m} \quad (11)$$

Kde $[A]_x$ = množství látky ve stacionární fázi, $[A]_m$ = množství látky v mobilní fázi [52].

V současné době existuje celá řada variant chromatografických metod a rozdělují se na základě různých kritérií, například podle **skupenství fází** (kapalinová, plynová a superkritická fluidní), podle **separačního mechanismu**. [52]

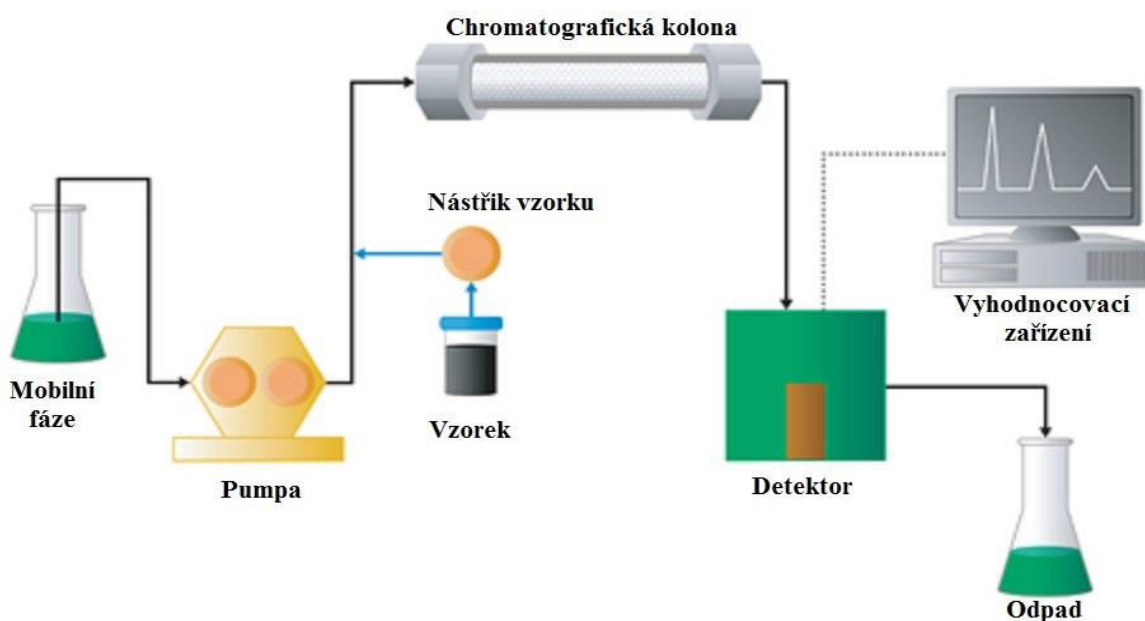
Tabulka č. 3: Přehled nejdůležitějších chromatografických metod [52]

Mobilní fáze	Separační mechanismus	Metoda	Užívaná zkratka
Plyn	síťový efekt	Plynová chromatografie na molekulových sítích	GSH
	adsorpce	Plynová adsorpční chromatografie	
	rozdělování	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC
Kapalina	síťový efekt	Gelová permeační chromatografie	GPC
	adsorpce	Kapalinová adsorpční chromatografie	LSC
	rozdělování	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
	chemisorpce	Iontově výměnná chromatografie	IEC
	specifická interakce molekul	Afinitní chromatografie	

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vychází z klasické kapalinové chromatografie, ale umožňuje širší použití, má větší rozlišovací schopnost a je méně časově náročná v porovnání s klasickou chromatografií. Principem je použití vysokého tlaku mobilní fáze, která může dosáhnout až 40 MPa.

V závislosti na polaritě sledovaných vzorků lze využít dvě možnosti HPLC kolon a to kapalinovou chromatografií s normální fází, kde mobilní fází je nepolární látka a stacionární je polární a kapalinovou chromatografií s obrácenou fází, která má polární mobilní fází a nepolární stacionární fází. Tato metoda má větší praktické využití. [53] [55] [56]



Obrázek č. 13: Schéma HPLC [54]

Eluce a mobilní fáze

Eluce může být izokratická nebo gradientová. Při výběru mobilní fáze záleží na typu kolony, se kterou se pracuje. Na základě eluotropní řady lze zvolit vhodné složení mobilní fáze. Polarita rozpouštědla je volena podle typu rozdělovací chromatografie.

Zvyšující se polarita



1. voda
2. methanol
3. acetonitril
4. ethylacetát
5. éter
6. dichlormethan
7. trichlormethan
8. toluen
9. hexan

Stanovení vzorku pomocí retenčních časů a integrálů z píků

Každá chemická látka je jinak zadržována na koloně a je tím charakteristická. Díky této vlastnosti je možné porovnáním zjistit, zda měřený vzorek látku obsahuje, či nikoliv a popřípadě v jaké je koncentraci. Pro určení koncentrace dané látky ve vzorku se využívá standardní řady roztoků stanovených látek o známé koncentraci. Porovnáním integrálů jejich píků v chromatogramu lze zjistit jejich koncentraci. Rovnice pro výpočet koncentrace – viz. experimentální část.

2 Experimentální část

2.1 Použitý materiál, chemikálie a přístroje

2.1.1 Kultura

Kvasinka *Kluyveromyces Marxianus* CCY 51–1–1* byla zakoupena ve Slovenské sbírce kvasinek (CCY). Kvasinka má optimální teplotu růstu při 24,0 – 25,0 C. [35] [57]

*Označení kmene ve sbírkách: **ATCC 28910** (ATCC, American Type Culture Collection), **CCY 51–1–1** (Zbierka kultúr kvasiniek), **NRRL Y–1190** (ARS Culture (NRRL) Collection), **VTT C–81110** (Teknologian tutkimuskeskus VTT – VTT Technical Research Centre of Finland), **DSM 5421** (Leibniz–Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), (Henneberg 236, Laffer 132, type E, NRRL Y–1190, BI czas 326/5) [35] [57]

2.1.2 Chemikálie pro inokulum, hydrolýzu a fermentaci

Tabulka č. 4: Chemikálie pro inokulum, hydrolýzu a fermentaci

D–glukosa	p.a., PENTA, C ₆ H ₁₂ O ₆ • H ₂ O
Kvasničný extrakt	pro bakteriologii, Carl Roth
Chlorid amonný	p.a. Lach–Ner s.r.o., NH ₄ Cl
Dihydrogenfosforečnan draselný	p.a. Lach–Ner s.r.o., KH ₂ PO ₄
Síran hořečnatý heptahydrát	p.a., Lach–Ner s.r.o., MgSO ₄ • 7 H ₂ O
Lepenkový papír	Odpadní lepenka široce využívaná k balení různých produktů. Byla využita lepenka pouze bez potištěných ploch.

2.1.3 Další chemikálie použité při analýzách

Tabulka č. 5: Další chemikálie použité při analýzách

Kyselina dusičná	65 % – p.a., Lach–Ner s.r.o., HNO ₃
Kyselina sírová	96 % – p.a., Lach–Ner s.r.o., H ₂ SO ₄
Hydroxid sodný	čistý, PENTA, NaOH
Kyselina octová	99,8 % – p.a., Lach–Ner s.r.o., C ₂ H ₄ O ₂
Kyselina citrónová monohydrát	p.a., Lach–Ner s.r.o., C ₆ H ₈ O ₇ • H ₂ O
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát	p.a., Lach–Ner s.r.o., Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O
Etanol absolutní	p.a., Merck s.r.o., C ₂ H ₆ O
Destilovaná voda	H ₂ O
Metanol HPLC pro analýzu	Lach–Ner s.r.o., CH ₄ O

2.1.4 Enzymy pro přípravu lignocelulózového materiálu

Enzymy sloužící pro hydrolytickou degradaci celulózy byly zakoupeny u firmy Novozymes. [46]

Tabulka č. 6: Enzymy od firmy Novozymes [58]

Enzym	Kód enzymu	pH optimum	Teplotní optimum
Celulázový komplex	NS22086	4,8 (5.0–5.5)	45(45–50)
β -glukosidáza	NS22118	6 (2.5–6.5)	(45–70)

2.1.5 Přístroje

- HPLC sestava
 - autosampler HT 300
 - termostat kolonový LCO 101 ECOM s.r.o.
 - pumpa ECOM s.r.o.
 - kolona WATREX 250x8 mm Polymer IEX H form
 - detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
 - diferenciální refraktometr RID K 101
- Mikroskop – MBL 2100 trinokulární
- Analytické váhy – Ohaus Pioneer Analytical Balance With Internal Calibration



Obrázek č. 14: Analytické váhy [62]

- Předvážkové váhy elektronické Helago EK–300
- Spektrofotometr – Thermo Scientific Helios Epsilon



Obrázek č. 15: Spektrofotometr [63]

- Turbidimetr – Ultrospec™ 10 Cell Density Meter



Obrázek č. 16: Turbidimetr [64]

- Třepačka – Heidolph Incubator 1000



Obrázek č. 17: Třepačka [65]

- pH metr pH 211 HANNA
- Sušárna UM 500 Memmert
- Mikrovlnná trouba – Daewoo výkon 700W
- Kuchyňský mixér – Rohnson R 536 Multi DUO – výkon 750W
- Elektrický vařič ETA dvouplotýnkový – Eta 2117
- Trouba elektrická – MORA 524
- Ultrazvuková čistička Ultrasound

2.1.6 Programy použité k vyhodnocení

- Kancelářský balík Microsoft Office 2010
- Grafický editor Gimp 2.6.1.2
- Citační editor Mendeley 1.11
- Clarity Chromatography Station 2.6.6.574
- Editace vzorců ChemSketch

2.2 Příprava použitých roztoků

2.2.1 Kultivační médium

Kultivační médium bylo připraveno podle následující tabulky a dále sterilováno v autoklávu.

Tabulka č. 7: Složení kultivačního média

Na 100 ml média	
3,00 g	glukóza
0,50 g	kv. extrakt
0,20 g	NH ₄ Cl
0,10 g	KH ₂ PO ₄
0,03 g	MgSO ₄ .7H ₂ O

Úprava pH kultivačního média

Úprava pH má zásadní význam pro růst mikroorganismů. Většina mikroorganismů roste na médiích s neutrálním pH. Úprava pH živných médií na požadovanou hodnotu byla provedena ve studeném médiu před sterilizací buď hydroxidem sodným, nebo kyselinou sírovou, v závislosti na složení média. Hodnota pH média byla upravena na hodnotu pH 4,5 - 6. [19] Pro měření pH byl použit pH metr, a pro úpravu pH hydroxid sodný o koncentraci 1 mol.cm⁻³ a kyselina sírová o koncentraci 1 mol.cm⁻³.

2.2.2 Roztoky pro stanovení celulózy

Pro stanovení celulózy byla připravena 80% kyselina octová naředěním zásobního roztoku 99,8% kyseliny octové. Pro 1000 ml 80% kyseliny octové bylo smícháno 864,5 ml 99,8 % kyseliny octové a naředěno destilovanou vodou do odměrné baňky o objemu 1000 ml.

Připravený roztok kyseliny octové byl dále smíchán s koncentrovanou kyselinou dusičnou v poměru 10:1 (C₂H₄O₂ : HNO₃), tedy 1000 ml C₂H₄O₂ bylo smícháno se 100 ml koncentrované HNO₃.

Další roztokem pro toto stanovení byla 72 % H_2SO_4 , která byla připravena naředěním zásobního roztoku 96 %, H_2SO_4 . Bylo odebráno 667,7 ml 96 % H_2SO_4 a naředěno s destilovanou vodou, poté nalito do 1000 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

2.2.3 Roztoky pro přípravu substrátu

Pro přípravu substrátu byl připraven 2 % w/v roztok H_2SO_4 . Bylo odebráno 11 ml 96 % H_2SO_4 a naředěno destilovanou vodou, poté nalito do 1000 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou na požadovaný objem.

Dále byl připraven 2 % w/v roztok NaOH rozpuštěním 20 g NaOH do 1000 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou vodou.

2.2.4 Pufr

Výběr vhodného pufru se řídí požadovanou hodnotou pH, které má být udržováno. Při volbě pufru je důležité zvážit teplotní rozsah kultivace, protože pH pufru je obvykle vztaženo na pokojovou teplotu a při zvýšení teploty se mění hodnota pKa. [42] Pro hydrolýzu byl zvolen citrát-fosfátový pufr. Z údajů uvedených v tabulce č.8. bylo stanoveno optimální složení roztoku pro různá pH, které odpovídají hodnotám pH 4,8; 5,4; 6,2 a 7. Po promíchání bylo ověřeno $\text{pH} \pm 0,1$. Tento pufr byl dále použit pro hydrolýzu a metody SSF a SHF.

Tabulka č. 8: Hodnoty x odpovídají 2 mol.cm⁻³ roztoku Na₂HPO₄ · 12 H₂O a 1 mol.cm⁻³ roztoku C₆H₈O₇ · H₂O udávané v ml na 100 ml roztoku [59]

pH	0,1 mol.cm ⁻³ citrát (ml)	0,2 mol. cm ⁻³ Na ₂ HPO ₄ (ml)
2.6	44.6	5.4
2.8	42.2	7.8
3.0	39.8	10.2
3.2	37.7	12.3
3.4	35.9	14.1
3.6	33.9	16.1
3.8	32.3	17.7
4.0	30.7	19.3
4.2	29.4	20.6
4.4	27.8	22.2
4.6	26.7	23.3
4.8	25.2	24.8
5.0	24.3	25.7
5.2	23.3	26.7
5.4	22.2	27.8
5.6	21.0	29.0
5.8	19.7	30.3
6.0	17.9	32.1
6.2	16.9	33.1
6.4	15.4	34.6
6.6	13.6	36.4
6.8	9.1	40.9
7.0	6.5	43.6

2.2.5 Složení mobilní fáze pro HPLC

Pro mobilní fázi byl použit 5 mmol.cm⁻³ roztok H₂SO₄. Bylo odebráno 278 μl 96 % H₂SO₄ a smícháno s destilovanou a deionizovanou vodou. Vzniklý roztok byl posléze nalit do 1000 ml odměrné baňky a doplněn destilovanou a deionizovanou vodou na požadovaný objem. Roztok byl promíchán a zfiltrován přes nylonový membránový filtr s velikostí pórů 0,40 ± 0,06 μm. Na závěr byl roztok odplyněn ultrazvukem po dobu 30 minut. [55]

2.2.6 Roztoky pro kalibrační křivky

Kultivační roztok byl připraven podle 2.2.1 Kultivační médium. Kultivace probíhala při teplotách 25, 35, 40, 45 a 50 °C po dobu 16 hodin. Odběry probíhaly každou hodinu. Počet buněk byl stanoven výpočtem z výsledků porovnání turbidimetrie a počítáním buněk v Bürkerově komůrce.

2.2.7 Stanovení počtu buněk počítáním Bürkerovy komůrky

Počet buněk byl stanoven v inokulu inkubovaném při 24°C po 12 hodin. Suspenze byla naředěna kultivačním médiem do pěti různých koncentrací. Toto měření bylo následně využito pro identifikaci počtu buněk v růstové křivce a pro správné zaočkování u metod SSF a SHF.

2.2.8 Stanovení počtu buněk z růstové křivky

Růstová křivka byla stanovena turbidimetricky odběry po 1 hodině. Porovnáním hodnot turbidimetrie a Bürkerovi komůrky umožnilo stanovit přibližné množství buněk při měření růstových křivek a očkování.

2.3 Předúprava papíru na substrát

Předúprava lepenkového papíru byla provedena jak mechanickou, tak chemickou úpravou, pro zajištění dostatečného rozložení tohoto celulólitického materiálu pro usnadnění následné hydrolýzy.

2.3.1 Mechanická úprava

Všechn lepenkový papír byl rozřezán na čtverce o přibližném rozměru 1 – 2 cm² a rozmixován s vodou na kašovitou suspenzi. Následně byla suspenze promyta destilovanou vodou.

2.3.2 Chemická úprava

Pro chemickou úpravu byly použity čtyři různé postupy a to:

1. Vzorek nebyl dále chemicky upravován
2. Vzorek upraven kombinací působení mikrovln a NaOH
3. Vzorek upraven kombinací působení mikrovln a H₂SO₄
4. Vzorek upraven kombinací působení mikrovln, H₂SO₄ a NaOH

Po chemické úpravě byly vzorky zfiltrány na Büchnerově nálevce a promývány do neutrálního pH filtrátu.

Předúprava pomocí mikrovlnné trouby a NaOH

Do kádinky o objemu 600 ml byly vloženy 3 g fyzikálně upraveného papíru, který byl následně rozsuspendován ve 150 ml 2 % w/v NaOH. Celá suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby, která byla spuštěna na plný výkon (700 W) po dobu 10 minut. Po vychladnutí byla suspenze několikrát přefiltrována a rozsuspendována do momentu, kdy filtrát vykazoval neutrální pH. Na promývání a rozsuspendování byla použita destilovaná voda. [24]

Předúprava pomocí mikrovlnné trouby a H₂SO₄

Do kádinky o objemu 600 ml byly vloženy 3 g fyzikálně upraveného papíru, který byl následně rozsuspendován ve 150 ml 2 % w/v H₂SO₄. Celá suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby, která byla spuštěna na plný výkon (700 W) po dobu 8 minut. Po vychladnutí byla suspenze několikrát přefiltrována a rozsuspendována do momentu, kdy filtrát vykazoval neutrální pH. Na promývání a rozsuspendování byla použita destilovaná voda.

Předúprava pomocí mikrovlnné trouby, H₂SO₄ a NaOH

Do kádinky o objemu 600 ml byly vloženy 3 g fyzikálně upraveného papíru, který byl následně rozsuspendován ve 150 ml 2 % w/v H₂SO₄. Celá suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby, která byla spuštěna na plný výkon (700 W) po dobu 8 minut. Po vychladnutí byla suspenze několikrát přefiltrována a rozsuspendována do momentu, kdy filtrát vykazoval neutrální pH. Následně byl koláč převeden a rozsuspendován ve 150 ml 2 % w/v NaOH. Celá suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby, která byla spuštěna na plný výkon (700 W) po dobu 10 minut. Po vychladnutí byla suspenze několikrát přefiltrována a rozsuspendována do momentu, kdy filtrát vykazoval neutrální pH. Na promývání a rozsuspendování byla použita destilovaná voda.

2.3.3 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza probíhala ve 12 Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml. Do každé baňky bylo vloženo 3 g upraveného papíru. Tyto baňky byly uzavřeny a vysterilovány v autoklávu (120 °C po dobu 20 minut). Po vychladnutí byla papírovina v baňkách zalita 50 ml sterilního citrát-fosforečnanového pufru o hodnotách pH 4,8; 5,4; 6,2 a 7. Erlenmeyerovy baňky se suspenzí papíroviny v pufru byly opatrně promíchány krouživými pohyby. K této suspenzi byly následně přidány enzymy, tak aby koncentrace celulázového komplexu v suspenzi odpovídala 6 % (156,5 µl na 50 ml) a 0,6 %

β -glukosidázy (15 μ l na 50 ml). Obsah byl opět jemně promíchán krouživými pohyby a vložen do temperované třepačky na 45°C na 150 rpm po dobu 82 hodin. Z každé baňky byl odebrán vzorek v časových intervalech 0, 2, 4, 8, 12, 24, 28, 34, 48, 52, 58, 72, 76 a 82 hodin. Hydrolytická reakce byla zastavena uložením vzorků do mrazničky. Vzorek byl po rozmražení zcentrifugován při 24000 rpm. Supernatant byl odebrán a zfiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 μ m do vialek. Bylo provedeno následné stanovení koncentrace cukrů ve zfiltrovaném supernatantu pomocí metody HPLC. [48]

2.4 Kvantitativní a kvalitativní zhodnocení substrátu

Kvantitativní a kvalitativní zhodnocení substrátu je důležitým krokem pro stanovení povahy a množství celulóзовých složek biomasy, které byly upraveny předchozími postupy.

2.4.1 Stanovení sušiny u předupraveného papíru

Stanovení sušiny u předupraveného papíru bylo provedeno v žihacím kelímku, který byl sušen v sušárně vyhřáté na 90°C po dobu 1 hodiny. Chladnutí kelímku probíhalo v exikátoru. Po vychladnutí byl kelímek zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Přibližně 0,5 g papírové hmoty bylo zváženo na analytických vahách a přeneseno do kelímku, který byl vložen na 4 hodiny do sušárny vyhřáté na 90°C. Následovalo vychladnutí kelímku v exikátoru a jeho zvážení na analytických vahách. [8] Pro výpočet sušiny byl použit vztah:

$$\text{sušina (\%)} = \frac{w_{\text{kelímekV}} - w_{\text{kelímek}}}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100 \quad (12)$$

Kde $w_{\text{kelímekV}}$ = hmotnost kelímku s vysušeným papírem, $w_{\text{kelímek}}$ = hmotnost kelímku, w_{vzorek} = hmotnost nevysušeného kelímku.

2.4.2 Stanovení popelu

Stanovení popelu bylo provedeno v žihacím kelímku, který byl vysušen v muflové peci vyhřáté na 550°C po dobu 1 hodiny. Kelímek následně chladnul v exikátoru a po zchladnutí byl zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. 1 g papírové hmoty byl zvážen na analytických vahách a přenesen do žihacího kelímku a následně vložen na 3 hodiny do muflové pece vyhřáté na 550°C. Chladnutí kelímku probíhalo v exikátoru. Po vychladnutí byl kelímek zvážen na analytických vahách. Pro výpočet množství popelu byl použit vztah:

$$\text{popel (\%)} = \frac{w_{\text{kelímekV}} - w_{\text{kelímek}}}{w_{\text{vzorek}}} \cdot 100 \quad (13)$$

Kde $w_{\text{kelímekV}}$ = hmotnost kelímku s papírem, $w_{\text{kelímek}}$ = hmotnost kelímku, w_{vzorek} = hmotnost popelu.

2.4.3 Stanovení celulózy

Pro stanovení množství celulózy bylo naváženo 0,8 g předupraveného papíru na analytických vahách a přesunuto do Erlenmeyerovy baňky o objemu 100 ml. Tento papír byl zalit 30 ml směsným roztokem kyseliny octové a dusičné viz. příprava roztoků. Erlenmayerovy baňky byly zabaleny do alobalu, aby docházelo k co nejnižším únikům páry a byly vloženy do vroucí lázně na 1 hodinu.

Po vychladnutí byl vzorek zfiltrován přes fritu s velikostí pórů S4, dále promyt etanolem a usušen v sušárně při 95°C po dobu 4 hodin. Vzorek s fritou byl vložen na 1 hodinu do exikátoru a zvážen na analytických vahách s odečtem váhy frity.

Po zvážení byla celulotická biomasa rozsuspendována v etanolu v Erlenmayerově baňce o objemu 100 ml. Celý obsah etanolu byl ve vodní lázni odpařen. Po odpaření bylo přidáno 100 ml 72 % H₂SO₄. Suspenze byla temperována na třepačce při 30°C na 150 rpm po dobu 1 hodiny. Následně byla suspenze zfiltrována a promyta etanolem na fritě s velikostí pórů S3. Tato fritu byla stejným postupem vysušena a zvážena na analytických vahách.

Výpočet obsahu celulózy

$$\text{celulóza (\%)} = \frac{(m_{S4\text{vzorek}} - m_{S4}) - (m_{S3\text{vzorek}} - m_{S3})}{m_p} \cdot 100 \quad (14)$$

Kde m_{S4} = hmotnost frity S4, $m_{S4\text{vzorek}}$ = hmotnost frity S4 se vzorkem, m_{S3} = hmotnost frity S3, $m_{S3\text{vzorek}}$ = hmotnost frity S3 se vzorkem, m_p = množství papíru.

2.5 Simultánní sacharifikace a fermentace – SSF

Papíry s různými úpravami o hmotnosti 3 g byly vloženy do 100 ml Erlenmayerových baněk vždy po 4 sériích pro každou úpravu (bez úpravy, H₂SO₄, NaOH a H₂SO₄ s NaOH). Do každé série bylo nalito 50 ml. pufru o hodnotách pH 4,8; 5,4; 6,2 a 7. Pufr byl obohacen složkami média bez zdroje glukózy.

Erlenmayerovy baňky se suspenzí papíroviny a pufru byly opatrně promíchány krouživými pohyby. K suspenzi byly přidány enzymy do dosažení výsledné koncentrace 6 % celulázového komplexu (156,5 μl na 50 ml) a 0,6 % β-glukosidázy (15 μl na 50 ml) v suspenzi. Obsah byl opět jemně promíchán krouživými pohyby a inokulován 50 μl suspenze kvasinek kmene *Kluyveromyces Marxianus* CCY 51–1–1. Inokulované baňky byly vloženy do temperované třepačky na 45°C na 150 rpm po dobu 82 hodin. Z každé baňky byly odebrány vzorky v časových intervalech 0, 2, 4, 8, 12, 24, 28, 34, 48, 52, 58, 72, 76 a 82 hodin.

Enzymatická reakce a kultivace byly zastaveny uložením vzorků do mrazničky. Vzorky byly po rozmražení a zcentrifugovány při 24000 rpm. Získaný supernatant byl odebrán a zfiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 μm do vialek. Byl stanovena koncentrace cukrů ve zfiltrovaném supernatantu pomocí metody HPLC.

2.6 Separovaná enzymatická hydrolýza a fermentace – SHF

Pro separovanou enzymatickou hydrolýzu byly různě upravené papíry o hmotnosti 3 g vloženy do 100 ml Erlenmayerových baněk vždy po 4 sériích pro každou úpravu (bez úpravy, H_2SO_4 , NaOH a H_2SO_4 s NaOH). Do každé série bylo nalito 50 ml. pufru o hodnotách pH 4,8; 5,4; 6,2 a 7. Pufř byl obohacen složkami média bez zdroje glukózy.

Erlenmayerovy baňky se suspenzí papíroviny a pufru byly opatrně promíchány krouživými pohyby. K suspenzi byly přidány enzymy do dosažení výsledné koncentrace 6 % celulóze komplexu (156,5 μl na 50 ml) a 0,6 % β -glukosidázy (15 μl na 50 ml) v suspenzi. Obsah byl opět jemně promíchán krouživými pohyby a vložen do temperované třepačky na 50°C na 150 rpm po dobu 82 hodin.

Po uplynutí stanovené doby byly vzorky inokulovány 50 μl suspenze kvasinek *Kluyveromyces Marxianus* CCY 51-1-1 a vložen do temperované třepačky na 25°C na 150 rpm po dobu 82 hodin. Z každé baňky byl odebrán vzorek v časových intervalech 0, 1, 4, 6, 8, 10, 12, 22, 26, 30, 36, 42, a hodin.

Enzymatická reakce a kultivace byly zastaveny uložením vzorků do mrazničky. Vzorky byly po rozmražení a zcentrifugovány při 24000 rpm. Získaný supernatant byl odebrán a zfiltrován přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 μm do vialek. Byla stanovena koncentrace cukrů ve zfiltrovaném supernatantu pomocí metody HPLC.

2.7 Stanovení cukru a etanolu pomocí metody HPLC

Pro stanovení byla použita mobilní fáze roztoku H_2SO_4 o koncentraci 5 mmol.l^{-1} . Průtok mobilní fáze byl 1 ml.min^{-1} . Termostat kolony byl nastaven na 40°C a objem nástřiku na 20 μl . Vzorek byl nastříknut pomocí autosampleru HT 300 a pomocí dávkovací smyčky. Pro detekci byl použit diferenciální refraktometr RID K 101. Čas izokratické eluce byl nastaven na 30 minut. [55]

Nástřik na kolonu byl proveden po třech sériích, aby se zamezilo chybám v měření.

Kvalitativní hodnocení bylo provedeno na základě retenčních časů a kvantitativní stanovení pomocí softwaru Clarity Chromatography Station 2.6.6.574.

Vyhodnocení bylo provedeno pomocí metody kalibrační křivky, kdy pomocí porovnání se

standardními roztoky byly určeny jednotlivé koncentrace. [55] Kalibrační přímku lze popsat vztahem:

$$x_i = a + bc_i \quad (15)$$

Kde x_i = je hodnota veličiny, X = koncentraci c_i , b = směrnice kalibrační přímky vyjadřující citlivost metody, a = úsek posunutí na ose y . (Statisticky $y = 0$) [55]

Výpočet koncentrací:

$$c_x = \frac{A_i}{A_s} \cdot c_s \quad (16)$$

Kde c_x = koncentrace analytu, A_i = plocha stanovované látky o neznámé koncentraci, A_s = plocha standardu, c_s = koncentrace standardu.

Stanovení výsledného množství produktu v závislosti na úbytku substrátu bylo statisticky vyhodnoceno na základě průměrných hodnot ze tří měření. Byl vypočten interval chybovosti, střední hodnoty (funkce confidence) s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ a chybových úseček u grafického zobrazení.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Stanovení vlastností substrátu

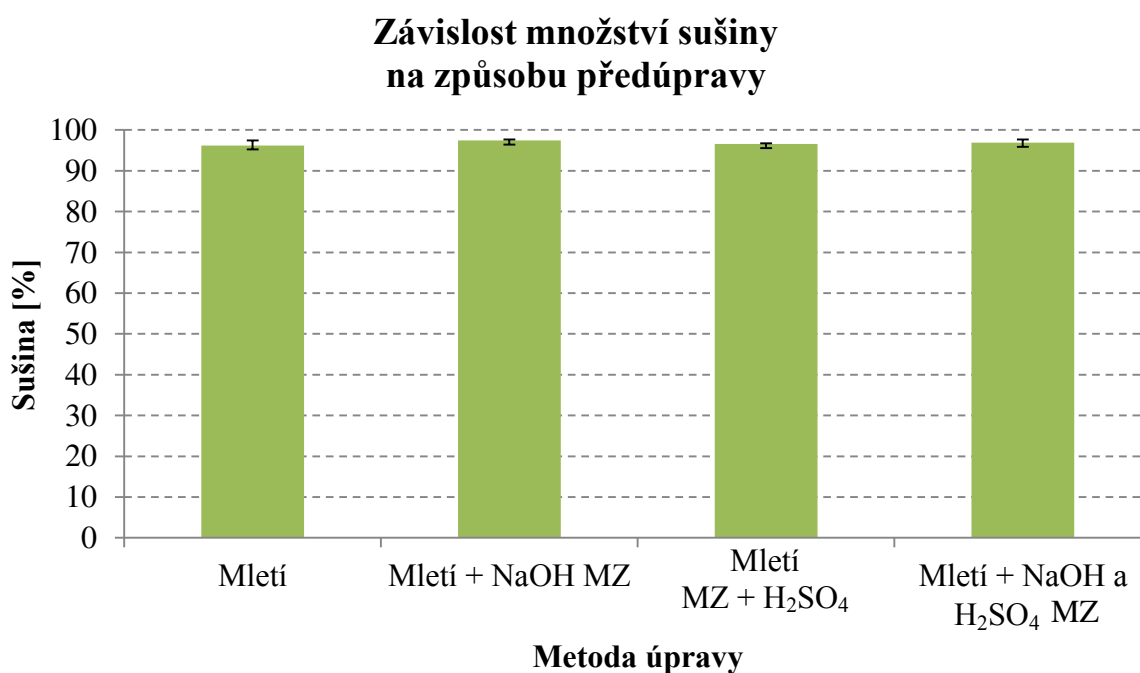
U substrátu bylo stanoveno množství sušiny, popelu a celulózy. Z výsledků bylo vypočítáno teoretické množství glukózy, které by mohlo být dosaženo při úplné hydrolyze celulózy obsažené v substrátu. Bylo vypočítáno také množství etanolu, který by teoreticky mohl být získán při konverzi se 100% účinností. Vypočítané teoretické hodnoty sloužily pro porovnání efektivity různých předúprav lignocelulózového substrátu, kterým byla odpadní lepenka.

3.1.1 Stanovení sušiny u předupraveného papíru

Stanovení sušiny předupraveného papíru bylo vypočítáno z rovnice číslo (13). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 9 a graficky znázorněny v grafu na obrázku č. 18.

Tabulka č. 9: Závislost množství sušiny na způsobu předúpravy

Forma úpravy	[%] sušiny
Mletí	96,21±1,21
Mletí + NaOH mikrovlnné zpracování	97,42±0,25
Mletí +H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	96,54±0,21
Mletí + NaOH a H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	96,88±0,81



Obrázek č. 18: Závislost množství sušiny na způsobu předúpravy *Mikrovlnné záření

Množství sušiny se lišilo jen velmi málo mezi různými způsoby úpravy. Nejvyšší obsah sušiny byl u lepenky upravené mikrovlnami a NaOH (97,42 %) a nejnižší hodnota náležela lepence upravené pouze mletím (96,21 %). Rozdíl mezi nimi činil pouhé 1,21 %.

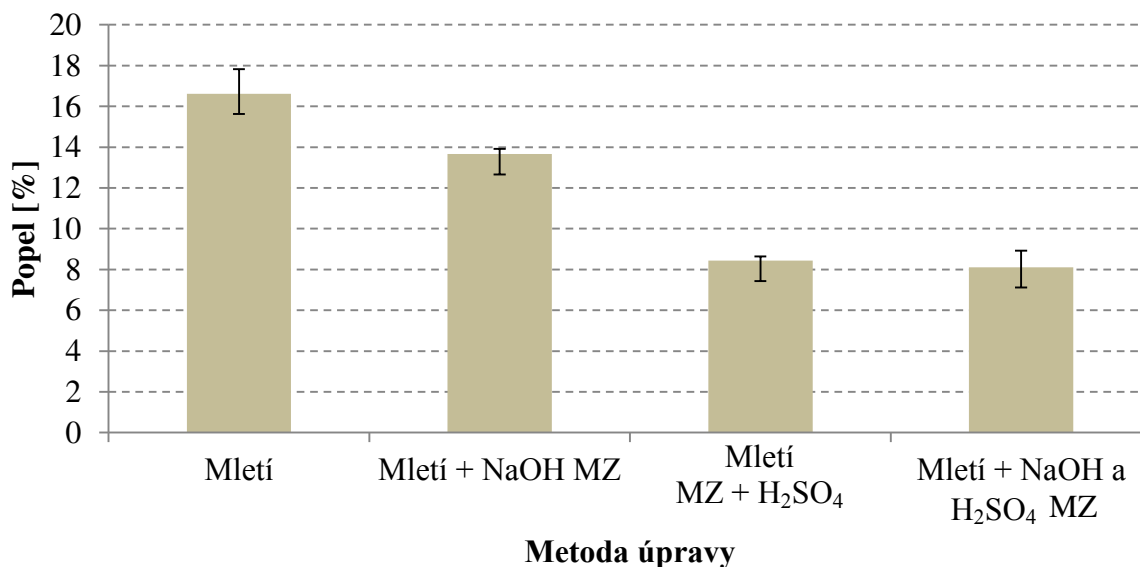
3.1.2 Stanovení popelu u předupraveného papíru

Stanovení popelu předupraveného papíru bylo vypočítáno z rovnice číslo (14). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 10 a graficky znázorněny v grafu na obrázku č. 19.

Tabulka č. 10: Závislost množství popelu na způsobu předúpravy

Forma úpravy	Popel [%]
Mletí	16,62 ± 0,36
Mletí + NaOH mikrovlnné zpracování	13,66 ± 0,17
Mletí + H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	8,43 ± 1,06
Mletí + NaOH a H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	8,11 ± 0,86

Závislost množství popelu na způsobu předúpravy



Obrázek č. 19: Závislost množství popelu na způsobu předúpravy *Mikrovlnné záření

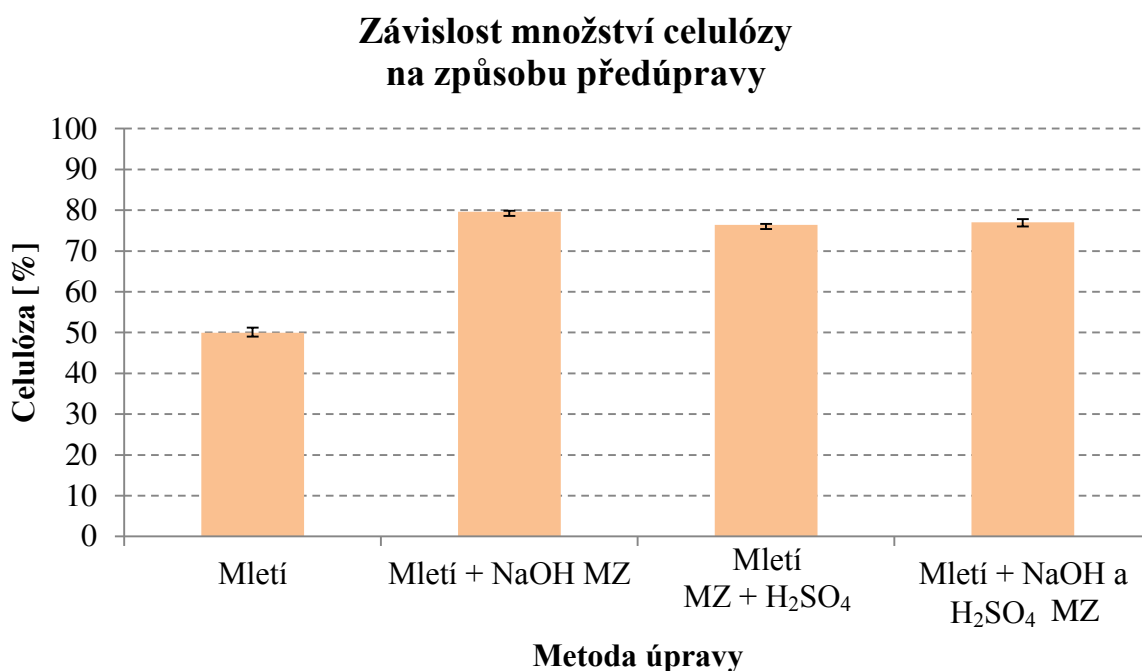
Nejvyšší obsah popelu měla lepenka připravená pouze mletím (16,62 %), následovala lepenka upravená mikrovlnami a NaOH (13,66 %). Nejnižší hodnoty byly naměřeny u úpravy mikrovlnami a H₂SO₄ (8,43 %) a úpravou mikrovlnami H₂SO₄ a NaOH (8,11 %).

3.1.3 Stanovení celulózy u předupraveného papíru

Stanovení množství celulózy u předupraveného papíru je důležité pro výpočet teoretického množství glukózy vzniklé hydrolýzou. Porovnáním teoretického a získaného množství glukózy lze zjistit s jakou úspěšností byla celulóza dekrystalizována a tím i zhodnotit efektivitu hydrolýzy u různých předúprav. Stanovení množství celulózy předupraveného papíru bylo vypočítáno z rovnice číslo (15). Výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 11 a graficky znázorněny v grafu na obrázku č. 20.

Tabulka č. 11: Závislost množství celulózy na způsobu předúpravy

Forma úpravy	Celulóza [%]
Mletí	49,98 ± 1,23
Mletí + NaOH mikrovlnné zpracování	79,64 ± 1,06
Mletí + H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	76,41 ± 0,87
Mletí + NaOH a H ₂ SO ₄ mikrovlnné zpracování	77,03 ± 0,98



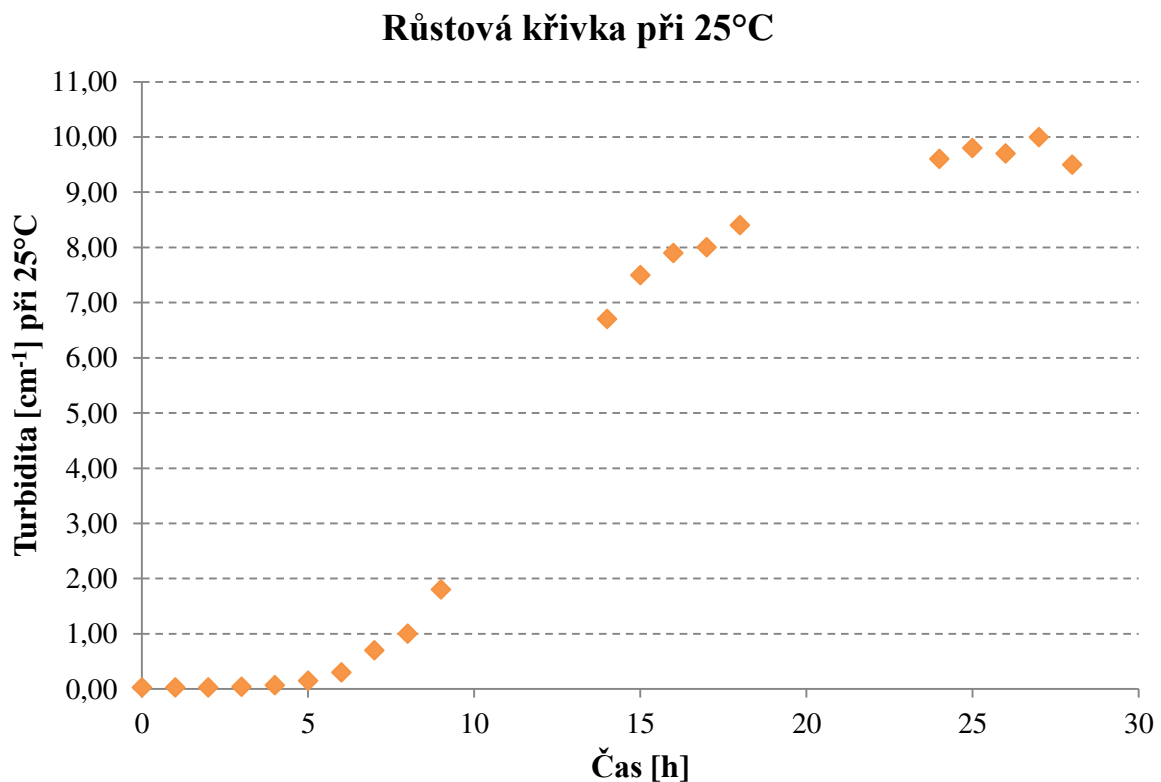
Obrázek č. 20: Závislost množství celulózy na způsobu předúpravy *Mikrovlnné záření

Množství celulózy u různých předúprav se nejvíce lišilo ze všech tří stanovovaných parametrů kvantitativní analýzy substrátu. Neupravená lepenka obsahovala pouze 48,98 % celulózy ve srovnání lepenkou upravenou mikrovlnami a NaOH, která obsahovala 79,64 % celulózy. Úpravou lepenky mikrovlnami, H₂SO₄ a NaOH bylo dosaženo 77,03 % obsahu celulózy a lepenka upravená mikrovlnami a H₂SO₄ obsahovala 76,41 % celulózy.

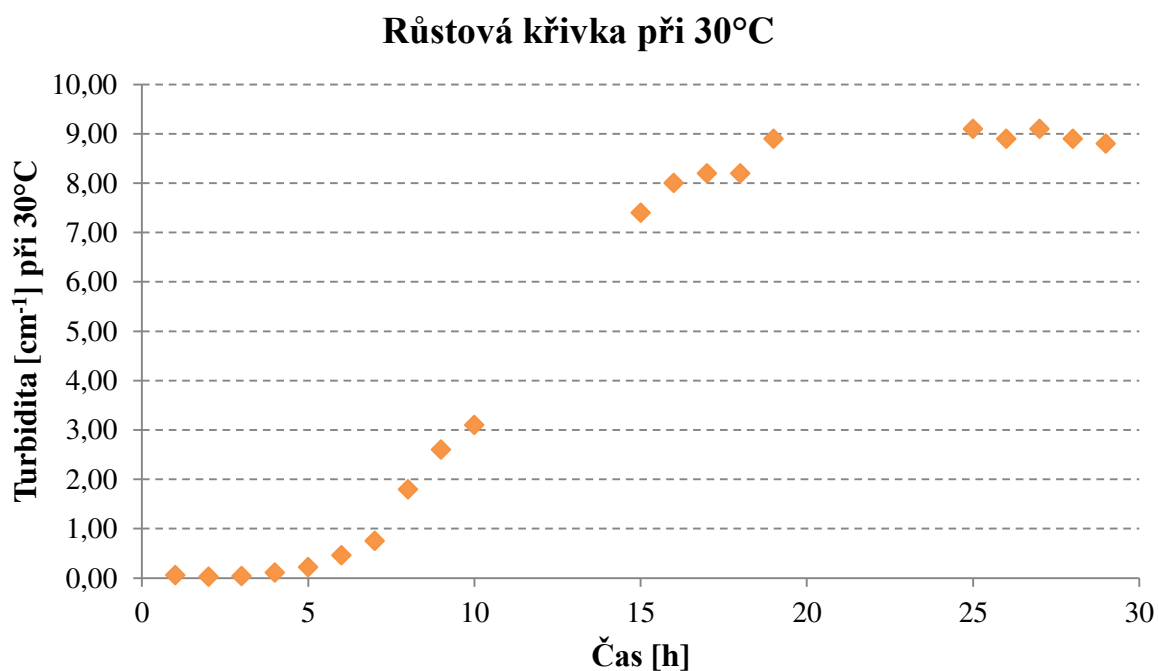
3.2 Stanovení růstové křivky

Optimální teplota růstu pro kvasinku *Kluyveromyces Marxianus* CCY 51–1–1 je podle průvodních informací sbírky 24 – 25°C. [35] [57]

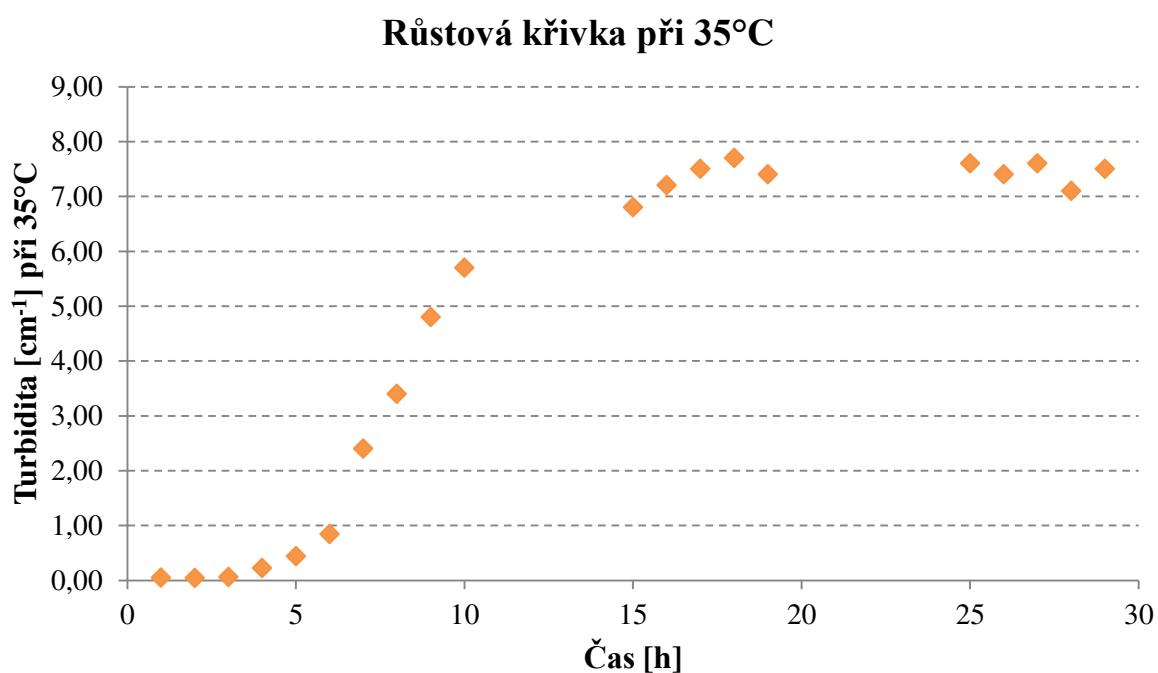
Stanovení růstové křivky kvasinky *K. Marxianus* probíhalo při různých teplotách. Vzhledem k velkým rozdílům v koncentracích buněk jsou kultivace uvedeny jednotlivě a poté společně. Tyto informace dále sloužily k rozhodnutí, v jakém čase je optimální inokulovat při metodě SSF a metodě SHF. Dalším parametrem bylo stanovení nejvyšší možné teploty, při které lze kvasinky kultivovat.



Obrázek č. 21: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 25°C



Obrázek č. 22: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 30 °C

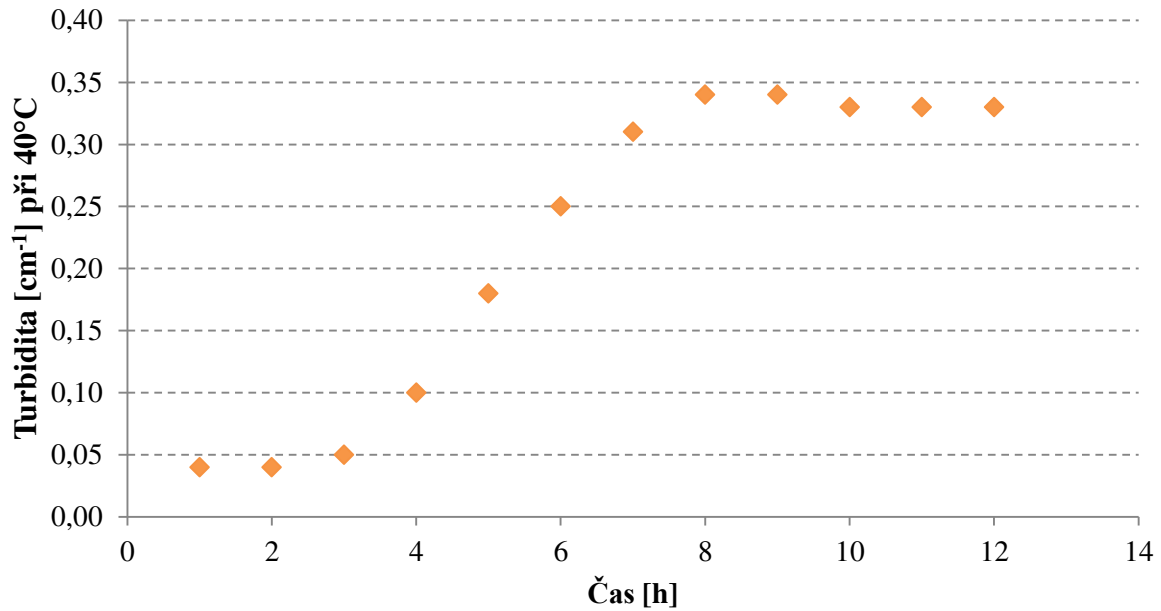


Obrázek č. 23: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 35 °C

Zhodnocením výsledků růstových křivek byla potvrzena optimální teplota růstu při 25°C (obrázek č. 21), kdy konečná koncentrace dosahovala nejvyšších hodnot. U vyšších teplot se exponenciální fáze dostavovala dříve, než u nižších teplot.

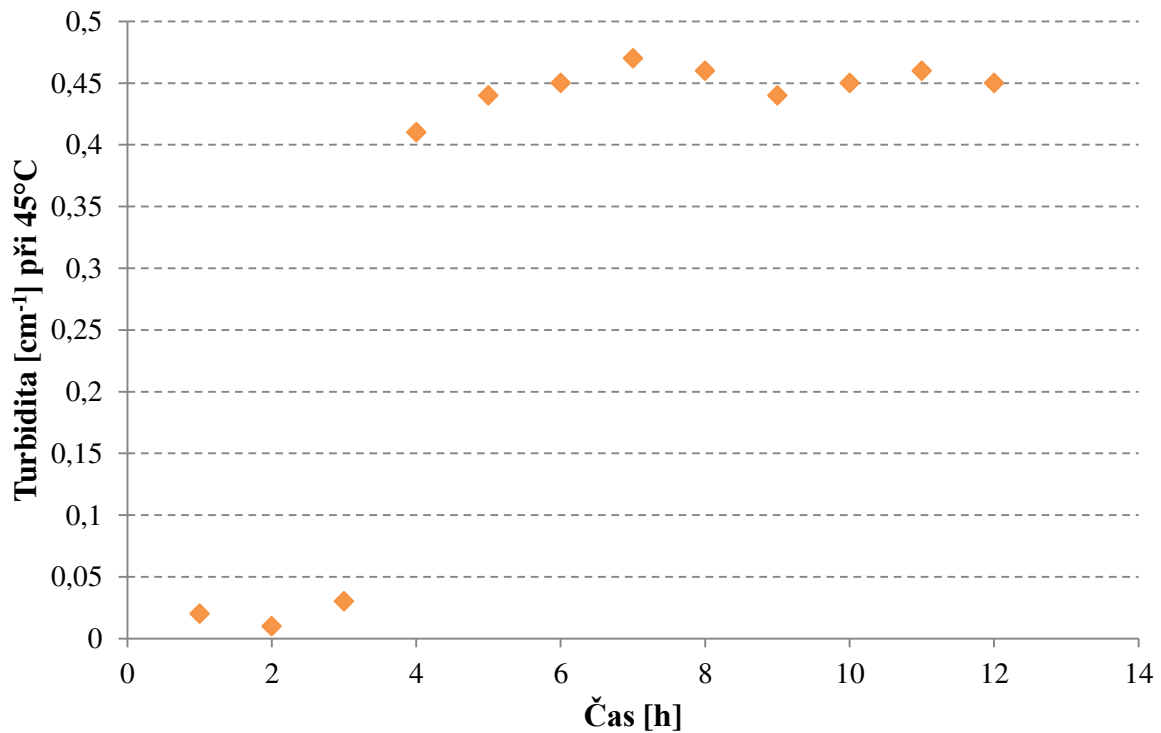
Je patrné, že u nejnižší teploty 25°C bylo dosaženo nejvyššího množství kvasinkové biomasy až při 27 hodinách zatímco u kultivacích při teplotách 30°C a 35°C bylo dosaženo nejvyššího množství kvasinkové biomasy ve 26 hodině (obrázky č. 22 a 23).

Růstová křivka při 40°C



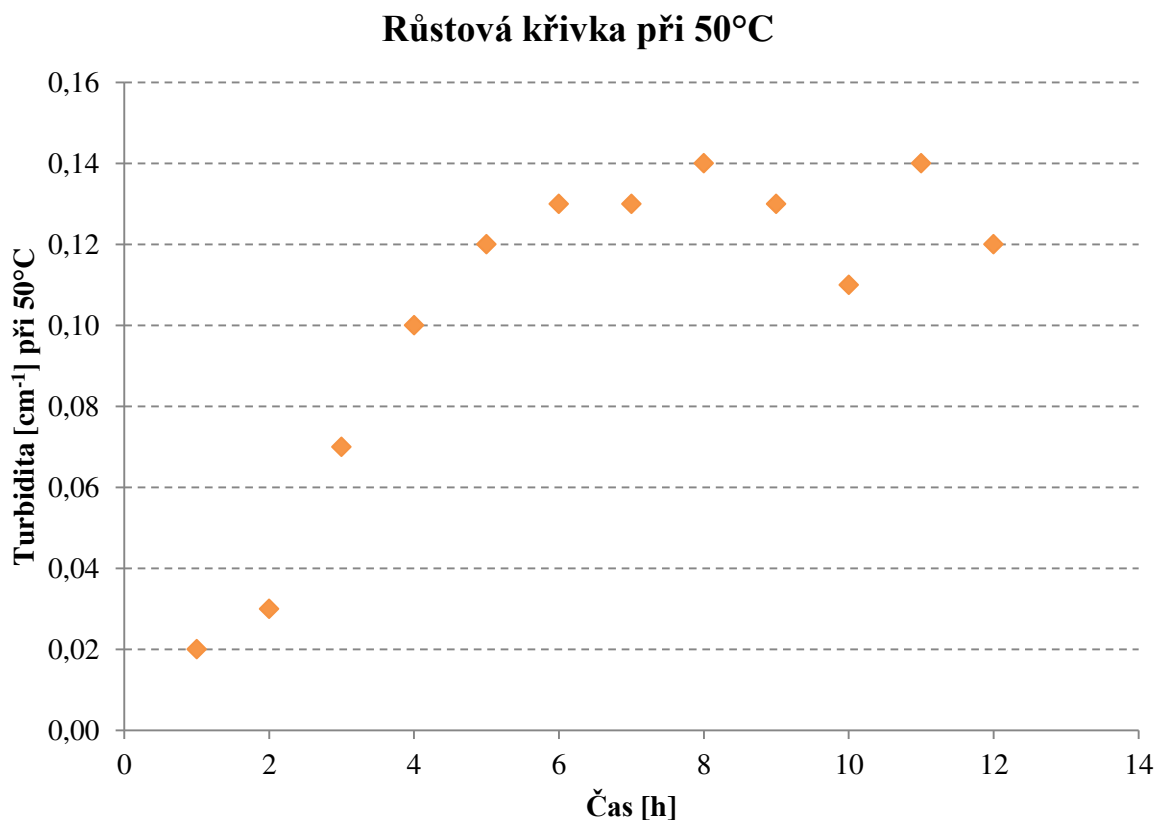
Obrázek č. 24: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 40 °C

Růstová křivka při 45°C



Obrázek č. 25: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 45 °C

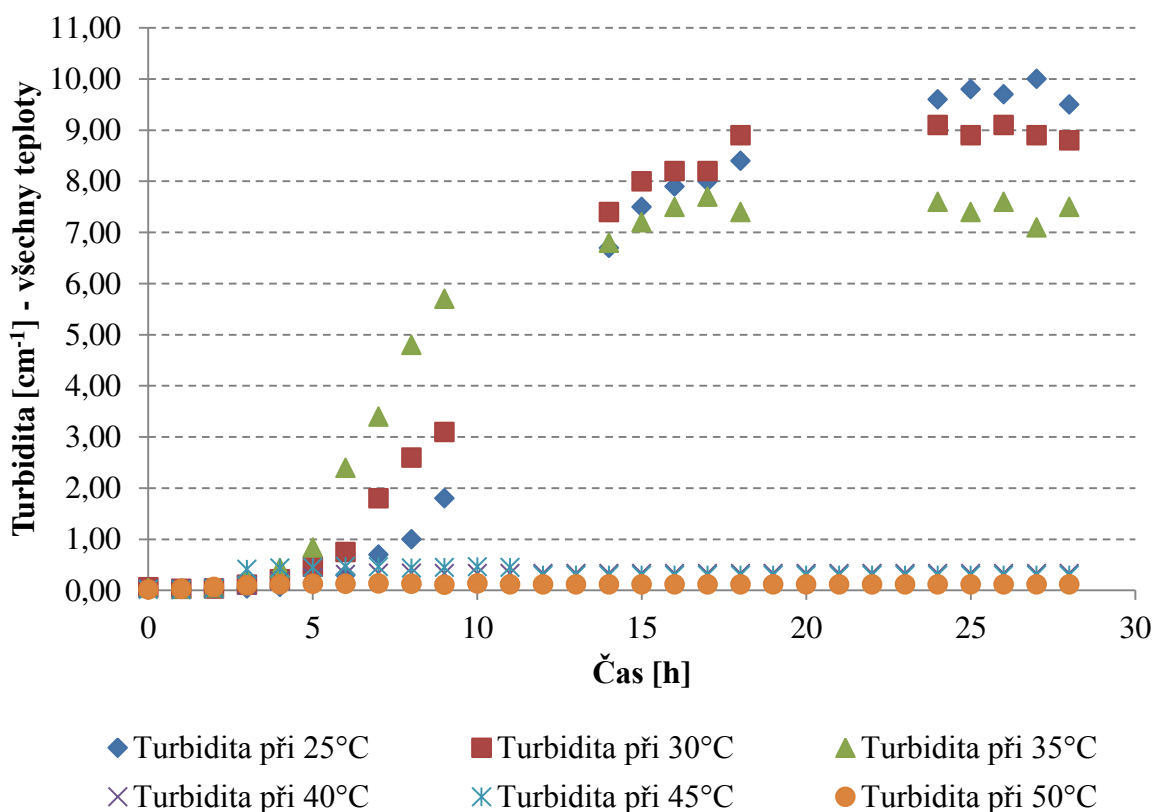
Kultivace při 40 a 45°C probíhala z počátku s velmi rapidním nárůstem a buňky rostly do nižší koncentrace v porovnání s 25, 30 a 35°C. Po dosažení maximální hodnoty mezi 7 - 8 hodinou, buňky udržovaly stabilní koncentraci a nedocházelo k zřetelnému odumírání (obrázky č. 24 a 25).



Obrázek č. 26: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 50 °C

U kultivace, která probíhala při 50°C byl zaznamenán nárůst biomasy, kde po 6 hodinách bylo zaznamenáno viditelné odumírání kvasinek. Docházelo k jejich usazování na dně. Tomu nasvědčují i kolísající hodnoty turbidity v 7 – 12 hodině kultivace (obrázek č. 26).

Růstová křivka - všechny teploty



Obrázek č. 27: Grafické vyjádření – Růstová křivka pro všechny teploty

Na obrázku číslo 27 jsou porovnány růstové křivky naměřené u jednotlivých kultivací provedených při teplotách 25, 30, 35, 40, 45 a 50 °C. Z uvedeného grafu vyplývá, že teplotní optimum pro kultivaci kvasinky *K. marxianus* je v rozmezí teplot 24 – 25 °C, ale roste v malé koncentraci i při 50 °C. Tohoto poznatku bylo využito pro přípravu podmínek pro metodu SSF, u které byla zvolena teplota kultivace 45 °C pro optimální enzymatickou konverzi lignocelulózového materiálu.

3.2.1 Odhad intervalu fází růstu

Tabulka č. 12: Intervaly fází růstu

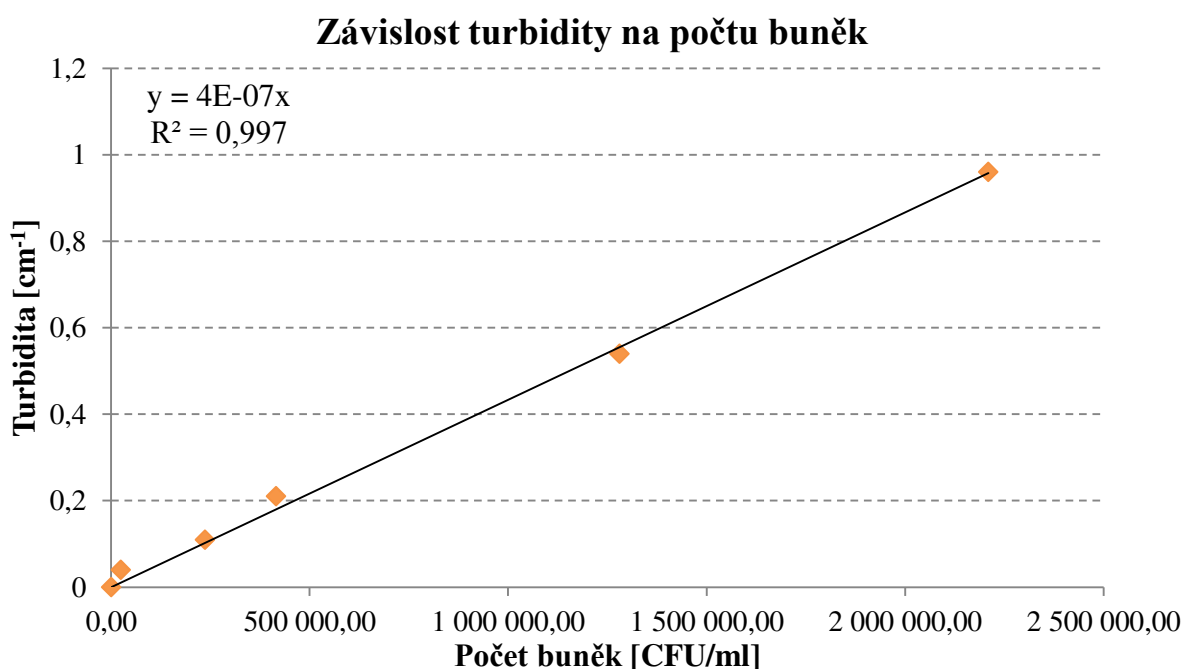
Teplota	Lag fáze [h]	Exponenciální fáze [h]	Fáze odumírání [h]
25 °C	0–8	8–25	25–28
30 °C	0–8	8–20	20–27
35 °C	0–7	7–18	18–25
40 °C	0–3	4–8	8–10
45 °C	0–2	2–5	5–7
50 °C	0–2	2–5	5–7

Z tabulky č. 12 je zřetelné, že při vyšší teplotě nastává exponenciální fáze růstu dříve než u nižších teplot a se vzrůstající teplotou růst končí v kratším časovém intervalu.

Pro odhad počtu buněk bylo provedeno jejich počítání na Bürkerově komůrce a v závislosti na turbiditě a byla sestrojena kalibrační křivka. Graficky je znázorněna na obrázku č. 28.

Tabulka č. 13: Závislost turbidity na počtu buněk

Ředění	Turbidita	CFU/ml
10	0,96	2210000
20	0,54	1281000
50	0,21	415000
100	0,11	236000
200	0,04	2400



Obrázek č. 28: Grafické vyjádření – Závislost turbidity na počtu buněk

3.3 HPLC vyhodnocení

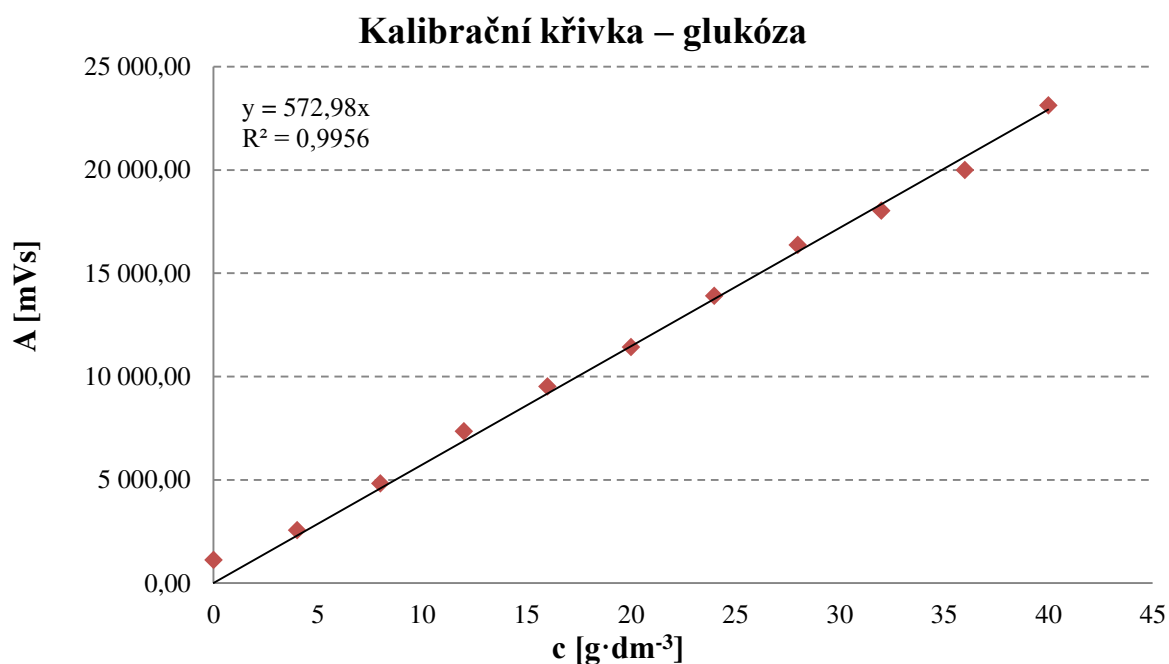
Vyhodnocení chromatogramů naměřených dat pomocí metody HPLC bylo provedeno pomocí metody kalibračních křivek. Pro vyhodnocení byly použity roztoky etanolu a glukózy o známé koncentraci, ze kterých byly vyneseny grafy pro závislost refrakčního indexu na koncentraci. Z těchto údajů byla sestrojena kalibrační křivka, jejíž rovnice posloužila pro výpočet koncentrací etanolu a glukózy ve vzorcích v závislosti na jejich refrakčním indexu. Vzorky byly nachystány podle kapitoly 2.7.

3.3.1 Kalibrační křivky pro HPLC vyhodnocení

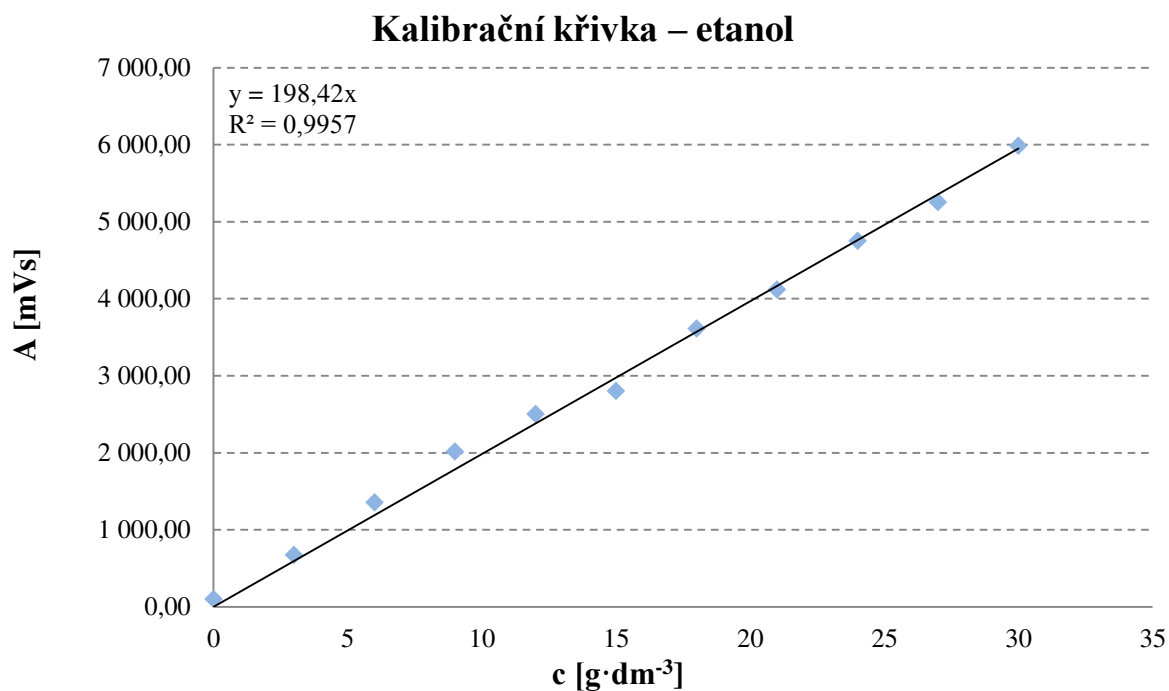
Kalibrační křivky pro stanovení koncentrace glukózy a etanolu pomocí metody HPLC jsou uvedeny na obrázcích č. 29 a 30. Naměřená a zpracovaná data kalibračních křivek etanolu a glukózy jsou uvedena v tabulce č. 14.

Tabulka č. 14: Kalibrační křivky glukózy a etanolu

Glukóza			Etanol		
c [g.cm ⁻³]	A [mVs]	Odchyłka	c [g.cm ⁻³]	A [mVs]	Odchyłka
0	1105	± 23	0	101	± 15
4	2555	± 31	3	674	± 41
8	4810	± 56	6	1355	± 36
12	7337	± 21	9	2018	± 87
16	9514	± 104	12	2504	± 29
20	11424	± 66	15	2804	± 33
24	13895	± 45	18	3615	± 45
28	16365	± 12	21	4121	± 77
32	18021	± 65	24	4752	± 12
36	19981	± 43	27	5253	± 88
40	23110	± 77	30	5987	± 95



Obrázek č. 29: Kalibrační křivka – glukóza



Obrázek č. 30: Kalibrační křivka – etanol

3.3.2 Enzymatická hydrolýza

Data získaná enzymatickou hydrolýzou sloužila pro stanovení účinnosti hydrolýzy lignocelulotického materiálu na glukózu.

Tabulky č. 15-19 obsahují naměřené koncentrace glukózy v závislosti na čase a pH enzymatické hydrolýzy u jednotlivých předúprav, kterými byly úprava pouze mletím, úprava působením mikrovln a NaOH, úprava působením mikrovln a H₂SO₄ a úprava působením mikrovln, H₂SO₄ a NaOH.

Tabulka č. 15: Enzymatická hydrolyza – úprava mletím

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolyze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,7	0,58	0,32	0,44
2	7,52	3,28	2,91	3,39
4	9,45	5,5	4,07	3,58
12	15,19	8,23	9,08	4,8
24	18,73	9,98	10,85	4,8
28	20,13	14,55	12,17	4,86
34	20,69	18,85	13,5	5,31
48	23,83	19,78	14,45	5,81
52	26,16	20,5	15,2	5,8
58	27,89	24,54	15,26	6,36
72	29,56	25,3	16,14	6,56
76	30,01	26,16	16,53	7,09
82	31,13	26,31	17,15	6,73

Tabulka č. 16: Enzymatická hydrolyza – úprava mikrovlnami a NaOH

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolyze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,81	0,70	0,50	0,61
2	8,85	5,46	3,32	2,60
4	10,52	6,04	5,00	3,80
12	20,21	15,03	12,24	7,13
24	25,29	24,16	19,09	8,99
28	26,05	24,73	19,09	9,36
34	26,67	24,68	19,79	11,27
48	27,53	25,88	19,09	10,14
52	32,48	26,58	17,71	10,21
58	32,29	26,59	19,78	10,52
72	34,77	25,89	20,23	10,78
76	35,26	30,07	21,89	10,85
82	35,52	30,66	22,19	11,32

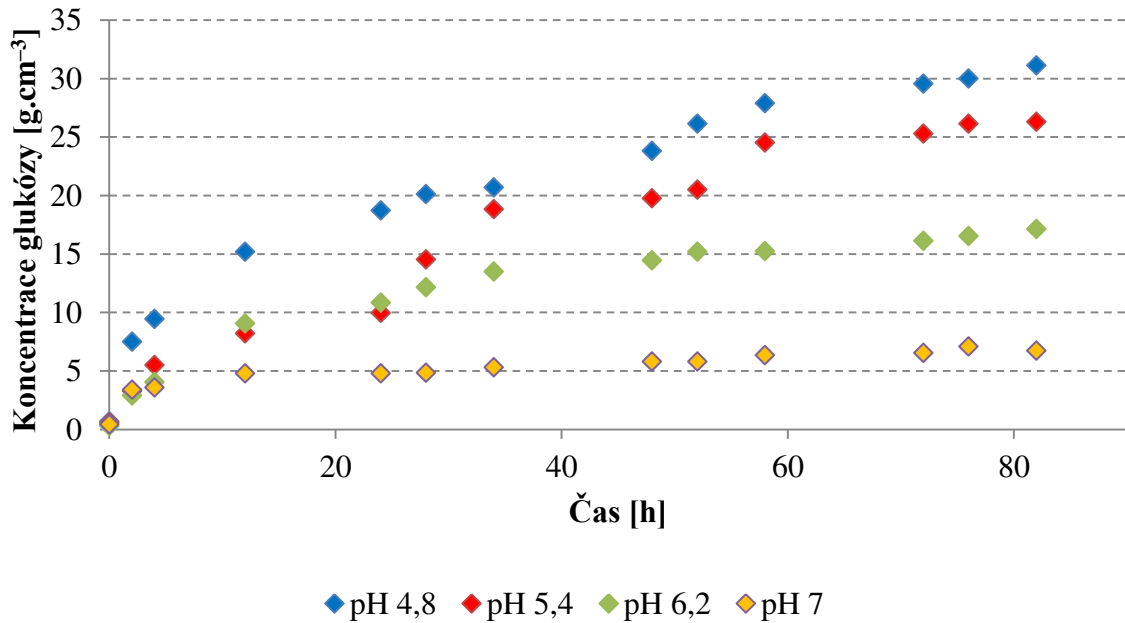
Tabulka č. 17: Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H_2SO_4

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,30	0,81	0,74	0,16
2	10,52	6,04	5,00	3,80
4	14,57	11,29	8,65	5,50
12	22,43	20,74	16,43	5,81
24	27,56	22,63	17,74	7,70
28	29,09	26,00	18,47	8,27
34	29,91	26,11	19,99	9,06
48	33,34	27,48	20,48	9,59
52	33,49	29,08	22,11	9,98
58	34,76	29,87	25,89	11,28
72	36,06	30,44	27,67	11,95
76	36,62	29,72	24,72	11,94
82	37,34	31,12	24,99	12,23

Tabulka č. 18: Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H_2SO_4 a NaOH

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,70	0,50	0,31	0,71
2	9,46	5,29	4,44	3,46
4	14,45	1,08	10,68	5,82
12	20,77	14,65	13,95	6,39
24	25,30	12,20	14,46	7,70
28	28,96	15,01	15,66	7,98
34	30,79	19,05	17,17	9,56
48	31,35	20,42	18,47	9,65
52	32,29	21,57	18,96	10,16
58	33,35	22,77	20,88	11,28
72	32,83	25,11	21,57	11,29
76	33,98	26,61	21,83	11,27
82	33,59	26,99	22,78	10,67

Enzymatická hydrolýza – úprava mletím

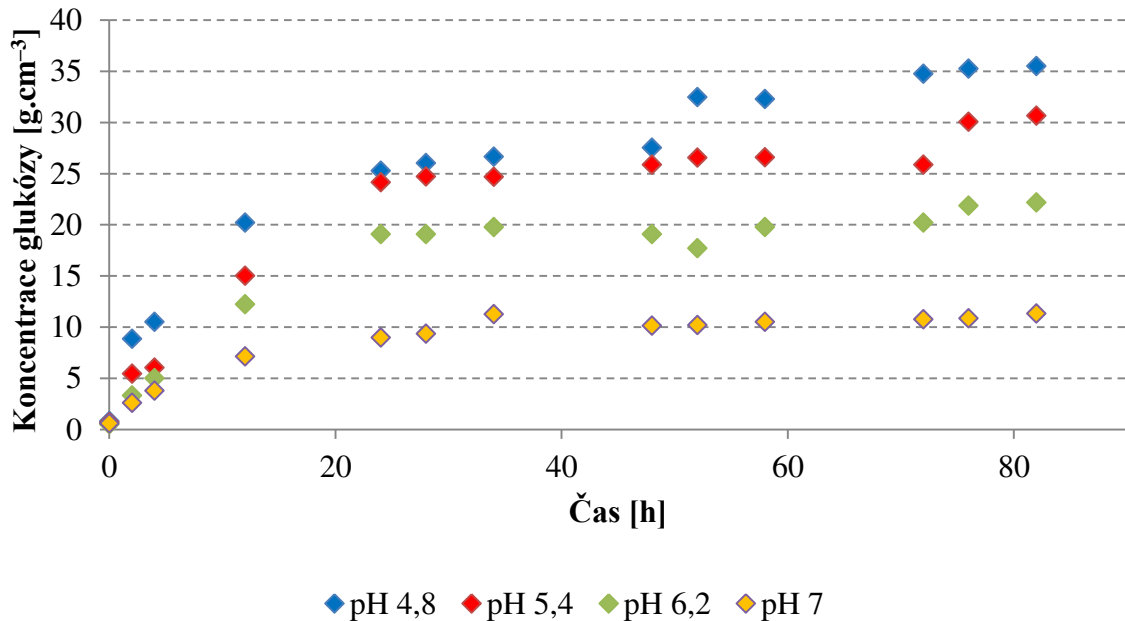


Obrázek č. 31: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mletím

U enzymatické hydrolýzy lepenky předupravené mletím (viz. obrázek č. 31) bylo maximum konverze dosaženo u pH 4,8 a enzymová aktivita se snižovala se zvyšujícím se pH. Nejnižší stupeň konverze na glukózu byl pozorován u hydrolýzy v pufru o pH 7.

Výpočtem bylo stanoveno, že při pH 5,5 bylo dosaženo přibližně 84,5 %, při pH 6,2 bylo dosaženo 55,1 % a při pH 7 bylo dosaženo 21,6 % aktivity dosažené u hydrolýzy při pH 4,8.

Enzymatická hydrolyza – úprava mikrovlnami a NaOH

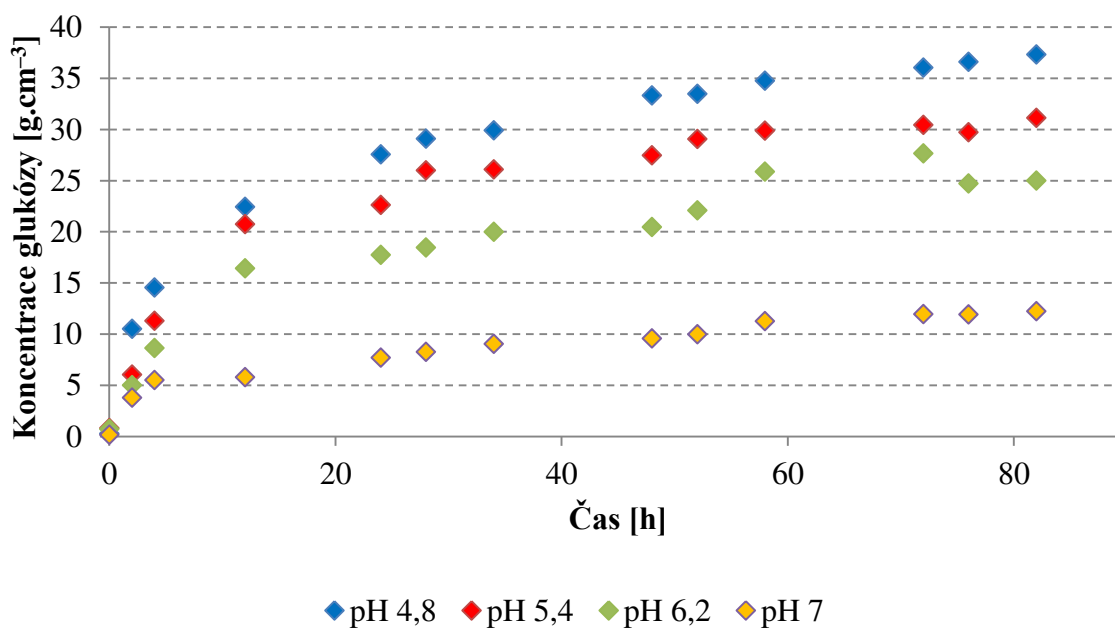


Obrázek č. 32: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolyza – úprava mikrovlnami a NaOH

U enzymatické hydrolyzy lepenky předupravené mletím a mikrovlnami za přítomnosti 2% w/v NaOH (viz. obrázek č. 32) bylo maximum konverze na glukózu dosaženo u pH 4,8 a enzymová aktivita se snižovala se zvyšujícím se pH. Nejnižší stupeň konverze byl pozorován u hydrolyzy v pufru o pH 7.

Výpočtem bylo stanoveno, že při pH 5,5 bylo dosaženo přibližně 86,3 %, při pH 6,2 bylo dosaženo 62,4 % a při pH 7 bylo dosaženo 31,9 % aktivity dosažené u hydrolyzy při pH 4,8.

Enzymatická hydrolyza – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

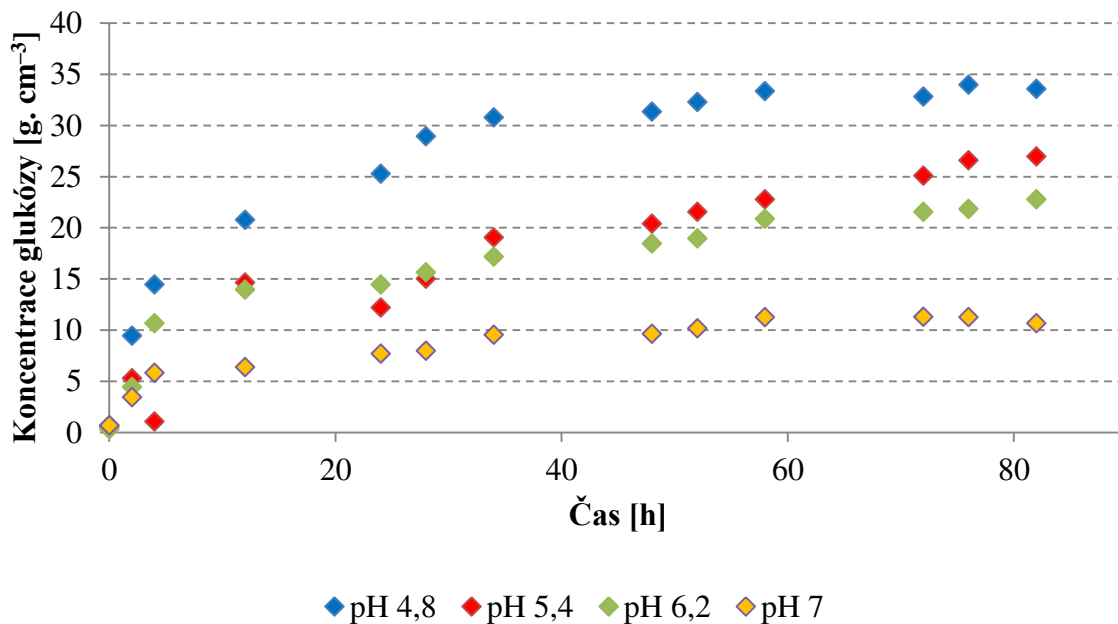


Obrázek č. 33: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolyza – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

U enzymatické hydrolyzy lepenky předupravené mletím a mikrovlnami za přítomnosti 2% w/v NaOH (viz. obrázek č. 33) bylo maximum konverze dosaženo u pH 4,8 a enzymová aktivita se snižovala se zvyšujícím se pH. Nejnižší stupeň konverze na glukózu byl pozorován u hydrolyzy v pufru o pH 7.

Výpočtem bylo stanoveno, že při pH 5,5 bylo dosaženo přibližně 83,3 %, při pH 6,2 bylo dosaženo 66,9 % a při pH 7 bylo dosaženo 32,7 % aktivity dosažené u hydrolyzy při pH 4,8.

Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H_2SO_4 a NaOH



Obrázek č. 34: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H_2SO_4 a NaOH

U enzymatické hydrolýzy lepenky předupravené mletím a mikrovlnami za přítomnosti 2% w/v NaOH (viz. Obrázek č. 34) bylo maximum konverze dosaženo u pH 4,8 a enzymová aktivita se snižovala se zvyšujícím se pH. Nejnižší stupeň konverze na glukózu byl pozorován u hydrolýzy v pufru o pH 7.

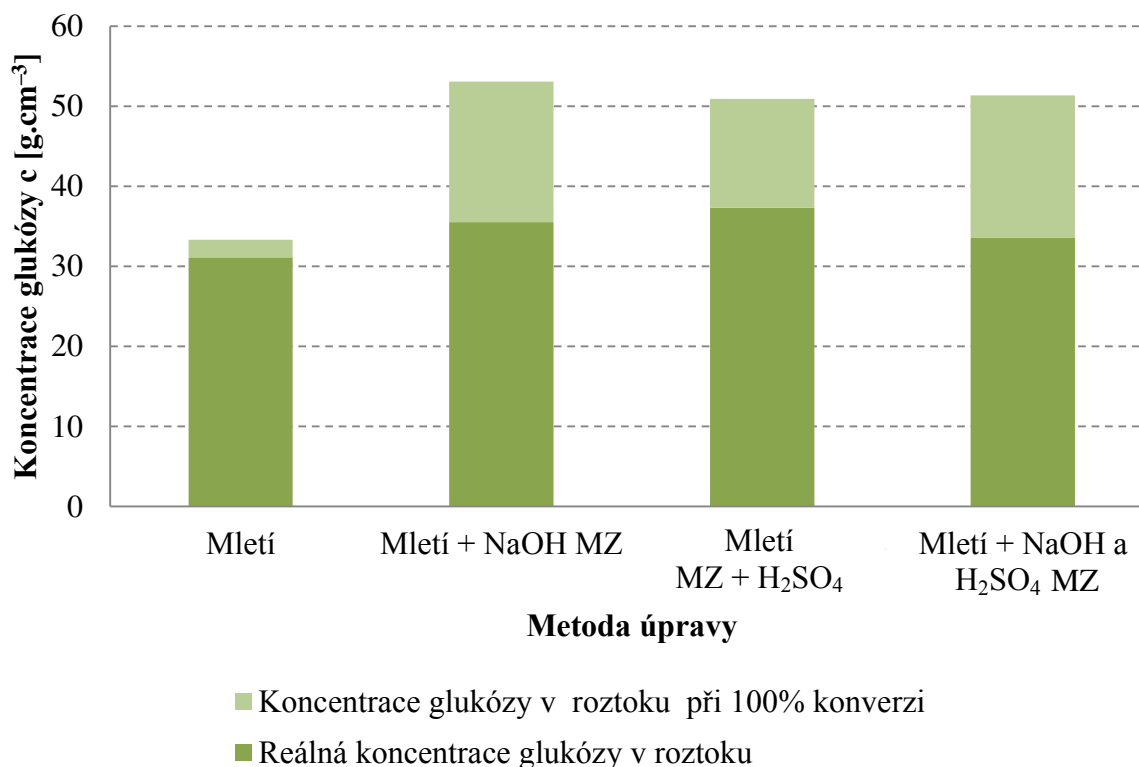
Výpočtem bylo stanoveno, že při pH 5,5 bylo dosaženo přibližně 80,4 %, při pH 6,2 bylo dosaženo 67,8 % a při pH 7 bylo dosaženo 31,8 % aktivity dosažené u hydrolýzy při pH 4,8.

Naměřená data z obrázků č. 31-34 potvrzují údaj od společnosti Novozymes, která enzymy vyrobila a uvádí optimální pH 4,8 pro celulázový komplex. [58] Dále je z naměřených dat také patrné, že enzymatická hydrolýza není závislá na způsobu předúpravy lepenkového papíru, ale pouze na pH.

Tabulka č. 19: Celkové zhodnocení hydrolyzy papíroviny

Upravená papírovina	Obsah celulózy [%]	Hmotnost celulózy ve 3g papíroviny [g]	Hmotnost glukózy při 100% konverzi celulózy [g]	Koncentrace glukózy v roztoku při 100% konverzi celulózy [g.cm ⁻³]	Reálná koncentrace v roztoku [g. cm ⁻³]	Stupeň konverze [%]
Mletí	49,98	1,50	1,67	33,32	31,13	93,43
Mikrovlnné záření, NaOH	79,64	2,39	2,65	53,09	35,52	66,90
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄	76,41	2,29	2,55	50,94	37,34	73,30
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄ a NaOH	77,03	2,31	2,57	51,35	33,59	65,41

Poměr reálně konvertovaného a teoretického množství glukózy



Obrázek č. 35: Grafické vyjádření – Poměr reálně konvertovaného a teoretického množství glukózy

Z tabulky č. 19 a obrázku grafu č 35 vyplývá, že největší stupeň konverze celulózy na glukózu byl u lepenky upravené pouze mletím. Tato biomasa obsahovala nejméně celulózy, avšak množství celulózy bylo přeměněno na glukózu přibližně z 93,43 %. U ostatních úprav,

kde obsah celulózy byl vyšší, nedocházelo k tak efektivní konverzi (66,90; 73,30 a 73,30 %). Je také možné, že docházelo ke zpětnovazebné inhibici produktem, anebo rozkladem hemicelulóz, které mohou být stále přítomny u neupravené lepenky.

Pro potvrzení inhibice nebo přítomnosti hemicelulóz by bylo potřeba dalších analýz přidavkem enzymu a analýzou neupraveného papíru na přítomnost hemicelulóz.

3.3.3 Simultánní sacharifikace a fermentace

Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u metody SSF byl prováděn po dobu 82 hodin. V průběhu byly odebírány vzorky a prováděna jejich analýza na obsah etanolu a glukózy.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 20-23 a graficky zpracované v grafech na obrázcích č. 27-40 pro všechny typy předúprav lepenky.

Tabulka č. 20: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava pouze mletím

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,69	0,57	0,31	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00
2	7,43	3,24	2,88	3,35	0,00	0,00	0,00	0,00
4	14,94	4,80	4,02	3,54	0,00	0,46	0,10	0,00
12	17,95	16,51	14,25	4,74	0,94	1,17	0,72	0,24
24	17,51	17,90	13,20	5,86	1,16	1,81	2,10	0,55
28	19,88	14,37	12,02	4,80	1,40	2,82	2,67	1,55
34	14,88	14,37	9,83	3,15	2,56	3,53	2,82	1,97
48	13,18	12,07	9,27	3,16	4,01	4,23	3,11	0,97
52	12,64	12,53	11,13	2,56	4,34	3,96	2,89	1,26
58	12,02	14,88	10,01	3,72	4,80	4,00	2,47	1,38
72	12,42	11,50	11,12	2,44	4,25	4,24	3,13	1,61
76	11,51	14,27	10,63	2,24	4,24	3,75	2,90	0,97
82	13,74	12,64	10,09	2,33	5,24	4,25	3,11	1,42

Tabulka č. 21: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami a NaOH

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolyze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolyze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,80	0,69	0,50	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00
2	8,75	5,39	3,28	2,57	0,00	0,00	0,00	0,00
4	10,39	5,96	4,94	3,75	0,27	0,00	0,00	0,00
12	19,96	14,85	12,09	7,04	0,78	0,33	0,20	0,00
24	24,98	23,86	14,27	11,13	1,02	0,77	0,51	0,49
28	23,60	24,42	14,27	9,24	3,19	1,00	2,05	0,25
34	19,97	19,74	16,94	8,72	2,57	3,40	2,51	0,78
48	17,94	16,94	14,27	10,01	3,77	3,33	3,44	1,74
52	17,50	16,82	13,74	10,09	3,94	3,97	3,21	1,30
58	14,25	8,55	14,38	10,40	4,18	3,19	2,74	1,81
72	13,77	7,98	14,01	10,65	4,14	3,41	2,51	1,68
76	13,78	8,65	13,21	10,71	4,38	3,69	2,59	1,76
82	13,76	8,16	12,53	11,18	4,43	3,62	2,44	1,93

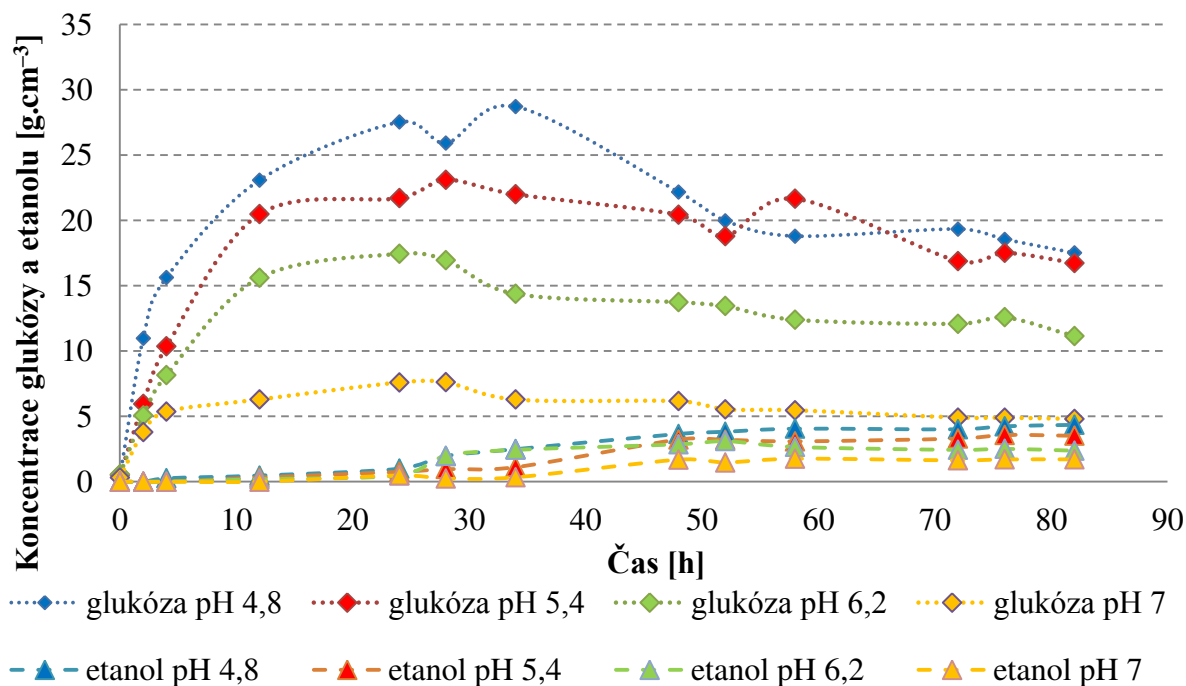
Tabulka č. 22: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolyze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolyze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	PH 7
0	0,38	0,51	0,57	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00
2	11,12	6,04	5,13	3,85	0,00	0,00	0,00	0,00
4	15,83	10,49	8,26	5,44	0,27	0,00	0,00	0,00
12	23,38	20,74	15,81	6,38	0,49	0,34	0,20	0,00
24	27,88	21,99	17,66	7,70	1,03	0,77	0,51	0,49
28	26,25	23,40	17,17	7,71	2,03	1,00	2,06	0,25
34	29,08	22,28	14,55	6,36	2,57	1,15	2,52	0,35
48	22,45	20,69	13,91	6,24	3,78	3,34	2,96	1,75
52	20,23	19,03	13,61	5,60	3,95	3,31	3,21	1,52
58	19,04	21,94	12,55	5,54	4,19	3,19	2,75	1,82
72	19,59	17,10	12,24	4,97	4,15	3,41	2,52	1,69
76	18,79	17,74	12,75	4,96	4,39	3,70	2,60	1,76
82	17,74	16,96	11,28	4,87	4,49	3,63	2,45	1,77

Tabulka č. 23: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami, H_2SO_4 a NaOH

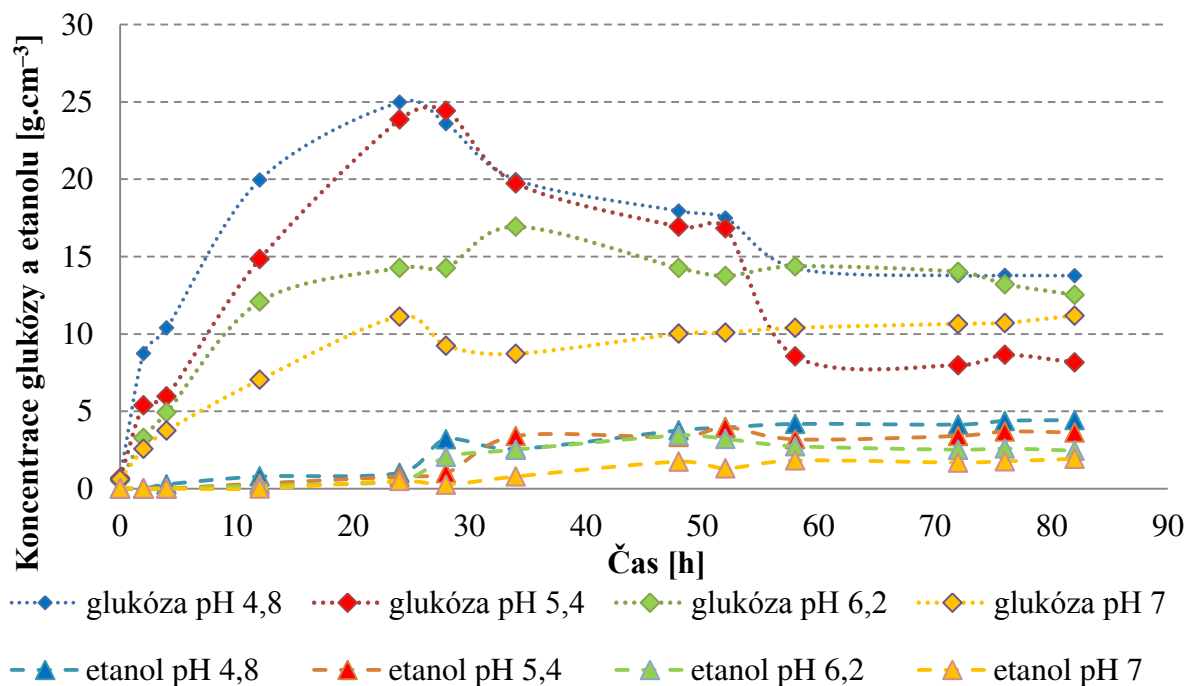
Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	0,69	0,50	0,31	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00
2	9,34	5,23	4,39	3,42	0,00	0,00	0,00	0,00
4	14,27	12,89	10,55	7,43	0,05	0,31	0,00	0,00
12	21,56	15,59	13,78	6,31	0,76	0,32	0,19	0,10
24	22,33	17,66	14,28	7,61	0,99	0,75	0,54	0,48
28	18,26	14,83	13,22	7,88	3,10	2,68	1,99	0,24
34	17,39	14,27	12,39	7,40	2,49	3,29	2,44	0,76
48	15,95	13,75	11,77	6,73	3,66	3,23	3,34	1,69
52	14,88	14,83	11,13	6,30	3,82	3,85	2,49	1,69
58	14,27	13,84	9,81	5,36	4,06	3,09	2,66	1,76
72	14,37	12,53	9,45	4,97	4,01	3,30	2,44	0,76
76	13,21	13,26	9,47	5,52	4,25	3,58	2,52	1,71
82	12,59	12,42	8,67	5,74	5,25	4,01	2,63	1,65

Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mletím



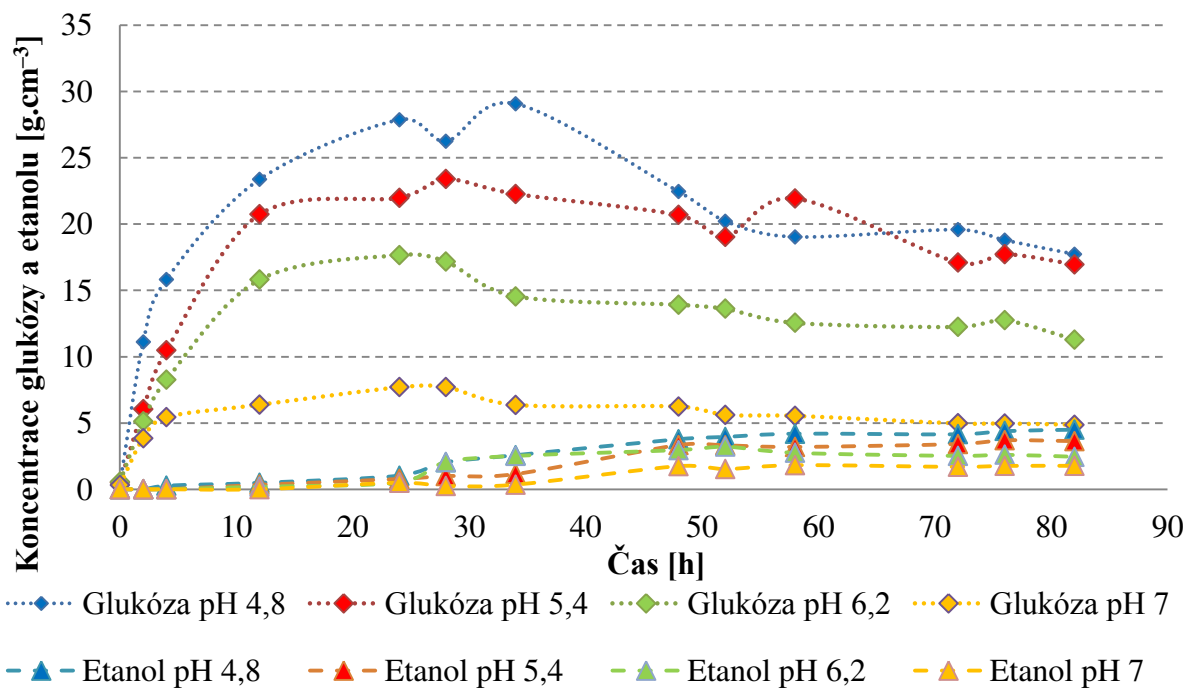
Obrázek č. 36: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mletím

Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH



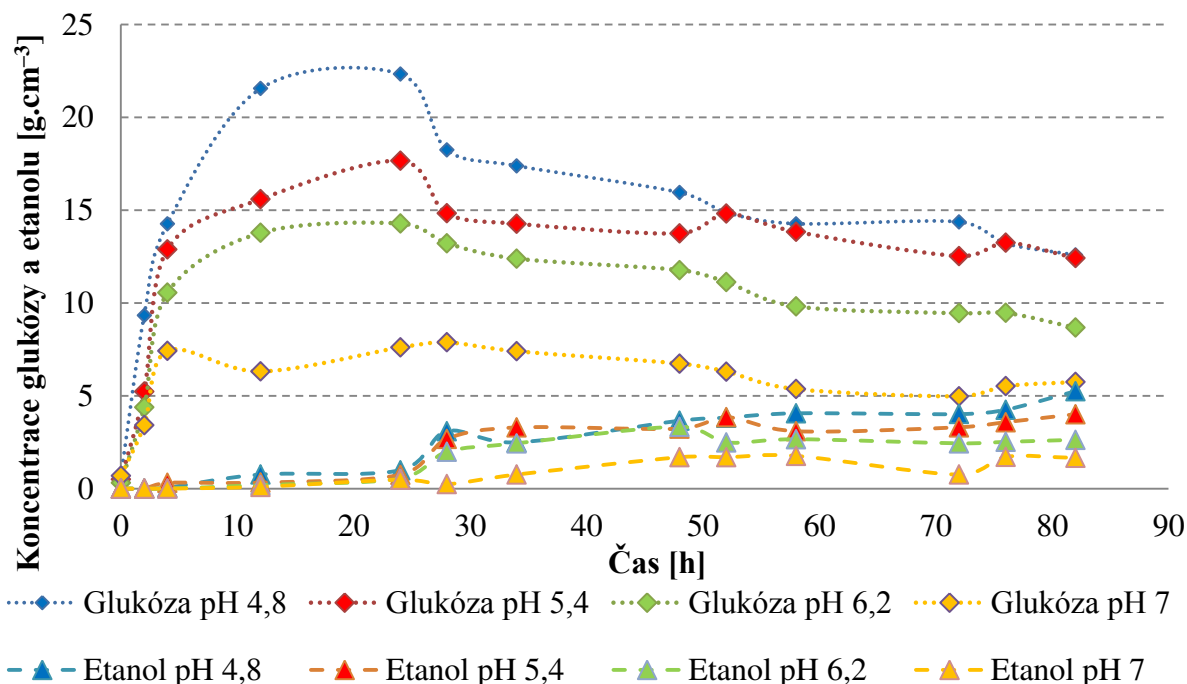
Obrázek č. 37: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH

Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a H₂SO₄



Obrázek č. 38: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami, H_2SO_4 a $NaOH$

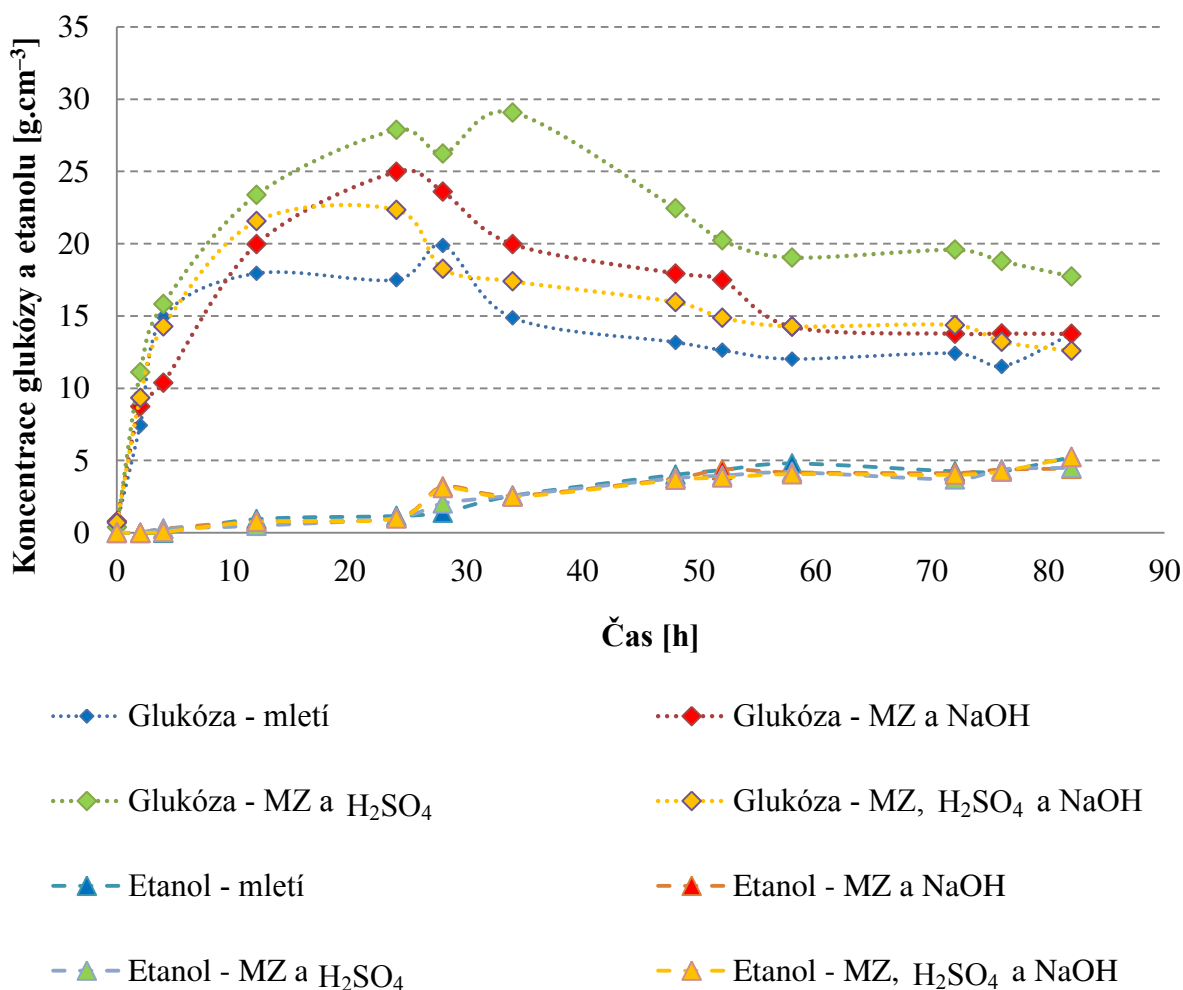


Obrázek č. 39: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami, H_2SO_4 a $NaOH$

Výsledky měření pomocí metody SSF uvádí, že se etanol tvořil do koncentrace $5,25 \text{ g.cm}^{-3}$. Největšímu nárůstu docházelo mezi 22 – 34 hodinou fermentace. V následujících hodinách fermentace zůstávala koncentrace etanolu téměř konstantní. Konstantní hladina etanolu může naznačovat, že buňky nebyly schopny odolávat vyšším koncentracím etanolu za daných teplot a docházelo k jejich odumírání. Údaje spotřeby glukózy naznačují, že malá část buněk přežívala i nadále. Další možností je, že hladina etanolu se držela na určité hladině, protože docházelo k jeho částečnému odpařování díky vysoké tenzi par.

Je zde velký rozdíl u produkce etanolu mezi rozdílným pH fermentace, kdy u hydrolyzy při pH 4,8 docházelo k vyšší efektivitě konverze celulózy na glukózy, a tím byla umožněna snadnější konverze etanolu z glukózy.

Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SSF



Obrázek č. 40: Grafické vyjádření – Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SSF

Na obrázku č. 40 je porovnán vliv jednotlivých předúprav papírové lepenky na výsledky metod SSF při optimálním pH o hodnotě 4,8. Z porovnání dat vyplývá, že se etanol tvořil přibližně ve stejné koncentraci nezávisle na metodě úpravy. Je zde také patrné, že u různých předúprav vznikalo různé množství glukózy. Tento výsledek potvrzuje fakt, že buňky nebyly schopny přežít vysoké koncentrace etanolu v médiu.

3.3.4 Separovaná hydrolýza a fermentace

Separovaná hydrolýza a fermentace byla provedena bez odstranění enzymů, proto lze očekávat malé výtěžky z hydrolýzy z nezhydrolyzované celulózy i během fermentace. Hydrolýza byla zpětnovazebně inhibována glukózou a po odstranění glukózy její spotřebou dochází k uvolnění této inhibice, a proto konverze může dále pokračovat.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulkách č. 24-27 a graficky zpracované v grafech na obrázcích č. 41-44 pro všechny typy předúprav lepenky.

Tabulka č. 24: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mletím

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	31,26	26,25	18,01	7,01	0,00	0,00	0,00	0,00
1	32,61	26,54	17,98	7,25	0,00	0,00	0,00	0,00
4	29,71	25,39	14,25	6,23	0,00	0,46	0,12	0,12
6	22,56	15,61	5,46	4,74	0,11	1,17	0,39	0,24
8	19,88	12,36	4,41	4,68	2,64	1,81	2,10	1,22
10	14,88	9,50	3,29	3,54	1,40	7,45	7,20	1,63
12	12,36	7,26	2,45	3,15	8,95	5,64	5,78	1,97
22	7,26	4,60	1,24	3,16	6,02	4,23	3,11	3,98
26	2,82	1,98	1,25	2,56	8,26	7,89	5,75	2,28
30	2,42	1,50	1,39	2,35	7,85	6,23	3,26	2,57
36	2,30	1,43	1,03	1,56	8,01	7,56	5,28	3,56
42	1,26	1,23	1,24	1,02	7,12	8,33	7,55	4,02
48	1,10	1,11	1,01	0,92	8,20	8,36	7,45	4,50

Tabulka č. 25: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami a NaOH

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	36,94	31,26	21,13	11,25	0,00	0,00	0,00	0,00
1	35,99	28,66	19,86	10,01	0,00	0,00	0,00	0,00
4	35,85	27,35	16,94	8,72	0,56	0,00	0,00	0,00
6	31,23	16,94	14,27	7,04	2,36	0,37	0,20	0,51
8	16,59	16,82	11,26	6,25	3,35	0,99	2,30	0,21
10	13,77	8,55	7,21	4,89	8,23	2,36	5,27	0,27
12	13,78	7,98	5,23	3,33	6,24	3,45	4,97	0,78
22	10,24	5,64	4,26	2,65	5,54	4,59	6,51	1,74
26	9,00	4,32	3,26	2,20	7,68	7,69	7,80	2,00
30	3,24	2,36	2,12	1,98	8,00	5,68	5,40	1,81
36	2,36	1,20	1,98	3,60	7,36	3,41	6,66	1,68
42	1,20	1,10	1,00	1,02	8,96	8,26	7,51	2,67
48	0,96	1,23	1,03	1,26	9,01	9,10	8,60	3,64

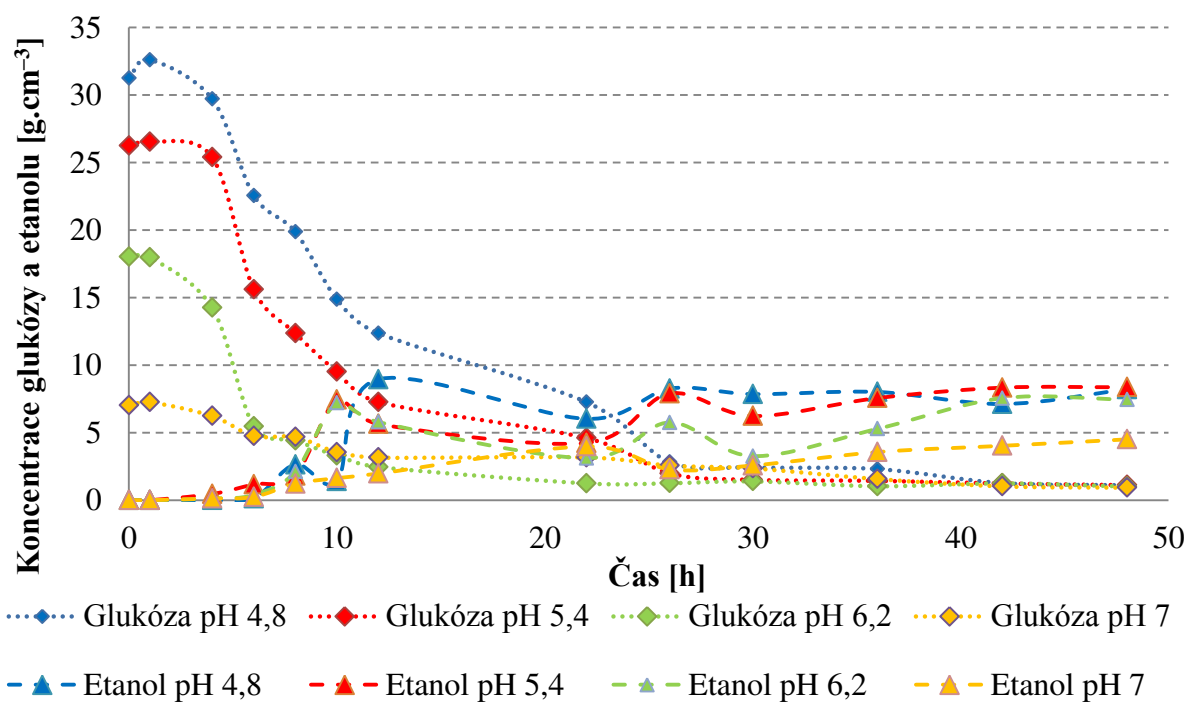
Tabulka č. 26: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	PH 7
0	37,89	32,12	25,16	11,96	0,00	0,00	0,00	0,00
1	37,21	30,28	25,69	11,29	0,00	0,00	0,00	0,00
4	30,21	16,51	24,65	10,98	0,36	0,00	0,13	0,26
6	22,16	13,56	20,12	7,56	0,31	0,34	0,36	0,23
8	18,36	9,67	13,65	5,45	2,30	0,77	3,29	2,39
10	12,36	7,28	9,87	4,89	6,84	6,36	5,98	2,59
12	11,68	7,35	7,58	4,35	7,59	7,89	6,34	3,00
22	9,94	7,89	6,30	3,26	8,26	6,54	7,59	2,87
26	6,37	5,69	4,98	3,12	7,27	9,13	8,29	2,59
30	4,32	4,57	5,36	2,98	8,98	7,98	7,93	1,82
36	2,36	2,35	3,12	2,00	9,01	8,87	6,98	2,69
42	1,25	1,26	2,20	1,43	9,21	8,97	5,19	3,28
48	0,67	0,87	1,02	0,99	9,31	9,33	7,89	3,35

Tabulka č. 27: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami, H_2SO_4 a $NaOH$

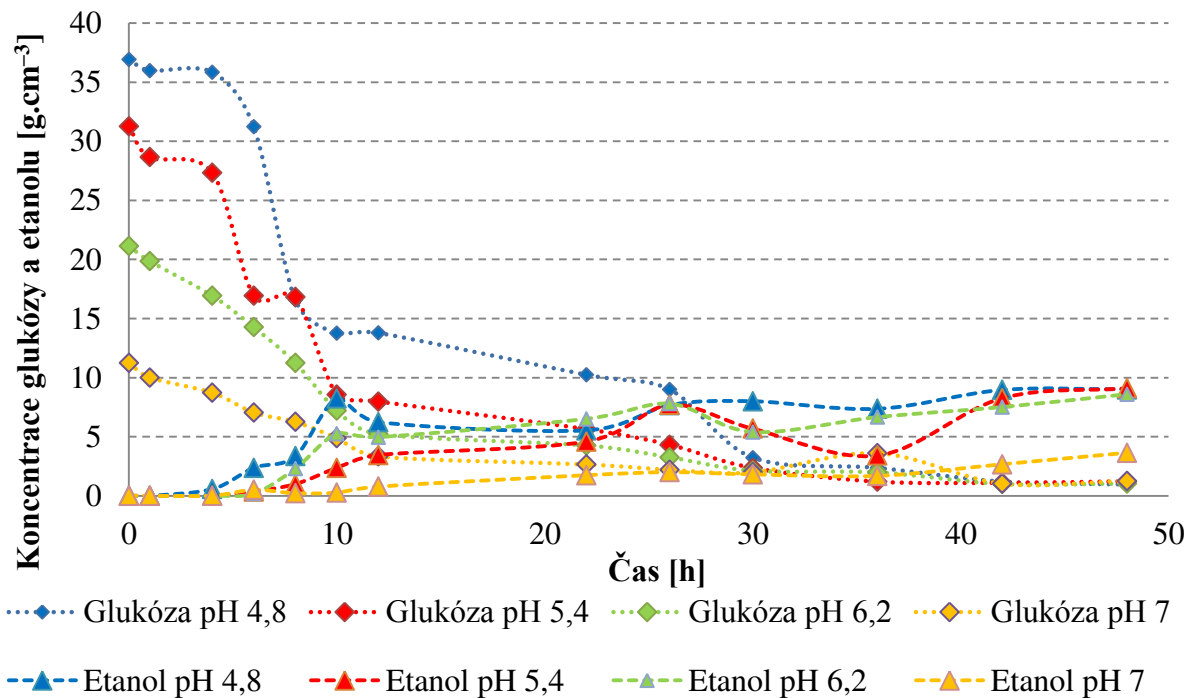
Čas [h]	c [g.cm ⁻³] glukózy při hydrolýze v pufru o				c [g.cm ⁻³] etanolu při hydrolýze v pufru o			
	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7	pH 4,8	pH 5,4	pH 6,2	pH 7
0	33,89	27,02	22,56	11,01	0,00	0,00	0,00	0,00
1	32,25	25,36	18,97	10,26	0,00	0,00	0,00	0,00
4	28,36	20,15	16,35	9,87	0,05	0,31	0,00	0,13
6	19,72	18,26	9,87	6,31	0,56	0,32	0,19	0,23
8	15,26	13,56	8,23	5,26	2,36	3,60	4,95	0,26
10	12,10	10,32	7,29	6,45	7,56	7,21	4,98	0,35
12	10,32	6,34	6,32	4,23	5,32	6,98	5,32	1,29
22	6,34	5,20	4,21	2,39	7,56	8,67	6,55	3,39
26	5,20	3,21	3,26	2,30	8,97	7,22	5,99	3,98
30	2,36	2,06	2,36	1,26	9,00	8,54	4,56	2,46
36	1,32	2,53	1,98	0,98	7,13	9,36	6,11	3,61
42	1,22	1,26	1,00	0,77	8,79	6,69	6,58	2,78
48	0,92	1,01	0,55	0,87	9,30	9,40	7,12	3,56

Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mletím



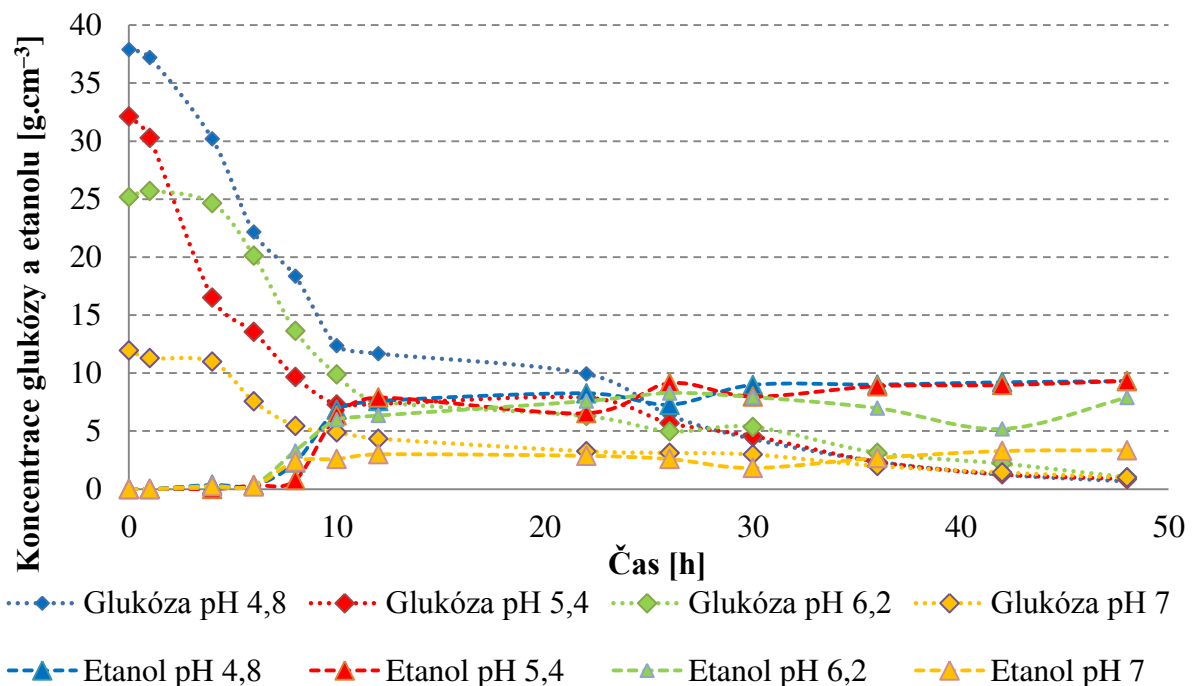
Obrázek č. 41: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mletím

Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH



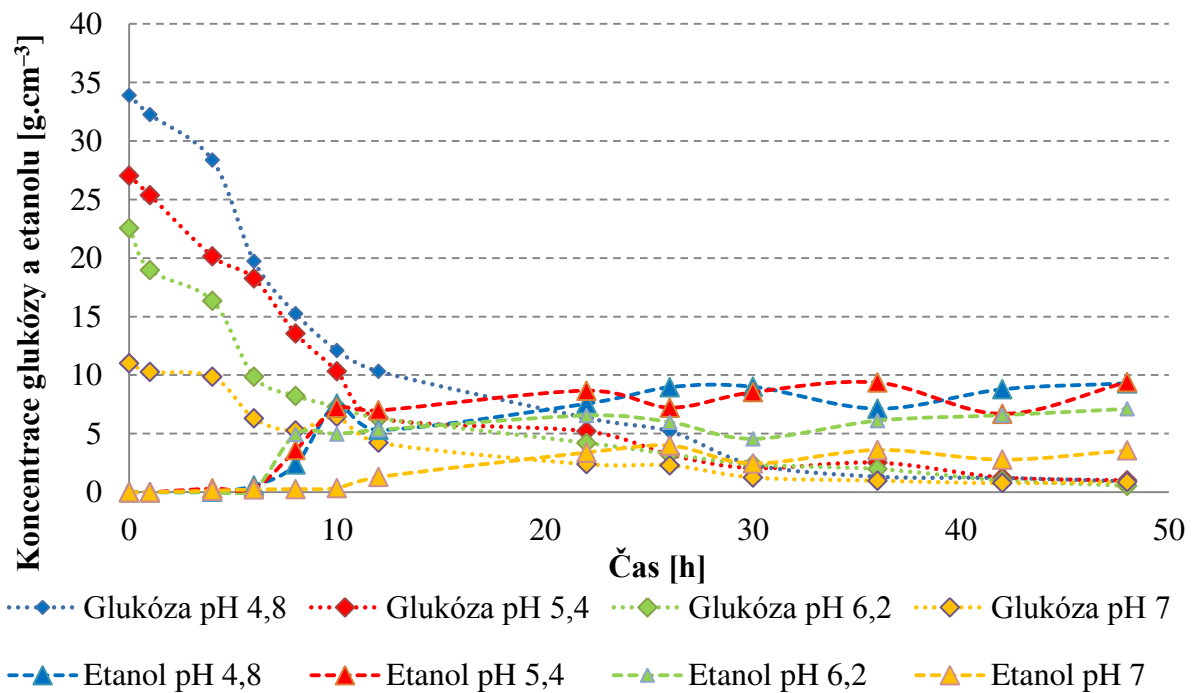
Obrázek č. 42: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH

Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami a H₂SO₄



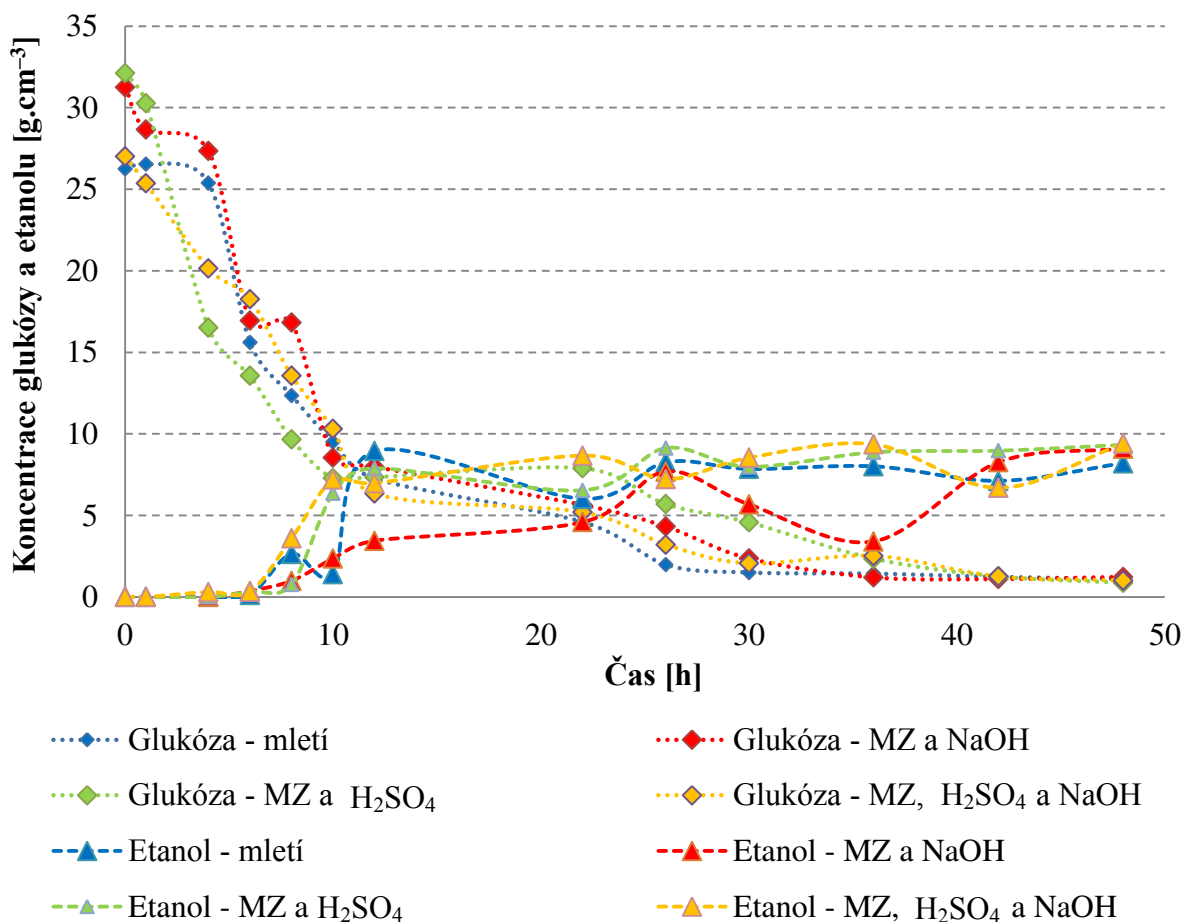
Obrázek č. 43: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami a H₂SO₄

**Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami,
H₂SO₄ a NaOH**



Obrázek č. 44: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolyza a fermentace – úprava mikrovlnami a H₂SO₄ a NaOH

Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SHF



Obrázek č. 45: Grafické vyjádření – Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SHF

Výsledky uvedené v předchozích grafech a tabulkách (viz. tabulky č. 24-27 a obrázky č. 41-45) ukazují, že se etanol začíná tvořit ve velkém množství mezi 6 – 12 hodinou fermentace a současně dochází k rapidnímu úbytku glukózy. Největší výtěžnosti etanolu bylo dosaženo za použití předúpravy mikrovlnami, H₂SO₄ a NaOH při pH 5,4. Nebyl sledován velký rozdíl ve výtěžku etanolu v závislosti na jednotlivých předúpravách lepenky.

Fermentací pomocí metody SHF při pH 4,8 a 5,4 nebyl sledován velký vliv na produkci etanolu. U fermentací, které probíhaly při vyšších hodnotách pH než je hodnota pH 5,4, lze pozorovat nižší koncentraci vyprodukovaného etanolu.

Tabulka č. 28: Tabulka teoretických výtěžků etanolu

Upravená papírovina	Teoretický výtěžek ethanolu z teoretického množství glukózy [g.cm ⁻³]	Teoretický výtěžek ethanolu z reálné glukózy (51%) [g.cm ⁻³]	Reálný výtěžek ethanolu z reálné glukózy [g.cm ⁻³]	Reálný výtěžek ethanolu z teoretické glukózy [%]	Reálný výtěžek ethanolu z reálné glukózy [%]
Mletí	17,02	15,87	8,36	49,13	52,66
Mikrovlnné záření, NaOH	27,11	18,12	9,10	35,56	50,23
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄	26,01	19,04	9,33	35,87	48,99
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄ a NaOH	26,22	17,13	9,40	35,84	54,87

*Pro tabulku byly použity data z SHF, u nejvyšších hodnot (pH 5,4).

Teoretický výtěžek etanolu byl vypočítán z hmotnosti stanovené celulózy v předupravené lepence. Pro zjednodušení výpočtu bylo vynecháno větvení celulotických vláken. Z tabulky č. 28 je zřejmé, že maximální konverze celulózy na etanol bylo dosaženo ze 49,13 % u lepenky předupravené pouze mletím. 33,56 % celulózy bylo přeměněno na etanol u lepenky předupravené mikrovlnami a NaOH, 35,87 % u lepenky předupravené mikrovlnami a H₂SO₄ a 35,84 % u lepenky předupravené mikrovlnami, H₂SO₄ a NaOH.

3.3.5 Srovnání fermentačních metod SSF a SHF

U obou metod byla zaznamenána produkce glukózy a následně i produkce etanolu. V kontrastu s jinými studiemi [47] je metoda SHF shledána jako efektivnější pro produkci bioetanolu z odpadní lepenky. U metody SHF bylo dosaženo přibližně dvojnásobné výtěžnosti etanolu na rozdíl od metody SSF. Ve studii z roku 1995 bylo dosaženo pomocí SSF při 45 °C pomocí *K. marxianus* IMB3 až 39 % konverze z čisté celulózy. [60] V nedávných studiích bylo optimalizací metod předúprav a fermentačních metod dosaženo dokonce 55 – 60 % konverze celulózy na etanol, kde byl jako výchozí substrát použit papírový kal nebo odpadní lepenka. [30]

Tabulka č. 29: Maximální stupeň konverze u SSF a SHF

Upravená papírovina	Teoretický výtěžek ethanolu [g.cm ⁻³]	Výtěžek ethanolu SSF [g.cm ⁻³]	Stupeň konverze SSF [%]	Výtěžek ethanolu SHF [g.cm ⁻³]	Stupeň konverze SHF [%]
Mletí	17,02	5,24	30,78	8,36	49,11
Mikrovlnné záření, NaOH	27,11	4,43	16,34	9,10	33,57
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄	26,01	4,49	17,26	9,33	35,87
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄ a NaOH	26,22	5,25	20,02	9,40	35,85

Tabulka č. 29 znázorňuje, s jakou efektivitou byla obsažená celulóza přeměněna na etanol. Tyto hodnoty vypovídají o efektivitě konverze při předúpravě lepenky jako substrátu pro výrobu etanolu.

V provedených měřeních této diplomové práce, bylo využito odpadní lepenky jako zdroje celulózy. Metodou SSF bylo dosaženo až 30,78% konverze celulózy na etanol a u metody SHF až 49,11% konverze celulózy na etanol. Výsledky mohou být zkresleny z důvodu přítomnosti hemicelulóz u lepenky upravené pouze mletím, které se pravděpodobně hydrolyzovaly na cukry, a tím poskytly více substrátu pro konverzi na etanol.

Tabulka č. 30: Maximální hmotnostní výtěžnost ethanolu u SSF a SHF

Upravená papírovina	Množství biomasy v 50 ml [g]	Výtěžek ethanolu SSF [g.cm ⁻³]	Výtěžek ethanolu SSF [mg]	Výtěžek ethanolu SHF [g.cm ⁻³]	Výtěžek ethanolu SHF [mg]
Mletí	3,00	5,24	262	8,36	418
Mikrovlnné záření, NaOH	3,00	4,43	222	9,10	455
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄	3,00	4,49	225	9,33	467
Mikrovlnné záření, H ₂ SO ₄ a NaOH	3,00	5,25	263	9,40	470

Tabulka č. 30 ukazuje výtěžnost ethanolu ze 3,00 g různě upravené lepenky, která byla pro reakci použita. Ze 3 g předupravené lepenky byla největší výtěžnost dosažena u lepenky předupravené mikrovlnným zářením, H₂SO₄ a NaOH, což odpovídá zisku 470 mg glukózy, následně u biomasy předupravené mikrovlnami a H₂SO₄, kde bylo získáno 467 mg, dále u lepenky předupravené mikrovlnami a NaOH bylo získáno 455 mg glukózy. V poslední řadě u lepenky upravené pouze mletím bylo získáno 418 mg glukózy ze 3 g předupravené lepenky.

4 Závěr

Cílem práce bylo provedení optimalizací fyzikálně-chemických faktorů vzhledem k produkci etanolu metodami SHF i SSF za použití kvasinky *Kluyveromyces marxianus* CCY 51-1-1. Dalším záměrem práce byla optimalizace obou zmíněných metod a porovnání jejich účinnosti při konverzi odpadní lepenky na etanol.

Jako substrát byla využita odpadní lepenka představující levný a obnovitelný zdroj glukózy. Byl stanoven vliv mechanických a chemických předúprav lepenky na efektivitu enzymatické hydrolýzy obsažené celulózy. Aby bylo možné stanovit ideální podmínky enzymatické hydrolýzy u obou typů fermentací, byly optimalizovány hodnoty pH těchto procesů a to v rozmezí pH 4,8 - 7.

Pomocí růstových křivek byly optimalizovány teplotní podmínky metody SSF a metody SHF tak, aby bylo dosaženo optimální teploty růstu kultury u metody SHF a maximální teploty, kdy je ještě kvasinka schopna reprodukce a utilizace substrátu na etanol pro metodu SSF. Výsledkem měření bylo získání optimální teploty 25 °C pro nejvyšší růst biomasy a teplotního limitu kultivace 50 °C. Při této teplotě kultivace však již nedocházelo k požadovanému nárůstu biomasy spojené s odumíráním buněk, a proto byla výsledná teplota horního teplotního limitu růstu upravena na 45 °C, což se jeví jako dobrý kompromis mezi optimální teplotou enzymatické aktivity použitých celulázových enzymů a ideální teplotou kultivace.

Analýza substrátu prokázala, že největší množství celulózy bylo získáno z lepenkové papíroviny upravené mikrovlnami a NaOH, přičemž tento zisk představoval 79,64 % z celkové hmotnosti upravené lepenky. Obdobně vysokého zisku bylo dosaženo i z lepenky upravené mikrovlnami, NaOH a H₂SO₄ (77,03 % celulózy). U lepenkové papíroviny upravené mikrovlnami a H₂SO₄ bylo získáno 76,41 % celulózy a u papíroviny upravené pouze mletím bylo 49,98 % celulózy. Ze získaných výsledků lze tedy konstatovat, že pro dosažení aplikovatelné produkce celulózy lze použít všech čtyř metod využívajících synergického efektu mikrovln.

Z výsledků vyplývá, že zatímco u hydrolýzy s enzymy celulázového komplexu a β-glukosidázy bylo optimální pH 4,8, tak při srovnání metod SHF a SSF byla téměř srovnatelná produkce etanolu při pH fermentace 4,8 i 5,4. Se zvyšujícím se pH se pak aktivita enzymu i množství vytvořeného etanolu dále snižovalo.

Metodou SSF bylo dosaženo nejlepších výsledků produkce etanolu za použití předúpravy lepenky pomocí kombinace mikrovln, H₂SO₄ a NaOH a pH 4,8. Finální dosažená koncentrace etanolu v médiu byla 5,25 g·cm⁻³ a celková koncentrace etanolu získaná přeměnou celulózy

byla 262,5 mg ze 3 g upravené papíroviny. Nejlepší předúpravou pro produkci etanolu metodou SHF představovala předúprava pomocí kombinace mikrovln, H_2SO_4 a NaOH , a fermentaci při pH 5,4. Výsledná koncentrace etanolu v roztoku $9\cdot 40 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a celková koncentrace etanolu získaná přeměnou celulózy byla 470,0 mg ze 3 g upravené papíroviny. Největší produkce etanolu bylo dosaženo u metody SHF na rozdíl od jiných publikovaných studií [47]. Separovanou hydrolýzou a fermentací byla stanovena koncentrace přibližně dvakrát větší než u metody SSF.

Nejvyššího stupně konverze na etanol z obsahu celulózy bylo dosaženo za použití neupravené lepenky a to ze 49,11 % celkové celulózy při pH fermentace 5,4. Nejvyššího výtěžku vztaženého na množství předupraveného materiálu bylo dosaženo u papírové lepenky upravené mikrovlnami, H_2SO_4 a NaOH .

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] LIMA, Marco Aurelio Pinheiro a Alexandra Pardo Policastro NATALENSE. Bioethanol. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. ISBN 978-953-51-0008-9.
- [2] LUQUE, Rafael, Juan CAMPELO a James H CLARK. Handbook of biofuels production: processes and technologies. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2011, xxiv, 659 pages. Woodhead Publishing in energy, no. 15. ISBN 978-1-84569-679-5.
- [3] DATTA, Rathin, Mark A. MAHER, Coleman JONES a Richard W. BRINKER. Ethanol-the primary renewable liquid fuel. Journal of Chemical Technology. 2011, vol. 86, issue 4, s. 473-480. DOI: 10.1002/jctb.2580. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2580>
- [4] NAIK, S.N., Vaibhav V. GOUD, Prasant K. ROUT a Ajay K. DALAI. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2010, vol. 14, issue 2, s. 578-597. DOI: 10.1016/j.rser.2009.10.003. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002342>
- [5] ROCHA, Saul N, Jose ABRAHAO-NETO, Maria E CERDAN, Maria I GONZALEZ-SISO a Andreas K GOMBERT. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast Kluyveromyces marxianus. Microbial Cell Factories. 2010, vol. 9, issue 1, s. 4-. DOI: 10.1186/1475-2859-9-4. Dostupné z: <http://www.microbialcellfactories.com/content/9/1/4>
- [6] SUNGGYU LEE, Y. Biofuels and bioenergy: processes and technologies. Boca Raton, FL: Taylor, 2012. ISBN 14-200-8955-2
- [7] CAMPBELL, Neil A a Jane B REECE. Biologie. Vyd. 1. Brno: Computer Press, 2006, xxxiv, 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.
- [8] NATHAN S. MOSIER, Nathan S. Michael R. Modern biotechnology: connecting innovations in microbiology and biochemistry to engineering fundamentals. Oxford [etc.]: Wiley, 2008. ISBN 978-047-0473-412.
- [9] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004, 171 s. ISBN 80-708-0551-X.
- [10] SUN, Ye a Jiayang CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Bioresource Technology. 2002, vol. 83, issue 1, s. 1-11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
- [11] BLASCHEK, Hans P, Thaddeus C EZEJI a Jürgen SCHEFFRAN. Biofuels from agricultural wastes and byproducts. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, xii, 262 p. ISBN 08-138-0252-0.
- [12] CARROLL, Andrew a Chris SOMERVILLE. Cellulosic Biofuels. Annual Review of Plant Biology. 2009, vol. 60, issue 1, s. 165-182. DOI: 10.1146/annurev.arplant.043008.092125. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.043008.092125>
- [13] U.S. DOE Breaking the biological barriers to cellulosic Etanol: A joint research agenda [online]. 2006 [cit. 2014-04-10]. Dostupné z: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/2005workshop/b2blowres63006.pdf>
- [14] KINNARINEN, Teemu, Marina SHAKHANOVA, Erika HIETANEN, Riina SALMIMIES, Antti HÄKKINEN a Marjatta LOUHI-KULTANEN. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of cardboard waste: Saccharification yield and subsequent separation of the solid residue using a pressure filter. Bioresource Technology. 2012, vol. 110, s. 405-411. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.138. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412001629>
- [15] KENT, James A. Handbook of industrial chemistry and biotechnology. New York: Springer, 2012, p. cm. ISBN 978-146-1442-585.
- [16] SAHA, Badal C a Kyoshi HAYASHI. Lignocellulose biodegradation. Washington, DC: American Chemical Society, c2004, xii, 400 p. ISBN 08-412-3876-6.
- [17] MEYERS, Robert A. Molecular biology and biotechnology: a comprehensive desk reference. New York: VCH, c1995, xxxviii, 1034 p., [12] p. of plates. ISBN 15-608-1925-1.
- [18] V. Krumphanzl and Z. Řeháček, *Mikrobiální technologie: buňka a techniky jejího využití : celost. vysokošk. příručka pro stud. přírodověd. fakult*, Rok vydání: 1988, Academia.
- [19] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 3. vyd. Brno: VUT FCH, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [20] VAN WYK, Jacobus P.H. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. Trends in Biotechnology. 2001, vol. 19, issue 5, s. 172-177. DOI: 10.1016/S0167-7799(01)01601-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779901016018>

- [21] ZHOU, Chunguang, Weihong YANG a Włodzimierz BLASIAK. Characteristics of waste printing paper and cardboard in a reactor pyrolyzed by preheated agents. *Fuel Processing Technology*. 2013, vol. 116, s. 63-71. DOI: 10.1016/j.fuproc.2013.04.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378382013001902>
- [22] ARIUNBAATAR, Javkhlan, Antonio PANICO, Giovanni ESPOSITO, Francesco PIROZZI a Piet N.L. LENS. Pretreatment methods to enhance anaerobic digestion of organic solid waste. *Applied Energy*. 2014, vol. 123, s. 143-156. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.02.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261914001718>
- [23] HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009, vol. 100, issue 1. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027.
- [24] KESHWANI, Deepak R. a Jay J. CHENG. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal bermudagrass for bioethanol production. *Biotechnology Progress*. 2010, vol. 26, issue 3, s. 644-652. DOI: 10.1002/btpr.371. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.371>
- [25] BALS, Bryan, Chris WEDDING, Venkatesh BALAN, Elizabeth SENDICH a Bruce DALE. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, vol. 102, issue 2, s. 1277-1283. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.08.058. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410014185>
- [26] S. Harisha, *Biotechnology procedures and experiments handbook*, 2007, Hingham: Infinity Science Press, ISBN: 978-1-934015-11-7.
- [27] TREVOR PALMER, Philip L. *Enzymes biochemistry, biotechnology and clinical chemistry*. 2nd ed. Oxford: Woodhead Publishing, 2007. ISBN 978-085-7099-921.
- [28] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [29] PENG, Lincai a Yuancai CHEN. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 2011, vol. 35, issue 4, s. 1600-1606. DOI: 10.1016/j.biombioe.2011.01.059. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953411000742>
- [30] RATLEDGE, Colin a B KRISTIANSEN. *Basic biotechnology*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2006, xiv, 666 p. ISBN 05-218-4031-7.
- [31] Kegg - Hydrolyza celulózy na celobiózu. [Online]. Dostupné z: <http://www.genome.jp/fig/reaction/R02886.gif>. [cit: 2014-03-02].
- [32] Kegg - Stěpení celobiózy. [Online]. Dostupné z: <http://www.genome.jp/fig/reaction/R00026.gif>. [cit: 2014-03-02].
- [33] VOET, Donald, Judith G VOET a Charlotte W PRATT. *Fundamentals of biochemistry*. New York: John Wiley, 1999, 1 sv. (různé stránkování). ISBN 04-715-8650-1.
- [34] *Kluyveromyces marxianus* (Yeast) (Candida kefyr). [Online]. Dostupné z: <http://www.uniprot.org/taxonomy/4911>. [cit: 2014-04-02].
- [35] ATCC, "Kluyveromyces marxianus (Hansen) van der Walt, teleomorph (ATCC® 8635™). [Online]. Dostupné z: <http://www.straininfo.net/strains/339697/browser>.
- [36] C. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout, *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Rok vydání: 2011, Elsevier Science, ISBN: 9780080931272 [cit: 2014-01-02].
- [37] FONSECA, Gustavo Graciano, Elmar HEINZLE, Christoph WITTMANN a Andreas K. GOMBERT. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, vol. 79, issue 3, s. 339-354. DOI: 10.1007/s00253-008-1458-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-008-1458-6>
- [38] VINCENZA FARACO, Editor. *Lignocellulose conversion enzymatic and microbial tools for bioethanol production*. Berlin: Springer, 2013. ISBN 978-364-2378-614.
- [39] SPENCER, John F a Dorothy M SPENCER. *Yeasts in natural and artificial habitats*. New York: Springer, 1997, viii, 381 p. ISBN 35-405-6820-4.
- [40] MEEHAN, C, I.M BANAT, G MCMULLAN, P NIGAM, F SMYTH a R MARCHANT. Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *Environment International*. 2000, vol. 26, 1-2, s. 75-79. DOI: 10.1016/S0160-4120(00)00084-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412000000842>
- [41] PAL, Rama, Saumyata TEWARI a Jai P. N. RAI. Metals sorption from aqueous solutions by *Kluyveromyces marxianus*: Process optimization, equilibrium modeling and chemical characterization. *Biotechnology Journal*. 2009, vol. 4, issue 10, s. 1471-1478. DOI: 10.1002/biot.200900051. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.200900051>
- [42] PANIKOV, Nicolai S. *Microbial growth kinetics*. 1. ed. London [u.a.]: Chapman, 1995. ISBN 978-041-2566-301.

- [43] SWAMY, P. Laboratory manual on biotechnology. 1st ed. Meerut, India: Rastogi Publications, 2008-2009, 617 p. ISBN 9788171339181.
- [44] POMMERVILLE, Jeffrey C. Fundamentals of microbiology. 10th ed. Burlington, MA: Jones, 2014. ISBN 14-496-8861-6.
- [45] Bacteria_Growth.” [Online]. Dostupné z: http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_Growth.html. [cit: 2014-01-02].
- [46] CANTARELLA, Maria, Laura CANTARELLA, Alberto GALLIFUOCO, Agata SPERA a Francesco ALFANI. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2004, vol. 39, issue 11, s. 1533-1542. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00285-1. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032959203002851>
- [47] KÁDÁR, Zs., Zs. SZENGYEL a K. RÉCZEY. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*. 2004, vol. 20, issue 1, s. 103-110. DOI: 10.1016/j.indcrop.2003.12.015. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669004000135>
- [48] KIZLINK, Juraj. *Technologie chemických látek a jejich využití*. 4., přeprac.a dopl. vyd. Brno: VUTIUM, 2011, 546 s. ISBN 978-80-214-4046-3.
- [49] CHAUVEL, Alain, LEFEBVRE, Gilles, *Petrochemical Processes: Technical and Economic Characteristics*, Rok vydání: 1989, Editions Technip, ISBN: 9782710805632.
- [50] EDITED BY MARIA R. KOSSEVA, Edited by Maria R. *Chemical and Environmental Engineering a School of Chemical Engineering COLIN WEBB. Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities*. First edition. Burlington: Elsevier Science, 2013. ISBN 978-012-3919-281.
- [51] SAHA, Badal C., Tsuyoshi YOSHIDA, Michael A. COTTA a Kenji SONOMOTO. Hydrothermal pretreatment and enzymatic saccharification of corn stover for efficient ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2013, vol. 44, s. 367-372. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.11.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669012006140>
- [52] *Laboratorní cvičení z biochemie: vysokoškolský učební text pro posluchače Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, Univerzity Karlovy v Praze, Univerzity Palackého v Olomouci a Masarykovi Univerzity v Brně*. 1. vyd. Praha: Nakladatelství Olomouc, 2000, 203 s. ISBN 80-718-2104-7.
- [53] PATNAIK, Pradyot. *Dean's analytical chemistry handbook*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, 2004, 1 sv. ISBN: 9780071410601.
- [54] ROBERT A. *Encyclopedia of analytical chemistry*. [Online ed.]. Hoboken, N.J.?: John Wiley, 200u. ISBN 978-047-0027-318.
- [55] NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 235 s. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [56] ROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007, xxiii, 574 p. ISBN 978-047-0859-049.
- [57] VTT C-81110 Strain Browser - StrainInfo. [Online]. Dostupné z: <http://www.straininfo.net/strains/494074/browser>. [Accessed: 01-Apr-2014].
- [58] Novozymes®. *Novozymes® biomass kit: Application Sheet. Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.
- [59] PEARSE, A. *Histochemistry, theoretical and applied*. 4th ed. New York: Distributed by Longman, 1980-1991, 3 v. ISBN 04430199831.
- [60] BARRON, N., R. MARCHANT, L. MCHALE a A. P. MCHALE. Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol formation from cellulose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, vol. 43, issue 3, s. 518-520. DOI: 10.1007/BF00218459. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00218459>
- [61] Instrumentation flashcards | Quizlet. [Online]. Dostupné z: <http://quizlet.com/5275979/instrumentation-flash-cards/>. [cit: 13-01-2014].
- [62] Ohaus Pioneer Analytical & Precision Laboratory Balance [online]. 2001 [cit. 2013-10-23]. Dostupné z: http://www.coventryscale.co.uk/product_info.php?ID=5607
- [63] Spectrophotometers, routine, Thermo Scientific Helios Epsilon [online]. 2002 [cit. 2013-10-23]. Dostupné z: https://webshop.fishersci.com/webfiles/uk/web-docs/1287_LC.pdf
- [64] *Ultrospec™ 10 Cell Density Meter* [online]. 1999 [cit. 2013-10-23]. Dostupné z: http://scientiis.com/laboratorium/catalog/product_info.php?products_id=15014
- [65] INKUBATOR 1000 [online]. 1997 [cit. 2013-10-23]. Dostupné z: http://www.johnmorris.com.au/files/product/attachments/22552/19522_manual_instr.pdf

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AFEX	amoniakální exploze
ATCC.....	American Type Culture Collection
ATP.....	adenosintrifosfát
CYY.....	Zbierka kultúr kvasiniek
GLC.....	plynová rozdělovací chromatografie
GPC.....	gelová permeační chromatografie
GSH.....	plynová chromatografie na molekulových sítích
HHF.....	hybridní hydrolýza a fermentace
HPLC.....	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC.....	iontově výměnná chromatografie
<i>K. Marxianus</i>	<i>Kluyveromyces Marxianus</i>
LLC.....	kapalinová rozdělovací chromatografie
LSC.....	kapalinová adsorpční chromatografie
MZ.....	mikrovlnné záření
RID.....	refraktometrický detektor
SHF.....	separovaná hydrolýza a fermentace
SSF.....	simultánní sacharifikace a fermentace
UV/VIS.....	ultrafialové a viditelné spektrum
VTT.....	Technical Research Centre of Finland

8 SEZNAM POUŽITÝCH VELIČIN

$[A]_m$	množství látky v mobilní fázi	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$[A]_x$	množství látky ve stacionární fázi	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
A	Absorbance	[-]
B	množství enzymu na začátku hydrolýzy	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
c	koncentrace roztoku	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
C	získané množství redukujících cukrů	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
D	potenciální množství redukujících cukru v substrátu	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
I	intenzita vystupujícího záření	[-]
I_0	intenzita vstupujícího záření	[-]
K_{ext}	extinkční koeficient	[-]
K_S	afinitní konstanta limitovaného substrátu	[-]
l	optická dráha kyvety	[cm]
L	stupeň ztráty enzymové aktivity	$[\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$M_{\text{r ethanol}}$	molekulární hmotnost etanolu	[-]
$M_{\text{r glukóza}}$	molekulární hmotnost glukózy	[-]
N	počet částic v 1 cm^3	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
P	koncentrace produktu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
P_{max}	teoretické maximum přeměny glukózy na etanol	[g]
q_p	množství vytvořeného specifického produktu	[g]
q_s	množství spotřebovaného substrátu	[g]
S	koncentrace substrátu	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
t	čas	[h]
X	koncentrace biomasy	$[\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
$Y_{p/s}$	stechiometrický poměr produkt-substrát	[-]
ΔH	teplo vzniklé při fermentaci	$[\text{J} \cdot \text{dm}^{-3}]$
ϵ	molární absorpční koeficient	$[\text{m}^2 \text{mol}^{-1}]$
μ	měrná růstová rychlost	$[\text{h}^{-1}]$
μ_{max}	maximální růst biomasy	$[\text{s}^{-1}]$
τ	turbiditní koeficient	[-]

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1: Zobecněné zastoupení komponent ve stěně rostlinné buňky [5]	10
Obrázek č. 2: Struktura celulózy se znázorněním štěpení celulázami [1].....	11
Obrázek č. 3: Hemicelulózové struktury: xylan a glukomannan [1].....	11
Obrázek č. 5: Struktura ligninu [1].....	12
Obrázek č. 5: Jednotlivé kroky procesu výroby etanolu z lignocelulotické biomasy [1]	14
Obrázek č. 5: Snímek elektronové mikroskopie zobrazující neupravenou enzymaticky hydrolyzovanou kukuřičnou píci. [12].....	17
Obrázek č. 5: Snímek elektronové mikroskopie zobrazující enzymaticky hydrolyzovanou kukuřičnou píci předupravenou horkou vodou. [12]	17
Obrázek č. 5: Štěpení exo- a endo- celulázami [30].....	21
Obrázek č. 5: Štěpení β -1,6-glukosidázou [31].....	21
Obrázek č. 9: Růstová křivka [44]	25
Obrázek č. 10: Struktura škrobu se znázorněním štěpení celulázami [1]	31
Obrázek č. 11: Schéma turbidimetru [61]	34
Obrázek č. 12: Schéma HPLC [54].....	35
Obrázek č. 12: Analytické váhy [62].....	38
Obrázek č. 13: Spektrofotometr [63].....	39
Obrázek č. 14: Turbidimetr [64].....	39
Obrázek č. 15: Třepačka [65]	39
Obrázek č. 19: Závislost množství sušiny na způsobu předúpravy.....	49
Obrázek č. 20: Závislost množství popelu na způsobu předúpravy	50
Obrázek č. 21: Závislost množství celulózy na způsobu předúpravy	51
Obrázek č. 22: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 25°C	52
Obrázek č. 23: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 30 °C	53
Obrázek č. 24: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 35 °C	53
Obrázek č. 25: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 40 °C	54
Obrázek č. 26: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 45 °C	54
Obrázek č. 27: Grafické vyjádření – Růstová křivka při 50 °C	55
Obrázek č. 28: Grafické vyjádření – Růstová křivka pro všechny teploty	56
Obrázek č. 26: Grafické vyjádření – Závislost turbidity na počtu buněk.....	57
Obrázek č. 30: Kalibrační křivka – glukóza.....	58
Obrázek č. 31: Kalibrační křivka – etanol.....	59
Obrázek č. 32: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mletím	62
Obrázek č. 33: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a NaOH	63
Obrázek č. 34: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	64
Obrázek č. 35: Grafické vyjádření – Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami, H ₂ SO ₄ a NaOH.....	65
Obrázek č. 33: Grafické vyjádření – Poměr reálně konvertovaného a teoretického množství glukózy.....	66
Obrázek č. 37: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mletím	69
Obrázek č. 38: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH.....	70
Obrázek č. 39: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	70
Obrázek č. 40: Grafické vyjádření – Simultánní sacharifikace a fermentace – úprava mikrovlnami, H ₂ SO ₄ a NaOH.....	71

Obrázek č. 41: Grafické vyjádření – Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SSF.....	72
Obrázek č. 42: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mletím ...	75
Obrázek č. 43: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mikrovlnami a NaOH.....	76
Obrázek č. 44: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	76
Obrázek č. 45: Grafické vyjádření – Separovaná hydrolýza a fermentace – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄ a NaOH.....	77
Obrázek č. 43: Grafické vyjádření – Porovnání různých metod předúprav s produkcí etanolu u SHF.....	78

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Lignocelulotický materiál a jeho složení [10].....	12
Tabulka č. 2: Prvková analýza termodekompozicí papíru [21].....	13
Tabulka č. 3: Přehled nejdůležitějších chromatografických metod [52].....	35
Tabulka č. 4: Chemikálie pro inokulum, hydrolýzu a fermentaci.....	37
Tabulka č. 5: Další chemikálie použité při analýzách.....	37
Tabulka č. 6: Enzymy od firmy Novozymes [58].....	38
Tabulka č. 7: Složení kultivačního média.....	40
Tabulka č. 8: Hodnoty x odpovídají 2 mol.cm ⁻³ roztoku Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O a 1 mol.cm ⁻³ roztoku C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O udávané v ml na 100 ml roztoku [59]..	42
Tabulka č. 9: Závislost množství sušiny na způsobu předúpravy.....	49
Tabulka č. 10: Závislost množství popelu na způsobu předúpravy.....	50
Tabulka č. 11: Závislost množství celulózy na způsobu předúpravy.....	51
Tabulka č. 12: Intervaly fází růstu.....	56
Tabulka č. 13: Závislost turbidity na počtu buněk.....	57
Tabulka č. 14: Kalibrační křivky glukózy a etanolu.....	58
Tabulka č. 15: Enzymatická hydrolýza – úprava mletím.....	60
Tabulka č. 16: Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a NaOH.....	60
Tabulka č. 17: Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	61
Tabulka č. 18: Enzymatická hydrolýza – úprava mikrovlnami, H ₂ SO ₄ a NaOH.....	61
Tabulka č. 19: Celkové zhodnocení hydrolýzy papíroviny.....	66
Tabulka č. 20: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava pouze mletím.....	67
Tabulka č. 21: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami a NaOH.....	68
Tabulka č. 22: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	68
Tabulka č. 23: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SSF – úprava mikrovlnami, H ₂ SO ₄ a NaOH.....	69
Tabulka č. 24: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mletím.....	73
Tabulka č. 25: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami a NaOH.....	74
Tabulka č. 26: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami a H ₂ SO ₄	74
Tabulka č. 27: Průběh spotřeby glukózy a tvorby etanolu u SHF – úprava mikrovlnami, H ₂ SO ₄ a NaOH.....	75
Tabulka č. 28: Tabulka teoretických výtěžků etanolu.....	79
Tabulka č. 29: Maximální stupeň konverze u SSF a SHF.....	80
Tabulka č. 30: Maximální hmotnostní výtěžnost etanolu u SSF a SHF.....	80