

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

ING. MIROSLAVA ZICHOVÁ

**PŘÍPRAVA MIKROBIÁLNÍCH METABOLITŮ Z ODPADNÍCH
SUROVIN**

*Autoreferát doktorské dizertační práce k získání vědecké hodnosti „Doktor“
ve zkratce Ph.D.*

BRNO 2017

Doktorská práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně, na ústavu Chemie potravin a biotechnologií.

Uchazeč: Ing. Miroslava Zichová
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT Brno

Školitel: prof. Ing. Michal Rosenberg, Ph.D.
Ústav biotechnologie
STU v Bratislave

Školitel specialista: Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA
Ústav chemie potravin a biotechnologií
FCH VUT Brno

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou využití odpadních surovin pro mikrobiální produkci významných metabolitů. První část práce je zaměřena na využití odpadního papíru, jakožto lignocelulosového materiálu, který představuje netradiční zdroj pro produkci bioethanolu. Druhá část se věnuje imobilizaci celulólytických enzymů, které se uplatňují při hydrolýze lignocelulosových materiálů.

Odpadní papír (lepenka) byl nejprve předupraven pomletím mixérem a vibračním mlýnem. Předupravená lepenka byla použita pro produkci ethanolu metodou simultánní sacharifikace a fermentace. Tato metoda byla nejdříve optimalizována s volnými buňkami *Saccharomyces cerevisiae*. Následujícím krokem byl výběr kmenů vhodných k imobilizaci. Kmeny *S. cerevisiae* a *Pichia kudriavzevii* byly imobilizovány technologií enkapsulace do nosiče z polyvinylalkoholu a opět testovány na produkci ethanolu metodou simultánní sacharifikace a fermentace.

V druhé části práce byl připraven nosič z odpadních polyethylentereftalových lahví, který byl použit k imobilizaci celulólytického komplexu. Pro tento nosič s enzymem byly stanoveny základní charakteristiky, jako teplotní a pH optimum, skladovací, operační a tepelná stabilita, enzymová kinetika a způsob účinku enzymu. Srovnáním se dvěma komerčními nosiči se tento nosič ukázal jako vhodný k imobilizaci celulólytického komplexu.

KLÍČOVÁ SLOVA: celulólytické enzymy, ethanol, imobilizace, odpadní papír

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	5
1.1	Charakteristika lignocelulosity	5
1.2	Fermentace	6
1.3	Imobilizace celulolytických enzymů	8
2	CÍLE PRÁCE	9
3	MATERIÁL A METODY	10
3.1	Mikroorganismy	10
3.2	Enzymy	10
3.3	Celulosevé substráty	10
3.4	Nosiče pro imobilizaci	10
3.5	Simultánní sacharifikace a fermentace	10
3.6	Imobilizace celulolytického komplexu	11
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	13
4.1	Předúprava lepenky	13
4.2	Optimalizace podmínek procesu SSF s použitím volných buněk <i>S. cerevisiae</i>	13
4.3	SSF s různými kvasinkovými kmeny.....	15
4.4	SSF s imobilizovanými buňkami	16
4.5	Optimalizace podmínek procesu SSF s použitím imobilizovaných buněk <i>S. cerevisiae</i> ...	19
4.6	Skladovací stabilita imobilizovaných buněk <i>S. cerevisiae</i>	20
4.7	SSF ve fermentoru	20
4.8	Srovnání dosažených výsledků se současným stavem řešené problematiky	22
4.9	Imobilizace celulolytického komplexu	22
5	ZÁVĚR.....	27
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	29
7	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ	35
8	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	36

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 CHARAKTERISTIKA LIGNOCELULOSY

Lignocelulosa je hlavní složkou rostlinné biomasy a zároveň představuje nejrozšířenější přírodní materiál na světě. Obvyklými zdroji lignocelulosity jsou zemědělské a lesnické zbytky, papír, určitý podíl tohoto materiálu je obsažen i v pevném komunálním odpadu. Již dlouho je lignocelulosa považována za potenciální zdroj cukrů zkvasitelných na ethanol. Hlavní překážkou širšího využití lignocelulosových materiálů je však jeho komplexita, kdy kromě celulosy obsahuje i hemicelulosu a lignin, jež jsou vzájemně pevně provázány a tvoří komplexní rigidní matici [1]. Zásadním problémem je také krystalinita celulosy. Tato organizace molekulární struktury představuje překážku v přístupu hydrolytických enzymů a brání účinnému rozkladu celulosy na molekuly glukosy, jež mohou být zkvašeny na ethanol [2].

1.1.1 Předúprava lignocelulosových materiálů

Vzhledem k výše uvedeným okolnostem je nezbytné lignocelulosový materiál nejprve narušit a upravit tak, aby enzymatická hydrolýza byla účinná a potažmo bylo dosaženo co největších výtěžků ethanolu. Efektivní a ekonomická předúprava by měla splňovat následující požadavky:

- produkce celulosových vláken pro enzymatickou hydrolýzu,
- zabránění vzniku inhibitorů hydrolytických enzymů a mikroorganismů používaných v následné fermentaci na ethanol,
- co nejnižší energetické nároky,
- malá produkce odpadu,
- nízká spotřeba chemikálií nebo využití levných chemikálií [3].

Pro předúpravu materiálu bylo zavedeno mnoho metod, které se dělí podle charakteru na fyzikální, fyzikálně-chemické, chemické a biologické. Nejjednodušší metodou předúpravy je mechanické zpracování, např. mletím nebo řezáním [4]. Často se využívá alkalická a kyselá hydrolýza. Účinná je také kombinace působení tepla a chemikálií [3].

1.1.2 Enzymatická hydrolýza

Celulolytické enzymy jsou systémem několika různých synergicky působících složek. Nejlépe prostudovaný je systém aerobních hub (*Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium solani*, *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces emersonii*, *Trichoderma koningii* a *Trichoderma reesei*). Celulolytický systém těchto hub se skládá z následujících složek [5]:

- endo-1,4- β -D-glukanasa (EG; endoglukanasa)
- exo-1,4- β -D-glukanasa (CBH; celobiohydrolasa)
- β -glukosidasa (celobiasa; glukohydrolasa)

Enzymatická hydrolýza celulosy je reakce s více kroky, která se odehrává v heterogenním systému, kde nerozpustná celulosa je nejdříve štěpena na rozhraní pevné a kapalně fáze synergickým působením jednotlivých složek celulolytického

systemu [6]. Endoglukanasy napadají náhodně amorfní oblasti celulosy a uvolňují glukooligosacharidy a celobiosu. Celobiohydrolasy postupně odštěpují celobiosu z neredukujícího i redukujícího konce celulosy. Toto zahájení rozkladu je pak doprovázeno štěpením rozpustných meziproductů na glukosu působením β -glukosidas, což se již odehrává v kapalně fázi [5, 6].

1.2 FERMENTACE

1.2.1 Fermentující mikroorganismy

Tradičními producenty ethanolu jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Zymomonas mobilis*. V průmyslových procesech se nejčastěji používá kvasinka *S. cerevisiae*, která se ukázala být velmi robustní a vhodná pro fermentaci lignocelulosových hydrolyzátů [7].

Potenciálními producenty ethanolu jsou i některé nesacharomycetní druhy kvasinek, např. *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kudriavzevii* (synonyma *Issatchenkia orientalis*, *Candida krusei*), *Debaryomyces hansenii* nebo *Wickerhamomyces anomalus* (synonymum *Pichia anomala*) [8, 9].

Potenciál produkce ethanolu mají také termofilní mikroorganismy, které jsou výhodné v procesu simultánní sacharifikace a fermentace vzhledem k jejich optimální teplotě pro růst přibližující se optimální teplotě enzymů [10].

1.2.2 Simultánní sacharifikace a fermentace

Simultánní sacharifikace a fermentace (SSF) neboli enzymatická hydrolýza a fermentace probíhající v jednom kroku je slibnou metodou výroby bioethanolu z lignocelulosových materiálů. Hlavním důvodem pro vyvinutí této metody bylo, že je při ní glukosa vzniklá hydrolýzou ihned spotřebována mikroorganismem, a tím se zabrání produktové inhibici enzymů [11]. Z této myšlenky plynou další výhody jako zvýšení rychlosti hydrolýzy, možnost nižšího dávkování enzymů, vyšší výnosy produktu, nižší požadavky na sterilitu, kratší trvání celého procesu a nižší investiční náklady (je potřeba pouze jedné reakční nádoby). Tento postup však vyžaduje kompromis mezi optimálními podmínkami pro enzymatickou reakci a pro fermentující mikroorganismy [12]. Účinnost této technologie je dále omezena inhibicí celulolytických enzymů vznikajícím ethanolem [13].

Náklady na výrobu ethanolu spojené s přípravou inokula je možné snížit opakovanými vsádkami s imobilizovanými buňkami. Výroba ethanolu pomocí imobilizovaných buněk má výhodu v tom, že buňky jsou zapouzdřené v nosném materiálu ve vysoké koncentraci, což vede k vyšší produktivitě ethanolu [14]. Mezi materiály vhodné pro imobilizaci buněk patří alginát vápenatý, agar, polyvinylalkohol, polyuretan, anorganické porézní matrice, případně některé zemědělské odpadní produkty [15].

Polyvinylalkohol (PVA) je vhodnou volbou tam, kde není nutný přestup kyslíku. Technologie LentiKats imobilizuje mikroorganismy do nosiče PVA ve tvaru čočky o průměru 3 - 4 mm. Tuhnutí LentiKats je založeno na částečném zaschnutí gelu při pokojové teplotě, které je jednou z nejméně škodlivých technik pro imobilizaci mikroorganismů. Takto imobilizované mikroorganismy nabízí několik výhod, jako například levnou a jednoduchou přípravu gelu, nízkou cenu nosiče, jednoduché

oddělení z reakční směsi, nízké difúzní limity (tloušťka 200 až 400 μm). Navíc má tento nosič vynikající mechanickou stabilitu, je netoxický a obtížně rozložitelný [16].

1.2.3 Současné poznatky výroby ethanolu z odpadního papíru

Výhodou využití odpadního papíru pro výrobu ethanolu je jeho dostatek, ekonomická konkurenceschopnost a obsah poměrně vysokého množství sacharidů. Odpadní papír navíc nevyžaduje tak energeticky náročné termofyzikální předúpravy ve srovnání s přírodními lignocelulosovými substráty díky tomu, že již byl v procesu rozvlákňování částečně delignifikován a zbaven významného množství hemicelulosity [17].

V jedné z dřívějších prací byl recyklovaný papír použit k výrobě ethanolu metodou SSF s termotolerantním kmenem kvasinek *Kluyveromyces marxianus*. Nejvyššího výnosu (asi 80 % teoretického) bylo získáno při nízké koncentraci substrátu a vysokém dávkování enzymu. S rostoucí koncentrací substrátu se objevily obtíže s mícháním, které bránily odpovídajícímu výtěžku ethanolu. Zachování výnosů při vyšším dávkování substrátu bylo dosaženo s fed-batch SSF, konečný výtěžek ethanolu pak byl kolem 18 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [18].

Další práce porovnávala výkon kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* s termotolerantní kvasinkou *Kluyveromyces marxianus* při SSF odpadní lepenky a papírenského kalu. Výsledky ukázaly, že *S. cerevisiae* je stejně výkonná jako *K. marxianus* při teplotě 40 °C. Konverze celulosy byla v rozmezí 55 - 60 % [19].

Jak z technického, tak ekonomického hlediska byla posuzována výroba ethanolu z různých odpadních papírů (noviny, kancelářský papír, časopisy a lepenka). Při vysokém dávkování substrátu (15 % hm.) bylo enzymatickou hydrolyzou dosaženo konverze celulosy na glukosu 50 - 76 %. Ethanol vyrobený z lepenky byl vyhodnocen jako nejlevnější [20].

Studie zabývající se hydrolyzou kancelářského papíru uvádí, že účinnost hydrolyzy je snížena přítomností popela, na který se adsorbují enzymy s větší afinitou než na celulosová vlákna. Dále zjistila, že sušení celulosových vláken je nevratný proces, který způsobuje uzavření pórů ve vláknech a také snižuje účinnost hydrolyzy [21].

Výtěžek enzymatické hydrolyzy může být zvýšen předúpravou substrátu ultrazvukem, jak bylo potvrzeno při použití tohoto postupu u hydrolyzy odpadního novinového papíru, kdy se takto získalo více než dvojnásobné množství zkvasitelných sacharidů [22]. Ultrazvuk byl také aplikován i při samotné fermentaci hydrolyzovaného papíru s téměř dvojnásobným zvýšením výtěžku ethanolu - ultrazvuk za optimalizovaných podmínek měl dle studie příznivý účinek na příjem glukosy buňkami fermentujícího mikroorganismu [23].

Postupně dochází ke zlepšování výtěžnosti ethanolu z papíru a papírenských kalů, nicméně konečná dosažená koncentrace ethanolu bývá obvykle nižší než 1 - 2 % hm. Příčinou jsou hlavně obtíže při vysokém dávkování substrátu. Nad zhruba 15 % hm. se absorbuje voda do papíru a výsledkem je příliš hustá suspenze, která vyžaduje velké síly pro míchání. Vzhledem k tomu, že odpadní papír obsahuje okolo 50 % celulosy, výtěžek ethanolu při dávkování substrátu 15 % hm. se nemůže očekávat vyšší než 3,75 % hm. Jednou z možností řešení tohoto problému spočívá

v postupném dávkování substrátu v kombinaci se SSF. Během sacharifikace dochází k degradaci substrátu, postupně se uvolňuje voda a snižuje se viskozita suspenze. Po ztekucení je pak možný další přírůstek substrátu [17].

1.3 IMOBILIZACE CELULOLYTICKÝCH ENZYMŮ

V případě rozkladu lignocelulosových materiálů je třeba zajistit úplné využití katalytického potenciálu celulolytických enzymů. Podle některých studií tvoří celulolytické enzymy až 50 % z celkových nákladů hydrolýzy [24]. Nejvýznamnější strategií pro snížení nákladů enzymatické hydrolýzy je recyklace celulolytických enzymů. Velký potenciál má technika imobilizace, která přímo zabraňuje rozdělení enzymu mezi substrát a roztok a usnadňuje tak opětovné využití [25].

O imobilizaci celulolytických enzymů je v literatuře dostupných relativně málo prací ve srovnání s jinými enzymy. Je to zejména kvůli tomu, že celulóza není rozpustná a některé imobilizační techniky (např. zapouzdření enzymu) nejsou vhodné, protože brání interakci enzymu se substrátem. Vhodnou technikou se jeví imobilizace celulolytického komplexu vazbou na nosič nebo pomocí zesítění [26].

Během posledních dvou desetiletí byly celulolytické enzymy imobilizovány na několik různých nosičů. Mezi vhodné materiály byla navržena hydrofilní polyuretanová pěna [27], chitin [28], polyvinylalkoholová membrána [29], silikonová membrána s tenkou vrstvou oxidu křemičitého na povrchu [30, 31], membrány kopolymeru akrylonitrilu [32], p-trimethylaminem modifikované polystyrenové kuličky [33], aktivní uhlí [34], nosiče s epoxidovými skupinami, které vytvářejí intenzivní vícebodovou kovalentní vazbu s lysinem a dalšími nukleofilními skupinami na povrchu proteinu [35, 36], jílové minerály (např. palygorskit, kaolinit) [37], glutaraldehydem aktivované lipozomy, které jsou dále vázány na chitozanové gelové částice [38], neporézní nanočástice oxidu křemičitého [39] nebo mesoporézní nanočástice oxidu křemičitého, které mohou být funkcionalizovány např. kondenzací s 3-aminopropyltriethoxysilanem, vinyltrimethoxysilanem nebo fenyltrimethoxysilanem [40, 41], polyamidoaminový dendrimer, který byl naroubován na povrch křemene mikrovlnným ozářením [42].

Dále byl celulolytický komplex vázán na N-sukcinyl-chitosan, který vykazuje rozpustnost resp. nerozpustnost v závislosti na pH. Imobilizovaný preparát je v rozpustné formě během enzymatické reakce, zatímco na nerozpustnou formu se převede snížením pH reakčního roztoku po reakci [43]. Na stejném principu funguje další nosič s komerčním názvem Eudragit, což je aniontový kopolymer na bázi kyseliny methakrylové a methylmethakrylátu [44, 45].

V posledních letech se využívají magnetické nosiče. Magnetické nanočástice s funkčními skupinami mají výhodné vlastnosti, kterými jsou velká plocha, malý difúzní odpor, vysoká kapacita a dají se rychle oddělit z velkého objemu roztoku pomocí magnetického pole. Příkladem magnetického nosiče pro imobilizaci celulolytických enzymů může být magnetická nanočástice pokrytá chitosanem a modifikovaná α -ketoglutarovou kyselinou [46] nebo vrstvou křemičitanu modifikovaného navázanými primárními aminy [47].

2 CÍLE PRÁCE

Cílem dizertační práce je posoudit využitelnost odpadního papíru jako potenciálního zdroje suroviny pro produkci bioethanolu a vybrat vhodný fermentující mikroorganismus. Výstupem je optimalizovaný proces hydrolýzy papíru celulolytickým komplexem enzymů a produkce ethanolu metodou simultánní sacharifikace a fermentace.

Součástí práce je také testování vybraných nosičů pro imobilizaci celulolytického komplexu potenciálně využitelných při degradaci lignocelulosových substrátů.

V práci jsou řešeny následující dílčí cíle:

- výběr vhodné předúpravy odpadního papíru (lepenky),
- optimalizace metody SSF s použitím volných buněk *S. cerevisiae*,
- srovnání produkce ethanolu metodou SSF s kvasinkami *S. cerevisiae* a bakteriemi *Zymomonas mobilis*,
- výběr vhodného kvasinkového kmene k imobilizaci,
- otestování imobilizovaných kmenů kvasinek pro produkci ethanolu metodou SSF,
- optimalizace metody SSF s použitím imobilizovaných buněk *S. cerevisiae*,
- ověření optimalizovaných podmínek pro produkci ethanolu metodou SSF ve fermentoru,
- příprava nosiče z PET lahví pro imobilizaci celulolytických enzymů,
- charakterizace imobilizovaného celulolytického komplexu na nosiči z PET lahví a dalších dvou komerčních nosičích.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MIKROORGANISMY

Saccharomyces cerevisiae (lihovarský kmen, dodaný STU v Bratislavě)

Pichia kudriavzevii CCY 29-9-42

Candida solani CCY 29-23-1

Wickerhamomyces anomalus CCY 38-1-35

Hanseniaspora guilliermondii CCY 46-2-4

Kluyveromyces marxianus CCY 51-1-1

Zymomonas mobilis CCM 2770

Zymomonas mobilis LMG 457

3.2 ENZYMY

Novozymes cellulosic ethanol enzyme kit; Novozymes A/S, Dánsko

Lyofilizovaný celulolytický komplex z *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma-Aldrich, Německo

3.3 CELULOSOVÉ SUBSTRÁTY

odpadní lepenka - běžně dostupná

kartónový papír - Biocel Paskov, a.s., Česká republika

Na-karboxymethylcelulosa, medium viscosity, Serva, Německo

Hydroxyethylcelulosa, practical grade, viscosity 4000 cP, Serva, Německo

3.4 NOSIČE PRO IMOBILIZACI

- nosič pro imobilizaci buněk

polyvinylalkohol (PVA 17 - 99), LentiKat's a.s, Česká republika

- nosiče pro imobilizaci enzymů

odpadní polyethylentereftalátové (PET) lahve - běžně dostupné

Sorsilen (objem pórů 2 - 3 cm³·g⁻¹, měrný povrch 80 - 100 m²·g⁻¹), Silona, Planá nad Lužnicí

Eupergit C (velikost částic 150 μm), Sigma-Aldrich, Německo

3.5 SIMULTÁNNÍ SACHARIFIKACE A FERMENTACE

Metoda SSF byla obecně prováděna tak, že nejdříve byl v pracovní nádobě (Erlenmeyerova baňka, resp. fermentor) vysterilizován substrát, který byl navážen na požadovanou koncentraci, dále byl přidán požadovaný objem sterilního 0,1 mol·dm⁻³ citrát-fosforečnanového tlumivého roztoku (pH 5) a po vychlazení bylo přidáno požadované množství enzymového preparátu. Nakonec byla směs zaočkována mikroorganismem. Pokud byly použity volné buňky, byly získány odstředěním z kultivačního glukosového média (10 minut při 3000 ot·min⁻¹), supernatant byl slit, k buňkám byla přidána sterilní voda a suspenze byla znovu

centrifugována. Po slítí supernatantu byly buňky naředěny na požadovanou koncentraci sterilní vodou a převedeny do kultivační nádoby se substrátem. V případě použití imobilizovaných buněk bylo zaočkování provedeno jednoduše nasypáním předem odvážených imobilizátů na sterilní Petriho misce.

SSF prováděná v Erlenmeyerových baňkách probíhala v termostatu bez třepání. Pro SSF realizovanou v laboratorním fermentoru byl postup totožný, byla nastavena teplota, možnost regulace pH a intenzita míchání.

SSF byla obvykle vedena 3 – 7 dní. Vzorky byly odebírány průběžně pro HPLC stanovení koncentrace glukosy a ethanolu.

Výtěžnost ethanolu metodou SSF byla počítána jako poměr získaného množství ethanolu a maximálního teoretického množství ethanolu. Toto maximální teoretické množství bylo vypočítáno z potenciálního množství glukosy získané z celulosy obsažené v odpadním papíru a z koeficientu konverze glukosy na ethanol.

3.5.1 Metoda HPLC/RI

Analýza vzorků odebraných během SSF byla provedena metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s refraktometrickou detekcí. Byl odebírán 1,5 ml vzorku, který byl centrifugován při $10\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 10 minut na chlazené centrifuze. Supernatant byl zfiltrován přes $45\ \mu\text{m}$ filtr do vialky. Vialka byla umístěna do karuselu autosampleru, který dávkoval $20\ \mu\text{l}$ vzorku na kolonu. Dělení probíhalo na koloně Watrex Polymer IEX H ($250\times 8\text{ mm}$) s izokratickou elucí. Mobilní fáze byla $9\ \text{mM H}_2\text{SO}_4$, průtok byl nastaven na $0,5\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, analýza probíhala při teplotě $40\ ^\circ\text{C}$ po dobu 30 min. K detekci byl použit refraktometrický detektor, kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno pomocí externí kalibrace s využitím příslušných standardů rozpuštěných v destilované vodě a analyzovaných za stejných podmínek jako vzorky.

3.6 IMOBILIZACE CELULOLYTICKÉHO KOMPLEXU

3.6.1 Příprava nosiče z odpadních PET lahví

Přibližně 100 g bezbarvých odpadních PET lahví zbavených etiket a nastříhaných na čtverce velikosti asi $4\times 4\text{ cm}$ bylo namočen do tekutého dusíku a ihned pomleto na střížném mlýně. Drť byla rozdělena na frakce pomocí sít. Částice menší než $0,8\ \text{mm}$ byly použity k aktivaci máčením v acetonu.

3.6.2 Způsob imobilizace celulolytického komplexu

Enzym byl imobilizován na tři různé nosiče - nosič z odpadních PET lahví, Sorsilen a Eupergit C. Ve 100 ml Erlenmeyerové baňce byl rozsuspendován 1 g nosiče ve $20\ \text{ml}\ 0,05\ \text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanového tlumivého roztoku o pH 4,8. Dále byl přidán enzym ($0,1 - 30\ \text{mg}$) a suspenze byla inkubována při $4\ ^\circ\text{C}$ za třepání.

3.6.3 Charakterizace imobilizovaného celulolytického komplexu

Stanovení aktivity celulolytického komplexu bylo založeno na měření nárůstu redukujících skupin vznikajících během hydrolyzy karboxymethylcelulosy (CMC) jako substrátu pomocí Somogyi-Nelsonovy metody. Aktivita volného

a imobilizovaného enzymového komplexu byla stanovena při pH 4,8 (v prostředí $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ octanového tlumivého roztoku) a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, substrátem byl 1% roztok CMC o pH 4,8.

3.6.4 Metoda podle Somogyi-Nelsona

Byly připraveny roztoky následujícím postupem:

Somogyi I:

12 g $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$, 16 g NaHCO_3 a 18 g Na_2CO_3 bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody. 144 g Na_2SO_4 (bezvodý) byl pomalu přidáván za stálého míchání do 600 ml teplé destilované vody. Po rozpuštění všech látek byly roztoky smíchány dohromady.

Somogyi II:

4 g CuSO_4 , 36 g Na_2SO_4 (bezvodý) bylo rozpuštěno v 200 ml destilované vody.

Nelsonův roztok III:

25 g $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ bylo rozpuštěno v 450 ml destilované vody, pomalu přidáno 21 ml koncentrované H_2SO_4 , roztok byl promíchán. Dále bylo přidáno 3 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ rozpuštěného v 25 ml destilované vody. Roztok byl smíchán a temperován 48 hodin v termostatu při 37°C .

Pro stanovení redukujících sacharidů bylo do každé zkumavky pipetováno 0,1 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 4:1) a následně 0,1 ml vhodně naředěného vzorku. Zkumavky byly 10 minut povařeny ve vroucí vodní lázni a následně ochlazeny na laboratorní teplotu. Potom bylo do zkumavek přidáno 0,1 ml činidla III a 1 ml destilované vody. Obsah zkumavek byl promíchán a byla změřena absorbance vzorků proti blanku při vlnové délce 530 nm. Blank obsahoval 0,1 ml destilované vody (resp. roztoku substátu) místo vzorku. Koncentrace redukujících sacharidů ve vzorku byla vypočtena z rovnice regresní přímky získané z kalibrační křivky sestavené pro glukosu.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 PŘEDÚPRAVA LEPENKY

Nejvíce redukujících sacharidů (33,3 %, vztaženo na množství celulosy) bylo získáno z papíru předupraveného jen fyzikálními metodami, a to kombinací pomletím mixérem a vibračním mlýnem (Tab. 1.).

Přestože vzorek předupravený kombinací fyzikální a chemické metody měl nejvyšší obsah celulosy, nebylo z něj získáno nejvíce redukujících sacharidů, což může být způsobeno působením reziduí chemických rozpouštědel na enzymy nebo horší přístupností celulosy po chemické předúpravě. Čistě fyzikální předúprava papíru, která je navíc časově i procedurálně méně náročná, se tedy ukázala jako nejvhodnější pro další experimenty.

Tab. 1.: Výtěžek redukujících sacharidů vzniklých enzymatickou hydrolyzou různě předupraveného papíru po 52 hodinách procesu

Způsob předúpravy	c_{RS} [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$]	výtěžek RS [%]
mletí	15,8	20,1
mletí + H_3PO_4	18,5	21,5
mletí + H_3PO_4 + NaOH	21,8	24,4
mletí + vibrační mlýn	28,9	33,3
mletí + vibrační mlýn + H_3PO_4 + NaOH	16,0	20,1

4.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK PROCESU SSF S POUŽITÍM VOLNÝCH BUNĚK *S. CEREVISIAE*

4.2.1 Dávkování substrátu

Nejvíce ethanolu vztaženo na množství použitého papíru (potažmo na množství dodané celulosy) bylo získáno při dávce 8 % w/v a 10 % w/v, kdy výtěžnost byla 48,2 %, resp. 47,9 %. Další zvýšení dávkování papíru se ukázalo jako nevýhodné, protože ačkoli absolutní výtěžek ethanolu byl vyšší, v přepočtu na dodanou celulosu byla výtěžnost nižší (36,5 % pro dávkování 12 % w/v, resp. 36,8 % pro dávkování 14 % w/v). Důvodem mohla být příliš vysoká hustota směsi, potíže s promícháváním, a tím nedostatečná dostupnost substrátu enzymům. Jako optimální proto bylo zvoleno dávkování papíru 8 % w/v.

4.2.2 Dávkování inokula

Existuje závislost mezi použitou koncentrací inokula a nárůstem biomasy a vzniku ethanolu, kdy se zvyšující se počáteční koncentrací buněk se snižuje jejich růst, dostupná glukosa tím pádem není využívána na tvorbu biomasy, ale na produkci ethanolu. V tomto případě byla jako optimální koncentrace inokula

zvolena koncentrace $40 \cdot 10^6$ CFU \cdot ml⁻¹, kdy bylo vytvořeno nejvíce ethanolu a zároveň nárůst biomasy byl nízký.

4.2.3 Dávkování enzymů

Výtěžnost ethanolu se zvyšuje až do množství 3 % w/w enzymu na množství substrátu, kdy dosahuje 49,2 %, při vyšších dávkách enzymu se výtěžnost zvyšuje jen nepatrně. Nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo při použití 10 % w/w enzymu (53,2 %), ovšem toto zvýšení není úměrné k množství enzymu. Vzhledem k tomu, že enzymy jsou v podstatě nejdražší položkou v celém procesu, je žádoucí použít co nejmenší možné množství. V tomto případě bylo zvoleno jako optimální dávkování 3 % w/w.

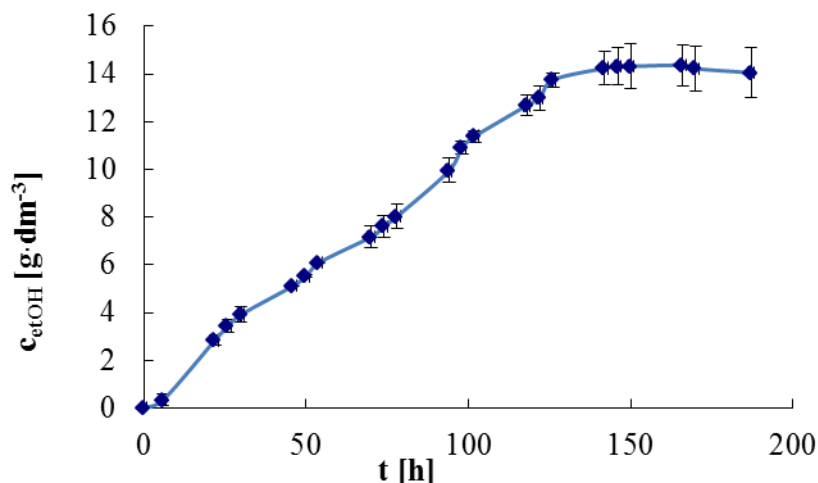
4.2.4 Živiny

Testován byl přídavek kvasničného extraktu (v koncentracích 1; 3 a 5 g \cdot dm⁻³), KH₂PO₄ (v koncentracích 0,1; 0,5 a 1 g \cdot dm⁻³) a MgSO₄ \cdot 7H₂O (v koncentracích 0,1; 0,5 a 1 g \cdot dm⁻³), tedy živin, které tvoří součást standardního média pro kultivaci kvasinek. Výsledky ukázaly, že přídavek živin nepřispěl k významnému zvýšení produkce ethanolu. V porovnání se vzorkem, ve kterém živiny nebyly, bylo nejvyšší zvýšení ethanolu zaznamenáno u vzorku s 1 g \cdot dm⁻³ KH₂PO₄, a to o pouhé 2 %. Při doživení totiž docházelo spíše k nárůstu biomasy, která spotřebovala více glukosu na úkor tvorby ethanolu.

4.2.5 Teplota

Nejvíce ethanolu bylo získáno při teplotě 30 °C, s rostoucí teplotou byla produkce nižší, při teplotě 37 °C došlo k poklesu výtěžnosti asi o 5,2 %, zatímco při 40 °C až o 44,2 %. S vyšší teplotou se snižuje viabilita buněk, a tedy i schopnost produkovat ethanol. Tento jev lze vysvětlit tím, že vyšší teplota mění transportní mechanismus nebo stupeň nasycení rozpustných sloučenin a rozpouštědel a dochází k hromadění toxinů, včetně ethanolu, v buňkách. Kromě toho vysoká teplota může způsobit denaturaci ribosomů a enzymů a může vést k problémům s fluiditou membrán [48]. Důvodem pro nižší produkci ethanolu může být i rozklad buněčné stěny celulolytickými enzymy při vyšších teplotách [49].

Výsledek optimalizace metody SSF s volnými buňkami kvasinky *S. cerevisiae* znázorňuje Graf 1. Výsledná získaná koncentrace ethanolu 14,3 g \cdot dm⁻³ po 146 h odpovídá výtěžnosti 51,5 %.



Graf 1.: Produkce ethanolu SSF se *S. cerevisiae* po optimalizaci procesu

4.3 SSF S RŮZNÝMI KVASINKOVÝMI KMENY

Kvasinka *S. cerevisiae* je sice tradičním a nejvyužívanějším producentem ethanolu, přesto výroba ethanolu z lignocelulosových substrátů tuto kvasinku staví před nové výzvy, které nebylo nutné zdolávat v klasických fermentacích. Takovými výzvami může být vysoký osmotický stres, zvýšené množství inhibitorů a také fermentace xylosy, která není možná bez geneticky upravené *S. cerevisiae*. Přírodní rozmanitost kvasinek by mohla rozšířit seznam těchto mikroorganismů s vhodnými vlastnostmi pro výrobu bioethanolu.

Produkce ethanolu metodou SSF z papíru byla testována u kvasinek *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida solani*, *Hanseniaspora guilliermondii*, přičemž srovnávacím kmenem byla *Saccharomyces cerevisiae*. Koncentrace ethanolu získané prvotním pokusem se šesti kvasinkovými kmeny jsou uvedeny v Tab. 2. Jsou uvedeny jako výsledné koncentrace po 163 hodinách SSF, kdy se již produkce zastavila. Kmeny *Candida solani* a *Hanseniaspora guilliermondii* produkovaly jen nevýznamná množství ethanolu a z následných experimentů byly vyloučeny. *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Kluyveromyces marxianus* a *Saccharomyces cerevisiae* byly použity pro experimenty prováděné s dvojnásobnými koncentracemi buněk při teplotě 30 °C a 40 °C. Vyšší teplota byla zvolena proto, aby se blížila teplotnímu optimu celulólytických enzymů, které je 50 °C. Výsledné koncentrace ethanolu z těchto experimentů jsou uvedeny v téže tabulce.

Pro tyto experimenty byl použit jiný substrát než doposud z důvodu realizace této části práce na jiném pracovišti (Chemický ústav SAV v Bratislavě), kde nebyla k dispozici lepenka předupravená výše popsaným způsobem, a proto byl použit bílý kartónový papír pomletý ručním mixérem. Výsledky mají tedy srovnávací povahu a SSF s konkrétním druhem kvasinek, který vedl k nejvyšším výtěžkům ethanolu, bude posléze optimalizována pro využití lepenky.

Tab. 2.: Konečné koncentrace ethanolu po 163 hodinách vedení SSF

	koncentrace ethanolu [g·dm ⁻³]		
	prvotní screening 30 °C	dvojnásobné inokulum	
		30 °C	40 °C
<i>P.kudriavzevii</i>	8,84 ± 0,14	14,01 ± 0,42	9,40 ± 0,04
<i>W. anomalus</i>	8,49 ± 0,01	12,47 ± 0,01	5,02 ± 0,05
<i>S. cerevisiae</i>	8,21 ± 0,02	13,35 ± 0,13	7,45 ± 0,03
<i>K. marxianus</i>	6,34 ± 0,31	12,58 ± 0,36	4,15 ± 0,08
<i>C. solani</i>	1,84 ± 0,11	-	-
<i>H. guilliermondii</i>	0,70 ± 0,04	-	-

Všechny čtyři testované kmeny vykazovaly významné zvýšení koncentrace ethanolu, když byla použita dvojnásobná koncentrace buněk při teplotě 30 °C, ale vyšší teplota způsobila pokles produkce ethanolu.

Kluyveromyces marxianus, která bývá často využívána pro své termotolerantní vlastnosti [10], se v tomto případě při vyšší teplotě neosvědčila. Při teplotě 40 °C byla produkce ethanolu oproti produkci při teplotě 30 °C třetinová.

Na druhou stranu, schopnost produkce ethanolu u *Wickerhamomyces anomalus* je třeba vyzdvihnout, protože tento druh kvasinky není příliš prostudovaný. Konečná koncentrace ethanolu byla srovnatelná s ostatními kmeny, které jsou považovány za dobré producenty. Toto potvrzuje jedna z nedávných studií hodnotící potenciál divokých kmenů kvasinek pro produkci ethanolu, kde bylo zjištěno, že *W. anomalus* měla vyšší toleranci k osmotickému stresu a toleranci k hydroxymethylfurfuralu se srovnatelnými výtěžky, jen byla nutná delší doba fermentace [50].

Nejvyšší množství ethanolu produkovaly *Pichia kudriavzevii* a *S. cerevisiae*, které navíc odolávaly teplotě 40 °C v průběhu prvních 92 hodin SSF.

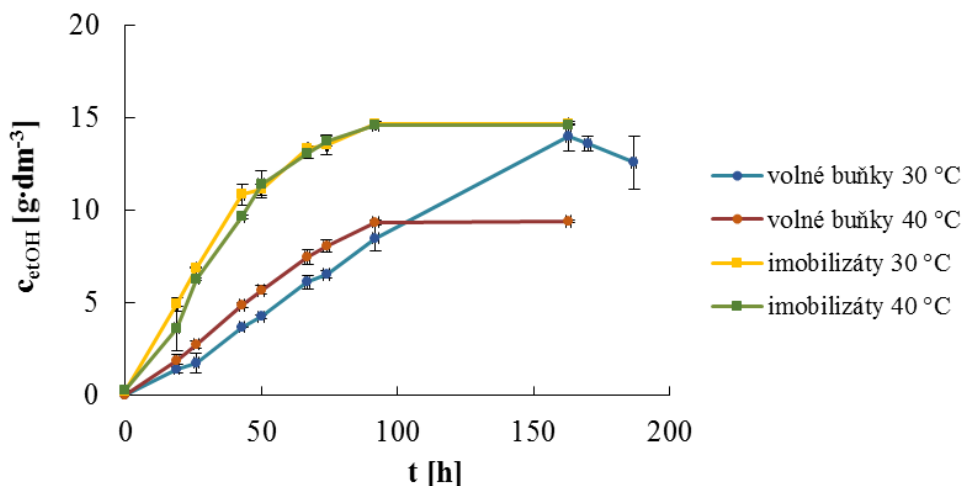
P. kudriavzevii je termotolerantní druh, který roste dobře při teplotách okolo 40 °C [51]. Výsledky ukazují, že volné buňky produkují vyšší množství ethanolu na počátku SSF při teplotě 40 °C. Nicméně s pokračujícím procesem (kolem 90. hodiny), se produkce ethanolu ukončila a buňky ztrácely životaschopnost.

4.4 SSF S IMOBILIZOVANÝMI BUŇKAMI

Z testovaných kmenů kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia kudriavzevii* produkovaly nejvyšší množství ethanolu a zároveň byly rezistentní k teplotě 40 °C během prvních 92 hodin. Z těchto důvodů byly imobilizovány technologií LentiKats® a použity pro další experimenty, které byly prováděny za stejných podmínek jako s volnými buňkami.

V případě *P. kudriavzevii* nebyl téměř žádný rozdíl v produkci ethanolu imobilizovanými buňkami při kultivaci při 30 °C a 40 °C, kdy konečná koncentrace ethanolu v médiu byla 14,67 ± 0,15 g·dm⁻³, resp. 14,63 ± 0,03 g·dm⁻³ (Graf 2.). Volné buňky dokázaly při 30 °C vyprodukovat podobné množství ethanolu (14,01 ± 0,42 g·dm⁻³), jen za delší dobu. Produkce volnými buňkami byla ze začátku

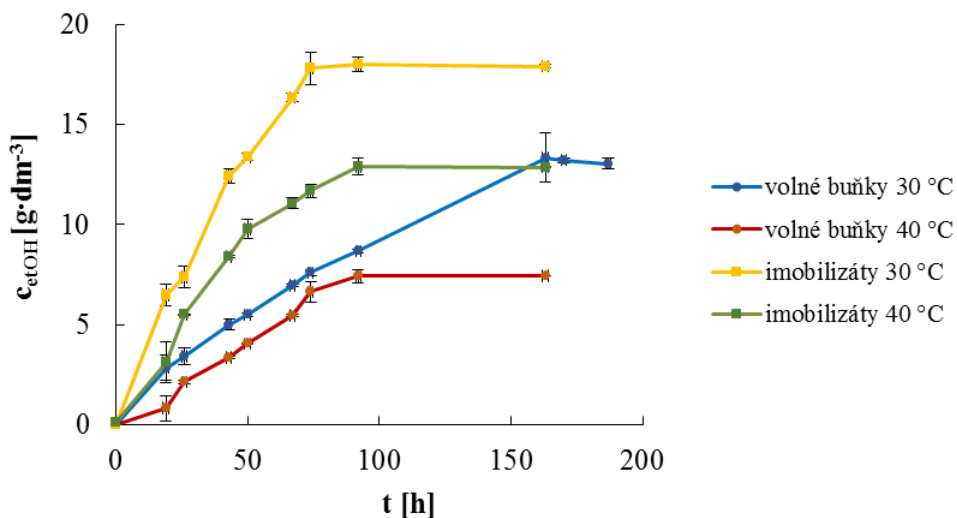
vyšší při 40 °C, což souvisí s termotolerancí tohoto kmene, ovšem při dlouhém vedení procesu tuto vlastnost zřejmě ztrácí. Po immobilizaci však buňky termotoleranci neztrácejí, na druhou stranu, tato výhoda může být využita jen tehdy, pokud je žádoucí proces urychlit za cenu vyšších energetických nároků.



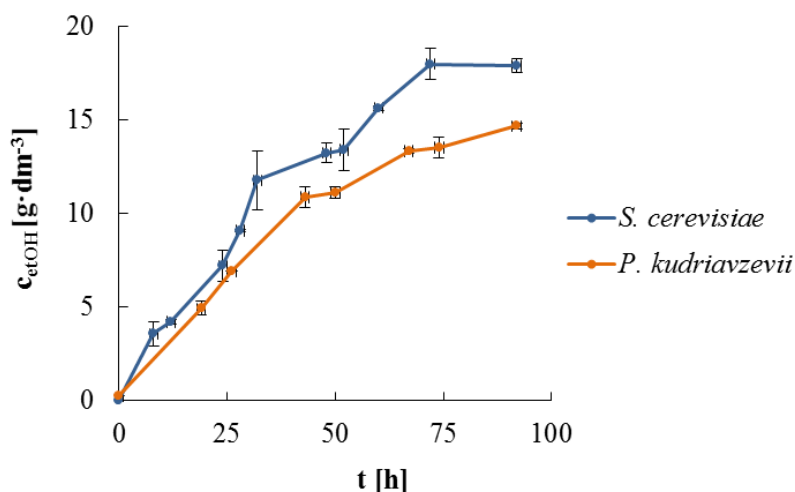
Graf 2.: Produkce ethanolu *Pichia kudriavzevii*

Immobilizované *S. cerevisiae* produkovaly nejvíce při 30 °C, kdy konečná koncentrace ethanolu byla $17,90 \pm 0,18 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Při 40 °C byla produkce nižší jak volnými, tak immobilizovanými buňkami, s nimiž bylo dosaženo koncentrace $12,89 \pm 0,41 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Graf 3.). Při teplotě 40 °C tedy *S. cerevisiae* produkovala méně než *P. kudriavzevii*. Tento fakt lze vysvětlit nižším teplotním optimem volných i immobilizovaných buněk *S. cerevisiae* než je optimum *P. kudriavzevii*.

Pro praktické využití je však výhodnější vést SSF při nižší teplotě z důvodu úspory nákladů na energii. Vzájemné srovnání produkce ethanolu těmito dvěma kmeny při 30 °C lze posoudit z Grafu 4. Z něj je patrné, že immobilizovaná *S. cerevisiae* je při této teplotě schopna celkově vyšší produkce, a je tedy vhodnější pro případné průmyslové využití.



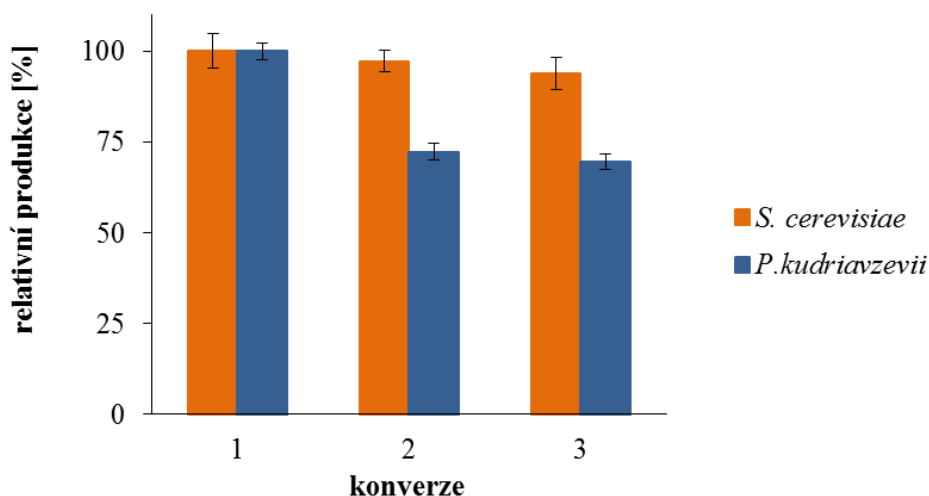
Graf 3.: Produkce ethanolu *Saccharomyces cerevisiae*



Graf 4.: Srovnání produkce ethanolu imobilizovanými buňkami *P. kudriavzevii* a *S. cerevisiae* při 30 °C

4.4.1 Operační stabilita imobilizovaných buněk

Pro praktické využití musí mít imobilizované buňky potřebnou aktivitu během celého procesu, a to i po opakovaných konverzích. Dřívější studie prokázala vysokou mechanickou stabilitu nosiče s buňkami imobilizovanými technologií LentiKats® při procesu kvašení piva. Během procesu trvajícího 30 dnů nebyly zaznamenány žádné změny v aktivitě a tvaru buněk ani velikosti nosiče [52]. Pro potvrzení předpokladu dobré operační stability byly provedeny tři po sobě následující cykly SSF. Po třetí konverzi byla u *S. cerevisiae* zachována produkce ethanolu z 94 %, zatímco u *P. kudriavzevii* klesla po třetí konverzi produkce o více než 30 % (Graf 5.). Výsledky tedy ukazují, že průmyslově adaptované buňky *S. cerevisiae* byly vhodnější pro imobilizaci a průmyslovou aplikaci než *P. kudriavzevii*.



Graf 5.: Stabilita produkce ethanolu imobilizovanými buňkami *P. kudriavzevii* a *S. cerevisiae* při opakovaných konverzích

4.5 OPTIMALIZACE PODMÍNEK PROCESU SSF S POUŽITÍM IMOBILIZOVANÝCH BUNĚK *S. CEREVISIAE*

4.5.1 Dávkování substrátu

Na rozdíl od experimentu s volnými buňkami bylo nejvíce ethanolu (vztaženo na množství použitého papíru) získáno při dávce 6 % w/v, kdy výtěžnost byla 85,6 %. Při dávkování papíru 8 % w/v, které bylo optimální při použití volných buněk, se výtěžnost snížila, byla jen 77,1 %. Jako optimální proto byla zvolena koncentrace papíru 6 % w/v.

4.5.2 Množství nosiče s imobilizovanými buňkami

Bylo testováno množství 5; 10 a 15 % w/v. Množství 5 % w/v nebylo dostačující, bylo získáno o 15 % ethanolu méně než při dávkování 10 % w/v. Naopak 15 % w/v imobilizátů již bylo nadbytečné, protože taková koncentrace biomasy neměla vliv na vyšší výtěžek. Optimální množství buněk pro SSF bylo v množství 10 % w/v imobilizátů. Ve srovnání s volnými buňkami, kdy bylo dávkováno (po přepočtu celkového množství buněk v konkrétním objemu) méně buněk, je dávkování imobilizovaných buněk vyšší a vede k ještě vyššímu výtěžku. To může souviset s vyšší tolerancí imobilizovaných buněk k inhibičnímu efektu ethanolu. Navíc, díky vyšší koncentraci buněk a kratší lag fázi je celý proces rychlejší.

4.5.3 Dávkování enzymů

Přestože bylo předpokládáno, že při použití imobilizovaných buněk bude potřeba vyšší dávkování enzymů, bylo zjištěno, že není nutné a je dostačující dávkování 3 % w/w enzymů stejně jako u buněk volných. Vysvětlit tento poznatek lze tím, že proces s imobilizovanými buňkami probíhá rychleji, a tedy je enzymy vytvořená glukosa ihned spotřebovávána a nedochází k inhibici enzymů substrátem. Také je celý proces kratší a enzymy neztrácejí aktivitu tolik, jako při delším procesu s volnými buňkami.

4.5.4 Živiny

Tak jako u SSF s volnými buňkami byl testován přídavek kvasničného extraktu (v koncentracích 1; 3 a 5 g·dm⁻³), KH₂PO₄ (v koncentracích 0,1; 0,5 a 1 g·dm⁻³) a MgSO₄·7H₂O (v koncentracích 0,1; 0,5 a 1 g·dm⁻³). Výsledky ukázaly, že ani při SSF s imobilizovanými buňkami není přídavek živin potřeba, protože produkce ethanolu se nezvýšila.

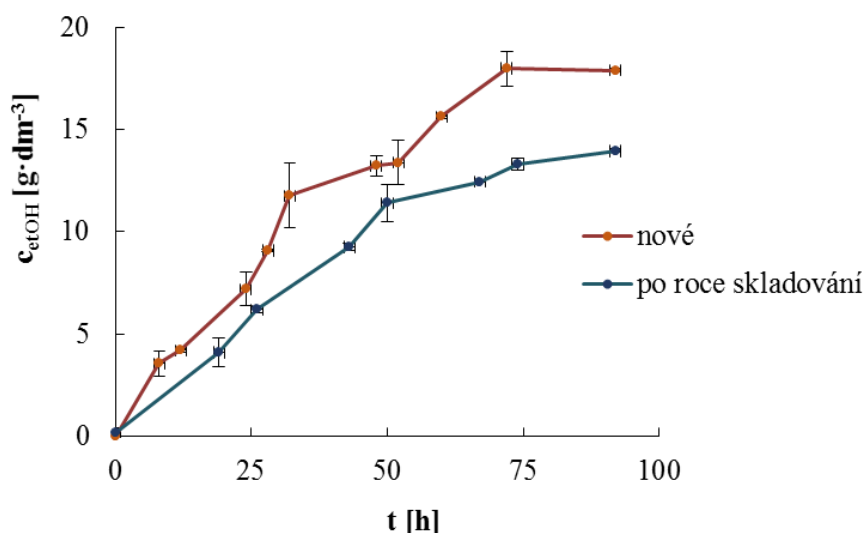
4.5.5 Teplota

Toleranci mikroorganismu k vyšší teplotě je možné imobilizací zvýšit [53], což v případě imobilizace *S. cerevisiae* bylo potvrzeno. Výtěžnost ethanolu při 40 °C se při použití imobilizovaných buněk snížila o 25,3 % a byla v čase 78 hodin

od počátku kultivace vyšší než při použití volných buněk při 30 °C (s volnými buňkami klesla výtěžnost ethanolu při 40 °C o 44,2 %). Optimální teplotou pro proces s imobilizovanými buňkami zůstává 30 °C.

4.6 SKLADOVACÍ STABILITA IMOBILIZOVANÝCH BUNĚK *S. CEREVISIAE*

Skladovací stabilita byla provedena pro imobilizované *S. cerevisiae*, kdy byla zjišťována schopnost produkce ethanolu po jednom roce skladování v uchovávacím médiu. Závislost produkce ethanolu v čase pomocí nových a rok starých imobilizátů znázorňuje Graf 6. Literatura uvádí dobrou skladovatelnost, glykolytickou aktivitu a životaschopnost buněk *S. cerevisiae* imobilizovaných v alginátu vápenatém a uložených déle než 1 rok [54]. Výsledky této práce ukazují asi 23% snížení produkce ethanolu po jednom roce uskladnění imobilizovaných buněk, které by mohlo být ještě dostačující pro komerční účely. Nicméně optimalizace podmínek skladování nebo složení použitého uchovávacího média by mohlo výtěžky ethanolu zlepšit.



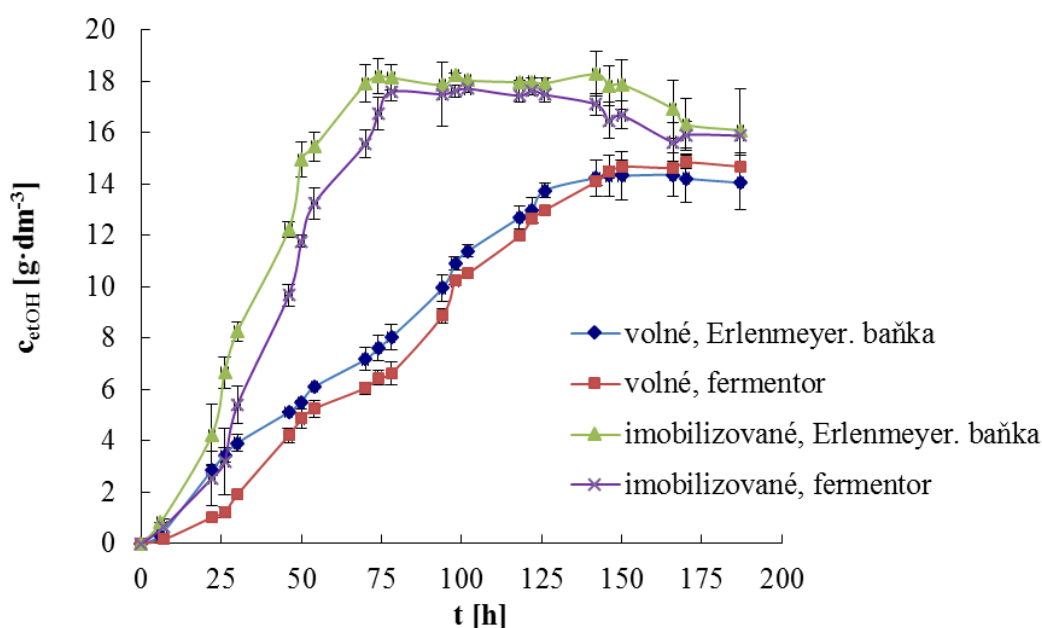
Graf 6.: Produkce ethanolu imobilizovanými buňkami *S. cerevisiae* po roce uskladnění

4.7 SSF VE FERMENTORU

Ověření optimalizací získaných podmínek v Erlenmeyerových baňkách bylo provedeno pro laboratorní fermentor s maximálním objemem 2 dm³. Pokusy byly prováděny jak s volnými, tak imobilizovanými buňkami a jako prostředí byl opět použit 0,1 mol·dm⁻³ citrát-fosforečnanový tlumivý roztok o pH 5. Dávkování celulolytického komplexu NS 22086 bylo 3 % w/w a β-glukosidasy NS 22118 0,6 % w/w vztaheno na hmotnost lepenky. Proces probíhal při teplotě 30 °C. Pokus s volnými buňkami byl uskutečněn s množstvím lepenky 8 % w/v. Pro pokus s imobilizovanými buňkami bylo dávkováno dle výsledků optimalizačních kroků 6 % w/v lepenky.

Výsledky obou experimentů včetně srovnání s pokusy provedenými v Erlenmeyerových baňkách jsou znázorněny v Grafu 7 a také v Tab. 3. Všechny SSF byly vedeny po dobu 187 hodin, přičemž s volnými buňkami bylo maximální koncentrace ethanolu dosaženo přibližně po 146 hodině, zatímco s imobilizovanými již po přibližně 70 hodinách procesu. Ve fermentoru byla však jak s volnými tak imobilizovanými buňkami dosažena maximální koncentrace ethanolu vždy o něco pomaleji než v Erlenmeyerových baňkách, což je způsobeno větším objemem směsi, její hustotou, a tedy obtížným dosažením homogenity, i přes to, že byla směs promíchávána.

Výtěžek ethanolu vzniklého při SSF ve fermentoru byl nicméně srovnatelný s výtěžkem v Erlenmeyerových baňkách a podmínky získané optimalizací v předcházejících krocích jsou tedy aplikovatelné i pro produkci ethanolu ve větším měřítku.



Graf 7.: Srovnání produkce ethanolu volnými a imobilizovanými buňkami *S. cerevisiae* v Erlenmeyerových baňkách a ve fermentoru

Tab. 3.: Srovnání výsledků produkce ethanolu volnými a imobilizovanými buňkami

buňky	měřítko	c_{etOH} [g·dm ⁻³]	výtěžnost [%]	čas [h]
volné	Erlenmeyerova baňka	14,3 ± 0,8	51,4	146
	fermentor	14,7 ± 0,3	52,6	150
imobilizované	Erlenmeyerova baňka	18,2 ± 0,7	87,0	74
	fermentor	17,6 ± 0,3	84,3	78

4.8 SROVNÁNÍ DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ SE SOUČASNÝM STAVEM ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Aby byla destilace ethanolu z média ekonomicky výhodná, uvádí se, že minimální koncentrace ethanolu v médiu by měla být $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [24]. Nicméně většina výsledků publikovaných v posledních letech s problematikou SSF různých lignocelulosových materiálů (nejen papíru, ale např. pšeničné slámy, odpadů ze zemědělství, apod.) udávají koncentraci ethanolu výrazně nižší než $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, např. [55-58]. Pro dosažení takových koncentrací ethanolu je nezbytné vysoké dávkování substrátu, které je však obtížně aplikovatelné kvůli problémům s mícháním nebo čerpáním a omezenému přestupu hmoty způsobeného vysokou viskozitou média a také jeho zvýšené toxicity vzhledem k přítomnosti většího množství inhibitorů. Se zvyšujícím se dávkováním substrátu (obvykle vyšší než 7-10 % w/v) tak obvykle výtěžnost ethanolu klesá [59]. Možným řešením by bylo uspořádání procesu způsobem fed-batch, který by umožnil postupné dávkování předupraveného substrátu, a tím také snížení viskozity média ve srovnání se vsádkovým uspořádáním.

Výsledky dosažené v této práci tedy odpovídají stavu současného poznání s tím, že dosažená výtěžnost nad 80 % patří spíše k nadprůměrným. Lepší výtěžnost byla dosažena díky aplikaci imobilizovaných buněk. Koncentrace ethanolu se po imobilizaci zvýšila téměř o 25 %, zatímco obdobné práce na produkci ethanolu pomocí různých imobilizačních technik udávají zvýšení o 10 - 15 %, např. [14, 60, 61]. Vyšší produktivita imobilizovaných buněk není umožněna jen vysokou koncentrací buněk v nosiči, ale také díky tomu, že imobilizované buňky jsou méně hydrodynamicky a mechanicky zatěžovány ve srovnání s buňkami volnými, což jim umožňuje využívat více buněčné energie k tvorbě produktu [14, 62].

Současně s vyšším výtěžkem ethanolu se použitím imobilizovaných fermentujících buněk celý proces zrychlil, s imobilizovanými buňkami trvala SSF o polovinu kratší dobu (150 h vs. 75 h), kratšího trvání fermentace bylo imobilizací buněk dosaženo i v dalších studiích [62-64].

4.9 IMOBILIZACE CELULOLYTICKÉHO KOMPLEXU

Nosič z PET lahví, způsob jeho přípravy a způsob imobilizace enzymu je předmětem užitého vzoru a patentu, jejichž spolupůvodcem je autor této práce. Dále byly k imobilizaci enzymu použity dva komerční nosiče, Sorsilen a Eupergit C.

4.9.1 Charakterizace imobilizovaného celulolytického komplexu

Stanovení optimálního množství navázaného enzymu na nosiči

Aktivita získaných imobilizovaných preparátů byla závislá na množství navázaného enzymového komplexu a byla vždy nižší než aktivita stejného množství volného enzymu. U PET nosiče, který měl nejmenší povrch v porovnání s ostatními nosiči, docházelo se zvyšujícím se množstvím adsorbovaného enzymu ke snižování

relativní aktivity. Nejvyšší dosažená relativní aktivita byla 1,70 % při navázaných 0,3 mg enzymu na 1 g nosiče. Maximální sorpční kapacita byla 1,16 mg enzymu na 1 g nosiče.

Imobilizovaný enzym na nosiči Sorsilen měl nejvyšší relativní aktivitu (4,56 %), když bylo vázáno 5 mg enzymu. Další zvyšování koncentrace enzymu na nosiči vedlo k poklesu relativní aktivity, což bylo pravděpodobně způsobeno sterickými zábranami vedoucími ke snížení přístupnosti vysokomolekulárního substrátu. Podobný efekt byl pozorován při použití nosiče Sorsilen po imobilizaci endopolygalakturonasy [65].

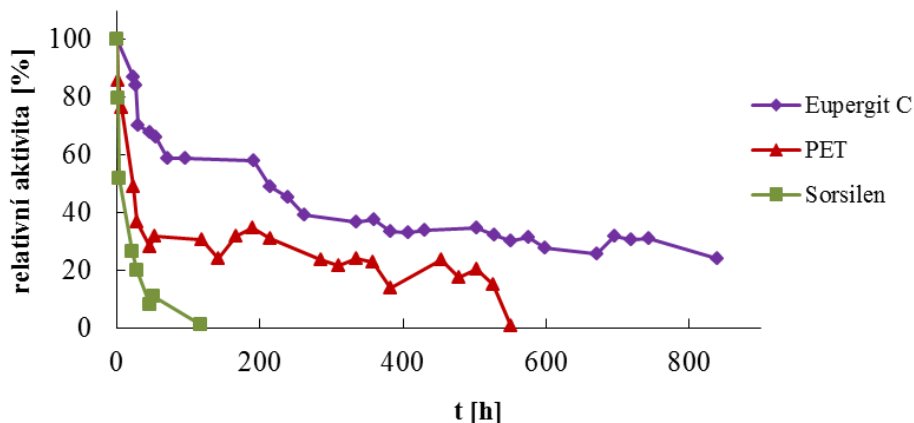
U enzymu navázaného na Eupergit C docházelo ke zvyšování relativní aktivity se zvyšujícím se množstvím dávkovaného enzymu. Při nejvyšším možném množství navázaného enzymu (1,43 mg) byla relativní aktivita více než 13 %. Důvodem pro takto vysokou relativní aktivitu ve srovnání s předchozími dvěma preparáty je pravděpodobně fakt, že enzym je na Eupergit C vázán kovalentně a tato vazba neovlivňuje negativně přístup substrátu do aktivních center imobilizovaných enzymů.

Stabilita imobilizovaných preparátů v průběhu skladování

Ačkoliv měl nejvyšší relativní aktivitu preparát na nosiči Eupergit C, z hlediska celkové aktivity vykazoval nejlepší výsledky imobilizát Sorsilen, a proto se tento preparát zdál být nejvhodnější pro praktické využití. Tento imobilizát však neměl dobrou skladovací stabilitu, během prvních tří týdnů došlo k poklesu jeho aktivity o téměř 50 %. V případě preparátu s Eupergitem C se pokles aktivity projevil během dvou týdnů, a to o 30 % a dále už nebyl zaznamenán. Preparát s PET nosičem byl první dva týdny stabilní, a po sedmi týdnech poklesla aktivita o 21 %. Ze všech nosičů je tedy po sledovanou dobu sedmi týdnů nejstabilnější. Ani v jednom případě nebyl pokles aktivity navázaných enzymů spojen s uvolňováním enzymů z testovaných nosičů.

Operační stabilita

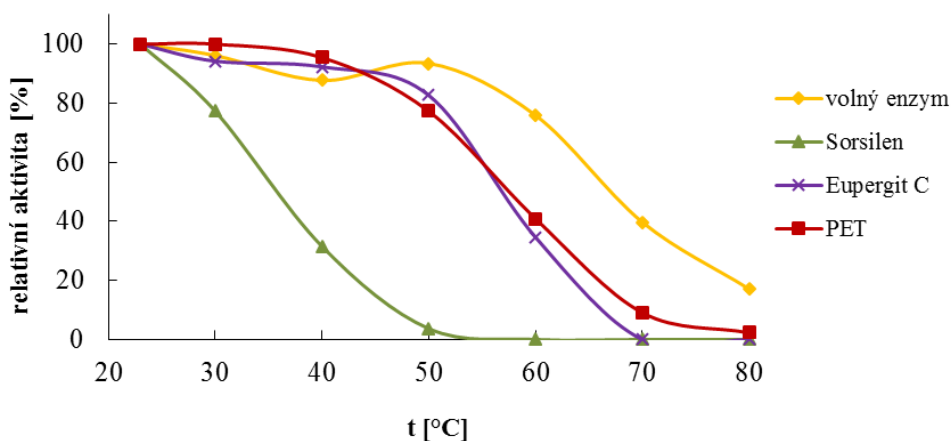
Operační stabilita imobilizovaných preparátů byla stanovena během konstantního průtoku roztoku substrátu (CMC) kolonou a je znázorněna v Grafu 8. Aktivita imobilizovaného enzymu na PET nosiči se ustálila po 48 hodinách procesu, během kterých došlo k výraznému poklesu až na 30 % původní hodnoty, přičemž v průběhu následujících 20 dnů již nebyl zaznamenán pokles. U preparátu se Sorsilenem došlo k poklesu aktivity po dvou dnech až o 90 % a po dalších třech dnech aktivita klesla na nulu. Za tento jev je zřejmě odpovědná vysoká nespecifická sorpční kapacita nosiče, kdy došlo k jeho zahlcení substrátem. Aktivita preparátu s Eupergitem C poklesla po prvních dvou dnech o 32 %, poté byl pokles jen velmi pozvolný a aktivita se pohybovala okolo 30 % původní hodnoty.



Graf 8.: Srovnání relativní aktivity imobilizátů při kontinuálním použití v koloně

Tepelná stabilita

Imobilizace neměla pozitivní účinek na tepelnou stabilitu celulolytického komplexu. Z Grafu 9. lze vidět, že preparáty s PET nosičem a Eupergitem C vykazovaly podobné vlastnosti, neboť stabilita zůstala nezměněna až do teploty 50 °C a při vyšších teplotách postupně klesala, podobně jako tomu bylo u volného enzymového komplexu. Preparát se Sorsilenem se ukázal jako velmi teplotně nestabilní, již při teplotě 50 °C nevykazoval žádnou aktivitu. Důvodem by mohla být zvýšená sorpce substrátu na nosič v důsledku zrychlení jeho přenosu při zvýšené teplotě. Sorpce substrátu na tento nosič byla pozorována už při zjišťování operační stability tohoto preparátu.



Graf 9.: Srovnání tepelné stability volného enzymu a imobilizovaných enzymových komplexů

pH a teplotní optimum

Optimální pH pro preparát s PET nosičem se nezměnilo ve srovnání s hodnotou pro volný enzym a bylo 4,8. V případě druhých dvou preparátů došlo k posunu pH optima na hodnotu 4,6 pro preparát se Sorsilenem a 4,4 pro preparát s Eupergitem C. Tento jev je vysvětlen tím, že změny chování v závislosti na pH mohou souviset s nábojem jak enzymu, tak nosiče [66].

Teplotní optimum enzymu imobilizovaného na PET nosič a Eupergit C zůstalo stejné jako u volného enzymu, a to 60 °C. Imobilizát Sorsilenu měl teplotní optimum při 50 °C. Tato hodnota je však ovlivněna skutečností, že celulolytický komplex imobilizovaný na Sorsilen je při teplotách vyšších než 50 °C nestabilní.

Enzymová kinetika

Kinetika imobilizovaných enzymů vykazovala chování podle modelu Michaelise a Mentenové. Po imobilizaci byl pozorován pokles maximálních rychlostí u všech preparátů ve srovnání s volným enzymem (Tab. 4.). S největší pravděpodobností byl tento pokles způsoben stericými zábranami nebo sníženou katalytickou účinností enzymu. Hodnota K_M pro enzym imobilizovaný na PET nosič a Eupergit C se také snížila, což bylo pozorováno i u celulolytického enzymu navázaného na methakrylátový polymerní nosič Eudragit S 100 [44], a dochází tedy ke zvýšení afinity substrátu k aktivnímu místu.

Tab. 4.: Hodnoty kinetických konstant

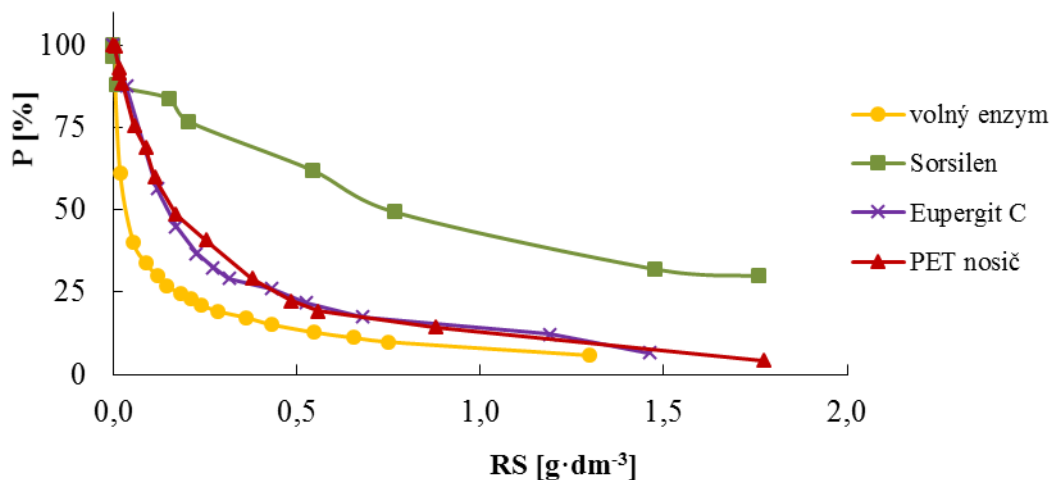
	K_M [g·dm ⁻³]	v_{lim} [μmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹]
volný enzym	13,856	103,093
PET nosič	3,123	1,139
Sorsilen	14,165	0,736
Eupergit C	3,076	3,212

Způsob účinku enzymu

Měřením poklesu viskozity bylo zjištěno, že u volného komplexu enzymů převládalo štěpení substrátu náhodným způsobem, tzn. nejdříve se uplatňovaly endoglukanasy a vznikaly nižší oligosacharidy. Dimery a monomery se tvořily až ke konci reakce.

Imobilizace na PET nosič ani kovalentní vazba na Eupergit C nezpůsobila výrazné změny ve způsobu degradace polymerního substrátu (Graf 10.). Způsob účinku imobilizovaných celulolytických enzymů byl změněn jen v případě adsorpce na Sorsilen, kdy štěpení neprobíhalo náhodně, ale postupovalo podél řetězce molekuly substrátu. K podobnému zjištění dospěla studie imobilizace polygalakturonasového komplexu na Sorsilen [67] a bylo potvrzeno i analýzou produktů degradace na tenké vrstvě, kdy u volného enzymu a enzymu imobilizovaného na PET nosič a Eupergit C byly v počátečních fázích reakce

detekovány jen oligosacharidy. Monomer a dimer byl detekován jen u hydrolyzy polymerního substrátu enzymem imobilizovaným na Sorsilen.



Graf 10.: Závislost poklesu viskozity substrátu na nárůstu redukujících skupin během hydrolyzy

Srovnáním vlastností celulólytického komplexu imobilizovaného na tři testované nosiče lze usuzovat, že PET nosič je vhodnou alternativou ke komerčním nosičům, jejichž cena je mnohdy příliš vysoká. Enzym imobilizovaný na PET nosič měl sice menší relativní aktivitu oproti enzymu imobilizovanému na Eupergit C, což je dáno zejména jeho menším měrným povrchem a způsobem vazby enzymu na nosič, zato prokázal dobrou skladovací stabilitu i ostatní testované vlastnosti. Vzhledem k tomu, že charakterizace imobilizovaného enzymu byla prováděna na rozpustný substrát, dalším krokem by mělo být jeho testování na reálném lignocelulosovém materiálu.

5 ZÁVĚR

Tato dizertační práce se zabývá problematikou využití odpadního papíru patřícího do skupiny lignocelulosových materiálů, které jsou v současné době považovány za perspektivní zdroj sacharidů pro výrobu bioethanolu. Hlavní část práce je tematicky zaměřena na produkci bioethanolu z odpadního papíru jak pomocí volných, tak imobilizovaných buněk, a druhá část se věnuje imobilizovaným celololytickým enzymům, které by mohly být využity pro hydrolýzu lignocelulosových materiálů.

Za surovinu pro produkci bioethanolu byla vybrána odpadní lepenka, která byla předupravena pomocí několika různých metod, z nichž se jako nejvhodnější ukázala fyzikální předúprava, a sice kombinace pomletím mixérem a vibračním mlýnem. Takto předupravená lepenka byla použita pro produkci bioethanolu pomocí metody simultánní sacharifikace a fermentace, která byla vybrána pro některé své výhody, zejména pro možnost realizace procesu výroby bioethanolu v jedné nádobě a kratší trvání celého procesu. Produkce bioethanolu metodou SSF z lepenky byla optimalizována s volnými buňkami *Saccharomyces cerevisiae* a také s bakterií *Zymomonas mobilis*. Přestože bakterie *Z. mobilis* jsou považovány za dobrého producenta ethanolu a výtěžnost ethanolu může být dokonce vyšší než u kvasinek, metodou SSF použitou v této práci bylo dosaženo zhruba polovičního výtěžku. Proto byly vytipovány další mikroorganismy, a to kvasinky ze Zbierky kultur kvasiniek, z nichž kmeny *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus* a *Kluyveromyces marxianus* se schopností produkce ethanolu blížily schopnostem komerčního kmene *S. cerevisiae*. Zajímavý a hodný bližšího zkoumání je zejména kmen *P. kudriavzevii*, který byl navíc do určité míry termotolerantní.

Kmeny *S. cerevisiae* a *P. kudriavzevii* byly imobilizovány technologií enkapsulace do nosiče z polyvinylalkoholu a opět testovány na produkci bioethanolu. Přestože *P. kudriavzevii* vykazovala v produkci ethanolu dobré výsledky, pro případné průmyslové použití se nakonec ukázala jako více vhodná *S. cerevisiae*, jejíž imobilizovaná forma měla větší stabilitu při opakovaných konverzích.

Obecně se díky imobilizaci fermentujících buněk zvýšila výtěžnost bioethanolu, maximální dosažená výtěžnost byla 87 %, s volnými buňkami se výtěžnost pohybovala okolo 50 %. Současně s vyšším výtěžkem se použitím imobilizovaných buněk celý proces zrychlil, s imobilizovanými buňkami trvala SSF o polovinu kratší dobu.

Podmínky metody SSF z lepenky pomocí volných i imobilizovaných buněk *S. cerevisiae* zjištěné optimalizací v Erlenmeyerových baňkách byly ověřeny v dvoulitrovém laboratorním fermentoru, kde bylo dosaženo srovnatelného výtěžku.

V části práce věnované pro změnu imobilizací enzymů se podařilo připravit nosič z odpadní suroviny, konkrétně odpadních PET lahví, jež se stal předmětem patentu. Tento nosič byl použit k imobilizaci celololytického komplexu, u něhož byly stanoveny základní charakteristiky, jako optimální pH a teplota, skladovací, operační a tepelná stabilita, enzymová kinetika a také způsob účinku enzymu po imobilizaci. Zároveň byly všechny tyto charakteristiky stanoveny taktéž u stejného celololytického komplexu imobilizovaného na dva komerční nosiče, Eupergit C a Sorsilen, a tyto tři imobilizáty byly vzájemně srovnány.

Zatímco enzym imobilizovaný na Sorsilen se pro případné využití neosvědčil, nosiče z PET lahví a Eupergit C se jeví jako vhodné k imobilizaci celulolytického komplexu, protože tyto imobilizáty mají poměrně dobrou operační, skladovací i tepelnou stabilitu a nemění se u nich způsob účinku oproti volnému enzymu.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PAULOVÁ L.; PAVLOVÁ E.; OLŠAN V.; JAISAMUT K.; LIPOVSKÝ J.; RYCHTERA M.; MELZOCH K.: Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulosity jako suroviny pro výrobu bioethanolu. *Chemagazín*. 2010. 20: 16 - 18.
- [2] Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: A joint research agenda. Rockville, Maryland: U.S. Department of energy. 2006. 206 s.
- [3] TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K.: Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *International Journal of Molecular Science*. 2008. 9: 1621 - 1651.
- [4] ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J.: Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010. 101: 4851 - 4861.
- [5] BHAT, M.K.; BHAT, S.: Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997. 15: 583 - 620.
- [6] ANDRIĆ, P.; MEYER, A.; JENSEN, P.; DAM-JOHANSEN, K.: Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. *Biotechnology Advances*. 2010. 28: 308 - 324.
- [7] ŠULÁK, M.; ŠMOGROVIČOVÁ, D.: Bioetanol: Súčasný trendy vo výskume a v praxi. *Chemické listy*. 2008. 102: 108 - 115.
- [8] CHAN, G. F.; GAN, H. M.; LING, H. L.; RASHID, N. A. A.: Genome Sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a Potential Producer of Bioethanol and Phytase. *Eukaryotic Cell*. 2012. 11: 1300 - 1301.
- [9] NGO THI PHUONG, D.; THANONKEO, P.; PHONG, H. X.: Screening Useful Isolated Yeasts for Ethanol Fermentation at High Temperature. *International Journal of Applied Science and Technology*. 2012. 2: 65 - 71.
- [10] BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; CABAÑAS, A.; CARRASCO, J.; MARTÍN, C.; NEGRO, M.J.; SAEZ, F.; SAEZ, R.: Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1991. 28 - 29: 307 - 315.
- [11] OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G.: A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008; 1: 7.
- [12] SUN, Y.; CHENG, J.Y.: Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002. 83: 1 - 11.
- [13] BEZERRA, R.; DIAS, A.: Enzymatic kinetic of cellulose hydrolysis: Inhibition by ethanol and cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005. 126: 49 - 59.
- [14] LEE, K.H.; CHOI, I.S.; KIM, Y.G.; YANG, D.J.; BAE, H.J.: Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused

- Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. *Bioresource Technology*. 2011. 102: 8191 - 8198.
- [15] WATANABE, I.; MIYATA, N.; ANDO, A.; SHIROMA, R.; TOKUYASU, K.; NAKAMURA, T.: Ethanol production by repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresource Technology*. 2012. 123: 695 - 698.
- [16] REBROŠ, M.; ROSENBERG, M.; STLOUKAL, R.; KRIŠTOFÍKOVÁ, Ľ.: High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats®. *Letters in Applied Microbiology*. 2005. 41: 412 - 416.
- [17] ELLISTON, A.; COLLINS, S.; WILSON, D.; ROBERTS, I.; WALDRON, K.: High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. *Bioresource Technology*. 2013.
- [18] BALLESTEROS, M.; OLIVA, J.; MANZANARES, P.; NEGRO, M.; BALLESTEROS, I.: Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002. 18: 559 - 561.
- [19] KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K.: Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*. 2004. 20: 103 - 110.
- [20] WANG, L.; SHARIFZADEH, M.; TEMPLER, R.; MURPHY, R.J.: Technology performance and economic feasibility of bioethanol production from various waste papers. *Energy & Environmental Science*. 2012. 5: 5717 - 5730.
- [21] CHEN, H.; VENDITTI, R.; JAMEEL, H.; PARK S.: Enzymatic Hydrolysis of Recovered Office Printing Paper with Low Enzyme Dosages to Produce Fermentable Sugars. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011. 166: 1121 - 1136.
- [22] SUBHEDAR, P. B.; BABU, N. R.; GOGATE, P. R.: Intensification of enzymatic hydrolysis of waste newspaper using ultrasound for fermentable sugar production. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015. 22: 326 - 332.
- [23] SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R.: Ultrasound-assisted bioethanol production from waste newspaper. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2015. 27: 37 - 45.
- [24] WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI G.: Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003. 19: 1109 - 1117.
- [25] GOKHALE, A. A., LEE, I.: Cellulase immobilized nanostructured supports for efficient saccharification of cellulosic substrates. *Topics in Catalysis*. 2012. 55: 1231- 1246.
- [26] ZHOU, Y.; SU, S.; SONG, M.; NIE, H.; ZHU, L.; WHITE, C.: Improving the stability of cellulase by immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles modified alpha-ketoglutaric acid. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 2009. 1 - 4.

- [27] CHAKRABARTI, A.C.; STOREY, K. B.: Immobilization of cellulase using polyurethane foam. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1988. 19: 189 - 207.
- [28] VAILLANT, F.; MILLAN, A.; MILLAN, P.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M.: Co-immobilized pectinlyase and endocellulase on chitin and Nylon supports. *Process Biochemistry*. 2000. 35: 989 - 996.
- [29] WU, L.; YUAN, X.; SHENG, J.: Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science*. 2005. 250: 167 - 173.
- [30] TÉBÉKA , I.; SILVA, A.; PETRI, D.: Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. *Langmuir*. 2009. 25: 1582 - 1587.
- [31] OGEDA, T.; SILVA, I.; FIDALE, L.; EL SEOUD, O.; PETRI, D.: Effect of cellulose physical characteristics, especially the water sorption value, on the efficiency of its hydrolysis catalyzed by free or immobilized cellulase. *Journal of Biotechnology*. 2012. 157: 246 - 252.
- [32] YUAN, X.; SHEN, N.; SHENG, J.; WEI, X.: Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of Membrane Science*. 1999. 155: 101 - 106.
- [33] GE, Y.; BURMAA, B.; ZHANG, S.; WANG, S.; ZHOU, H.; LI, W.: Co-immobilization of cellulase and glucose isomerase by molecular deposition technique. *Biotechnology Techniques*. 1997. 11: 359 - 361.
- [34] DAOUD, F.; KADDOUR, S.; SADOON, T.: Adsorption of cellulase *Aspergillus niger* on a commercial activated carbon: kinetics and equilibrium studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010. 75: 93 - 99.
- [35] DE BARI, I. VERARDI, A.; CALABRÓ, V.; LIUZZI, F.; RICCA, E.; BRACCIO, G.: Immobilization of cellulase enzymes on epoxy Sepabeads® for the hydrolysis of lignocellulosic materials. *18th European Biomass Conference and Exhibition*. 2010. 1440 - 1442.
- [36] TU, M.; ZHANG, X.; KURABI, A.; GILKES, N.; MABEE, W.; SADDLER, J.: Immobilization of β -glucosidase on Eupergit C for Lignocellulose Hydrolysis. *Biotechnology Letters*. 2006. 28: 151 - 156.
- [37] SINEGANIA, A.; EMTIAZIB, G.; SHARIATMADARIC, H.: Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2005. 290: 39 - 44.
- [38] LI, C.; YOSHIMOTO, M.; FUKUNAGA, K.; NAKAO, K.: Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresource Technology*. 2007. 98: 1366 - 1372.
- [39] AFSAHI, B.; KAZEMI, A.; KHEIROLOMOOM A.; NEJATI S.: Immobilization of cellulase on non-porous ultrafine silica particles. *Scientia Iranica*. 2007. 14: 379 - 383.
- [40] TAKIMOTOA, A.; SHIOMIA, T.; INOA, K.; TSUNODAB, T.; KAWAIB, A.; MIZUKAMIB, F.; SAKAGUCHI, K.: Encapsulation of cellulase with mesoporous silica (SBA-15). *Microporous and Mesoporous Materials*. 2008. 116: 601 - 606.

- [41] HARTONO, S.B.; QIAO, S.; LIU, J.; JACK, K.; LADEWIG, B.; HAO, Z.; LU, G.: Functionalized mesoporous silica with very large pores for cellulase immobilization. *Journal of Physical Chemistry C*. 2010. 114: 8353 - 8362.
- [42] WANG, S.; SU, P.; DING, F.; YANG, Y.: Immobilization of cellulase on polyamidoamine dendrimer-grafted silica. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013. 89: 35 - 40.
- [43] ZHOU, J.: Immobilization of cellulase on a reversibly soluble–insoluble support: properties and application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 58: 6741 - 6746.
- [44] YU, Y.; YUAN, J.; WANG, Q.; FAN, X.; WANG, P.: Covalent immobilization of cellulases onto a water-soluble-insoluble reversible polymer. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012. 166: 1433 - 41.
- [45] DOURADO, F.; BASTOS, M.; MOTA, M.; GAMA, F.M.: Studies on the properties of Celluclast/Eudragit L-100 conjugate. *Journal of Biotechnology*. 2002. 99: 121- 131.
- [46] ZHOU, Y.; SU, S.; SONG, M.; NIE, H.; ZHU, L.: Improving the stability of cellulase by immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles modified alpha-ketoglutaric acid. *Bioinformatics and Biomedical Engineering*. 2009. 3: 1 - 4.
- [47] SONG, Q., MAO, Y., WILKINS, M., SEGATO, F., PRADE, R.: Cellulase immobilization on superparamagnetic nanoparticles for reuse in cellulosic biomass conversion. *AIMS Bioengineering*. 2016. 3: 264 - 276.
- [48] PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W.: Mathematical modelling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2006. 28, 36 - 43.
- [49] CHU, D.; ZHANG, J.; BAO, J.: Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*. 2012. 5: 1020 - 1026.
- [50] RUYTERS, S.; MUKHERJEE, V.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M.; WILLIEMS, K. A.; LIEVENS, B.: Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015. 42: 39 - 48.
- [51] JUTAKANOKKE, R.; TANASUPAWAT, S.; AKARACHARANYA, A. J.: Characterization and ethanol fermentation of *Pichia* and *Torulaspora* strains. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2014. 4, 52 - 56.
- [52] BEZBRADICA, D., OBRADOVIC, B., LESKOSEK-CUKALOVIC, I., BUGARSKI, B., NEDOVIC, V.: Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation. *Process Biochemistry*. 2007. 42, 1338 - 1351.
- [53] KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A.: Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. 2004. 21: 377 - 397.

- [54] MELZOCH, K., RYCHTERA, M., HÁBOVÁ, V.: Effect of immobilization upon the properties and behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Biotechnology*. 1994. 32, 59 - 65.
- [55] ALFANI, F.; GALLIFUOCO, A.; SAPOROSI, A.; SPERA, A.; CANTARELLA, M.: Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2014. 25: 184 - 92.
- [56] CONCALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; DA COSTA NOGUEIRA, C.; DOS SANTOS, E. S.; TEIXEIRA, J. A.; DE MACEDO, G. R.: Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. *Fuel*. 2014. 131: 66 - 76.
- [57] LOPEZ-LINARES, J. C.; ROMERO, I.; CARA, C.; RUIZ, E.; MOYA, M.; CASTRO, E.: Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel*. 2014. 122: 112 - 8.
- [58] SURYAWATI, L.; WILKINS, M. R.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L.; MANESS, N. O.; BANAT, I. M.: Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008. 101: 894 - 902.
- [59] PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRANSKÁ, B.; RYCHTERA, M.; MELZOCH, K.: Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2015. 33: 1091 - 1107.
- [60] NIU, X., WANG, Z., LI, Y., ZHAO, Z., LIU, J., JIANG, L., XU, H., LI, Z.: "Fish-in-Net", a Novel Method for Cell Immobilization of *Zymomonas mobilis*. *PLoS ONE*. 2013. 8, e79569. DOI: 10.1371/journal.pone.0079569.
- [61] BEHERA, S, MOHANTY, R. C., RAY, R. C.: Ethanol production from mahula (*Madhucalatifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffacylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*. 2011. 88: 212 - 215.
- [62] MATHEW, A. K., CHANEY, K., CROOK, M., HUMPHRIES, A. C.: Bioethanol production from oilseed rape straw hydrolysate by free and immobilised cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *WIT Transactions on State-of-the-art in Science and Engineering*, 2014. 83: 15-24.
- [63] KARAGÖZ, P., ÖZKAN, M.: Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. *Bioresource Technology*. 2014. 158: 286 - 293.
- [64] NIKOLIC, S., MOJOVIC, L., PEJIN, D., RAKIN, M.: Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Biomass and Bioenergy*. 2010.34: 1449-1456.
- [65] REXOVÁ-BENKOVÁ I., OMELKOVÁ J., KUBÁNEK V.: Endo-D-galacturonase immobilized by adsorption on porous polyethyleneterephthalate. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 1982. 47: 2716 - 2723.

- [66] ROMO-SÁNCHEZ, S.; CAMACHO, C.; RAMIREZ, H. L.; ARÉVALO-VILLENA, M.: Immobilization of commercial cellulase and xylanase by different methods using two polymeric supports. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2014. 5: 517-526.
- [67] REXOVÁ-BENKOVÁ, Ľ.; STRATILOVÁ, E.; KUBÁNEK, V.: Pektinázový komplex imobilizovaný na polyethyléntereftalát. *Kvasný Průmysl*. 1984. 8: 177-181.

7 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

ATCC	American Type Culture Collection
CBH	celobiohydrolasa
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CCY	Zbierka kultúr kvasiniek
CFU	počet jednotek tvořících kolonie
CMC	karboxymethylcelulosa
EG	endoglukanasa
etOH	ethanol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LMG	Laboratory of Microbiology Gent Bacteria Collection
P	pokles viskozity
PET	polyethylentereftalát
PVA	polyvinyalkohol
RI	rekrakční index
RS	redukující sacharidy
SAV	Slovenská akadémia vied
SSF	simultánní sacharifikace a fermentace
STU	Slovenská technická univerzita

8 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

- články v časopisech s IF

ZICHOVÁ, M.; STRATILOVÁ, E.; OMELKOVÁ, J.; VADKERTIOVÁ, R.; BABÁK, L.; ROSENBERG, M.: Production of ethanol from waste paper using immobilized yeasts. *Chemical papers*. 2017. 71: 553–561.

ZICHOVÁ, M.; STRATILOVÁ, E.; ROSENBERG, M.; OMELKOVÁ, J.: Imobilizace celulolytických enzymů na nosiče s polyethyltereftalátu a polyakrylamidu. *Chemické listy*. 2015. 109: 946-949. ISSN: 1213-7103.

- články v časopise bez IF

BABÁK, L.; ŠUPINOVÁ, P.; ZICHOVÁ, M.; BURDYCHOVÁ, R.; VÍTOVÁ, E.: Biosorption of Cu, Zn and Pb by thermophilic bacteria -- effect of biomass concentration on biosorption capacity. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 2012. 60: 9-18. ISSN: 1211- 8516.

- články v konferenčním sborníku

ZICHOVÁ, M.; STRATILOVÁ, E.; BABÁK, L.; ROSENBERG, M.: Screening of yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of waste paper. *Studentská konference Chemie je život*. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická: 2017. s. 168 - 172. ISBN: 978-80-214-5489-7.

ZICHOVÁ, M.; OMELKOVÁ, J.; STRATILOVÁ, E.: Cellulase immobilization on carrier from waste polyethylene terephthalate bottles. *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, v. v. i.: 2014. s. 469-472. ISBN: 978-80-904959-2- 0.

- postery na konferencích

ZICHOVÁ, M.; BABÁK, L.; ROSENBERG, M.; STRATILOVÁ, E.; OMELKOVÁ, J.: *Ethanol production from waste paper using immobilized Saccharomyces cerevisiae cells*. 41th Annual Conference on Yeasts. 2014. s. 57-57. ISBN: 1336- 4839.

ZICHOVÁ, M.; STRATILOVÁ, E.; OMELKOVÁ, J.; ROSENBERG, M.: *Utilization of waste material for immobilization of cellulose-degrading enzymes*. EMEC15 - The 15th European Meeting on Environmental Chemistry. Brno: 2014. ISBN: 978-80-214-5073- 8.

ZICHOVÁ, M.; ROSENBERG, M.; BABÁK, L.; LUKAČKOVÁ, A.: *Produkce ethanolu bakterií Zymomonas mobilis z odpadního papíru*. 26. kongres Československé společnosti mikrobiologické. Brno: Československá společnost mikrobiologická, 2013. s. 259-259. ISBN: 978-80-260-4507- 6.

ZICHOVÁ, M.; VRÁNOVÁ, D.; OMELKOVÁ, J.; REICHSTÄDTER, M.: *Polygalacturonase immobilized by adsorption on carrier from PET bottles*. Book of abstracts The 4th International Scientific Conference Applied Natural Sciences 2013 Nový Smokovec, High Tatras, Slovak Republic. Trnava: University of Ss. Cyril and Methodius in Trnava, 2013. 133-133. ISBN: 978-80-8105-501- 0.

OMELKOVÁ, J.; ZICHOVÁ, M.; VALICOVÁ, M.; ŠIMKOVIC, I.: *Production of cellulase and polygalacturonase by Aureobasidium pullulans on agricultural wastes*. 39th Annual Conference on Yeasts, Book of abstracts. Bratislava: 2012. s. 62-62. ISSN: 1336- 4839.

ZICHOVÁ, M.; OMELKOVÁ, J.; STUHLÍKOVÁ, O.: *Cellulase immobilized by adsorption on porous polyethylene terephthalate*. Sborník přednášek a posterů. Brno: MU Brno, 2012. s. 184-184. ISBN: 978-80-86313-34- 4.

ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L.; ZICHOVÁ, M.: *MATHEMATICAL MODELING OF THE GROWTH CURVE OF THERMOPHILIC MICROORGANISMS*. Book of Abstracts, 14. Osterreichische Chemietage. Linz: GOCH, 2011. ISBN: 978-3-900554-69- 9.

BABÁK, L.; ŠUPINOVÁ, P.; ZICHOVÁ, M.: *BIODEGRADATION OF WHEY BY LACTOBACILLUS CASEI ASSOCIATED WITH PRODUCTION SELECTED METABOLITES*. Book of Abstracts, 14. Osterreichische Chemietage. Linz: GOCH, 2011. ISBN: 978-3-900554-69- 9.

ZICHOVÁ, M.; BABÁK, L.; ŠUPINOVÁ, P.; LEPAŘ, P.: *The enzymatic hydrolysis of waste paper*. Linz: GÖCH, 2011. ISBN: 978-3-900554-69- 9.

ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L.; ZICHOVÁ, M.; BURDYCHOVÁ, R.: *Effect of concentration of biomass on biosorption capacity*. Chemické listy. Brno: ČSCH, 2011. s. S1028. ISSN: 0009- 2770.

Patenty, užité vzory

OMELKOVÁ, J.; ZICHOVÁ, M.; Vysoké učení technické v Brně: *Nosič pro imobilizaci enzymu, způsob jeho přípravy, způsob imobilizace enzymu a biokatalyzátor*. 303640, patent. 2012.

OMELKOVÁ, J.; ZICHOVÁ, M.; Vysoké učení technické v Brně: *Nosič pro imobilizaci enzymu a biokatalyzátor*. 23397, užité vzor. 2012.