

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM RŮSTU A OPTIMALIZACE PRODUKCE VYBRANÝCH
METABOLITŮ ZYMOMONAS MOBILIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

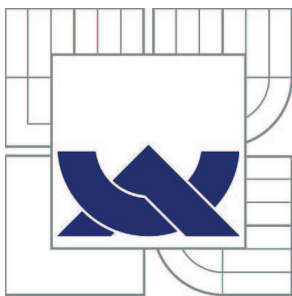
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

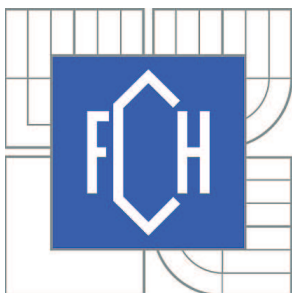
Bc. ADÉLA LUKAČKOVÁ

BRNO 2012



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

STUDIUM RŮSTU A OPTIMALIZACE PRODUKCE VYBRANÝCH METABOLITŮ ZYMOMONAS MOBILIS

STUDY OF GROWTH AND OPTIMIZATION OF SELECTED METABOLITES PRODUCTION BY
ZYMOMONAS MOBILIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

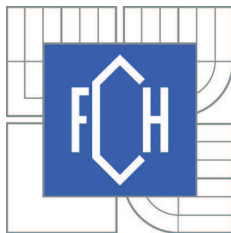
Bc. ADÉLA LUKAČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0596/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Adéla Lukačková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

Název diplomové práce:

Studium růstu a optimalizace produkce vybraných metabolitů *Zymomonas mobilis*

Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) zpracování metodické části
- 3) provedení několika kultivací bakterií
- 4) analýza a optimalizace produkce daných metabolitů

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

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

Bc. Adéla Lukačková
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o možnosti využití enzymatické hydrolýzy a bakterií *Zymomonas mobilis* při výrobě bioetanolu z odpadního papíru.

V teoretické části jsou shrnuty základní informace o používaných metodách hydrolýzy, o papíru, jako surovině pro enzymatickou hydrolýzu, možnostech fermentační výroby bioetanolu se zaměřením na porovnání procesů enzymatické hydrolýzy a fermentace a simultánní sacharifikace a fermentace. Dále jsou zde rozebrány vhodné typy mikroorganismů pro etanolové kvašení a simultánní hydrolýzu a sacharifikaci, pojednání o jednotlivých výhodách a nevýhodách. Závěr teoretické části je věnován návrhu technologického postupu pro výrobu bioetanolu zahrnující všechny potřebné kroky od vstupu suroviny až po separaci vzniklého etanolu.

V experimentální části byla provedena optimalizace parametrů hydrolýzy, fermentace a simultánní sacharifikace a fermentace za použití enzymů společnosti Novozymes[®] a bakterií *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457. Bylo sledováno množství přeměněné celulózy z papíru na glukózu a následně vzniklé množství etanolu metodou HPLC/RI. V rámci maximalizace efektivity procesu byl optimalizován druh pufru, množství buněk, enzymů a substrátu. Experimenty byly prováděny na papíru s vysokým obsahem celulózy a pro srovnání také na standardním médiu obsahujícím glukózu. Vyšších výtěžků enzymatické hydrolýzy bylo dosaženo s použitím enzymů Novozymes[®] Cellulosic ethanol enzyme Kit. Jako lepší producent se prokázal kmen *Zymomonas mobilis* LMG457.

ABSTRACT

In the diploma thesis are discussed the process of enzymatic hydrolysis of waste paper as a source for the production of bioethanol by bacteria *Zymomonas mobilis*.

In the theoretical part summarize basic information about particular methods of hydrolysis, about paper used as a raw material for enzymatic hydrolysis, about possibilities of the fermentative production of bioethanol focusing on the method of simultaneous saccharification and fermentation comparison with enzymatic hydrolysis and fermentation. Suitable microorganisms for ethanolic fermentation and simultaneous saccharification and fermentation and their advantages and disadvantages, are further discussed in this part as well. The theoretical part ends with the suggestion of the technological process for production of bioethanol. It covers all necessary steps from the input of raw material to the separation of produced ethanol.

In the experimental part various parameters of hydrolysis, fermentation and simultaneous saccharification and fermentation were optimized using enzymes from Novozymes[®] company and the *Zymomonas mobilis* CCM2770 and *Zymomonas mobilis* LMG457 bacterium. The conversion rate of paper cellulose to glucose and production of ethanol were observed by HPLC/RI method. Type of buffer, quantity of cells, enzyme and substrate were optimized in order to maximize the efficiency of the process. All experiments were performed on paper containing high amount of cellulose and for comparison on standard medium which contains glucose. The highest yields was achieved with the use of Novozymes[®] Cellulosic ethanol enzyme Kit. The strain *Zymomonas mobilis* LMG457 has demonstrated as a better producer.

KLÍČOVÁ SLOVA

Enzymatická hydrolýza, fermentace, SSF, odpadová papírovina, biopalivo, celuláza, Novozymes, *Zymomonas mobilis*.

KEYWORDS

Enzymatic hydrolysis, fermentation, SSF, waste paper, biofuel, cellulase, Novozymes, *Zymomonas mobilis*.

LUKAČKOVÁ, A. *Studium růstu a optimalizace produkce vybraných metabolitů Zymomonas mobilis*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. 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

Mé poděkování patří vedoucímu diplomové práce Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při zpracování této práce, dále pak Ing. Miroslavě Zichové za ochotu a všestrannou pomoc.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Definice a vymezení pojmů	9
2.1.1 Biomasa	9
2.1.2 Lignocelulóza	9
2.1.3 Papírovina	9
2.1.4 Biopalivo	9
2.1.5 Kapalná biopaliva	9
2.1.6 Enzymy	9
2.1.7 Hydrolýza	9
2.1.8 Fermentace	9
2.2 Papír, surovina pro enzymatickou hydrolýzu	9
2.2.1 Výroba papíru	10
2.2.2 Rozdělení papíru	11
2.2.3 Chemické složení papíru	11
2.2.4 Degradace papíru	13
2.3 Předúprava	14
2.4 Metody hydrolýzy lignocelulózového materiálu pro fermentační technologie	14
2.4.1 Kyselá hydrolýza	14
2.4.2 Enzymatická hydrolýza	15
2.4.3 Srovnání kyselé a enzymatické hydrolýzy	16
2.5 Fermentace lignocelulózových hydrolyzátů	17
2.6 Simultánní sacharifikace a fermentace	18
2.7 Vhodné typy mikroorganismů pro metodu SSF a etanolové kvašení	19
2.7.1 Kvasinky	19
2.7.2 Bakterie	20
2.8 Návrh technologického postupu	20
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje	22
3.1.1 Použité chemikálie	22
3.1.2 Použitý substrát	22
3.1.3 Použité enzymy	22

3.1.4	Použité kultury	25
3.1.5	Použité přístroje	25
3.2	Příprava roztoků	26
3.2.1	Příprava tlumivých roztoků	26
3.2.2	Příprava pevného, inokulačního a kultivačního média pro <i>Zymomonas mobilis</i>	26
3.2.3	Mobilní fáze pro HPLC (1,3 mmol/l H ₂ SO ₄)	26
3.3	Předúprava papíru	26
3.4	Enzymatická hydrolýza	26
3.5	Úprava hydrolyzátu	27
3.6	Zaočkování	27
3.7	Fermentace	27
3.8	Simultánní sacharifikace a fermentace	27
3.9	Stanovení odebraných vzorků metodou HPLC	28
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	29
4.1	Analýza obsahu látek pomocí HPLC	29
4.2	Základní kvantitativní analýza materiálu	29
4.2.1	Sestavení růstové křivky <i>Zymomonas mobilis</i> na standardním médiu	29
4.3	Optimalizace podmínek procesu	30
4.3.1	Optimalizace druhu pufru	30
4.3.2	Optimalizace množství buněk <i>Zymomonas mobilis</i> v produkčním médiu	31
4.3.3	Optimalizace množství enzymů	35
4.3.4	Optimalizace množství substrátu	48
4.4	Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace	49
4.4.1	Hydrolýza	50
4.4.2	Fermentace	51
4.4.3	Simultánní hydrolýza a fermentace	54
4.4.4	Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Biomass Kit	58
4.4.5	Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit	59
5	ZÁVĚR	61
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67

1 ÚVOD

Etanol je produktem mikrobiální fermentace, který provází lidstvo už tisíce let. Krom tradičního využití v lihovarnictví se etanol stává nejrychleji rostoucím energetickým zdrojem současnosti [13, 52]. Jedním z důvodů je i fakt, že zdroje konvenčních paliv jsou vyčerpatelné a předpokládá se, že v průběhu následujících let bude spotřeba kapalných paliv dále stoupat. Tento nárůst nebude ropný průmysl schopen pokrýt, proto je nutné zahájit produkci náhradních paliv. [5, 32, 33]

Jedním z těchto paliv je i bioetanol, neboli etanol produkovaný z biomasy, která je na rozdíl od konvenčních paliv, zdroj obnovitelný, tedy teoreticky nevyčerpatelný. Krom toho, použití paliv na bázi obnovitelných zdrojů nemá negativní vliv na bilanci oxidu uhličitého v atmosféře. Stoupající množství oxidu uhličitého, jako nejdůležitějšího skleníkového plynu, vede ke globálnímu oteplování, které se stává předmětem zájmu široké veřejnosti. Přechod z konvenčních na obnovitelné zdroje energie je nevyhnutelný pro trvale udržitelný rozvoj na Zemi. [5, 52]

Stejně jako v ČR, tak i ve světě se v současnosti pro výrobu bioetanolu využívají převážně škrobnaté a cukernaté zemědělské suroviny, což sice pro zemědělskou výrobu představuje určitou záruku odbytu, ale v posledních letech evokuje též etické otázky týkající se produkce biopaliv na úkor jejich potravinářského využití. [22]

Materiály na bázi celulózy, mezi něž patří zemědělské odpady (obilná a kukuřičná sláma, kukuřičné oklasky), dřevo a dřevní štěpky, piliny, odpadní papír, energetické plodiny a komunální odpad, představují perspektivní surovinu pro výrobu biopaliv. Vzhledem k tomu, že se z velké části jedná buď o odpadní materiály nebo části rostlin, které nemají potravinářské využití, je jejich cena v porovnání se zemědělskými surovinami velmi nízká. Mohly by tedy teoreticky představovat ideální surovinu pro navazující biotechnologický proces. [22, 55]

V některých případech lze proces fermentace spojit s předchozím krokem (enzymovou hydrolýzou). Tento proces nazývaný současná sacharifikace a fermentace (SSF) by s sebou měl přinést zkrácení doby trvání výroby, sníženou pravděpodobnost inhibice celulytických enzymů produktem reakce (glukózou), problém by však mohl být negativní vliv vznikajícího etanolu na aktivitu enzymů. [22, 34]

Základním aspektem pro výběr mikrobiálního producenta etanolu je schopnost dosahovat vysokých výtěžností na asimilovaný substrát, tolerance vůči produktu a možným přítomným inhibitorům a genetická stabilita [22]. Obecně se za producenty etanolu považují kvasinky, hlavně *Saccharomyces cerevisiae*, ale jeho producentem mohou být i bakterie. Jako slibnou se ukázala bakterie *Zymomonas mobilis*, která má v porovnání s kvasinkami rychlejší metabolismus a nižší nutriční nároky. Právě vhodností využití kmene *Zymomonas mobilis* k výrobě bioetanolu se zabývá tato práce.

Byly zkoumány optimální podmínky procesu enzymatické hydrolýzy a fermentace a simultánní sacharifikace a fermentace, za použití produkčních kmenů *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457. V rámci práce byl použit papír s vysokým obsahem celulózy, jako zástupce lignocelulóзовých materiálů. Cílem této práce bylo zjistit, za jakých podmínek je možné dosáhnout co největší produkce etanolu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Definice a vymezení pojmů

2.1.1 Biomasa

Biomasa je definována jako organická hmota rostlinného nebo živočišného původu. Může být využita pro energetické účely, jde o obnovitelný zdroj energie. [21]

2.1.2 Lignocelulóza

Je hlavní složkou biomasy. Skládá se z přírodních polymerů jako je celulóza, lignin a hemicelulózy, jejichž zastoupení je proměnlivé. Obsahuje také malé množství minerálních látek, tuků a rozpustných sacharidů. [5]

2.1.3 Papírovina

Řídká suspenze, která je surovinou pro výrobu papíru. Obsahuje rostlinná vlákna (dřevovina, celulóza, případně hadrovina) upravená na vhodnou velikost. Pro úpravu vlastností jsou přidávána plniva, klíždla, barviva a jiné pomocné chemické přípravky. Obsah vody je větší než 90 %. [24]

2.1.4 Biopalivo

Jde o palivo vzniklé výrobou či přípravou z biomasy nebo biologického odpadu. [46]

2.1.5 Kapalná biopaliva

Jsou kapalná paliva vyrobená z biomasy (dle definice z nařízení vlády č. 352/2002 Sb.). [47]

2.1.6 Enzymy

Biokatalyzátory se strukturou biopolymeru, většinou bílkoviny. Katalyzují téměř všechny metabolické reakce. Jsou vysoce specifické, katalyzují jen určitý typ reakce a přeměnu určité skupiny substrátu (substrátová specifita). [1]

2.1.7 Hydrolýza

Energeticky výhodné štěpení molekul reakcí s vodou za působení vhodného katalyzátoru. [2]

2.1.8 Fermentace

Proces, při němž se žádané produkty získávají chemickou přeměnou organických látek zapříčiněnou metabolickou činností mikroorganismů. [3]

2.2 Papír, surovina pro enzymatickou hydrolýzu

Pro produkci etanolu se používají různé substráty v závislosti od toho, na jaké účely bude vyrobený etanol použitý. Kvalita vstupní suroviny pro potravinářský průmysl musí samozřejmě splňovat jiné kritéria než substráty pro palivový etanol. Náklady na substrát pro produkci palivového etanolu tvoří asi třetinu celkových nákladů, proto je potřebné sladit vstupní substrát s produkčním mikroorganismem tak, aby byly výtěžky etanolu maximální, což předpokládá maximální využití složek substrátu při minimální produkci vedlejších produktů. [5, 10]

Levným a potencionálně zajímavým zdrojem lignocelulózy je použitý kancelářský papír, který obsahuje 60–80 % sacharidové složky v sušině. [5, 9]

2.2.1 Výroba papíru

Papír se vyrábí převážně ze smrkového a jedlového dřeva, případně i dřeva listnáčů. Tvrdé dřeva mají krátké vlákna (asi 1 mm) a vzniká z nich jemný papír. Naopak měkké dřeva mají vlákna dlouhá (asi 6,5 mm) proto z nich vzniká hrubší papír.

Podstatou výroby je rozvlákňování dřeva mechanickým nebo chemickým způsobem. [24]

Mechanický způsob

Dezintegrace dřevné hmoty probíhá obroušováním na rychle rotujících kotoučích, vzniká dřevovina. Dřevovina je suspenze vláken a inkrustujících látek (lignin a hemicelulózy), která se používá na výrobu lepenek, levných papírů nebo skládačkových lepenek, které tvoří venkovní, méně kvalitní vrstvu. Také se přidává do méně kvalitních tzv. „dřevitých“ papírů jako tzv. „papírenská pozlátka“. [24]

Chemický způsob

Podstatou je odbourání inkrustujících látek dřeva a získání co nejčistší buničiny (celulóza).

Sulfitový způsob

- $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2 + \text{H}_2\text{SO}_3$ za vyšší teploty a tlaku
- Vyšší výnos buničiny
- „nepromastitelné papíry“

Sulfátový způsob

- $\text{Na}_2\text{S} + \text{NaOH}$ při 150 °C a 0,7 MPa
- Nejvýznamnější způsob, šetrný k degradaci celulózy (delší vlákna – pevnost)
- Kvalitní papíry

Nátronový způsob

- NaOH
- Méně kvalitní papír
- Dnes již v praxi nepoužívaný [24]

Úpravy buničiny

Bělení

- Aktivním chlórem (např. $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, ClO_2)
- Atomárním kyslíkem (např. H_2O_2)

Zplstnatění papíroviny

- Nanášení buničinové suspenze (0,5%) na papírenská síta, rychlý pohyb síta (vibrace)
→ orientace vláken ve směru pohybu → anizotropní vlastnosti (rozdíly mezi lícovou a rubovou stranou papíru)
- Po sítu poměr voda:buničina asi 3:2, zbytek musí být dále odsušen

- Hlazení papíru se provádí v tzv. kalandrech, papír prochází mezi válci → hlazení jednostranné i oboustranné, pokud jsou válce profilované, vzniká vlnitý papír

Zlepšení nativních vlastností papíru

- Plnidla – snížení transparentnosti
- Klíždla – zabránění rozpíjení barev a potisku vůbec
- Barviva
- Pryskyřice – pro zvýšení pevnosti za mokra (močovino-formaldehydové, popř. melaminoformaldehydové)

Impregnace papíru

- Zvýšení odolnosti proti vodě, zlepšení bariérových vlastností pro plyny, odolnost vůči chemickým látkám, tepelné spájení, zlepšení vzhledu [24]

2.2.2 Rozdělení papíru

Charakteristická vlastnost, podle které se materiály dělí je plošná hmotnost [g.m^{-2}] neboli gramáž.

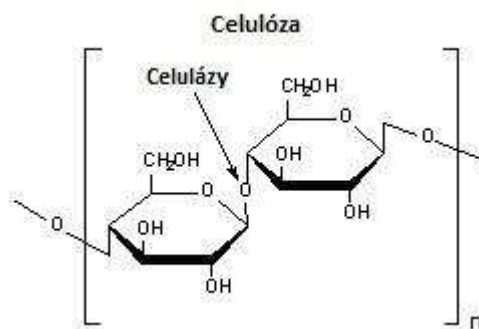
- Papír (do 150 g.m^{-2})
- Karton ($150\text{-}250 \text{ g.m}^{-2}$)
- Lepenka (nad 250 g.m^{-2})
- Běžný papír ($80\text{-}90 \text{ g.m}^{-2}$)
- Průklepový papír ($20\text{-}30 \text{ g.m}^{-2}$) [6]

2.2.3 Chemické složení papíru

Lignocelulóza je kompaktní materiál, který svojí komplexností a odolností výrazně zvyšuje náklady na hydrolýzu v porovnání se škrobem. To je důvod, proč je v současnosti bioetanol z biomasy stále dražší než etanol připravený ze škrobu. [5, 7]

Celulóza

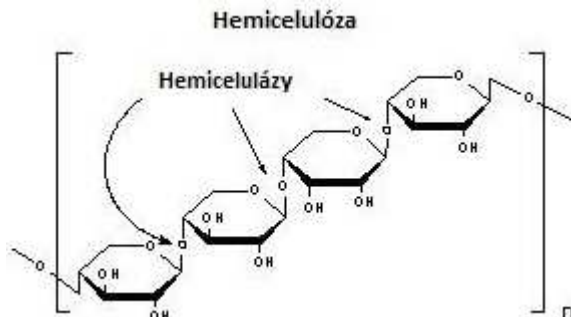
Je strukturní polysacharid tvořený exkluzivně řetězcí molekul glukózy spojenými β -(1→4) glykosidyckými vazbami. Celulóza má stejné chemické složení jako škrob, vzhledem k rozdělení vazeb mezi molekulami glukózy je její struktura rozdílná. Glukózové řetězce jsou pevně spjaté, vytvářejí vysoko krystalickou a kompaktní látku. Celulóza je ve vodě nerozpustná a je výrazně odolná vůči depolymerizaci. Stupeň větvení a zastoupení jednotlivých sacharidů je závislé na rostlině, ze které daný materiál pochází. [5]



Obrázek 1: Struktura celulózy [25]

Hemicelulóza

Váže se na celulózové mikrofibrily vodíkovými vazbami, čímž se utváří síť. Molekuly hemicelulózy mají xylanovou resp. glukonovou kostru s množstvím postranných řetězců substituovaných různými minoritními sacharidy, např. manózou, fukózou, arabinózou, galaktózou, kyselinou glukonovou apod. [5]

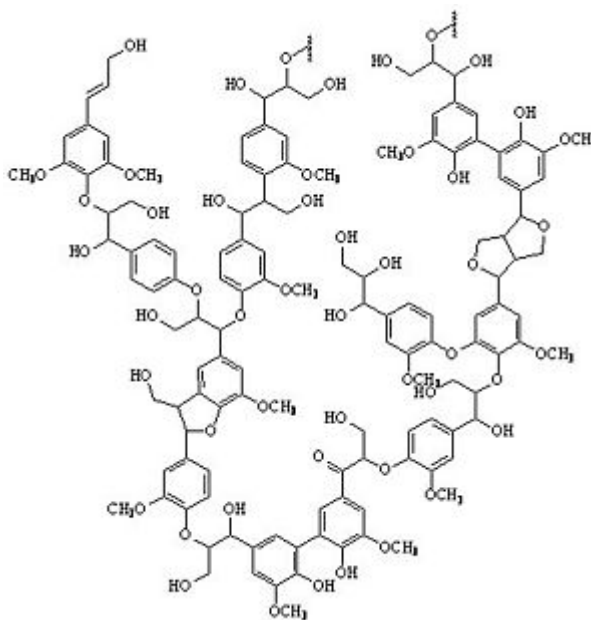


Obrázek 2: Struktura hemicelulózy [25]

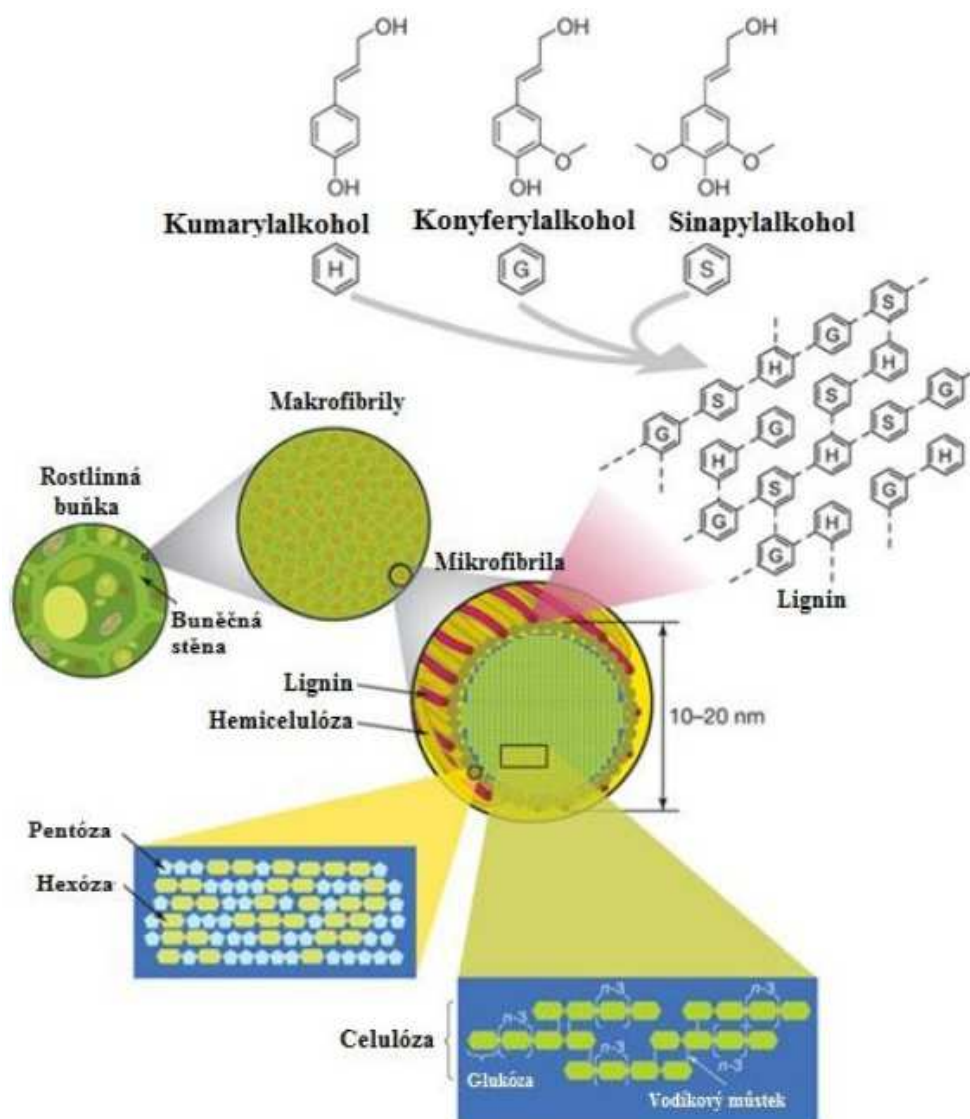
Lignin

Lignin, amorfní heteropolymer složený převážně z fenylypropanových jednotek (konyferylalkoholu, p-kumarylalkoholu a sinapylalkoholu). Zvyšuje pevnost buňkové stěny a zvyšuje odolnost rostlinné buňky vůči chorobám a škůdcům. Lignin se kovalentně váže na postranné řetězce hemicelulózy esterovými vazbami přes kyselinu ferulovou. [5, 8, 27, 28, 29]

Aby bylo možné celulózový materiál efektivně využít pro enzymatickou hydrolýzu, je nutné tuto komplexní matici narušit. [27, 28, 29]



Obrázek 3: Struktura ligninu [26]



Obrázek 4: Struktura lignocelulózy [36]

2.2.4 Degradace papíru

Papír podléhá stejně jako všechny organické materiály za určitých podmínek řadě degradačních procesů. Faktory vedoucí k destrukci papíru, resp. celulóзовé makromolekuly, lze rozdělit na vnitřní a vnější. Mezi významné vnitřní faktory, které si papír nese již z výroby, patří například druh, kvalita a chemické složení papíroviny, použitá plniva, klíždla a barviva, a třeba i nečistoty vnesené do papíru z provozních vod a technologií. Mezi vnější degradační faktory patří především teplota, relativní vlhkost a čistota prostředí, účinek oxidů síry a dusíku, ozónu, světelná energie, biologičtí škůdci (plísně, bakterie, hmyz).

Mechanismy degradace papíru se dělí na chemické a fyzikální. Základními chemickými mechanismy degradace papíru jsou hydrolýza, oxidace, popřípadě sítování a dále mikrobiologická degradace a mechano-chemická degradace. Mezi fyzikální mechanismy degradace papíru patří: tzv. zvýšení obsahu krystalické fáze a relaxace volného objemu celulózy v amorfních oblastech. [6]

2.3 Předúprava

Prvním stádiem celého procesu je předúprava vstupní suroviny, jejímž cílem je rozrušení ligninu a uvolnění krystalické struktury celulózy pro rychlejší hydrolýzu a s tím související efektivnější využití celulolytických enzymů. Předúprava je z pohledu ekonomiky jeden z nejdražších článků celého výrobního procesu [8]. V této fázi se používají různé chemické látky, velmi kyselé až velmi alkalické prostředí s různým konečným efektem na surovinu. Účinek termochemické předúpravy se projevuje nejen na celkové cukerné složce lignocelulózy, ale vznikají i látky nežádoucí s potenciálním inhibičním vlivem na produkční mikroorganismy, např. vznik furfuralů v kyselém prostředí a ferulátů a acetátů v prostředí zásaditém [7]. [5, 50]

Na druhou stranu je nezbytné tyto úpravy provést, neboť narušení komplexní matrice a delignifikace vedou k významnému zvýšení výtěžku zkvasitelných cukrů v následné enzymové hydrolýze v porovnání s neupravenými materiály.[22]

2.4 Metody hydrolýzy lignocelulózového materiálu pro fermentační technologie

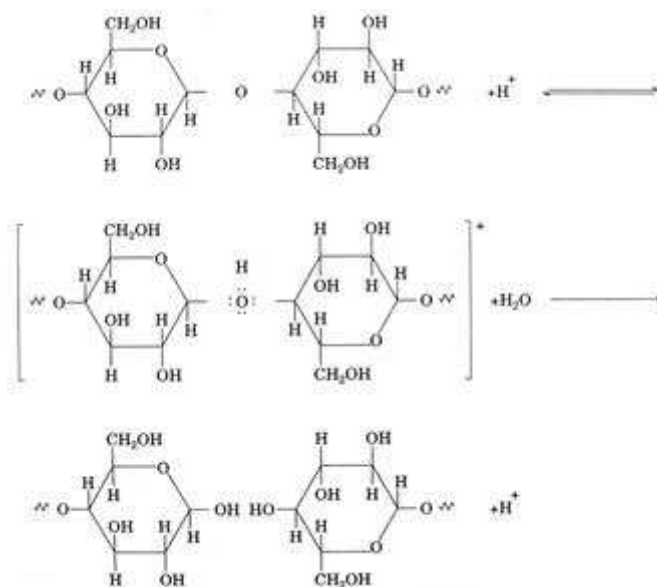
Hydrolýza je chemický proces, při kterém v přebytku vody a působením vhodného katalyzátoru dochází k rozkladu substrátu na jeden nebo více nových produktů. Tento proces se uplatňuje v mnohých průmyslných odvětvích.

Hydrolýza lignocelulózového materiálu je důležitým krokem v úpravě vstupní suroviny. Probíhá za působení katalyzátoru, kterým mohou být iony vodíku (kyselá hydrolýza) nebo celulázové enzymy (enzymatická hydrolýza). [4]

Při hydrolýze se celulóza štěpí na jednotlivé molekuly glukózy, a to buď enzymaticky použitím celulázového aparátu nebo chemickou cestou účinkem kyseliny (sírové nebo jiné), produkty kyselé hydrolýzy se liší v závislosti od druhu použité kyseliny. Současně dochází i k rozkladu hemicelulóz na směs strukturních monosacharidů. [4, 5]

2.4.1 Kyselá hydrolýza

Glykosidická vazba v celulóze a v hemicelulózách je stabilní v neutrálním nebo mírně alkalickém prostředí, naopak v kyselém prostředí podléhá tato vazba hydrolýze a dochází k postupnému zkracování polymerního řetězce (snižování polymeračního stupně) a ztrátě mechanických vlastností papíru. Je-li kyselou hydrolýzou rozrušeno pouze 0,5-1 % glykosidických vazeb, je papír už prakticky nepoužitelný. Hydrolytický rozpad glykosidické vazby celulózy je katalyzován vodíkovým kationem a probíhá v několika fázích, viz. obrázek 5. [6]



Obrázek 5: Kyselé hydrolýza glykosidické vazby [6]

V první fázi vodíkový kationt reaguje s kyslíkovým atomem glykosidické vazby, resp. jeho volným elektronovým párem. Vzniká konjugovaná kyselina. Dochází ke štěpení vazby C₁-O-C₄ za přítomnosti molekuly vody a současně ke krácení polymerního řetězce. Tato fáze je velmi pomalá. V poslední fázi se uvolňuje vodíkový kationt. Kyselé hydrolýza probíhá přednostně v amorfní oblasti. [6]

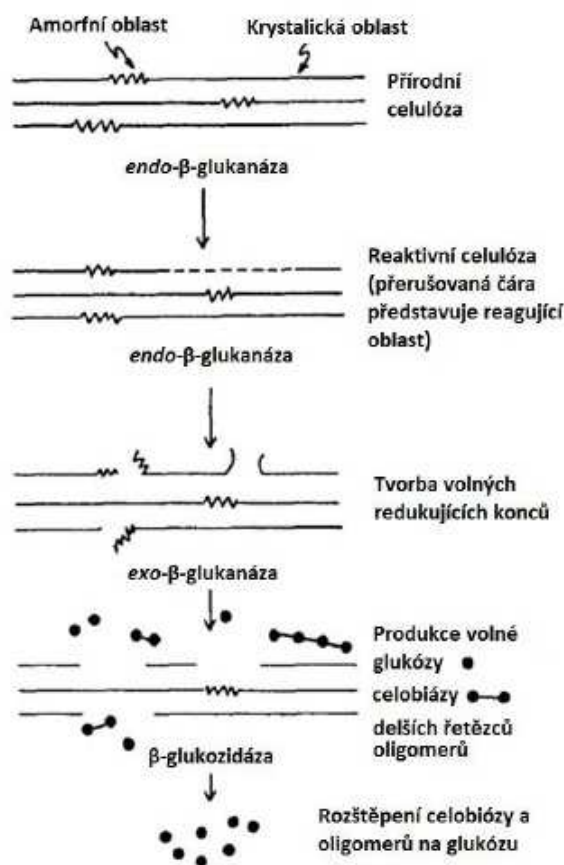
2.4.2 Enzymatická hydrolýza

Při enzymatické hydrolýze vznikají v menším počtu reverzní produkty, což přispívá k tomu, že získáváme podstatně čistší hydrolyzáty. Hydrolýzu ovlivňuje kvalita a kvantita enzymu, teplota, pH, koncentrace substrátu, produktu a inhibiční látky v prostředí. S rostoucí teplotou všeobecně roste rychlost reakce. Při reakcích katalyzovaných enzymy je hraniční teplotou 80 °C, při které nastává jejich denaturace. Proto je v praxi snaha hledat a uplatňovat termostabilní enzymy, případně jejich termostabilitu zvyšovat. [4, 18, 19, 20]

Celulázy, mikrobiální enzymy schopné hydrolýzy celulózy, se skládají z několika synergických složek. Celulázový komplex tvoří tři základní složky: endo-β-(1, 4)-glukanázy, exo-β-glukanázy a β-(1, 4)-glukozidázy. Tyto složky mohou být přítomny ve více formách, často jako isoenzymy. [29, 37, 38]

Každá skupina má určitou funkci:

- endo-β-(1, 4)-glukanázy se skládají z několika komponent, u kterých je předpokládáno náhodné štěpení β-(1, 4)-glykosidických vazeb v celulóze především v amorfní oblasti za vzniku oligosacharidů o různé molekulové hmotnosti
- exo-β-glukanázy se skládají ze dvou podskupin:
 - β-(1, 4)-glukan-glukohydrolázy, které odštěpují glukózové jednotky z neredukujícího konce řetězce celulózy
 - β-(1, 4)-glukan-celobiohydrolázy, které odštěpují celobiózou jednotky z neredukujícího konce řetězce
- β-(1, 4)-glukozidáza hydrolyzuje celobiózu a krátké oligosacharidy na glukózu [29, 39, 40]



Obrázek 6: Schématické znázornění synergického působení jednotlivých enzymů na celulózu [30]

V procesu jsou enzymy používány za mírných podmínek, díky tomu vzniká jen málo inhibitorů, které by brzdily aktivitu enzymů a zároveň enzymatická hydrolýza vyžaduje méně energie než kyselá. [29, 39, 40]

Zásadní nevýhodou enzymatické hydrolýzy jsou poměrně vysoké náklady na enzymy. Jelikož však mnoho společností hledá způsoby, jak snížit náklady pomocí masové výroby, očekává se v blízké budoucnosti pokles ceny enzymů na konkurenceschopnou úroveň. [29, 37, 39, 40]

Faktory ovlivňující enzymatickou hydrolýzu lignocelulóзовých materiálů

Enzymatická hydrolýza se skládá ze tří kroků: adsorpce enzymů celulózy na povrchu celulózy, biologický rozklad celulózy na fermentovatelné cukry a desorpce celulózy. Její účinnost závisí především na koncentraci substrátu, typu a koncentraci enzymů založených na celulóze a dalších podmínkách, při kterých reakce probíhá (teplota, pH). Zvýšením dávky celulózy se může zvýšit rychlost tvorby a obsah glukózy, ale zvýší se i cena. Výhodou je, že celulóza získaná z kalové vody se může opět použít pro další rozklad.

Při adsorpci celulózy na povrch celulózy však dochází ke zpomalování zcukření, a proto je potřeba tomuto nežádoucímu jevu zabránit. Jednou z metod, jak tohoto docílit, je přidat do roztoku tenzidy, které změní vlastnosti povrchu celulózy a minimalizují nevratné vázání celulózy na celulózu. Další je SSF metoda. [35]

2.4.3 Srovnání kyselé a enzymatické hydrolýzy

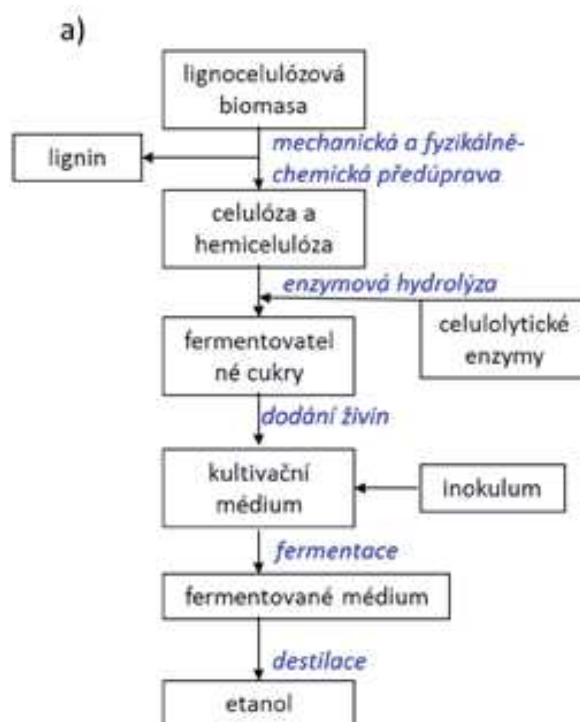
Rozdíly mezi kyselou a enzymatickou hydrolýzou jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Srovnání kyselé a enzymatické hydrolyzy [29, 37]

	Kyselé hydrolyza	Enzymatická hydrolyza
1.	Nespecifický katalyzátor, proto bude rozkládat lignin stejně jako hydrolyzovat celulózu	Specifický katalyzátor, nutnost fyzikálních a chemických předúprav materiálu, aby byla celulóza dostupná degradaci
2.	Rozklad hemicelulóz na inhibiční složky (např. furfural) a oxidační rozklad monosacharidů kyselinami	Produkce roztoku sacharidů připraveného pro následnou anaerobní fermentaci
3.	Náročné provozní podmínky spojené s většími náklady na antikoroziní opatření a ohřev	Mírné provozní podmínkách (50°C, atmosférický tlak, pH 4,5 – 5,0)
4.	U koncentrovaných kyselin - vysoké náklady na recyklaci a znovupoužití kyselin	Vysoké náklady na produkci celuláz, obtížná recyklace
5.	Vysoká rychlost hydrolyzy	Nížeší rychlost hydrolyzy
6.	Vzniklý odpad u kyselé hydrolyzy má charakter nebezpečného odpadu	Vzniklý odpad po enzymatické hydrolyze je bez problému kompostovatelný, nebo spalitelný

2.5 Fermentace lignocelulóзовých hydrolyzátů

Lignocelulózové materiály jsou po ukončení enzymové hydrolyzy použity pro přípravu médií pro navazující biotechnologický proces. Jelikož však často obsahují velmi zředěné roztoky zkvasitelných sacharidů (zejména kvůli vysokému hydromodulu, který je nutno použít při předúpravách) a jsou chudé i na zdroje ostatních živin (dusík, fosfor, stopové prvky, vitamíny), které jsou nezbytné pro metabolismus mikroorganismů, je nutné tyto živiny doplnit např. přidáním kukuřičných výluhů nebo kvasničného extraktu před tím, než je do média zaočkována produkční kultura. [22, 23]



Obrázek 7: Schéma výroby etanolu SHF procesem [41]

2.6 Simultánní sacharifikace a fermentace

K simultánní sacharifikaci a fermentaci dochází spojením kroků, hydrolýzou celulózy v přítomnosti fermentujícího mikroorganismu. Probíhá při teplotě, která je kompromisem mezi teplotou vhodnou pro hydrolýzu (45-50 °C) a teplotou fermentace (30 °C). Pokud probíhá hydrolýza celulózy i hemicelulóz současně s kofermentací glukózy a pentóz ve fermentační směsi v jednom kroku, jde o simultánní sacharifikaci a kofermentaci. [5, 35]

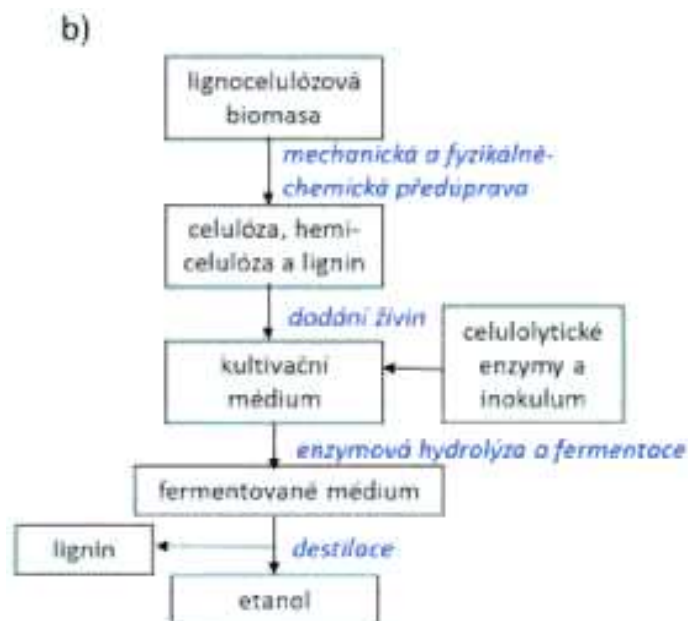
SSF a SSCF snižují provozní náklady, protože oba dva kroky probíhají současně, eliminují potřebu zařízení na hydrolýzu substrátu, protože zcukernění substrátu probíhá přímo ve fermentačním tanku, tedy nejsou potřebné dva fermentační tanky nýbrž jeden. [5, 9, 11]

V případě SSF a SSCF je možné ušetřit čas hydrolýzy i množství hydrolytických enzymů, protože v důsledku simultánní fermentace vznikajících produktů hydrolýzy nedochází k inhibici celulózových preparátů, které jsou vznikající glukózou a celobiózou zpětnovazebně inhibované. Tato výhoda se výrazněji projevuje při použití mikroorganismů schopných přímo fermentovat celobiózu. Krom toho je při tomto procesu výrazně snižené zatížení buněk osmotickým tlakem ze strany substrátu, ke zcukernění dochází postupně v průběhu procesu a vznikající substrát je průběžně fermentovaný. [5, 10, 11]

V současnosti mnoho lihovarů přechází na SSF, protože krom výše uvedeného snižuje riziko kontaminace (glukóza je odstraněna ihned), zvyšuje výtěžek etanolu na jednotku substrátu a celkově je méně energeticky náročný, tudíž environmentálně a ekonomicky výhodný. [5, 11]

Přínosem je i vysoká efektivita na jednotku objemu výrobního prostoru, protože koncentrace buněčné hmoty v reaktoru je v porovnání se vsázkovým systémem podstatně vyšší, hlavně pokud se kontinualizace kombinuje s recyklem buněk nebo s jejich imobilizací. Recyklu buněk se může dosáhnout centrifugací, sedimentací flokulujících kvasinek nebo membránovou filtrací. Odseparované buňky se vracejí do fermentačního procesu. Při imobilizaci se buňky produkčního kmene váží na povrch inertního nosiče, do nitra pórovitého materiálu nebo uzavírají do mikrokapslí případně jiných útvarů oddělených mikropórovitou membránou. Mezi nejčastěji používané imobilizační materiály patří přírodní a syntetické polymerní hydrogely, jako je alginát vápenatý, agar, κ-karagenan, polyuretan, polystyrén a polyvinylalkohol, přičemž imobilizáty mívají sférický nebo čočkovitý tvar s průměrem 0,3–3,0 mm. Ač mají kontinuální systémy množství výhod, jejich rozšíření v praxi je zatím velmi malé. Problémem jsou vysoké investiční náklady na vybudování systému a některé zatím nevyřešené doprovodné problémy. Největší překážkou je však stále cena nosiče, který je zřejmě determinujícím faktorem pro rozšíření těchto systémů. [5, 12, 51, 54]

Mezi nevýhody SSF patří rozdílné teploty hydrolýzy a fermentace, kdy musíme zvolit určitý kompromis. Dále pak možnost zpomalení rychlosti tvorby glukózy negativním vlivem etanolu na enzymy, případně schopnost přežití mikroorganismů produkujících enzymy v etanolu. [35]



Obrázek 8: Schéma výroby etanolu SSF procesem [41]

2.7 Vhodné typy mikroorganismů pro metodu SSF a etanolové kvašení

Jedním z tradičních důvodů, které se uvádějí jako překážka v rozvoji průmyslné výroby bioetanolu, je nedostatek vhodných produkčních mikroorganismů na konverzi biomasy na palivový etanol. Nedostatek mikroorganismů souvisí s ekonomicky efektivním využitím potencionálních substrátů. Bohužel, žádný mikroorganismus volně se vyskytující v přírodě není schopen efektivně fermentovat směs hexóz a pentóz na etanol. Proto se metodami genového inženýrství připravují rekombinanty schopné efektivně konvertovat lignocelulózové hydrolyzáty na etanol. Pro specifické vlastnosti a různé výhody jednotlivých mikroorganismů probíhá intenzivní výzkum nejen kvasinek, ale i bakterií. Doposud však není známo, zda některý producent bude z ekonomického hlediska natolik zajímavý, že zaujme místo preferovaného produkčního mikroorganismu v technologii výroby palivového etanolu z lignocelulózových hydrolyzátnů. Více pravděpodobnou variantou bude nasazení různých mikrobiálních producentů „šitých na míru“ podle charakteru konkrétního provozu. [5, 10, 15, 57]

2.7.1 Kvasinky

Kvasinky jako eukaryotické organismy s diferenciovanými organelami pomaleji rostou a mají tedy nižší produkční rychlost a nižší stupeň konverze substrátu na etanol. Jejich větší a robustnější buňky, hrubší buňkové stěny, růst při nízkém pH, menší nároky na živiny a větší odolnost vůči kontaminaci a inhibitorům jim dávají výhodné postavení při komerčním využití v kvasném průmyslu. [5, 15]

Mezi nejlepší kvasinky, které fermentují xylózu přímo na etanol, patří kmeny druhů *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* a *Pachysolen tannophylus*, avšak tyto kvasinky mají limitovanou toleranci vůči etanolu a inhibitorům vznikajícím při předúpravě substrátu a vyžadují přísně dodržovanou aeraci, proto se vhodnějším řešením ukazuje příprava a následné použití rekombinantních kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. [5, 16, 17, 48]

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae je tradičním mikroorganismem lihovarského průmyslu a jako taková je nejprozkoumanější kvasinkou vůbec. Proto je i modelovým jednobuněčným eukaryotickým organismem v základním výzkumu. Je zástupcem řádu Endomycetales. Rozmnožuje se vegetativně multilaterálním pučením, přičemž netvoří pravé mycelium a generativně vytvářením asků. Fermentuje glukózu, fruktózu, galaktózu, sacharózu, manózu, galaktózu, maltózu a rafinózu. Pro rozklad hexóz využívá Embden-Mayerhof-Parnasovu dráhu (glykolýzu). Neasimiluje dusičnanový dusík a laktózu. Tvar buněk je kulovitý až oválný. [5]

Současné trendy směřující k produkci palivového etanolu z lignocelulózových materiálů vyžadují schopnost produkčního mikroorganismu efektivně zkvašovat xylózu a arabinózu vznikající rozkladem hemicelulóz. *Saccharomyces cerevisiae* však přirozeně nezakvašuje pentózy, proto je příprava kmenů s těmito vlastnostmi předmětem genového inženýrství. [5, 49, 56]

2.7.2 Bakterie

Bakterie mají oproti kvasinkám některé nesporné výhody. Jako prokaryotické organismy jsou podstatně menší a nemají diferenciované orgány. Rostou proto rychleji a mají menší spotřebu živin na produkci vlastní biomasy, rychlost produkce etanolu i jeho výtěžnost je v porovnání s kvasinkami vyšší. Na druhé straně však mají bakterie výrazně nižší toleranci vůči etanolu, kyselinám a ostatním inhibitorům, proto je těžké uchránit systém od kontaminace jako při používání kvasinek. Další hrozbou pro provozy využívající bakterie jsou bakteriofágy. [5, 14]

Mezi bakterie, které mají vlastní pyruvátdekarboxylázu a alkoholdehydrogenázu patří *Zymomonas mobilis*. Pro potencionální využití v průmyslu biopaliv se ukazují jako slibné i další gramnegativní bakterie: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* a některé druhy rodu *Erwinia*, které mají přirozenou schopnost využívat široké spektrum sacharidů, ale nemají vlastní enzymy pro biosyntézu etanolu. Produkční kmeny těchto druhů se připravují metodami genového inženýrství. [5]

Zymomonas mobilis

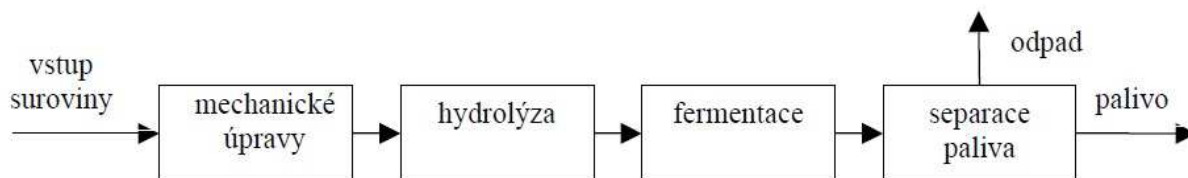
Zymomonas mobilis je fakultativně anaerobní gramnegativní bakterie. Já známá i pod názvem *Zymomonas lindneri* resp. *Pseudomonas lindneri*. Vyznačuje se mezi bakteriemi dost unikátní Entner-Doudoroffovou glykolytickou dráhou, pomocí níž zkvašuje sacharózu, glukózu a fruktózu. Experimenty s využitím *Zymomonas mobilis* v potravinářském průmyslu nebyly úspěšné z důvodu přítomnosti nežádoucích sirných a hnilobných pachů a příchutí v konečných produktech. [5]

Zymomonas mobilis vykazuje tří- až pětinasobně vyšší rychlost produkce etanolu a výtěžnost až 97 % teoretického maxima vycházejícího ze stechiometrie reakce oproti *Sacchromyces cerevisiae* s výtěžností 90–92 %. Některé kmeny *Zymomonas mobilis* jsou relativně tolerantní k některým inhibitorům vyskytujícím se v lignocelulózových hydrolyzátech, např. furfuralu a kyselině octové. [5, 13, 53]

2.8 Návrh technologického postupu

Výroba probíhá v několika na sebe navazujících procesech, viz. obrázek 9. V první fázi se musí provést mechanické úpravy suroviny, aby bylo dosaženo lepší účinnosti následné

hydrolýzy. Jednoduché cukry jsou dále zpracovatelné při fermentaci. Po ní následuje separace paliva, při níž se oddělí využitelný produkt od odpadu. [35]



Obrázek 9: Schéma procesu výroby biopaliva [35]

Pro rozsah zadání diplomové práce jsou relevantní první tři kroky schématu výroby kapalných biopaliv. Jedná se o předúpravu vstupní suroviny (viz. kapitola 2.3), následnou enzymatickou hydrolýzu (viz. kapitola 2.4.2) a fermentaci (viz. kapitola 2.5) s cílem dosáhnout co největšího výtěžku etanolu z fermentovatelných sacharidů. [29]

Vzhledem k získaným teoretickým poznatkům této práce, bude provedeno ověření možné inhibice produkty hydrolýzy procesem simultánní sacharifikace a fermentace. Postup je znázorněn na obrázku 10.



Obrázek 10: Návrh postupu optimalizace enzymatické hydrolýzy za použití metody SSF [29]

Bude provedena optimalizace základních podmínek SSF procesu (druh tlumivého roztoku, koncentrace enzymu, množství substrátu, množství mikroorganismů) za účelem maximalizace efektivity procesu. Výsledky budou vyhodnoceny na základě měření koncentrace glukózy a etanolu v odebraném médiu metodou HPLC.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

Příprava tlumivých roztoků

- octan sodný bezvodý – p.a., LachNer, C_2H_3NaO
- kyselina octová 99% – p.a., LachNer, CH_3COOH
- kyselina citrónová monohydrát – p.a., LachNer, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$
- hydrogenfosforečnan sodný střední dodekahydrát – Lachema a.s., $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$

Příprava kultivačních médií

- destilovaná voda, H_2O
- kyselina sírová – 96%, p.a., LachNer, H_2SO_4
- hydroxid sodný – čistý, PENTA, $NaOH$
- kvasničný extrakt – pro bakteriologii, Carl ROTH
- dihydrogenfosforečnan draselný – p.a., LachNer, KH_2PO_4
- síran hořečnatý heptahydrát – p.a., LachNer, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- síran amonný – p.a., LachNer, $(NH_4)_2SO_4$
- agar – bakteriologický, Carl ROTH

Příprava kalibračních roztoků pro HPLC

- D-glukosa bezvodá – p.a., PENTA, $C_6H_{12}O_6$
- Etanol 99,9% – pro HPLC, Sigma-Aldrich, C_2H_5OH

3.1.2 Použitý substrát

K hydrolýze byl použit papír s vysokým obsahem celulózy dodaný Slovenskou technickou univerzitou v Bratislavě.

3.1.3 Použité enzymy

Novozymes® Biomass Kit

- NS50013 (celulázový komplex)

Celulázový preparát NS50013 katalyzuje rozklad celulóзовého materiálu na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy, přičemž hlavními produkty reakce jsou celobióza a glukóza. Doporučuje se preparát kombinovat s preparátem NS50010 pro maximalizaci výkonu. [44]

Tabulka 2: Enzymová aktivita preparátu NS50013, doporučené pH, teplota a dávkování

Enzym	Aktivita ¹	Hustota ² (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkování % w/w (na TS)
NS50013 (celulázový komplex)	700 EGU/g (~70 FPU/g)	1,2	4,5–6,5	45–50	2–6 %

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

2 – hodnota hustoty je přibližná

3 – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být nutné dávkování značně variabilní

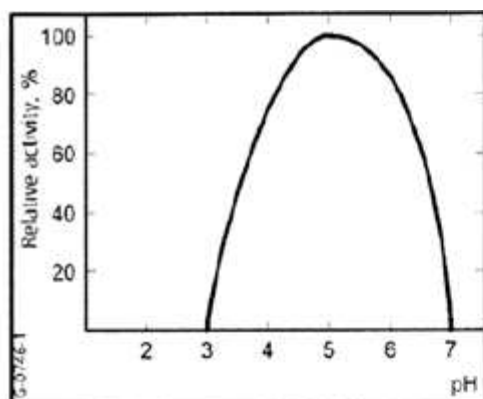


Fig. 1. Influence of pH on the activity of NS50013.

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

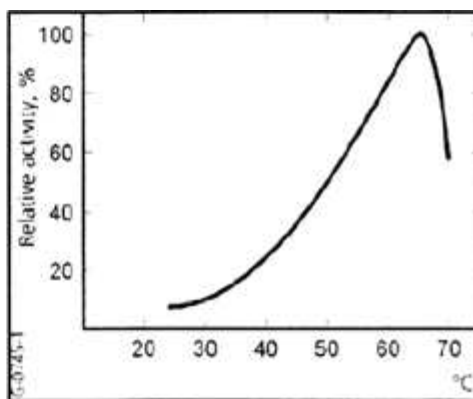


Fig. 2. Influence of temperature on the activity of NS50013.

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

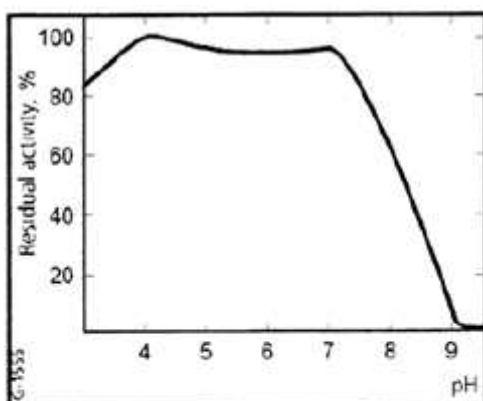


Fig. 3. Influence of pH on the stability of NS50013.

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

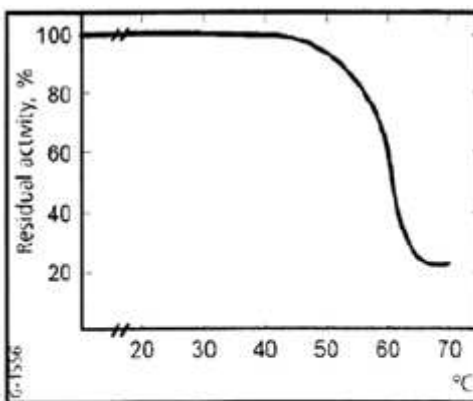


Fig. 4. Influence of temperature on the stability of NS50013.

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

Obrázek 11: Vliv pH a teploty na aktivitu a stabilitu preparátu NS50013 (celulázového komplexu) [44]

– NS50010 (β-glukozidáza)

β-glukozidázový preparát hydrolyzuje celobiózu na glukózu. Doporučený přídavek preparátu NS50010 je 5–10 % (v/v) množství enzymového preparátu NS50013 pro kompletní hydrolýzu dostupné celulózy. [44]

Tabulka 3: Enzymová aktivita preparátu NS50010, doporučené pH, teplota a dávkování

Enzym	Aktivita ¹	Hustota ² (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkování % w/w (na TS)
NS50010 (β-glukozidáza)	250 CBU/g	1,2	2,5–6,5	45–70	0,2–0,6 %

1 – CBU – cellobiase unit

2 – hodnota hustoty je přibližná

3 – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být nutné dávkování značně variabilní

Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

– NS22086 (celulázový komplex)

Celulázový preparát NS50013 katalyzuje rozklad celulózového materiálu na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy, přičemž hlavními produkty reakce jsou celobióza a glukóza. Doporučuje se preparát kombinovat s preparátem NS22118 pro maximalizaci výkonu. [45]

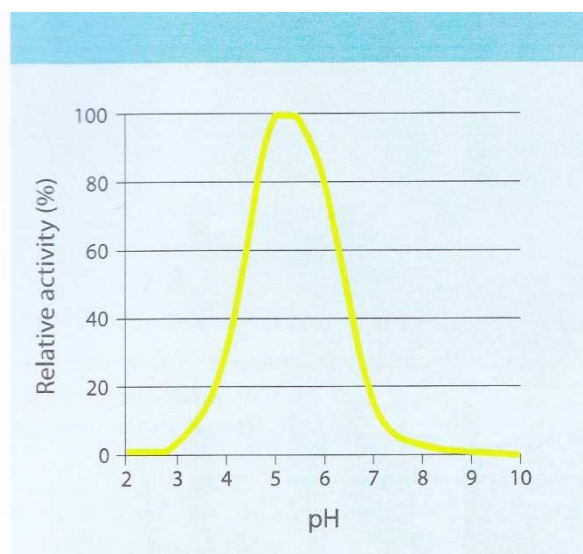
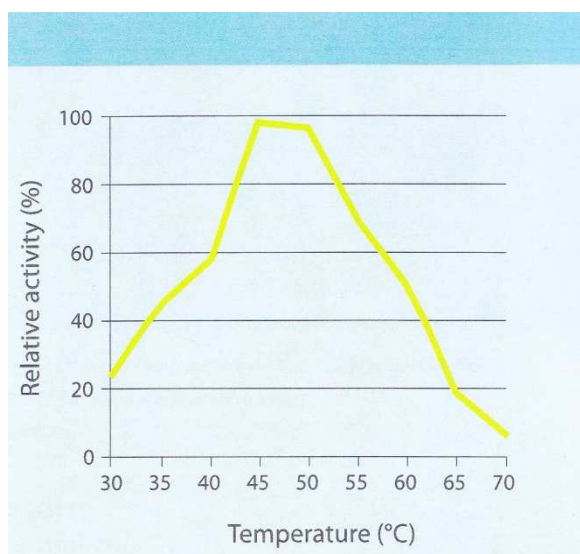
Tabulka 4: Enzymová aktivita preparátu NS22086, doporučené pH, teplota a dávkování

Enzym	Aktivita ¹	Hustota ² (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkování % w/w (na TS)
NS22086 (celulázový komplex)	1,000 BHU(2)/g	1,15	5,0–5,5	45–50	1–5 %

1 – BHU(2) – biomass hydrolysis unit

2 – hodnota hustoty je přibližná

3 – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být nutné dávkování značně variabilní



Obrázek 12: Vliv pH a teploty na aktivitu preparátu NS50013 (celulázového komplexu) [45]

– **NS22118 (β -glukozidáza)**

β -glukozidázový preparát hydrolyzuje celobiózu na glukózu. Doporučený přídavek preparátu NS50010 je 0–4 % (v/v) množství enzymového preparátu NS22086 pro kompletní hydrolýzu dostupné celulózy. [45]

Tabulka 5: Enzymová aktivita preparátu NS22118, doporučené pH, teplota a dávkování

Enzym	Aktivita ¹	Hustota ² (g/ml)	pH	Teplota (°C)	Dávkování % w/w (na TS)
NS22118 (β -glukozidáza)	250 CBU/g	1,2	2,5–6,5	45–70	0,2–0,6 %

1 – CBU – cellobiase unit

2 – hodnota hustoty je přibližná

3 – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být nutné dávkování značně variabilní

3.1.4 Použité kultury

Ke kultivaci byly pořízeny kultury *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457 pořízené ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě, ze sbírky mikroorganismů ústavu biotechnologie a potravinářství.

3.1.5 Použité přístroje

Analytické váhy Pioneer™ OHAUS
 Běžné laboratorní sklo
 Centrifuga Eppendorf 5417 R
 Inkubátor Memmert
 Kombinovaná lednice BOSCH
 Minitřepačka lab dancer vario
 Mixér Rohson MultiDuo R-536
 Pečící trouba Mora 524
 pH metr inoLab® pH 720
 Spektrofotometr Helios ε
 Termostatovaná třepačka Heidolph® Promax 1020
 Ultrazvuková čistička Ultrasound
 Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
 Váha OHAUS
 HPLC
 – Detektor UV/VIS ECOM s.r.o.
 – Diferenciální refraktometr RIDK 101
 – Pumpa ECOM s.r.o.
 – Sampler HT 300
 – Termostat kolonový LCO 101 ECOM s.r.o.

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Příprava tlumivých roztoků

Byla vypočítána navážka soli pro cílový objem a požadované molarity tlumivých roztoků. Navážená sůl byla rozpuštěna v 60 % cílového objemu destilované vody. Roztok požadované molarity soli byl temperován na požadovanou teplotu enzymatické reakce a byl titrován na cílové pH roztokem odpovídající kyseliny. Roztoky byly doplněny na požadované objemy destilovanou vodou. Před použitím byly připravené roztoky pufrů uchovávány v chladu při 4 °C.

3.2.2 Příprava pevného, inokulačního a kultivačního média pro *Zymomonas mobilis*

Médium pro bakterie bylo přiřívno dle návodu dodaného ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě ke kultuře *Zymomonas mobilis*.

Složky byly namíchány dle tabulky 6. Do inokulačního média bylo navíc přidáno 100 g glukózy, při přípravě srovnávacích médií bylo rovněž do média přidáno 100 g glukózy. Při přípravě pevného média pro výsev na plotny byl do roztoku krom glukózy přidán také agar v množství 20 g/l.

Ve všech médiích bylo upraveno pH zředěnou kyselinou sírovou (1:1) na hodnotu 5,5 a směs byla sterilizována (120 °C, 15 minut).

Tabulka 6: Složky inokulačního a kultivačního média

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

3.2.3 Mobilní fáze pro HPLC (1,3 mmol/l H₂SO₄)

73,7 µl 96% H₂SO₄ bylo rozmícháno ve 1000 ml deionizované vody.

3.3 Předúprava papíru

Pro zlepšení dostupnosti celulózy pro enzymatický komplex je nutné papír předupravit.

Byla použita fyzikální předúprava mechanickým mletím. Papír byl nastříhán na drobné kousky a následně mlet vlhkým mletím s destilovanou vodou v homogenizátoru / mixéru. Surovina byla zfiltrována a proprána destilovanou vodou. Filtrační koláč byl rozprostřen do tenké vrstvy a usušen při 80 °C v sušárně.

3.4 Enzymatická hydrolýza

Hydrolýza papíru byla prováděna v batch režimu.

Suchý a pomletý materiál byl navážen s přesností na 0,01 g a umístěn do Erlenmayerových baněk. Byly připraveny tlumivé roztoky, postup je uveden v kapitole 3.2.1. Pufrů byly napipetovány do Erlenmayerových baněk s naváženým substrátem. Následovala sterilizace po dobu 15 minut při 120 °C. Aby bylo zabráněno kontaminaci během hydrolýzy, byly Erlenmayerovy baňky uzavřeny zátkami z buničiny. Dále byly baňky s obsahem

10 minut temperovány na požadovanou teplotu v temperované třepačce a poté byly přidány enzymy. Doba začátku byla zaznamenána a ve stanovených intervalech byly provedeny odběry pro HPLC.

3.5 Úprava hydrolyzátu

Hydrolyzát získaný po proběhnuté hydrolýze byl zfiltrován. Filtrát byl doživen dle tabulky 7.

Tabulka 7: Doživení filtrátu

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

3.6 Zaočkování

Z kolonií, které vyrostly na Petriho misce, byla mikrobiologickým očkem odebrána jedna (single kolonie) a naočkována do baňky s inokulačním médiem, viz. kapitola 3.2.2. Kultivace probíhala staticky při teplotě 30 °C. Po 24 hodinách byla napropagovaná biomasa odstředěna, promyta sterilní destilovanou vodou a naředěna na OD = 1. Touto suspenzí byly zaočkovány baňky s kultivačním médiem na výslednou koncentraci 6 nebo 10 % obj.

Při optimalizaci množství buněk byly připraveny suspenze buněk o OD = 0,1; 0,2; 0,5 a 1. Těmito suspenzemi byly zaočkovány baňky s kultivačním médiem na výslednou koncentraci 6 % obj.

3.7 Fermentace

Byly namíchány média, standardní dle návodu v kapitole 3.2.2, hydrolyzát byl upraven dle návodu v kapitole 3.5. Bylo upraveno pH a poté byly Erlenmayerovy baňky s obsahem vysterilizovány po dobu 15 minut při 120 °C za účelem snížení počtu možných kontaminantů v médiu. Po ochlazení a vytemperování na teplotu, při které měla fermentace probíhat, byly vzorky zaočkovány roztokem obsahujícím předem určené množství buněk *Zymomonas mobilis*. Byl zaznamenán čas začátku reakce a ve stanovených intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC.

3.8 Simultánní sacharifikace a fermentace

Byla provedena s cílem maximalizace výnosu procesu a minimalizace produktové inhibice, která se vyskytuje při oddělené hydrolýze a fermentaci. Navržený postup procesu je uveden v kapitole 2.8. Byla provedena optimalizace základních podmínek procesu s ohledem na viabilitu použité kultury a maximalizaci výnosu hydrolýzy.

Byl optimalizován druh tlumivého roztoku, množství enzymu, substrátu a buněk. Při optimalizaci jednotlivých parametrů byla vždy jedna proměnná a zbylé parametry zůstaly konstantní.

Postup provedení experimentu byl následující: do Erlenmayerových baněk byl navážen suchý předupravený papír s přesností na 0,01 g. Byly připraveny tlumivé roztoky,

viz. kapitola 3.2.1. Tlumivý roztok byl pipetován do Erlenmayerových baněk obsahujících substrát. Tato suspenze se nechala 24 hodin inkubovat, poté bylo změřeno pH a případně upraveno na požadovanou hodnotu. Suspenze byla doživena, postup je uveden v kapitole 3.2.2, a sterilizována 15 minut při 120 °C za účelem snížení počtu možných kontaminantů v médiu. Po ochlazení a vytemperování na teplotu, při které mělo SSF probíhat, byly přidány enzymy ve stanoveném množství a vzorek byl zaočkován roztokem obsahujícím předem určené množství buněk *Zymomonas mobilis*. Byl zaznamenán čas začátku reakce a ve stanovených intervalech byly odebrány vzorky pro HPLC.

3.9 Stanovení odebraných vzorků metodou HPLC

Na analýzu vybraných produktů bylo odebráno 1,5 ml vzorku. Toto množství bylo centrifugováno při 8000 otáčkách po dobu 10 minut na chlazené centrifuze eppendorf. Supernatant byl zfiltrován přes 45 µm filtr a zmražen pro pozdější stanovení. Po rozmražení byl vzorek promíchán a následně nastříknut na kolonu.

Separace probíhala izokraticky při 40 °C a průtoku 0,5 ml/minutu na koloně WATREX 250 x 8 mm Polymer IEX H⁺ o rozměrech 250 x 4,6 mm a zrnění 8 µm. Byl použit sampler HT 300 s dávkovací smyčkou 20 µl. Jako mobilní fáze byla použita 1,3 mmol/l H₂SO₄. K detekci byl použit refraktometrický detektor RIDK 101 a detektor UV/VIS ECOM při vlnové délce 190 nm. Veškerá měření byla prováděna trojmo.

Kvantitativní vyhodnocení bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Ze standardů byla použita glukóza a etanol. Standardy byly ředěny deionizovanou vodou a analýza byla provedena metodou RP-HPLC za stejných podmínek jako analýza vzorků. Jednotlivé kroky křivky byly vyhodnoceny a získaná závislost byla použita ke stanovení obsahu daných analytů v reálných vzorcích.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Analýza obsahu látek pomocí HPLC

Glukóza a etanol byly stanoveny metodou HPLC/RI dle postupu uvedeného v kapitole 3.9. Kvalitativní analýza byla provedena na základě srovnání retenčních časů jednotlivých složek s retenčními časy standardů. Kvantitativní analýza byla provedena metodou kalibrační křivky. Neznámý obsah stanovené složky se určí pomocí analytické vyhodnocovací funkce $c = f(y(x))$.

Tabulka 8: Rovnice kalibračních křivek standardů

Standard	Rovnice kalibrační křivky
Glukóza	$y \text{ (mV}\cdot\text{s)} = 711,86 \cdot x \text{ (g/l)} + 95,494$
Etanol	$y \text{ (mV}\cdot\text{s)} = 245,99 \cdot x \text{ (g/l)} - 21,114$

Odečtená průměrná plocha pod píkem (y) byla dosazena do rovnice uvedené v tabulce 8 a byla vypočtena koncentrace analytů (x).

4.2 Základní kvantitativní analýza materiálu

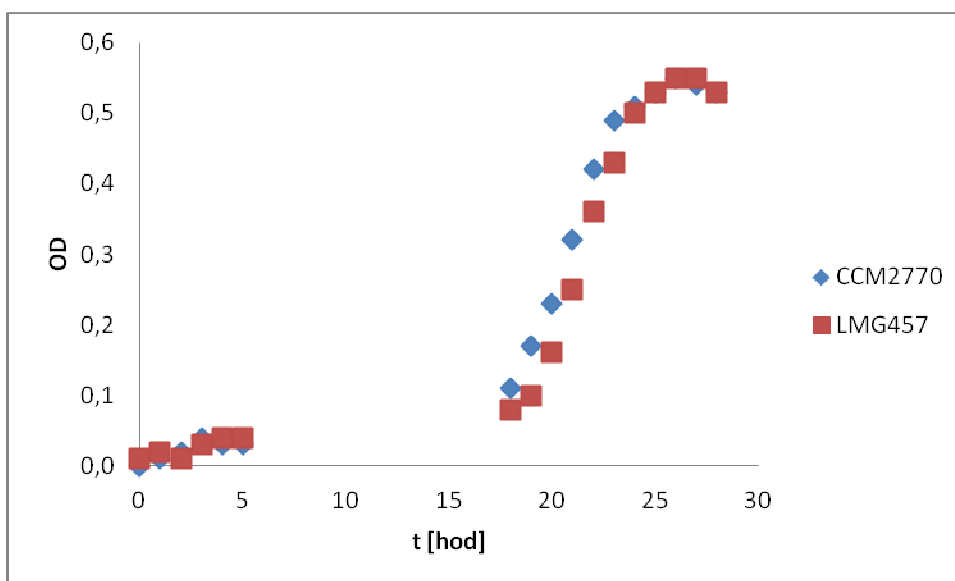
4.2.1 Sestavení růstové křivky *Zymomonas mobilis* na standardním médiu

V médiu, které obsahovalo jako zdroj uhlíku glukózu, byly sestaveny růstové křivky dvou kmenů *Zymomonas mobilis*. CCM2770 na sacharóze levan produkující kmen a LMG457 levan neprodukující kmen. Kultivace probíhala staticky při teplotě 30 °C, pH 5,5. Růstové křivky byly vyneseny na základě naměřených hodnot optické denzity v závislosti na čase.

V grafu 1 je viditelná lag-fáze trvající pravděpodobně 17 hodin (protože v mezičase chybí data), která přechází do exponenciální fáze, stacionární fáze začíná ve 26. hodině kultivace.

Doba inokulace byla zvolena na 24 hodin, tato doba je v intervalu exponenciální fáze růstu, přenosem buněk v této části se minimalizuje lag-fáze. Tento čas byl rovněž uveden v materiálech dodaných spolu s kmeny *Zymomonas mobilis*.

Graf 1: Růstové křivky kmenů *Zymomonas mobilis*



4.3 Optimalizace podmínek procesu

Byl učiněn předpoklad, že všechna glukóza vytvořená během hydrolýzy je přeměněna v procesu fermentace na etanol. Jako ukazatel efektivity hydrolýzy bylo považováno množství vzniklé glukózy, efektivita fermentace byla stanovena z množství vzniklého etanolu. U SSF bylo ukazatelem opět množství etanolu. Množství sledovaných produktů (glukóza a etanol) bylo stanoveno metodou HPLC.

4.3.1 Optimalizace druhu pufru

Prvním krokem je vytvoření vhodného prostředí, které nesníží aktivitu enzymů a zároveň bude vyhovovat buňkám. Byly testovány dva pufrы a voda při pH = 4,8, protože toto pH bylo vyhodnoceno jako nejvhodnější v předchozích pracích.

Pokus probíhal po dobu 72 hodin v temperované třepačce. Podmínky pokusu jsou uvedeny v tabulce 9 a dávkování enzymů v tabulce 10. Jako médium byl použit octanový pufr, citrát-fosforečnanový pufr a voda. Pufrы byly připraveny dle návodu, viz. kapitola 3.2.1.

Po 72 hodinách hydrolýzy byly odebrány vzorky a metodou HPLC stanoven obsah glukózy. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu 2, kde jsou jednotlivé pufrы a voda porovnány. V tabulce 11 je uvedeno relativní množství vzniklé glukózy v procentech vztažené ke vzorku s největším přírůstkem.

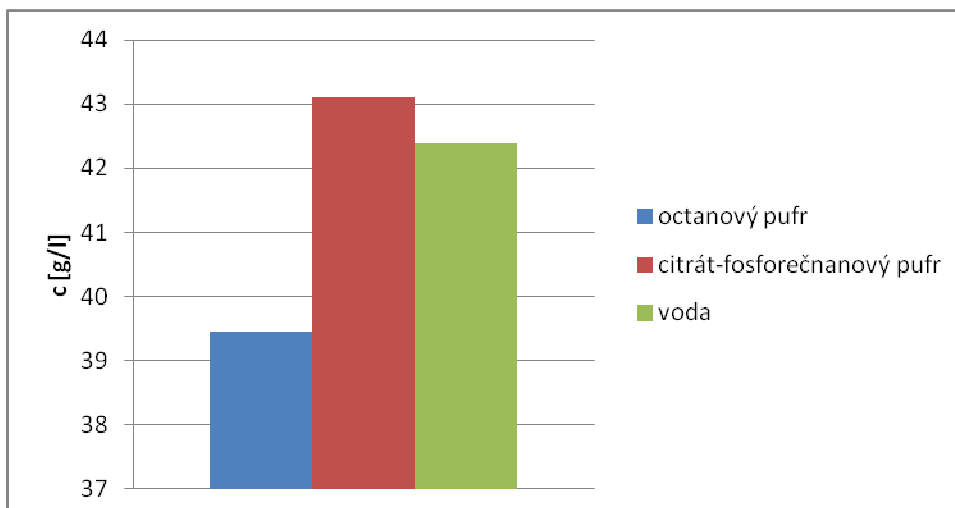
Tabulka 9: Podmínky použité při hydrolýze papíru (optimalizace druhu pufru) po dobu 72 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	4,8	50	180

Tabulka 10: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	8
	V _{enzym} [ml]	0,267
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,8
	V _{enzym} [ml]	0,027

Graf 2: Obsah glukózy po 72 hodinách hydrolýzy



Tabulka 11: Relativní zvýšení koncentrace glukózy v % po 72 hodinách hydrolyzy

Médium	Zvýšení C_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení C_{GLU} [%]
octanový pufr	39,45	91,52
citrát-fosforečnanový pufr	43,11	100,00
voda	42,38	98,30

Z experimentu vyplývá, že v 0,1 mol/l citrát-fosforečnanovém pufru je nejvyšší obsah glukózy, tudíž nejvyšší aktivita enzymů. Proto byl 0,1 mol/l citráto-fosforečnanový pufr použit v dalších pokusech. Voda obsahovala také vysoké množství glukózy, ale z důvodu neschopnosti udržet pH při SSF bylo od jejího použití upuštěno.

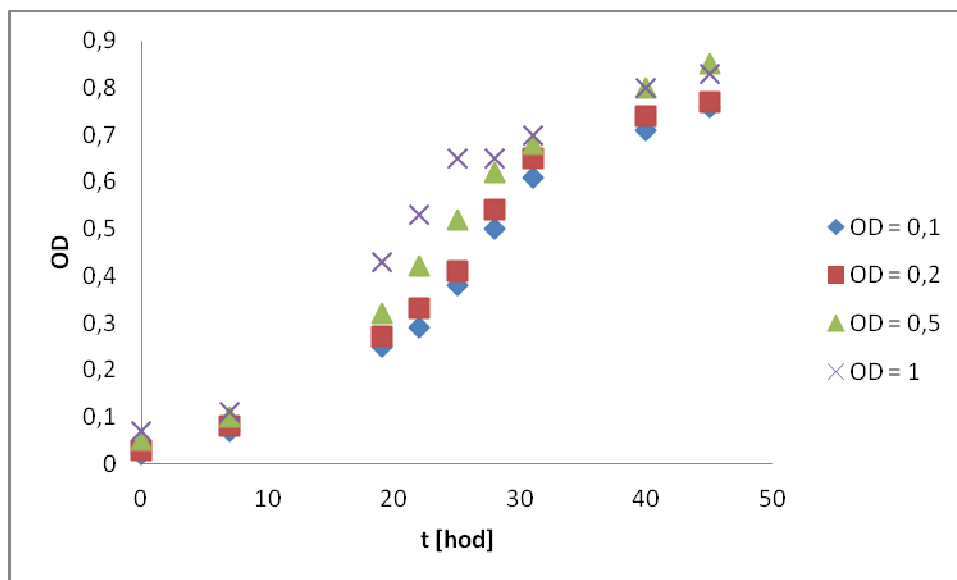
4.3.2 Optimalizace množství buněk *Zymomonas mobilis* v produkčním médiu

Byly provedeny kultivace za účelem stanovení optimální koncentrace buněk pro zaočkování tak, aby došlo k co největší přeměně glukózy na etanol.

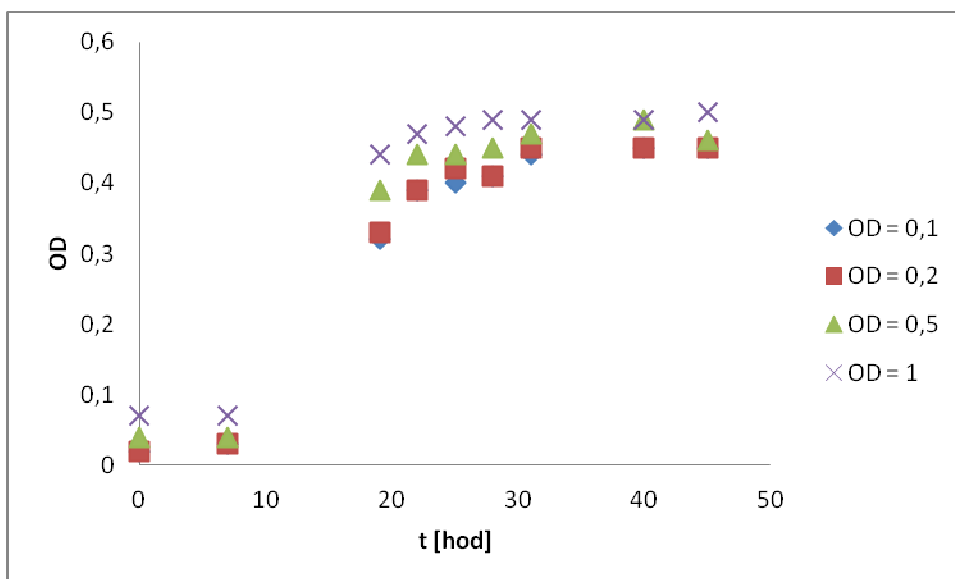
Experiment probíhal v 50 ml média, které jako zdroj uhlíku obsahovalo glukózu, bylo zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj., viz. kapitola 3.6. Kultivace probíhala stacionárně při teplotě 30 °C a trvala 45 hodin.

V pravidelných intervalech byla měřena optická denzita jednotlivých médií, získané výsledky jsou uvedeny v grafech 3 a 4.

Graf 3: Růstové křivky *Zymomonas mobilis* CCM2770 na standardním médiu

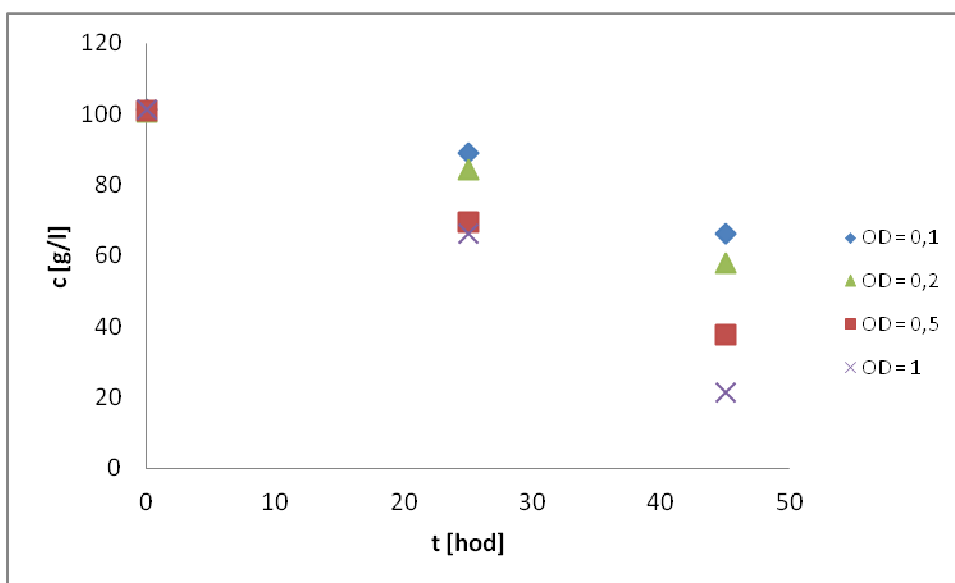


Graf 4: Růstové křivky *Zymomonas mobilis* LMG457 na standardním médiu

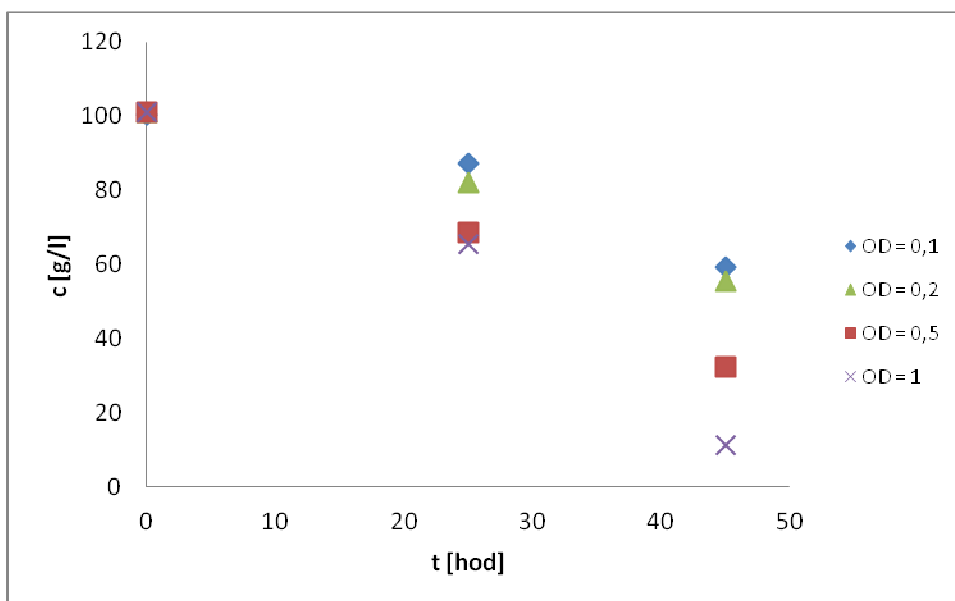


Rovněž byly v určitých intervalech odebrány vzorky v nichž byl metodou HPLC stanoven obsah glukózy a etanolu, výsledky jsou uvedeny v grafech 5–8, ve kterých je porovnávána koncentrace glukózy a etanolu v závislosti na množství buněk zaočkovaných v čase 0. Relativní změny koncentrací etanolu a glukózy v procentech jsou vztaheny k vzorku s největším přírůstkem, uvedeny v tabulce 12.

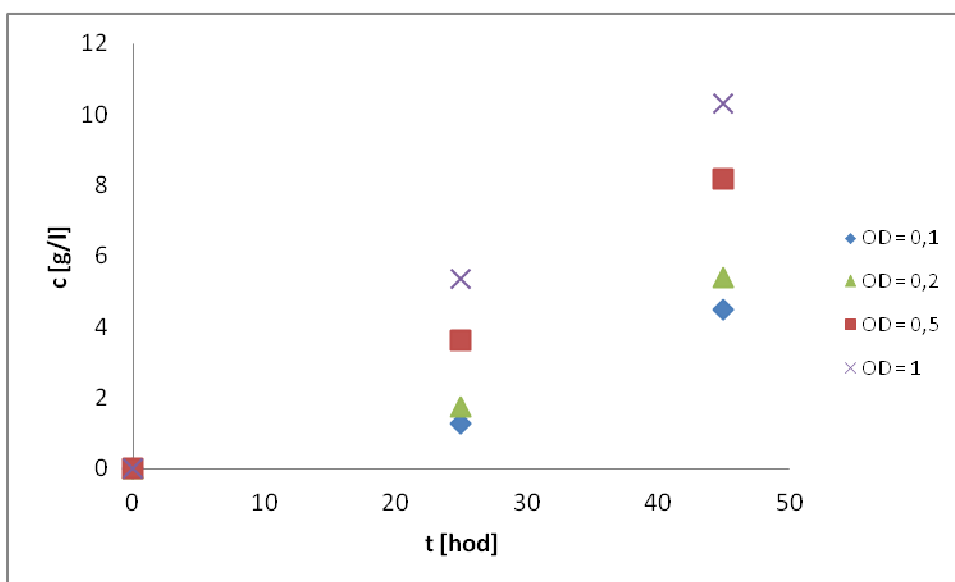
Graf 5: Obsah glukózy v médiu během kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770



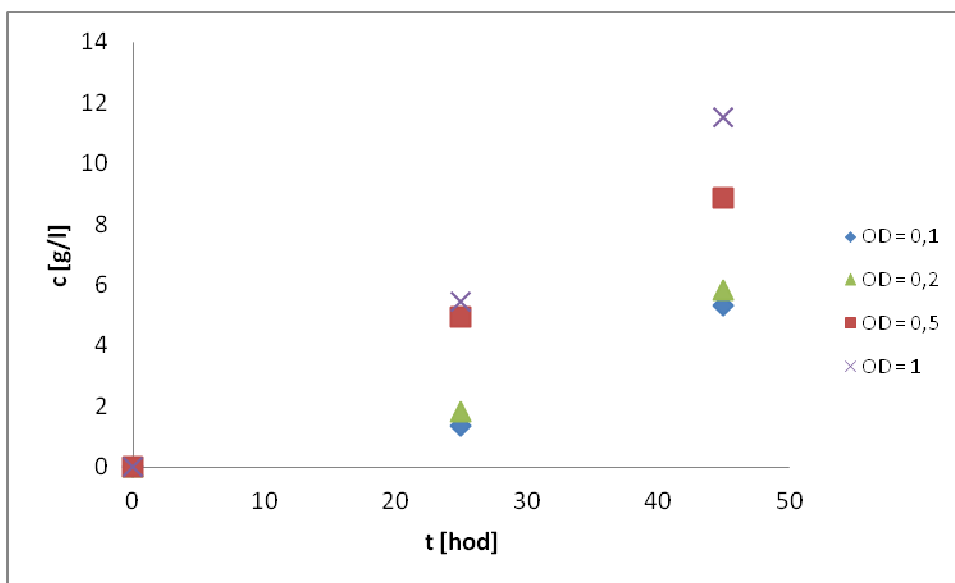
Graf 6: Obsah glukózy v médiu během kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457



Graf 7: Obsah etanolu v médiu během kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770



Graf 8: Obsah etanolu v médiu během kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457



Tabulka 12: Relativní změna koncentrace glukózy a etanolu v % po 45 hodinách

	Zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj.	Snížení c_{GLU} [g/l]	Relativní snížení c_{GLU} [%]	Zvýšení c_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení c_{EtOH} [%]
<i>Zymomonas mobilis</i>	0,1	34,87	39,0	4,50	39,0
	0,2	42,52	47,5	5,39	46,7
<i>CCM2770</i>	0,5	63,17	70,6	8,18	70,9
	1,0	80,04	89,5	10,31	89,4
<i>Zymomonas mobilis</i>	0,1	41,08	45,9	5,32	46,2
	0,2	45,80	51,2	5,85	50,7
<i>LMG457</i>	0,5	68,56	76,6	8,87	76,9
	1,0	89,47	100,0	11,53	100,0

Obsah glukózy se snižoval rovnoměrně v závislosti na množství buněk, nejpomaleji v médiích obsahujících 6 % obj. suspenze buněk o OD = 0,1 a naopak nejrychleji v médiích, které obsahovaly 6 % obj. suspenze buněk o OD = 1. Kmen *LMG457* vykazoval vyšší úbytek než kmen *CCM2770*.

Obsah etanolu se rovněž zvyšoval rovnoměrně v závislosti na množství buněk, nejpomaleji v médiích obsahujících 6 % obj. suspenze buněk o OD = 0,1 a naopak nejrychleji v médiích, které obsahovaly 6 % obj. suspenze buněk o OD = 1. Přičemž kmen *LMG457* vykazoval vyšší produkci než kmen *CCM2770*, což se shoduje s úbytkem v množství glukózy.

Vzhledem k tomu, že buňky byly do média přidány ve stejnou dobu, byly ve stejné fázi růstu a měly v produkčním médiu stejné podmínky, můžeme říci, že množství produkovaného

etanolu bylo ovlivněno schopností přizpůsobit se změně prostředí, která byla lepší ve větším počtu buněk. [29, 31]

Experiment dokázal, že pro větší produkci etanolu je vhodné použít vyšší koncentrace buněk při zaočkování. Pro další pokusy byla zvolena počáteční koncentrace buněk 6 % obj. o OD = 1.

Další optimalizace množství buněk byly spojeny s optimalizací množství enzymů a jsou uvedeny v kapitole 4.3.3.

4.3.3 Optimalizace množství enzymů

Byly provedeny pokusy za účelem optimalizace množství enzymů v produkčním médiu.

Novozymes® Biomass Kit

Pokus trval 96 hodin v temperované třepačce. Procesní podmínky jsou popsány v tabulce 13 a dávkování enzymu v tabulce 14. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1.

Ve 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC a měřeno pH. Získaná data jsou uvedena v grafech 9 a 10. Relativní množství přírůstku koncentrace glukózy v závislosti na množství použitých enzymů vztažené ke vzorku s největším přírůstkem je shrnuto v tabulce 15.

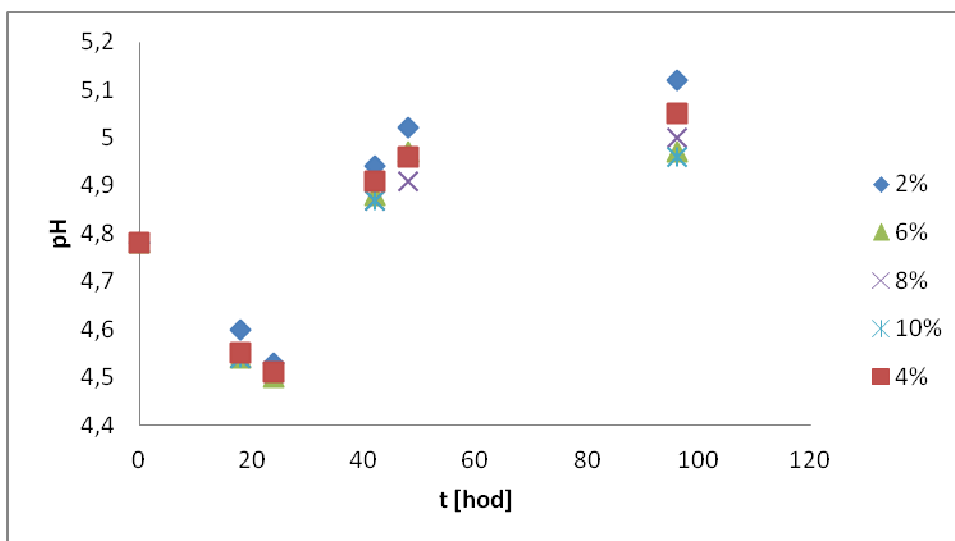
Tabulka 13: Podmínky použité při hydrolýze papíru po dobu 96 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	50	180

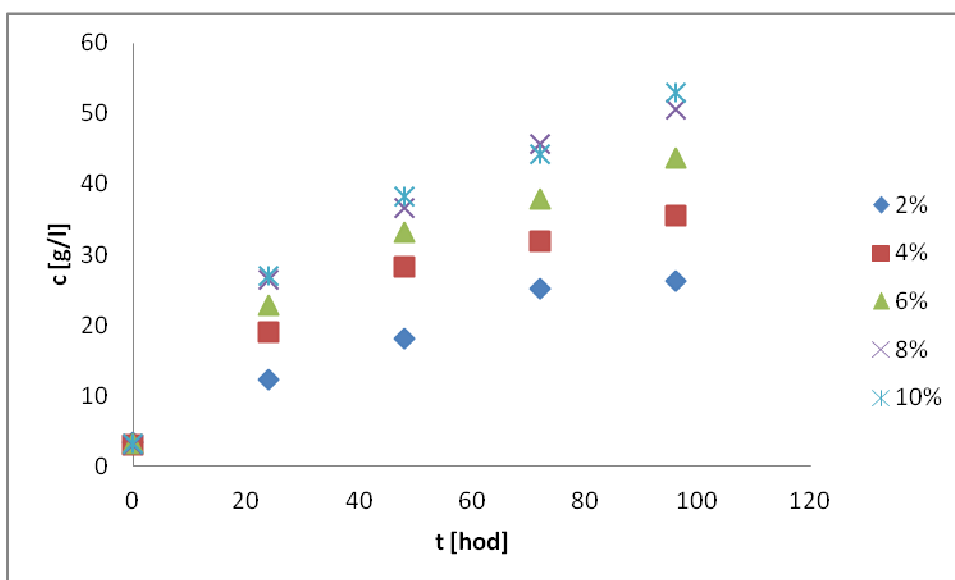
Tabulka 14: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	2	4	6	8	10
	V _{enzym} [ml]	0,067	0,133	0,200	0,267	0,333
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
	V _{enzym} [ml]	0,007	0,013	0,020	0,027	0,033

Graf 9: Změna pH při různém dávkování enzymů



Graf 10: Obsah glukózy v médiích obsahujících různé množství enzymů

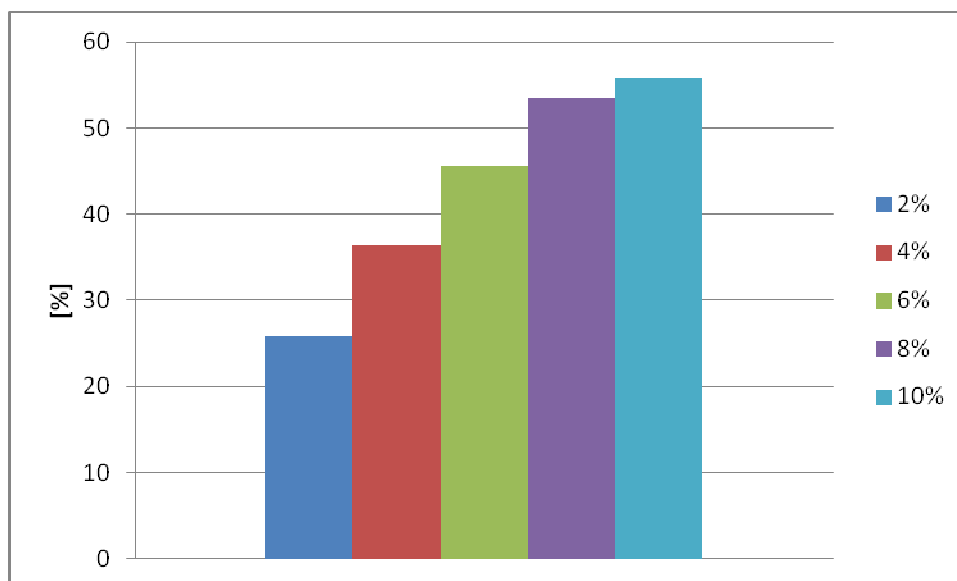


Tabulka 15: Přehled zvýšení koncentrace glukózy při optimalizaci množství enzymů

Množství enzymu [% w/v]	Zvýšení c_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení c_{GLU} [%]	$m_{\text{celulóza}}$ [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
2	22,98	46,24	80,00	88,89	25,85
4	32,32	65,05	80,00	88,89	36,36
6	40,49	81,50	80,00	88,89	45,56
8	47,58	95,75	80,00	88,89	53,52
10	49,69	100,00	80,00	88,89	55,90

hmotnost složek je uvedena v objemu 1 l

Graf 11: Experimentální výtěžek glukózy v % při použití různého množství enzymů



Ze získaných dat vyplývá, že množství dávkovaného enzymu na změnu pH nemělo téměř žádný vliv. Množství glukózy v médiu se postupně zvyšovalo s množstvím enzymů. Pro další pokusy byla zvolena hodnota 6 % w/w vztaženo na množství substrátu, protože tato hodnota je výrobcem enzymů doporučena jako mezní, viz. kapitola 3.1.3.1. Dalším důvodem pro nezvyšování koncentrace je cena enzymu, která tvoří nezanedbatelnou část ceny celého procesu. Pro podrobnější srovnání by bylo nutné vypracovat ekonomickou analýzu, která by porovnávala náklady spojené s navýšením koncentrace enzymů a získané zvýšením efektivity procesu. [29, 55]

Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

– SSF *nedoživeno*

Byla provedena optimalizace množství enzymů, pokusy byly prováděny s kmeny *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457 po dobu 72 hodin v temperované třepačce. Procesní podmínky jsou popsány v tabulce 16 a dávkování enzymu v tabulce 17. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1. Do média nebyly přidány živiny dle kapitoly 3.2.2. Roztoky byly zaočkovány na výslednou koncentraci 6 % obj., viz kapitola 3.6.

Ve 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC. Získaná data jsou uvedena v grafech 12–15. Relativní množství přírůstku koncentrace glukózy a etanolu v závislosti na množství použitých enzymů vztažené ke vzorku s největším přírůstkem je shrnuto v tabulce 18.

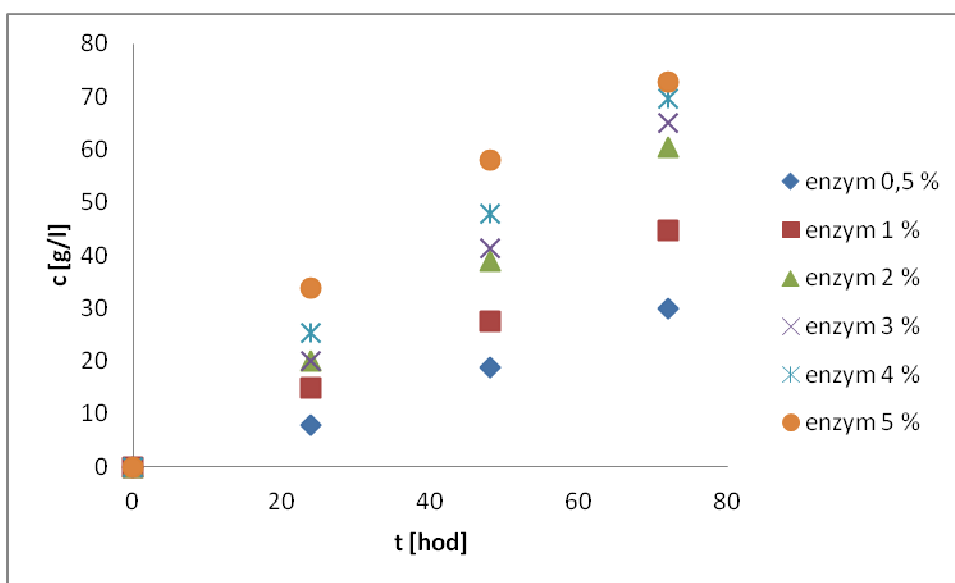
Tabulka 16: Podmínky použité při optimalizaci množství enzymu SSF bez doživení po dobu 72 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	50	180

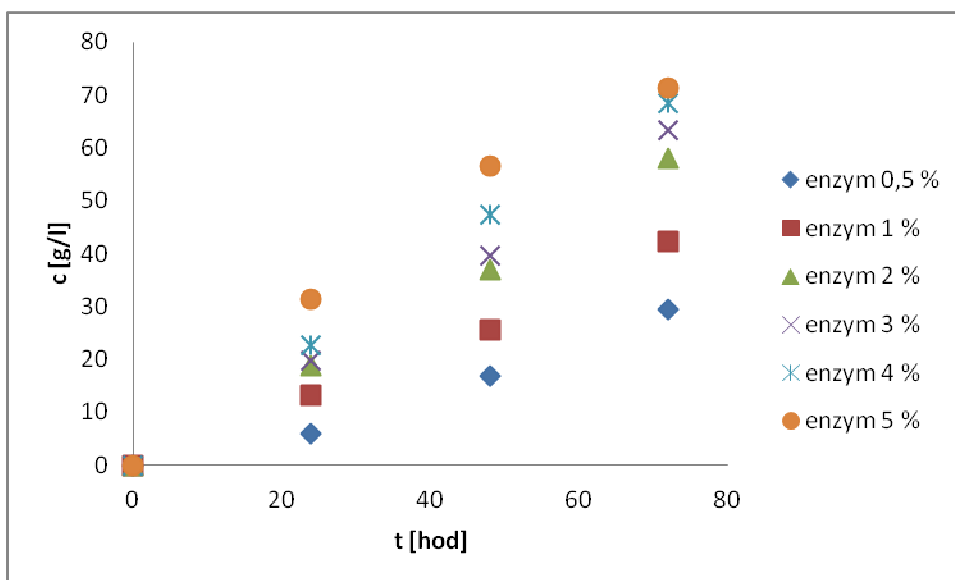
Tabulka 17: Použité dávkování enzymů SSF bez doživení

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
	V _{enzym} [μl]	13	26	52	78	104	130
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
	V _{enzym} [μl]	1,25	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5

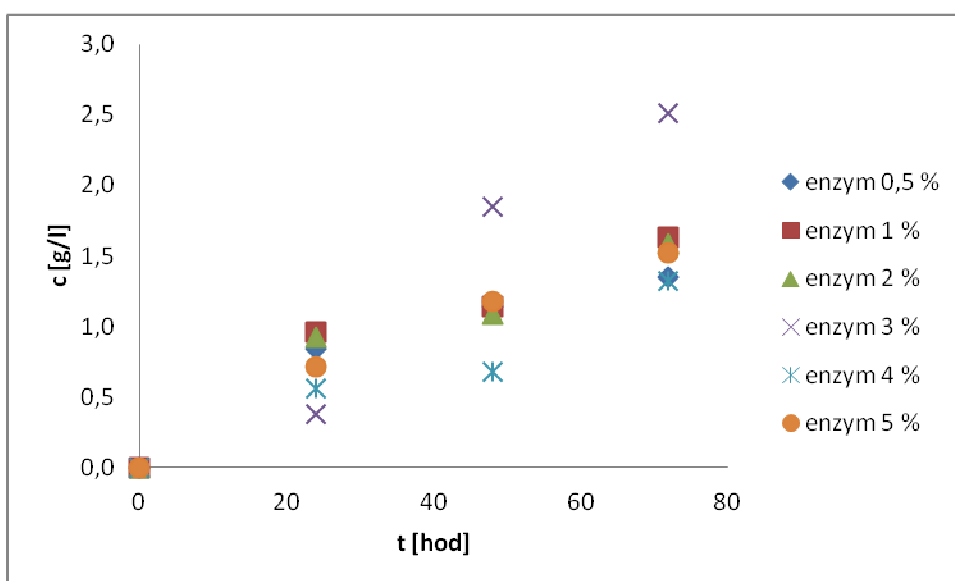
Graf 12: Obsah glukózy v médiu bez živin během kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770 při použití různých množství enzymů



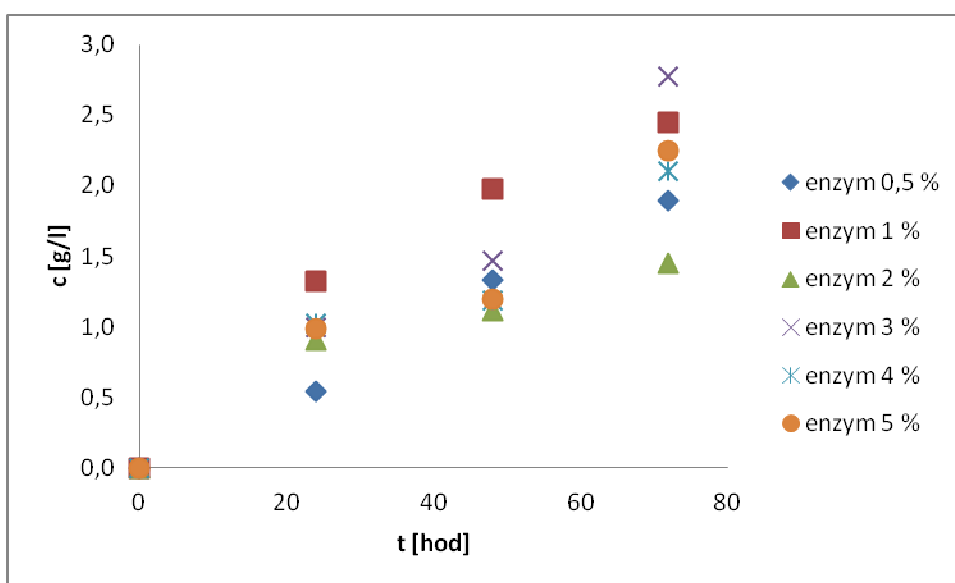
Graf 13: Obsah glukózy v médiu bez živin během kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457 při použití různých množství enzymů



Graf 14: Obsah etanolu v médiu bez živin během kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770 při použití různých množství enzymů



Graf 15: Obsah etanolu v médiu bez živin během kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457 při použití různých množství enzymů



Tabulka 18: Přehled zvýšení koncentrace glukózy a etanolu při optimalizaci množství enzymů v médiu bez živin

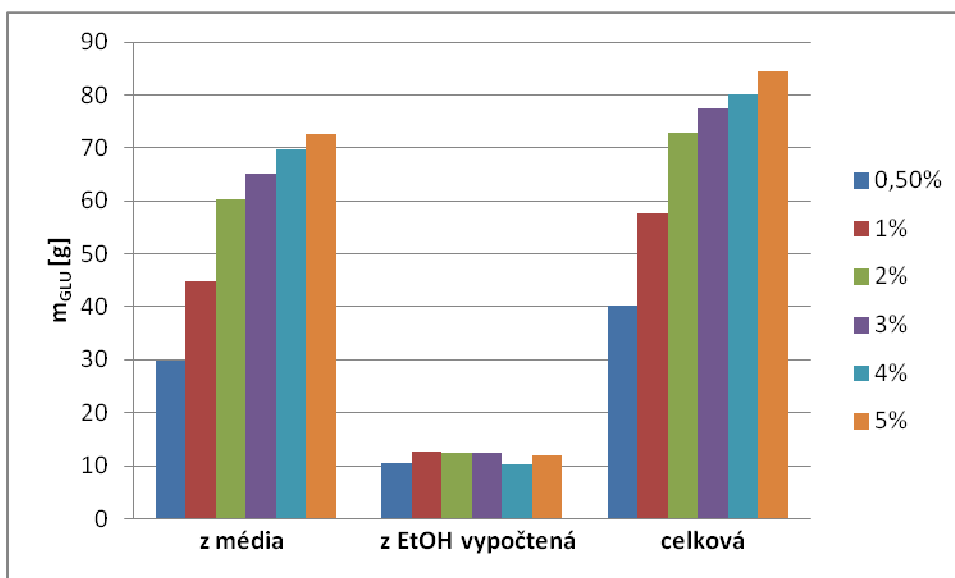
	Množství enzymů [%]	Zvýšení c_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení c_{GLU} [%]	Zvýšení c_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení c_{EtOH} [%]
<i>Zymomonas mobilis</i> CCM2770	0,5	29,81	41,0	1,35	48,6
	1,0	44,75	61,6	1,63	59,0
	2,0	60,41	83,1	1,59	57,3
	3,0	65,14	89,6	1,59	57,3
	4,0	69,69	95,9	1,32	47,8
	5,0	72,67	100,0	1,52	55,0
<i>Zymomonas mobilis</i> LMG457	0,5	29,36	40,4	1,90	68,4
	1,0	42,25	58,1	2,45	88,5
	2,0	58,06	79,9	1,45	52,4
	3,0	63,40	87,2	2,77	100,0
	4,0	68,50	94,3	2,10	76,0
	5,0	71,33	98,2	2,24	81,0

Tabulka 19: Experimentální výtěžek glukózy při optimalizaci množství enzymů bez doživení

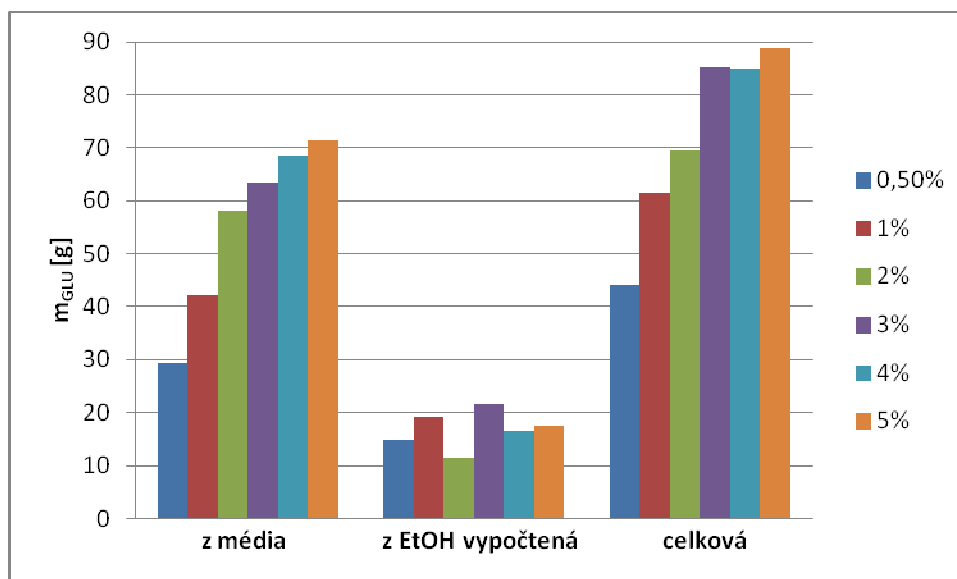
	Množství enzymů [%]	$m_{\text{GLU z EtOH}}$ vypočtená [g]	m_{GLU} celková [g]	$m_{\text{celulóza}}$ [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
<i>Zymomonas mobilis</i> CCM2770	0,5	10,52	40,34	80,00	88,89	45,38
	1,0	12,77	57,53	80,00	88,89	64,72
	2,0	12,41	72,82	80,00	88,89	81,92
	3,0	12,41	77,54	80,00	88,89	87,24
	4,0	10,36	80,05	80,00	88,89	90,06
	5,0	11,93	84,59	80,00	88,89	95,17

	Množství enzymů [%]	m _{GLU} z EtOH vypočtená [g]	m _{GLU} celková [g]	m _{celulóza} [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
<i>Zymomonas mobilis</i> <i>LMG457</i>	0,5	14,83	44,19	80,00	88,89	49,71
	1,0	19,17	61,42	80,00	88,89	69,10
	2,0	11,36	69,42	80,00	88,89	78,10
	3,0	21,70	85,10	80,00	88,89	95,74
	4,0	16,46	84,96	80,00	88,89	95,58
	5,0	17,55	88,88	80,00	88,89	99,99
hmotnost složek je uvedena v objemu 1 l						

Graf 16: Množství získané glukózy při kultivaci *Zymomonas mobilis* CCM2770



Graf 17: Množství získané glukózy při kultivaci *Zymomonas mobilis* LMG457



Pro vyhodnocení byl učiněn předpoklad, že jediný sacharid využitý na výrobu etanolu byla glukóza a její konverze byla beze ztrát. Ze známého množství etanolu bylo zpětně vypočítáno množství glukózy. Toto množství glukózy bylo přičteno k množství zbývajících volné glukózy z média za účelem zjištění teoretického celkového množství vzniklé glukózy.

Na základě shromážděných dat bylo vypočítáno, že nejvyšší množství glukózy bylo v médiích obsahujících 5 % w/w enzymů vztaženo na hmotnost substrátu, množství vytvořeného etanolu bylo vyšší v médiích obsahujících 1–3 % w/w enzymů vztaženo na hmotnost substrátu. Vysoká rychlost hydrolýzy mohla způsobit částečnou inhibici tvorby etanolu bakteriemi. Proto byla pro další pokusy zvolena nižší koncentrace enzymů – 2 % w/w vztaženo na hmotnost substrátu. Nižší koncentrace enzymů je vhodnější i z finančního hlediska, jelikož cena enzymů tvoří nezanedbatelnou část ceny celého procesu.

– SSF doživeno

Byla provedena optimalizace množství enzymů a buněk, pokusy byly prováděny pouze s kmenem *Zymomonas mobilis* LMG457 po dobu 168 hodin v temperované třepačce. Procesní podmínky jsou popsány v tabulce 20 a dávkování enzymu v tabulce 21. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1. Do média byly přidány živiny dle kapitoly 3.2.2. Zaočkováno bylo na výslednou koncentraci 6 a 10 % obj., viz. kapitola 3.6.

Ve 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC a měřeno pH. Získaná data jsou uvedena v grafech 18–23. Relativní množství přírůstku koncentrace glukózy a etanolu v závislosti na množství použitých enzymů a buněk vztažené ke vzorku s největším přírůstkem je shrnuto v tabulce 22.

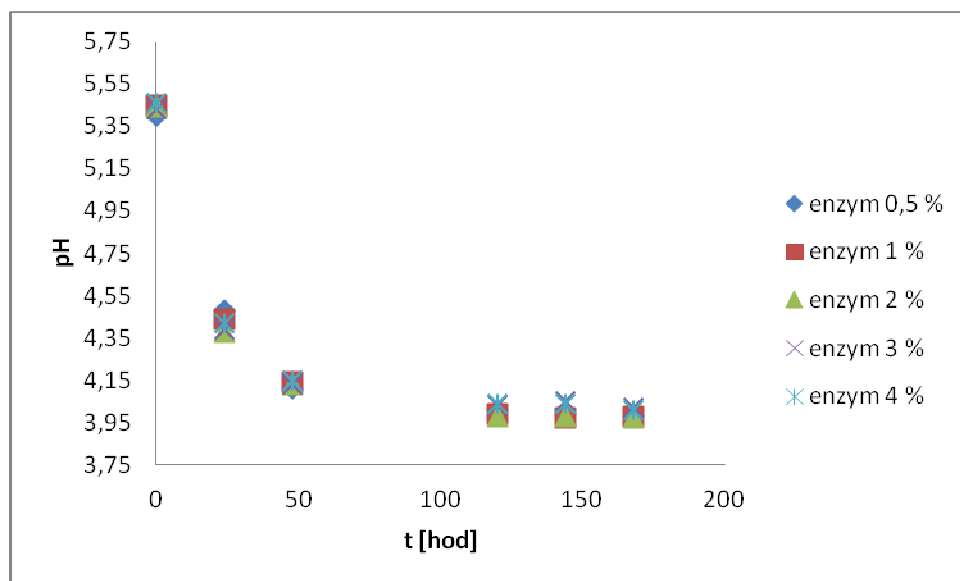
Tabulka 20: Podmínky použité při optimalizaci množství enzymu SSF s doživením po dobu 168 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	citrát-fosforečnanový pufr	5,5	50	180

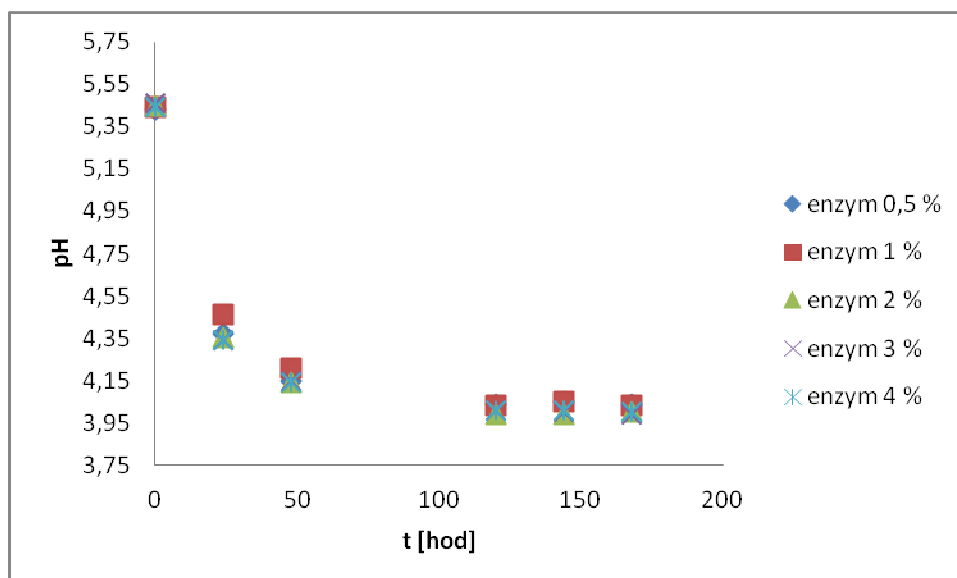
Tabulka 21: Použité dávkování enzymů SSF s doživením

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0
	V _{enzym} [μl]	13	26	52	78	104
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
	V _{enzym} [μl]	1,25	2,5	5,0	7,5	10,0

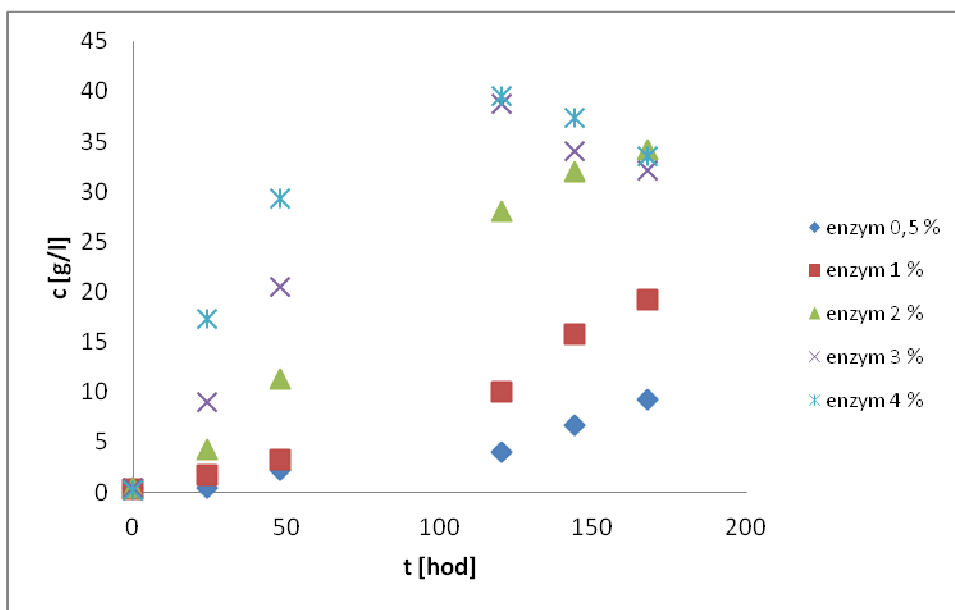
Graf 18: Změna pH během SSF v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj.



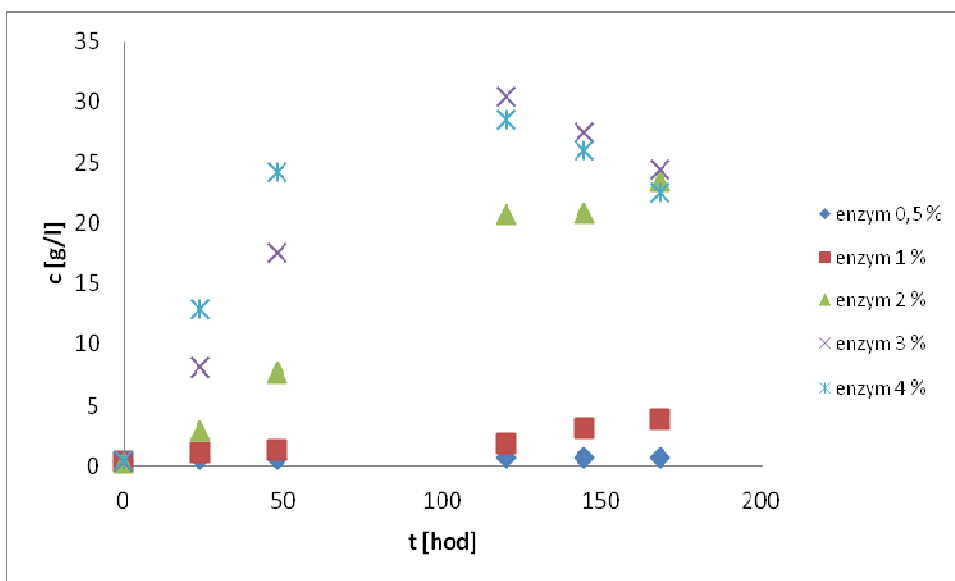
Graf 19: Změna pH během SSF v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 10 % obj.



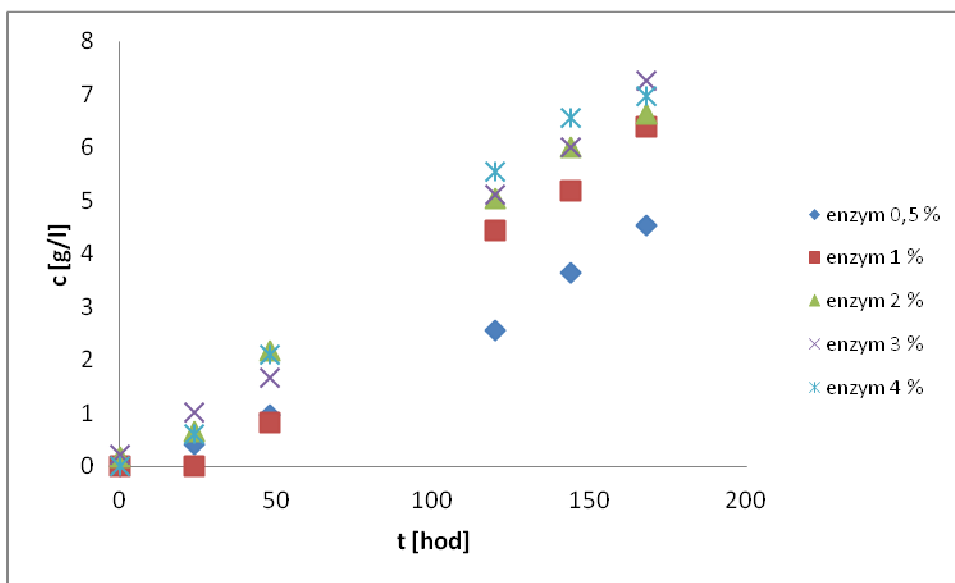
Graf 20: Obsah glukózy v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj.



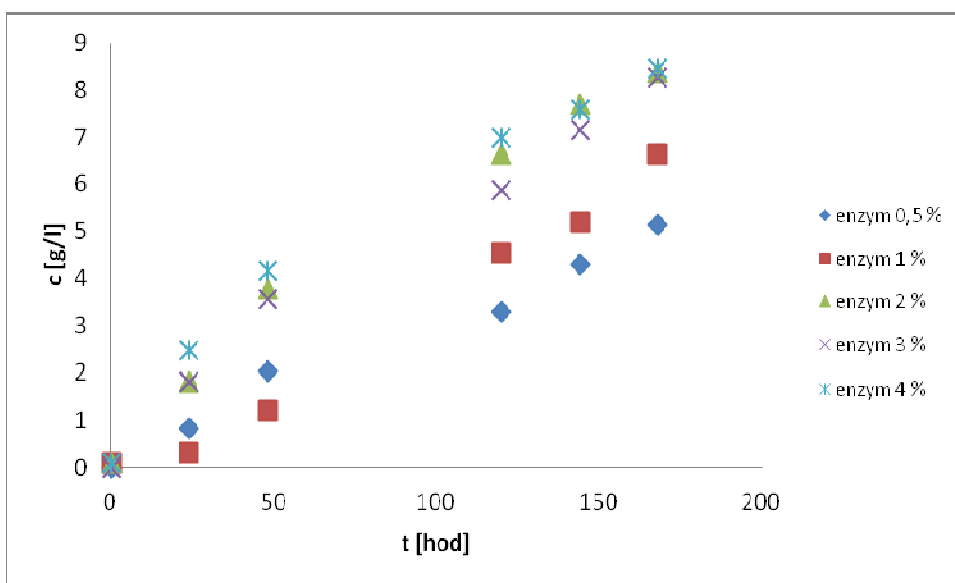
Graf 21: Obsah glukózy v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 10 % obj.



Graf 22: Obsah etanolu v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj.



Graf 23: Obsah etanolu v médiu s doživením při použití různých množství enzymů, zaočkováno na výslednou koncentraci 10 % obj.



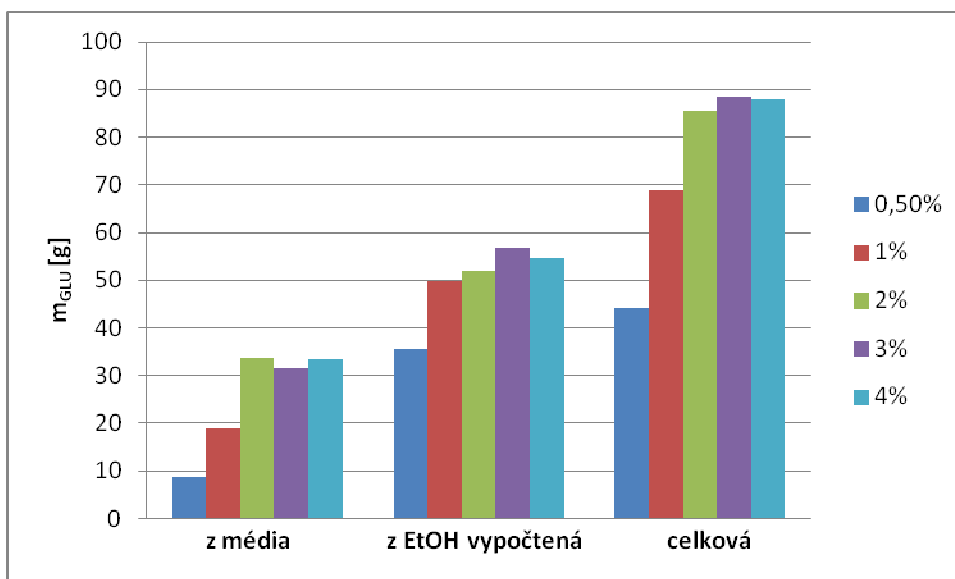
Tabulka 22: Přehled zvýšení koncentrace glukózy a etanolu při optimalizaci množství enzymů a buněk v médiu s doživením

<i>Zymomonas mobilis</i> <i>LMG457</i>	Množství enzymů [%]	Zvýšení c_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení c_{GLU} [%]	Zvýšení c_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení c_{EtOH} [%]
6 % obj.	0,5	8,75	26,0	4,53	53,5
	1,0	18,95	56,3	6,38	75,4
	2,0	33,64	100,0	6,63	78,2
	3,0	31,63	94,0	7,26	85,7
	4,0	33,34	99,1	6,98	82,4
10 % obj.	0,5	0,39	1,1	5,14	60,7
	1,0	3,45	10,2	6,63	78,3
	2,0	23,19	68,9	8,37	98,8
	3,0	24,11	71,7	8,25	97,5
	4,0	22,12	65,8	8,47	100,0

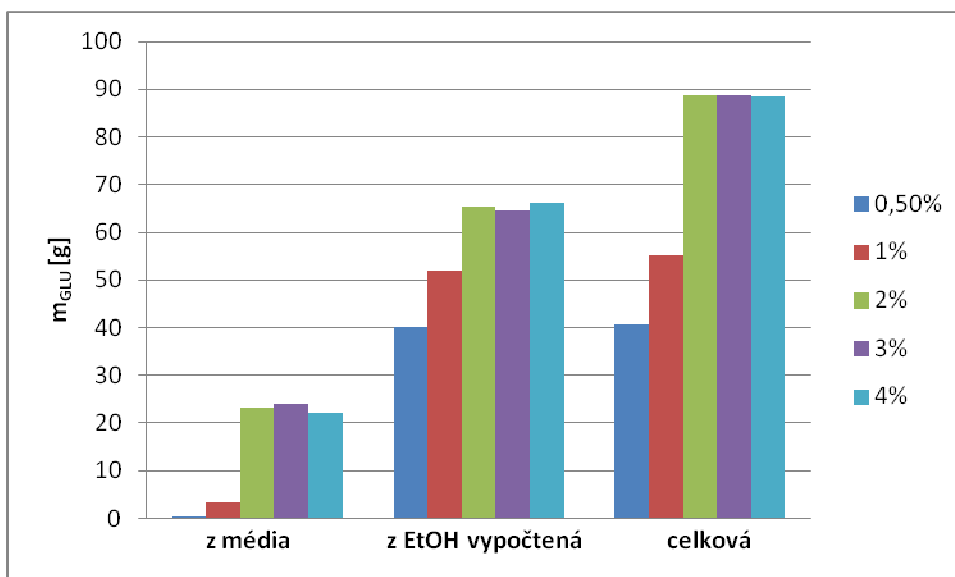
Tabulka 23: Experimentální výtěžek glukózy z procesu SSF při optimalizaci množství enzymů

<i>Zymomonas mobilis</i> <i>LMG457</i>	Množství enzymů [%]	$m_{\text{GLU z EtOH}}$ vypočtená [g]	m_{GLU} celková [g]	$m_{\text{celulóza}}$ [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
6 % obj.	0,5	35,45	44,20	80,00	88,89	49,73
	1,0	49,92	68,87	80,00	88,89	77,48
	2,0	51,82	85,46	80,00	88,89	96,14
	3,0	56,78	88,42	80,00	88,89	99,47
	4,0	54,57	87,90	80,00	88,89	98,89
10 % obj.	0,5	40,24	40,62	80,00	88,89	45,70
	1,0	51,86	55,31	80,00	88,89	62,22
	2,0	65,45	88,64	80,00	88,89	99,72
	3,0	64,56	88,67	80,00	88,89	99,76
	4,0	66,24	88,36	80,00	88,89	99,40
hmotnost složek je uvedena v objemu 1 l						

Graf 24: Množství získané glukózy z kultivace, zaočkováno na výslednou koncentraci 6 % obj.



Graf 25: Množství získané glukózy z kultivace, zaočkováno na výslednou koncentraci 10 % obj.



Pro vyhodnocení byl učiněn předpoklad, že jediný sacharid využitý na výrobu etanolu byla glukóza a její konverze byla beze ztrát. Ze známého množství etanolu bylo zpětně vypočítáno množství glukózy. Toto množství glukózy bylo přičteno k množství zbývajících volné glukózy z média za účelem zjištění teoretického celkového množství vzniklé glukózy.

Na základě shromážděných dat bylo vypočítáno, že nejvyšší množství glukózy bylo v médiích obsahujících 2–4 % w/w enzymů vztaženo na hmotnost substrátu, množství buněk mělo vliv na rychlost tvorby etanolu.

Z výsledků je patrné, že doživení médií má na výtěžnost procesu velký vliv, proto další pokusy budou probíhat pouze s doživením. Koncentrace enzymů pro další experimenty byla stanovena na 2 % w/w vztaženo na hmotnost substrátu se zaočkováním na výslednou koncentraci 10 % obj.

4.3.4 Optimalizace množství substrátu

Byl proveden experiment na optimalizaci množství papíru v produkčním médiu.

Pokus probíhal 72 hodin v temperované třepačce při podmínkách, které jsou popsány v tabulce 24, dávkování enzymů a substrátu je uvedeno v tabulce 25. Jako tlumivý roztok byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1.

Získané výsledky jsou zaznamenány v grafu 26. Relativní zvýšení koncentrace glukózy v tabulce 26 je vztaženo ke vzorku s nejvyšším obsahem glukózy.

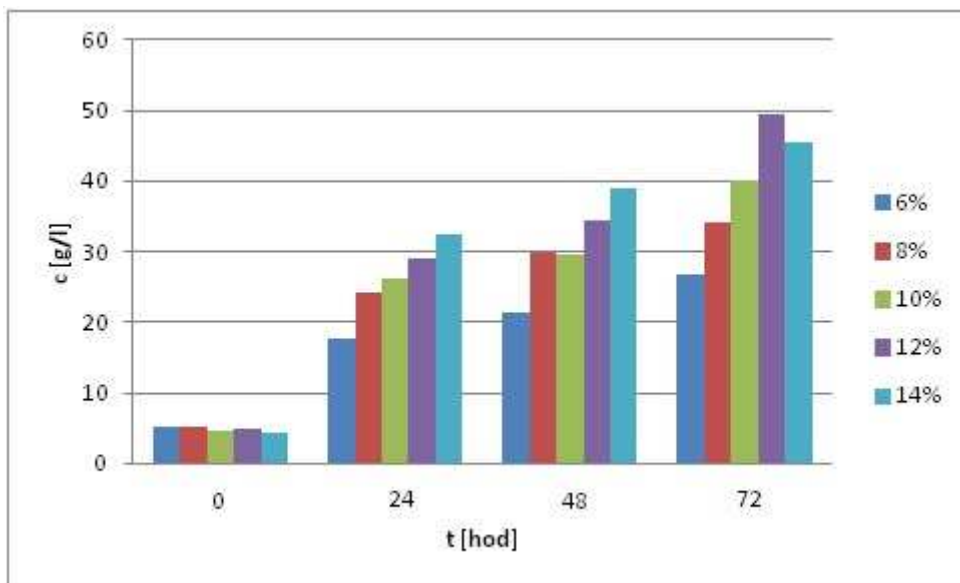
Tabulka 24: Podmínky použité při optimalizaci množství substrátu

V_{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
50	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	50	180

Tabulka 25: Použité dávkování substrátu a enzymů

cs [% w/v]		6	8	10	12	14
$m_{\text{substrát}}$ [g]		3	4	5	6	7
celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	6	6	6	6	6
	V_{enzym} [ml]	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350
β -glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	V_{enzym} [ml]	0,015	0,020	0,025	0,030	0,035

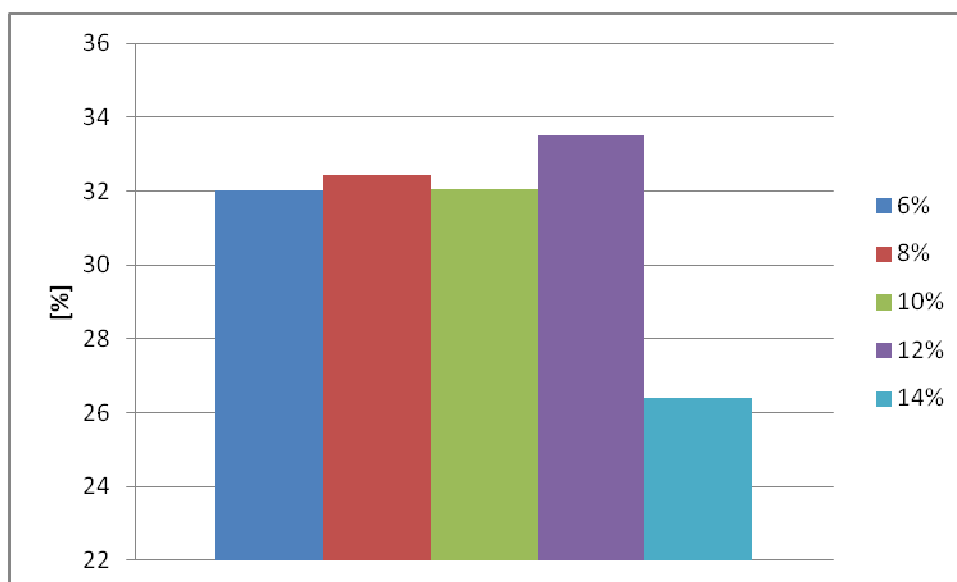
Graf 26: Závislost koncentrace glukózy na čase v médiích s různým množstvím substrátu



Tabulka 26: Relativní zvýšení koncentrace glukózy při optimalizaci množství substrátu

Množství substrátu [% w/v]	Teoretický výtěžek GLU v 1 l [g]	Zvýšení c_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení c_{GLU} [%]	Výtěžnost GLU [%]
6	66,67	21,34	47,80	32,02
8	88,89	28,84	64,58	32,45
10	111,11	35,62	79,77	32,06
12	133,33	44,66	100,00	33,49
14	155,56	41,08	91,99	26,41

Graf 27: Výtěžnost glukózy při různém dávkování substrátu



Ze známého množství naváženého papíru a získaného množství glukózy byla vypočítána výtěžnost jednotlivých experimentů.

Na základě naměřených dat bylo stanoveno, že nejvyšší množství glukózy bylo získáno při použití 12 % w/v vztaženo na objem média. Z dat dále vyplývá, že další navyšování koncentrace substrátu nevedlo ke zvýšení množství vytvořeného etanolu, což mohlo být způsobeno vysokou viskozitou média a horším mícháním směsi. Pro další experimenty byla zvolena koncentrace substrátu 8 % w/v vztaženo na objem média z důvodu lepší dostupnosti celulózy enzymům, díky důkladnějšímu promíchávání.

4.4 Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace

Byla provedena série pokusů za účelem porovnání experimentálního výtěžku enzymatické hydrolýzy a fermentace s procesem SSF. Pro porovnání bylo nutné zpětně vypočítat množství glukózy zfermentované na etanol. Byl učiněn předpoklad, že vzniklá glukóza byla jediný sacharid, který byl bakteriemi fermentován a zároveň 100 % převeden na etanol.

4.4.1 Hydrolýza

Novozymes® Biomass Kit

Pokus probíhal po dobu 96 hodin v temperované třepačce. Podmínky pokusu jsou uvedeny v tabulce 27 a dávkování enzymu v tabulce 28. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1.

Byly odebírány vzorky ve 24 hodinových intervalech a metodou HPLC stanoven obsah glukózy. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu 28.

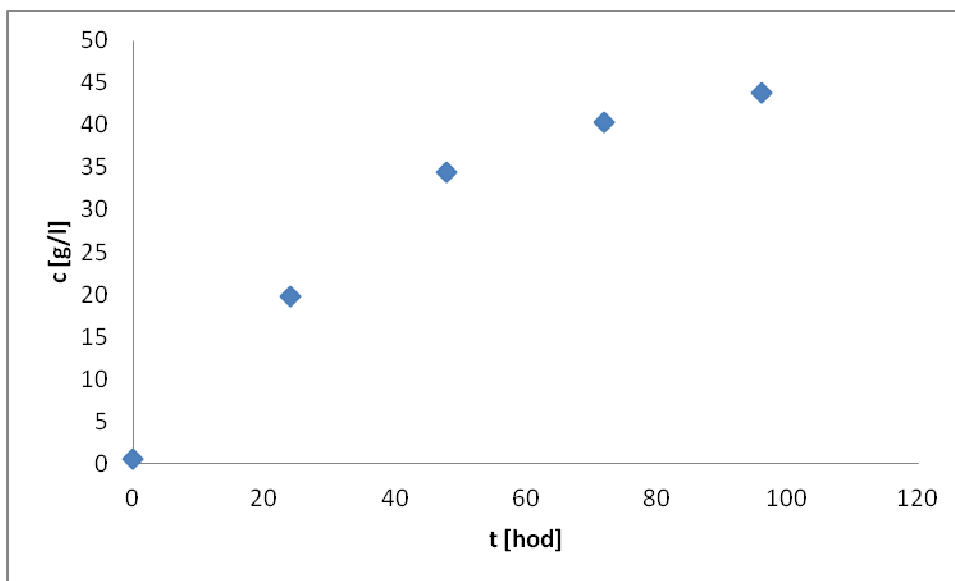
Tabulka 27: Podmínky použité při hydrolýze papíru po dobu 96 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	8	100	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	50	180

Tabulka 28: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	6
	V _{enzym} [ml]	0,400
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,6
	V _{enzym} [ml]	0,040

Graf 28: Změna obsahu glukózy během hydrolýzy



Hydrolyzát obsahoval po 96 hodinách hydrolýzy 43,771 g/l glukózy. Následovala jeho úprava, která je popsána v kapitole 3.5.

Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

Pokus probíhal po dobu 144 hodin v temperované třepačce. Podmínky pokusu jsou uvedeny v tabulce 29 a dávkování enzymu v tabulce 30. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1.

V pravidelných intervalech byly odebírány vzorky a metodou HPLC stanoven obsah glukózy. Výsledky měření jsou zaznamenány v grafu 29.

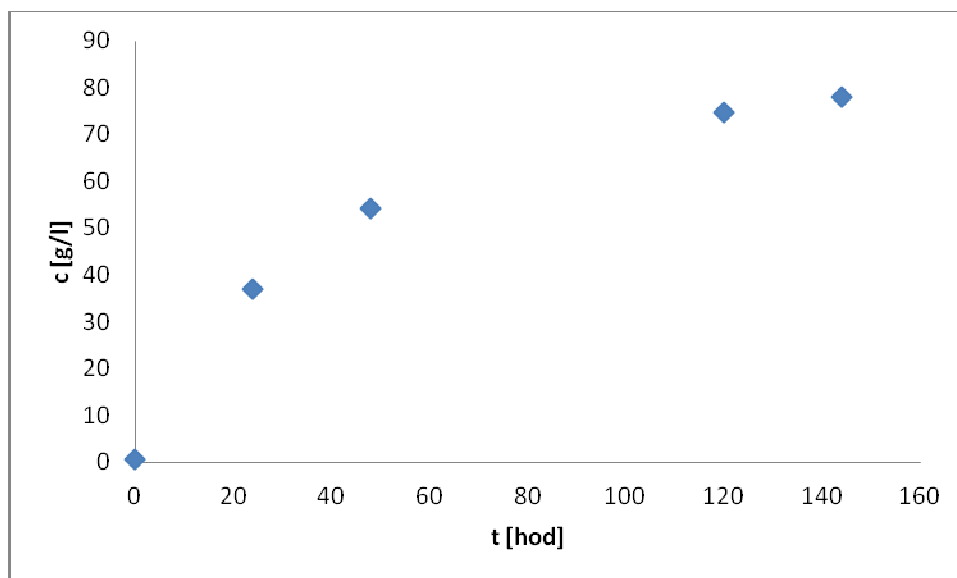
Tabulka 29: Podmínky použité při hydrolýze papíru po dobu 144 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	12	150	citrát-fosforečnanový pufr	5	50	180

Tabulka 30: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	2
	V _{enzym} [ml]	0,209
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,2
	V _{enzym} [ml]	0,020

Graf 29: Změna obsahu glukózy během hydrolýzy



Hydrolyzát obsahoval po 144 hodinách hydrolýzy 77,978 g/l glukózy. Následovala jeho úprava, která je popsána v kapitole 3.5.

Z grafů je patrné, že enzymy Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit hydrolyzují papír za daných podmínek podstatně rychleji než enzymy Novozymes® Biomass Kit a to při použití nižší koncentrace enzymů.

4.4.2 Fermentace

Byla provedena fermentace hydrolyzátů, pokusy byly prováděny s kmeny *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457.

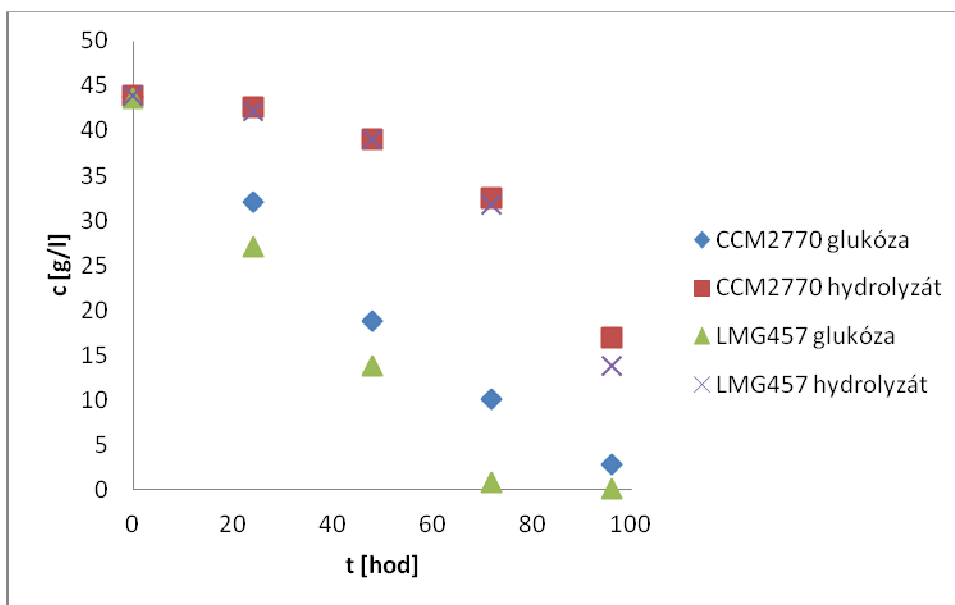
Hydrolyzát Novozymes® Biomass Kit

Pokus probíhal po dobu 96 hodin v termostatu při podmínkách, které jsou uvedeny v tabulce 31. Jako médium byl použit hydrolyzát získaný z předchozí hydrolýzy a srovnávací médium (citrát-fosforečnanový pufr s glukózou). Množství glukózy bylo vypočítáno tak, aby se shodovalo v obou médiích, která byla následně doživena dle návodu v kapitole 3.2.2. Zaočkováno bylo na výslednou koncentraci 10 % obj., viz. kapitola 3.6.

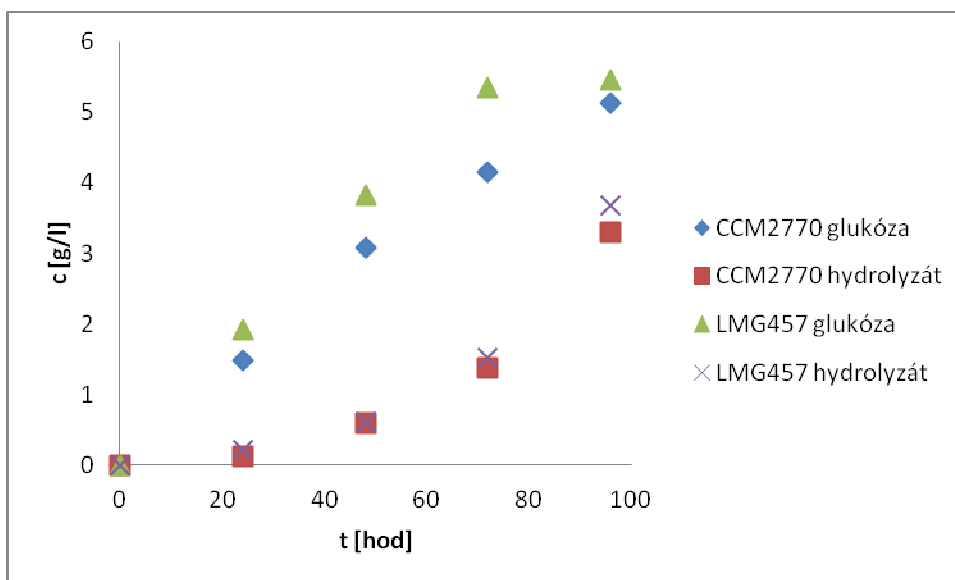
Tabulka 31: Podmínky použité při fermentaci

V_{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
50	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	30	žádné

Graf 30: Obsah glukózy v médiu během fermentace



Graf 31: Obsah etanolu v médiu během fermentace



Tabulka 32: Relativní změna koncentrace glukózy a etanolu při fermentaci

	Substrát	Snížení C_{GLU} [g/l]	Relativní snížení C_{GLU} [%]	Zvýšení C_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení C_{EtOH} [%]
<i>Zymomonas mobilis</i> CCM2770	glukóza	40,81	93,7	5,13	94,0
	hydrolyzát	26,91	61,8	3,30	60,4
<i>Zymomonas mobilis</i> LMG457	glukóza	43,54	100,0	5,46	100,0
	hydrolyzát	30,03	69,0	3,68	67,4

Srovnávací média obsahovala větší množství etanolu než doživené hydrolyzáty, což signalizuje možnou přítomnost inhibitoru vzniklého během hydrolyzy papíru.

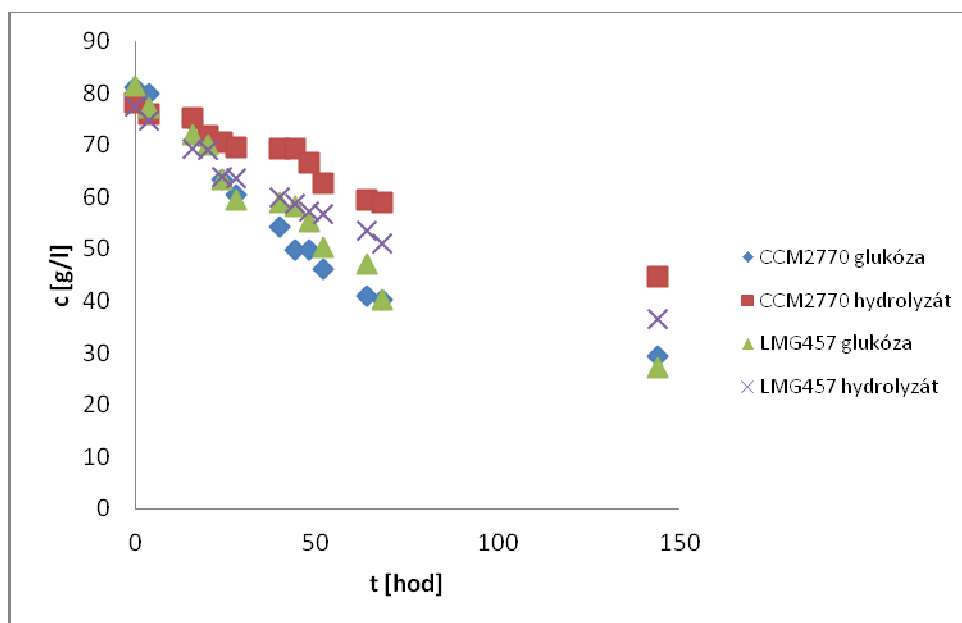
Hydrolyzát Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

Byla provedena fermentace hydrolyzátu, pokus probíhal po dobu 144 hodin v termostatu při podmínkách, které jsou uvedeny v tabulce 33. Jako médium byl použit hydrolyzát získaný z předchozí hydrolyzy a srovnávací médium (citrát-fosforečnanový pufr s glukózou). Množství glukózy bylo vypočítáno tak, aby se shodovalo v obou médiích, která byla následně doživena dle návodu v kapitole 3.2.2. Zaočkováno bylo na výslednou koncentraci 10 % obj., viz. kapitola 3.6.

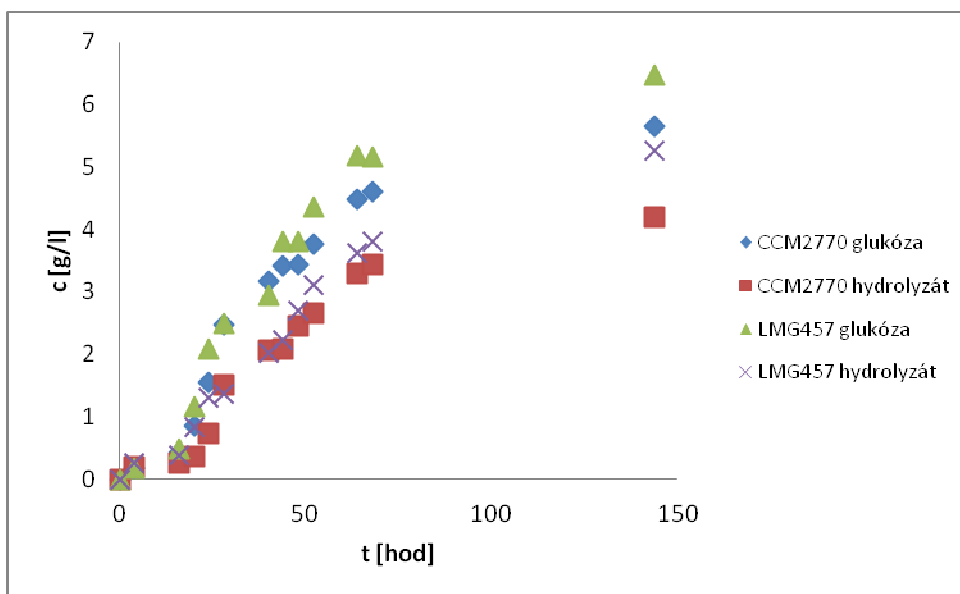
Tabulka 33: Podmínky použité při fermentaci

V_{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
50	citrát-fosforečnanový pufr	5,5	30	žádné

Graf 32: Obsah glukózy v médiu během fermentace



Graf 33: Obsah etanolu v médiu během fermentace



Tabulka 34: Relativní změna koncentrace glukózy a etanolu při fermentaci

	Substrát	Snížení C_{GLU} [g/l]	Relativní snížení C_{GLU} [%]	Zvýšení C_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení C_{EtOH} [%]
<i>Zymomonas mobilis</i> CCM2770	glukóza	51,87	95,7	5,65	87,4
	hydrolyzát	33,70	62,2	4,20	65,0
<i>Zymomonas mobilis</i> LMG457	glukóza	54,18	100,0	6,46	100,0
	hydrolyzát	41,14	75,9	5,27	81,5

Srovnávací média obsahovala větší množství etanolu než doživené hydrolyzáty, což signalizuje možnou přítomnost inhibitoru vzniklého během hydrolyzy papíru.

4.4.3 Simultánní hydrolýza a fermentace

Byla provedena simultánní hydrolýza a fermentace, pokusy byly prováděny s kmeny *Zymomonas mobilis* CCM2770 a *Zymomonas mobilis* LMG457.

Novozymes® Biomass Kit

Pokus byl prováděn po dobu 96 hodin v termostatu. Procesní podmínky jsou popsány v tabulce 35 a dávkování enzymu v tabulce 36. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1. Do média byly přidány živiny dle kapitoly 3.2.2. Zaočkováno bylo na výslednou koncentraci 10 % obj., viz. kapitola 3.6.

Ve 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC. Získaná data jsou uvedena v grafech 34 a 35. Relativní množství přírůstků koncentrace glukózy a etanolu v závislosti na množství použitých enzymů vztažené ke vzorku s největším přírůstkem je shrnuto v tabulce 37.

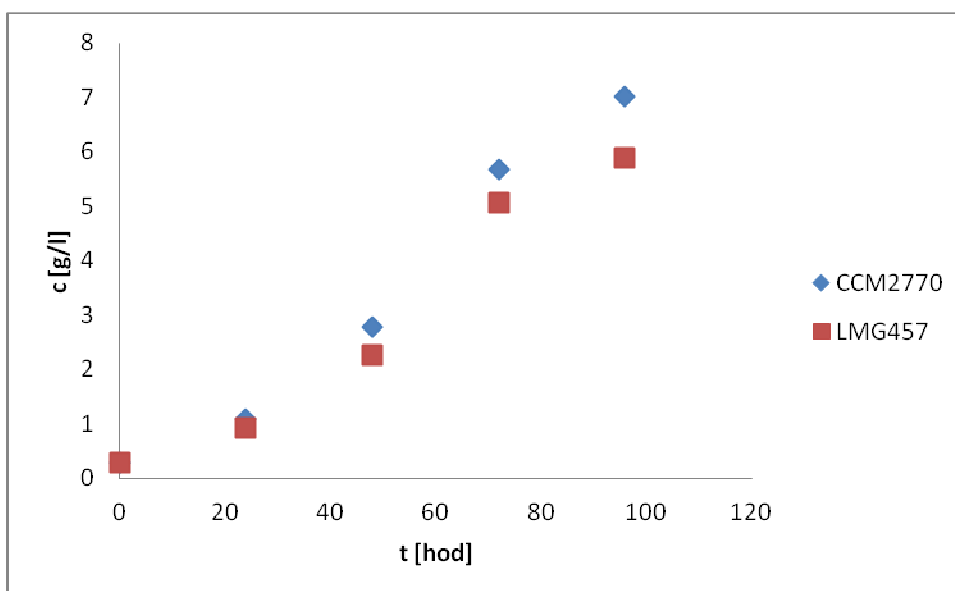
Tabulka 35: Podmínky použité při SSF po dobu 96 hodin

CS [% w/v]	m _{substrát} [g]	V _{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	citrát-fosforečnanový pufr	4,8	30	žádné

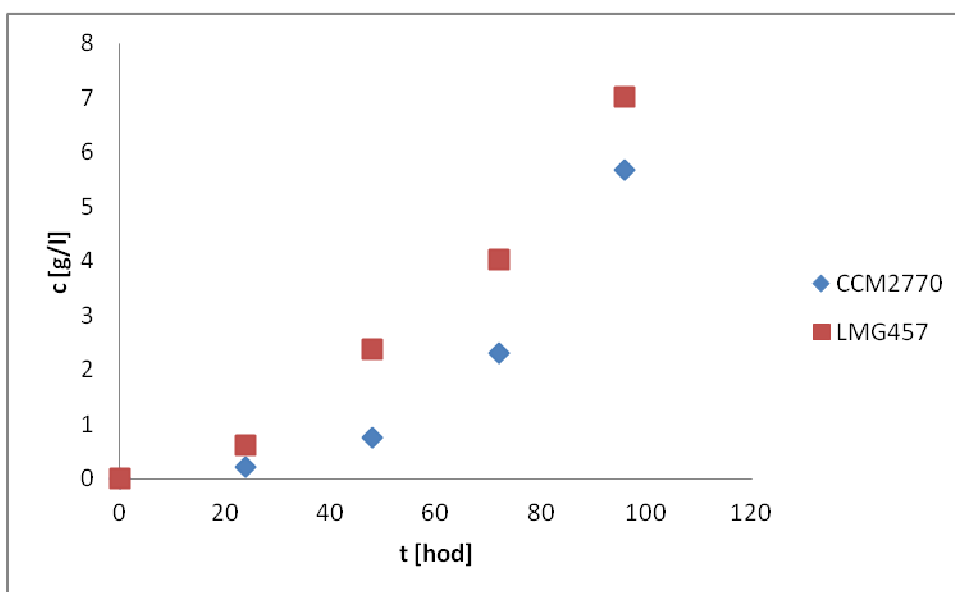
Tabulka 36: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	6
	V _{enzym} [ml]	0,200
β-glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,6
	V _{enzym} [ml]	0,020

Graf 34: Obsah glukózy v médiu během SSF



Graf 35: Obsah etanolu v médiu během SSF



Tabulka 37: Relativní změna koncentrace glukózy a etanolu při SSF

<i>Zymomonas mobilis</i>	Zvýšení C_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení C_{GLU} [%]	Zvýšení C_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení C_{EtOH} [%]
CCM2770	6,74	100,0	5,68	100,0
LMG457	5,61	83,3	7,01	47,4

Tabulka 38: Experimentální výtěžek glukózy ze SSF

<i>Zymomonas mobilis</i>	$m_{\text{GLU z EtOH}}$ vypočtená [g]	C_{GLU} z média [g/l]	m_{GLU} celková [g]	$m_{\text{celulóza}}$ [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
CCM2770	44,42	6,74	51,16	80,00	88,89	57,56
LMG457	54,83	5,61	60,45	80,00	88,89	68,00

Celkový výtěžek glukózy z kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457 obsahoval větší množství glukózy, přestože obsah glukózy z média byl nižší než u kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770. Z toho můžeme usuzovat, že s rychlejší utilizací glukózy roste i rychlost hydrolýzy.

Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

Pokus byl prováděn po dobu 144 hodin v termostatu. Procesní podmínky jsou popsány v tabulce 39 a dávkování enzymu v tabulce 40. Jako médium byl použit citrát-fosforečnanový pufr připravený dle návodu, viz. kapitola 3.2.1. Do média byly přidány živiny dle kapitoly 3.2.2. Zaočkováno bylo na výslednou koncentraci 10 % obj., viz. kapitola 3.6.

Ve 24 hodinových intervalech byly odebírány vzorky pro HPLC. Získaná data jsou uvedena v grafech 36 a 37. Relativní množství přírůstku koncentrace glukózy a etanolu v závislosti na množství použitých enzymů vztažené ke vzorku s největším přírůstkem je shrnuto v tabulce 41.

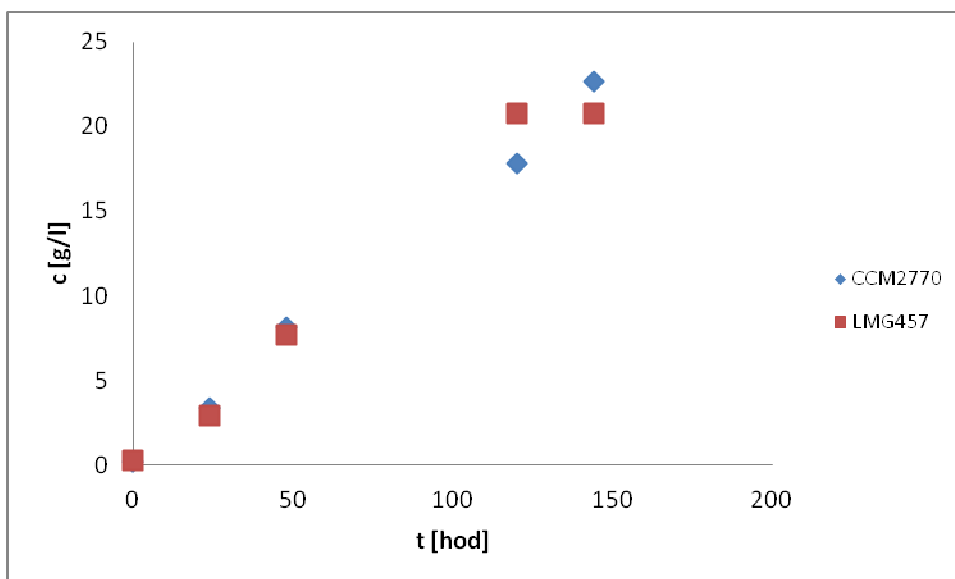
Tabulka 39: Podmínky použité při SSF po dobu 144 hodin

CS [% w/v]	$m_{\text{substrát}}$ [g]	V_{pufr} [ml]	tlumivý roztok	pH	t [°C]	míchání [ot/min]
8	4	50	citrát-fosforečnanový pufr	5,5	30	žádné

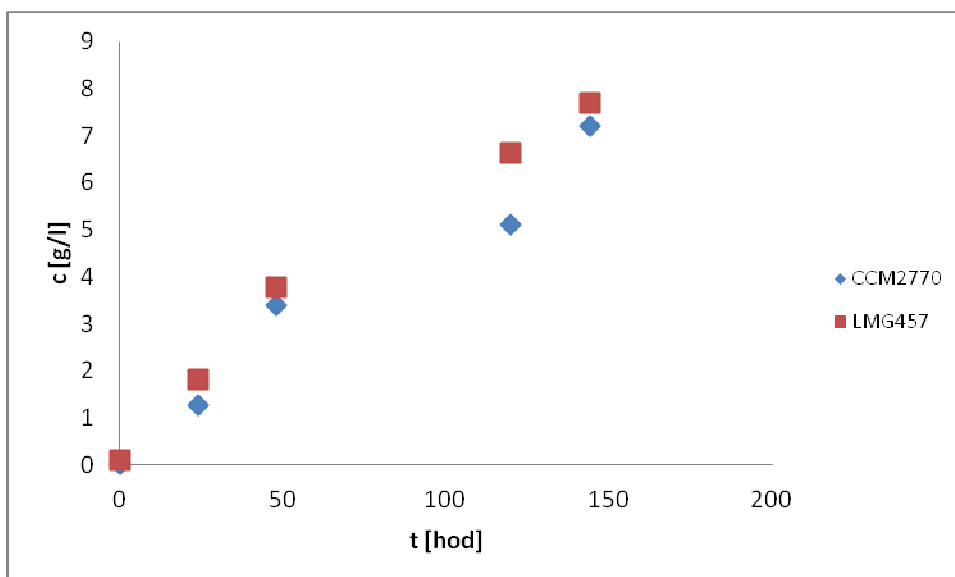
Tabulka 40: Použité dávkování enzymů

celulázový komplex	dávkování enzymu [% w/w na TS]	2
	V_{enzym} [ml]	0,070
β -glukozidáza	dávkování enzymu [% w/w na TS]	0,2
	V_{enzym} [ml]	0,007

Graf 36: Obsah glukózy v médiu během SSF



Graf 37: Obsah etanolu v médiu během SSF



Tabulka 41: Relativní změna koncentrace glukózy a etanolu při SSF

<i>Zymomonas mobilis</i>	Zvýšení c_{GLU} [g/l]	Relativní zvýšení c_{GLU} [%]	Zvýšení c_{EtOH} [g/l]	Relativní zvýšení c_{EtOH} [%]
CCM2770	22,46	100,0	7,20	93,4
LMG457	20,53	91,4	7,71	100,0

Tabulka 42: Experimentální výtěžek glukózy ze SSF

<i>Zymomonas mobilis</i>	m _{GLU} z EtOH vypočtená [g]	c _{GLU} z média [g/l]	m _{GLU} celková [g]	m _{celulóza} [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
CCM2770	56,31	22,46	78,77	80,00	88,89	88,62
LMG457	60,27	20,53	80,80	80,00	88,89	90,90

Celkový výtěžek glukózy z kultivace *Zymomonas mobilis* LMG457 obsahoval větší množství glukózy, přestože obsah glukózy z média byl nižší než u kultivace *Zymomonas mobilis* CCM2770. Z toho můžeme usuzovat, že s rychlejší utilizací glukózy roste i rychlost hydrolýzy.

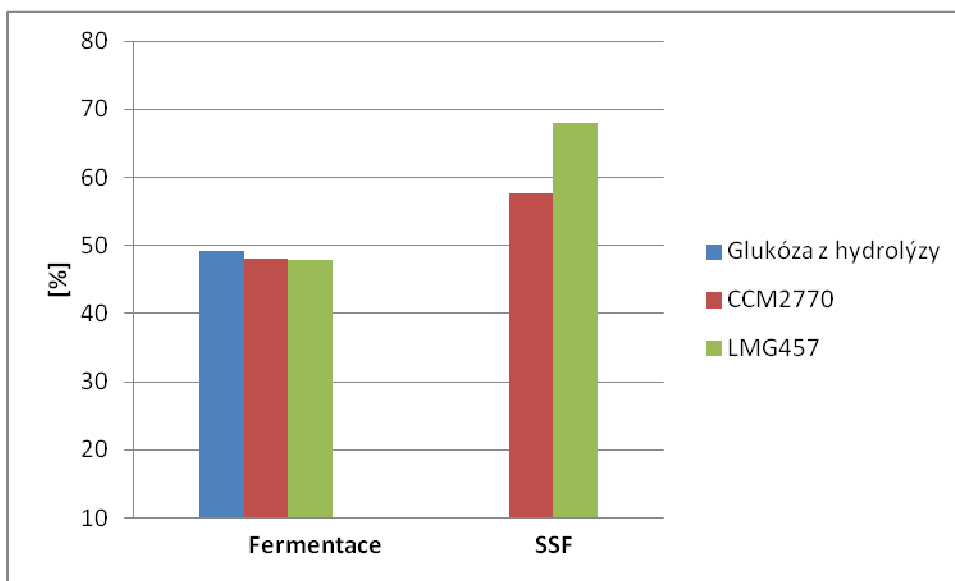
4.4.4 Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Biomass Kit

Z navážky papíru (celulózy) bylo vypočítáno teoretické množství vzniklé glukózy. Ze známých koncentrací etanolu bylo zpětně vypočítáno množství glukózy nutné na přeměnu, toto množství bylo přičteno ke glukóze, která zůstala v médiu. Celkové množství glukózy bylo porovnáno s teoretickým množstvím glukózy a získán experimentální výtěžek glukózy.

Tabulka 43: Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Biomass Kit v čase 94 hodin

	c _{EtOH} [g/l]	m _{GLU} z EtOH vypočtená [g]	c _{GLU} z média [g/l]	m _{GLU} celková [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
Hydrolýza			43,77	43,77	88,89	49,24
Fermentace CCM2770	3,30	25,81	16,95	42,76	88,89	48,11
LMG457	3,68	28,78	13,79	42,57	88,89	47,89
SSF CCM2770	5,68	44,42	6,74	51,16	88,89	57,56
LMG457	7,01	54,83	5,61	60,44	88,89	67,99
hmotnost složek je uvedena v objemu 1 l						

Graf 38: Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Biomass Kit v čase 94 hodin



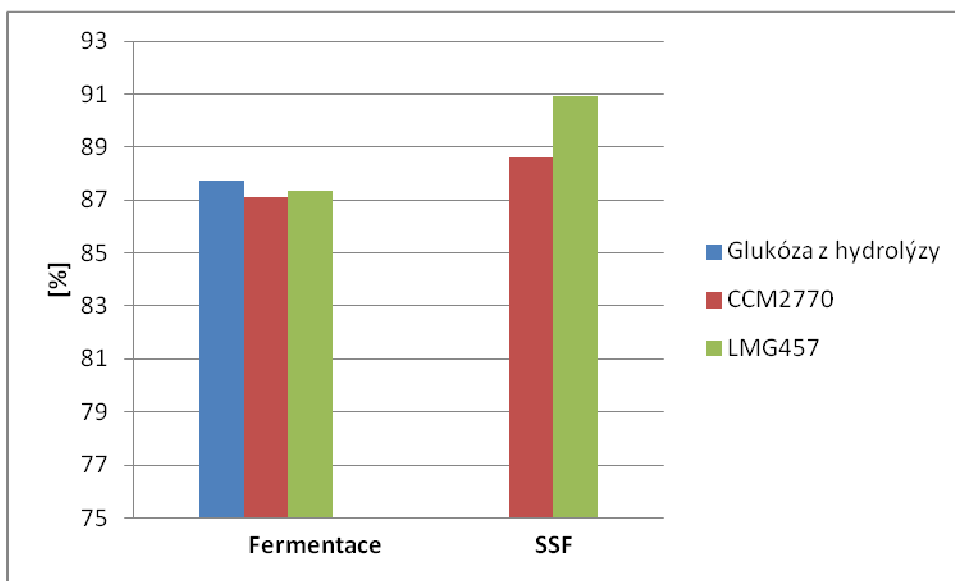
Výsledky jasně ukazují výhodnost SSF procesu, nejen, že během tohoto procesu vzniklo větší množství etanolu, ale také za poloviční čas. Kmen *Zymomonas mobilis* LMG457 se projevil jako vhodnější producent z důvodu vyšších výtěžků etanolu.

4.4.5 Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit

Tabulka 44: Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit v čase 144 hodin

		C _{EtOH} [g/l]	m _{GLU} z EtOH vypočtená [g]	C _{GLU} z média [g/l]	m _{GLU} celková [g]	Teoretický výtěžek GLU [g]	Exp. výtěžek GLU [%]
Hydrolýza				77,98	77,98	88,89	87,73
Fermentace	CCM2770	4,20	32,85	44,60	77,45	88,89	87,13
	LMG457	5,27	41,22	36,42	77,64	88,89	87,34
SSF	CCM2770	7,20	56,31	22,46	78,77	88,89	88,62
	LMG457	7,71	60,30	20,53	80,83	88,89	90,94
hmotnost složek je uvedena v objemu 1 l							

Graf 39: Porovnání výtěžku enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace při použití Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit v čase 144 hodin



Rovněž při použití enzymů Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit ukazují výsledky výhodnost SSF procesu. Kmen *Zymomonas mobilis* LMG457 se projevil jako vhodnější producent z důvodu vyšších výtěžků etanolu.

Obsah glukózy při použití enzymů Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit byl vyšší než u hydrolyzátu enzymů Novozymes® Biomass Kit. Jelikož byly podmínky upraveny rozdílně, vždy nejvhodněji pro každý druh enzymů, média doživena stejně dle kapitoly 3.2.2, zaočkování proběhlo rovněž na stejnou výslednou koncentraci, nezbývá než konstatovat, že enzymy Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit hydrolyzují papír rychleji než Novozymes® Biomass Kit a jsou tedy vhodnější pro další použití.

Vzhledem k nedokonalostem aparatury, mohlo během experimentů dojít k odpařování etanolu, jelikož kultivace probíhaly při teplotě 30 °C a v dlouhých časových intervalech.

Srovnání procesů SHF a SSF není přímo možné, jelikož v procesu SHF je sledováno množství glukózy v procesu SSF je vzniklá glukóza ihned přeměňována na etanol (účinnost není přesně známa). Část etanolu mohla vytékat během kultivace. Dále byla zavedena aproximace, že etanol vznikal pouze z glukózy a to se 100% účinností. V důsledku těchto faktorů jsou získané výsledky pouze orientačního charakteru.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vhodnost a rozsah použitelnosti bakterie *Zymomonas mobilis* při průmyslové výrobě bioetanolu z odpadního papíru.

Byly testovány dva kmeny *Zymomonas mobilis* CCM2770 (na sacharóze levan produkující kmen) a *Zymomonas mobilis* LMG457 (levan neprodukující kmen). Rovněž byly testovány dva druhy balíčků enzymů firmy Novozymes®. Balíček Novozymes® Biomass Kit, ze kterého byly testovány preparáty NS50013 (celulázový komplex) a NS50010 (β-glukozidáza), s balíčkem Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit, ze kterého byly testovány preparáty NS22086 (celulázový komplex) a NS22118 (β-glukozidáza).

V rámci maximalizace efektivity procesu, byla provedena optimalizace parametrů hydrolýzy, fermentace a simultánní sacharifikace a fermentace. Experimenty byly prováděny na papíru s vysokým obsahem celulózy a pro srovnání také na standardním médiu obsahujícím glukózu. Optimalizovány byly parametry: druh pufru, množství buněk, enzymů a substrátu.

V závislosti na vitalitě buněk byl shledán nejvhodnějším 0,1M citrát-fosforečnanový pufr, který rovněž vykazoval během hydrolýzy největší výtěžky glukózy, tudíž nejvyšší aktivitu enzymů.

Experimenty, při kterých bylo zkoumáno optimální množství buněk *Zymomonas mobilis*, ukázaly, že přírůstky etanolu byly vyšší při zaočkování větším množstvím buněk. Nejvyšší koncentrace etanolu 8,47 g/l bylo dosaženo při zaočkování suspenzí buněk na výslednou koncentraci 10 % obj.

Během optimalizace množství enzymů Novozymes® Biomass Kit bylo nejvyššího výtěžku dosaženo při koncentraci 10 % w/w vztaženo na množství substrátu, výsledný obsah glukózy v médiu po 96 hodinách hydrolýzy byl 49,69 g/l. Nejvyššího výtěžku při optimalizaci množství enzymů Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit bylo dosaženo při koncentraci 5 % w/w vztaženo na množství substrátu, výsledný obsah glukózy v médiu po 168 hodinách SSF byl 22,12 g/l a obsah etanolu 8,47 g/l.

Byla provedena optimalizace množství substrátu v produkčním médiu. Nejvyšší koncentrace glukózy 44,66 g/l bylo dosaženo při dávkování 12 % w/v vztaženo na objem média po 72 hodinách hydrolýzy.

Po optimalizaci parametrů následovalo porovnání enzymatické hydrolýzy a simultánní hydrolýzy a fermentace. Nejlepších výsledků bylo dosaženo v procesech SSF s bakteriemi *Zymomonas mobilis* LMG457. Při použití enzymů Novozymes® Biomass Kit byl výtěžek etanolu 7,01 g/l po 96 hodinách. S balíčkem enzymů Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit byl výtěžek etanolu 7,71 g/l po 144 hodinách kultivace. Výsledky ze srovnávacích měření při použití standardních médií vždy vykazovaly vyšší výtěžky etanolu, což bylo nejspíš zapříčiněno přítomností inhibičních látek v papíru.

Nejen, že metodou SSF bylo docíleno vyšších výtěžků etanolu než u SHF, ale dalším podstatným kritériem je i doba celého procesu, která je u SSF poloviční. Při použití enzymů Novozymes® Biomass Kit samotná hydrolýza probíhala 96 hodin a experimentální výtěžek glukózy byl 49,24 %. U procesu SSF, který probíhal stejnou dobu, byl experimentální výtěžek glukózy 67,99 %. S použitím Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit samotná hydrolýza

probíhala 144 hodin a experimentální výtěžek glukózy byl 87,73 %. U procesu SSF, který probíhal stejnou dobu, byl experimentální výtěžek glukózy 90,94 %.

Jednotlivé balíčky enzymů můžeme navzájem nejlépe porovnat při samotné hydrolýze, kdy v čase 96 hodin, hydrolyzát Novozymes® Biomass Kit obsahoval 43,77 g/l glukózy, zatímco hydrolyzát Novozymes® Cellulosic ethanol enzyme Kit ve stejném čase přibližně 70 g/l (odečteno z grafu).

Ze zjištěných výsledků je patrné, že bakterie *Zymomonas mobilis* se jeví jako vhodná alternativa k výrobě bioetanolu z odpadního papíru. Do množství získaného etanolu se promítalo složení kultivačního média, přítomnost živin a koncentrace glukózy. Nepodařilo se sehrát množství enzymů s množstvím buněk tak, aby ihned docházelo k utilizaci vytvořené glukózy. Produkce etanolu se zpomalila při nižším množství etanolu v médiu, naopak při nadbytku glukózy byl etanol produkován rychleji.

Díky tomu, že má jako bakterie rychlejší metabolismus, je i proces vzniku etanolu mnohem rychlejší, proto mají *Zymomonas mobilis* velký potenciál pro průmyslovou výrobu a zvýšení produkce bioetanolu. Do budoucna je třeba se také zabývat selekcí vhodných kmenů, které budou schopny zkvašovat širší spektrum sacharidů. Genové manipulace otvírají obrovské množství možností využití tohoto kmene.

Všechny experimenty probíhaly v laboratorních podmínkách, které nebyly pro anaerobní kultivace dokonalé. Teplota i délka procesů se jistě podepsaly na ztrátách etanolu vlivem odpařování. V dalším kroku by jistě bylo vhodné ověřit poznatky získané z této práce za použití reaktoru, který by zajistil lepší kontrolu anaerobních podmínek, zamezil úniku etanolu a zefektivnil míchání. V navazujících experimentech by měly být zkoumány i termofilní kultury, které umožní zvýšení teploty, tím nastaví vhodnější podmínky pro enzymy a zefektivní hydrolýzu.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KODÍČEK, M. *enzymy*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-02-28]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=enzymy>
- [2] KODÍČEK, M. *hydrolysa*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-02-28]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=hydrolysa>
- [3] KODÍČEK, M. *fermentace*. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-02-28]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=fermentace>
- [4] HORVÁTHOVÁ, V., et al. HYDROLÝZA KUKUŘIČNÉHO ŠKROBU REKOMBINANTNOU α -AMYLÁZOU Z THERMOCOCCUS HYDROTHERMALIS. *Nová Biotechnologica* [online]. 2004 [cit. 2012-03-06]. Dostupný z WWW: <www.chtf.stuba.sk>
- [5] ŠULÁK, M., ŠMOGROVIČOVÁ, D.: Bioetanol: současné trendy vo výzkume a v praxi. *Chem. Listy*
- [6] Ďurovič M. a kol.: Restaurování a konzervování archiválií a knih. PASEKA. 2002.
- [7] Gray K. A., Zhao L., Emptage M.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10, 141 (2006).
- [8] Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladisch M.: *Bioresour. Technol.* 96, 673 (2005).
- [9] Mosier N., Wyman C., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladisch M.: *Bioresour. Technol.* 96, 673 (2005).
- [10] Dien B. S., Cotta M. A., Jeffries T. W.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 258 (2003).
- [11] Bothast R. J., Schlicher M. A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 19 (2005).
- [12] Verbelen P. J., De Schutter D. P., Delvaux F., Verstrepen K. J., Delvaux F. R.: *Biotechnol. Lett.* 28, 1515 (2006).
- [13] Jeffries T. W.: *Nat. Biotechnol.* 23, 40 (2005).
- [14] van Maris A. J., Abbott D. A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Luttik M. A., Wisselink H. W., Scheffers W. A., van Dijken J. P., Pronk J. T.: *Antonie Van Leeuwenhoek.* 90, 391 (2006).
- [15] Jeffries T. W.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 320 (2006).
- [16] Jeffries T. W., Jin Y.-S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 495 (2004).
- [17] Hahn-Hagerdal B., Linden T., Senac T., Skoog K.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28-29, 131 (1991).
- [18] HORVÁTHOVÁ, V., ŠTURDÍK, E., JANEČEK, Š.: Stabilita, stabilizácia a aplikácia amyláz. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 40, 2001, s. 1-20.
- [19] HORVÁTHOVÁ, V., JANEČEK, Š., ŠTURDÍK, E.: Amylolytic enzymes: their specificities, origins and properties. *Biologia* 55, 2000, s. 603-613.

- [20] LEISOLA, M., JOKELA, J., PASTINEN, O., TURUNEN, O., SCHOEMAKER, H.: Industrial use of enzymes. http://www.hut.fi/Units/BioprocessEngineering/Kem-70.415/INDUSTRIAL_USE_OF_ENZYMES.DOC, 05.11.2004.
- [21] CELJAK, Ivo: Biomasa je nezbytná součást lidského života. *Biom.cz* [online]. 2008-12-22 [cit. 2012-02-15]. Dostupné z WWW: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/biomasa-je-nezbytna-soucast-lidskeho-zivota?sel_ids=1&ids>. ISSN: 1801-2655.
- [22] PAULOVÁ, L., et al. VYUŽITÍ ODPADNÍCH MATERIÁLŮ NA BÁZI LIGNOCELULÓZY JAKO SUROVINY PRO VÝROBU BIOETANOLU. *CHEMAGAZÍN* [online]. 2010, 20, 5 [cit. 2012-03-08]. Dostupný z WWW: <www.chemagazin.cz>
- [23] HAMELINCK C.N., HOOIJDONK G., FAAIJ A.: Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* 28, 384–410, 2005.
- [24] ŠIMKO, P.: Balení potravin - přednášky . [online]. VUT Brno, 2011. [cit. 12.3.2012]. Dostupné z WWW: <<https://www.vutbr.cz/elearning/>>.
- [25] University of Miami, Department of biology [online]. 2010 [cit. 2012-03-28]. The Plant Cell is Special. Dostupné z WWW: <http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F09_3.html>.
- [26] iGem [online]. 2008 [cit. 2012-03-28]. Team:Wisconsin/Project. Dostupné z WWW: <<http://2008.igem.org/Team:Wisconsin/Project>>.
- [27] OLSSON, L.; HAHNHAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY* [online]. 1996, 18, 5, [cit. 2012-03-28]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>. ISSN 0141-0229.
- [28] SANCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *BIOTECHNOLOGY ADVANCES* [online]. 2009, 27, 2, [cit. 2012-03-28]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>. ISSN 0734-9750.
- [29] LEPAŘ, P. Enzymatická hydrolýza odpadní papíroviny – zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 77 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Petr Gabriel.
- [30] Biotechnology: A multi volume comprehensive treatise. Ed. by H.-J. Rehm and G. Reed. 2nd completely rev. edition. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH, 1996. 739 s. ISBN 3-527-28310-2.
- [31] DOHÁNYOS, Michal. Česká bioplynová asociace [online]. - [cit. 2012-04-9]. Teoretické základy anaerobní fermentace. Dostupné z WWW: <www.czba.cz>.
- [32] Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B. H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C. A., Frederick W-J. Jr., Hallett J. P., Leak D. J., Liotta C. L., Mielenz J. R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T.: *Science*. 311, 484 (2006).
- [33] Pimentel D., Patzek T., Cecil G.: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 189, 25 (2007).
- [34] PRASAD S., SINGH A., JOSHI H.C.: *Ethanol as an alternative fuel from agricultural industrial and urban residues*. *Resources, Conservation and Recycling* 50, 1–39, 2007.

- [35] Kokrhelová, K., Jirout, T. Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv. STČ [online]. 2008 [cit. 2012-04-16]. Dostupný z WWW: <http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf>.
- [36] Nature.com [online]. 2008 [cit. 2012-04-16]. Structure of lignocellulose. Dostupné z WWW: <www.nature.com>.
- [37] Biotechnology: A multi volume comprehensive treatise. Ed. by H.-J. Rehm and G. Reed. 2nd completely rev. edition. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo : VCH, 1996. 739 s. ISBN 3-527-28310-2.
- [38] GIORNO, L., DRIOLI, E.: Biocatalytic membranereactors: applications and perspectives. *Tibtechnology* 18, 2000, s. 339-349. GODFREY, T., WEST, S.: *Industrial Enzymology*. The Macmillan Press Ltd, London, 1996, 609 s.
- [39] TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* [online]. 2008, 9, 9, [cit. 2012-04-16]. Dostupný z WWW: <apps.isiknowledge.com>. ISSN 1422-0067.
- [40] *Biofuels Journal* [online]. 2005 [cit. 2012-04-16]. Novozymes and NREL Reduce Enzyme Cost for Biomass to Ethanol Conversion. Dostupné z WWW: <http://www.biofuelsjournal.com/articles/novozymes_and_nrel_reduce_enzyme_cost_for_biomass_to_ethanol_conversion-26004.html>.
- [41] PAULOVÁ, L., et al. MOŽNOSTI PRODUKCE BIOETANOLU Z FYTOMASY A ODPADNÍCH MATERIÁLŮ NA BÁZI CELULÓZY. *CHEMAGAZÍN* [online]. 2011, 21, 5 [cit. 2012-04-16]. Dostupný z WWW: <www.chemagazin.cz>.
- [42] ELNAWAWY A. S., et al.: Effect of carboard delignification on the production of protein-enriched fermented foyer in submerged cultures. *Resources, Conservation and Recycling* 11, 101–110, 1994.
- [43] YÁNEZ R., ALONSO J. L., PARAJO J.C.: Production of hemicellulosic sugars and glukose from residual corrugated carboard. *Process Biochemistry* 39, 1543–1551, 2004.
- [44] Novozymes® . Novozymes® biomass kit : Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.
- [45] Novozymes® . Novozymes® cellulosic ethanol enzyme kit : Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.
- [46] Motorová paliva a biopaliva. PRAŽÁK, Václav. *Česká rafinérská* [online]. 2008 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: <http://www.crc.cz/cz/index.aspx>
- [47] Nařízení vlády, kterým se stanoví emisní limity a další podmínky provozování spalovacích stacionárních zdrojů znečišťování ovzduší. In: 352/2002. 2002.
- [48] DELGENES, J., J. LAPLACE, R. MOLETTA a J. NAVARRO. Comparative study of separated fermentations and cofermentation processes to produce ethanol from hardwood derived hydrolysates. *BIOMASS & BIOENERGY*. 1996, č. 11, s. 353-360.
- [49] LAU, M., Ch. GUNAWAN, V. BALAN a B. DALE. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) and

- Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS*. 2010, č. 3.
- [50] FRANDEN, M., P. PIENKOS a M. ZHANG. Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. 2009, č. 144, s. 259-267.
 - [51] FRANCO, H., et al.: DILUTED ACID PRETREATMENT OF PINUS RADIATA FOR BIOETHANOL PRODUCTION USING IMMOBILIZED SACCHAROMYCES CEREVISIAE IR2-9 IN A SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND FERMENTATION PROCESS. *JOURNAL OF THE CHILEAN CHEMICAL SOCIETY*. 2011, č. 56, s. 901-906.
 - [52] ABRIL, D. a A. ABRIL. Ethanol from lignocellulosic biomass. *CIENCIA E INVESTIGACION AGRARIA*. 2009, č. 36, s. 177-189.
 - [53] ROGERS, P., E. JOACHIMSTHAL a K. HAGGETT. Ethanol from lignocellulosics: Potential for a *Zymomonas*-based process. *AUSTRALASIAN BIOTECHNOLOGY*. 1997, č. 7, s. 304-309.
 - [54] KRISHNAN, M., et al.: Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5). *APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*. 2000, 84-6, s. 525-541.
 - [55] BRETHAUER, S. a Ch. WYMAN. Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *BIORESOURCE TECHNOLOGY*. 2010, č. 101, s. 4862-4874.
 - [56] CHANDRAKANT, P. a V. BISARIA. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. *CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY*. 1998, č. 18, s. 295-331.
 - [57] WEBER, Ch., et al.: Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2010, č. 87, s. 1303-1315.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

c – koncentrace

CBU – cellobiase unit – celobiózová jednotka

EGU – endo-glucanase unit – endoglukanázová jednotka

EtOH – etanol

FCH VUT – Fakulta chemická, Vysoké učení technické

FPU – filter paper unit

GLU – glukóza

HPLC – vysokotlaká kapalinová chromatografie

m – hmotnost

OD – optická denzita

ot/min – otáčky za minutu

p.a. – pro analysi (lat.) – označení chemikálií k analytickým účelům

RI – refraktometrický detektor

SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation, hydrolýza substrátu v samostatném kroku před vlastním zakvašením zářary, oddělená hydrolýza a fermentace

SSF – Simultaneous Sacharification and Fermentation, simultánní sacharifikace a fermentace

SSCF – Simultaneous Sacharification and Co-Fermentation, simultánní sacharifikace a kofermentace

TS – total solids – souhrn tuhých částic

UV – ultrafialová oblast

V – objem

% obj. – objemových %

% v/v – objemových % na objemová %

% w/v – hmotnostních % na objemová %

% w/w – hmotnostních % na hmotnostní %