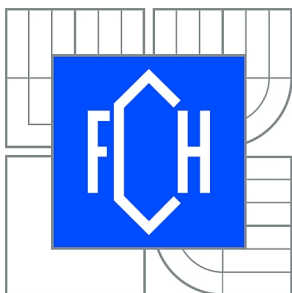


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VYUŽITÍ ZYMOMONAS MOBILIS PRO PRODUKCI BIOETHANOLU Z CELULÓZOVÝCH MATERIÁLŮ

APPLICATION OF ZYMOMONAS MOBILIS FOR BIOETHANOL PRODUCTION FROM
CELLULOSE MATERIALS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

IVETA ČALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0643/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Iveta Čalová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Využití *Zymomonas mobilis* pro produkci bioethanolu z celulóзовých materiálů

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše současného stavu řešené problematiky
2. Provedení několika kultur na vybraných celulozových materiálech s optimalizací produkce biolihi
3. Využití separačních metod k analýze ethanolu.
4. Zhodnocení výsledků

Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

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

Iveta Čalová
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bakalářská práce pojednává o využití *Zymomonas mobilis* pro produkci bioethanolu z odpadního papíru. Byly použity tři druhy papíru od různých výrobců za účelem optimalizace produkce bioethanolu. Jednotlivé papíry byly podrobeny stejným úpravám, a to mechanickému rozmělnění a následně enzymatické hydrolýze. Během kultivace *Zymomonas mobilis* v jednotlivých hydrolyzátech byly odebírány vzorky pro stanovení produkce bioethanolu. Analýza probíhala na vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Vyhodnocena byla produkce bioethanolu, spotřeba glukózy a také produkce kyseliny mléčné, která byla na chromatogramech znatelná.

ABSTRACT

The thesis deals with the use of *Zymomonas mobilis* to produce bioethanol from waste paper. There were used three types of paper made by various manufacturers to optimize the production of bioethanol. Individual papers were subjected to the same adjustments namely mechanical grinding and subsequent enzymatic hydrolysis. During cultivation of *Zymomonas mobilis* in different hydrolysates were taken samples for determination of bioethanol production. The analysis was carried out on high-performance liquid chromatography. Production of bioethanol and glucose consumption was evaluated as well as production of lactic acid since it was also noticeable on the chromatograms.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bioethanol, *Zymomonas mobilis*, celulózový materiál, enzymy, hydrolýza.

KEYWORDS

Bioethanol, *Zymomonas mobilis*, cellulosic material, enzymes, hydrolysis.

ČALOVÁ, Iveta. *Využití Zymomonas mobilis pro produkci bioethanolu z celulózových materiálů*. Brno, 2012. Bakalářská práce. VUT v Brně, FCH.
Vedoucí práce Ing. Libor Babák, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

Ráda bych tímto poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Liboru Babákovi, Ph.D za vedení, odborné rady, čas a pomoc při vypracování této práce.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Klíčová slova a základní pojmy.....	8
2.1.1	Bioethanol	8
2.1.2	<i>Zymomonas mobilis</i>	8
2.1.3	Celulózový materiál	8
2.1.4	Enzymy	8
2.1.5	Hydrolýza	8
2.2	Bioethanol	8
2.3	Suroviny pro výrobu bioethanolu	8
2.4	Předúprava surovin	10
2.4.1	Fyzikální metody.....	10
2.4.2	Fyzikálně-chemické metody.....	11
2.4.3	Chemické metody.....	11
2.4.4	Biologické metody.....	12
2.4.5	Enzymatická hydrolýza.....	12
2.5	Výroba bioethanolu.....	14
2.5.1	Používané mikroorganismy	14
2.5.2	Fermentace.....	15
2.5.3	Separace a odvodnění bioethanolu.....	18
2.5.4	Kapalinová chromatografie	18
3	Experimentální část.....	19
3.1	Použité chemikálie, materiál a přístroje	19
3.1.1	Použité enzymy	19
3.1.2	Použité chemikálie	19
3.1.3	Použité přístroje a pomůcky	19
3.1.4	Použitá kultura	20
3.1.5	Použitý substrát	20
3.2	Příprava roztoků, média a inokula	21
3.2.1	Příprava pufu.....	21
3.2.2	Předúprava papíru a příprava média	21
3.2.3	Příprava inokula.....	22
3.2.4	Zaočkování médií a kultivace.....	22
3.3	Metody měření.....	22

3.3.1	<i>Stanovení sušiny</i>	22
3.3.2	<i>Stanovení růstové křivky</i>	22
3.3.3	<i>Stanovení množství metabolitů na HPLC</i>	23
4	Výsledky a diskuze	23
4.1	Stanovení sušiny	23
4.2	Růstové křivky	23
4.3	HPLC analýza	26
4.3.1	<i>Kalibrační křivky</i>	26
4.3.2	<i>Úbytek glukózy a produkce metabolitů</i>	28
5	Závěr	38
	Seznam použité literatury	39
	Seznam obrázků	42
	Seznam tabulek	43
	Seznam grafů	44

1 Úvod

Aktuálním problémem je znečišťování ovzduší spalováním fosilních paliv, ale také úbytek zdrojů, ze kterých je možno čerpat. Obecně biopaliva mohou být řešením tohoto problému. Vzhledem k rychlému růstu obyvatelstva a industrializace na světě poptávka po biopalivech roste velmi rychle. Bioethanol, který patří do skupiny biopaliv, je v západních zemích velmi hojně vyráběn, a to již od roku 1975. Až do dnešních dní probíhají ve světě výzkumy jak nejefektivněji bioethanol vyrábět. Otázkami jsou samozřejmě cena, dopad na životní prostředí a v neposlední řadě suroviny.

Celulóзовý materiál by mohl být velmi atraktivní surovinou pro výrobu bioethanolu. Jedná se o dostupný materiál, který nemá tak významnou roli jako například cukrová třtina či cukrová řepa, které jsou primárně potravinami. Celulóзовý materiál je dostupný právě jako odpadní papír, dřevěné štěpky ze zpracování dřeva a další různé druhy biomasy.

Dalšími faktory, které je nutno zohlednit jsou metody zpracování a předúpravy materiálů. Enzymatická hydrolýza je jednou z ekonomicky náročnějších metod předúprav, ale zátěž pro životní prostředí ve srovnání s chemickými metodami, např. kyselá hydrolýza či alkalická hydrolýza, je daleko menší. Díky velmi dobré znalosti mikrobiologie, je možno nákladnost toho procesu výrazně snížit.

Mikroorganismy jsou jednou z hlavních složek biotechnologií a potravinářství. Využívání živých organismů pro průmysl znamená také ve velké míře úlevu pro životní prostředí. Bakterie *Zymomonas mobilis* jsou známé jako velmi dobrý producent bioethanolu a ve srovnání s kvasinkami *Sacharomyces cerevisiae* jsou tolerantnější vůči vyššímu obsahu bioethanolu v médiu, což může vést k daleko větší výtěžnosti.

2 Teoretická část

2.1 Klíčová slova a základní pojmy

2.1.1 Bioethanol

Kapalné biopalivo vyráběné z různých druhů biomasy. Jedná se o látku se sumárním vzorcem C_2H_6O a předpona bio se uvádí právě z důvodu výroby z obnovitelných zdrojů. [1]

2.1.2 *Zymomonas mobilis*

Bakterie produkující ethanol ve své metabolické dráze. Gram negativní bakterie tyčinkovitého tvaru. [2]

2.1.3 Celulózový materiál

Materiál obsahující jako hlavní stavební jednotku celulózu, která je následně rozložitelná různými metodami (např. enzymatickou hydrolýzou) na fermentovatelné cukry. [3]

2.1.4 Enzymy

Látky bílkovinné povahy s katalytickými vlastnostmi. Oproti anorganickým katalyzátorům se vyznačují větší substrátovou specifitou. Reakce katalyzované enzymy se vyznačují vyšší reakční rychlostí. [4]

2.1.5 Hydrolýza

Chemický proces, při kterém dochází za působení katalyzátoru (např. enzymů) a přebytku vody k rozkladu látky na nové produkty. [5]

2.2 Bioethanol

Bioethanol je kapalné biopalivo, které je možno vyrobit z různých zdrojů biomasy. Historie výroby sahá do roku 1975 a hlavní výroba je dodnes v západních státech (Brazílie, USA). Jedná se o atraktivní alternativní palivo s nižší produkcí emisních částic. Obsahuje totiž 35 % O_2 , což snižuje počet částic a NO_x ze spalování. Má vyšší oktanové číslo, širší limity hořlavosti a kratší dobu hoření oproti benzínu. Avšak v praxi se čistý bioethanol nevyužívá, přimíchává se jako 5-10% podíl do běžných automobilových benzínů. [1, 6, 7]

Bioethanol slouží nejen jako palivo pro vznětové motory, ale také jako významná chemická surovina. Lze jej s 96% výtěžkem dehydratovat na ethylen a ten pak zpracovávat na polyetylen, vinylchlorid a propanal. [7]

2.3 Suroviny pro výrobu bioethanolu

Biopaliva se získávají z rostlinných olejů, cukrové řepy, obilí, organického odpadu a biomasy. Využívají se takové biologické suroviny, které obsahují značné množství sacharidů nebo materiálů, které mohou být převedeny na sacharidy, jako je škrob či celulóza. Suroviny pro výrobu bioethanolu lze rozdělit do několika tříd:

- Suroviny s obsahem sacharosy (cukrová řepa, cukrový čirok, cukrová třtina, ovoce).
- Suroviny s obsahem škrobu (pšenice, kukuřice, ječmen, rýže).
- Lignocelulózová biomasa (dřevo, sláma, traviny, odpadní papír).

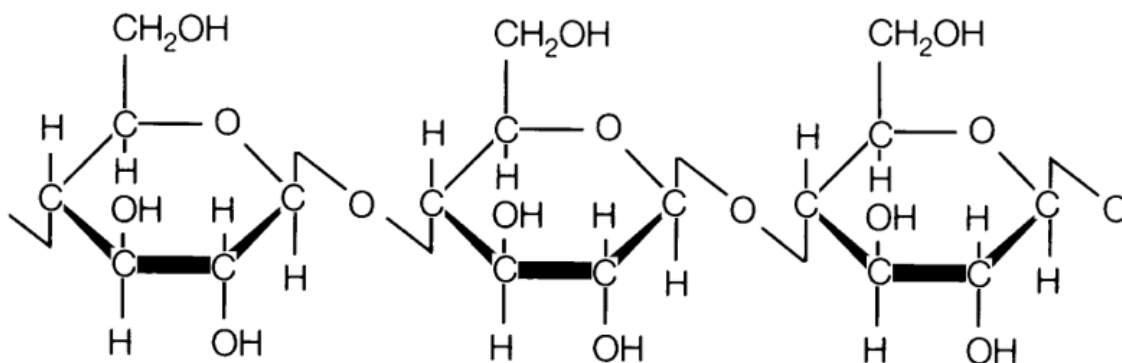
Pro srovnání je uvedena tabulka výtěžnosti bioethanolu, kterou lze získat z uvedených surovin.

Tabulka 1: Produkce bioethanolu z různých surovin [1]

Suroviny	Bioethanol [dm ³ .t ⁻¹]
s obsahem sacharosy	
cukrová třtina	70
cukrová řepa	110
cukrový čirok	60
s obsahem škrobu	
brambory	110
sladké brambory	125
kukuřice	360
ječmen	250
pšenice	340
lignocelulosoá biomasa	280

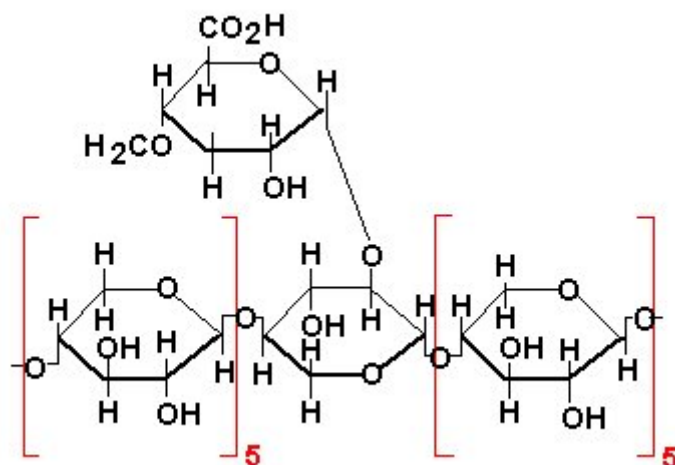
Jedním z hlavních problémů při výrobě bioethanolu je dostupnost surovin. Závisí ve velké míře na zeměpisné lokalitě a na období, kdy je produkce surovin možná. Cena surovin je dalším důležitým faktorem, protože tvoří více než jednu třetinu celkových nákladů na výrobu. V současnosti se odstupuje od využívání konvenčních surovin jako kukuřice či cukrová třtina, protože jsou primárně využívány jako potraviny a krmiva. Z tohoto důvodu jsou lignocelulosoé materiály velmi populární pro výrobu bioethanolu.

Lignocelulosoá biomasa je složena ze tří hlavních složek: hemicelulosa, celulosa, lignin. Celulosa je polysacharid složený z D-glukosových jednotek, které jsou spojeny β -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidickou vazbou. [1,3]



Obrázek 1: Struktura celulosy [8]

Hemicelulosa je stejně jako celulosa polysacharid, ale není složen pouze z jednoho monosacharidu. Složkami jsou hexosy (manosa, galaktosa), ale také pentosy (arabinosa, xylosa). [8]



Obrázek 2: Hemicelulosa [9]

Lignin je hlavní stavební složkou dřevin, zvyšuje pevnost buněčné stěny a chrání tak strukturu před škůdci a různými chorobami. Jedná se o vysokomolekulární látku fenolického charakteru. Je vázán kovalentními vazbami na postranní řetězce hemicelulosity, které tvoří ochranný obal okolo celulosových mikrofibril, což značně komplikuje hydrolýzu. [8]

2.4 Předúprava surovin

Předúprava biomasy je nejdůležitějším úkonem při výrobě biopaliv. Dochází k oddělení jedné nebo více komponent biomasy. Jednotlivé komponenty jsou poté přístupnější pro další čištění ať už biologické či chemické. Účelem předúpravy lignocelulosity je odstranění ligninu a hemicelulosity a zvýšení poréznosti materiálu. Předúprava je nákladný proces a tvoří až 18% z celkových nákladů výroby bioethanolu. [3,8,10]

Při předúpravě biomasy musí být splněny tyto požadavky:

- zlepšení dostupnosti celulosity pro proces hydrolýzy
- nesmí docházet k nežádoucí degradaci a ztrátám polysacharidů
- nesmí vznikat vedlejší produkty, které by působily inhibičně na následné procesy hydrolýzy a fermentace
- proces musí být finančně efektivní [11]

K předúpravě surovin se využívají fyzikální, fyzikálně-chemické, chemické a biologické procesy. [11]

2.4.1 Fyzikální metody

2.4.1.1 Mechanické rozmělnění

Prvním krokem pro výrobu bioethanolu je mletí, rozmělnění, drcení nebo štěpení lignocelulosity biomasy. Výsledná velikost částic po štěpení je 10-30 mm a 0,2-2 mm po mletí. Díky této metodě je pak k dispozici větší specifický povrch a dochází ke snížení stupně polymerace, toto kladně přispívá k zvýšení výnosu následné hydrolýzy. [8,10]

2.4.1.2 Pyrolýza

Jedná se o termický rozklad organických materiálů bez přísunu oxidačních médií (O_2 , CO_2 , vodní pára). Materiál je ošetřován při teplotě vyšší než $300\text{ }^{\circ}C$ a dochází tak k rozložení celulosy na plynné produkty, jako H_2 a CO . Poté je možno kyselou hydrolýzou (1 M H_2SO_4 , $97\text{ }^{\circ}C$, 2,5h) dosáhnout výtěžku 80 – 85% redukujících cukrů s podílem glukosy vyšším než 50%. Takto je tedy dosaženo dostatečného množství zdroje uhlíku pro růst mikroorganismů při výrobě bioethanolu. [3,8,12]

2.4.2 Fyzikálně-chemické metody

2.4.2.1 Exploze vodní parou

Jedná se o zpracování rozmělněné biomasy, kdy na materiál působí proud vysokotlaké nasycené páry. Proces probíhá při $160\text{--}290\text{ }^{\circ}C$ a $0,7\text{--}4,8\text{ MPa}$ po několik minut, poté je reakce náhle ukončena dekompresí na atmosférický tlak. Lignocelulosa biomasa je rozložena na jednotlivá vlákna a získáme tak výtěžek o 45-65% obsahem xylosy. Nevýhodou však je rozštěpení části xylosové frakce a tvorba inhibičních látek pro mikroorganismy, které jsou používány při následném zpracování. [8,10]

2.4.2.2 Exploze za použití amoniaku

Předúprava zahrnuje použití kapalného amoniaku a parní explozi. Princip metody je velmi podobný jako u exploze vodní parou, kdy je lignocelulosa biomasa vystavena vysoké teplotě ($60\text{--}100\text{ }^{\circ}C$) a tlaku po dobu cca 30 min. Délka působení závisí na stupni nasycení biomasy. Využívá se 1 kg amoniaku na kilogram suché biomasy. Tato metoda má výhodu, že nevytváří inhibitory navazujících procesů. Využívá se pro materiály s nižším obsahem ligninu v biomase. [3,8,10]

2.4.2.3 CO_2 exploze

Metoda je velmi podobná explozi vodní parou i za použití amoniaku. Dávku je se 4 kg na kilogram suché biomasy za tlaku $5,6\text{ MPa}$. CO_2 je skleníkový plyn, proto existují pochybnosti o využívání této metody. Výtěžnost je menší než u předchozích metod, ale je ekonomicky nejvýhodnější. Nedochází ke vzniku inhibitorů stejně jako u exploze s využitím amoniaku. [8,10]

2.4.3 Chemické metody

2.4.3.1 Kyselé hydrolýza

Cílem metody je získání vysokého výtěžku rozpustných sacharidů z lignocelulosa biomasy. Je možno využít jak kyselin koncentrovaných, ale také zředěných (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl , H_3PO_4 atd.). Běžně se využívá teplotního rozmezí $130\text{--}210\text{ }^{\circ}C$. Výsledkem tohoto procesu mohou být vedlejší produkty jako kyselina octová či furfural, kdy tyto látky mohou působit jako inhibitory pro růst mikroorganismů. Při použití 0,75% H_2SO_4 za teploty $121\text{ }^{\circ}C$ po dobu působení 1h, bylo získáno 74% rozpustných sacharidů z pšeničné slámy. Po dokončení procesu je nutné aby pH nabývalo neutrálních hodnot. [1,3]

2.4.3.2 Alkalická hydrolýza

Alkalické procesy využívají nižších teplot a tlaků ve srovnání s předchozími metodami. Využívané jsou nejčastěji hydroxidy (sodný, draselný, vápenatý, amonný), které způsobují bobtnání lignocelulosa biomasy, což vede k zvýšení vnitřní plochy a narušení struktury ligninu. Dochází ke snadnějšímu pronikání molekul vody do vnitřní struktury, oddělí se tak

hemicelulosa, lignin a jednotlivé sacharidy (glukosa, xylosa). Metoda je závislá na použitém materiálu, přesněji na obsahu ligninu. Pro materiály s vysokým obsahem ligninu je tato metoda neúčinná. Příkladem je použití této metody na měkké dřevo, které obsahovalo více ligninu než 26%. Naopak vhodným materiálem pro využití této metody je pšeničná sláma (10-18% obsah ligninu), kukuřičná sláma či topolové dřevo. [1,3,10]

2.4.4 Biologické metody

Při využití biologických metod pro předúpravu lignocelulosových materiálů se nejčastěji používají vláknité houby a plísně, které způsobují degradaci hemicelulosity a ligninu. Plísně se dělí podle barev, kdy každá má jinou účinnost a to podle toho jaká bakterie je v ní přítomna. Nejčastěji je využívána bílá plíseň, která nejúčinněji rozkládá lignin. Využíváme kupříkladu tyto houby:

- *Pleurotus ostreatus*
- *Phanerochaete sordida*
- *Penicillium chrysosporium*
- *Pycnoporus cinnabarinus*
- *Aspergillus terreus* a další. [3,8]

Metoda je považována za šetrnou k životnímu prostředí, jelikož nevyužívá žádné chemikálie. Velkou výhodou jsou nízké nároky na energii a podmínky, což značně snižuje náklady. Nevýhodou je však nízká účinnost těchto procesů a také zatím nebyly příliš využívány. [1,8,10,13]

2.4.5 Enzymatická hydrolýza

Dochází k přeměně polysacharidů (celulosa, hemicelulosa) na monosacharidy (glukosa, xylosa), které jsou pak využívány mikroorganismy při fermentaci. Díky mírným podmínkám (pH 4,5-5 a teplota 40-50 °C) je proces méně nákladný než kyselá či alkalická hydrolýza, vyžaduje menší přísun energie a je šetrnější k životnímu prostředí. Enzymatická hydrolýza se skládá ze tří kroků: adsorpce enzymů celulázy na povrchu celulózy, biologický rozklad celulosy na fermentovatelné cukry a desorpce celulázy. Celulázy, mikrobiální enzymy schopné hydrolyzovat celulózu jsou ve skutečnosti skupinou několika, synergicky působících komponentů. Celulázy jsou indukovatelné enzymy produkované organismy jen v přítomnosti celulózy, celobiózy, laktózy, soforózy a jiných sacharidů obsahujících β - (1,4) glykosidické vazby. Celulázový komplex je složen ze tří základních složek, které jsou často přítomny jako izoenzymy. Každá skupina v komplexu zastupuje jinou funkci:

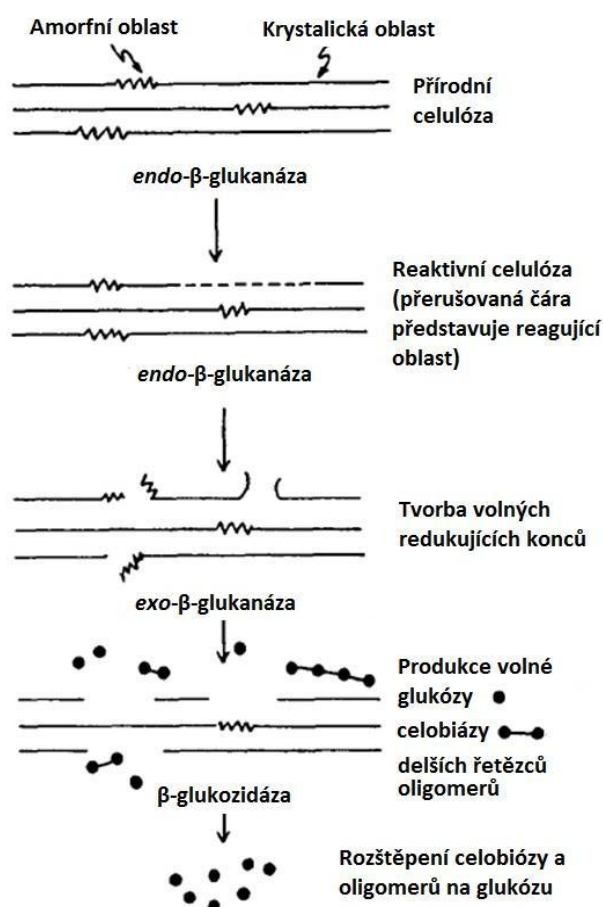
- Endo- β -(1,4)-glukanázy jsou složeny z několika komponent, u kterých předpokládáme náhodně štěpení β -(1,4)-glykosidických vazeb v celulóze za vzniku oligosacharidů o různé molekulové hmotnosti.
- Exo- β -(1,4)-glukanázy se skládají ze dvou podskupin:
 - β -(1,4)-glukan-glukohydrolázy, které odštěpují z neredukujícího konce řetězce celulózy jednotlivé glukózové jednotky,
 - β -(1,4)-glukan-celobiohydrolázy, které odštěpují celobiózové jednotky z neredukujícího konce řetězce celulózy.
- β -(1,4)-glukosidáza hydrolyzuje celobiózu a krátké oligosacharidy na glukózu. [8]

Enzymy jsou však velice nákladné, často se využívá mnoho mikroorganismů pro výrobu těchto enzymů. Enzym celulózu produkují například bakterie těchto rodů: *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Microbispora*, *Streptomyces* atd. [11]

Mezi vláknité houby, které produkují celulózu zařazujeme např.: *Trichoderma viridis*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma konigii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium irensii* a *Fusarium solani*. [11]

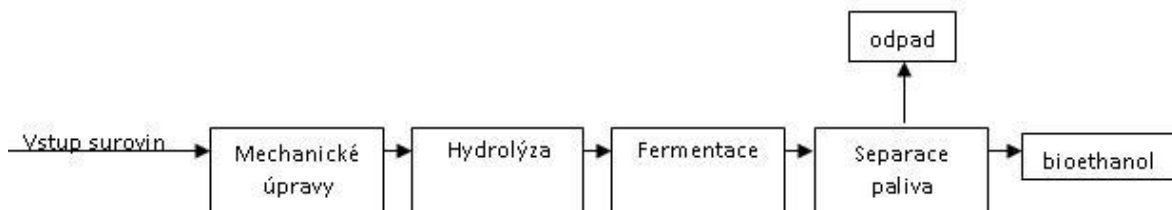
2.4.5.1 Mechanismus enzymatické hydrolýzy

Mechanismus zahrnuje štěpení vnitřní glykosidické vazby endo-glukanázami následované synergickým účinkem endo- a exo-glukanáz. Finální hydrolýza oligosacharidů je katalyzována β -(1,4)-glukosidázou. Celkový průběh je schematicky zobrazen na obrázku č. 3. [8]



Obrázek 3: Schematické znázornění synergického působení jednotlivých enzymů na celulózu [8]

2.5 Výroba bioethanolu



Obrázek 4: Schéma výroby bioethanolu [13]

2.5.1 Používané mikroorganismy

Při fermentaci můžeme využít mnoho mikroorganismů produkujících bioethanol. Avšak mezi nejpoužívanější patří kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* a bakterie *Zymomonas mobilis*. [13]

2.5.1.1 *Sacharomyces cerevisiae*

Fakultativně anaerobní kvasinky, ale jsou schopny růst a využívat sacharidy i za aerobních podmínek. Hlavním metabolitem je ethanol tvořený v buňce z monosacharidů, které byly transportovány z buňky do média. Konečným produktem po řadě enzymatických reakcí je tedy ethanol a oxid uhličitý. Hlavními vlastnostmi je rychlá produkce ethanolu, vysoká tolerance k němu a nízká produkce vedlejších metabolitů. [14]

2.5.1.2 *Zymomonas mobilis*

Taxonomické zařazení:

doména:	<i>Bacteria</i>
kmen:	<i>Proteobacteria</i>
třída:	<i>Alphaproteobacteria</i>
řád:	<i>Sphingomonadales</i>
čeleď:	<i>Sphingomonadaceae</i>
rod:	<i>Zymomonas</i>

Gramnegativní bakterie, která má tyčinkovitý tvar a často bývá opatřena 1-4 polárními bičíky. Jedná se o nesporulující mikroorganismy, které neukládají žádný rezervní materiál. Z fyziologického hlediska je rod chemoheterotrofní, fakultativně anaerobní nebo mikroaerofilní. Fermentují glukózu a fruktózu, produkují ethanol, CO₂ a kyselinu mléčnou. Vyskytují se jako původci kažení piva, jablečného a hruškového moštu. Jako fermentační činitel se vyskytují u nápojů z agáve, palmového vína, džusů z cukrové třtiny, u včel a zrajícího medu. Jsou nepatogenní pro člověka, zvířata i rostliny. Teplotní optimum je 30°C a rozmezí pH je široké 3,5 – 7,5. [2]



Obrázek 5: Mikroskopický obraz *Zymomonas mobilis* [15]

V porovnání s kvasinkami má rychlejší metabolismus, nižší nároky na výživu a vyšší toleranci k teplotám. Studie dokázaly, že výtěžnost při použití této bakterie je o 5% vyšší než u *Sacharomyces cerevisiae*. [1,14]

2.5.2 Fermentace

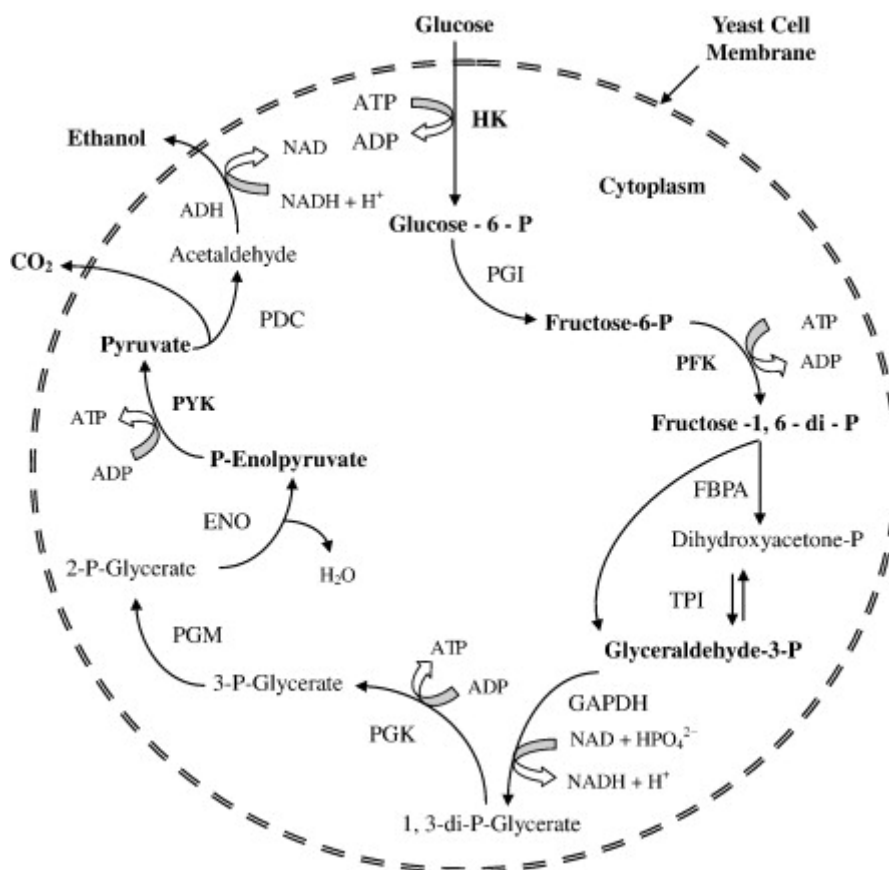
Po předúpravě surovin a přeměně celulosy a hemicelulosy na jednoduché cukry se provádí fermentace. Dochází tak k přeměně sacharidů na bioethanol a oxid uhličitý pomocí mikroorganismů dle rovnice: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$. [16]

2.5.2.1 Médium

Zdrojem sacharidů je rozložená lignocelulosa, dále se přidává kvasničný extrakt, toto je dostačující pro *Sacharomyces cerevisiae*. Pro udržování rozmnožování buněk jsou nezbytné dusíkaté látky - pokud se do média nedodají, růst se zpomalí a s tím se zpomalí i tvorba etanolu. Jako zdroj dusíku lze použít aminokyseliny, z kterých vzniká pyruvát a ethanol. Spektrum substrátů, které je *Zymomonas mobilis* schopen využívat, je omezeno na glukosu, fruktosu (konstitutivními enzymy) a sacharosu (pouze u některých kmenů, enzymy jsou induktivní povahy). Ostatní substráty využívány nejsou. Dobrého nárůstu je dosaženo na chemicky definovaném médiu obsahujícím některé růstové faktory (pantothenát vápenatý, thiamin, pyridoxin, biotin, nikotinová kyselina). Použití melasy jako substrátu se neosvědčilo vzhledem k přítomnosti některých inhibičních faktorů, inhibiční efekt je vyvolán i vysokými koncentracemi iontů hořčiku a draslíku. Rozmezí tolerovaných hodnot v případě pH je široké (pH 3,5 – 7) s optimem při neutrální hodnotě pH. [16]

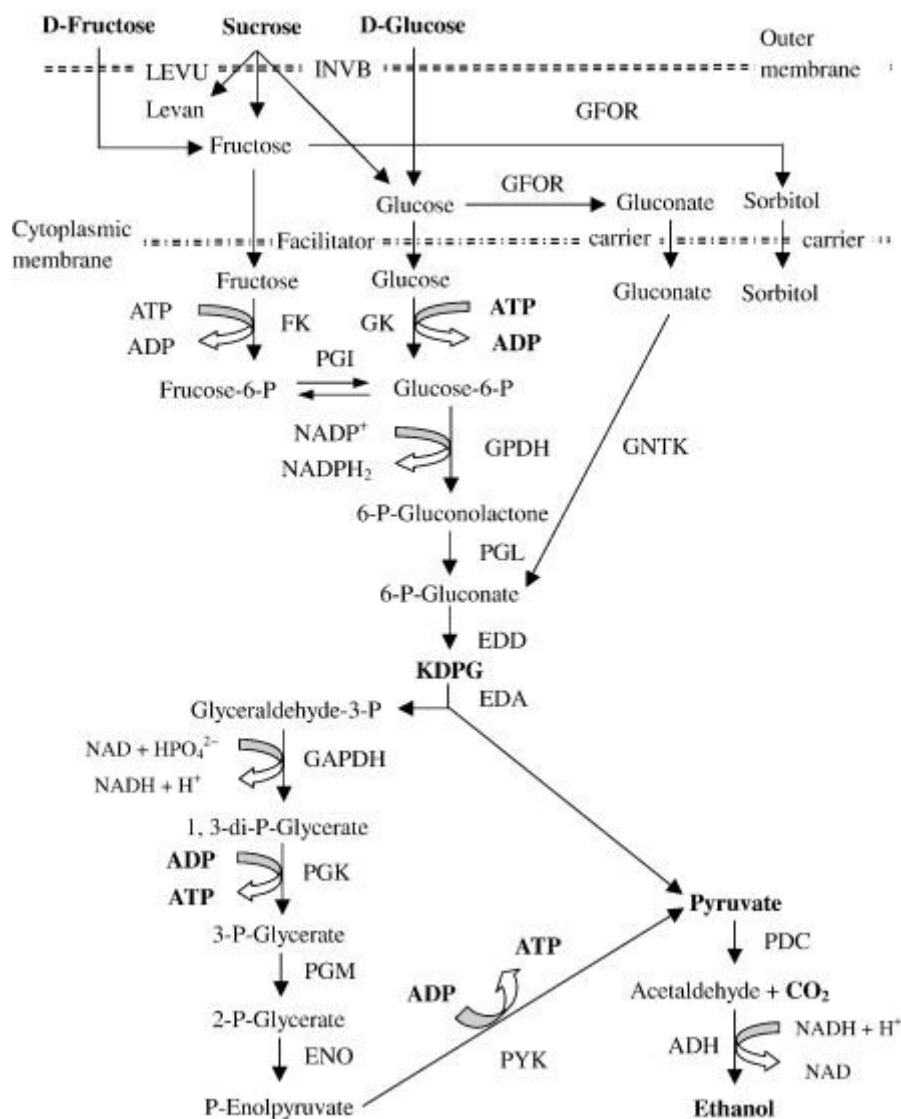
2.5.2.2 Mechanismus fermentace

Mechanismem v případě kvasinky *Sacharomyces cerevisiae* je proces glykolýzy. Během glykolýzy dochází ke spotřebě glukosy, regeneraci ADP, produkci pyruvátu a NADH. V buňce je omezen počet molekul NAD^+ , proto je nutné je regenerovat předáním H^+ z NADH jiné molekule. Takto je tedy H^+ předán acetaldehydu za produkce ethanolu. [16]



Obrázek 6: Glykolýza a alkoholové kvašení [17]

Bakteriální rod *Zymomonas* se do určité míry svými vlastnostmi podobá kvasinkám, k produkci etanolu však nepoužívá enzymy glykolýzy, ale Entner-Doudoroffovy dráhy. Glukosa je v něm přeměňována na glukonolakton, který přechází na 2-oxo-3-deoxy-6-P-glukonát. Tato látka je štěpena na pyruvát a glyceraldehyd-3-P. Z pyruvátu vzniká obvyklou cestou ethanol a glyceraldehyd-3-P je přeměňován na pyruvát enzymy glykolýzy. Tato cesta ovšem poskytuje pouze 1 molekulu ATP na 1 molekulu glukosy. To má za následek menší nárůst biomasy a zvýšený výtěžek. Rod *Zymomonas* je jediným dosud známým rodem mikroorganismů, který dokáže tuto dráhu provozovat i za anaerobních podmínek. [18]



Obrázek 7: Metabolismus *Zymomonas mobilis* [17]

2.5.2.3 Fermentační procesy

V dnešní době dochází k zavádění procesů současné sacharifikace a fermentace – SSF, a to z důvodů snížení nákladů. Nevýhodou této metody je volba podmínek, při sacharifikaci je teplota 45-50 °C a při fermentaci 27-29 °C. Nejčastěji je využíván vsádkový (batch) proces, který probíhá při stálém objemu média. Jak již bylo zmíněno, proces probíhá anaerobně, avšak ze začátku dochází k mírnému provzdušnění. Hodnota pH je 4-6 a teplota během růstu kvasinek 30-35 °C, při fermentaci je vhodné udržovat teplotu nižší, a to 27- 29 °C. Z důvodu anaerobního průběhu k míchání nedochází. Nejvýhodnějším způsobem je však kontinuální proces v kombinaci s recyklací mikroorganismů. Rozšíření těchto procesů je zatím v praxi velmi malé z důvodu vysoké ceny nosiče. [8,19]

2.5.3 Separace a odvodnění bioethanolu

Destilací za normálního tlaku získáme ethanol nejvýše o koncentraci 95,5 % hm. (azeotropický bod). Pro účely biopaliv je třeba získat bioethanol bezvodý a to procesem odvodnění. [20]

Odvodňování destilací – principem této metody je snížení tlaku v koloně, tím dojde k posunu složení azeotropické směsi na skoro 100% ethanol. Nevýhodou tohoto způsobu je vysoká finanční náročnost, protože snížení tlaku souvisí s větším průměrem a silnějšími stěnami kolony a je potřeba mít uzavřený okruh chladicí vody nutný pro ochlazení par o nízké teplotě. [20]

Odvodňování tuhými látkami – tato metoda patří mezi nejstarší, používá se např. pálené vápno, chlorid vápenatý, sádra či octan sodno-draselný a jiné látky, které na sebe vážou vodu. [20]

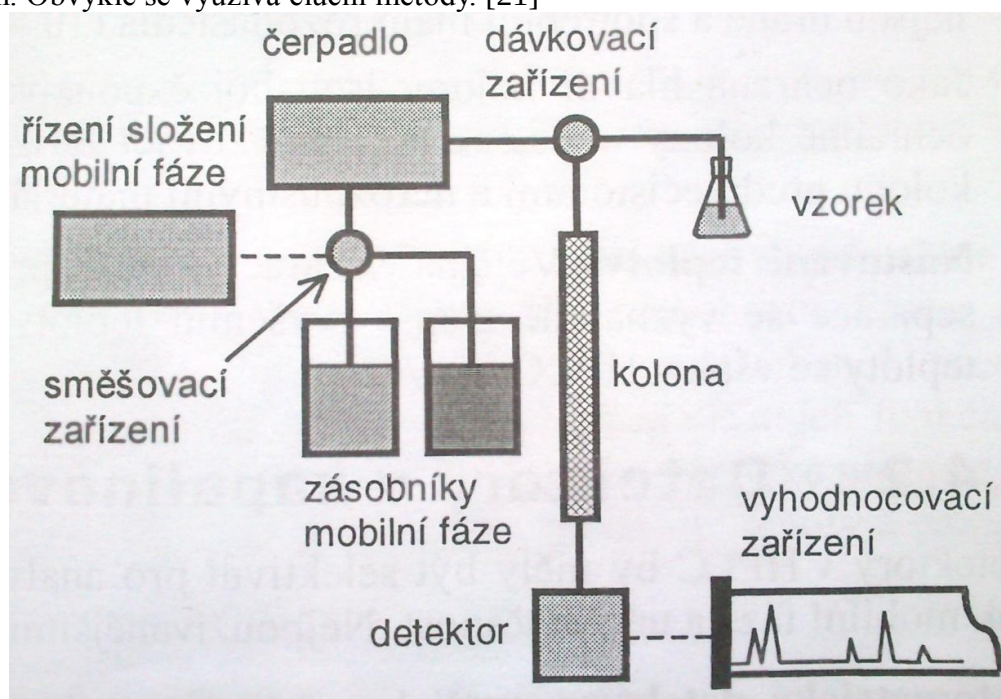
2.5.4 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují jednotlivé složky obsažené ve vzorku. Vzorek je vnášen mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze.

- Stacionární fáze – nepohyblivá.
- Mobilní fáze – pohyblivá.

Vzorek umísťujeme na začátek stacionární fáze. Mobilní fáze se pohybuje přes stacionární a vzorek je mobilní fází unášen. Jednotlivé složky vzorku mohou být stacionární fází zachycovány, a proto se při pohybu zdržují. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází více poutány. Tím se postupně složky od sebe separují a na konec stacionární fáze se dostávají dříve složky méně zadržované. [21]

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fází. Čas, jaký stráví v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Protože je možno pracovat za laboratorní teploty a není nutné převádět vzorek na plyn, je tato metoda vhodná i pro separaci netěkavých a tepelně nestálých sloučenin. Obvykle se využívá eluční metody. [21]



Obrázek 8: schéma chromatografu [21]

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie, materiál a přístroje

3.1.1 Použité enzymy

Pro enzymatickou hydrolýzu byly použity dva enzymy, které vyrábí společnost *Novozymes*®. Přesně se jednalo o produktovou řadu *Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit*.

- NS22086 – celulázový komplex: Rozkládá celulóзовý materiál na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy.
- NS22118 – β -glukosidáza: Také známá jako celobiáza, která rozkládá celobiózu na glukózu. [22]

Tabulka 2: Klasifikace a vlastnosti enzymů [22]

enzym	aktivita ¹	hustota ² (kg.dm ⁻³)	pH	teplota (°C)	dávkování ³ % w/w (TS)
NS22086	1,000 BHU(2)/g	1,15	5,0 - 5,5	45 - 50	1 - 5 %
NS22118	250 CBU/g	1,2	2,5 - 6,5	45 - 70	0,2 - 0,6 %

1 – BHU(2) – jednotka hydrolýzy biomasy

CBU – celobiázová jednotka

2 – hodnoty hustot jsou udávány přibližně

3 – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být dávkování značně variabilní [22]

3.1.2 Použité chemikálie

- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát – p.a., Lachema, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- kyselina citronová monohydrát – p.a., Lachema, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- D-glukóza – p.a., Penta, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- kvasničný extrakt – pro bakteriologii, Roth
- síran amonný – p.a., LachNer, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- síran hořečnatý heptahydrát – p.a., LachNer, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- dihydrogenfosforečnan draselný – p.a., LachNer, KH_2PO_4
- destilovaná voda – H_2O
- kyselina mléčná – p.a., 80%, Lachema, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$
- ethanol – p.a., MERCK, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- kyselina sírová – p.a., MERCK, H_2SO_4

3.1.3 Použité přístroje a pomůcky

- Centrifuga Hettich EBA 20
- Pečící trouba Mora 524
- Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- Termostat Memmert

- Termostatovaná třepačka Heidolph® Unimax 1010
- pH metr HANNA pH 211
- Běžné laboratorní sklo
- Mikropipety
- Minitřepačka lab dancer vario
- Mixér Rohson MultiDuo R-536
- HPLC
 - Předkolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 40 x 8 mm
 - Kolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 8 x 250 mm
 - Detektor: RID
- Tlakový hrnec Fagor



Obrázek 9: Ultrospec™ 10 Cell Density Meter

3.1.4 Použitá kultura

Byla použita kultura *Zymomonas mobilis* LMG 457, která je známá jako dobrý producent ethanolu z celulóзовých materiálů. Kultura byla uchovávána v Petriho misce na pevném agarovém médiu v chladničce.

Kultura nese přesný název *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* (Lindner 1928) Kluyver and van Niel 1936 AL. Je uváděno, že mikroorganismy mohou způsobit onemocnění u člověka, ale distribuce je možná bez omezení. Kulturu je možno využít pro účely výuky, výzkumu nebo v průmyslových institucích. [23]

3.1.5 Použitý substrát

Pro optimalizaci produkce ethanolu byly použity tři různé druhy papíru od různých výrobců. Shrnutí jednotlivých vlastností je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka 3: Klasifikace a vlastnosti papírů

papír 1	firma	BIOCEL PASKOV, a.s.
	jas	88 %
	popel	0,50 %
	obsah nečistot	2,0 ppm
	suchost	80 - 90 %
	pH	5,0 - 7,0
papír 2	firma	BUKÓZA EXPORT - IMPORT, a.s.
	jas	86 - 88 %
	popel	0,40 %
	obsah nečistot	50 m ⁻²
	suchost	80%
	pH	5,5
papír 3	firma	Lenzing Gruppe
	jas	90 %
	popel	0,08 %
	obsah nečistot	150 m ⁻²
	suchost	85 %
	pH	6

3.2 Příprava roztoků, média a inokula

3.2.1 Příprava pufru

Bylo naváženo 14,32 g Na₂HPO₄·12H₂O, toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 200 ml, rozpuštěno, doplněno po rysku a důkladně promícháno. Připravený roztok byl zředěn na cca 600 ml a bylo upravováno pH postupným přikapáváním kyseliny citrónové na hodnotu 5. Roztok s upraveným pH byl převeden do odměrné baňky na 750 ml, baňka byla doplněna po rysku a řádně promíchána.

3.2.2 Předúprava papíru a příprava média

Jednotlivé listy papíru byly rozstříhány na co nejmenší části, které pak byly vloženy do elektrického mixeru a pomlety na jemný prach.

Byly připraveny tři Erlenmeyerovy baňky, do kterých bylo naváženo 20 g pomletého papíru. Papír v Erlenmeyerových baňkách byl zalit 250 ml připraveného pufru. Erlenmeyerovy baňky byly vysterilizovány a po ochlazení na cca 50 °C bylo přidáno do každé 0,87 ml celulázového komplexu a 0,1 ml β - glukosidázy. Erlenmeyerovy baňky byly zazátkovány a vloženy do termostátované třepačky vyhřáté na 50 °C, ve které docházelo k enzymatické hydrolýze po dobu jednoho týdne.

Po týdnu byly jednotlivé roztoky zfiltrovány a po přidavku živin dle tabulky č. 4 (vyjma D-glukózy) vysterilizovány.

3.2.3 Příprava inokula

Inokulum bylo připravováno v 500 ml Erlenmeyerově baňce. Nejprve bylo odměřeno 200 ml destilované H_2O , do které byly postupně přidávány navážené živiny. Následně bylo takto připravené médium vysterilizováno a po vychladnutí na cca 30 °C bylo pomocí kličky zaočkováno kulturou z Petriho misky. Erlenmeyerova baňka byla vložena do předem vyhřátého inkubátoru na 30 °C a inokulum bylo kultivováno 24 h.

Tabulka 4: Množství živin pro přípravu inokula

látky	m [g]
D - glukóza	20
kvasničný extrakt	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1
KH_2PO_4	0,2

3.2.4 Zaočkování médií a kultivace

Vysterilizovaná média připravena z jednotlivých papírů byla zaočkována stejným množstvím buněk. Z inokula bylo odebráno vždy 10 ml do tří centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly odstředovány po dobu 10 min při 6000 otáčkách za minutu. Supernatant byl poté slit a znovu bylo pipetováno 10 ml suspenze buněk do zkumavek a centrifugováno. Po slití supernatantu byl k buňkám přidán 1 ml sterilní vody a buňky byly rozsuspendednovány pomocí vortexu a přelity do připraveného média. Pro dokonale kvantitativní převedení buněk byla centrifugační zkumavka vypláchnuta dalším mililitrem sterilní vody. K médiu o objemu 200 ml bylo přidáno 2 ml sterilní vody s buňkami. Zaočkováná média v Erlenmeyerových baňkách byly zazátkovány a kultivovány v inkubátoru při 30 °C. Hodnota pH v médiích byla 5. Kultivace tedy probíhala vsádkovou metodou.

3.3 Metody měření

3.3.1 Stanovení sušiny

Z inokula bylo odebráno 10 ml suspenze buněk do centrifugační zkumavky, která byla odstředována po dobu 10 min při 6000 otáčkách za minutu. Po odstředění byl supernatant nad usazenými buňkami slit a k buňkám byl přidán 1 ml sterilní vody. Buňky byly rozsuspendednovány ve vodě pomocí vortexu a přelity na předem zváženou misku. Zkumavka byla následně vypláchnuta 1 ml sterilní vody a toto množství bylo také přilito na misku. Miska byla poté sušena při 105 °C. Po vysušení byla miska zvážena na analytických vahách a z rozdílu hmotností byl vypočten obsah sušiny.

3.3.2 Stanovení růstové křivky

Z jednotlivých médií byly odebírány vzorky ve 2 h intervalech pro stanovení optické hustoty. Měření bylo prováděno na přístroji Ultrospec™ 10 Cell Density Meter při vlnové délce 600 nm. Jako blank byly použity jednotlivé hydrolyzáty, takže pro každé médium byl

samostatný blank. Při posledních odběrech byla optická hustota vyšší než 1 a vzorky byly ředěny 1:1.

Růstové křivky byly následně sestaveny jako závislost optické hustoty na čase, a to ve formě grafů.

3.3.3 Stanovení množství metabolitů na HPLC

Během kultivace byly odebírány vzorky pro analýzu HPLC ve 4 h intervalech a množství 5 ml. Vzorky byly zcentrifugovány aby došlo k odstranění všech buněk. Supernatanty byly následně zředěny 10x a přefiltrovány do vialek a dány na analýzu. Veškeré podmínky a parametry analýzy jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky a parametry analýzy

průtok	0,5 ml/min
teplota	40 °C
čas analýzy vzorku	35 min
tlak	1,7 Mpa
mobilní fáze	1,3 mM H ₂ SO ₄
předkolona	Watrex Polymer IEX H-forma, 40 x 8 mm
kolona	Watrex Polymer IEX H-forma, 8 x 250 mm
detektor	RID

4 Výsledky a diskuze

4.1 Stanovení sušiny

Pomocí vázkové metody bylo stanoveno množství sušiny v inokulu.

Tabulka 6: Stanovení sušiny

m_m [g]	m_{m+b} [g]	c [g.10 cm ⁻³]	c [g.dm ⁻³]
1,1608	1,1618	0,001	0,1

m_m – hmotnost prázdné vysušené misky

m_{m+b} – hmotnost misky s buňkami

Stanovení sušiny bylo prováděno pro zjištění množství buněk, kterými byly zaočkovány jednotlivé hydrolyzáty. Množství buněk v každém hydrolyzátu tedy odpovídalo 1 mg sušiny.

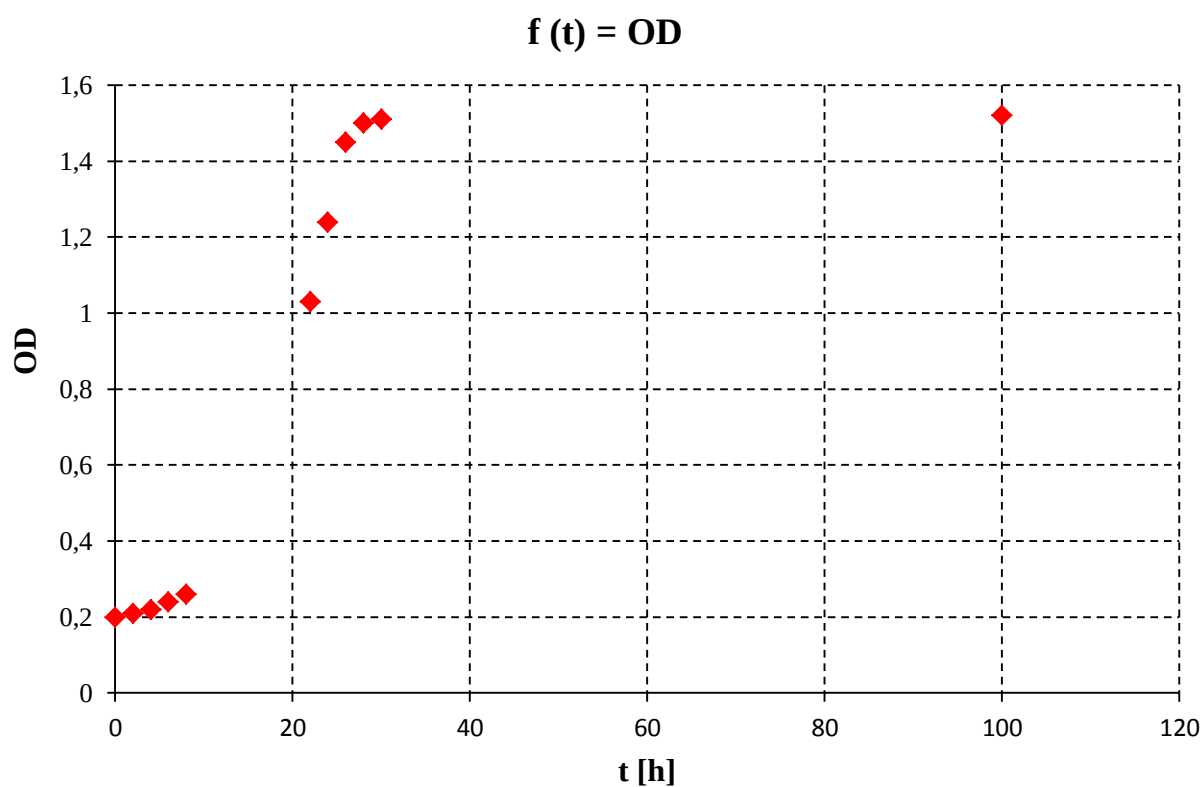
4.2 Růstové křivky

Byl sledován růst kultury v připravených hydrolyzátech, odběry byly prováděny ve 2 h intervalech. Růst byl sledován jako závislost optické hustoty na čase. Z naměřených hodnot byly sestaveny grafy.

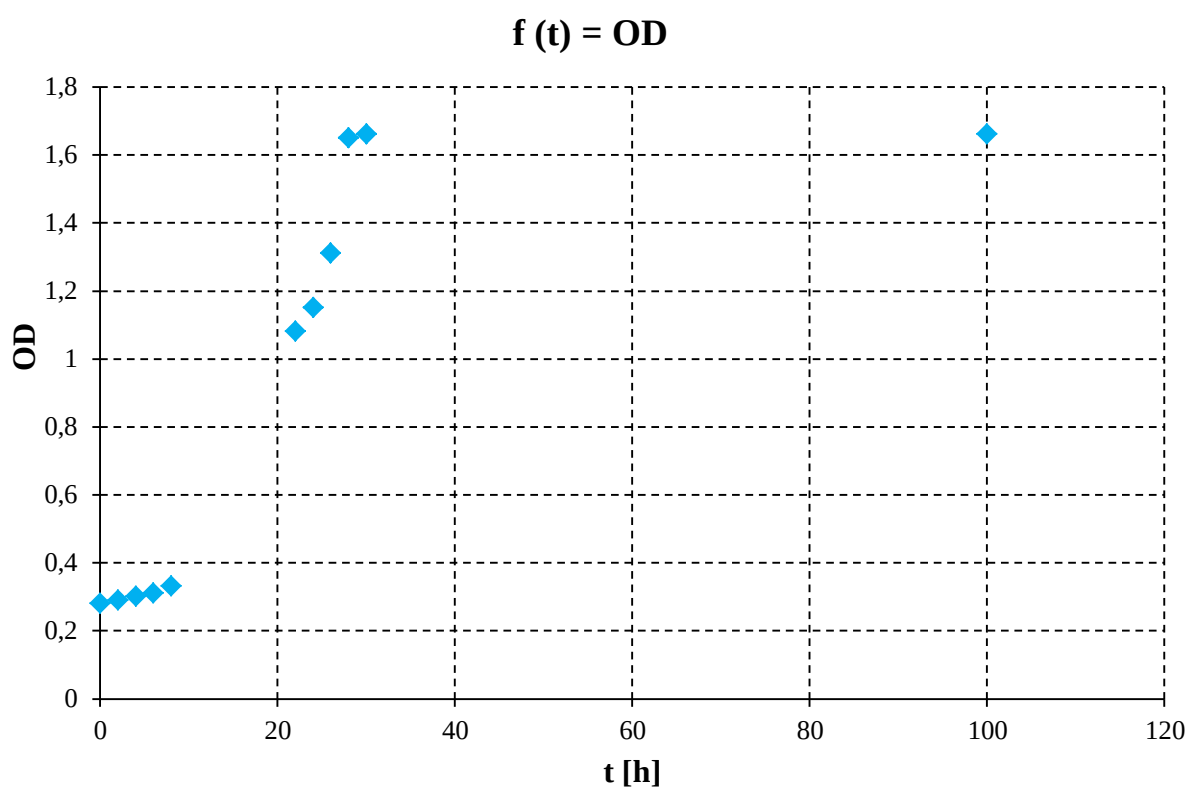
Tabulka 7: Závislost optické hustoty na čase

papír 1			papír 2			papír 3		
t (h)	OD	ředění	t (h)	OD	ředění	t (h)	OD	ředění
0	0,2	-	0	0,28	-	0	0,43	-
2	0,21		2	0,29		2	0,46	
4	0,22		4	0,3		4	0,46	
6	0,24		6	0,31		6	0,47	
8	0,26		8	0,33		8	0,49	
22	1,03	2x	22	1,08	2x	22	1,04	2x
24	1,24		24	1,15		24	1,17	
26	1,45		26	1,31		26	1,25	
28	1,5		28	1,65		28	1,75	
30	1,51		30	1,66		30	1,78	
100	1,52		100	1,66		100	1,78	

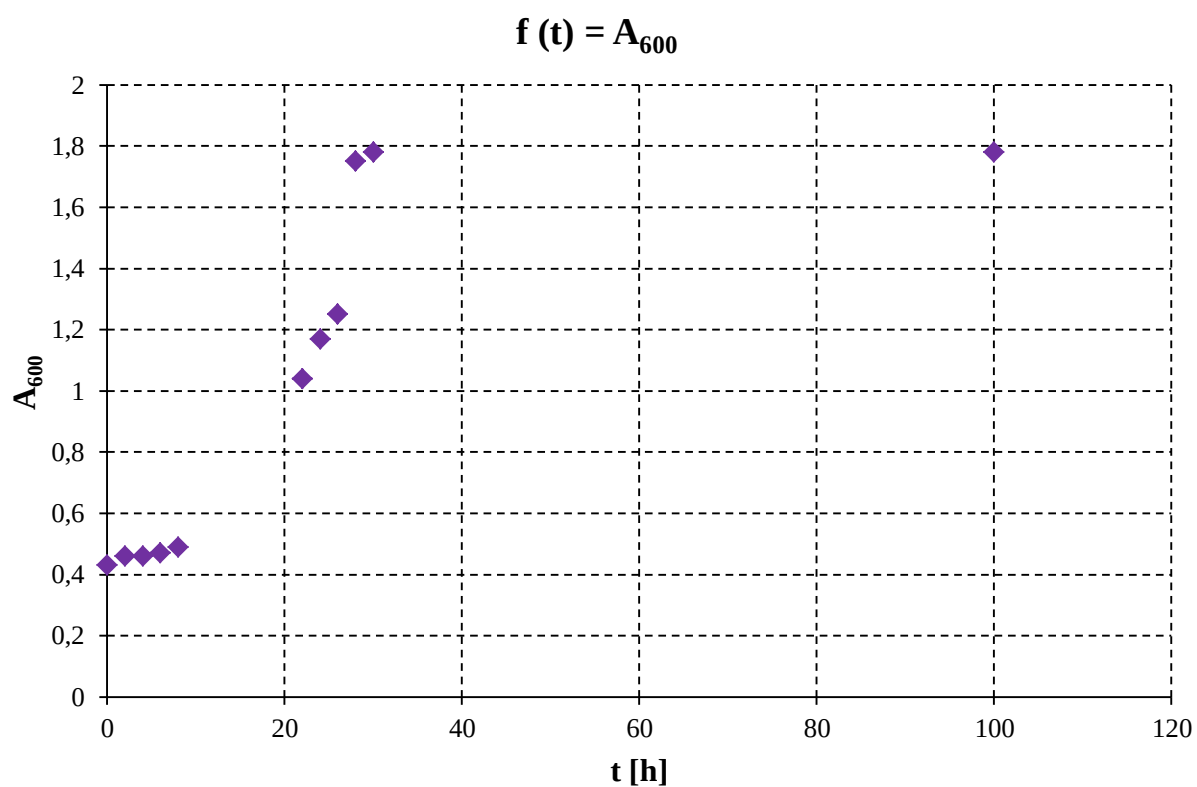
Graf 1: Růstová křivka *Zymomonas mobilis* v médiu papíru 1



Graf 2: Růstová křivka *Zymomonas mobilis* v médiu papíru 2



Graf 3: Růstová křivka *Zymomonas mobilis* v médiu papíru 3



Grafy 1 – 3 zobrazují jednotlivé fáze růstu *Zymomonas mobilis* v závislosti na čase. Na každém z těchto grafů lze velmi dobře jednotlivé fáze rozlišit. V průběhu prvních 4 – 6 h pozorujeme Lag fázi, která postupně přechází ve fázi zrychleného růstu. Dlouhá doba Lag fáze je nejspíše způsobena změnou prostředí a docházelo tedy déle k adaptaci buněk. Při odběru v čase 22 h již vidíme exponenciální fázi růstu, která v čase 30 h přechází do stacionární fáze růstu. Největší nárůst buněk byl pozorován v médiu papíru 3, protože médium papíru 3 obsahovalo největší množství glukózy, což je zobrazeno na grafech 9 a 10.

4.3 HPLC analýza

Ze standardních roztoků byly ředěním připraveny vzorky, které následně byly podrobeny analýze na HPLC. Pomocí analýzy byly sestaveny jednotlivé kalibrační křivky pro následné stanovení úbytku glukózy a nárůstu jednotlivých metabolitů ve vzorcích.

4.3.1 Kalibrační křivky

Tabulka 8: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku

c [g.dm ⁻³]	A [mV.s]
0	0
2	4206,25
4	8504,31
6	13495,96
8	16939,29
10	21373,00

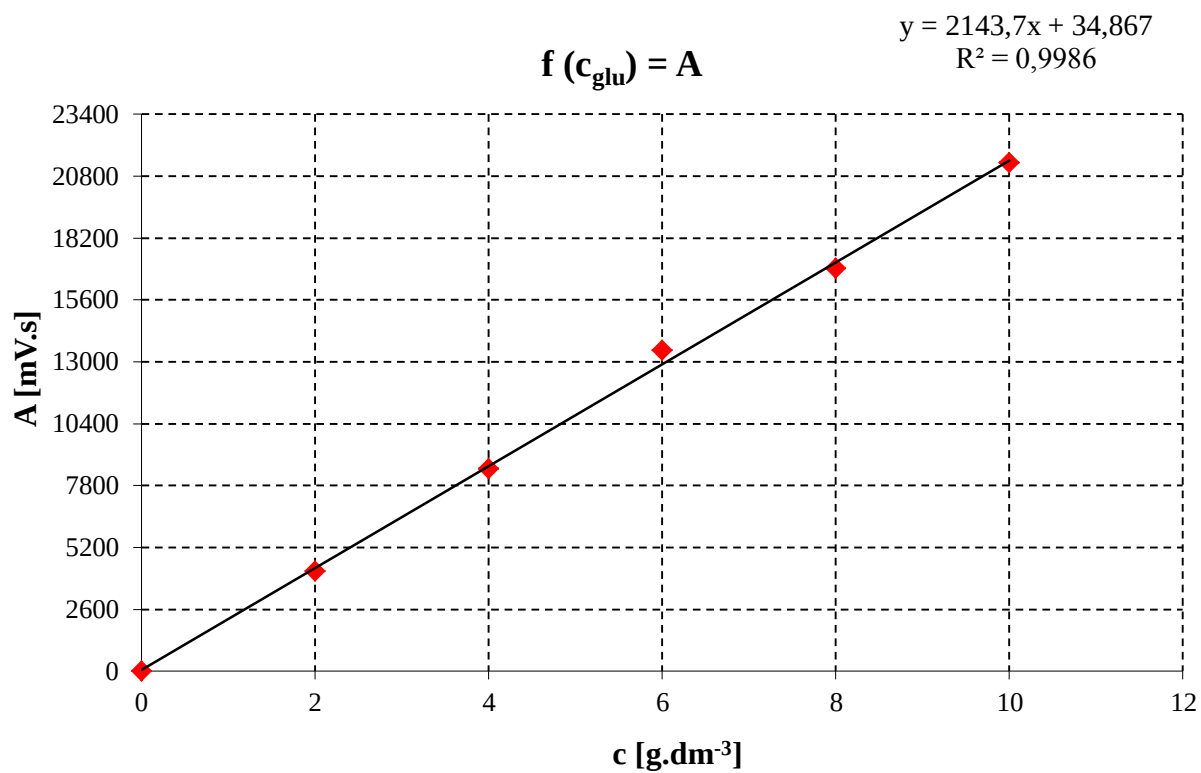
Tabulka 9: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku

c [g.dm ⁻³]	A [mV.s]
0	0
2	1649,64
4	3137,09
6	4443,08
8	6264,15
10	7786,63

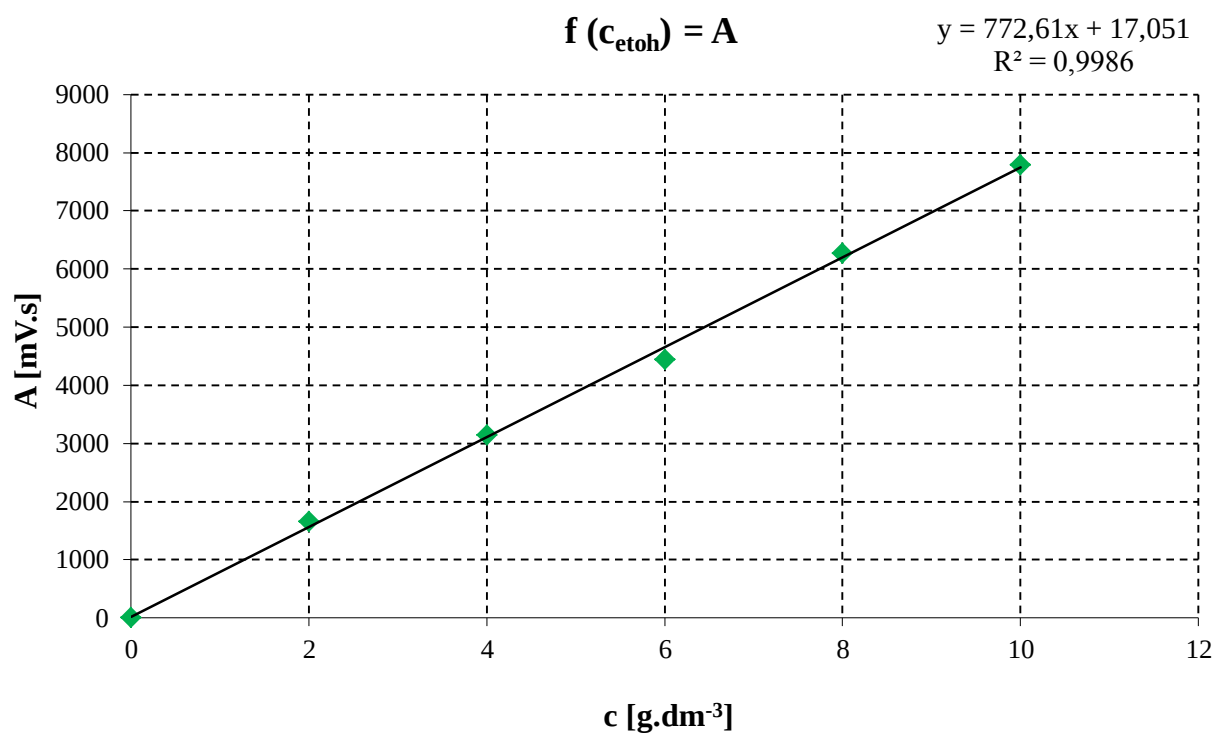
Tabulka 10: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku

c [g.dm ⁻³]	A [mV.s]
0	0
2	1159,67
4	2269,47
6	3721,33
8	5218,95
10	6009,49

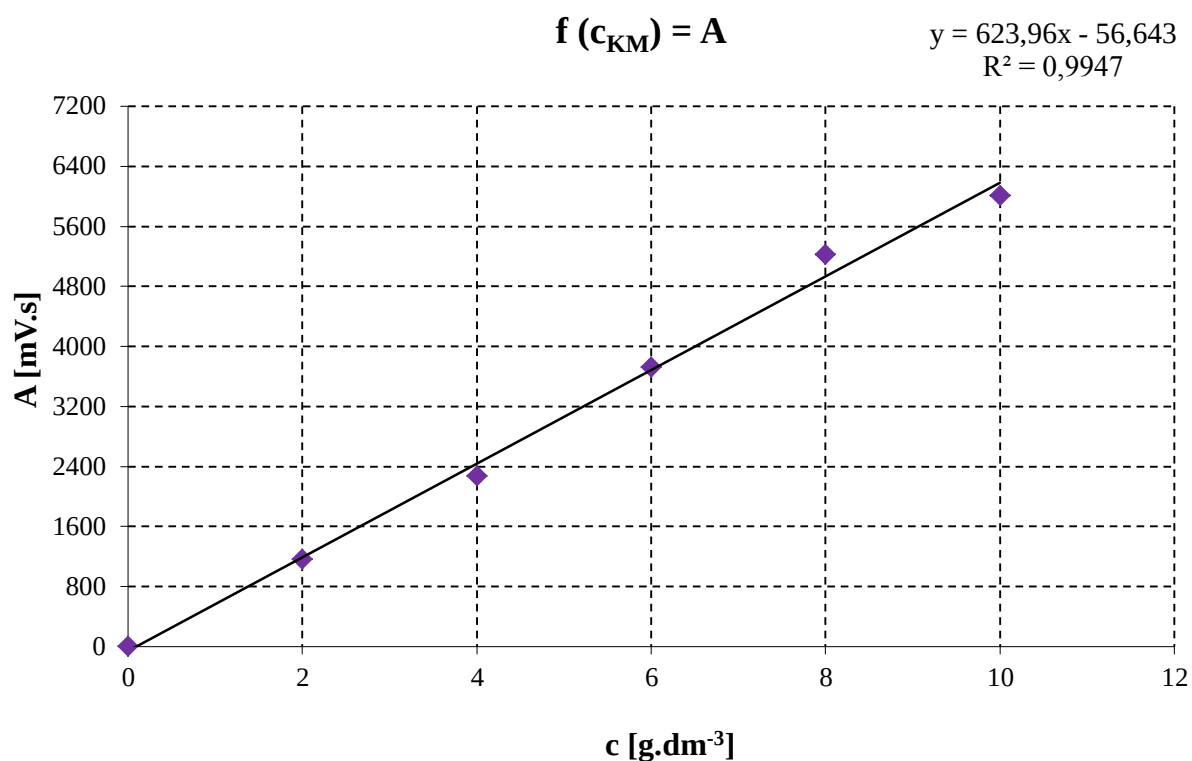
Graf 4: Kalibrační křivka pro glukózu



Graf 5: Kalibrační křivka pro ethanol



Graf 6: Kalibrační křivka pro kyselinu mléčnou



4.3.2 Úbytek glukózy a produkce metabolitů

Tabulka 11: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku

papír 1			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	8345,74	38,7688
2	4	8105,75	37,6493
3	8	7653,20	35,5382
4	22	7490,90	34,7811
5	26	7413,89	34,4219
6	30	7229,95	33,5638
7	100	7053,61	32,7413

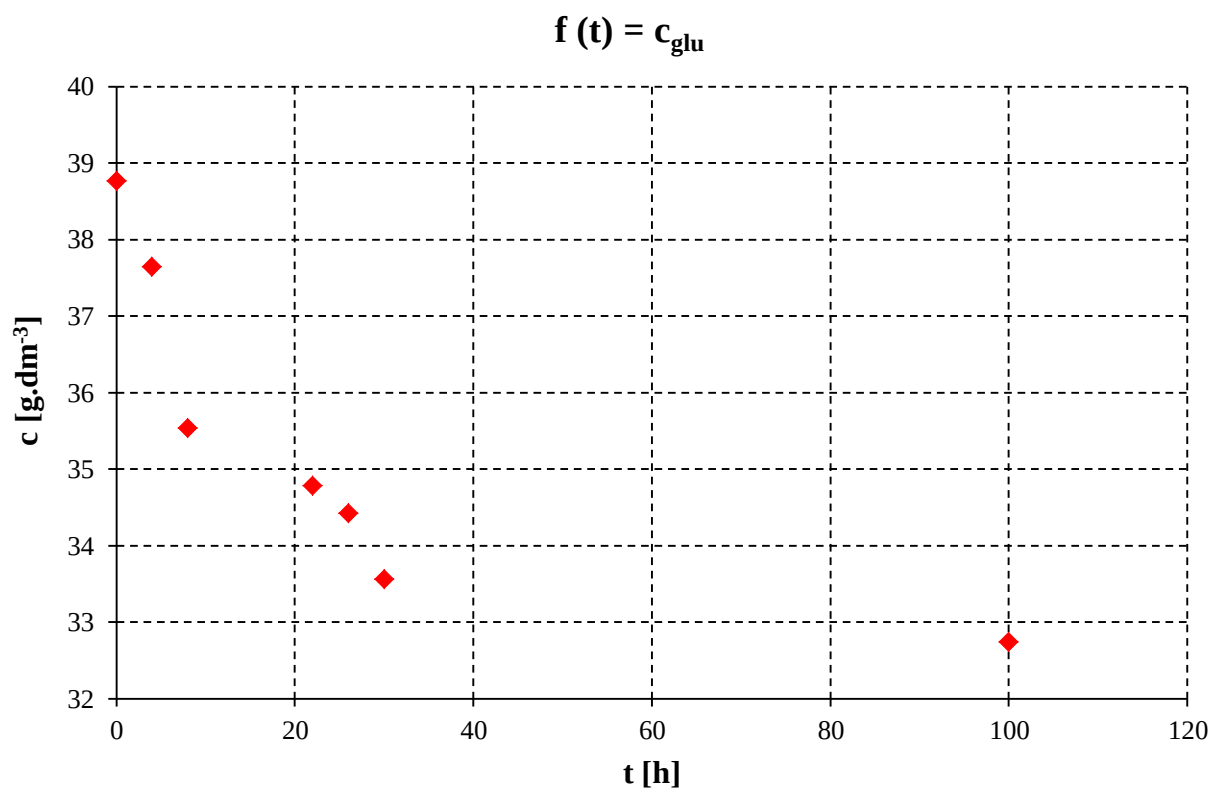
Tabulka 12: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku

papír 2			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	9641,97	44,8155
2	4	9410,71	43,7367
3	8	9350,53	43,4560
4	22	9100,50	42,2897
5	26	8662,08	40,2445
6	30	8654,10	40,2073
7	100	8469,44	39,3459

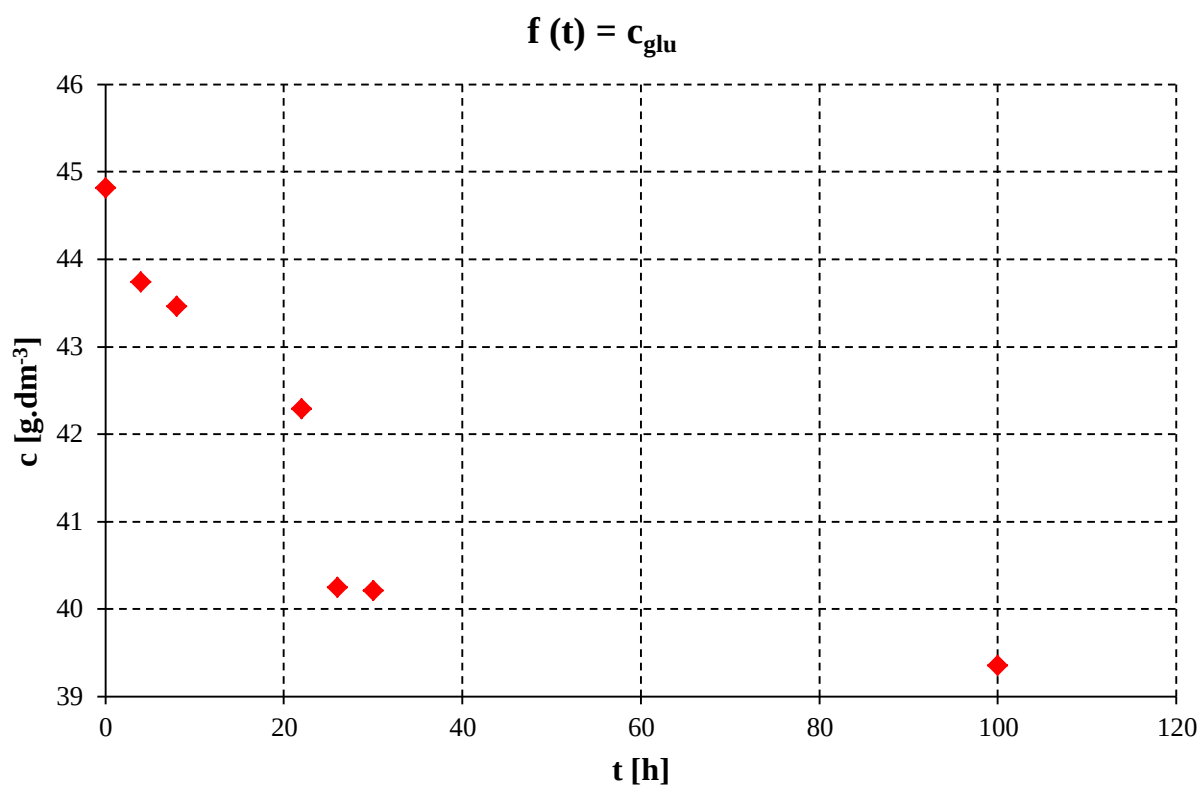
Tabulka 13: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku

papír 3			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	14588,21	67,8889
2	4	13650,07	63,5126
3	8	13123,62	61,0569
4	22	13013,21	60,5418
5	26	13002,57	60,4921
6	30	12945,59	60,2264
7	100	11932,09	55,4985

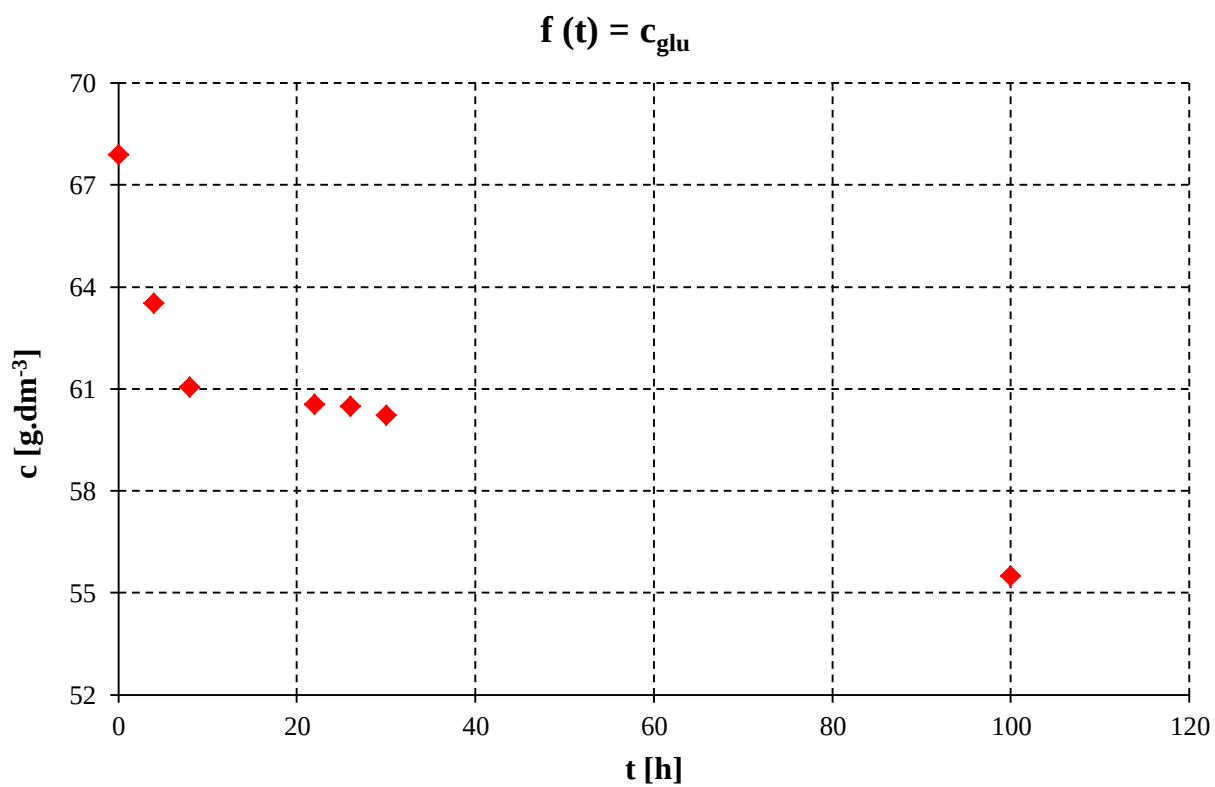
Graf 7: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 1)



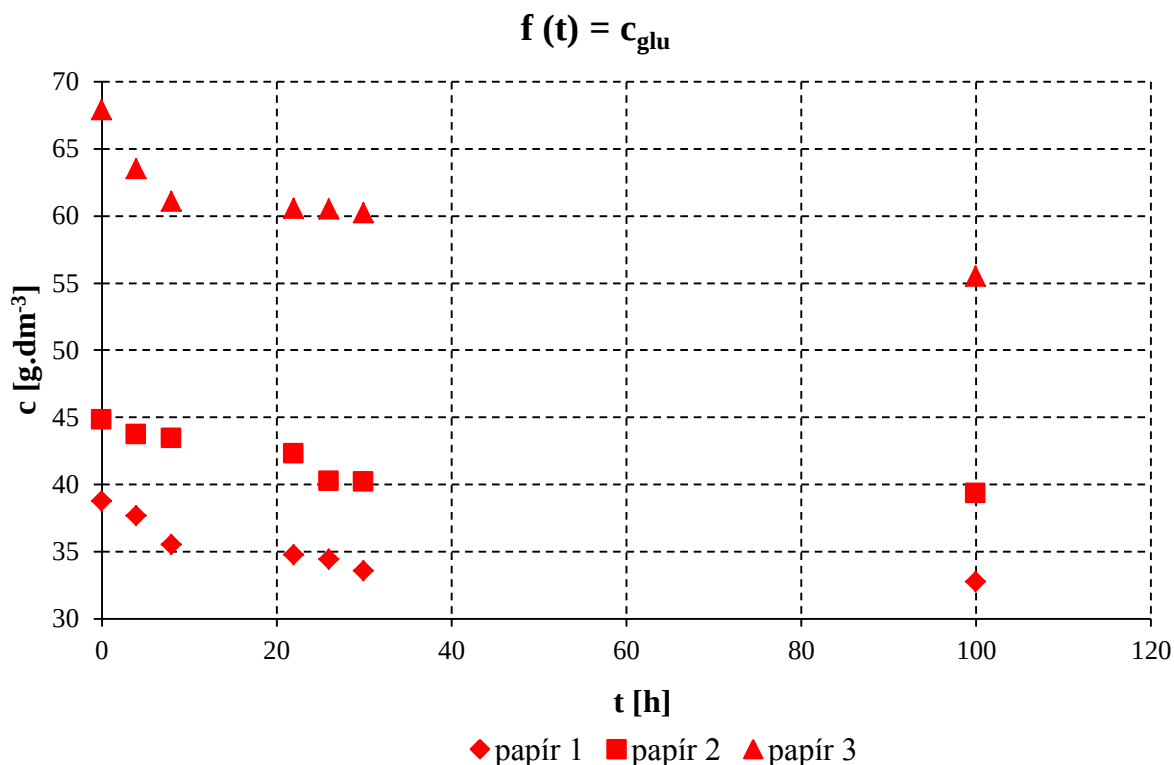
Graf 8: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 2)



Graf 9: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 3)



Graf 10: Srovnávací graf úbytku glukózy



Na grafu 10 lze pozorovat úbytek glukózy v jednotlivých médiích na čase. V médiu připraveného enzymatickou hydrolýzou papíru 1 byl obsah glukózy nejmenší a v médiu z papíru 3 byl stanoven obsah glukózy největší. V médiu s největším obsahem glukózy můžeme také pozorovat nejznatelnější úbytek, a to $12,39 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. V médiích papíru 1 a papíru 2 úbytek glukózy byl poloviční. Koncentrace i úbytek glukózy hrály významnou roli při růstu buněk, v médiu papíru 3 byl nárůst buněk největší. Vyšší koncentrace glukózy ovlivňovala i produkci ethanolu, která také byla největší v médiu papíru 3.

Tabulka 14: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku

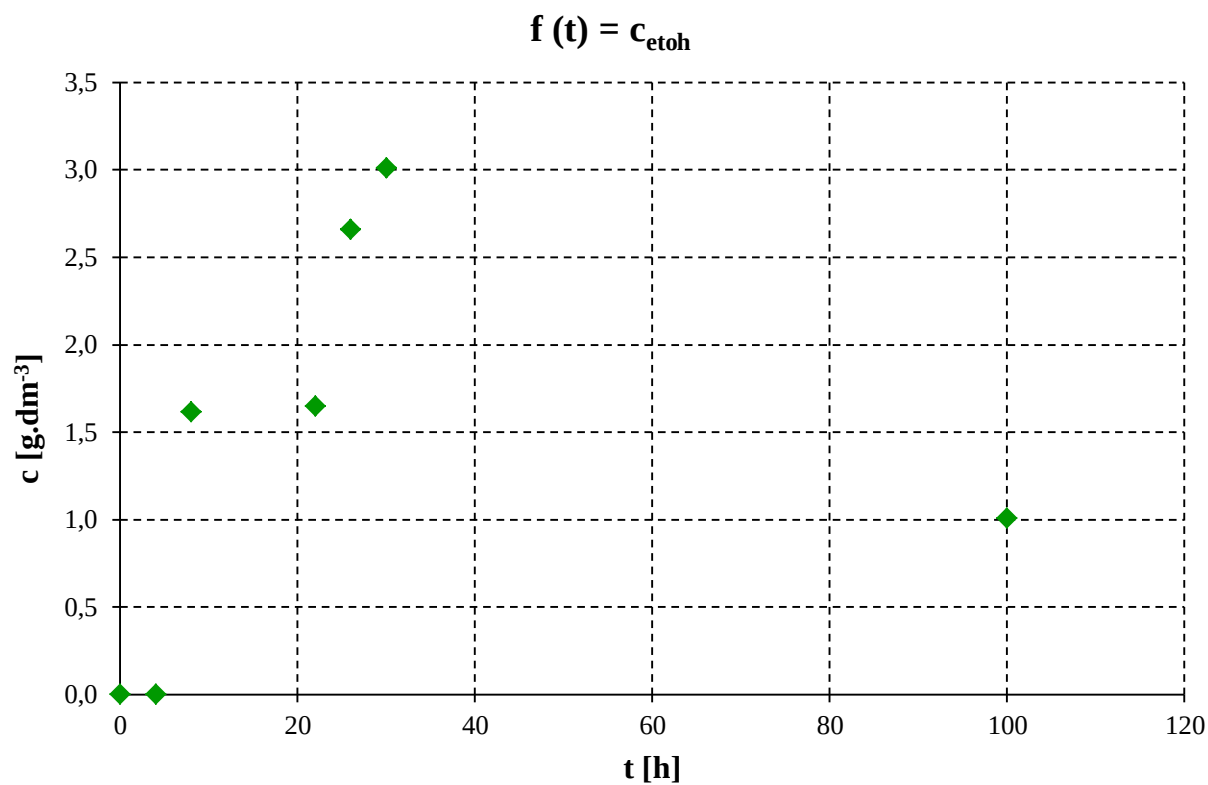
papír 1			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	141,76	1,6141
4	22	144,35	1,6476
5	26	222,33	2,6570
6	30	249,54	3,0091
7	100	94,69	1,0049

Tabulka 15: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku

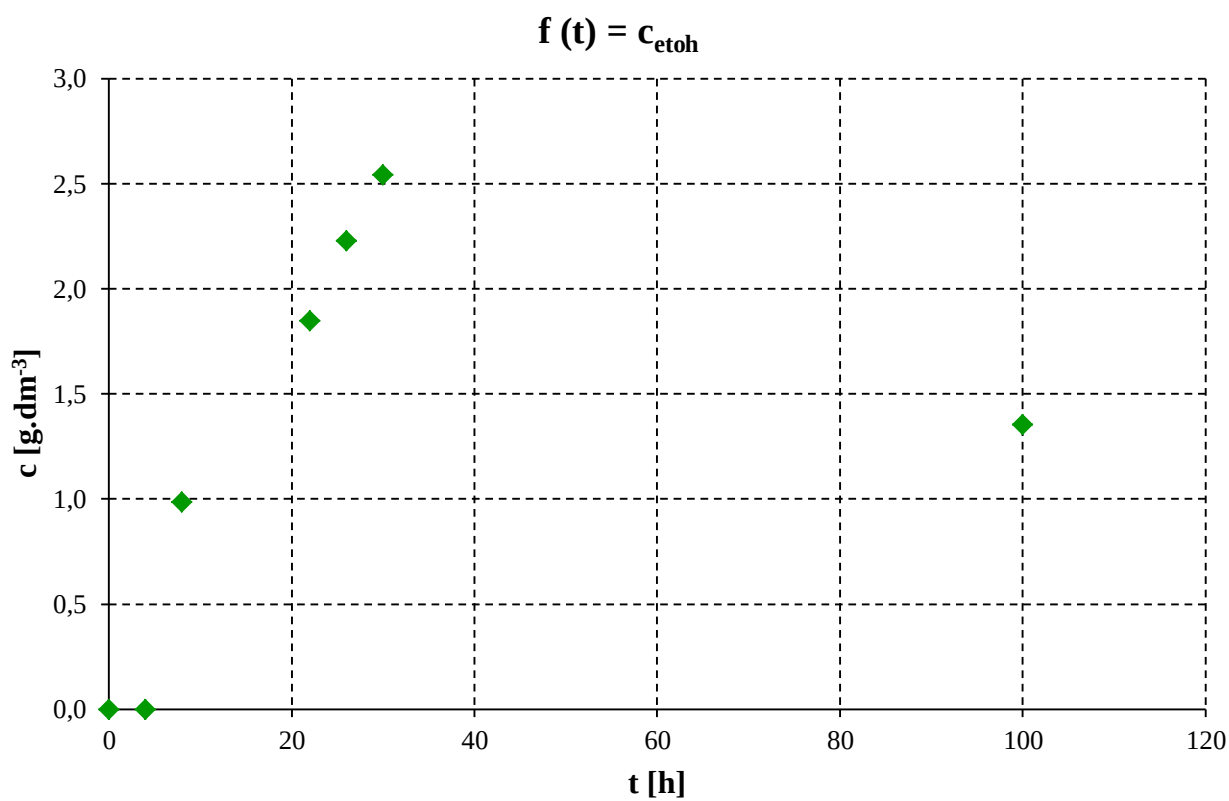
papír 2			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	93,33	0,9873
4	22	159,97	1,8498
5	26	189,41	2,2309
6	30	213,66	2,5447
7	100	121,84	1,3562

Tabulka 16: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku

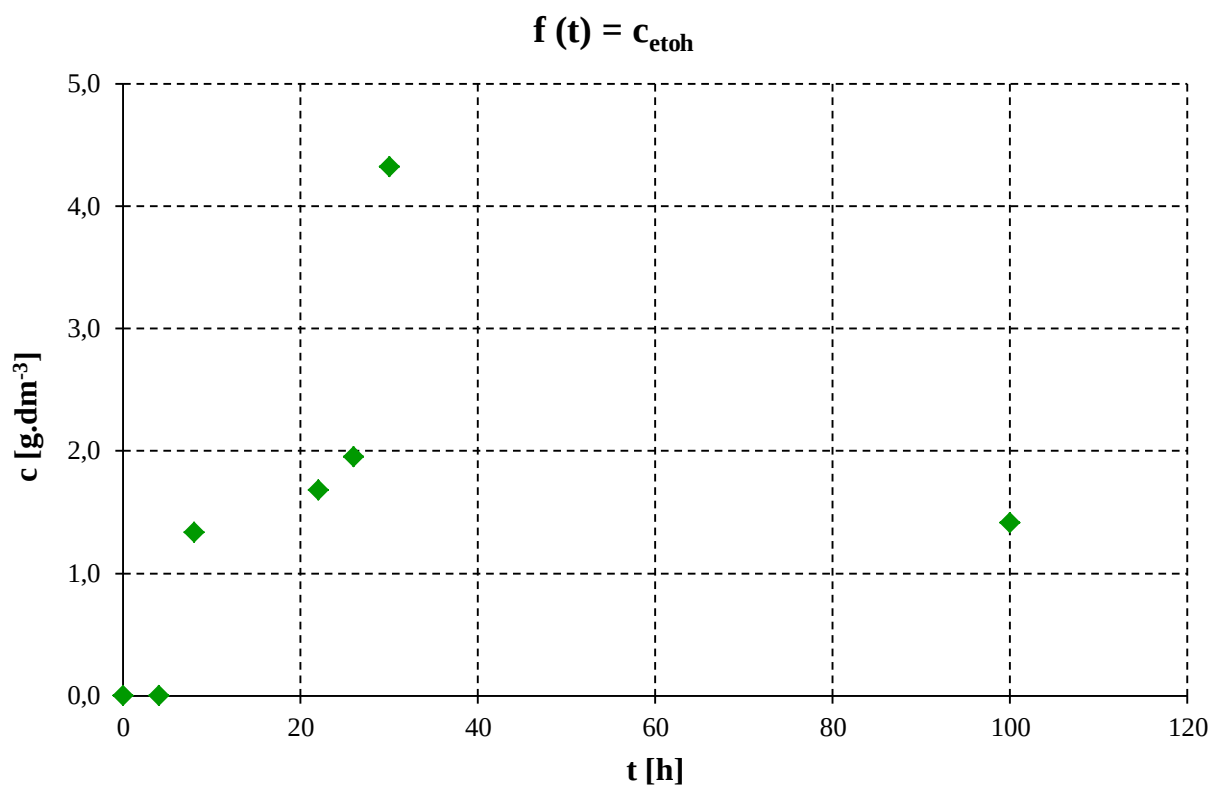
papír 3			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	119,87	1,3308
4	22	146,71	1,6782
5	26	167,68	1,9495
6	30	350,62	4,3174
7	100	125,99	1,4101

Graf 11: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 1)

Graf 12: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 2)



Graf 13: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 3)



Na grafech 11 – 13 je znázorněna produkce bioethanolu v závislosti na čase v jednotlivých médiích. Srovnávací graf nebyl sestaven z důvodu překrývajících se hodnot a nepřehlednosti. Ve všech médiích byla pozorována produkce v čase 8 h po zaočkování. V čase 8 h byly buňky ve fázi zrychleného růstu, ale přecházely již do exponenciální fáze růstu, kdy docházelo k nejznatelnějšímu úbytku glukózy. Největší produkce byla zaznamenána v médiu papíru 3 v čase 30 h, a to $4,3174 \text{ g.dm}^{-3}$. V posledním odebíraném vzorku, v čase 100 h, byl pozorován výrazný pokles koncentrace bioethanolu. Pokles byl způsoben vytěkáním bioethanolu z média, které bylo uzavřeno vatovými zátkami, a kultivace probíhala při 30°C . Mezi 10 – 20 h pozorujeme částečnou stagnaci produkce bioethanolu, což je způsobeno bouřlivou exponenciální fází, kdy docházelo především k tvorbě biomasy.

Produkce bioethanolu nebyla příliš velká, ale byla zaznamenána produkce kyseliny mléčné, což poukazuje na nevhodné podmínky pro produkci bioethanolu. Nevhodnými podmínkami v tomto případě rozumíme zavzdušňování média při jednotlivých odběrech vzorků. Přístup kyslíku totiž snižuje dostupnost NADH pro redukci acetaldehydu na ethanol alkohol dehydrogenázou. [24]

Tabulka 17: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku

papír 1			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm^{-3}]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	0,00	0,0000
4	22	241,31	4,7751
5	26	245,58	4,8437
6	30	271,63	5,2611
7	100	427,41	7,7578

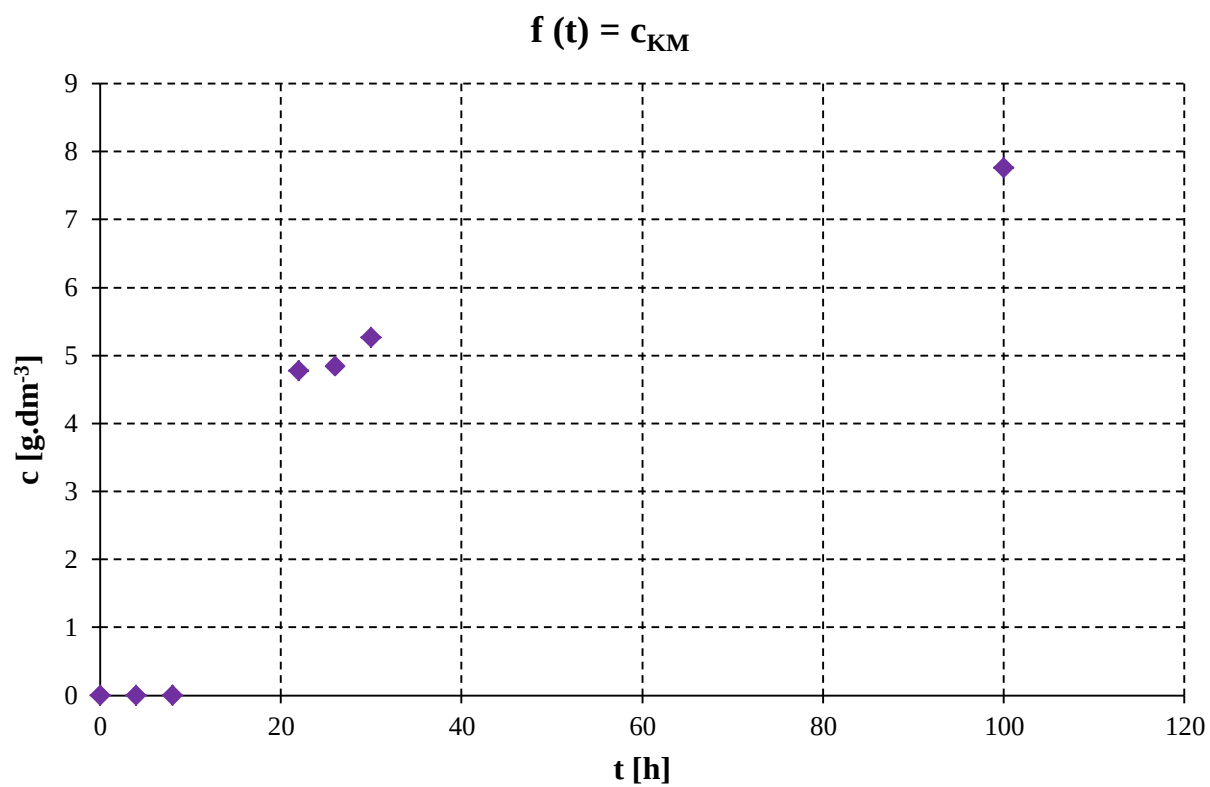
Tabulka 18: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku

papír 2			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm^{-3}]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	0,00	0,0000
4	22	201,55	4,1380
5	26	237,55	4,7150
6	30	259,61	5,0684
7	100	480,36	8,6064

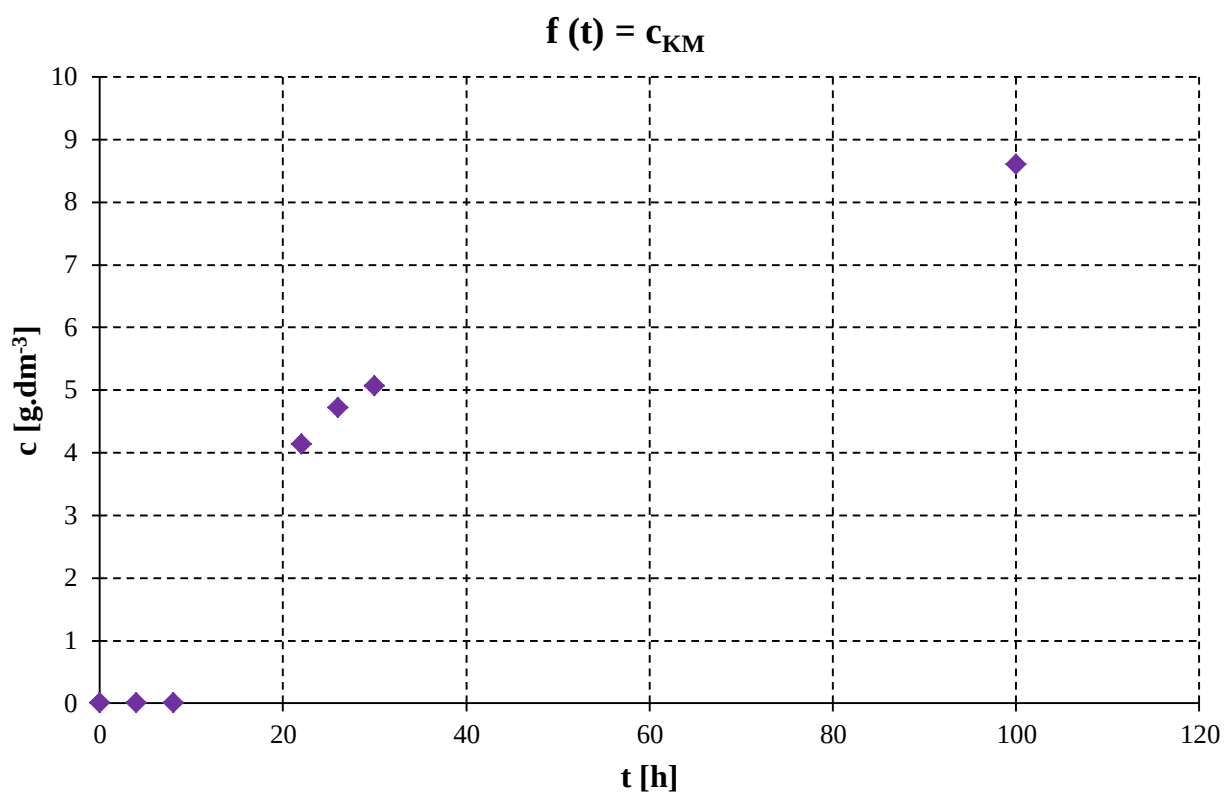
Tabulka 19: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku

papír 3			
vzorek	t (h)	A [mV.s]	c [g.dm ⁻³]
1	0	0,00	0,0000
2	4	0,00	0,0000
3	8	0,00	0,0000
4	22	177,99	3,7603
5	26	201,76	4,1414
6	30	278,76	5,3754
7	100	391,76	7,1864

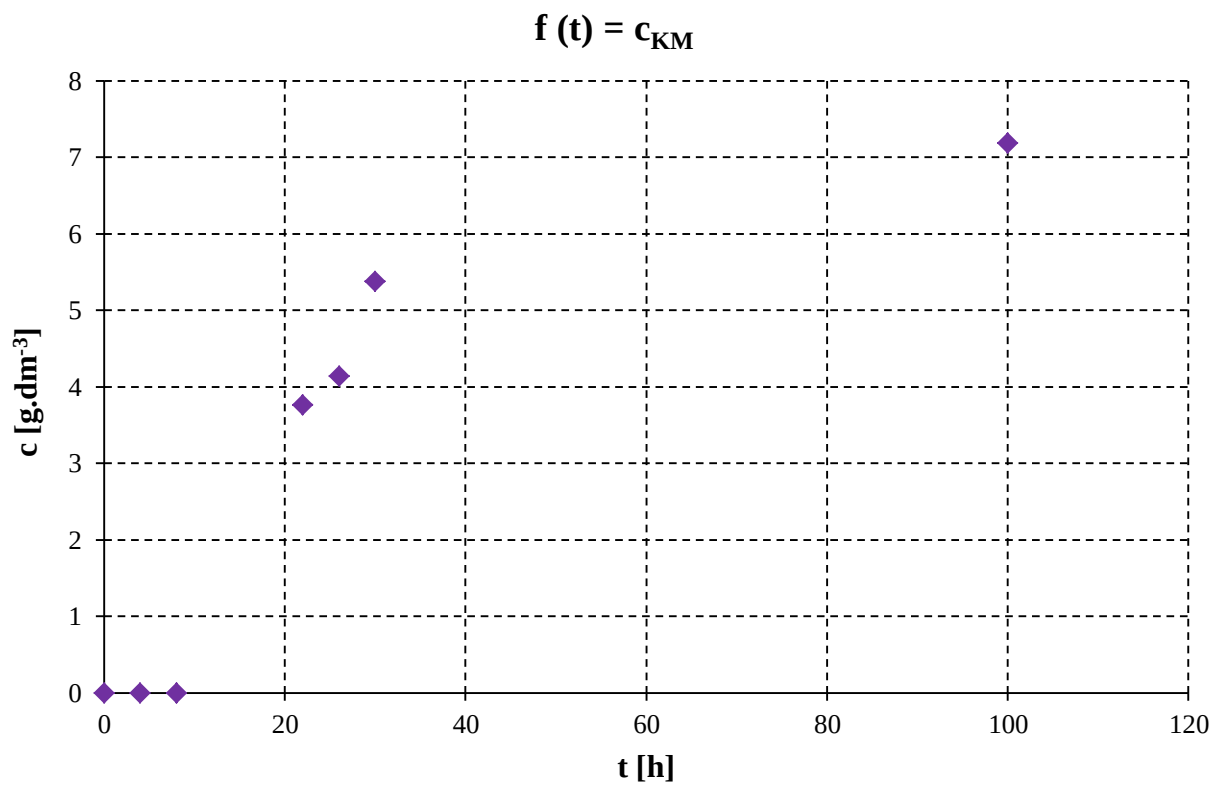
Graf 14: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 1)



Graf 15: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 2)



Graf 16: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 3)



Na grafech 14 – 16 je zobrazena produkce kyseliny mléčné v čase. První nárůst je možno pozorovat v čase 22 h a dále až do odběru v čase 100 h. Kyselina mléčná jako primárním metabolit tedy byla produkována v exponenciální fázi růstu, kde docházelo k nejznatelnějšímu úbytku glukózy. Největší koncentrace byla zjištěna v médiu papíru 2, a to $8,6064 \text{ g.dm}^{-3}$. Z tohoto je možné vyvodit přímou závislost mezi produkcí bioethanolu a kyseliny mléčné. Bioethanolu bylo vyprodukováno nejméně právě v médiu papíru 2, kde koncentrace kyseliny mléčné byla nejvyšší. Produkce kyseliny mléčné byla způsobena přílišným zavzdušňováním média při odebírání vzorků.

5 Závěr

Cílem práce bylo optimalizovat produkci bioethanolu pomocí *Zymomonas mobilis* na vybraných celulóзовých materiálech. Jako celulóзовý materiál byla použita odpadní papírovina. Tři druhy papíroviny poskytnuté různými společnostmi sloužily k optimalizaci a nalezení nejvhodnějšího média pro produkci bioethanolu. Jednotlivé papíry se lišily obsahem nečistot, jase, pH a také suchostí. Papíry byly poskytnuty společnostmi BIOCEL PASKOV, a.s., BUKÓZA EXPORT - IMPORT, a.s. a Lenzing Gruppe. Mechanické rozmělnění a enzymatická hydrolyza byly použity jako předúprava papírů za cílem co největšího výtěžku glukózy pro proces fermentace.

Největší množství glukózy bylo získáno z papíru 3, kde následně nejlépe rostly buňky a také její spotřeba byla v tomto médiu nejvyšší. Papír 3, který poskytla společnost Lenzing Gruppe, obsahoval dostatek celulózy, kterou pak bylo možno enzymatickou hydrolyzou rozložit na glukózu.

Růstové křivky byly sestaveny jako závislost optické hustoty na čase. Bylo možno dobře pozorovat jednotlivé fáze růstu buněk a následně vidět úbytek glukózy a produkci metabolitů, právě v závislosti na jednotlivých fázích růstu.

Jednotlivé hydrolyzáty byly zaočkovány kulturou *Zymomonas mobilis* LMG 457, která nese přesný název *Zymomonas mobilis subsp. mobilis* (Lindner 1928) Kluyver and van Niel 1936 AL. Kultivace probíhala vsádkovým způsobem, při 30 °C a pH 5.

Analýza produkce bioethanolu probíhala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a veškeré sledované hodnoty se v jednotlivých médiích lišily. Výtěžek bioethanolu nebyl příliš velký, protože nebyly vytvořeny optimální podmínky pro jeho produkci. Hlavním faktorem byl přístup kyslíku do média během kultivace. Při odebírání vzorků docházelo k promíchávání médií s kulturou a tím pádem i k provzdušnění. Na chromatogramech byla zaznamenána produkce kyseliny mléčné, která byla v případě média papíru 2 až trojnásobně vyšší než produkce bioethanolu.

Tabulka 20: Srovnání produkce bioethanolu a kyseliny mléčné

	Bioethanol	Kyselina mléčná
	c [g.dm ⁻³]	c [g.dm ⁻³]
papír 1	3,0091	7,7578
papír 2	2,5447	8,6064
papír 3	4,3174	7,1864

Ze srovnávací tabulky tedy plyne, že optimalizace produkce bioethanolu byla provedena a jako nejvhodnější médium můžeme označit papír 3. Tabulka zároveň poukazuje na přímou závislost produkce bioethanolu a kyseliny mléčné. V případě, že by tedy nedocházelo k přístupu kyslíku během kultivace produkce bioethanolu by byla daleko vyšší.

Seznam použité literatury

- [1] BALAT, Mustafa, Havva BALAT, Cahide ÖZ a Kaustav AIKAT. Progress in bioethanol processing: An overview. *Progress in Energy and Combustion Science* [online]. 2008, roč. 34, č. 5, s. 551-573 [cit. 2012-04-22]. ISSN 03601285. DOI: 10.1016/j.pecs.2007.11.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360128507000706>.
- [2] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [3] SARKAR, Nibedita, Sumanta Kumar GHOSH, Satarupa BANNERJEE a Kaustav AIKAT. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* [online]. 2012, roč. 37, č. 1, s. 19-27 [cit. 2012-04-22]. ISSN 09601481. DOI: 10.1016/j.renene.2011.06.045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096014811100382X>
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0600-1.
- [5] MULLER, P. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 1994, roč. 66, č. 5, s. 1077-1184 [cit. 2012-04-26]. ISSN 0033-4545. DOI: 10.1351/pac199466051077. Dostupné z: <http://iupac.org/publications/pac/66/5/1077/>
- [6] MASNÝ, Petr. Bioethanol jako alternativní palivo . *Dvorek.eu* [online]. 15.1.2008, -, [cit. 2011-12-05]. Dostupný z: <<http://www.dvorek.eu/article.do?articleId=4456>>.
- [7] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biotechnologie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1991, 182 s. ISBN 80-708-0121-2.
- [8] BRUMMER, Vladimír. Enzymatická hydrolýza odpadní papíroviny – zdroj suroviny pro výrobu kapalných biopaliv. Brno, 2010. 93 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [9] Formation and Chemistry of Wood: Chemical Composition of Wood. In: *The Nature of Wood and Wood Products* [online]. [cit. 2012-04-22]. Dostupné z: <http://ifbholz.ethz.ch/natureofwood/pc/ch/ch12.html>
- [10] HARUN, Razif, W.S.Y. JASON, Tamara CHERRINGTON a Michael K. DANQUAH. WITHDRAWN: Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, roč. 81, č. 4, s. - [cit. 2012-04-22]. ISSN 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2010.07.071. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007001000>

- [11] SUN, Ye, Jiayang CHENG a John F KENNEDY. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Journal of Chemical Technology* [online]. 2006, roč. 81, č. 4, s. 623-635 [cit. 2012-04-22]. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
- [12] STAF, Marek. *Pyrolýza odpadní biomasy* [online]. Praha : VUT, 2003. 8 s. Seminární práce. VŠCHT v Praze. Dostupné z: <http://oei.fme.vutbr.cz/konfer/biomasa/Staf.pdf>
- [13] KOKRHELOVÁ, Květoslava; JIROUT, Tomáš. Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv. In *Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv* [online]. Praha : ČVUT, 2008 [cit. 2011-12-05]. Dostupné z: http://stc.fs.cvut.cz/History/2008/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf
- [14] BRANNÁ, Petra. Biotechnologie výroby průmyslového lihu Petra Branná Bakalářská práce [online]. Zlín : UTB, 2009. 45 s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Dostupné z : http://dspace.knihovna.utb.cz/bitstream/handle/10563/8437/brann%C3%A1_2009_bp.pdf?sequence=1
- [15] Fragments of cell flocs whose pili appear disrupted by centrifugation. In: *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. [cit. 2012-04-18]. Dostupné z: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/7/f5.html>
- [16] ČEJKOVÁ, Alena. *Biotechnologické aplikace mikroorganismů* [online]. Syllabus k předmětu. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/fpm-bak.pdf>
- [17] BAI, F.W., W.A. ANDERSON a M. MOO-YOUNG. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks: a review. *Journal of Chemical Technology* [online]. 2006, roč. 81, č. 4, s. 623-635 [cit. 2012-04-22]. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975007001000>
- [18] VESELÝ, Martin a kol.. VŠCHT PRAHA. *Mikrobní Technologie I, II* [online]. Praha: VŠCHT, 1999 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: www.vscht.cz/kch/download/sylaby/mikroII.pdf
- [19] ŠULÁK, Martin ; ŠMOGROVIČOVÁ, Daniela . *Bioethanol: současné trendy ve výzkume a praxi*. Chemické listy. 2008, 102, s. 108-115.
- [20] EXNAR, Petr , et al. *Praktická lihovarnická příručka*. Praha : Agrospoj Těšnov, 1998. Technologie výroby lihu, s. 143-174.
- [21] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

[22] Novozymes® . Novozymes® biomass kit : Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.

[23] Belgian co-ordinated collections of micro-organisms. *Belgian co-ordinated collections of micro-organisms* [online]. 16 December 2011 [cit. 2012-04-25]. Dostupné z: <http://www.straininfo.net/strains/27719/browser>

[24] PANESAR, Parmjit S, Satwinder S MARWAHA a John F KENNEDY. Zymomonas mobilis: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology* [online]. 2006, roč. 81, č. 4, s. 623-635 [cit. 2012-04-22]. ISSN 0268-2575. DOI: 10.1002/jctb.1448. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1448>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura celulosy [8]	9
Obrázek 2: Hemicelulosa [9]	10
Obrázek 3: Schematické znázornění synergického působení jednotlivých enzymů	13
Obrázek 4: Schéma výroby bioethanolu [13]	14
Obrázek 5: Mikroskopický obraz <i>Zymomonas mobilis</i> [15]	15
Obrázek 6: Glykolýza a alkoholové kvašení [17]	16
Obrázek 7: Metabolismus <i>Zymomonas mobilis</i> [17]	17
Obrázek 8: schéma chromatografu [21]	18
Obrázek 9: Ultrospec™ 10 Cell Density Meter	20

Seznam tabulek

Tabulka 1: Produkce bioethanolu z různých surovin [1]	9
Tabulka 2: Klasifikace a vlastnosti enzymů [22]	19
Tabulka 3: Klasifikace a vlastnosti papírů	21
Tabulka 4: Množství živin pro přípravu inokula	22
Tabulka 5: Podmínky a parametry analýzy	23
Tabulka 6: Stanovení sušiny	23
Tabulka 7: Závislost optické hustoty na čase	24
Tabulka 8: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku	26
Tabulka 9: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku	26
Tabulka 10: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku	26
Tabulka 11: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku	28
Tabulka 12: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku	28
Tabulka 13: Závislost koncentrace glukózy na ploše píku	29
Tabulka 14: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku	31
Tabulka 15: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku	32
Tabulka 16: Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku	32
Tabulka 17: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku	34
Tabulka 18: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku	34
Tabulka 19: Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku	35
Tabulka 20: Srovnání produkce bioethanolu a kyseliny mléčné	38

Seznam grafů

Graf 1: Růstová křivka <i>Zymomonas mobilis</i> v médiu papíru 1	24
Graf 2: Růstová křivka <i>Zymomonas mobilis</i> v médiu papíru 2	25
Graf 3: Růstová křivka <i>Zymomonas mobilis</i> v médiu papíru 3	25
Graf 4: Kalibrační křivka pro glukózu	27
Graf 5: Kalibrační křivka pro ethanol	27
Graf 6: Kalibrační křivka pro kyselinu mléčnou	28
Graf 7: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 1)	29
Graf 8: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 2)	30
Graf 9: Závislost úbytku glukózy na čase (papír 3)	30
Graf 10: Srovnávací graf úbytku glukózy	31
Graf 11: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 1)	32
Graf 12: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 2)	33
Graf 13: Závislost produkce ethanolu na čase (papír 3)	33
Graf 14: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 1)	35
Graf 15: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 2)	36
Graf 16: Závislost produkce kyseliny mléčné na čase (papír 3)	36