

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

Studijní obor: Všeobecné zemědělství  
Katedra: Aplikovaných rostlinných biotechnologií

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**  
**Hydrolyza kukuřičné siláže**

Vedoucí diplomové práce:  
**Prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.**

Autor:  
**Václav Míka**

---

2010

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Hydrolýza kukuřičné siláže“ vypracoval samostatně a na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v seznamu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b) zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

.....

V Českých Budějovicích 25. 4. 2010

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu práce Prof. Ing. Stanislavu Kuželovi, CSc. za odborné vedení a vstřícný přístup k řešení problémů a komplikací. V neposlední řadě bych také rád poděkoval konzultantovi práce Ing. Josefu Marouškovi, Ph. D. za odborné vedení, dohled, cenné rady a pomoc při práci v laboratoři.

## **Abstract**

Aim work is compare yield GE at acid, alkalic and enzymatic hydrolysis cellulose phytomass at different acidity ( $H_2SO_4$ , 3, 6, 9 and 12%), fundamentals (NaOH, 3, 6, 9 and 12%) and while using different enzymatic preparations (6 preparations to hydrolysis celluloses and hemicelluloses). Further is assessed positive influence compressive extrusion (0,3MPa and 1MPa).

**KEYWORDS:** Hydrolysis; cellulose; maize; enzymes

## **Souhrn**

Cílem práce je porovnat výtěžnost GE při kyselé, zásadité a enzymatické hydrolýze celulózové fytomasy při různých koncentracích kyseliny ( $H_2SO_4$ , 3, 6, 9 a 12%), zásady (NaOH, 3, 6, 9 a 12%) a při použití různých enzymatických preparátů (6 preparátů k hydrolýze celulóz a hemicelulóz přidávaných v množství 50 nebo 100 jednotek). Dále je hodnocen pozitivní vliv tlakové extruze (0,3MPa a 1MPa).

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Hydrolýza; celulóza; kukuřice; enzymy

### **Seznam zkratk:**

GE = glucose equivalent; celkové množství redukujících cukrů obsažených ve škrobovém hydrolyzátu; g/kg

CEA= cellulose enzyme activity (mg celulózy, které za sekundu hydrolyzuje 1 gram enzymu, S(mg)/t(s)/E(g)

## OBSAH

1. ÚVOD.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
2.1 Kukuřice.....	9
2.1.1 Kořenový systém.....	9
2.1.2 Stéblo.....	10
2.1.3 Listy.....	10
2.1.4 Květenství a květ.....	10
2.1.5 Kukuřičná siláž.....	11
2.2 Suroviny k výrobě alkoholů.....	11
2.2.1 Lignocelulózový materiál.....	11
2.3 Předúprava substrátu.....	14
2.4, Hydrolýza.....	14
2.4.1 Kyselá hydrolýza.....	15
2.4.2 Zásaditá hydrolýzy.....	17
2.4.3 Enzymatická hydrolýza.....	17
2.5 Produkty kvašení.....	24
2.5.1 Bioetanol.....	24
2.5.2 Biobutanol.....	28
3. CÍL PRÁCE.....	30
4. MATERIÁL A METODIKA.....	30
4.1 Kyselá hydrolýza.....	30
4.2 Zásaditá hydrolýzy.....	30
4.3 Enzymatická hydrolýza.....	31
4.4 CEA.....	31
4.5 Obsah GE.....	32
4.6 Obsah zkvasitelných látek.....	33
4.7 Popis enzymových preparátů.....	33
5. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	36
5.1 Kyselá hydrolýza.....	36
5.2 Zásaditá hydrolýza.....	38
5.3 Enzymatická hydrolýza.....	40
6. ZÁVĚR.....	45

7. POUŽITÁ LITERATURA.....	46
----------------------------	----

## 1. ÚVOD

Hospodářský rozvoj našeho státu byl po léta zakládán na těžbě a spalování uhlí, jehož zásoby v přepočtu na jednoho obyvatele patřily k největším na světě. V době největšího rozvoje těžby to bylo více než deset tun uhlí na každého z nás ročně a jen postupně se uhlí nahrazuje kapalnými a plynnými palivy. Opět se však jedná o paliva fosilní, jejichž spalováním se uvolňuje oxid uhličitý a způsobuje, že se podstatnou měrou zesiluje skleníkový jev. Změny klimatu jsou tak do značné míry způsobeny energetikou a dopravou, obecně spotřebou fosilních zdrojů (Petříková a kol. 2006).

Zásadními opatřeními jsou snižování spotřeby energie a nahrazování neobnovitelných zdrojů zdroji obnovitelnými (Petříková a kol. 2006).

Se stále rostoucím trendem alternativních zdrojů energie roste mj. i poptávka po biopalivech. Jejich výroba probíhá v několika na sebe navazujících procesech. V první fázi se musí provést mechanické úpravy suroviny (mletí, drcení apod.), aby byla dosažena lepší účinnost následné hydrolýzy, která se provádí z důvodů rozložení složitých cukrů na jednoduché, jež jsou dále zpracovatelné při fermentaci. Po ní následuje separace paliva, při níž se oddělí využitelný produkt od odpadu (Kokrhelová, Jirout, 2003).

Samotná produkce biopaliv na bázi alkoholu vyráběných procesem fermentace je již technologicky celkem dobře propracována. Před vlastní výrobou je však třeba cyklus zahájit hydrolýzou. Existují tři základní způsoby, jak fyto masu hydrolyzovat. Jedná se o kyselou, zásaditou a enzymatickou hydrolýzu. Tyto způsoby hydrolýzy je možné ještě modifikovat, a nebo společně kombinovat. Také je neustále prováděn výzkum, jak hydrolýzu zefektivnit.

Samotná hydrolýza je nenahraditelným startem při produkci biopaliv na bázi alkoholu. Po vlastní hydrolýze je již možné využít různých směrů dalšího zpracování, nicméně tento 'start' je podle současného poznání velmi důležitý a jeho efektivní provedení a následné získání co největšího množství kvalitního hydrolyzátu je rozhodující pro efektivitu následné produkce konkrétního biopaliva.

Jak už bylo řečeno, po hydrolýze přichází na řadu fermentace, jejímž produktem je v dnešní době nejčastěji bioetanol, ale na obzoru se objevují i takzvaná biopaliva druhé generace, mezi která patří například biobutanol, který má v mnoha ohledech lepší vlastnosti než bioetanol.

Nejčastějšími plodinami pro výrobu bioetanolu jsou cukrová řepa, brambory, kukuřice a obiloviny. Možné suroviny pro výrobu tohoto paliva jsou i méně významné obiloviny, jako jsou třeba čirok a čekanka. Pro produkci je možné využít i znehodnocené ovoce nebo odpad ze zemědělsko-lesnické činnosti jako je například sláma nebo dřevní štěpka.

## **2. LITERÁRNÍ PŘEHLED**

### **2.1 Kukuřice**

Kukuřice (*Zea mays* L.) patří do čeledi lipnicovitých (Poaceae) a skupiny kukuřicovitých (Maydeae) (Diviš 2000).

Je plodinou původně z tropických oblastí, pěstuje se však v rozmanitých klimatických podmínkách. Tato skutečnost byla umožněna rozvojem šlechtění, jehož výsledkem je fakt, že se dnes používá výhradně hybridní osivo (Šroller, Faměra 1997).

Kukuřice je jedna z nejvíce pěstovaných plodin na světě. V roce 2003 organizace FAO oznámila, že 163 zemí produkovalo celkově 640 milionů tun zrna. Deset zemí bylo odpovědných za 80 % světového celkového objemu výroby a jedna země, Spojené státy produkovala poněkud více než 40 % tohoto množství (Vondrášková 2005).

Na území České republiky se kukuřice pěstuje od počátku století. Kukuřičné zrno je důležitým komponentem pro krmné směsi. V poslední době vzrůstal význam kukuřice i u nás pro přímou lidskou výživu. Dále je kukuřice důležitou surovinou pro škrobárenský a kvasný průmysl a význam má i v oblasti léčiv (Šroller, Faměra 1997).

#### **2.1.1 Kořenový systém**

Kukuřice má svazčitý kořenový systém, jehož kořeny pronikají podle stanovištních podmínek poměrně hluboko do půdy (1,5 – 3m) a zajišťují dobré zásobování rostliny vodou ze značné hloubky. Převážná část jemných kořínků je však rozložena v orniční půdní vrstvě do hloubky 20 cm, kolem stébla v okruhu jednoho metru a více (Hruška 1962).



Způsob zakořeňování kukuřice ovlivňuje nejen odrůda, ale značně také vodní a tepelné poměry půdní. Rané nízké odrůdy nezakořeňují tak do hloubky a šířky jako vysokovzrůstné pozdní (Hruška 1962).

Podzemní orgány totiž ovlivňují chování a růst celé rostliny, zejména z hlediska odolnosti proti suchu a nízkým i vysokým teplotám. Dále působí na celý vývoj rostliny i zralost generativních orgánů. Významná je produkce auxinů, gibberelinů, cytokininů, vitamínů a jiných látek, které působí prostřednictvím kořenů a vzájemným působením mezi nadzemní a podzemní částí na celý metabolismus a růst, jeho zrychlení i zpomalení. Nemenší význam má i pohyb asimilátů a vitamínů z nadzemních částí do podzemních a jejich případný návrat zpět (Petr a kol. 1980).

### **2.1.2 Stéblo**

Stéblo kukuřice je plné (vyplněno dřevem) a je současně zásobním orgánem. Stéblo kukuřice je rozdělené kolénky (nody) na články (internódia). Články stébla nejsou stejně dlouhé. Nejkratší jsou bazální články. Výška stébla se v našich podmínkách v závislosti na hybridu pohybuje od 1,2 do 3,0 metrů (Diviš 2000).

### **2.1.3 Listy**

Listy jsou nejvýznamnější morfologickou strukturou rostlin. Jsou adaptovány pro zabezpečení celého komplexu procesů souhrnně označovaných jako fotosyntéza. V celé řadě rostlinných organismů představují listy rostlin orgány velmi specifické: tenké ploché útvary již napohled naznačují vývojové přizpůsobení k maximální absorpci slunečního záření a k maximálnímu zkrácení transportních drah při výměně plynů mezi vnitřním prostorem listu a okolní atmosférou (Procházka 1998).

### **2.1.4 Květenství a květ**

Kukuřice patří mezi rostliny jednopohlavné a jednodomé. Samčí tyčinkovité květy tvoří klásky v latách. Samičí pestíkové květy vytváří palice. Je to klas s hrubou hlavní osou, na které jsou zrna v řadách. Počet řad je obvykle od 8 do 18 (Diviš 2000).

### **2.1.5 Kukuřičná siláž**

Kukuřičná siláž patří k nejlevnějším objemným konzervovaným krmivům a současně krmivům s nejvyšší koncentrací energie. Silážní kukuřice se v porovnání s jinými krmnými plodinami vyznačuje až o 50 % nižšími náklady na produkci energie, vysokou potenciální produkcí a plně mechanizovanou sklizní. Složení sušiny silážní kukuřice je dobrým předpokladem k úspěšné konzervaci (Doležal a kol. 2008).

## **2.2 Suroviny k výrobě alkoholů**

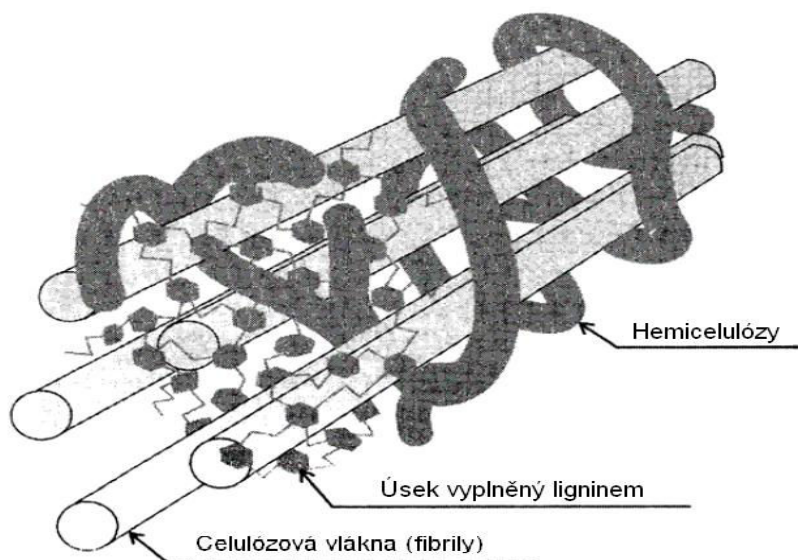
K výrobě alkoholů lze použít všechny suroviny, které obsahují přímo zkvasitelné cukry, a nebo polysacharidy, které lze převést enzymatickou, kyselou nebo alkalickou hydrolýzou na zkvasitelné cukry (Pelikán, Sáková, 2001). Z polysacharidů má pro kvasné procesy největší význam škrob a celulóza, z produktů jejich hydrolýzy pak i dextriny (Krumphanzl a kol. 1988). Suroviny lze rozdělit na cukernaté, škrobnaté a lignocelulózové. Mezi suroviny cukernaté patří ovoce, cukrovka, melasa a dextroner. Melasa je vedlejším produktem při zpracování cukrovky a dextroner je matečný louh po krystalizaci glukózy při její výrobě ze škrobu. Škrobnaté suroviny jsou brambory a obiloviny (Pelikán, Sáková, 2001). Lignocelulózové suroviny jsou tvořeny sulfitovými výluhy a hydrolyzáty dřeva, které vznikají působením chemických sloučenin, pořípadě tlaku na rostlinný materiál (ligninová, lignocelulózová a hemicelulózová rostlinná pletiva).

### **2.2.1 Lignocelulózový materiál**

Na lignocelulózové materiály je možno pohlížet jako na kompozitní materiály.

Pro pochopení procesů probíhajících při výrobě biopaliv je třeba věnovat pozornost jejich složení. Struktura lignocelulózových materiálů je složena zejména z celulózových vláken, tzv. fibril, což jsou ve vodě nerozpustné polysacharidy, které tvoří nosnou část celé rostliny. Fibrily jsou po celé délce obtáčeny rozvětvenými řetězci hemicelulózy a zbytek rostliny vyplňuje lignin, který zde působí jako „lepidlo“ (pojivo), držící všechno pohromadě.

Obrázek 1.: Stavba lignocelulózového substrátu

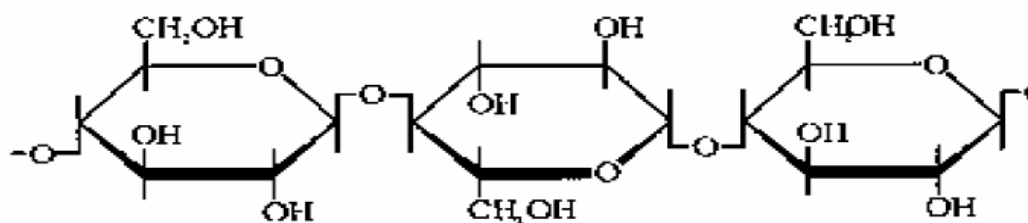


Zdroj: Kokrhelová a Jirout (2003)

### 2.2.1.1 Celulóza

Celulóza je všeobecně považována za nejrozšířenější substrát (Krumphanzl a kol. 1988). Vytváří krystalické formy a její různě prostorově orientované řetězce se skládají průměrně z tisíce molekul glukózy. Základní cukernou složkou celulózy je D-glukóza (Kokrhelová, Jirout 2003).

Obrázek 2.: Stavba celulózy



Zdroj: Kokrhelová a Jirout (2003)

Metody jejího využití závisejí na znalostech metod ekonomické konverze na přístupné formy uhlíku a energie. Za zdroje jsou považovány kromě primárních, obnovitelných i pevné městské odpady, zemědělské odpady z rostlinné, živočišné

a lesní výroby. Hlavním problémem, který je třeba zvládnout pro ekonomické získávání glukosy z celulózy je pomalá rychlost hydrolýzy. Pro zvýšení výtěžků extracelulárních celulóz je třeba optimalizovat produkci enzymů ve fermentorech volbou optimálních vnějších podmínek. Lignin představuje pro celulasu bariéru a je potřeba vyjasnit úlohu bakterií a nižších hub při jeho biodegradaci. Byl též zkoumán vliv peroxidu vodíku a železnatých iontů na depolymeraci hemicelulóz (Krumphanzl a kol. 1988).

### **2.2.1.2 Hemicelulózy**

Hemicelulózy jsou oproti celulóze složitější heteropolysacharidy, jsou amorfní a obsahují rozvětvené řetězce. Jsou podpůrnou, resp. prostorovou armaturou celého systému a současně i pojícím „cementem“ (Kokrhelová a Jirout 2003). Skládá se z pětiuhlíkatých sacharidů jako je xylóza či arabinóza spojených s glukózou (Hisano a kol. 2009).

Podléhají však rychleji enzymatické hydrolýze než celulóza (Kokrhelová a Jirout 2003).

Tvoří obvykle 11 až 37% hmotnosti sušiny lignocelulózy (Taherzadeh a Karimi 2007).

### **2.2.1.3 Lignin**

Lignin je aromatický prostorový heteropolymer fenolického typu se strukturou naprosto odlišnou od celulózy a hemicelulózy. Díky tomu je jeho struktura biologicky velmi obtížně rozložitelná a lignin je velmi odolný i proti biomethanizačním rozkladům. Ovšem pokud se nám podaří rozložit celulózu a hemicelulózu, lignin už nemá co držet pohromadě a sám se rozpadne (Kokrhelová a Jirout 2003).

Spojení ligninu s celulózu a hemicelulózu má záporný dopad na produkci bioetanolu z lignocelulóзовých materiálů, protože znesnadňuje uvolňování polysacharidů během předúpravy materiálu a také absorbuje enzymy užívané pro zcukření (Hisano a kol. 2009).

Proto byla v několika rostlinných druzích studována funkce genů podílející se na biosyntéze ligninu. Z dostupných informací o genech a díky rozvoji rostlinné

technologie je nyní možné modifikovat či redukovat obsah ligninu v plodinách určených pro produkci biopaliv (Hisano a kol. 2009).

### 2.3 Předúprava substrátu

Nejjednodušší způsob fyzikální předúpravy je mechanické rozmělnování. Celulóza se z vnitřní struktury materiálu získává nejprve jeho lámáním, drcením a mletím, případně jejich kombinací. Velikost částic závisí na druhu zpracování a pohybuje se od 10-30 mm při lámání až po 0,2–2 mm u mletí. Tato operace je energeticky náročná a měla by vždy předcházet hydrolýze. Spojením fyzikálních a chemických postupů byly vyvinuty fyzikálně-chemické postupy. Nejpoužívanější z těchto způsobů předúpravy lignocelulóзовých materiálů je v současné době zpracování materiálu pomocí exploze vodní parou. Probíhá za vysokých teplot a tlaků, kdy se biomasa a přehřátá pára přivede na teplotu 160-260 °C (tomu odpovídá tlak 0,69-4,83 MPa), následuje setrvání na teplotě a poté prudké snížení tlaku až na tlak atmosférický. Může probíhat za vysokých teplot a krátké době setrvání na teplotě (270 °C, 1 min), nebo při nízkých teplotách a dlouhé výdrži (190 °C, 10 min). Nedávné studie však naznačují, že je vhodnější druhá varianta, tedy nízká teplota a delší čas výdrže (Kokrhelová a Jirout 2003).

### 2.4 Hydrolýza

Biomasa rostlinného původu má kompozitní strukturu, tvořenou zejména celulóзовými vlákny a řetězci hemicelulózy, spojené ligninem. Celulóza a hemicelulózy jsou složité sacharidy, které jsou tlakovou hydrolýzou rozkládány na jednoduché cukry za současného vzniku dalších látek. Získané cukry lze následně fermentovat a destilací získat bioetanol (nebo biobutanol) nebo z nich anaerobním procesem vyrobit bioplyn. Vedle toho je možné ze suspenze po hydrolýze získat látky, využitelné v chemickém průmyslu (fural, lignin, organické kyseliny) (Anonym 2009).

V dnešní době je nejvyužívanější hydrolýza kyselá a enzymatická.

K lehce hydrolyzovatelným polysacharidům patří hemicelulózy, glukany a xylany, k obtížně štěpitelným pak celulóza (Krumphanzl a kol. 1988).

Hydrolýza celulózy na glukózu je zvažována ze tří hledisek:

- původ a vlastnosti suroviny
- mechanická předúprava surovin
- vlastní konverze (Krumphanzl a kol. 1988)

### 2.4.1 Kyselá hydrolýza

Principem kyselé hydrolýzy je vystavení substrátu kyselině při specifické teplotě a po určitou dobu. K hydrolýze je nejčastěji používána kyselina sírová, ale užívají je i jiné kyseliny, například kyselina chlorovodíková (Taherzadeh a Karimi 2007).

Kyselá hydrolýza může být rozdělena do dvou skupin, a to na hydrolýzu pomocí koncentrované kyseliny a hydrolýzu pomocí zředěné kyseliny (Taherzadeh a Karimi 2007).

Tabulka 1.: Porovnání hydrolýzy pomocí koncentrované a ředěné kyseliny:

Metoda hydrolýzy	Výhody	Nevýhody
Pomocí koncentrované kyseliny	Provádění při nižší teplotě, vysoký výnos cukru	Vysoká spotřeba kyseliny, koroze přístrojového vybavení, delší reakční čas (2 až 6 h), vysoká spotřeba energie pro obnovu kyseliny
Pomocí ředěné kyseliny	Nízká spotřeba kyseliny, kratší doba působení	Provádění za vysokých teplot, koroze přístrojového vybavení, nízký výnos cukru, tvorba nežádoucích vedlejších produktů

Zdroj.: Taherzadeh a Karimi (2007)

#### 2.4.1.1 Hydrolýza pomocí koncentrované kyseliny

Hydrolýza lignocelulózy prostřednictvím koncentrované kyseliny sírové nebo chlorovodíkové je poměrně starý proces. Oproti hydrolýze pomocí ředěné kyseliny přináší vyšší výnos zkvasitelných cukrů a tím i následnou vyšší produkci bioetanolu. Navíc jsou tyto procesy prováděny za nižších teplot (například 40°C),

což je oproti hydrolýze pomocí zředěných kyselin jasná výhoda. Na druhou stranu je koncentrace kyseliny při této metodě velmi vysoká (například 30 - 70%), a roztok a výpary koncentrované kyseliny působí značně korozivně. Proto proces vyžaduje drahé slitiny nebo keramické části zařízení. Vysoká investiční náklady a náklady na údržbu velmi zredukovali zájem o komerční využití této metody (Taherzadeh a Karimi 2007).

I přes výše popsané nevýhody je tato metoda zajímavá a je využívána v procesu nazvaném „Biosulfurol“ jedné nizozemské výzkumné skupiny. V tomto procesu je biomasa impregnována s 70% kyselinou sírovou a následně hydrolyzována přidáním vody. Kyselina je pak obnovena částečně aniontovými membránami, částečně ve formě  $H_2S$  při anaerobním čištění odpadních vod (Taherzadeh a Karimi 2007).

#### **2.4.1.2 Hydrolýza pomocí ředěné kyseliny**

Hydrolýza pomocí ředěné kyseliny je pravděpodobně nejpoužívanější způsob chemické hydrolýzy. Tato metoda může být použita buď jako předstupeň pro enzymatickou hydrolýzu, nebo může být použita přímo k hydrolýze lignocelulózového substrátu na zkvasitelné cukry (Taherzadeh a Karimi 2007).

Převážná část hemicelulóz (více než 80%) by mohla být při této metodě hydrolyzována při teplotě pod 200°C. Maximální výnos glukózy nastal ale až při teplotách vyšších než 220°C. To je způsobeno větší odolností celulózy vůči hydrolýze (Taherzadeh a Karimi 2007).

Hlavními nedostatky této metody je degradace sacharidů během hydrolitických reakcí a vznik nežádoucích vedlejších produktů. To snižuje nejen výnos zkvasitelných cukrů, ale některé z vedlejších produktů inhibují tvorbu bioetanolu během fermentačního procesu. Aby nedocházelo k degradaci sacharidů a tvorbě inhibitorů, je tato metoda prováděna ve dvou stupních. Nejdříve jsou nastaveny nižší teploty (120- 170°C) a dojde k převodu hemicelulózy na monomery cukru. Následuje druhý stupeň, kdy se teplota zvýší a dojde k hydrolýze celulózy (Taherzadeh a Karimi 2007).

## 2.4.2 Zásaditá hydrolýza

Efekt alkalické hydrolýzy závisí na obsahu ligninu v materiálu. Jedná se o zmýdlování mezimolekulárních vazeb esterů. Alkalické zcukření přináší nejlepší výsledky u tvrdého dřeva (listnaté stromy), avšak u měkkého dřeva (jehličnany) s obsahem ligninu nižším než 26 % nebyl rozklad pozorován. V případě odstranění ligninu pomocí alkalických rozpouštědel se k hydrolýze užívá směs organických rozpouštědel (metanol, etanol, aceton apod.) a anorganických kyselin jako katalyzátoru. Proces probíhá při vysokých teplotách (asi 185 °C) a rozpouštědla se musí po ukončení procesu odstranit, aby mohly být produkty dále zpracovány (Kokrhelová a Jirout 2003).

K hydrolýze lze kromě organických rozpouštědel použít i hydroxid sodný nebo draselný. Tento způsob hydrolýzy se samostatně v praxi příliš neuplatňuje, protože je finančně náročný a poskytuje jen nízký výnos zkvasitelných cukrů. Častější využití této metody je v kombinaci, nejčastěji s enzymatickou hydrolýzou.

## 2.4.3 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza se skládá ze tří kroků: adsorpce enzymů celulózy na povrch 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, ale zvýší se i cena. Ale výhodou je, že se může celulóza získaná z kalové vody 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 toho docílit je přidat do roztoku tenzidy, které změní vlastnosti povrchu celulózy a minimalizují nevratné vázání celulózy na celulózu. Další je tzv. SSF metoda. Je to proces založený na současně probíhajícím zcukření a fermentaci vzniklých cukrů. Děj probíhá při teplotě 38 °C, což je kompromis mezi teplotou vhodnou pro hydrolýzu (45-50 °C) a teplotou fermentace (30 °C) a má následující výhody:

- nižší požadavky na enzymy
- vyšší produkce cukrů



- nižší požadavky na sterilní podmínky, protože glukóza je odstraněna ihned
- kratší čas
- vše lze provádět v jednom reaktoru

K nevýhodám patří:

- rozdílné teploty hydrolýzy a fermentace
- zpomalení enzymů etanolem
- schopnost přežití mikrorganismů produkujících enzymy v etanolu

(Kokrhelová a Jirout 2003)

### 2.4.3.1 Enzymy

Enzymy jsou vlastní katalyzátory biochemických reakcí. Jejich molekuly jsou obrovské bílkovinné vřasené struktury. Jednotlivé enzymy se od sebe liší jednak množstvím a sledem aminokyselin v proteinových molekulách, jednak druhem a stupněm zřasení neboli sekundární a terciární strukturou (Koštíř 1965).

Enzymy jsou obvykle vysoce specifické, to znamená, že určitý enzym katalyzuje pouze určitou reakci nebo její typ (Koštíř 1965).

Pokud se týká názvosloví, není u enzymů nesnadné, pokud máme reakci, kterou katalyzují nebo typ substrátu, který napadají. Jejich název končí příponou – *áza*. Například enzymy katalyzující hydrolýzu substrátu se souhrně nazývají hydrolázy. Určitý pořádek zavedla roku 1961 komise pro enzymy při Mezinárodní biochemické unii IUB (International Union of Biochemistry) společně s Názvoslovnou komisí pro biologickou chemii při IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry- tj. Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii), kde dostal každý, dnes už definovaný enzym svoje číslo. Jedná se o čtyřciferný kód, kde první číslice značí příslušnost enzymu do jedné ze šesti hlavních tříd, druhá do zařazení do podskupiny, třetí do podpodskupiny, čímž je definován typ katalyzované reakce, a konečně čtvrtá číslice je pořadí v podpodskupině. Nový enzym se pak postupně takto „zaškatulkuje“ (Koštíř 1965).

## **Enzymové třídy:**

### **EC.1. Oxidoreduktasy**

Tvoří třídu enzymů katalyzujících intermolekulární oxidačně- redukční reakce. Jsou jednou z nejpočetnějších tříd enzymů. Oxidoredukční děje realizují buď přenosem atomů vodíku nebo elektronů, případně vestavěním atomu kyslíku do substrátu (Havlová 1999).

### **EC.2. Transferasy**

Neboli Kinasy. Jsou to enzymy přenášející skupiny atomů mezi molekulami (Havlová 1999).

### **EC.3. Hydrolasy**

Za účasti molekul vody katalyzují štěpení různých vazeb (Špička 2004), které vznikly kondensací, například peptidové, glykosidové, esterové (Vodrážka 2002).

Jedná se o velmi početnou skupinu enzymů, vesměs povahy jednoduchých bílkovin (Vodrážka 2000).

### **EC.4. Lyasy**

Enzymy, které štěpí vazby C-C, C-O, C-N jiným způsobem než hydrolýzou nebo oxidací (Špička 2004). Zajišťují eliminaci skupin za vzniku dvojných vazeb (Havlová 1999). Od ostatních tříd enzymů se lyasy odlišují tím, že v jednom směru působí na jeden substrát, ale ve směru opačném na substráty dva (Špička 2004).

### **EC.5. Isomerasy**

Působí stechiometrické změny uvnitř molekul, intramolekulární oxidačně-redukční reakce a přenosy skupin (Havlová 1999). Pokud při reakci dochází k přenosu celé skupiny na jiný atom, používá se i termín mutasa (Špička 2004). Jedná se o nejméně početnou skupinu enzymů (Havlová 1999).

## EC.6. Ligasy

Katalyzují sloučení dvou látek, tedy vznik nových vazeb C-C, C-O, C-N. Při tom se energie potřebná pro vznik těchto vazeb získává současným štěpením energeticky bohaté látky, nejčastěji ATP (hydrolýzy ATP) (Špička 2004).

### 2.4.3.2 Enzymová aktivita

Důležitým výsledkem jednání komise bylo zavedení enzymových jednotek. Základní jednotka je U a je definována jako množství enzymu, které katalyzuje přeměnu jednoho mikromolu substrátu za minutu, za přesně určených podmínek, například teploty (pokud možno 25°C), optimálního pH, optimální koncentrace substrátu a podobně (Koštíř 1965).

Po zavedení jednotek SI byla pak v roce 1972 definována nová jednotka pro katalytickou aktivitu- katal. V roce 1981 zavedl IUPAC pro katalytickou aktivitu vyjádřenou v katalech název rychlost přeměny substrátu (Vodrážka 2002).

Enzym má aktivitu jednoho katalu, jestliže přemění jeden mol substrátu za jednu sekundu. Rozměr katalu je tedy  $\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . Katal je jednotka velmi velká, proto se většinou uplatňují její zlomky. V některých případech je užitečné uvádět takzvanou specifickou aktivitu, což je aktivita vztažená na množství bílkovin. Pokud máme čistý enzym, lze aktivitu vztáhnout i na mol enzymu (molární aktivita). Často je však k dispozici pouze enzymový preparát, v takovém případě se aktivita vztahuje například na ml enzymového preparátu (Špička 2004).

Fyzikálně- chemické vlastnosti celulózových materiálů, určující její využitelnost pro enzymovou degradaci jsou: tvar vlákna, velikost a difuzibilita reagujících molekul ve vztahu k velikosti a povrchovým vlastnostem hrubých kapilár a prostory mezi mikrofibrilami, stupeň krystalizace a polymerace celulózy, rozměry jejích jednotek a povaha látek spojených s celulózou. Minerální látky ovlivňují enzymové odbourání celulózy několika způsoby: podporují tvorbu vitamínů (biotin), inhibují růst a vývoj celulólytických mikroorganismů, ovlivňují přístup enzymů k celulóze kapilární strukturou buněk a specificky inhibují rychlost a rozsah enzymové hydrolýzy (Krumphanzl a kol. 1988).

### 2.4.3.3 Faktory ovlivňující rychlost enzymové reakce

Podobně jako chemická kinetika se také enzymová kinetika zabývá studiem faktorů, které ovlivňují rychlost chemické reakce (Špička 2004).

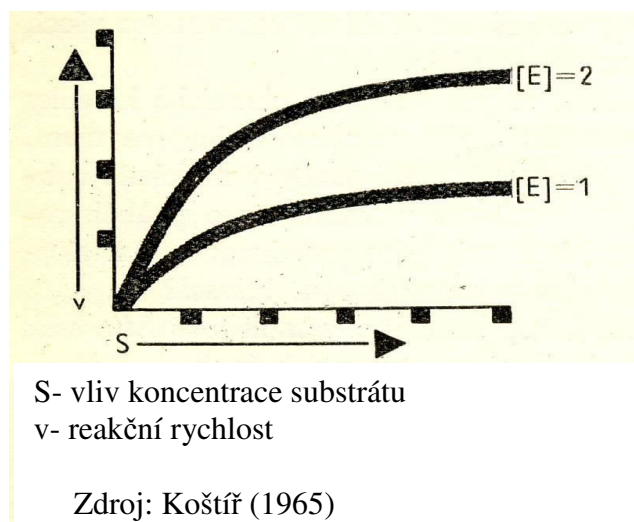
Mezi hlavní faktory patří: koncentrace substrátu a enzymu, teplota, pH a aktivátory a inhibitory (Špička 2004).

#### Koncentrace substrátu

Základní představa mechanismu působení enzymů vychází z toho, že enzym tvoří se substráty takzvaný enzymosubstrátový komplex, který se následně rozpadá na produkty a původní enzym (Špička 2004).

Sledováním rychlosti enzymové reakce při různé koncentraci substrátu za jinak stejných podmínek (například pH, teplota), zjistíme že reakční rychlost je funkcí koncentrace substrátu. Jejím zvyšováním rychlost reakce nejprve ostře roste, pak se její růst zpomaluje, až při určité koncentraci dosáhne maximální hodnoty, která se už dalším zvyšováním koncentrace substrátu nemění. Grafem této funkce je křivka, v podstatě jedna větev rovnoosé hyperboly. Maximální reakční rychlost je závislá kromě koncentrace substrátu také na koncentraci enzymu. Při nejvyšší reakci je povrch enzymu úplně nasycen substrátem, který je na jeho určitých záchytných místech adsorbován. Při nižších koncentracích enzymu reaguje substrát méně (i za vysoké koncentrace substrátu), protože je nižší „koncentrace“ záchytných míst. Za nízké koncentrace substrátu nejsou všechna místa enzymu obsazena, proto nemůže být rychlost katalyzované reakce maximální (Košťál 1965).

Obrázek 3.: Vliv koncentrace substrátu na rychlost enz. reakce

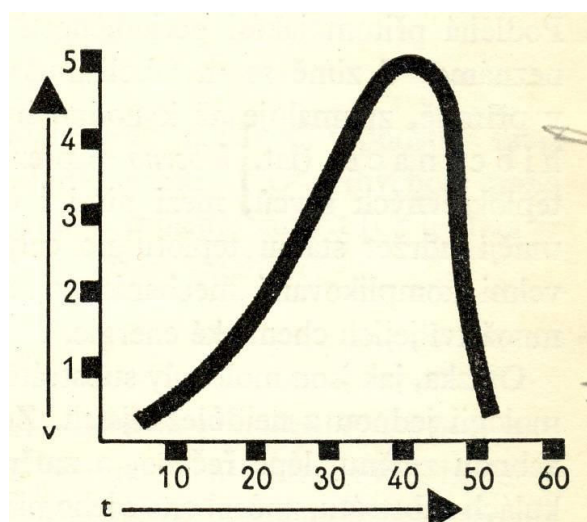


## Teplota

Zvyšováním teploty roste rychlost enzymové reakce, ale též rychlost rozkladu enzymu. Dosažením určité teploty se dosáhne nejvyšší rychlosti reakce, dalším zvyšováním teploty rychlost reakce klesá (Špička 2004). Výsledkem těchto dvou protichůdných dějů je vznik závislosti s maximem, které se nazývá optimální teplota enzymu (Vodrážka 2002).

Poloha maxima je dána termostabilitou enzymu, ale současně je též ovlivněna způsobem měření (dobou, po kterou necháme při jednotlivých teplotách enzymovou reakci probíhat). Čím kratší jsou tyto doby, tím méně se proces tepelné inaktivace uplatní a naměřené hodnoty budou vyšší (Vodrážka 2002).

Obrázek 4.: Teplotní optimum enzymu



t- teplota v °C  
v- reakční rychlost

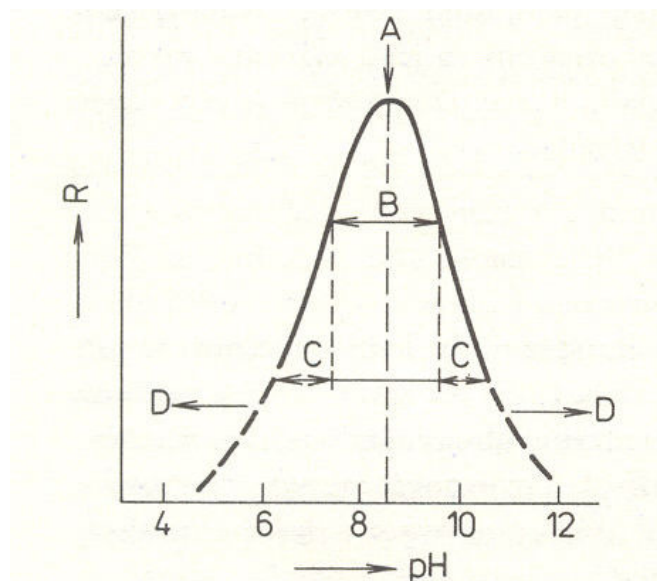
Zdroj: Koštíř (1965)

## pH

Na rychlost enzymové reakce má značný vliv pH prostředí. Je to dáno chemickým charakterem proteinů. Změny koncentrace vodíkových iontů a hydroxylových aniontů ovlivňují konformaci proteinových molekul a tedy i aktivního místa enzymu. Tomuto pH se říká optimální pH (Špička 2004).

Jedná se o charakteristickou konstantu enzymu, není však absolutní, protože do jisté míry závisí i na koncentraci daného substrátu. Kolísá však v pouze nepatrných mezích (Koštíř 1965).

Obrázek 5.: Optimální pH enzymu



R - počáteční rychlost reakce; pH - hodnota pH prostředí na počátku reakce; A - optimální pH; B - oblast stability enzymu; C - oblast reverzibilní inaktivace; D - oblast okamžité inaktivace

Zdroj: Valášek

### Aktivátory a inhibitory

Jako jiné katalyzátory, tak také enzymy mohou být snadno „otráveny“ různými jedy nebo zásahy tak, že ztrácejí svou účinnost. Mluvíme o inhibici nebo také inaktivaci (Košťál 1965). Je zajímavé, že mnohdy inhibitor jednoho enzymu může být aktivátorem enzymu druhého (Košťál 1965).

Podle mechanismu působení inhibitorů můžeme rozlišit několik typů inhibicí:

#### Kompetitivní

Inhibitor je strukturně podobný substrátu a stejně jako substrát se váže v aktivním místě enzymu. Na rozdíl od substrátu ale není přeměněn na povrch. Tento substrátu podobný inhibitor může být z vazby vytlačen substrátem (Špička 2004).

#### Nekompetitivní

Při této inhibici nemůže být inhibitor vytěsněn. Klasickým příkladem je vazba inhibitoru mimo aktivní místo enzymu. Funkce enzymu je změnou konformace nevratně blokována (Špička 2004).

## **Akompetitivní**

Inhibitor se váže na enzymosubstrátový komplex, nikoli na volný enzym (Špička 2004).

Řada enzymů vyžaduje pro svou funkci přítomnost iontů kovů. Ty se účastní vazby substrátu do aktivního místa enzymu. Bez jejich přítomnosti jsou enzymy neaktivní nebo mají výrazně sníženou aktivitu. Takové látky se označují jako aktivátory (Špička 2004).

Je zajímavé, že mnohdy inhibitor jednoho enzymu může být aktivátorem enzymu druhého (Koštř 1965).

## **2.5 Produkty kvašení**

### **2.5.1 Bioetanol**

Etanol neboli etylalkohol je jednomocný nasycený alkohol, získávaný kvašením, v čistém stavu představuje čirou, lehce pohyblivou kapalinu, příjemné vůně a pálivé chuti, která se s vodou smíchá v každém poměru, přičemž dochází ke smršťování objemu. Absolutní alkohol má měrnou hmotnost  $0,79425 \text{ kg.dm}^{-3}$ , vře při  $78,3^\circ\text{C}$ , mrzne při  $-112,3^\circ\text{C}$ . Ve směsi s vodou vykazuje bod varu vyšší, odpovídající přesně složení kapaliny (Pelikán, Sáková, 2001).

Etanol je dobrým rozpouštědlem pro čtené, ve vodě nerozpustné látky, jako jsou například pryskyřice, oleje, mastné kyseliny atd. Při neúplné oxidaci se mění na acetaldehyd, při úplné na kyselinu octovou. Pro vyšší i nižší živočichy je koncentrovaný etanol prudkým jedem, etanol vstříknut do krve působí okamžitou smrt (srdeční kolaps). Zředěný alkohol je při mírném používání pro lidský organismus neškodný, organismus osvěžuje a je zdrojem energie (Pelikán, Sáková, 2001).

Z historie není známo ve které zemi byl získán čistý etanol poprvé (Pelikán, Sáková, 2001), ale alkoholické kvašení i jiné biochemické pochody byly známy již v šerém dávnověku (Koštř 1965).

Tak vznikla například ve starém Egyptě báje o bohu Osirisovi, který naučil zasvěcence pěstovat vinnou révu a připravovat vína. Při alkoholickém kvašení

vznikalo velké množství plynu, unikajícího v bublinách. Zdálo se proto, že kvasná kapalina vřela. Jelikož vřít je latinsky *fervere*, bylo kvašení podle *Plinia* nazýváno fermentatio, na rozdíl od hnití, které nazval putrefactio (Koštíř 1965). Destilátu ze zkvašených surovin se přisuzovala zázračná moc a získání „vody života“ patřilo vedle nalezení „kamene mudrců“ k velkému umění. Čistý etanol se řadil k velkým cenným sloučeninám, jak o tom svědčí jeho pojmenování „rostlinné živé stříbro“ (Pelikán, Sáková, 2001).

I když výrobky z lihu byly známy od nepaměti, nevědělo se až do poloviny 17. století z jakých látek líh vzniká a tím méně, jak jeho tvorba probíhá. Po početných pokusech se podařilo objasnit tvorbu alkoholu až počátkem 19. století francouzskému badateli Gay-Lussacovi, který vyjádřil lihové kvašení známou rovnicí:



(Pelikán, Sáková, 2001)

Gay- Lussac si ovšem tehdy milně představoval, že jde o působení kyslíku na roztok cukru (Koštíř 1965).

Začátkem 20. století se zemědělské lihovary podílely na celkové produkci lihu asi z 90% a zbývajících 10% připadalo na výrobu lihu z melasy. Za 2. světové války byla zavedena výroba lihu ze sulfitových louhů (odpad při výrobě buničiny) a později se začal vyrábět etanol také chemickou cestou z etylenu. V posledních letech v souvislosti s energetickou krizí dochází v celém světě k prudkému rozvoji lihovarnického průmyslu, přičemž je výroba zaměřena na energetický etanol, který slouží buď sám, nebo ve směsích s benzinem, jako pohonná látka pro spalovací motory (Pelikán, Sáková, 2001).

### **2.5.1.1 Mechanismus etanolového kvašení**

Etanol mohou ve větším nebo menším množství produkovat nejrůznější mikroorganismy, v praxi se však uplatňují převážně kvasinky, a to z technologických i ekonomických důvodů. Kvasinky zaručují při optimálním vedení kvasných pochodů maximální výtěžnost, etanol je velmi čistý a standardní jakosti a svým charakterem odpovídá zpracované surovině. Mezi důležité činitele ovlivňující



činnost kvasinek a tím i průběh kvašení patří teplota, pH, koncentrace substrátu a inhibičních látek. Optimální teplota se pohybuje od 27 do 29°C, pro množení od 30 do 34°C. Smrtící teplota je kolem 55°C. Koncentrace alkoholu její vliv zesiluje. Vhodné pH je od 4,6 do 5,6, v alkalickém prostředí kvasinky hynou, v příliš kyselém degenerují. Koncentrace substrátu by se měla pohybovat okolo 16-18% cukru, při vyšší koncentraci se prodlužuje doba kvašení a zvyšuje se množství neprokvašeného cukru. Z inhibičních látek je třeba uvést stopy těžkých kovů (As, Pb, Zn), kyselina máselná (už při koncentraci 0,0005%), kyselina propiánová (0,001%) a kyselina octová (0,15%). Negativně působí i samotný alkohol, při koncentraci 4-5% obj. alkoholu se kvasinky přestávají množit, při koncentraci nad 17% obj. kvašení ustává (Pelikán, Sáková, 2001).

Během procesu kvašení vznikají četné přechodné a vedlejší produkty, z nichž většina je již známá v čisté formě. Zkvašování cukru tedy není jednoduchý, jednostupňový proces, ale komplex po sobě následujících chemických reakcí, z nichž každá je katalyzována vhodným enzymem. V podstatě probíhá lihové kvašení v devíti stupních: Hexóza se mění na hexosomonofosfát, ten dále na hexosodifosfát, postupně pak na 3-fosfoglycerinaldehyd, kyselinu 3-fosfoglycerínovou, kyselinu 2-fosfoglycerínovou, kyselinu fosfopyrohroznovou, acetaldehyd, a ten na konečný produkt etanol a oxid uhličitý. Největší význam z vedlejších produktů má glycerol, již z toho důvodu, že změnou reakce na alkalickou lze jeho množství zvýšit na 21-37% zpracovaného cukru. Používá se k výrobě výbušnin. Z vyšších jednosytných alkoholů, jako hlavní součást přiboudliny, jsou nejdůležitější isoamylalkohol, propylalkohol a butylalkohol. Přiboudlina je žlutohnědá tekutina, nepříjemného, ke kašli dráždícího, zápachu, v surovém lihu ji bývá obsaženo 0,1-0,5%. Z dalších produktů jsou zastoupeny acetaldehyd, kyselina jantarová, kyselina mravenčí, kyselina mléčná a kyselina octová. Kromě glycerolu a kyseliny jantarové jde vesměs o látky těkavé, které při destilaci přecházejí do destilátu a ovlivňují jeho složení a kvalitu (Pelikán, Sáková, 2001).

### **2.5.1.2 Cena bioetanolu**

Velké přebytky mléčných výrobků, cukru, masa a obilovin pamatují především obyvatelé bývalé EU 15. I u nás máme zkušenosti se snižováním zemědělské produkce. Prázdňá fráze charakterizující přebytky potravin byly

důsledkem zemědělské politiky EU před 20 lety. Vyústěním byla změna nařízení EU pro zemědělský trh v roce 1992. Poté bylo vydáno rozhodnutí, že část orné půdy (10%) zůstala neobdělána po určité vegetační období, aby se potlačila nadprodukce. Ale tato půda stále vyžaduje kultivaci, aby se udržela její úrodnost. Kultivace také chrání zásoby humusu a zabraňuje erozi minerálů. Jako náhradu obdrželi farmáři prémii za výměru v rozsahu od 250 do 300 EUR za hektar v závislosti na výnosech v oblasti. Tyto peníze použili na pokrytí nákladů na zatravnění a údržbu půdy. Alternativou pro farmáře je výroba energie. Jakékoliv oblasti ponechané ladem jsou používány pro pěstování energetických plodin. Každé nové odvětví, jestliže vytváří příjem pro zaměstnavatele a zaměstnance, má kladný vliv na ekonomiku země. Účinky jsou o to větší, jestliže obsahuje novou činnost, která nemá negativní dopady na jakékoliv stávající průmyslové odvětví a která nahrazuje předešlé dovozy s domácí přidanou hodnotou. Přitom se předpokládá jeho místo v celkové ekonomice vytvářením pracovních míst, požadováním meziproductů z ostatních průmyslových odvětví a vytvářením požadavku na investiční majetek, spotřební zboží a služby. Přispívá tudíž přímo a nepřímo ke zvyšování národní přidané hodnoty a vytváří pomocí různých daní (z příjmu, z obchodování, DPH atd.) a fiskálních poplatků doplňkový příjem pro státní pokladnu a pro sociální pojištění. Současně s tím přináší tento průmysl veřejné úspory v různých oblastech: pojištění v nezaměstnanosti a náklady na regulaci trhu pro různé přebytky na zemědělském komoditním trhu (Jevič 2009).

Pro každou průmyslovou biosyntetickou výrobu má výše nákladů na suroviny základní, i když vždy různým způsobem rozhodující význam. O využitelnosti surovin k výrobě biopaliv rozhodují do značné míry tyto ekonomické faktory: cena, náklady na zpracování, dostupnost, náklady na dopravu. Dalšími hledisky pro posouzení vhodnosti surovin jsou například nutnost úpravy suroviny před fermentací, nároky na energie a potřeba zařízení. Sdružování fermentačních kapacit do velkoobjemových investic pak činí ekonomické rozvahy odlišné od zpracování surovin v menších provozech. V každém případě musí být náklady na suroviny kompenzovány optimálním objemem výroby a kvalitou produktu (Krumphanzl a kol. 1988).

Surovina a technologie jsou při výrobě bioetanolu těsně propojeny. Přitom suroviny se mohou výrazně lišit svojí cenou, od odpadů se zápornou hodnotou po relativně drahý bramborový škrob (Cionová a Kittel 2004).

Tradičně je výroba bioetanolu spojena s využitím sacharidových složek obsažených v zemědělských plodinách. Touto cestou se ubíraly doposud všechny realizované programy výroby bioetanolu - Proálcool program v Brazílii v 70. letech na bázi cukrové třtiny, výroba gasoholu v USA od 80. let s využitím kukuřice, nebo v ČR nyní na bázi obilí. 70 - 80% nákladů na výrobu bioetanolu představuje cena suroviny. Vysoký obrát na ha je jeden z důvodů zájmu zemědělců o bioetanol. Prakticky lze bioetanol vyrábět z jakékoliv biomasy, zejména celulózy, včetně odpadů (zbytků z těžby dřeva, starého papíru, komunálních odpadů). Perspektivní jsou postupy založené na enzymatické hydrolýze polysacharidů. Je do určité míry paradoxní, že s rozvojem a integrací produkce bioetanolu právě tyto moderní technologie, nikoliv rafinerie, se mohou stát největším konkurentem zemědělců a tradičních lihovarů, které pro rozvoj výroby bioetanolu lobují. (Cionová a Kittel 2004).

Tabulka 2.: Porovnání cen bioetanolu produkovaného z různých plodin

<b>Plodina</b>	<b>Cena bioetanolu (US\$/m<sup>3</sup>)</b>
<b>Lignocelulóza (enzymatická hydrolýza)</b>	<b>180</b>
Cukrová třtina	260
Cukrová řepa	300 - 400
Kukuřice	300 - 420
<b>Lignocelulóza (kyselá hydrolýza)</b>	<b>450</b>
Syntetický etanol	540
Pšenice	770
Brambory	990

Zdroj: Cionová a Kittel (2004)

### 2.5.2 Biobutanol

Biopaliva se stala nedílnou součástí každodenního života moderní společnosti. Bioethanol a methylestery mastných kyselin tvoří běžnou součást produkčních benzinů a motorových naft, sice v omezeném množství, ale tlak na intenzivnější náhradu fosilních paliv bio-komponentami neustále sílí. I přes značné problémy spojené s vysokými výrobními náklady, technickými a logistickými problémy a negativním vlivem na cenu potravin v případě biopaliv tzv. 1. generace vývoj směřuje k biopalivům tzv. 2. generace, jejichž surovinovou

základnu tvoří zemědělská nepotravinářská produkce a odpadní biomasa. Mezi biopaliva 2. generace je řazen i biobutanol (Pospíšil a kol. 2008).

Předností biobutanolu je to, že na rozdíl od bioethanolu může být přidáván do motorových benzinů ve vyšší koncentraci, až 10 obj. %, a lze jej používat bez nutnosti modifikace motoru. Má až o 30 % vyšší energetický obsah v porovnání s bioethanolem. Provozní testy, které realizovaly firmy DuPont a BP, prokázaly, že směsné palivo s 16 % obj. biobutanolu má z hlediska dlouhodobého provozu motorových vozidel stejné vlastnosti jako palivo s 10 % bioethanolu a v řadě parametrů toto v USA dnes již běžné směsné palivo dokonce předčí (Pospíšil a kol. 2008).

Z hlediska praktických dopadů lze za velmi pozitivní označit to, že biobutanol v porovnání s bioethanolem prakticky nepohlcuje vodu, resp. v přítomnosti vody v palivu nepřechází do vodní vrstvy. Benziny obsahující biobutanol by tak mohlo být reálně přepravovat stávajícími liniovými potrubními systémy. Biobutanol je rovněž méně agresivní k většině konstrukčních materiálů, včetně plastů, než bioethanol. Výsledky testů bobtnání různých elastomerů ukazují, že benzín obsahující 20 % obj. ethanolu se chová obdobně jako čistě uhlovodíkové palivo (Pospíšil a kol 2008).

Připravuje se druhá generace technologických jednotek na výrobu biobutanolu. Tyto jednotky budou pracovat s novým biotechnologickým procesem o vyšším stupni konverze na biobutanol bez vedlejší produkce acetonu a ethanolu pomocí biokatalyzátoru. V USA se předpokládá jejich uvedení do provozu v roce 2010. Jako surovina se pro tyto procesy uvažují kromě dosud používaných kukuřice, cukrovky a cukrové třtiny také pšenice, maniok, sorghum a v delším časovém horizontu i dřevní odpad a rychle rostoucí celulóznové zdroje. Podle analýzy Well – to – Wheel je biobutanol ze všech hledisek výhodnější než bioetanol, včetně lepší energetické bilance i bilance CO<sub>2</sub> (Pražák 2006).

### **3. CÍL PRÁCE**

Cílem práce bylo porovnání výtěžnosti GE (redukujících cukrů) a alkoholu při kyselé, zásadité a enzymatické hydrolýze a při efektu tlakové extruze 0 MPa, 0,3 MPa a 1 MPa.

### **4. MATERIÁL A METODIKA**

Jako vzorek fytomasy byla použita kukuřičná siláž. Práce byla zaměřena na lignocelulózovou část siláže.

Hydrolýzy probíhali podle níže uvedených metodik. Pro vytvoření tlaku 0,3MPa byl použit sterilizátor Chirana HS 62A užitím silnostěnné tlakové nádoby, která byla opatřena tlakoměrem. Pro pokusy při tlaku 1MPa byl využit externí zdroj.

#### **4.1 Kyselé hydrolýza (Metodika dle Marouška)**

- 1) 50g sušiny fytomasy se máčí v 1 litru vody. Přidá se požadovaná koncentrace  $H_2SO_4$  (3, 6, 9, 12%)
- 2) v případě prováděné extruze je směs v co nejkratší době vyhřáta do požadovaného tlaku, kde je držena po dobu 30 minut
- 3) prudká dekomprese

#### **4.2 Zásaditá hydrolýza (Metodika dle Marouška)**

- 1) 50g sušiny fytomasy se máčí v 1 litru vody. Přidá se požadovaná koncentrace NaOH (3, 6, 9, 12%)
- 2) v případě prováděné extruze je směs v co nejkratší době vyhřáta do požadovaného tlaku, kde je držena po dobu 30 minut
- 3) prudká dekomprese

### 4.3 Enzymatická hydrolýza (Metodika dle Marouška)

- 1) 50g sušiny fyto­masy se máčí v 1 litru vody.
- 2) v případě prováděné extruze je směs v co nejkratší době vyhřáta do požadovaného tlaku, kde je držena po dobu 30 minut
- 3) prudká dekomprese
- 4) provede se zoptimalizování pH a teploty pro vybraný enzym
- 5) aplikuje se 50, nebo 100 jednotek CEA dle zvoleného enzymového preparátu
- 6) 6 hodin stálého míchání, kontroly pH a teploty

### 4.4 CEA (Metodika dle Marouška)

Enzymy rozkládající celulózu jsou dávkovány v celulóze enzyme activity (mg celulózy, které za sekundu hydrolyzuje 1 gram enzymu, S(mg)/t(s)/E(g), dále jen CEA):

- 1) Do 200ml Erlenových baněk navážit po 1,000g CMC (E466, sodná sůl karboxymethylcelulózy)
- 2) Přidat po 0,1g testovaného enzymu (0,1g = 2 kapky), (v případě slepých vzorků tento krok vynechat)
- 3) Vstříknout 10g destilované H<sub>2</sub>O tak, aby smyla případné zachycené zbytky po stěnách a promísila enzym s CMC
- 4) Dle charakteristiky enzymu upravit pu­frem pH (Sýkora, 1976)
- 5) temperovat v optimální teplotě dle charakteristiky enzymu po 30 minut
- 6) Přidat 15ml destilované H<sub>2</sub>O a 10ml měďnatého roztoku (na 1000 ml měďnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 350ml destilované H<sub>2</sub>O + 50g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> ve 100ml destilované H<sub>2</sub>O + 25g krystalického CuSO<sub>4</sub>. Destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 1000ml a vyčkat na rozpuštění (za studena 24h)).
- 7) 10 minut varu, následně rychlé ochlazení
- 8) přidat 5ml 30% roztoku KJ (na 200 ml 30% roztoku KJ: 60 g KJ + kapka 10 % NaOH (na 100ml 10% NaOH: 10 g NaOH + destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (na 1000 ml 25%

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 250 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 750ml destilované H<sub>2</sub>O). Při použití bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v mědnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

9) K titracím připravit zásobu 0,05 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (dále jen sirnatan), (na 2000ml sirnatanu: 25 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O + 2000ml destilované H<sub>2</sub>O).

10) Titrem „X“ (kde  $X \geq 0,02g \leq 0,03g$ ) KIO<sub>3</sub> + 1,5 g KJ v 50 ml 0,1 M HCl (na 1000 ml 0,1 M HCl: 8,8 ml HCl + 991,2 ml destilované H<sub>2</sub>O), se na titrátoru (pro DL 50 metodou J-titr) stanoví koeficient přesnosti 0,05 M sirnatanu (dále jen „Y“)

11) Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby sirnatanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745. Tato hodnota je jednotkou celulózo – enzymatické aktivity (CEA) a uvádí, kolik mg GE je za optimálních podmínek schopen daný enzym (m = 0,1g) rozštěpit z 1g celulózy za 30 minut.

#### 4.5 Obsah GE (Metodika dle Marouška)

Metoda je založena na principu, kdy redukující látky za varu v alkalickém prostředí redukují mědnatou sůl na Cu<sub>2</sub>O. Nezareagovaný přebytek Cu-soli se stanoví jodometricky ( $2Cu_2^+ + 4J^- \rightarrow 2CuJ + J_2$ ). Uvolněný jód se titruje sirnatanem ( $J_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow 2J^- + S_4O_6^{2-}$ ).

1) Do 200ml Erlenmayerových baněk se naváží po 1g hydrolyzátu

2) Vstříkne se 24g destilované H<sub>2</sub>O a 10ml mědnatého roztoku (na 1000ml mědnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 350ml destilované H<sub>2</sub>O + 50g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> ve 100ml destilované H<sub>2</sub>O + 25g krystalického CuSO<sub>4</sub>. Destilovaná H<sub>2</sub>O se doplní do 1000ml a vyčká se na rozpuštění (za studena 24h)).

3) 10minut varu, následně se rychle ochladí.

4) přidá se 5ml 30% roztoku KJ (na 200 ml 30% roztoku KJ: 60 g KJ + kapka 10 % NaOH (na 100ml 10% NaOH: 10 g NaOH + destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) destilovanou H<sub>2</sub>O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (na 1000 ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 250 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 750ml destilované H<sub>2</sub>O). Při použití bezvodého Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v mědnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

5) K titracím se připraví zásoba 0,05 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O (dále jen sirnatan), (na 2000ml sirnatanu: 25 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5 H<sub>2</sub>O + 2000ml destilované H<sub>2</sub>O).

6) titrem „X“ (kde  $X \geq 0,02g \leq 0,03g$ )  $KIO_3$  + 1,5 g KJ v 50 ml 0,1 M HCl (na 1000 ml 0,1 M HCl: 8,8 ml HCl + 991,2 ml destilované H<sub>2</sub>O), se na titrátoru (pro DL 50 metodou J-titr) stanoví koeficient přesnosti 0,05 M sirnatanu (dále jen „Y“).

7) Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby sirnatanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745, čímž se získají mg GE.g<sup>-1</sup> sušiny materiálu.

#### **4.6 Obsah zkvasitelných látek**

Objem zkvasitelných látek lze stanovit testem alkoholové výtěžnosti.

1) Stanovení sušiny fytohydrolyzátu

2) Do 3 baněk se odváží po 100g fytohydrolyzátu

a) varianta A se nechá původní

b) varianta B se ředí vodou 1:1

c) varianta C se ředí vodou 1:5

3) 1 balíček droždí (40g) se rozdrobí a rozmíchá se s 90ml vody na řídkou kašičku. Do každé z variant se přidá 1/3 objemu kašičky.

4) Při 29 až 30°C po 72 hodin

5) Po zkvašení se opatrně neutralizuje roztokem 0,1M NaOH na fenolftalein do slabě růžova.

6) Destiluje se do 200, či 250ml odměrky daný objem (t.j. zhruba 190 či 240ml).

7) Vytemperuje se na 20°C a doplní se destilovanou vodou po značku.

8) Alkoholometrem se zjistí obsah alkoholu. Za výsledek se bere ta varianta, jejíž ředění je optimální, tj. výtěžek alkoholu je po přepočtu největší.

#### **4.7 Popis enzymových preparátů**

##### **APN (Inosample APN)**

Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Aspergillus oryzae*. Katalyzuje rozklad celulózy na oligo- a monosacharidy.



Vlastnosti: Světle žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 5- 8, optimální pH 6- 7  
Teplotní rozsah 40- 60°C, optimální teplota 50- 55°C

#### **HMC (Inosample HMC)**

Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Humicola insolens*. Katalyzuje rozklad hemicelulóz,  $\beta$ - glukánů a celulózy na oligo- a monosacharidy.

Vlastnosti: Žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 5- 7, optimální pH 5- 6  
Teplotní rozsah 40- 60°C, optimální teplota 50- 60°C

#### **CLC (Inosample CLC)**

Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Trichoderma reesei*. Katalyzuje rozklad celulózy,  $\beta$ - glukánů a hemicelulóz na oligo- a monosacharidy.

Vlastnosti: Žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 4- 6, optimální pH 4,5- 5,5  
Teplotní rozsah 50- 65°C, optimální teplota 55- 65°C

#### **HMP (Inosample HMP)**

Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Trichoderma reesei*. Katalyzuje rozklad hemicelulóz na oligo- a monosacharidy.

Vlastnosti: Žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 6,5- 9, optimální pH 7- 8,5  
Teplotní rozsah 40- 60°C, optimální teplota 45- 55°C

#### **TK (Texazym bio- TK)**

Kombinovaný enzymatický prostředek určený pro rozklad celulóзовých a hemicelulóзовých substrátů na oligo- a monosacharidy dále zkvasitelné na bioplyn popř. biopaliva na bázi alkoholů.

Vlastnosti: Žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 6,5- 8,5, optimální pH 7- 8  
Teplotní rozsah 40- 60°C, optimální teplota 50°C

#### **APC (Texazym APC)**

Kombinovaný enzymatický prostředek určený pro rozklad celulóзовých substrátů na oligo- a monosacharidy dále zkvasitelné na bioplyn popř. biopaliva na bázi alkoholů.

Vlastnosti: Žlutohnědá kapalina, rozpustný v teplé i studené vodě  
Rozsah pH 4,5- 8, optimální pH 6- 7  
Teplotní rozsah 40- 60°C, optimální teplota 50°C

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE

Dohányos (2008) uvádí: „Zmenšením velikosti částic mechanickou nebo jinou dezintegrací dochází k podstatnému zvětšení povrchu a tím i k větší dostupnosti enzymovému rozkladu, u některých metod předúpravy dochází i k hydrolýze makromolekulárních látek.“

S touto myšlenkou se nerozhází žádný z výše citovaných autorů, jedná se o všeobecně uznávaný fakt. Dezintegrace materiálu před samotnou hydrolýzou je v praxi běžně užívána a zvyšuje efekt hydrolýzy.

### 5.1 Kyselá hydrolýza

Tabulka 3: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při kyselé hydrolýze

	% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
	3	6	9	12
bez efektu extruze	13,762	15,201	17,492	18,451
s efektem 0,3 MPa extruze	78,002	91,562	105,624	104,593
s efektem 1 MPa extruze	90,565	96,703	109,704	114,568

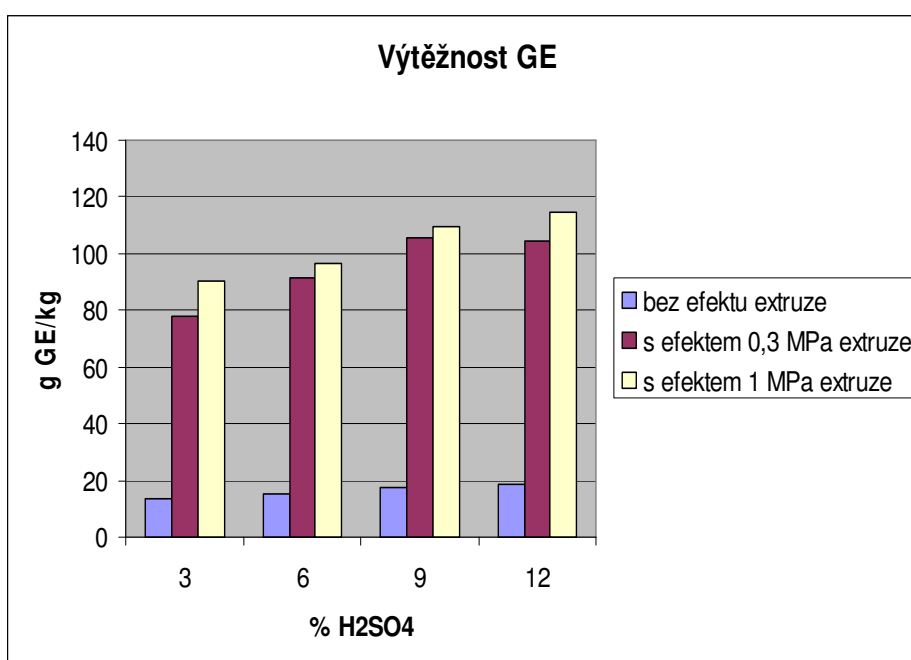
U kyselé hydrolýzy bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti GE při tlaku 1 MPa a koncentraci kyseliny sírové 12 %. Z výsledků je také zřejmé, že hydrolýza bez efektu extruze přináší v porovnání s hydrolýzou, kdy je efekt extruze použit, až více než šestkrát nižší výtěžnost GE. Pro co nejlepší výsledky hydrolýzy je tedy potřeba efektu extruze využívat.

Optimálními podmínkami a rychlosti kyselé hydrolýzy se mimo jiné zabývá i Kaštánek (2001). Říká: „Specifičnost hydrolytických technologií spočívá v tom, že rychlost hydrolýzy je zhruba přímo úměrná koncentraci katalyzátoru v oblasti zanedbatelného vlivu vnitřní a vnější difuze a v rozmezí koncentrace katalyzátoru (kyselina sírová) 0,1- 30%. Optimální technologii lze tedy hledat volbou koncentrace katalyzátoru a teploty, přičemž je horní hranice teploty omezena (kolem 280°C) kvůli degradaci sacharidů. Ukazuje se, že optimální parametry se budou zřejmě pohybovat v oblasti nízkých koncentrací kyselin (do 0,5%), relativně vysokých teplot

(kolem 260 °C) a vyšších tlaků (do 25 MPa), s úměrně nízkými dobami prodlení (řádově sekundy)“.

K tomuto názoru se přiklání i výše citovaní Taherzadeh a Karimi (2007), kteří metodu hydrolýzy pomocí kyseliny s nízkou koncentrací a za vyšších teplot považují za výhodnější než metodu hydrolýzy pomocí koncentrované kyseliny. Kvůli problému s degradací sacharidu navrhují navíc provádět hydrolýzu ve dvou stupních (nejprve hydrolýzy hemicelulóz za nižších teplot, poté hydrolýza celulózy za vyšších teplot).

Graf 1: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při kyselé hydrolýze

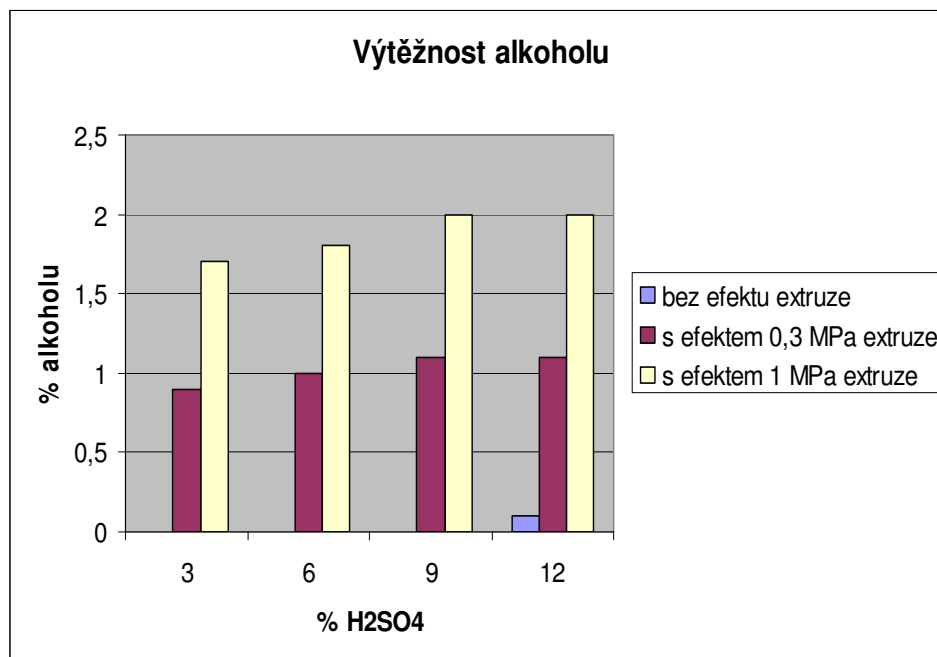


Tabulka 4: Výtěžnost alkoholu v % při kyselé hydrolýze

	% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
	3	6	9	12
bez efektu extruze	0	0	0	0,1
s efektem 0,3 MPa extruze	0,9	1	1,1	1,1
s efektem 1 MPa extruze	1,7	1,8	2	2

Výtěžnost alkoholu byla opět nejvyšší při použití efektu 1 MPa extruze a to při koncentraci 9 % kyseliny sírové. Při zvýšení koncentrace kyseliny na 12 % došlo už jen k zanedbatelnému zvýšení obsahu alkoholu.

Graf 2: Výtěžnost alkoholu v % při kyselé hydrolýze



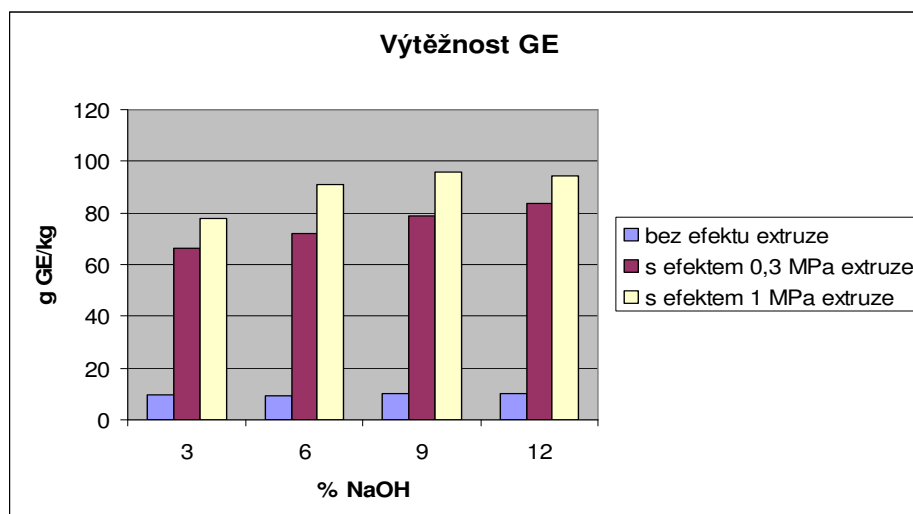
## 5.2 Zásaditá hydrolýza

Tabulka 5: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při zásadité hydrolýze

	% NaOH			
	3	6	9	12
bez efektu extruze	9,477	9,243	10,105	10,142
s efektem 0,3 MPa extruze	66,43	72,255	79,104	83,743
s efektem 1 MPa extruze	77,814	90,806	95,907	94,588

Při zásadité hydrolýze bylo dosaženo největší výtěžnosti opět při použití efektu 1 MPa extruze a koncentraci NaOH 9 %. V porovnání s kyselou hydrolýzou je výtěžnost GE nižší.

Graf 3: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při zásadité hydrolýze

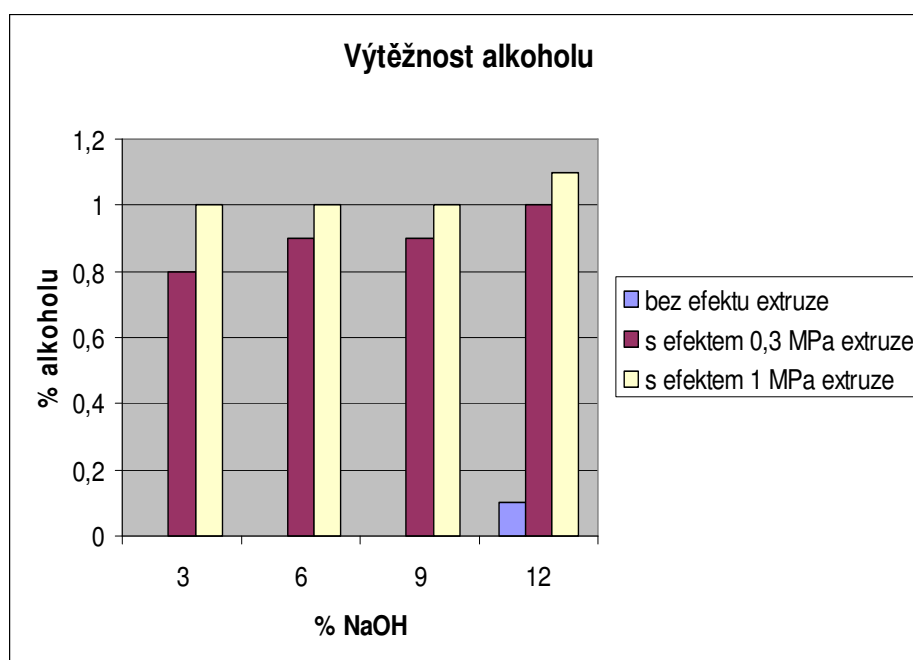


Tabulka 6: Výtěžnost alkoholu v % při zásadité hydrolýze

	% NaOH			
	3	6	9	12
bez efektu extruze	0	0	0	0,1
s efektem 0,3 MPa extruze	0,8	0,9	0,9	1
s efektem 1 MPa extruze	1	1	1	1,1

Pokud jde o výtěžnost alkoholu opět se kladně projevil efekt 1 MPa extruze. Největší výtěžnosti bylo dosaženo při extruzi 1 MPa a koncentraci NaOH 12 %. Při hydrolýze bez efektu extruze bylo dosaženo relevantní výtěžnosti alkoholu až při koncentraci NaOH 12 %. Ve srovnání s hydrolýzou s efektem extruze je tento výsledek zanedbatelný.

Graf 4: Výtěžnost alkoholu v % při zásadité hydrolýze



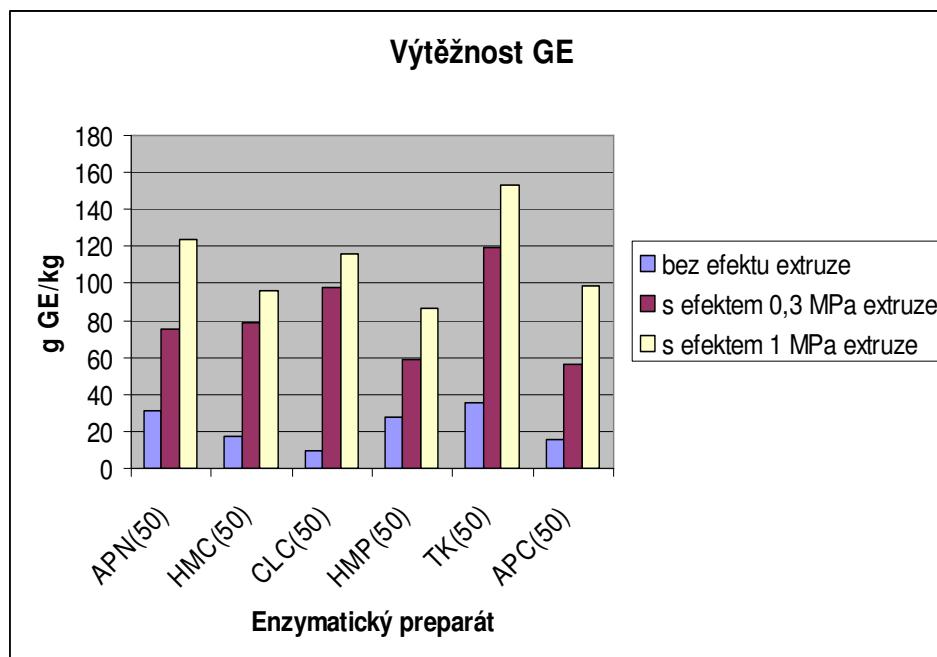
### 5.3 Enzymatická hydrolýza

Tabulka 7: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 50 CEA)

	Enzymatický preparát					
	APN(50)	HMC(50)	CLC(50)	HMP(50)	TK(50)	APC(50)
bez efektu extruze	31,306	17,306	9,677	27,622	35,213	15,328
s efektem 0,3 MPa extruze	74,946	78,651	97,683	59,153	119,453	56,436
s efektem 1 MPa extruze	123,588	95,941	116,076	86,243	153,158	98,355

Při dávkování enzymatických preparátů 50 CEA dosahoval nejvyšší výtěžnosti GE preparát TK a to jak při hydrolýze bez efektu extruze tak při použití 0,3 MPa či 1 MPa extruze. Nejvyššího výsledku dosáhl tento preparát při 1 MPa extruzi. Vysokou výtěžnost GE poskytl i preparát APN nebo CLC. Ovšem u preparátu CLC je nezbytný efekt extruze. Bez extruze dosáhl tento preparát nejnižší výtěžnost GE.

Graf 5: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 50 CEA)



Tabulka 8: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 100 CEA)

	Enzymatický preparát					
	APN(100)	HMC(100)	CLC(100)	HMP(100)	TK(100)	APC(100)
bez efektu extruze						
extruze	59,045	16,98	14,265	28,743	40,587	14,321
s efektem 0,3 MPa extruze						
extruze	99,536	95,753	123,513	74,454	138,454	63,457
s efektem 1 MPa extruze						
extruze	148,125	108,732	126,942	96,64	179,156	120,553

Při dávkování enzymatických preparátů 100 CEA dosáhl nejvyšší výtěžnosti bez efektu extruze preparát APN. Při použití 0,3 MPa nebo 1 MPa extruze dosahoval nejlepších výsledků opět preparát TK. Nejvyšší výtěžnosti GE při enzymatické hydrolýze dosáhl preparát TK při dávkování 100 CEA a efektu 1 MPa extruze.

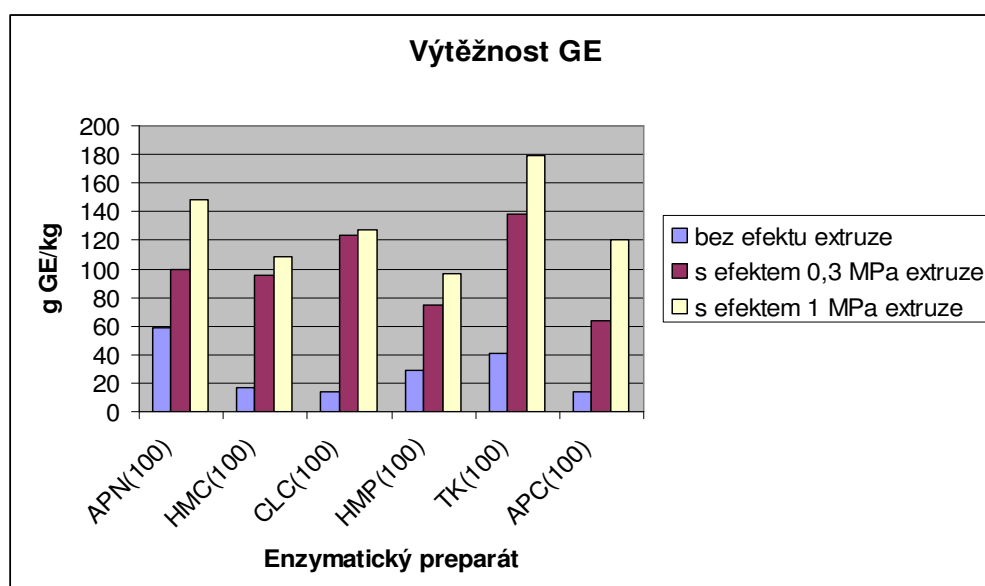
Dosažené výtěžky redukujících cukrů jsou nízké, oproti výtěžkům, které jsou uváděny v literatuře. To může být způsobeno i tím, že během hydrolýzy nebyly její produkty průběžně odčerpávány.



Tuto domněnku podporuje i Křen (1997) svým tvrzením: „Hydrolyza celulózy je podpořena kontinuálním odstraňováním glukózy (například kvašením), protože glukóza působí inhibičně na celulázu“.

Dalším důvodem, proč jsou výtěžky redukcujících cukrů nižší je fakt, že tato práce je zaměřena na lignocelulóзовou část kukuřičné siláže. Do výsledků tedy nebyl zahrnut výtěžek redukcujících cukrů získaný hydrolyzou kukuřičného škrobu.

Graf 6: Výtěžnost GE v g.kg<sup>-1</sup> při enzymatické hydrolyze (dávkování enzymů 100 CEA)

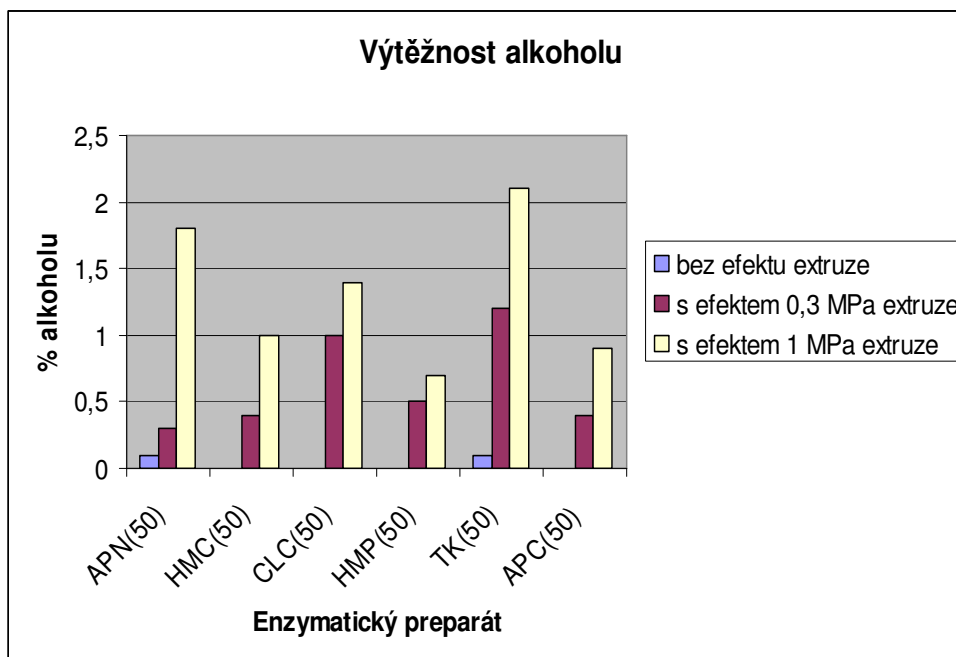


Tabulka 9: Výtěžnost alkoholu v % při enzymatické hydrolyze (dávkování enzymů 50 CEA)

	Enzymatický preparát					
	APN(50)	HMC(50)	CLC(50)	HMP(50)	TK(50)	APC(50)
bez efektu extruze	0,1	0	0	0	0,1	0
s efektem 0,3 MPa extruze	0,3	0,4	1	0,5	1,2	0,4
s efektem 1 MPa extruze	1,8	1	1,4	0,7	2,1	0,9

Při dávkování preparátů 50 CEA dosahovaly nejvyšší výtěžnosti alkoholu bez použití efektu extruze preparáty APN a TK. Tyto hodnoty jsou ale opět zanedbatelné oproti výsledkům hydrolyzy s použitím efektu extruze. Nejvyšší výtěžnost alkoholu při dávkování 50 CEA dosáhl preparát TK a to při 1 MPa extruzi. Při stejném tlaku dosahoval dobrých výsledků i enzymatický preparát APN.

Graf 7: Výtěžnost alkoholu v % při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 50 CEA)



Tabulka 10: Výtěžnost alkoholu v % při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 100 CEA)

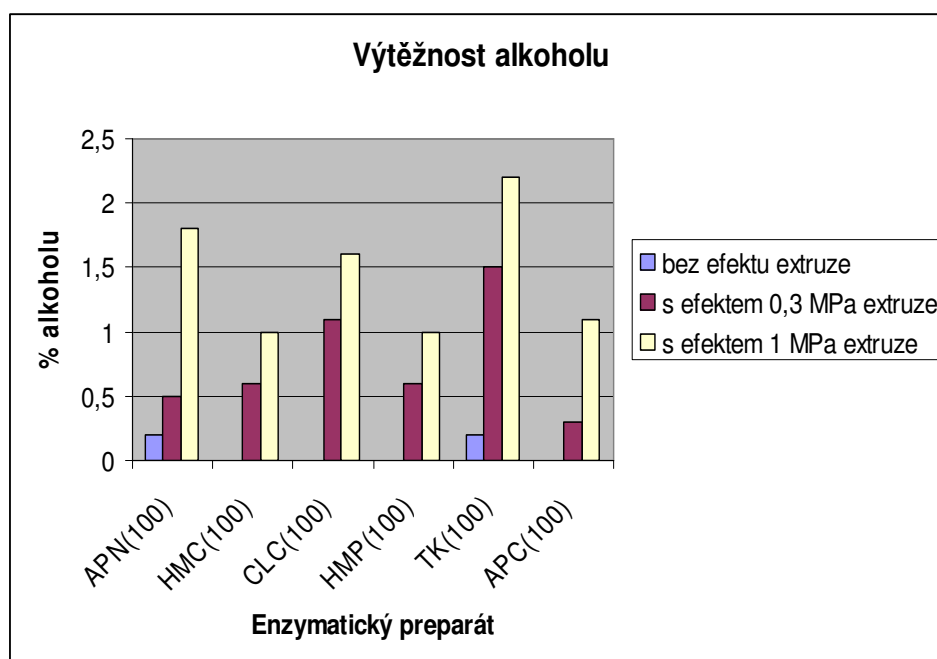
	Enzymatický preparát					
	APN(100)	HMC(100)	CLC(100)	HMP(100)	TK(100)	APC(100)
bez efektu extruze	0,2	0	0	0	0,2	0
s efektem 0,3 MPa extruze	0,5	0,6	1,1	0,6	1,5	0,3
s efektem 1 MPa extruze	1,8	1	1,6	1	2,2	1,1

Při dávkování enzymatických preparátů 100 CEA dosahovaly opět nejlepších výsledků při hydrolýze bez použití efektu extruze preparáty APN a TK. Při použití efektu extruze došlo u preparátů už jen k mírnému nárůstu výtěžnosti alkoholu oproti dávkování 50 CEA. Nejvyšší výtěžnosti alkoholu při enzymatické hydrolýze bylo dosaženo kombinací enzymatického preparátu TK při dávkování 100 CEA a 1 MPa efektu extruze.

Štěrbá (2008) říká: „Problémem se štěpením lignocelulózy pomocí enzymů je, že enzymy netolerují kyselé prostředí, vysokou koncentraci etanolu a teplotu“.

K tomuto tvrzení je třeba dodat, že vývoj enzymů jde neustále kupředu a již dnes je možné setkat se s enzymy schopnými katalyzovat reakci při kyselém pH (4,5 i méně) a za vysokých teplot (i při 75°C). Co se týká vysoké koncentrace etanolu, je tento problém řešen dnes již běžně používanou technologií kontinuálního odčerpávání etanolu.

Graf 8: Výtěžnost alkoholu v % při enzymatické hydrolýze (dávkování enzymů 100 CEA)



Pokud se týká výtěžnosti alkoholů, většinou platí, že čím více bylo vyprodukováno redukujících cukrů, tím větší byla následně produkce alkoholu. Ovšem v této práci se jedná jen o ukazatel doplňkový, protože díky nepřesnosti alkoholometru a nízkým naměřeným hodnotám je jeho vypovídací schopnost malá. Hlavním kritériem hodnocení hloubky hydrolýzy je tedy výtěžnost redukujících cukrů.

## 6. ZÁVĚR

Po zhodnocení výsledků lze konstatovat, že u kyselé hydrolýzy bylo dosaženo nejvyšší výtěžnosti redukujících cukrů při efektu 1 MPa extruze a koncentraci kyseliny 12%, a to 114,568 g GE/kg sušiny. Této kombinaci tlaku a koncentraci kyseliny odpovídala i nejvyšší produkce alkoholu, které činila přibližně 2%. Přibližně 2% výtěžnosti alkoholu byla naměřena za stejného tlaku při koncentraci kyseliny 9%, i když výtěžnost redukujících cukrů byla nižší (109,704 g GE/kg sušiny). Toto je další důkaz malé vypovídací schopnosti testu výtěžnosti alkoholů.

U zásadité hydrolýzy bylo nejvyššího výtěžku redukujících cukrů dosaženo opět při efektu tlakové extruze 1 MPa a při koncentraci NaOH 9%. Výtěžek byl 95,907 g GE/kg sušiny. Ovšem výtěžek alkoholu nejvyšší při tlaku 1 MPa a koncentraci NaOH 12%. Tento rozdíl bude opět nejspíše způsoben nepřesností alkoholometru, možná je i drobná dílčí chyba při provádění pokusu.

Co se týká enzymatické hydrolýzy bylo při dávkování enzymatického preparátu 50 CEA nejvyššího výtěžku z kvasitelných cukrů dosaženo opět při efektu tlakové extruze 1 MPa a za použití enzymatického preparátu TK a to 153,158 g GE/kg sušiny. Tento preparát dosáhl nejlepších výsledků za stejného tlaku i při dávkování 100 CEA a to 179,156 g GE/kg sušiny. Z nejvyšších výtěžků GE bylo dosaženo i nejvyšších výtěžků alkoholů. Při dávkování enzymatického preparátu TK 50 CEA byl výtěžek alkoholu 2,1%, při dávkování 100 CEA pak 2,2% (opět při tlaku 1 MPa).

Z výsledků tedy vyplývá, že při hydrolýze kukuřičné siláže byla z kyselé, zásadité a enzymatické hydrolýzy nejúčinnější právě naposled jmenovaná.

Z naměřených hodnot je také patrné, že hydrolýza bez efektu tlakové extruze poskytuje oproti hydrolýzy s využitím tohoto efektu zanedbatelné výtěžky GE a tím pádem i alkoholu.

Kyselá, zásaditá i enzymatická hydrolýza jsou neustále zkoumány a vyvíjeny. Výzkum a vývoj je nejvíce zaměřen na hydrolýzu enzymatickou, objevují se nové enzymatické preparáty schopné odolávat nižším pH a vyšším teplotám, čímž jsou schopny mnohem lépe hydrolyzovat fytomasu. Díky těmto novým poznatkům je enzymatická hydrolýza stále více ekonomicky zajímavá.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

Anonym.: Hydrolýza. (cit 10. 3. 2010), dostupné z www:

[http://biomasstechnology.cz/wp/?page\\_id=197](http://biomasstechnology.cz/wp/?page_id=197)

Cionová, E., Kittel, H.: Bioetanol jako komponenta automobilových paliv. Česká rafinářenská a. s., Kralupy nad Vltavou, 2004. (cit 11. 3. 2010), dostupné z www:

<http://www.cappo.cz/veletrh2004/cionova.html>

Diviš, J., Pěstování rostlin. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České budějovice, 2000.

Dohányos, M.: Jak zvýšit efektivnost bioplynové stanice?. Alternativní energie , roč. 6, 2008. (cit 15. 12. 2009), dostupné z www:

<http://www.tzb-info.cz/t.py?i=5550&t=2>

Doležal P., Zeman L., Zdráhalová I., Pirochta V., Skládanka J., - Sklizeň kukuřice a zásady konzervace. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,

Agronomická fakulta, Brno, 2008. (cit 17. 12. 2009), dostupné z www:

[http://www.agroweb.cz/Sklizen-kukurice-a-zasady-konzervace\\_\\_s245x31458.html](http://www.agroweb.cz/Sklizen-kukurice-a-zasady-konzervace__s245x31458.html)

Havlová, P.: Hydrolytické a oxidoredukční enzymy ječného sladu. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 1999.

Hisano, H., Nandakumar, R., Wang, Z., Y.: Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biocel production. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant. vol. 45, no. 3, 306-313 s, 2009.

Hruška J., Dlabola J., Hrdlička J., Hron F., Karkan A., Kutina J., Martinek V., Pozděna J., Pulpán J., Verner P., Vožda J., Voždová G., Vrbenský V., Monografie o Kukuřici. SZN, Praha, 1962.

Jevič, P.: Ekonomika biopaliv. Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha, 2007. (cit 11. 4. 2010), dostupné z www: <http://www.forcity.cz/2007/download/Jevic.pdf>

Jevič, P.: Udržitelná energie ze zemědělství. Výzkumný ústav zemědělské techniky, Praha, 2009. (cit 24. 4. 2010), dostupné z www: <http://biom.cz/cz/odborne-clanky/udrzitelna-energie-ze-zemedelstvi>

Kaštánek, F.: Bioinženýrství. Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, Praha, 2001.

Kokrhelová, K., Jirout, T.: Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv. 2003. (cit 12. 12. 2009), dostupné z www: [http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova\\_Kvetoslava\\_12118.pdf](http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf)

Košťtř, J.: Chemie a fyzika živých soustav. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha, 1965.

Krumphanzl, V., Řeháček, Z., a kol.: Mikrobiální technologie- buňka a techniky jejího využití. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha, 1988.

Křen, V.. Mikrobiální a enzymové biotransformace. 1997. (cit 20. 12. 2009), dostupné z www: <http://www.biomed.cas.cz/mbu/biotrans/vyuka>

Pelikán, M., Sáková, L.: Jakost a zpracování rostlinných produktů. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 2001.

Petr J., Černý V., Hruška L., - Tvorba výnosu hlavních polních plodin, SZN, Praha, 1980.

Petříková, V., Sladký, V., Stražil, Z., Šafařík, M., Ust'ak, S., Váňa, J.: Energetické plodiny, Profi Press, Praha, 2006.

Pospíšil, M., Šiška, J., Šebor, G.: Biobutanol jako pohonná hmota v dopravě. Ústav technologie ropy a petrochemie, Vysoká škola chemicko- technická v Praze, Praha, 2008. (cit 15. 3. 2010), dostupné z www: <http://www.mze-vyzkum-infobanka.cz/default.aspx?assID=53699>  
(Zprava\_RU\_2008\_04\_QH81323\_Biobutanol\_aprochem)

Pražák, V.: Biopaliva druhé generace. 2006. (cit 15. 3. 2010), dostupné z www: [http://www.cappo.cz/ftp/bio\\_druhe\\_gner.pdf](http://www.cappo.cz/ftp/bio_druhe_gner.pdf)

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., - Fyziologie rostlin, Academia, Nakladatelství Akademie věd ČR, Praha, 1998.

Špička, J.: Biochemie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 2004.

Šroller, J., Faměra, O.: Speciální fyto technika- rostlinná výroba. Ekopress, Praha, 1997.

Štěrbá, M.: Biopaliva druhé generace vyráběná z lignocelulózy. Pro atom web, č. 2008020601, 2008. (cit 11. 12. 2009), dostupné z www: <http://proatom.luksoft.cz/view.php?cisloclanku=2008020601>

Taherzadeh, M., J., Karimi, K.: Acid- based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materiále, Bioethanol review. BioResource 2(3), 472- 499 s, 2007.

Valášek, P.: Enzymy. (cit. 15. 3. 2010), dostupné z www: <http://www.ft.utb.cz/czech/upich/vyuka/chap/prednasky/enzymy.pdf>

Vodrážka, Z.: Biochemie. Academia, nakladatelství Akademie věd ČR, Praha, 2002.

Vondrášková, Š.: Bioetanol: životaschopné biologické palivo?. (cit 10. 4. 2010), dostupné z www: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=1&typ=1&val=39241&ids=138>

# **Přílohy**



Příloha 1.: Postup v používání biopaliv v členských státech (v %) pro období 2003 - 2005

Členský stát	Podíl biopaliva v roce 2003	Podíl biopaliva v roce 2004	Podíl biopaliva v roce 2005	Národní indikativní cíl
Rakousko	0,06	0,06	0,93	2,50
Belgie	0,00	0,00	0,00	2,00
<b>ČR</b>	<b>1,09</b>	<b>1,00</b>	<b>0,05</b>	<b>3,70</b>
Dánsko	0,00	0,00	bez údajů	0,10
Finsko	0,11	0,11	bez údajů	0,10
Francie	0,67	0,67	0,97	2,00
Německo	1,21	1,72	3,75	2,00
Irsko	0,00	0,00	0,05	0,06
Itálie	0,50	0,50	0,51	1,00
Holandsko	0,03	0,01	0,02	2,00
Polsko	0,49	0,30	0,48	0,50
Slovensko	0,14	0,15	bez údajů	2,00
Slovinsko	0,00	0,06	0,35	0,65
Španělsko	0,35	0,38	0,44	2,00
Švédsko	1,32	2,28	2,23	3,00
Velká Británie	0,026*	0,04	0,18	0,19**
EU-25	0,5	0,7	1,00 (odhad)	1,40

Zdroj: Jevič (2007)

Příloha 2.: Produkce bioetanolu v rozhodujících zemích v mil. m<sup>3</sup>

USA	Brazílie	Čína	EU
16 (40 %)	15 (38 %)	1,3 (3 %)	0,75 (2 %)

Zdroj: Jevič (2007)

Příloha 3.: Nové výrobní kapacity na bioetanol

Společnost	Výrobní kapacita	Surovina
Ethanol Energy, a.s. Vrdy	700 000 hl (55 000 t)	obilí, kukuřice
Korfil, a.s. Hustopeče	1 000 000 hl (80 000 t)	obilí
PLP, a.s. Trmice (spuštění v XI. 2007)	1 000 000 hl (80 000 t)	obilí
Cukrovary TTD Agroethanol TTD Dobrovice	800 000 hl (63 000 t)	cukrovka (difúzní šťáva, cukerní roztoky)

Zdroj: Jevič (2007)

Příloha 3.: Průměrná plošná produktivita a nákladovost (bez DPH), 1 € = 27,30 Kč

Zemědělské plodiny	Jednotka	Řepka olejná	Zrny a obiloviny	Cukrová řepa	Kukuřice na siláž (celá rostlina)
Výnos	t/ha	3 (4)	4 (7)	52 (55)	33 (50)
Cena	€/t	290	170	30	29
Cena produkce na plochu	€/ha	870 (1160)	680 (1190)	1560 (1650)	957 (1450)
<i>Užitná energie z konverze plodiny (bez účinnosti při využití)</i>					
<b>Spotřeba suroviny</b>	-	<b>2,3 kg/ litr oleje</b>	<b>2,6 kg/ litr ethanolu</b>	<b>9,5 kg/ litr ethanolu</b>	<b>6 kg/ m<sup>3</sup> bioplynu</b>
Biopaliva z 1 ha	-	1300 (1750) litrů oleje <sup>1</sup>	1540 (2700) litrů ethanolu <sup>2,4</sup>	5480 (5790) litrů ethanolu <sup>2</sup>	5500 (8340) m <sup>3</sup> bioplynu <sup>3</sup>
Výnos energie	kWh/ha	12220 (16450)	8930 (15650)	31770 (33570)	33620 (50970)
<b>Náklad na surovinu</b>	€/kWh	<b>0,071</b>	<b>0,076</b>	<b>0,049</b>	<b>0,028</b>

Zdroj: Jevič (2007)