

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

Srovnání hydrolýzy vybraných druhů fytomasy
při termotlakové přípravě surovin

Ing. Josef Maroušek

2009

Školitel: prof. Ing. Stanislav Kužel, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Práce byla vypracována v návaznosti na výzkum MSM 600 766 5806. Zvláštní poděkování za úzkou spolupráci patří profesorům S. Kuželovi, L. Kolářovi, E. Naoko, S. Baldwin, D. Possarac, P. Liebhard a V. Vashakidze.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně, na základě vlastních zjištění a uvedených zdrojů.

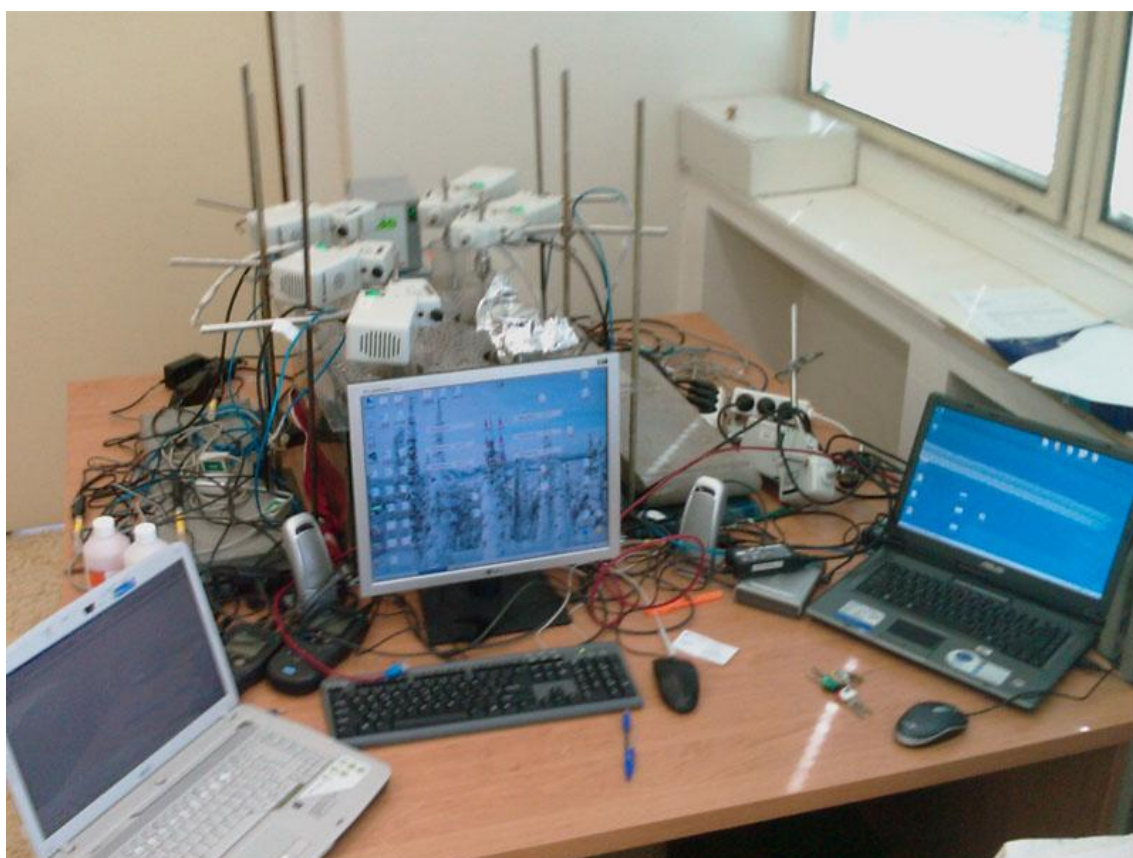
.....

V Českých Budějovicích, dne 17.12.2009

OBSAH:

| | |
|---|----|
| 1.1 Seznam zkratk | 6 |
| 1.2 Úvod | 7 |
| 1.3 Cíl práce | 8 |
| 2. Rešerše | 9 |
| 2.1 Principy hydrolýzy fytomasy | 9 |
| 2.2 Technologie kyselá hydrolýza fytomasy | 18 |
| 2.3 Technologie zásadité hydrolýzy fytomasy | 25 |
| 2.4 Technologie enzymatické hydrolýzy fytomasy | 29 |
| 2.5 Technologie kombinovaných hydrolýz fytomasy | 45 |
| 3. Metodika | 49 |
| 3.1 Sladové mléko | 59 |
| 3.2 Kyselá hydrolýza | 60 |
| 3.3 Zásaditá hydrolýza | 60 |
| 3.4 Enzymatická hydrolýza | 60 |
| 3.5 SEA | 61 |
| 3.6 CEA | 62 |
| 3.7 Obsah GE | 63 |
| 3.8 Objem zkvasitelných látek | 63 |
| 3.9 Filtrační koeficient | 64 |
| 3.10 Adsorbance | 64 |
| 4. Výsledky | 65 |
| 4.1 Absorbance škrobnaté fytomasy | 65 |
| 4.2 Absorbance celulóznové fytomasy | 66 |
| 4.3 Kyselá hydrolýza škrobnaté fytomasy | 67 |
| 4.4 Kyselá hydrolýza celulóznové fytomasy | 68 |
| 4.5 Zásaditá hydrolýza škrobnaté fytomasy | 69 |
| 4.6 Zásaditá hydrolýza celulóznové fytomasy | 70 |
| 4.7 Enzymatická hydrolýza škrobnaté fytomasy | 71 |
| 4.8 Enzymatická hydrolýza celulóznové fytomasy | 72 |
| 4.9 Filtrační koeficienty extrudované fytomasy | 73 |
| 5. Diskuze | 74 |
| 6. Závěr | 77 |
| 7. Souhrn | 79 |
| 8. Abstract | 79 |
| 9. Použitá literatura | 80 |
| 10. Přílohy | 97 |
| Příloha 1: | 97 |
| Příloha 2: | 98 |

Srovnání hydrolýzy vybraných druhů fyto­masy při termotlakové přípravě surovin



*Mnoho kolegů mi říká, že kybernetika a biochemie jsou vzdálené obory.
Osobně si myslím, že studium jednoho bez druhého je diletantismus.*

1.1 Seznam zkratek

AAGAOP = Atmospheric Aqueous Glycerol Autocatalytic Organosolv Pretreatment, úprava užitím glycerolu

AFEX = Ammonia Fiber Explosion, extruze čpavkem

AQ = antrachinone (antracen-9,10-dion, $C_{14}H_8O_2$)

CBU = Cellobiase Units, cellobiázové jednotky (Ghose, 1978)

CGPM = Conférence générale des poids et mesures, Všeobecná konference metrologie

DMF = 2,5-dimetylfuran, $(CH_3)_2C_4H_2O$

DMTHF = dimetyltetrahydrofuran

FPU = Filter Paper Unit, jednotka enzymatické aktivity (Decker et al., 2003)

GE = Glucose Equivalent, cukry ekvivalentní glukóze

HMF = 5-hydroxymetylfuraldehyd, $C_6H_6O_3$

HUB = aktivní prvek počítačové sítě, rozbočovač

ISU = International System of Units, Mezinárodní systém jednotek

IU = International Unit, mezinárodní jednotka biologické aktivity

IUB = International Union of Biochemistry, Mezinárodní unie biochemie

LCC = lignin-carbohydrate complex, ligninuhlovodíkové vazby

MTHF = metyltetrahydrofuran

NC-IUB = Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry,

Nomenklaturní výbor IUB

OS = Operation System, operační systém

PC = Personal Computer, počítač

PID = Proportional Integral Derivative Controller

SSF = simultaneous saccharification and fermentation, fermentace probíhající za hydrolýzy

THAQ = tetrahydroantrachinon, $C_{14}H_{12}O_2$

TMAH = tetrametylamonium-hydroxid, $C_4H_{13}NO$

USB = Universal Serial Bus, univerzální síťová sběrnice

VID = Voltage Identification Digital, číselná identifikace napětí

WHO = World Health Organization, Světová zdravotní organizace

XA = Xylanase Activity, aktivita xylanázy (Bailey, Biely, Poutanen, 1992)

1.2 Úvod

Naakumulovaná energie se u rostlin ukládá i do energeticky náročných vazeb při syntézách biopolymerů vysoké molekulové hmotnosti. V souvislostech předkládané práce se jedná zejména o celulózu, hemicelulózu a škrob.

Zpřístupnění energie v dílčích glukózových jednotkách výše uvedených polymerů za přijatelných nákladů a minimálních negativních ekologických dopadů, je klíčovou otázkou nejen pro segment bioenergetiky a chemický průmysl (Ragauskas et al., 2006).

Východiskem předkládané disertační práce byla výroba atraktivní suroviny, biobutanolu (Nölling et al., 2001; Antoni, Zwerlov, Schwarz, 2007; Dürre, 2007; Gressel, 2007; Dürre, 2008). Tato technologie spočívá v jímání metabolických produktů dnes již výhradně geneticky modifikovaných bakterií původem z rodu *Clostridium acetobutylicum*, dříve známější jako Weizmannův organismus. Aktuálně je začleněn do domény Bacteria, oddělení Firmicutes, třídy Clostridia, řádu Clostridiales, čeledi Clostridiaceae, rodu *Clostridium acetobutylicum* (Bergey, Holt, 1994).

Tyto klostridiální kmeny využívají přístupné monosacharidy, disacharidy i polysacharidy (Zappe et al., 1988). Do určité míry jsou schopny si vlastními enzymy dílčí monomery ze polysacharidů samy naštěpit, ale pro průmyslové využití je nutné jim výživné médium v podobě zcukřených fytohydrolyzátů zajistit.

V době sepisování práce se nejsilnějšími nástroji rozkladu fytomasy jeví mechanická dezintegrace, silná (superkritická) termotlaková extruze, hydrolýza, metanolýza, ozonolýza, etanolýza, exploze čpavkem, či oxidem uhličitým, tepelné šoky, či expozice selektivnímu elektromagnetickému vlnění.

Samotná hydrolýza fytomasy, konkrétně enzymatická, je zásadní, avšak doposud pevně neuchopená oblast rostlinných biotechnologií. Zvládnutím této problematiky by bylo možno zefektivnit fungování biorafinérií, jejichž spektrum produktů sahá od léčiv, přes potravinové výtažky, sloučenin pro chemický průmysl, až po biopaliva (Ohara, 2003; Blaschek, 2000).

V předkládané disertační práci jsou na nízkotlakově extrudované i neextrudované škrobnaté a celulóзовé fytomase studovány způsoby hydrolýzy při různých hladinách intenzity.

1.3 Cíl práce

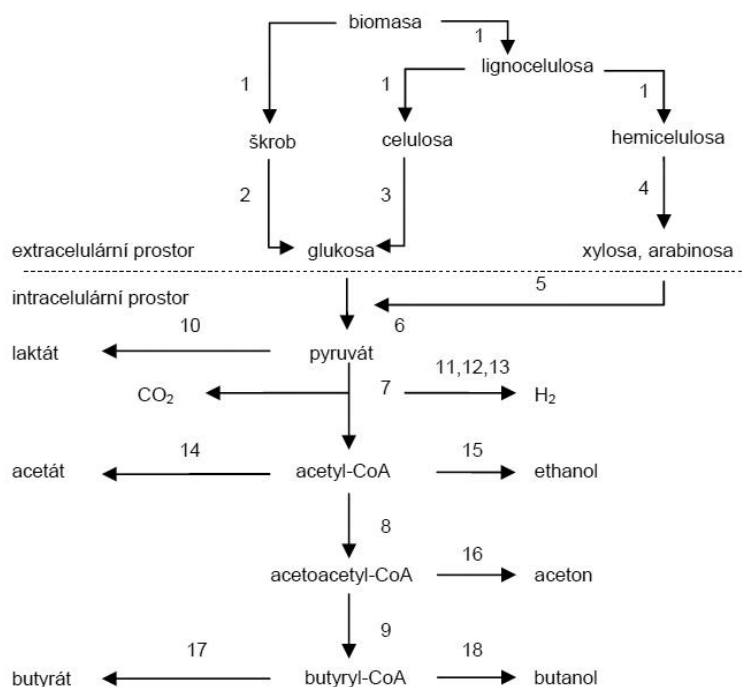
Cílem práce je srovnání efektu mírné termotlakové extruze na škrobnatou a celulóзовou fytomasu při různých stupních intenzity kyselé, zásadité a enzymatické hydrolýzy s tím, že hloubku hydrolytického procesu je třeba posuzovat jednoduchou, obecně srovnatelnou metodou, aplikovatelnou v provozu.

2. Rešerše

2.1 Principy hydrolýzy fytomasy

Ačkoli jsou klostridia schopna sama produkovat například α -amylázu, α -glukosidázu, β -amylázu, β -glukosidázu, glukoamylázu, pullulanázu, či amylopullulanázu (Lipovský et al. 2009; Badr, Told, Hamdy, 2001), k vyšší a rychlejší produkci požadovaných metabolitů, je třeba jim fytomasu před-hydrolyzovat (viz grafika 1).

Grafika 1: *Enzymatické děje na rozhraní extra- a intracelulárního prostoru*



zdroj: Lipovský et al., 2009

V bioenergetické praxi se běžně diskutuje o 4 druzích hydrolýzy. Termotlakové, kyselé, zásadité a enzymatické. Exaktně, chemicky, existují jen 3, kyselé, zásadité a enzymatická. Termotlaková hydrolýza, či autohydrolýza, je nesprávný „terminus technicus“ pro reakční podmínky materiálu. Vysokou teplotou, doprovázenou zvýšením tlaku, může dojít ke zvýšení reakční plochy (Thompson, Chen, Grentlein, 1989), přičemž vyšší teploty mohou zároveň zefektivnit účinky kyselin a zásad (Meunier-Goddik et al., 1998).

Fytomasa se v návaznosti na problematiku hydrolýzy dělí na cukernatou, škrobnatou a lignocelulózovou. Suroviny cukernaté obsahují hlavně glukózu (C₆H₁₂O₆, dříve hroznový, či

krevní cukr), fruktózu ($C_6H_{12}O_6$, dříve ovocný cukr) a sacharózu ($C_{12}H_{22}O_{11}$, dříve třtinový cukr), případně jiný, přímo zkvasitelný cukr (Pelikán, Sáková, 2001). Mezi suroviny cukernaté lze lokálně řadit zejména ovoce, částečně i cukrovku.

Mírně odlišná terminologie dělí fytomasu na cukernatou, škrobnatou a celulóзовou, s důrazem na fakt, že první dvě skupiny jsou určeny primárně pro lidskou obživu (Holtzaple et al., 1997). Skupina celulóзовých plodin je sice nejhojnější, avšak její konverze v použitelnou surovinu je tak náročná, že první dvě skupiny představují i přes vyšší cenu stále lukrativní alternativu. Celulóзовé materiály jsou správněji lignocelulóзовé. Obsahují totiž 40 až 60% celulózy, 20 až 40% hemicelulózy a 10 až 25% ligninu.

Mezi lokální škrobnaté suroviny lze řadit kukuřici, pšenici a ječmen (Melzoch, Rychtera, 1995). Mezi lignocelulóзовé materiály zejména dřevo a jeho odpady, slámu, kukuřičné palice, bagázu (zbytek po vylisování cukerné šťávy z cukrové třtiny). Nejvýznamější lokální škrobnatou surovinou jsou brambory (Pelikán, Sáková, 2001). Mezi lignocelulóзовé suroviny patří fytomasa dřevnaté povahy včetně sulfitových výluhů z výroby celulózy. Z listnatých stromů se získá víc pentóz, z jehličnatých více hexóz (Pelikán, Sáková, 2001).

Poměr pentóz ku hexózám závisí nejen na fytomase vstupující do procesu, ale i na reakčních podmínkách (Dunning, Lathrop 1928). Fytomasový hydrolyzát obsahuje obvykle furfural, který může působit jako inhibující složka pro potencionální organizmy (de Vrije et al., 2009), kyselinu octovou, mravenčí a uronovou. Při procesu zcukřování získané množství furfuralu činí pouze zlomek teoretického výtěžku, odpovídající obsahu pentozanů a pentóz, což lze odůvodňovat tím, že za podmínek zcukřování furfural vůbec nevzniká, nebo se opět rozruší (Ganz, 1929). Při reakčních podmínkách směřujících výhradně k získávání furfuralu je dosaženo jen nepatrných výtěžků cukru.

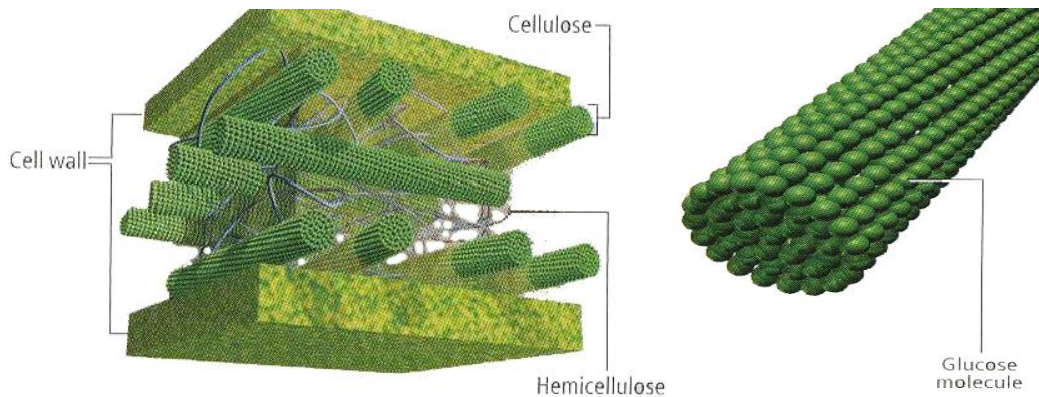
Obecně lze hydrolyzu, stejně jako například metanolýzu, či etanolýzu zařadit do skupiny solvolytických reakcí (Wikipedia, 2009), jejichž princip spočívá v rozkladu polykondenzátů nízkomolekulárními sloučeninami (International Union of Pure and Applied Chemistry, 2007). Při tomto typu štěpné reakce je na každé jednotlivé přerušení řetězce nezbytná právě 1 molekula H_2O . V případě enzymatických reakcí se jedná o přičlenění molekuly vody k molekule substrátu za jejího současného rozštěpení (Ambrožová, 2004).

V souvislostech předkládané práce je studována hloubka hydrolyzy na rozklad celulózy, hemicelulózy a škrobu v dílčí molekuly glukózy, či jejich ekvivalentů (glucose equivalent, dále jen GE). Pro celulózu je problematika efektně vyvedena například v grafice 2

a 3 (Huber, Dale, 2009). Pevnou strukturu znázorněné celulózy využívají rostliny ke své opoře, neboť jim její „trámoví“ umožňuje vertikální růst.

Grafika 2 a 3: *Celulózová vlákna obklopená hemicelulózou a ligninem*

(není zobrazen) vyztužují rostlinnou buňku

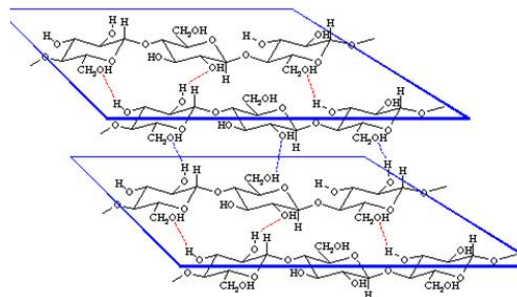


zdroj: Huber, Dale, 2009

Jako kuriozitu lze poznamenat, že pevnosti celulózy ke stavbě a pasivní obraně těla využívají i někteří zástupci živočišné říše. Například bičíkovci ze skupiny Dinoflagellata (obrněnky) (Roček, 1995).

Celulóza je dlouhý, nerozvětvený, lineárně kondenzující polymer D-anhydroglukopyranóz (spojené β -1,4 vazbou) se stupněm polymerizace od 100 do 20 000 (Dale, Balan, 2008), či od 500 do 20 000 (Holtzaple et al., 1994). Přilehlé molekuly celulózy jsou párovány vodíkovými vazbami a van der Waalsovými silami, což zapříčiňuje paralelní krystalické struktury, jejichž podstata je kritickou příčinou obtíží daného tématu (viz grafika 4).

Grafika 4: *Role vodíkové vazby ve strukturách celulózy*



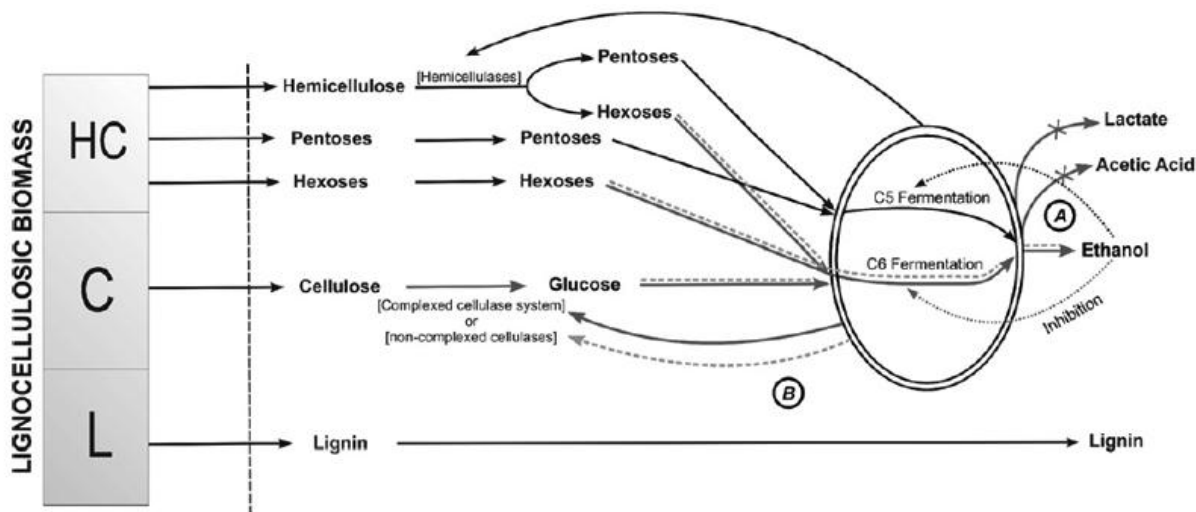
zdroj: Venkatesh et al., 2006

Výzkum potvrdil význam reakční teploty, roli již zmiňované vodíkové vazby (viz grafika 4), molární hmotnosti hydrolyzujícího reaktantu, pomocného rozpouštědla a důležitost typu struktury celulózy (Mantanis, Young, Rowell, 1995).

Zdrojem fytohydrolyzy může být prakticky jakákoli fytomasa, od cíleně pěstované, přes zemědělské zbytky, až po suťové dřevo ze stavebnictví. Užitím vhodných katalyzátorů lze při teplotách 50 až 200°C produkovat cukry, obvyklými metodami fermentovatelné na klasická alkoholová biopaliva. Teplotami mezi 300 až 600°C je možno produkovat surové oleje, rafinovatelné na benzíny, a vysokými teplotami (nad 700°C) je možno získat plyn, který lze taktéž upravit na kapalné palivo (Mantanis, Young, Rowell, 1995).

K paletě nejčastěji hydrolyzované fytomasy je možno dodat, že její složení je z 33 až 50% celulóza, 9 až 22% hemicelulóza a 18 až 22% lignin (Mosier et al., 2005). Lignocelulózové materiály jsou největším zdrojem hexóz a pentóz s tím, že xylóza je nejhojnější pentózou v hemicelulóze (20 až 30% v sušině lignocelulózy) (Zhao, Xia, 2009). Alternativy zpracování lignocelulózové fytomasy znázorňuje grafika 5 (Cardona, Sánchez, 2007).

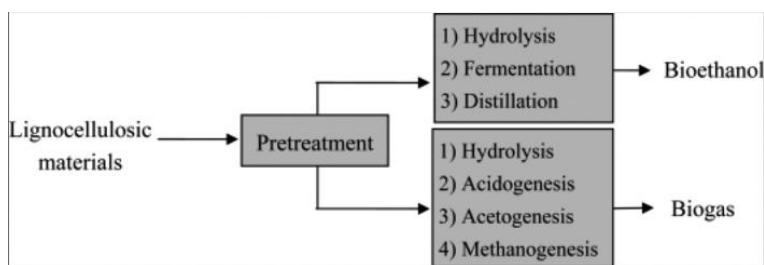
Grafika 5: Principy využití lignocelulózové fytomasy



zdroj: Cardona, Sánchez, 2007

Celistvější pohled na začlenění hydrolyzy v systému zpracování lignocelulózové fytomasy nabízí grafika 6 (Taherzadeh, Karimi, 2008).

Grafika 6: Alternativy zpracování lignocelulózového fytohydrolyzátu

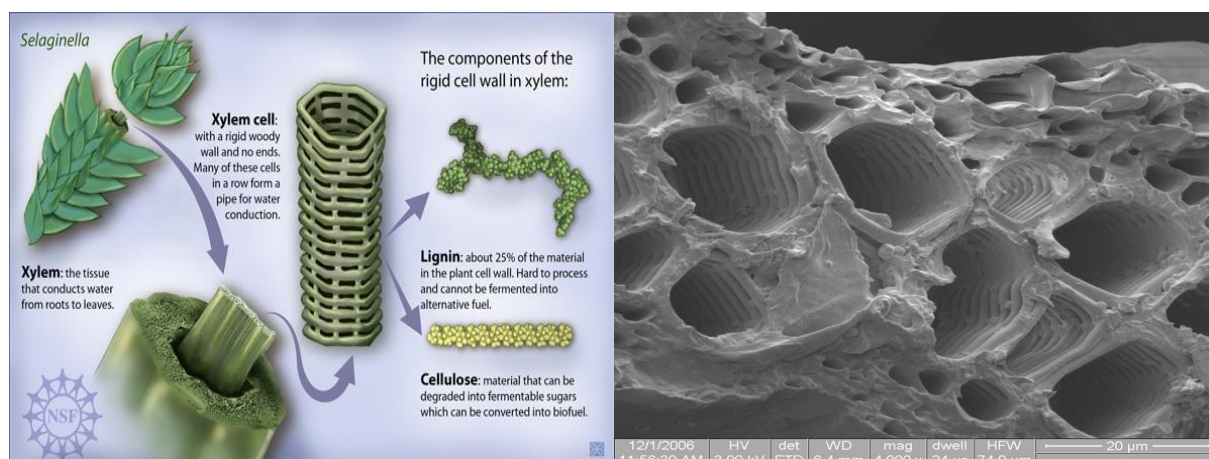


zdroj: Taherzadeh, Karimi, 2008

Obsah ligninu, který není na výše uvedené grafice 2 a 3 pro přehlednost zobrazen, působí v převráceném poměru k účinnosti enzymatické hydrolýzy (de Vrije, 2009). S hemicelulózou (pro zemědělské komodity nejčastěji ve formě xylózy, viz grafika 7 a 8) působí jako ochrana celulózy (Taherzadeh, Karimi, 2008). Bez mechanické úpravy, či optimalizace reakčních podmínek, je hydrolýza amylázou, celulázou, proteázou, keratinázou či lipázou málo účinná a pomalá. Oproti celulóze, která tvoří silná krystalická vlákna, hemicelulózy mají chaotické, amorfní a rozvětvené tvary. Proto jsou snadněji hydrolyzovatelné kyselinami (Sjöström, 1993; Morohoshi, 1991).

Stupeň polymerizace hemicelulóz je obvykle 200 a dělí je na 3 skupiny: xylany, manany a galaktanty (dle páteřního polymeru) (Holtzaple et al., 1994).

Grafika 7 a 8: Struktura lignocelulózové fytohmasy



zdroj: National Science Foundation, 2009

Lignin je hydrofobní, čímž brání ztrátám vody ze systému cév (Holtzaple et al., 1994). Jedná se o velmi komplexní molekulu tvořenou z fenylypropanových jednotek

pospojovaných do třírozměrné, těžce rozložitelné struktury (viz grafika 8). Pro svoji pevnost hraje klíčovou roli ve stěnách rostlinných buněk (Taherzadeh, Karimi, 2008).

Existují vazby i mezi celulózu, hemicelulózu a ligninem (Taherzadeh, 1999; Palmqvist, Hahn-Hägerdal, 2000). Lignin (základní stavební jednotkou je fenylypropan) dává rostlině sílu právě obepínáním celulózových vláken a jeho odolnost proti enzymům slouží rostlině jako evoluční obrana proti hmyzu či mikrobům (Holtzaple et al., 1994). Jeví se tak jako další brzdící faktor hydrolýzy hemicelulózy (Huang, 1975; Taherzadeh, Karimi, 2008; Taherzadeh, 1999).

Důležitým faktorem je též krystaličnost, která nemůže být ovlivněna předúpravou suroviny (Himmel et al., 2005; Himmel et al., 2008). Molekula celulózy má jak krystalické (obvykle 2/3), tak amorfni oblasti, přičemž krystaličnost může být poměřována jejich zastoupením. Ve vztahu k hydrolýze má význam nejen index krystaličnosti, dimenze krystalitů, pórovitost, ale i stupeň polymerizace definovaný viskozitou (Ramos et al., 2005).

Nižší krystaličností celulózy se zvyšuje účinek celuláz (Fan, Lee, Beardmore, 1980). Nízké využití hydrolyzujících reaktantů může být často limitováno nedostatkem reakční plochy. Byla prokázána korelace mezi zpřístupněnou reakční plochou a hloubkou hydrolýzy. Spouštěcí efekt má odbourání hemicelulózy a ligninu, ale nejedná se o osamocený faktor (Taherzadeh, Karimi, 2008).

Zvětšování reakční plochy je důležité i u škrobnatých surovin. Paření brambor má za úkol připravit fyzikální úpravou a chemickými změnami surovinu, především škrob, dusíkaté látky a další složky bramborové hlízy pro pozdější účinek enzymů i jako zdroj živin pro kvasinky (Pelikán, Sáková, 2001). Sladová amyláza nepůsobí na nativní škrob, nýbrž na škrobový maz a zejména ztekucený škrob, čehož se dosáhne pařením suroviny pod tlakem. V případě brambor tlaky v rozmezí 0,3 až 0,35 MPa při teplotách 143 až 174°C po dobu 10 minut (Pelikán, Sáková, 2001). Rozdíl mezi kyselou a enzymovou hydrolýzou škrobu je v rozdílném způsobu odbourávání škrobu. Při kyselé hydrolýze na začátku převládají dextriny, pak jejich množství klesá a přibývá glukóza. Při enzymové hydrolýze vzniká maltóza, ale dle použitých enzymů a reakčních podmínek lze získat pestrou škálu hydrolyzátů.

U lignocelulózových materiálů je možno dosáhnout zvýšení reakční plochy například máčením ve vodě, či aplikací polárních rozpouštědel (Fan, Lee a Beardmore, 1980). Vysušení lignocelulózové fytomasy reakční plochu naopak minimalizuje. Naopak voda krystaličnost celulózy zvýší díky rekrystalizaci amorfni částí. Nadměrnému smáčení lignocelulózy brání lignin (Taherzadeh, Karimi, 2008). Jeho složení a distribuce může být stejně tak důležitá, jako

jeho koncentrace. Odstraněním ligninu se zvýší reakční plocha na celulóze a následná hydrolyza probíhá hlouběji a rychleji (Saddler, 2008).

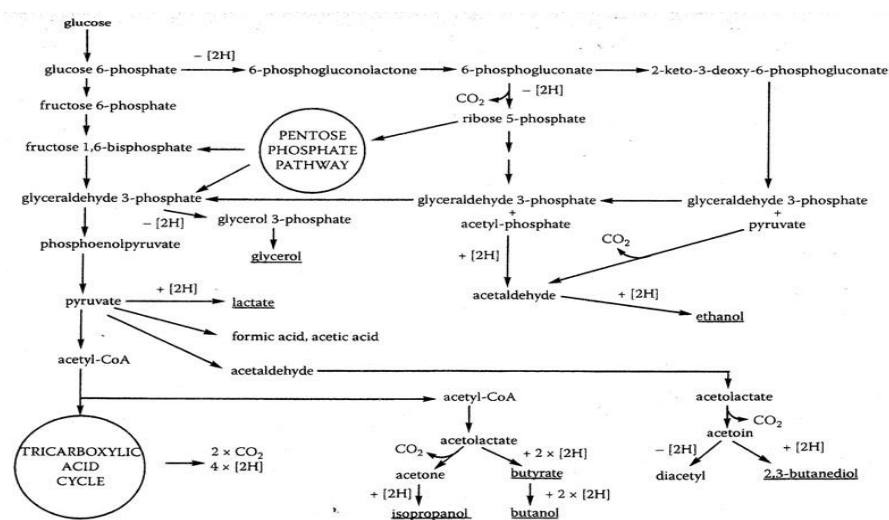
Na hemicelulózu lze pohlížet jako na fyzickou hranici, která brání přístupu hydrolyzujících reaktantů k vláknům celulózy (Taherzadeh, Karimi, 2008). Odstranění pouze samotné hemicelulózy nebylo doposud možné bez současného narušení ligninu.

Pokud se nezačne s hydrolyzátem bez prodlevy pracovat, či není odpovídajícím způsobem konzervována, jeho chemická, potažmo energetická, hodnota začíná v řádech hodin prudce degradovat divokými kulturami plísní (Kokrhelová, Jirout, 2003). Tyto mikroorganismy se aktivují k činnosti v okamžiku, kdy mají dostatek disponibilní potravy (glukózy) a spustí fermentační procesy, vedoucí například k výrobě bioplynu (Nelson, Cox, 2008).

Mikrobiální oxidace disponibilní glukózy v hydrolyzátu lze zjednodušit zápisem $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 2,822 \text{ kJ}$, či anaerobně $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2O_5OH + 2CO_2 + 118,1 \text{ kJ}$ (Mousdale, 2008). Uvolněná glukóza je též hodnotným zdrojem uhlíku, jehož určité množství bývá spotřebováno na dělení buněk. Více je využito biosyntetickými reakcemi endotermické povahy, avšak jen malý podíl energie je spálen v teplo biochemickými reakcemi s termodynamickou účinností výrazně nižší než 100%. Proces $aC_6H_{12}O_6 + bO_2 \rightarrow \text{buňky} + cCO_2 + dH_2O + \text{teplo}$, kde „c“ a „d“ jsou signifikantně nižší než „6a“ lze z fyziologického pohledu determinovat jako mikrobiální bujení.

Nejdůležitější produkty, či meziprodukty těchto reakcí lze rozřadit na alkoholy (etanol, glycerol, n-propanol, n-butanol), kyseliny (mravenčí, octová, mléčná, propionová, máselná) a dekarboxylované kyseliny (acetoin, aceton, diacetyl, 2,3-butanediol) viz grafika 9.

Grafika 9: Enzymatické dráhy metabolismu glukózy při mikrobiální fermentaci



zdroj: Mousdale, 2008

Látky získané hydrolýzou fytohmasy nezávisí jen na použité surovině, ale jsou též funkcí použitého množství kyseliny, její koncentrace, použitého tlaku, teplot i doby reakce (Ganz, 1929).

Diskutované produkty jsou odpadními produkty mikrobiálních metabolizmů, přičemž každý z nich má geneticky dány konkrétní reprodukční požadavky na zastoupení a složení živin, pH, teplotu, či absorpci O₂ (Govindaswamy, Vane, 2010; Altıntaş et al., 2002; Linde, Galbe, Zacchi, 2008; Helle et al., 2004).

V řadě států, které se diskutovanému výzkumu intenzivněji věnují jsou hlavní surovinou obiloviny (Melzocha, Rychtera, 1995). Nejvíce se zpracovává kukuřice a žito. V Polsku, Rusku a i v jiných státech převažuje jako škrobnatá surovina žito. Jeho zápary jsou však oproti pšenici viskóznější. Je to způsobeno vyšším obsahem pentozanů (kolem 10%).

Při výběru lokálních komodit se musí vycházet faktu, že hlíza brambor obsahuje průměrně 18 % škrobu (závisí na odrůdě) a hektarový výnos brambor se dlouhodobě pohybuje kolem 30t. Pro rozšíření surovinové základny je možno po přihlédnutí k aktuálním cenám diskutovat o pšenici (technické odrůdy Trane, Astella, Rexia), která obsahuje v závislosti na kultivačních podmínkách kolem 65 až 71% škrobu, 14% bílkovin, 1,8% tuku, 68% extraktivních bezdusíkatých látek (Melzocha, Rychtera, 1995). K výrobě lihu lze rovněž použít ječmen. Při jeho zpracování však v zápaře obsažené pluchy způsobují tvorbu silných dek na povrchu kvasu. V posledních letech se s úspěchem vyzkoušel a dále používá kříženec žita a pšenice (tritikále). Jeho odrůdy jsou snadněji zpracovatelné lihovarským způsobem a dávají stabilně dobré výtěžky.

Problematiku fytohydrolýzy, nelze zúžit pouze na hledání optimálních parametrů pro získání maximálního výtěžku z kvasitelných látek. Konkurenční výhodou je tradičně získávání vedlejší produktů, využívání synergických efektů, či obnovování zreagovaných surovin.

Pro růst mikroorganismů a související tvorbu jimi vytvářených produktů je třeba zajistit vhodné podmínky (složení média, pH, teplota, oxidačně-redukční potenciál, určitý parciální tlak kyslíku v médiu a jiné). Mikroorganismy musí mít pro svou činnost k dispozici kromě uhlíku též zdroje dusíku, fosforu a dalších biogenních prvků, specifické růstové faktory jako jsou například vitaminy, aminokyseliny, či minerální látky, které si mikroorganismus nemůže sám syntetizovat (Melzocha, Rychtera, 1995). Mikroorganismy přijímají z prostředí živiny a využívají je pro svůj růst. Pro biosyntetické pochody musí mít mikroorganismy zajištěn dostatečný přívod živin a energie, což se zabezpečí vhodným dávkováním

energetických substrátů, které jsou většinou i zdroji uhlíku pro výstavbu energeticky bohatých sloučenin a živin.

Pro následnou kontinuální fermentaci vychází většina kontinuálních technologií (Alzola, 1941; Rietter, 1981) ze známých Schollerovo perkolátorů pracujících na 160 až 180°C v kyselém prostředí po několik hodin. Dílčí modifikace pro dřevnatou fytomasu již byly taktéž patentově kryty (Thomsen, 1959).

Lignocelulózová fytomasa se může rafinovat nejen v cukry a lignin, ale i protein (Stuart, 1992). Zatímco extrakce proteinu a ligninu i technologicky jsou efektivní, výsledky u cukru jsou značně pod teoretickou úrovní. Je to díky důkladnému fyzickému a chemickému propojení mezi ligninem a celulózu uvnitř buňky, v čemž je spatřováno snížení dostupnosti celulózy pro hydrolýzu (Stuart, 1992).

Enzymové vybavení mikroorganismů určuje tzv. zkvasitelnost sacharidů (cukrů). Přímo zkvasitelné jsou jen monosacharidy, jejichž molekula obsahuje 6 uhlíků, tzv. hexosy. Monosacharidy s 5 uhlíky v molekule (pentosy) nejsou přímo zkvasitelné, i když z nich působením některých mikroorganismů etanol může vzniknout, ale jiným způsobem než při alkoholovém kvašení. Složitější sacharidy (oligosacharidy až polysacharidy) musí být před zkvašením hydrolyzovány na monosacharidy a to buď působením vlastních enzymů mikroorganismů (hydrolytické enzymy, např. amylasy, celulasy, inuliny aj.) (Šebor, Pospíšil, Žákovec, 2006).

Samotnými kvasinkami jsou přímo zkvasitelné jen monosacharidy - hexózy (hlavně glukóza, fruktóza, mannóza, méně již galaktóza) a disacharidy (sacharóza, maltóza, méně laktóza a melibióza). Dále polysacharidy jako škrob, celulóza, inulin apod., které však musí být před zkvašením hydrolyzovány na jednoduché zkvasitelné cukry (Kadlec, 2002).

Pro výrobu kvasného ethanolu přicházejí v úvahu následující sacharidy: monosacharidy - glukóza, fruktóza, mannóza, galaktóza. Disacharidy, které kvasinky mohou z větší části převést na monosacharidy (díky působení svých vlastních enzymů): sacharosa, maltosa, laktosa, celobióza. Trisacharidy, které mohou být působením některých enzymů kvasinek rozštěpeny na jednotlivé monosacharidy, resp. na mono- a di-sacharid. Nejběžnějším trisacharidem je rafinóza. Ne všechny kvasinky mají enzym melibiázu a proto často zůstává melibióza neprokvašena. Polysacharidy nemohou být přímo lihovarskými kvasinkami zkvašovány, protože nemají k dispozici odpovídající enzymy štěpící tyto substráty na jednoduché, zkvasitelné cukry (Melzoch, Rychtera, 1995).

2.2 Technologie kyselé hydrolýzy fytomasy

Kdo a kdy poprvé aplikoval kyselou hydrolýzu, nelze spolehlivě dohledat. Zcukření celulózy pomocí HCl bylo poprvé na světě patentováno Dangelivierem roku 1880 v Německu (National Research Council, 1986). Odstartoval se tím tak závod v hledání optimálních parametrů pro celý fytohydrolyzní proces (s odpovídající modifikací aplikovatelné i na zásaditou, enzymatickou a kombinovanou hydrolýzu), který lze charakterizovat jako hledání technologicko – ekonomického optima z následujících parametrů:

- 1) vstupní surovina, její parametry
- 2) způsob mechanické přípravy suroviny
- 3) sušina suroviny během fází procesu
- 4) zvolené hydrolyzující činidlo, způsob aplikace
- 5) koncentrace hydrolyzujícího činidla
- 6) reakční podmínky (tlak, pH, teplota...)
- 7) nástup reakčních podmínek
- 8) doba zdržení a dynamika daných reakčních podmínek
- 9) způsob a rychlost ukončení reakčních podmínek
- 10) opětovné využívání surovin, stabilizace pro návazné procesy.

Taktéž optimalizace kyselé hydrolýzy ke zvýšení výtěžnosti maltózy (2 molekuly D-glukózy spojené $\alpha(1\rightarrow4)$ vazbou, triviálně sladový cukr), potažmo cukerných roztoků ze škrobu (polysacharid z amylózy a amylopektinu, exaktně s obsahem malého množství proteinů, lipidů a zhruba 25 až 35 % H_2O , strukturálně $(C_6H_{10}O_5)_n$) jsou známy více než 100 let (Duryea, 1902). Výsledků je dosahováno jemným povařením škrobného roztoku za stálého míchání (stálé a intenzivní míchání je předpokladem všech dále diskutovaných technologií, pokud není uvedeno jinak, pro stručnost je tato podmínka dále považována za samozřejmou) tak, aby se nenarušila škrobová zrna. Po přidání slabé kyseliny (například 1 až 2% HCl) je definován tlak páry 0,3 MPa po dobu 30 minut s následným ochlazením a neutralizací (například NaOH).

Účinky vedlejších produktů kyselé hydrolýzy, zejména deriváty furaldehydu, kyselina ferulová, či p-kumarová, jsou pro některé potenciální organizmy následně využívající

zcukřený hydrolyzátní inhibiční. Výjimkou je 5-hydroxymetylfuraldehyd ($C_6H_6O_3$, dále jen HMF), jenž může mít i efekt stimulační (Ezeji, Quereshi, Blaschek, 2007). Příbuzný metyltetrahydrofuran (dále jen MTHF) a dimethyltetrahydrofuran (dále jen DMTHF) jsou další potenciálně slibná biopaliva (Hayes et al., 2008).

Velmi významného pokroku na poli kyselých hydrolyzů učiněno prohříváním celulóзовých materiálů spolu s hydrolyzačním činidlem (v tomto případě H_2SO_4 , ale i jiné kyseliny) v systému reakčních nádob a spojením fyzikální úpravy se samotnou hydrolyzou (Dreyfus, 1934). Zarážející mohou být reakční časy nad 16 hodin, je ale nutno brát v úvahu, že předmětem dávného patentu je fytomasa spíše dřevnaté povahy. Jako optimální je uváděna koncentrace kyselin 0,05 až 0,1%, avšak v některých reaktorech, při vyšším podílu sušiny, až 10%. Patentováno bylo i nalezené teplotní rozpětí 160 až 190°C. Protože při této teplotě nelze samotnou vodou obsaženou ve fytomase dosáhnout vyšších tlaků, bylo patentováno i připouštění inertních plynů, jakým je třeba N_2 , čímž bylo dosaženo dodatečné navýšení tlaku na 1,5 až 2MPa.

Patentována je i ideální 6 až 8% sušina vstupující fytomasy, 2% H_2SO_4 a reakční doba 1 až 4 hodiny při 130°C (Legg, Christensen, 1930). Taktéž teplotní rozsahy od 140 do 220°C, při tlacích 0,3 až 3,7MPa (Brink, 1991). pH 2 až 3 bylo dosahováno HNO_3 , přičemž sušina testované fytomasy se pohybovala okolo 15%.

V prvním kroku je možno pracovat v rozpětí 180 až 210°C, přičemž doba zrdžení je 4, 8 a 12 minut (Sassner et al., 2008). Jako hydrolyzující kyselina byla používána H_2SO_4 , jejíž obsah byl 0,25 a 0,5%. Údajně se tak podařilo zhydrolyzovat 86 až 92% ze všech teoreticky dostupných cukrů. Jako optimum je uváděno 200°C a reakční doba v časovém rozpětí 4 až 8 minut a 0,5% H_2SO_4 . Výtěžek je v tomto případě uváděn 55g GE / 100g suché fytomasy.

Nízké koncentrace H_2SO_4 (1%), za tlaku 1 MPa, při krátkých reakčních dobách podporují v hydrolyzátní vznik cukrů, zatímco furfuralu vzniká jen málo (Ganz, 1929). Obdobně účinkují vysoké koncentrace kyselin za atmosférického tlaku, ale při kombinaci vysokých tlaků a silných kyselin není dosahováno tolik cukrů či furfuralu, kolik by se očekávalo, přičemž se tvoří větší množství kyseliny octové (CH_3COOH) a mravenčí ($HCOOH$). Při vysoké koncentraci kyselin, avšak jen středním tlaku (0,5 MPa) jsou získávány vysoké výtěžky furfuralu, ale nepatrné výtěžky cukru. Aplikaci kyseliny je tudíž výhodné oddělit ve 2 procesy. Nejdříve vhodnou koncentrací hydrolyzovat pentozany v pentózy, ty ze směsi následně vyloužit. Uvedenou modifikací koncentrace lze efektivněji hydrolyzovat celulózu. První krok je zaměřen na získávání furfuralu a dosahuje se ho 4 až 5% kyselinou při atmosférickém tlaku (Ganz, 1929). Tento způsob lze provádět s modifikací, kdy se odbourané

pentozany převedou v jediném pracovním postupu na furfural, který se parou vytěsňuje a kondenzuje. K tomu je za stejných koncentrací H_2SO_4 (4 až 5%) potřeba 0,5 MPa.

Hydrolyzovaný zbytek je po vyloužení pentóz, či odehnání furfuralu dále hydrolyzován 0,5 až 1% H_2SO_4 při tlaku nejméně 1 MPa, aby celulóza lépe podléhala hydrolyze. Přínosné je cukr vyloužit a poslední krok opakovat.

Při štěpení celulózy fytohmoty je patentováno i využití 70% H_2SO_4 po 20 minut při 20°C za atmosférického tlaku, kterou pak jímá zpět již jen jako 30% (Ekström, 1910). Výsledný hydrolyzát gelové konzistence lze následně ředit natolik, až poklesne koncentrace odváděné H_2SO_4 na 1%. Tento kyselý hydrolyzát, stále gelové konzistence lze opakovaně mísit se 70 až 95% H_2SO_4 a povařovat (teplota neměla přesáhnout 100°C) v poměru 1/1 až 1/1,25 (míněno hydrolyzát / kyselina) 30 až 60 minut, taktéž za atmosférického tlaku.

Na celulózy fytohmoty byl rozvíjen podobný princip i ohledně dvoj- a vícefázové kyselí hydrolyzy v podobě opakování silné, následně velmi slabé koncentrace kyseliny (Oxley, Groomberg, Challis, 1931). Při aplikaci 65 až 80% (lépe 70 až 80%) H_2SO_4 byly jímány, jako primární produkty, kyselí celulózy. Po následném rozředění (druhém stupni kyselí hydrolyzy) na 1 až 5%, byly získávány dextriny, cukry a další. Ačkoli výtěžky všech surovin lze označit za uspokojivé, dochází touto metodou k enormní spotřebě kyseliny. Je tudíž navrženo extrahování kyseliny například převedením do 3 až 5-ti násobného množství propan-2-onu (CH_3COCH_3 , triviálně aceton), než je množství kyseliny v hydrolyzátu primární fáze a její následné koncentrování do původní koncentrace. Je doporučeno produkty ohřívat, či povařovat. Patentován je teplotní rozsah od 25 do 35°C s důrazem na teploty od 28 do 33°C. Taktéž je definován důležitý poznatek, který lze chápat v obecnější rovině, než jen pro celulózy materiály. Neboli, že čas potřebný k odpovídajícímu efektu na celulózy materiály je úměrný teplotě, síle kyseliny a stupni rozmělnění. Dostatečný čas je v patentu uveden v rozpětí mezi 30 minutami a 24 hodinami. Při 70% H_2SO_4 jsou nejlepší výsledky dosahovány dle uvedeného patentu při 30°C. Velmi markantních výsledků je dosahováno mezi 6 a 10-ti hodinami. Na příkladu bavlny hydrolyzované 78 až 79% H_2SO_4 (hmotnost H_2SO_4 je dvojnásobkem hmotnosti fytohmoty) je doporučeno po 4 hodinách při 30°C přidávat CH_3COCH_3 (hmotnost CH_3COCH_3 je dvojnásobkem hmotnosti H_2SO_4). Pro fytohmoty škrobnaté povahy je patentována teplota 138°C (Lillie, 1910).

Patentově je pokryto aplikovat H_2SO_4 (0,87%) do 6 až 8% sušiny vstupující fytohmoty (Lackman, 1910). Jako alternativa je uvedena kyselina mléčná, ale i dražší, avšak výhodnější, chlorovodíková a šťavelová. Patent kryje provádění aplikace na fytohmoty v tenkých povlacích, například rozprašováním.

Alternativou je vytvořit hydrolyzát rozpuštěním materiálu v silné kyselině (60 až 80% H_2SO_4) při 25 až 35°C (nejlepší výsledky udávány mezi 28 a 33°C) a až následně, po rozředění, tlakovat fyto masu ve slabší koncentraci kyseliny (2 až 5% H_2SO_4) (Dreyfus, 1934). I zde je možno zamezit plýtvání hydrolyzující kyselinou, provádět její znovuzískávání z procesu. Reakční čas je udáván v návaznosti na ostatní parametry s velkým rozpětím od 30 minut do 24 hodin. Při 60 až 80% H_2SO_4 a teplotě přesně 30°C, jsou zmiňovány nejlepší výsledky mezi 4 a 12 hodinami.

Jiné zdroje uvádějí optimální mezi 6 a 10 hodinami (Oxley, Groomberg, Challis, 1931). Je doporučeno snížit před následným zpracováním objem vody v hydrolyzátu na ne více než 50% (Dreyfus, 1934). Zbytky kyselého prostředí pak mohou být z hydrolyzátu vyluhovány těkavými rozpouštědly jako CH_3COCH_3 , či diethylether ($(\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2)_2\text{O}$ ether ethanolu, triviálně éter), což je další smyčka obnovující surovinu v procesu.

Smyčky k obnovování reagujících látek při kyselé hydrolýze lze užít i při separaci vápenatých a hořečnatých solí (Marchand, 1918). Vakuovým vypařováním se uvolňuje SO_2 a sulfidy se přeměňují na odpovídající chloridy. Ačkoli zrovna ligniny nehrají v následujících kvasných procesech důležitou roli, je důležité zmínit jejich pozoruhodné vlastnosti v živé fyto mase, jako je třeba proces regenerace poraněných a infikovaných buněk. Krom HCl je patentem doporučováno aplikovat i H_3PO_4 , HNO_3 a H_2SO_4 (Marchand, 1918). Všechny tyto silné minerální kyseliny mohou být použity k uvolňování SO_2 , ale soli vznikající přidáním uvedených kyselin ztlačně zasahují do procesu z technologického hlediska. Jedná se jak o agresivní korozi, jako následek aplikace HCl na kovových částech aparatury, tak její inhibiční projevy v následném využití organizmy.

Za účelem zvýšení obsahu pentozanů v hydrolyzátu je fyto masa vysušována proudem vzduchu po 30 minut tak, aby její teplota nepřesáhla 80°C (Dunning, Lathrop, 1928). Za tímto účelem má po rozmělnění, při kterém propadala síty s oky 0,042 cm, tento porézní materiál prachové konzistence vlhkost pod 1,5%. Vzniklý prach je v poměru 15/100 až 55/100 hydrolyzován 80 až 87% H_2SO_4 při teplotě 40°C, nebo nižší. Materiál byl podroben kontinuálně rostoucímu mechanickému tlaku přes 0,69 MPa. V rozpětí 0,69 až 1,72 MPa byla doba zdržení mezi 1 až 5 minutami. Pro dosažení nejlepších výsledků nebylo vhodné překročit 10 minut a teplotu 45°C. K vytvoření těchto mechanických tlaků využily mlátičí mlýny, mechanické tlouky, kolové mlýny, či diskontinuální šroubovací lisy. Výsledný hydrolyzát je však neohybná plastická hmota, která musí být následně opět hydrolyzována méně než 10% (optimum patentováno mezi 7 a 10%) H_2SO_4 při tlacích 0,035 až 0,31 MPa ve šroubovitém reaktoru při teplotách od 120 do 135°C. Do ba zdržení v tomto reaktoru by

neměla přesáhnout 40 minut, optimální rozsah byl patentován mezi 5 a 20 minutami (Dunning, Lathrop, 1928). Následně je hydrolyzát standardně extrudován do atmosférického tlaku. Cukry zbylé v ligninovém koláči jsou vymývány vodou, která je kontinuálně používaná i v hydrolyzáru. Pro kukuřičné zrno, rozmělněné na prach tak, aby prošlo sítím s oky 0,042mm je dosahováno nejlepších výsledků v následujících kombinacích parametrů: a) 4,4% H₂SO₄, 100°C, 55 minut, sušina 6% b) 4,4% H₂SO₄, 100°C, 50 minut, sušina 6% c) 4,9% H₂SO₄, 100°C, 50 minut, sušina 2% d) 1,9% H₂SO₄, 121°C, 50 minut, sušina 30% e) 0,98% H₂SO₄, 121°C, 50 minut, sušina 6%. Pro ovesné vločky bylo patentováno 4,4% H₂SO₄, 100°C, 55 minut, 6% sušina a 4,4% H₂SO₄, 100°C, 55 minut, sušina 6% (Dunning, Lathrop, 1928).

Bylo prokázáno, že žádný mix kyselin nepřináší při prvním stupni hydrolyzy výhody oproti užití samostatné kyseliny (Classen, 1919). Některé kombinace údajně přinášejí spíše technické obtíže. Zajímavějších výsledků je možno dosáhnout adicí vybraných kyselin do již hotového primárního hydrolyzáru. Kyseliny aplikované v procesu tvorby primárního hydrolyzáru jsou nazývány konverzní. V následné fázi je patentováno přidat alternativní kyseliny, na které lze již pohlížet jako na katalyzátory. Ty jsou přidávány v porovnání s konverzními kyselinami v malém množství, zatímco objem konverzních kyselin je více určen objemem surové fytomasy vstupující do procesu. Patentována je kombinace, při které je HCl konverzní kyselinou a H₂SO₄, H₂SO₃, HF, či jejich mix, kyselinami katalytickými. V případě užití H₂SO₄ jako konverzní kyseliny jsou na pozici katalytických kyselin HCl, H₂SO₃, či jiné anorganické kyseliny (Classen, 1919). Kromě kyselin je diskutována alternativa aplikací solí s kyselou reakcí, například síranů a sulfidů. Dále je patentováno přidání solí, které jsou rozkládány nadbytkem konverzní kyseliny, či takových, které jsou za reakčních podmínek taktéž hydrolyzovány (MgCl₂, CaCl₂, AlCl₃, ZnCl₂, MnCl₂). Součástí patentu je i aplikace oxidů kovů (uvedeny oxidy Fe, Cr, Mg), jejichž přidání údajně umožňuje snížit reakční tlaky při stejné hloubce hydrolyzy. Pro 1t celulóзовé fytomasy prašného charakteru prezentována výtěžnost 12 litrů teoreticky 100% alkoholu a 2,2% furfuralu. Reakční poměry jsou uváděny jako 1000 hmotnostních dílů celulóзовé fytomasy : 880 dílů H₂O : 10 dílů HCl : 2 díly H₂S a 1 díl SO₂. Alternativou je 1000 dílů celulóзовé fytomasy : 880 dílů H₂O : 10 dílů HCl : 2 díly H₂S a 1 díl SO₂ s ohřevem do 160 až 170°C, či variace s 1% HCl, 2% H₂S, při 150°C, nebo další alternativa s 1% HCl, 2% H₂S, 0,1% SO₂ při 150°C (Classen, 1919).

Hemicelulóza je z fytomasy hydrolyzována v první fázi při 135 až 190°C a tomu odpovídajícímu tlaku vodní páry (Rietter, 1981). Reakční doba je uváděna od 0,05 do 5

minut, ale lze ji prodloužit až na 20 minut. Při hydrolýze celulózy je v druhé, či dalších fázích údajně výhodnější pracovat v teplotním rozsahu od 210 do 250°C s odpovídajícími tlaky vodní páry. Reakční doby jsou zmiňovány stejné, jako v první fázi hydrolýzy, přičemž patent zmiňuje co nejmenší poměr kapaliny k sušině od 3/1 do 1,5/1 (vyzdviženo je okolí poměru 2/1). Je doporučováno z fytomasy vytlačit lisy vzduch, protože ten je při hydrolýze nežádoucí. Na HCl i H₂SO₄ je pohlíženo jako na katalyzátory, které je třeba následně z procesu odčerpat. Je doporučováno jich používat minimální množství. Právě k tomu slouží vyšší reakční teploty, které údajně zároveň spouští hydrolytické reakce i v organických kyselinách přítomných v biomase (Rietter, 1981).

Kyselá hydrolýza probíhá hlouběji pokud má použitá minerální kyselina vyšší bod varu, což v důsledku zdůrazňuje využití H₂SO₄. Patentově je pokryto dvakrát opakovat 1,1MPa, 185°C po 30 minut, což vede k vyšší hydrolýze pentozanů. V hydrolyzátu je tím získáno i vyšší množství kyseliny octové, metanol a aceton. Hexózy ze surového materiálu byly rozloženy na disacharidy a trisacharidy, které během hydrolýzy pentozanů přecházejí ve spodní části reaktoru na kyselinu glukarovou a spektrum mastných kyselin (Rietter, 1981).

Optimální pH pro kyselou hydrolýzu fytomasy je 5 (Arroyo, 1941). Při pH pod 5,5 trpí kovové součásti, při pH nad 5,75 má xylóza zvýšenou tendenci k rozkladu (Legg, Christensen, 1930).

Po ukončení hydrolýzy H₂SO₄ je patentováno výsledný hydrolyzát neutralizovat vápnem (CaO) a odstranit tak SO₂ v plynné formě (Lackman, 1912; Dunning, Lathrop, 1928). Krom vápna lze použít taktéž křídou (CaCO₃) (Dreyfus, 1934), či uhličitan sodný (Na₂CO₃) (Lillie, 1910). Pro celulóзовou fytomasu je H₂SO₄ výhodné použít k neutralizaci Ca(OH)₂ či CaCO₃ (Wagner, 1917). Zbytky HCl zle efektivně neutralizovat Ca(OH)₂, či MgCO₃, které shodně vytvářejí rozpustné chloridy (Marchand, 1918).

Činnost fermentačních organismů kultivovaných v hydrolyzátu tlumí nejen vznikající destiláty, ale i organismy, které přežily předchozí technologické kroky, živořice na vstupní surovině (Nelson, Cox, 2008).

Klasická sterilizace hydrolyzátu vyšší teplotou je problematická, protože xylóza lehce karamelizuje. Byla patentována „blesková“ (132 až 138°C po dobu 2 až 6-ti minut s rychlým náběhem i chlazením) sterilizace, při níž dojde k dostatečné sterilizaci bez patrného rozkladu xylózy (Tsuchiya et al., 1948). K odstranění toxických reziduí, které mohou mít původ například v měděném plášti reaktoru, z hydrolyzátu (pH od 6 do 10) zle přidávat Fe piliny (0,1 až 1g/100 ml). Neutralizaci vápnem je patentováno provádět rovnou při bodu varu během vypouštění z hydrolyzátu (Tsuchiya et al., 1948). Výsledné pH pak záleží na teplotě

neutralizace. Při 65°C je údajně vhodné vyrovnávat na pH od 5 do 7, při vyšších teplotách je zmiňováno pH nižší, s tím, že pokojová teplota vyžaduje pH od 8 do 10.

Antiseptický efekt mají již sulfidy vznikající po aplikaci H₂SO₄ (Lackman, 1912). Odstraňování sirných sloučenin z hydrolyzátu již bylo technologicky vyřešeno (Robeson, 1906).

Mezi jednotlivými stupni hydrolyzy lze hydrolyzát dočasně neutralizovat solemi aplikovaných kyselin, které je možno následně s nezhydrolyzovanými částmi fytomasy ligninového charakteru spalovat (Rietter, 1981). První fáze spalování má nadbytkem CO redukční parametry. Ve druhé fázi hoření jsou parametry čistě oxidační, a je možno obnovovat minerální kyseliny a neutralizační činidla. V případě hydrolyzy H₂SO₄ je možno při kontinuálním spalování nezhydrolyzované fytomasy přidávat vápno a tím získávat síran vápenatý (CaSO₄) (Rietter, 1981).

V kyselých hydrolyzátech je výhodné i třeba dodatečně zvýšit obsah cukrů minimálně na 50%, aby se proces nezvrhával (Underkofler, Barton, Rennet, 1957). Protože kultury běžně přítomné ve vstupující fytomase vzniklý hydrolyzát bezprostředně kontaminují, je výhodné aplikovat selektivní sterilizaci v kombinaci s následnou aplikací výživného média, jako zdroje dusíku a fosforu (Tsuchiya et al., 1948).

2.3 Technologie zásadité hydrolýzy fytohmasy

Samotná zásaditá hydrolýza je v praxi méně rozšířená. Krom neúměrných provozních nákladů je to především pro vznik solí, které vznikají při kontaktu alkálií s lignocelulóзовými materiály. Tyto soli působí inhibičně na potencionální organizmy v následném zpracování (2,59g ABE/litr oproti 21,37g ABE/litr při odstranění inhibitorů) fytohydrolýzátu (Lipovský et al., 2009). Již při mírné alkalické hydrolýze lze detekovat inhibující furfural a problematický HMF (de Vrije et al., 2009). Zásaditá hydrolýza se proto využívá nejčastěji v kombinacích s jinými postupy (viz rešerše v kapitole 2.5 Technologie kombinovaných hydrolýz).

Efektivita zásadité hydrolýzy závisí na obsahu ligninu v materiálu (Kokrhelová, Jirout, 2003). V případě odstranění ligninu pomocí alkalických rozpouštědel je výhodné k hydrolýze užít směs organických rozpouštědel (například metanol, etanol, aceton) a anorganických kyselin jako katalyzátoru. Proces probíhá při vysokých teplotách (okolo 185°C) a rozpouštědla se musí po ukončení procesu odstranit, aby mohly být produkty dále zpracovány.

Výtěžky cukrů nejsou z výše uvedených důvodů u zásadité hydrolýzy ekonomicky natolik zajímavé, tudíž se zásaditá hydrolýza obrací směrem k výrobě surovin užitých v plnidlech plastů či různých zalévacích hmotách (Tyson, 1995). Stejným procesem je možno docílit výroby přírodních sladidel, rozpouštědel a příbuzných surovin pro chemický průmysl (etanol, butadien, kyselinu octovou, mléčnou a podobně).

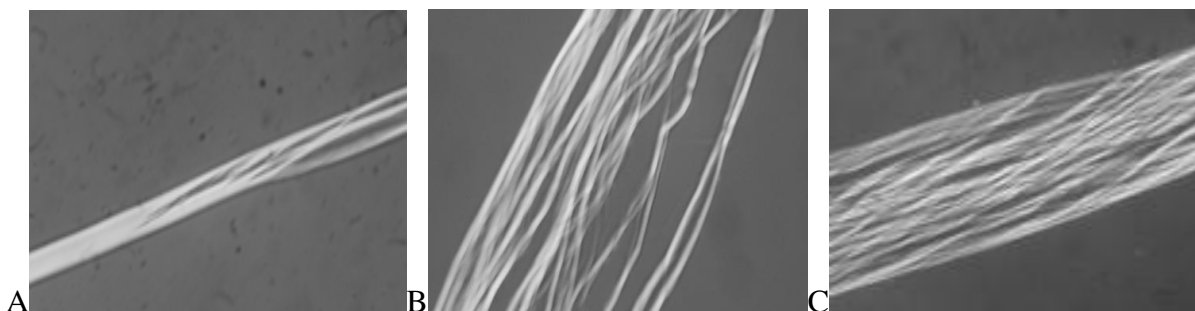
K zásadité hydrolýze lze úspěšně použít LiOH, NaOH, KOH (0.5M - 12M) a tetrametylamonium–hydroxid ($C_4H_{13}NO$, dále jen TMAH) v různých směsích (Öztürk, Bechtold, 2005). Z grafiky 10 je patrné, že vyšších efektů lze dosáhnout nejen zvyšováním koncentrace hydroxidu, ale důležitý je i reakční tlak a teplota.

Grafika 10 (A, B, C): *Celulóзовé vlákno po aplikaci TMAH*

A: 0,7M TMAH, pokojová teplota

B: 2M TMAH, pokojová teplota

C: 1M TMAH při ultrasonifikaci, 80°C po 90 minut



zdroj: Öztürk a Bechtold⁹³

Ke štěpení celulózy lze využívat hydroxidy alkalických kovů (Zhang, Okubayashi, Bechtold, 2005a-d). Pro sušinu fytomasy od 6 do 18% (nejlépe 10 až 12%) lze po 90 minutách ve 2,5 až 4,7% NaOH dosáhnout nejlepších výsledků při 40 až 80°C (lépe 60 až 70°C) (Annergren et al., 1982).

Aplikaci Ca(OH)₂ je efektivní provádět jen za vysokých teplot (Holtzaple et al., 1994). Reakční podmínky jak pro NaOH a Ca(OH)₂ uvádí grafika 11 a 12.

Grafika 11: Přehled reakčních podmínek pro zásaditou hydrolyzu užitím NaOH

| Reference | Type of Biomass | Temp. (°C.) | Time | Particle Size | g NaOH/100 g solution | g NaOH/100 g biomass | Effect on Digestibility |
|----------------------|-------------------------|-------------|----------|---------------|-----------------------|----------------------|--|
| Moore et al. 1972 | Cotton linters | 30 | 1 h | 40 mesh | 1 | 20 | No effect ² |
| Moore et al. 1972 | Aspen | 30 | 1 h | 40 mesh | 1 | 20 | Increased from 10% to 50% ² |
| Millet et al. 1970 | Different wood samples | 25 | 1 h | — | 1 | 20 | Increased ² |
| Fient et al. 1970 | Different wood samples | 25 | 1 h, 2 h | 40 mesh | 0.5, 1 | 2–20 | Increased ² |
| Baker et al. 1975 | Aspen sawdust | ambient | 2 h | 0.16 cm | 0.5 | 5 | Increased from 41% to 52% ¹ |
| Anderson et al. 1973 | Ryegrass straw | ambient | 24 h | 2.54 cm | 0.5–8 | 7.5–120 | Increased from 33% to 90% ² |
| Mandels et al. 1974 | Bagasse | 72 | 1 h | 1/8" mesh | 2 | — | Increased ² |
| Mandels et al. 1974 | Newspaper | 70 | 90 m | 1/8" mesh | 2 | 100 | Increased ² |
| Turner et al. 1990 | Different grass samples | — | 48 m | 4 mm | 3 | — | Increased ² |

¹In vivo, ²In vitro

zdroj: (Holtzaple et al., 1994)

Grafika 12: Přehled reakčních podmínek pro zásaditou hydrolyzu užitím $\text{Ca}(\text{OH})_2$

| Reference | Type of Biomass | Temp. (°C.) | Time | Particle Size | g water/g solution | g $\text{Ca}(\text{OH})_2/100$ g biomass | Effect on Digestibility |
|--------------------|-----------------|----------------|------------|---------------|--------------------|--|--|
| Playne 1984 | Bagasse | 20 | 8 d | 2.25 | 0.87 | 12 to 30 | Increased from 19% to 72% ² |
| Waller et al. 1975 | Corn cobs | ambient | 14 d | Ground | 0.6 | 4 | Improved digestibility ¹ |
| Rounds et al. 1974 | Corn cobs | — | — | — | — | 4 | No effect ² |
| Gharib et al. 1975 | Poplar bark | ambient | 1 or 150 d | 9.5 mm | 0.6 | 4 to 16 | Increased from 30% to 52% ² |
| Felix et al. 1990 | Soyabean straw | ambient/frozen | 30 d | Chopped | 0.65 | 2 to 5 | No effect ¹ |

¹In vivo, ²In vitro

zdroj: (Holtzaple et al., 1994)

Ohledně lignocelulósových materiálů byla v rámci zásadité hydrolyzy patentována široká báze reakčních parametrů (Holtzaple et al., 1994). Obnova $\text{Ca}(\text{OH})_2$ může probíhat kontinuálně, jako zbytek procesu. Rozpustný hydroxid je ze zreagované fytomasy vymýván vodou a reakcí s CO_2 přeměňován v nerozpustný CaCO_3 . Ten je teplem rozkládán na CaO a CO_2 , který je zpět hydratovaný na $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Pro dezintegrovanou dřevnatou fytomasu byly patentovány koncentrace Na_2O od 5 do 80 ml/l, přičemž k zásadité hydrolyze docházelo při relativně nízkých teplotách 20 až 80°C po dobu 5 až 60 minut (Grudinín et al., 1982). Důležité je sledovat dynamiku s jakou daná fytomasa vzdoruje zásaditému hydrolyzačnímu činidlu. Při 20g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$, teplotě 70°C a reakčním čase 20 minut, bylo údajně dosaženo stupně hydrolyzace 95,6%. Při snížení koncentrace hydrolyzujícího reaktantu na 10g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$, reakční teplotě taktéž 70°C a stejné době reakce (40 minut) je uváděn stupeň hydrolyzy již jen 76,4%. Pokud se ovšem snížilo zastoupení hydrolyzujícího Na_2O na pouhých 5g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$ a teplota jen na 20°C, je pozorován pokles stupně hydrolyzy na 50%. V okamžiku zvýšení dávky Na_2O opět na 20g/l, avšak za stejně nízké reakční teploty (20°C) i času (20 minut) bylo pozorováno zvýšení stupně hydrolyzy na 62,3%. Efekt teploty byl pozorován, když se za stejné koncentrace (20g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$) teplota zvedla na 60°C a hydrolyza byla přerušena po 5 minutách. Pozorovaný stupeň hydrolyzy byl údajně 84,4%. Na otázku, zda-li není 5 minut příliš málo odpověděla hydrolyza, která byla za stejné koncentrace i teploty (20g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$, 60°C) provedena o 15 minut déle. Po 20 minutách byl pozorován stupeň hydrolyzy 87,6%, což je oproti předchozí hodnotě, získané za čtvrtinový čas nárůst jen o 3,2%. Souhrn všech parametrů dokresluje stupeň hydrolyzace 93,4%, který byl dosažen při koncentraci 20g $\text{Na}_2\text{O}/\text{l}$, teplotě zvýšené na 70°C a reakčním čase 20 minut. Zvýšení dávky Na_2O na 40g/l nemělo při nízké teplotě 20°C očekávaný efekt ani po 20 minutách (stupeň hydrolyzy 74,6%). Komplexnost problému

dokresluje hydrolýza o dávce 80g Na₂O/l při 70°C, která byla ukončena po 5 minutách. Stupeň hydrolýzy byl za daných reakčních podmínek 80,4% (Grudinín et al., 1982).

Při zásadité hydrolýze Ca(OH)₂ bylo pozorováno zvýšení stupně krystaličnosti celulózy (Kim, Holtzaple 2006). V případě testovaného krmivářského zrna ze 43 na 60%. V návaznosti na dosažené výsledky lze předpokládat, že došlo k rozštěpení amorfních částí fytohmoty (lignin a hemicelulóza). Pro dané reakční podmínky byly patentovány doby zdržení od 20 sekund do 5 minut, pH od 10,5 do 12,5, teplota od 65°C do 167°C, tlak od 0,35 do 1,7MPa (Tyson, 1995).

2.4 Technologie enzymatické hydrolýzy fytomasy

Obecně je známo, že obratlovci enzymy schopné hydrolyzovat celulózu nemají a že přežvýkavci ve svém složitém trávicím traktu udržují kultury mikroorganismů vylučujících celulózy, které hydrolýzu celulózy umožňují. Škrob jsou býložravci i všežravci schopni hydrolyzovat úspěšněji.

Enzymy jsou biokatalyzátory produkované živými buňkami tak, aby se staly nosiči specifických biochemických reakcí metabolického procesu buňky (Underkoflera, Barton, Rennert, 1957). Jsou vysoce specifické na konkrétní substrát a je možno je aplikovat bezbuněčně (Buchner, Buchner, Hahn, 2007).

Využívání enzymatické hydrolýzy se datuje daleko do minulosti. Příkladem je užití ječného sladu k hydrolýze škrobu v pivovarnictví, či moči na moření usní (Underkofler, Barton, Rennert, 1957). Stále existují indiánské kultury, kde ženy vyrábějí pálenku nažvýkáním škrobnatých hlíz. Využívání enzymů, včetně jejich výroby, bylo započato v 19. století a během následujících let vyústilo v kultivování organismu *Aspergillus oryzae* (Takamine, 1894; Takamine 1914).

Metody k efektivnější produkci stále většího a aktivnějšího spektra enzymů byly během 20. století mnohokrát zdokonaleny (Hoogerheide, 1957; Forbath, 1957). Většina enzymů je v práškovité podobě stabilní. Bývají míchány v soli, cukru, škrobu, či pšeničné mouce. Některé ale pro úplné dosažení svého potenciálu potřebují přítomnost stabilizátorů a aktivátorů (Underkofler, Barton, Rennert, 1957). Při přesném měření rozložitelnosti celulózy enzymatickými preparáty je tak třeba kalkulovat i s glukózou, která může být obsažena v samotném preparátu jako konzervační prostředek (McMillan, 1994; Zhang, Schell, McMillan, 2007).

Enzymatická hydrolýza se skládá ze tří kroků: adsorpce enzymů celulózy na povrchu celulózy, biologický rozklad celulózy na fermentovatelné cukry a desorpce celulózy (Kokrhelová, Jirout, 2003). Její účinnost závisí především na koncentraci substrátu, typu a koncentraci enzymů založených na celulóze a dalších podmínkách, při kterých reakce probíhá (teplota, pH). Efektivní hydrolýza vyžaduje synergické reakce více druhů celuláz (Zhang, Himmel, Mielenz, 2006). Zvýšením dávky celulózy se může zvýšit rychlost hydrolýzy a obsah celulózy v hydrolyzátu (Huang, 1975). Nelze ale opomeout vyšší náklady. Výhodou je, že se může celulóza získaná z kalové vody opět použít pro další rozklad.

Při adsorpci celulózy na povrch celulózy dochází ke snížení efektivity hydrolýzy. Tomuto jevu je možno bránit aplikací tenzidů, které změni vlastnosti povrchu celulózy a minimalizují nevratné vázání celulózy na celulózu. Alternativou je i kultivace mutantů produkujících aktivnější celulózy (Zhang, Himmel, Mielenz, 2006). Progresivní technologií je i Simultaneous saccharification and fermentation (dále jen SSF). Jedná se o proces založený na současně probíhající zcukření a fermentaci vzniklých cukrů (Nelson, Cox, 2008). Děj probíhá při teplotě 38°C, což je kompromis mezi teplotou vhodnou pro hydrolýzu (45-50°C) a teplotou fermentace (30°C).

Pro předkládanou práci je ze všech enzymů klíčová skupina hydroláz. Jedná se o hydrolytické enzymy, které se řadí do skupiny EC3 Hydrolases (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2009), čemuž nejlépe odpovídá český překlad hydrolázy. Tato skupina je funkčně dělena do 13 podskupin. První se značí jako EC 3.1 Acting on ester bonds a v českém prostředí je známá jako Esterázy. Ta je rozčleněna do 31 uskupení.

Mezi esterázy patří lipáza (hydrolyzuje estery vyšších mastných kyselin a glycerolu; pracuje bez specifického koenzymu), pektáza (vyskytuje se u bakterií i hub rodů *Aspergillus*, *Penicillium*, u kterých hydrolyzuje methoxylové skupiny pektinu), tanáza (hydrolyzuje esterové vazby taninů, nejlepším producentem je *Aspergillus niger* a další houby), sulfatáza, fenylsulfatáza, chondrosulfatáza a lecithináza (štěpí lecitin na lysolecithin, lecithináza C je identická s α -toxinem *Clostridium perfringens*) (Ambrožová, 2004). Podskupina EC 3.2 nese název Glycosylases (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2009), čemuž odpovídá české Glykosidázy. Ty odpovídají za štěpení glykosidických vazeb (odtud název skupiny enzymů) v molekulách polysacharidů (Ambrožová, 2004). Některé bakterie je vylučují do prostředí jako tzv. exoenzymy (jsou odpovědné za štěpení velkých molekul polysacharidů na molekuly menší, kterým je umožněno snadněji procházet přes buněčné membrány do nitra bakterie). Podle substrátu se dělí na oligosacharidázy a polysacharidázy.

Mezi oligosacharidázy patří maltáza (α -glukosidáza štěpící maltózu, α -D-glukosidy a sacharózu), trehaláza (je produktem kvašení u bakterií, kvasinek a plísní a štěpí disacharid trehalózu), cellobiáza (β -glukosidáza štěpí β vazby v sacharidech, např. v cellobióze, salicinu a amygdalinu; u kvasinek, plísní a bakterií), β -glukoronidáza (hydrolyzuje konjugované glukuronidy na glukuronovou kyselinu), α -galaktosidáza (hydrolyzuje α -galaktosidy, rafinózu a melibiózu; u *Aspergillus oryzae*), β -galaktosidáza (tzv. laktáza, hydrolyzuje β -galaktosidy, laktóza je štěpena na galaktózu a glukózu; u druhů *Escherichia coli*, *Lactobacterium sp.*, plísní

a kvasinek) a sacharáza (tzv. β -h-fruktozidáza, štěpící sacharózu na glukózu a fruktózu; u kvasinek, plísní a bakterií mléčného a octového kvašení) (Ambrožová, 2004).

Z polysacharidáz, štěpících řetězce polysacharidů, mají význam amylázy (hydrolyzují škroby a glykogen tak, že konečným produktem je maltóza či glukóza; příkladem je α -amyláza, která štěpí α -1,4 vazby za účasti vápníku, tj. štěpení amylózy a amylopektinu na oligosacharidy; β -amyláza štěpí α -1,4 vazby od začátku polysacharidového řetězce, pokud narazí na α -1,6 vazbu, reakce se zastavuje; využití je při zcukřování škrobnatých zápar v lihovarnictví, v textilním průmyslu či pekařství), pektinázy (působí na pektinovou kyselinu, rozrušují vazby mezi jednotkami galakturonové kyseliny; jsou hojné u bakterií a plísní např. druhu *Aspergillus oryzae*), celulázy (rozkládají celulózu, produktem hydrolýzy celulózy je cellobiáza, která je štěpena na glukózu cellobiázou; jsou produkovány bakteriemi, plísněmi i prvky), hemicelulázy (štěpí polysacharidy složené z glukózových nebo fruktózových jednotek), chitinázy (tzv. mukopolysacharidázy, hydrolyzují chitin na N-acetylglukozamin; u půdních mikroorganismů, plísní a aktinomycet), hyaluronidázy (patří mezi mukopolysacharidázy, štěpí hyaluronovou kyselinu, mají význam při pronikání některých bakterií nebo jejich toxinů do tkání jiných organismů, proces je založen na faktu, že rozštěpením hyaluronové kyseliny se porušuje ochranná bariéra těla proti infekci, vyskytuje se u pneumokoků, stafylokoků a anaerobních klostridií).

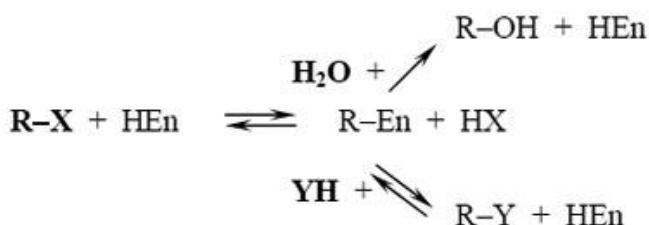
Třetí podskupinou jsou EC 3.3 Acting on ether bonds (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2009), čtvrtou EC 3.4 Acting on peptide bonds (Peptidases), česky peptidázy, pátou EC 3.5 Acting on carbon-nitrogen bonds, other than peptide bonds, šestou EC 3.6 Acting on acid anhydrides, sedmou EC 3.7 Acting on carbon-carbon bonds, osmou EC 3.8 Acting on halide bonds, devátou EC 3.9 Acting on phosphorus-nitrogen bonds, desátou EC 3.10 Acting on sulfur-nitrogen bonds, jedenáctou EC 3.11 Acting on carbon-phosphorus bonds, dvanáctou EC 3.12 Acting on sulfur-sulfur bonds a poslední EC 3.13 Acting on carbon-sulfur Bonds (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2009).

Enzymy (biokatalyzátory) snižují aktivační energii, nemění rovnovážný stav reakce, ale urychlují jeho dosažení a na průběhu se nepodílejí stechiometricky (Ambrožová, 2004).

Enzymy jsou bílkoviny, které mají vlastnosti společné všem proteinům. Jsou specifické, v určitém směru na buňce nezávislé koloidní vysokomolekulární biochemické katalyzátory, které jsou produkovány živou buňkou. Katalytická činnost enzymů je umožněna adsorpcí molekul z roztoku na jejich povrch. Adsorpce je specifická, tj., že pouze určité molekuly substrátu jsou adsorbovány a orientovány na povrchu enzymu tak, že mohou

reagovat. Rychlost reakce je úměrná až do určité výše koncentrace katalyzátoru (Ambrožová, 2004).

Grafika 13: *Princip enzymatické hydrolýzy*



Kde: R-X ... substrát, R ... přenášená skupina, Y ... akceptor přenášené skupiny, kde ve speciálních případech jím může být i voda

zdroj: Ambrožová, 2004

Enzym, jako celek, se označuje jako tzv. holoenzym. Enzym tvoří se substrátem dočasný komplex, ve kterém se substrát váže na enzym v aktivním místě. Aktivní místo si lze představit na povrchu či uvnitř molekuly enzymu, na jehož velikosti a tvaru se podílejí postranní řetězce nejméně tří aminokyselin (serin, histidin, trimosin) (Ambrožová, 2004).

Koenzymy jsou popisovány jako termostabilní a relativně specifické a nezbytné součásti některých enzymů, ve kterých jsou vázány různě pevnou vazbou na bílkovinnou složku, přičemž jednou z charakteristických vlastností koenzymů je fakt, že si je živé soustavy neumějí samy syntetizovat a jsou proto přijímány s potravou. Kofaktory jsou ionty kovů, např. Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} a Cu^{+} (Ambrožová, 2004).

Aktivní místo enzymu je tvořeno tak, že je schopné selektivně adsorbovat pouze ty látky, jejichž struktura koresponduje se strukturou aktivního místa. Biologická specifita enzymu závisí tedy na struktuře aktivního místa. Aktivní místo je svým tvarem přizpůsobeno tvaru substrátu, čím je přizpůsobení větší, tím větší je následně specifita substrátu. Specifita enzymu je založena na způsobilosti enzymu štěpit určitou vazbu ve složité molekule organických sloučenin. Například škrob je štěpen amylázou, maltóza maltázou, celulóza celulázou. Některé enzymy jsou absolutně specifické, tj., že atakují pouze jediný substrát.

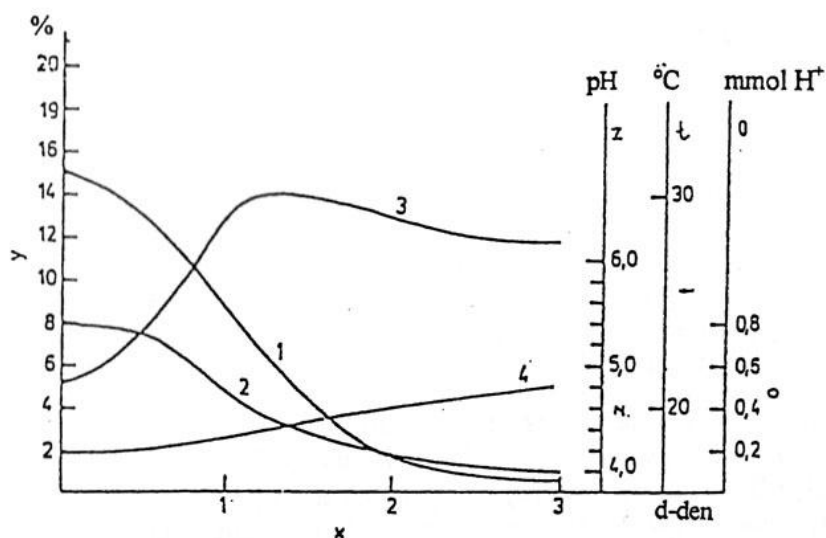
Kontaminující enzymová aktivita může být někdy i užitečná, jako je tomu například u β -glukanasy ve smíšených amylázových a proteázových preparátech z *Bacillus subtilis* (Wiseman, 1978). V praktické části této práce například β -glukanasa snižuje viskozitu sladiny a tím usnadňuje použití takovýchto bakteriálních exoenzymů.

Ztekucení a zcukření škrobu provádějí amylytické enzymy (Pelikán, Sáková, 2001). Při použití lihovarského sladu jsou to byly sladové amylázy, dnes se vesměs používají dovážené bakteriální a plísňové amylázy, což proces zcukřování usnadňuje a urychluje.

α -amyláza škrob hlavně ztekucuje a rozkládá na dextriny, za současného vzniku malého množství maltózy. Štěpí vazby 1 a 4 v hlavních i postranních řetězcích. Je odolná vůči vyšším teplotám, avšak citlivá na kyselost prostředí. β -amyláza štěpí vazby 1 a 4 jen v hlavním řetězci a odštěpuje postupně molekuly maltózy na neredukčním konci řetězce.

Při enzymatické hydrolýze odštěpují exoglukanázy konce řetězců celulózy a endoglukanázy rozbíjejí řetězce uprostřed (Kokrhelová, Jirout, 2003). Vzniklá látka se nazývá celobióza a teprve jejím rozpadem pomocí enzymu β -glykosidázy vzniká glukóza. Poškozuje se teplotou nad 60°C , snáší však nižší pH. Tvoří hlavně cukr maltózu. Při rozkladu škrobu se uplatňují i další enzymy, např. amyloglukosidáza a R-enzym, štěpící vazby 1 a 6 v místě rozvětvení. Dynamiku procesu dokumentuje grafika 14.

Grafika 14: Kvašení zápar



Kvasné křivky kvašení zápar

osa x – doba kvašení (d), osa y – sacharizace (%), osa z – pH, osa t – teplota ($^{\circ}\text{C}$), osa o – obsah titrovatelných kyselin ($\text{mmol H}^+ / 20 \text{ ml}$); 1 – průběh sacharizace, 2 – průběh pH, 3 – průběh teploty, 4 – průběh obsahu kyselin

zdroj: Pelikán, Sáková, 2001

Obdobné křivky jsou známy i pro hydrolýzu celulózy (Huang, 1975). Hydrolytické enzymy jsou velmi specifické, respektují i stechiometrické rozdíly mezi sloučeninami

(Ambrožová, 2004). Příkladem je maltáza, která štěpí pouze α -1,4 glykosidické vazby v polysacharidech.

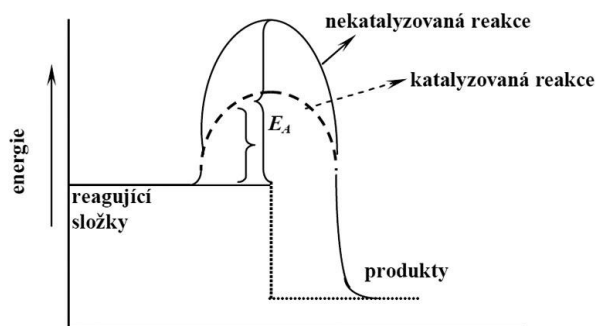
Zpracování škrobnatých surovin doznalo ve světě značných změn v technologii (Melzoch, Rychtera, 1995). Ty se týkají zejména snížení energetických nákladů na výrobu a to hlavně s ohledem na využití vysokoaktivních enzymových preparátů. Přitom je důležitá i otázka mechanického rozmělnění suroviny a zpřístupnění zrn škrobu působení enzymů. Paření pod tlakem se značně omezuje a využívá se termostabilních ztekutujících α -amyláz.

Enzymové preparáty obsahují i další hydrolytické enzymy, které výtěžnost sacharidů zvyšují. Některé technologie preferují využití recirkulace kvasinek a proto je nutné připravit záparu bez suspendovaných částic. Znamená to buď využít jen endospermové části zrna (upravené mletí zrna) nebo po působení enzymů oddělit pevný podíl a dále pak pracovat s kapalným podílem. Při tomto způsobu bude nižší výtěžnost lihu, protože část škrobu mizí s pevným podílem. Tento materiál lze použít pro přípravu krmiv. Jiné technologie předepisují oddělení pevného podílu po zkvašení a následnou destilaci kapalného podílu. Pevný podíl se použije k přípravě krmiv a kapalný podíl po destilaci (výpalky) je využit k přípravě nové zápary. Recirkulace kapalného podílu je zvláště důležitá u větších lihovarů, protože zde je nutno výpalky expedovat v zahuštěné, nebo ještě lépe v suché formě.

Škrob musí nejprve nabobtnat a zmazovatět, potom dochází ke ztekucení (účinek α -amylázy) a nakonec ke zcukření (účinek β -amylázy) (Melzoch, Rychtera, 1995). Teplota mazovatění u sladového škrobu je 50 až 57°C, pro ztekucení škrobového mazu jde o optimum teploty 65 až 75°C (pH 4,6), pro zcukření je optimální teplota 60 – 65°C (pH 4,5), Enzym α -amyláza se teplem inhibuje při teplotě kolem 80°C, kdežto β -amyláza již při teplotě 75°C. Prodlužováním nebo zkracováním časových prodlev při rmutování pro oba amylolytické enzymy lze získat sladiny s různým obsahem zkvasitelných cukrů.

Se stoupající teplotou rychlost reakce stoupá až do optima (Ambrožová, 2004). Při vyšší teplotě rychle klesá, až konečně ustává. Pokles je způsoben tepelnou inaktivací enzymu. Aby vznikl produkt, musí být molekuly vhodně aktivovány energií, kterou je tzv. Aktivační energie. Katalyzátory (enzymy) tuto aktivační energii snižují (viz grafika 15).

graf 2: Charakter E_A při katalyzované a nekatalyzované reakci

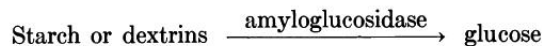
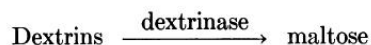
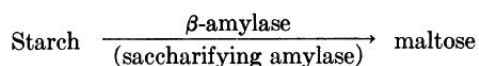
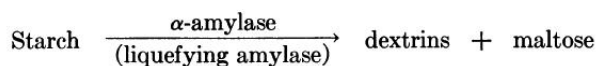


zdroj: Ambrožová, 2004

Velmi výrazný je v dané věci účinek pH (Ambrožová, 2004). Většina enzymů má optimum mezi pH 5 – 8, (někdy i 2 – 10). Vliv pH se výrazně uplatňuje na povaze prostředí. Účinek záření může být zesílen fotodynamickým účinkem některých barviv (methylenová modř, eosin). Ultrafialové záření a rentgenové záření mohou mít inhibiční vliv a způsobit denaturaci bílkovinné složky enzymu.

Klíčovým faktorem enzymatické hydrolýzy je též velikost reakční plochy (Taherzadeh, Karimi, 2008; Sun, Cheng, 2002; Stone et al., 1969). Dalším faktorem distribuce enzymů je celkový objem ligninu, který je zodpovědný za integritu, pevnost a prevenci smáčení lignocelulázy (Taherzad, Karimi, 2008). Delignifikační proces může následně uvolnit prostor pro následnou enzymatickou hydrolýzu. Samotnou delignifikací se již ale hydrolyzují některé hemicelulózy. Uvolněný lignin je bohužel inhibitorem celulózy, méně též xylnázy a glukosidázy.

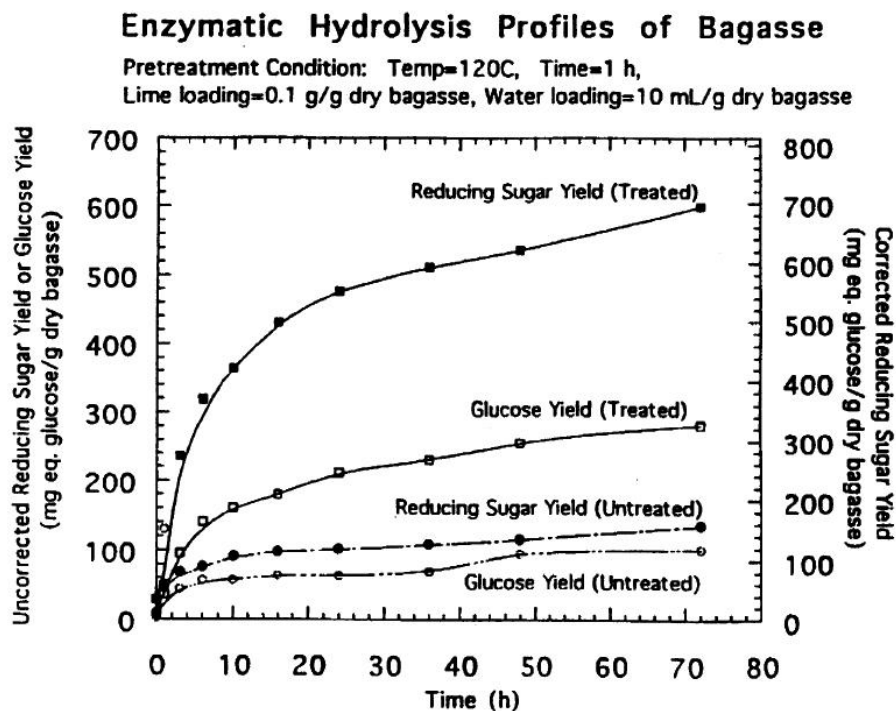
Ze všech hydroláz mají pro dané téma největší význam amylázy (Underkofler, Barton a Rennert, 1957). Dle naznačení typu amylázové reakce jsou děleny na „zkapalňující“ (liquefying) a „zcukřující“ (saccharifying). β -amyláza, která není mikrobiálního původu, je pravým zcukřujícím enzymem formujícím maltózu přímo ze škrobu štěpíc disacharidové jednotky na otevřených koncích řetězce. α -amylázy z různých zdrojů mají obvykle dobrou schopnost zkapalňování, ale jejich zcukřovací schopnost je značně variabilní, stejně jako jejich termostabilita. Jejich reakce je možno vyjádřit jako



s tím, že bakteriální amylázy zůstávají aktivnější při vyšších teplotách, než plísňové amylázy, čímž také lépe ztekucují škrob.

Kromě teplot má velký vliv i reakční doba enzymu. Poměrně názorně je problematika zpracována na příkladu bagázy v grafice 16 (Holtzaple et al., 1994).

Grafika 16: Vliv reakční doby enzymu na GE



zdroj: Holtzaple et al., 1994

Pro dávkování biologicky aktivních látek jsou zavedeny jednotky International Unit (mezinárodní jednotka, dále jen IU). Jedná se o jednotku vztaženou na biologickou aktivitu, jejíž původ je ve farmakologii. Definice IU se liší u každé látky. Velké množství je jich definováno pod záštitou World Health Organization (Světová zdravotní organizace, dále jen WHO), která definuje reakční podmínky a způsob stanovení.

Konkrétně pro enzymy navrhla IUB jednotku roku 1964. Jednalo se o množství enzymu, které katalyzuje konverzi 1 mikromolu substrátu za minutu. Podmínky reakce byly definovány velmi obecně, a to tak, aby byla rychlost konverze maximální. Doporučeno je 30°C, optimální pH a optimální koncentrace.

Protože ale minuta není jednotkou ISU (dříve SI), roku 1978 navrhla CGPM jednotku katal (NC-IUB, 1979), která byla oficiálně přijata až roku 1999. V mezidobí NC-IUB definovala přítomnost enzymu výskytem chemické reakce, kterou katalyzuje. Na základě doporučení Enzyme Nomenclature Recommendations z roku 1964 IUB definovala standardní jednotku enzymatické aktivity jako množství, které bude katalyzovat transformaci 1 mikromolu substrátu za minutu ve standardních podmínkách.

Později bylo doporučeno vyjádření v molech za sekundu a tehdy dostala doposud bezejmenná jednotka enzymatické aktivity jméno katal. Katal (dále jen kat) se tak stal symbolem katalytické aktivity, která zvýší zrychlení reakce právě o 1 mol/s v návaznosti na kvantitativní rozbor. Katalytická aktivita enzymu je poměřována zrychlením reakce (množství substance za čas, neboli mol/s), které je pro enzym stanovováno po kvantitativním rozboru (například pomocí spektrofotometru). Ačkoli se v anglosaských zemích a díky exportované laboratorní technice i jinde ve světě IU dále využívá, dle zákona č. 505/1990 Sb. O metrologii ze dne 16.11.1990, který stanoví povinné používání jednotek ISU (SI) je tato jednotka lokálně nesprávná a měl by se využívat výhradně kat.l⁻¹ odvozený ze soustavy ISU (SI).

Základním vztahem je rovnice Michaelise a Mentenové (Kodíček, 2007a-d), popisující závislost počáteční reakční rychlosti enzymové reakce v_o na koncentraci substrátu $[S]$,

Grafika 17: Rovnice Michaelise a Mentenové

$$v_o = \frac{V_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

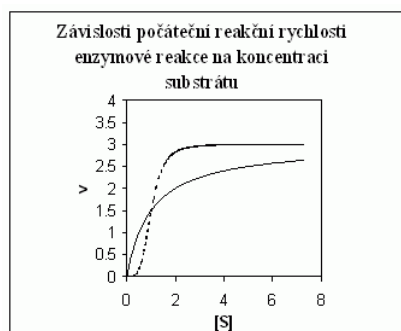
zdroj: Kodíček, 2007

kde konstanta V_{lim} je tzv. limitní rychlost (někdy též méně správně maximální rychlost V_{max}) a K_m Michaelisova konstanta. Grafem závislosti v_o na $[S]$ je rovnoosá hyperbola s posunutým počátkem, která pro vysoké koncentrace substrátu limituje k hodnotě V_{lim} . Limitní rychlost, stejně jako počáteční reakční rychlost pro každou koncentraci substrátu, je přímo úměrná koncentraci aktivního enzymu v roztoku.

Rychlost reakční počáteční (initial reaction rate or velocity) je pojem užívaný v enzymové kinetice pro rychlost reakce v čase $t = 0$, tedy pro rychlost, kterou lze změřit in

in vitro po přidání enzymu do roztoku substrátů (viz grafika 18), kde přerušovaná čára vyjadřuje pouze specifikum allosterických enzymů (aktivní centra jednotlivých podjednotek se navzájem ovlivňují tak, že vazba substrátu do jednoho centra zvyšuje aktivitu centra dalšího) (Kodíček, 2007a-d).

Grafika 18: *Reakční rychlost (v), koncentrace substrátu [S]*



zdroj: Kodíček, 2007

Koncentrace produktů je nulová a reakce tedy probíhá pouze jedním směrem. Substrát (substrate) je pojem užívaný v enzymologii pro látku, vstupující do reakce (chemicky vyjádřeno reaktant). Například substráty reakce, katalyzované enzymem invertázou (sacharóza + H₂O → glukóza + fruktóza), jsou sacharóza a voda. Dochází i k inhibici enzymů substrátem (Kodíček, 2007a-d), kdy substrát váže do aktivního místa několika nekovalentními vazbami. Při vysoké koncentraci substrátu se do tohoto místa může vázat několik molekul, z nichž však ani jedna nemá vůči katalytickým skupinám vhodnou polohu a nemůže tedy být přeměněna. Podle počtu substrátů pak dělíme enzymové reakce na jednosubstrátové (například většina izomerací, glukóza → fruktóza), dvousubstrátové (většina reakcí, viz uvedená hydrolýza sacharózy), třisubstrátové (například aktivace aminokyseliny pro proteosyntézu, aminokyselina + tRNA + ATP → aminoacyl-tRNA + AMP + PPi) nebo i čtyřsubstrátové (např. karboxylace pyruvátu za vzniku oxalacetátu, CH₃-CO-COO⁻ + CO₂ + ATP + H₂O → ⁻OOC-CH₂-CO-COO⁻ + ADP + P_i).

Rychlost limitní (limiting rate or velocity) je jeden ze základních parametrů rovnice Michaelise a Mentenové (Kodíček, 2007a-d) a dá se z ní odvodit teoreticky nejvyšší počáteční reakční rychlost, jíž může reakce při dané koncentraci enzymu za určitých podmínek (pH, teplota atd.) dosáhnout. Z různých důvodů (inhibice substrátem, omezená rozpustnost substrátů atd.) však není možné této rychlosti experimentálně docílit. Michaelisova konstanta (Michaelis constant) K_m (jindy též K_M), je parametr rovnice Michaelise a Mentenové. Je rovna

koncentraci substrátu, již je zapotřebí, aby bylo při dané koncentraci enzymu dosaženo počáteční reakční rychlosti, která odpovídá polovině limitní rychlosti. Čím je nižší, tím má enzym k danému substrátu vyšší afinitu. Má rozměr koncentrace, obvykle $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Nezávisí na koncentraci enzymu, proto ji lze určit i pro nepřečištěné enzymové preparáty či, dokonce tkáňové řezy nebo jiné biologické struktury, obsahující studovaný enzym.

Aktivita enzymu se uvádí v jednotkách specifické aktivity (Ambrožová, 2004), tj. v jednotkách specifické aktivity na jednotku vzorku. Aktivitu enzymu lze udávat v jednotce aktivity UI a katalu.

Stanovením rychlosti enzymatické reakce, tj. měřením úbytku substrátu nebo přibýváním produktu lze měřit i koncentraci enzymu. Pro absolutní vyjádření rychlosti enzymatické reakce se používá tzv. číslo přeměny. Číslo přeměny (turn-over-number) je absolutním vyjádřením aktivity enzymu a udává, kolik molekul substrátu je schopná přeměnit molekula enzymu (množství molu substrátu/mol enzymu/minuta), určuje rychlost enzymatické reakce.

Enzymatická hydrolýza nepřináší požadovaný efekt bez předchozí mechanicko - fyzikální přípravy (Ruiz et al., 2008). Před enzymatickou hydrolýzou celulózami je doporučeno aplikovat termotlakovou extruzi při 180 až 230°C. Po 96 hodinách hydrolýzy je dosaženo výtěžku 72% odpovídající koncentraci 47,3 gramů glukózy v litru. Při 220°C bylo ze 100g fytomasy vyhydrolyzováno 16,7g glukózy, přičemž proces dosahoval signifikantních výsledků již při 210°C. Je tak údajně možno dosáhnout zcukření až 57,8% (Sharma, Kalra, Grewal, 2002). Při teplotách okolo 50°C v následné enzymatické hydrolýze *Trichoderma reesei* o dávce 25 FPU však nepomáhají ani vyšší tlaky (Decker et al., 2003).

Alternativní metody uvádí vysokotlakou aplikaci čpavku (Ammonia Fiber Explosion, dále jen AFEX) u které je patentem ošetřena teplota 50 až 110°C, při které údajně nedochází k degradaci cukrů a nejméně údajně zatěžuje životní prostředí (Stuart, 1992).

K tabulce doposud publikovaných údajů (viz grafika 19) lze doplnit, že při prudké změně tlaku u AFEXu dojde k vystříknutí vody zachycené v rostlinných vláknech a tím i k redukci rozměrů fytomasy (Holtzaple et al., 1992). Zvýšení hloubky enzymatické hydrolýzy po úpravě AFEXem velmi závisí na použité surovině (Gupta, Kim, Lee, 2007).

Grafika 19: Přehled vybraných publikovaných reakčních podmínek pro AFEX

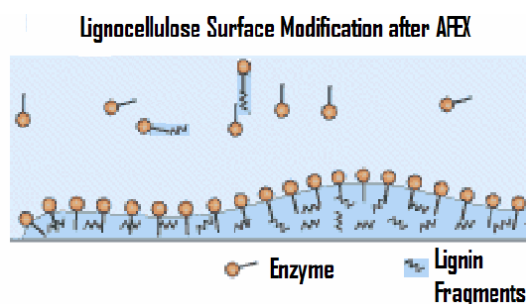
| Reference | Type of Biomass | Ammonia State | Temp. (°C.) | Time | Pressure | Particle Size | gNH ₃ /kg dry biomass | Effect on Digestibility |
|---------------------|-----------------------|--------------------|-------------|-----------|-----------------|---------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Villareal 1988 | Coastal Bermuda grass | Gaseous | ambient | — | atmosp. | — | 40 | Increase in DIT, CP ¹ |
| Waiss et al. 1972 | Rice straws | NH ₄ OH | 160 | 1 h | — | 0.64 cm | 26/52 | Increased ² |
| Waiss et al. 1972 | Rice straws | NH ₄ OH | ambient | 30 d | atmosp. | 0.64 cm | 50 | Increased ¹ |
| Millet et al. 1970 | Aspen sawdust | Liquid | 30/60/90 | 1 h | 155/360/725 psi | — | — | Increased by 51% ² |
| Millet et al. 1970 | Aspen sawdust | Gaseous | 30 | ½ to 74 h | 155 psi | — | — | Increased by 47% ² |
| Brown 1987 | Limpo grass | Gaseous | ambient | 30 d | atmosp. | 2.5 cm | 20/30/40 | Increased ¹ |
| Kellens et al. 1983 | Wheat straw | NH ₄ OH | 29 | 21 d | atmosp. | 2 mm | 50 | Increased 13% to 33% ² |
| Kellens et al. 1983 | Wheat straw | Gaseous | 6 | 44 d | atmosp. | 2.5 cm | 50 | Increased ¹ |
| Hultquist 1982 | Alfalfa | Liq./Gas. | 20–30 | 30 m | 70–165 psig | 1/16–½ in. | 5/20 | Increased by 50% ² |
| Millet et al. 1975 | Aspen sawdust | Gaseous | — | 2 h | 70 psi | — | — | Increased by 46% ¹ |
| Morris et al. 1980 | Corn stover | — | ambient | — | atmosp. | 1.3 cm | 30 | Increase in DIT, DE ¹ |

DIT = daily intake, CP = crude protein, DE = digestible energy, ¹in vivo, ²in vitro

zdroj: Holtzapple et al., 1992

Optimum pro AFEX nastává při 2 až 3 MPa, teplotách 60 až 120°C 10% sušiny při reakční době od 5 do 15 minut (Chundawat, Venkatesh, Dale, 2005). AFEX působí zejména na acetylové skupiny, hemicelulózu, celulózu, ligninouhlovodíkové vazby (lignin-carbohydrate complex, dále jen LCC), (Koshijima, Watanabe, 2003), lignin, proteiny, vápenaté vazby pro kyselinu uronovou, pektiny a podobně, viz grafika 20.

Grafika 20: povrch lignocelulózy po AFEX



zdroj: Chundawat, Venkatesh, Dale, 2005

V AFEXu se násobí chemická síla tekutého čpavku s fyzikálními silami při explozivním uvolnění tlaku, což umožňuje lépe fytomasu „otevřít“ pro následnou enzymatickou hydrolýzu (Holtzapple et al., 1992). Při aplikaci *Trichoderma reesei* se dařilo na bagáze zvýšit účinek 5,5 krát a na konopné dužnině až 11 krát.

Do 30 minut však nelze při 75°C očekávat signifikantní výsledky, protože β -glukosidické vazby ztrácejí pevnost až při vyšších teplotách (Zhang, Lyndl, 2005).

Proces obvykle probíhá při dávkování amoniaku 1-2 kg amoniaku/kg suché biomasy, teplotě 90°C a době výdrže 30 minut (Kokrhelová, Jirout, 2003). Používá se pro velké množství lignocelulózových materiálů, např. stébla pšenice, ječmene, rýže, kukuřice a jiných obilovin, papír, konopí, lisovanou třtinu apod., avšak není vhodná pro materiály s vysokým obsahem ligninu. Po použití se musí amoniak recyklovat, aby nedošlo ke znečištění životního prostředí a snížily se náklady.

Mezi největší přednosti AFEXu patří relativně nízké provozní náklady (Huber, Dale, 2009). Optimum lze hledat mezi teplotami 70 až 180°C, obsahem vody 40 až 80%, zastoupením čpavku 1:1 až 3:1 a reakčním čase 5 až 30 minut (Venkatesh et al., 2006). Byly nalezeny mechanismy k jeho optimalizaci pro následnou enzymatickou hydrolýzu (Teymouri et al., 2005). Před AFEXem je efektivní fytomasu máčet (Dale, Balan, 2008). Čpavek je vhodné dávkovat od 0,2 po 2kg na 1kg suché fytomasy při 50 až 200°C, 1,4 až 3,5MPa.

Na optimalizaci teploty, objemu vody a čpavku, reakčních časů, či dávky enzymů existuje více hledisek (Murnen et al., 2008). Jako optimum je ověřeno 160°C, poměr amoniaku k sušině fytomasy 2:1, 233% zastoupení vody a 5 minutový reakční čas. Po 168 hodinách enzymatické hydrolýzy (celulázou, β -glukosidázou a xylanázou) lze údajně zpřístupnit až 96% glukánů (glukózou tvořené oligo- a polysacharidy) a 81% xylanů.

Pomocí vícefaktorového (obsah vody, velikost částic, koncentrace O_3 , typu fytomasy a průtokové rychlosti vzduchu ku O_3) srovnávání (2^{k-p} Fractional Factorial Design) před enzymatickou hydrolýzou (při pokojových podmínkách) bylo dosaženo teoretické optimum pro ozonolýzu (García-Cubero et al., 2009). Na zkoumané rýžové slámě tak bylo po ozonolýze dosaženo 57 až 88,6% teoreticky disponibilních cukrů. Pro srovnání bez ozonolýzy 16 až 29%.

Při přípravě zápar ze škrobnatých surovin rozlišujeme dva způsoby: a) tlakový (pařákový) způsob a b) beztlakový způsob (Melzoch, Rychtera, 1995). V posledních letech se však druhý způsob používá častěji. Tuto změnu umožnila výroba termostabilních α -amyláz bakteriálního původu. Tento enzym je krátkodobě aktivní i při teplotách nad 100 °C (v praxi se používají teploty kolem 90°), což je výhodné, protože může působit i během zmazovatění škrobu. Odolnost vůči teplotě se zvýší ionty vápníku (u nové generace enzymů i to však již není nutné). Optimální pH pro působení při uvedené teplotě je 6,5 až 7.

Při tlakovém způsobu se zpracovávají celá zrna nebo hlízy. Proces uvolnění a zmazovatění škrobu vyžaduje teploty nad 100 °C. Toho se dosáhne působením vodní páry o

vyšším tlaku. Nejpoužívanějším pařákem u nás Henzeův pařák a jeho modifikace (Kubata, 1962). Velkou výhodou paření je, že se zápara současně vysteriluje. Náklady na paření jsou však vyšší než při beztlakovém způsobu. Paření má tři fáze: propařování, paření pod tlakem a vyhánění díla.

Při beztlakovém způsobu musí být obilí namleté na částice odpovídající velikosti. Mletí může být realizováno za sucha (šrotovníky) nebo za mokra (např. dispergátory nebo kladívkové mlýny). Co se týče velikosti částic zrna jsou zkušenosti z lihovarů různé, ale většinou se odborníci shodují v tom, že velikost částic by neměla být menší než 0,4 mm a větší než 1,6 mm. Po této části předpravy suroviny se přistoupí k použití enzymů. Jejich hlavním cílem je postupně převést škrob uložený ve škrobových zrnech až na zkvasitelný sacharid, převážně glukosu. Přitom nejde o jeden enzym, ale o komplex tzv. amylolytických enzymů. Z nich jsou důležité α -, β - amylázy a amyloglukosidázy. Kromě těchto enzymů lze použít i další hydrolytické enzymy jako např. hemicelulázy (např. xylanázy, β -glukanázy), proteázy a celulózy. Jejich působením lze zvýšit výtěžnost lihu a současně i snížit viskozitu media (především jsou v tomto směru důležité hemicelulázy a celulózy). Technické enzymy většinou obsahují i tyto enzymové aktivity. Lihovarské enzymy jsou vyráběny v kapalně fázi a jejich dávkování je snadné. Je třeba však dodržovat pokyny výrobce.

Existují i tzv. aktivátory, které se podílejí na aktivaci enzymu (Ambrožová, 2004), se kterou se setkáme v případě multienzymových systémů. Tyto systémy jsou představovány řadou enzymů podílejících se na přeměně výchozí látky v několikastupňových reakcích, v tzv. metabolických drahách. Na regulaci těchto reakcí se podílejí nekovalentně regulované enzymy, tzv. allosterické enzymy, kterými jsou oligomery složené ze dvou nebo více identických podjednotek a jsou prvním enzymem v řadě. Vyskytují se ve dvou extrémních reverzibilních stavech a to v aktivním a inaktivním stavu s odlišnou konformací. Allosterické enzymy mají na povrchu kromě vazebného místa pro substrát velké množství míst, na které se váže látka označovaná efektor, tzv. aktivátor, který vede postupně ke konformačním změnám ostatních podjednotek a tím vzrůstá aktivita enzymu. Efektor může enzymatickou reakci urychlit, zpomalit, či úplně zastavit. Váže se pomocí slabých vazebných sil. Naopak inhibičně působí konečný produkt multienzymové reakce, který uvádí allosterický enzym do inaktivní konformace.

S obtížemi při dávkování enzymů je třeba se vyrovnat i při dávkování enzymů k získávání termostabilní xylanázy (Beg et al., 2000). Optimum bylo nalezeno při pH = 8,5, teplotě 50°C a 2 hodinách reakčního času. Takovýto jednoduchý způsob je však uplatnitelný jen tehdy, pokud je důvěřováno údajům aktivity deklarované výrobcem.

Enzymatickou hydrolýzu fytomasy má smysl provádět až po silném mechanickém rozrušení (Weil et al., 1994; Grethlein, 1984; Grethlein, Converse, 1991; Converse, Grethlein, 1989; Walker, Wilson 1991; Nazhad et al., 1995), Čím kvalitněji byla provedena mechanická destrukce vláken, tím vyšší účinek enzymů. Poznatky získané při studiu molekulárních mechanismů mechanicko-fyzikální přípravy celulózy poskytly značné proniknutí do vlivu stupně krystalizace a měrné povrchové plochy na stupeň hydrolýzy fytomasy, což autoři doplnili ekonomickou studií vypovídající o návratnosti mechanicko-fyzikální přípravy média.

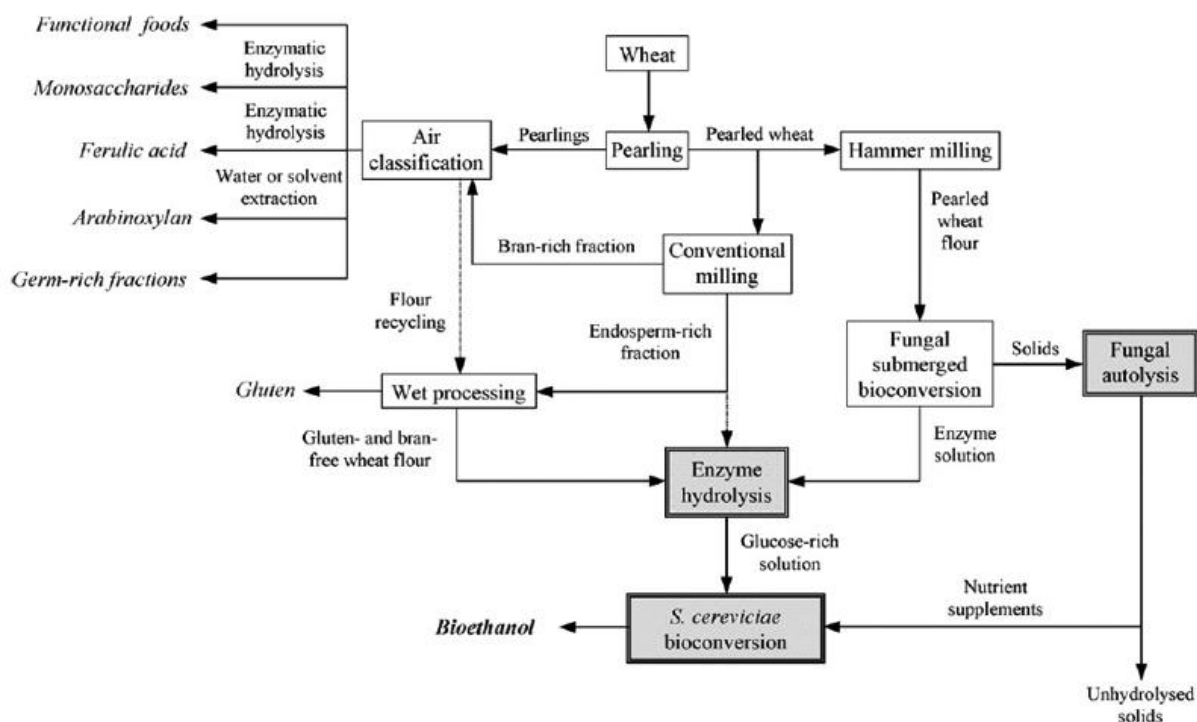
Pokud je bavlněná celulóza rozemleta na submikronové částice, lze dosáhnout až 5ti násobného výtěžku (60% z teoretického maxima) oproti běžnému stavu (Yeh, Huan, Chen, 2009). Zvyšování hloubky intenzity hydrolýzy touto cestou nabízí široké pole působnosti, protože je možno využít i kvalitnější techniku (SPX corporation, 2009).

Samotnou enzymatickou hydrolýzou *Trichoderma reesei* a *Aspergillus niger* bylo dosaženo shodně 15% teoretického potenciálu, po termotlakové přípravě až 90% teoretického potenciálu získané glukózy (Grous, Converse, Grethlein, 1986). Byla provedena studie parametrů pro dosažení maximální efektivity při enzymatické hydrolýze slámy (Rivers, Emert, 1988). Za další možný příklad enzymatické hydrolýzy může být považována vysokoteplotní dvouetapní aplikace amoniaku s následnou enzymatickou hydrolýzou pro separaci xyланu a ligninu (Kim, Lee, 2005).

Novinkou je metoda přípravy lignocelulózové fytomasy glycerolem (atmospheric aqueous glycerol autocatalytic organosolv pretreatment, dále jen AAGAOP) (Sun, Chen, 2008). 5% koncentrát byl v AAGAOP zdržen při ve 220°C po 3 hodiny. Následně bylo uvolněno až 70% hemicelulózy a 65% ligninu. Po 48 hodinách enzymatické hydrolýzy bylo údajně dosaženo 90% hydrolýzy.

Taktéž ve způsobu zpracování pšeničného zrna lze vysledovat novátorské trendy související s intenzivním rozemletím zrna (Arifeen et al., 2009). Pracovní postu je rozkreslen v grafice 21, Mletí bylo tak intenzivní, že mouka propadávala 500 μ m sítím.

Grafika 21: Začlenění enzymatické hydrolyzy v systému Arifeenova kolektivu



zdroj: Arifeen et al., 2009

Tento systém, zařaditelný do technologie komplexního zpracování (seznam produktů je čitelný v levé části grafiky 21) s minimalizací odpadů, využíval k enzymatické hydrolyze enzymy produkované organismy *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 (kultivováno při 30°C, pH = 4,5). Fytomasa byla primárně ztekucována při 80°C a tlaku 0,1MPa po dobu 3 hodiny. Samotná enzymatická hydrolyza probíhala ve 29% sušinně dávkou 45g filtrátu *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1 /l. Začala teplotním náběhem pro sekundární ztekucení na 68°C, následně klesla na reakční optimum pro *Aspergillus awamori* 2B 361 U2/1, tedy 60°C. pH nebylo během hydrolyzy kontrolováno. Je udáváno, že po 24 hodinách byl obsah glukózy v hydrolyzátu 266g/l, což je pro danou fytomasu interpretováno jako 87% konverzi škrobu. Při následné produkci etanolu se ukázalo výhodné odstraňování lepku.

Odpadní škrob byl v první fázi hydrolyzován enzymatickým mixem Teramamyl 120L (1%). Hydrolyza probíhala při pH=4,2 a teplotě 100°C po dobu 25 hodin. V druhé fázi byl přidán enzymatický mix Spirizyme (taktéž 1%). pH bylo zachováno na 4,2, ale teplota byla na následujících 25 hodin snížena již jen na 60°C. Sterilizace probíhala při 110°C po dobu 15 minut. Po oddělení nezhydrolyzovaného škrobu a vláknitého materiálu centrifugou bylo získáváno 80 až 110 glukózových ekvivalentů (dále jen GE) z 1 litru hydrolyátu (Davis et al., 2006).

2.5 Technologie kombinovaných hydrolýz fytomasy

Nejlepších technologických výsledků bylo dosaženo optimalizováním a skládáním postupů z předchozích kapitol. Principem kombinovaných hydrolýz fytomasy zůstává depolymerizovat celulóзовou, hemicelulóзовou, či lignocelulóзовou složku, avšak při kombinaci postupů je nutno brát zvláštního zřetele na zabránění degradace výstupních monosacharidů, což bývá u kontinuálních systémů technologickou obtíží.

Kombinovanou hydrolýzu fytomasy je doporučeno provádět až po rozemletí, kdy propadává sítem s oky 2mm (Zhao, Xia, 2009). Po promytí a vysušení byl v sušině obsah celulózy 38,7%, hemicelulózy 21,7% a ligninu 19,3%. Následně byl v poměru 1:8 aplikován po 75 minut 0,5M NaOH při 80°C. Zastoupení celulózy v sušině vzrostlo na 64,1%, hemicelulózy na 24,6%. Obsah ligninu v sušině klesl po provedené zásadité hydrolýze na 8,6%. Mix celuláz a hemiceluláz z *Trichoderma reesei* vykazoval 146 FPU, 12 cellobiázových jednotek (dále jen CBU, viz Ghose, 1978) a aktivitu xylanázy 1458 (dále jen XA, viz Bailey, Biely, Poutanen, 1992). Preparát z *Aspergillus niger* ZU-07 vykazoval 376 CBU a nedetekovatelnou FPU. Dávky enzymatické hydrolýzy byly 10 a 20 FPU. Optimální reakční teplota je 45 až 50°C, reakční čas 12 hodin (Zhao, Xia, 2009). Technické obtíže nastávají, pokud mají probíhat zároveň fermentační procesy (SSF), jejichž optimální teplota je mimo výše uvedené teplotní rozmezí.

Patentován je i 2-fázový proces, ve kterém k první hydrolýze dochází při 140 až 220°C, tlaku 0,3 až 1,5MPa a pH od 2 do 3 (například HNO₃) (Brink, 1991). Sušina fytomasy se pohybuje okolo 15%. V tomto kroku dojde k hydrolýze převážně hemicelulóz na pentózy a hexózy. Následuje citlivější krok, při kterém je fytomasa oxidována 0,2 až 0,4g O₂/1kg sušiny fytomasy za minutu. Obvykle taktéž v rozpětí 140 až 220°C. Následuje druhý hydrolyzační krok za silnějších podmínek, obvykle při teplotách od 160 do 240°C. Konkrétně při pH 2,1 je v patentu zaznamenán reakční čas 60 minut, teplota 170°C a průtok vzduchu zajišťující 1g O₂ 1kg sušené fytomasy za 1 minutu. Druhá fáze má v daném případě teplotu mezi 160 a 240°C, přičemž je doporučeno rozmezí 180 až 220°C. Koncentrace redukujících cukrů se dá následně případně očekávat mezi 1 a 10%. V jiném případě je v první fázi při pH (reaktantem je HNO₃) od 1,4 do 3 (přesněji od 1,6 do 3) je při teplotách 140 až 220°C (optimálně 160 a 180°C) patentován tlak 0,5MPa po dobu nepřesahující 40 minut. V druhém kroku je pH od 1,2 do 3 (lépe od 1,3 do 2) patentována teplota od 160 do 200°C. Tlak by měl být vyšší, než

v předchozím kroku (Brink, 1991). 1kg suché fytomasy by mělo za 1 minutu proudit 0,2 až 4g O₂. Další hydrolyzační krok by měl probíhat při pH od 1,2 do 2,5 (nejlépe 1,25 až 1,75). Teplotní rozmezí je udáváno mezi 160 a 240°C, lépe 180 až 220°C. Zde by již mělo docházet k samotnému rozkladu celulózy na jednotlivé jednotky glukózy. Suché oxidační procesy by měly probíhat optimálně nad 220°C, optimum pro vlhké oxidační procesy leží mezi 180 a 220°C. Touto metodou lze kyselou hydrolýzou HNO₃ (pH = 3) při 160°C po 10 minutovém náběhu a následném 30 minutovém zdržení v prvním stupni dosáhnout obsahu redukcujících cukrů 1,16%. Po vymytí a snížení pH (pomocí 72% HNO₃) na 2,45 lze po 10 minutovém náběhu na 160°C a následném 60 minutovém zdržení při proudu 1,01g O₂/kg suché fytomasy přejít do tlaků od 0,7 až 1,8 MPa k další kyselé hydrolýze. Ta bude probíhat při 195 až 205°C při tlaku 2,4MPa. Maximálního obsahu cukrů by mělo být dosaženo po 35 minutách.

Byl publikován postup skládající se z zásadité hydrolýzy a následné enzymatické hydrolýzy celulázou z *Trichoderma reesei* (Marchal, Rebeller, Vandecasteele, 1984). Jsou známy i metody nevyžadující předchozí odstraňování ligninu z fytomasy (Holtzaple et al., 1992). Studium závislosti dávek hydroxidu, vody, reakčního času a teploty tak bylo umožněno zkrátit zvýšením reakční teploty dobu hydrolýzy z 8 až 150 dní, tudíž i zmenšit objem reaktorů a zároveň se vyhnout riziku degradace lignocelulózy. Protože se již pracovalo při zvýšených teplotách, ukázalo se výhodné desetinásobně zvýšit objem reakční vody, nejen z důvodu ředění, ale i kvůli jejímu relativně vysokému měrnému teplu. Hydroxid vápenatý (Ca(OH)₂) byl vybrán pro relativně nízkou cenu v porovnání s ostatními zásadami, i z hlediska bezpečnosti.

Podmínkou úspěšnosti této kombinované hydrolýzy je rozemletí fytomasy na zhruba 1cm kusy. Následně je přidávána voda (poměr k suché fytomase patentován na 6 až 19:1, optimum zaznamenáno 16:1) a Ca(OH)₂ (2 až 50g Ca(OH)₂ : 100g suché fytomasy, optimum zaznamenáno při 30g Ca(OH)₂ : 100g suché fytomasy) vždy dle vybraného druhu fytomasy. pH se tak pohybuje v rozmezí mezi 8,5 až 10,5, optimum je zmíněno mezi 9 a 10. Reakční teploty jsou v patentu zaznamenány v rozmezí od 40 do 150°C, optimální rozmezí je definováno mezi 100 a 140°C, vždy s přihlédnutím k danému typu fytomasy. Reakční doby začínají na 1 a končí na 36 hodinách. Optimum lze hledat mezi 1 a 20 hodinami, mohou jím být například 3 hodiny, pro jiné druhy fytomasy například mezi 15 a 25 hodinami. Obsah ligninu se tak snižuje jen o 30 až 20%, někdy jen o 15%. Principem je odstranění acetylových skupin z hemicelulózy, čímž je následně zvýšena celková rozložitelnost bez toho, aniž by se odstraňovaly molekuly ligninu. Takto nahydrolyzovaná fytomasa se dále hydrolyzuje obvykle kyselinami, enzymaticky, či opět kombinací výše uvedených metod.

Při 2, 4 a 6% sušiny rozdrcené ječné slámy lze enzymatickou hydrolyzou získat 2, 3 a 3,6 g etanolu z litru substrátu (Boyle, Barron, McHale, 2004). Při aplikaci nízkých koncentrací NaOH byl pozorován markantní nárůst na 3,9, 8 a 12g etanolu z litru, což odpovídalo až 20g etanolu ze 100g slámy.

Po intenzivním rozemletí fytomasy, považování v kyselině a jejím následném vymytí lze při silných dávkách enzymů dosáhnout vysoké hloubky hydrolyzy (Stuart, 1992). Je třeba ale zamezovat tvorbě ($C_5H_{10}O_5 \rightarrow C_5H_4O_2 + 3 H_2O$) toxického $C_5H_4O_2$ (furfural) či HMF, který je následně v hydrolyzátu přítomný a musí se separovat, aby nepůsobil toxicky (de Vrije et al., 2009). HMF lze převádět na $(CH_3)_2C_4H_2O$ (2,5-dimetylfuran, dále jen DMF), který má využití nejen jako kapalné biopalivo, ale je nadějnou surovinou pro chemický průmysl (Leshkov, Chheda, Dumesic, 2006). Tvorba i detoxikace páry zvyšuje náklady procesu (Stuart, 1992).

Za kombinovanou hydrolyzu lze považovat i postup kdy po klasické kyselé hydrolyze následuje hydrolyza enzymatická. Z 10 až 20% sušiny lze údajně dosáhnout výtěžků 74 až 91,4% teoreticky disponibilní glukózy (Allen, Grethlein, Converse, 1984).

Pokud je po mletí a tlakové extruzi následně prováděna zásaditá hydrolyza pomocí NaOH při 70°C, údajně se daří delignifikovat fytomasu ze 77% (Vrije, 2002). Výtěžek z fytomasy byl 95% celulózy a 44% hemicelulózy, přičemž po konečném stádiu enzymatické hydrolyzy byla zpřístupněna glukóza, xylóza a arabinóza z 69% z celulózové a z 38% z hemicelulózové frakce. Závažná je úloha inhibičního furfuralu a 5-hydroxymethyl furfuralu (de Vrije et al., 2002).

Byl zkoumán efekt přítomné hemicelulózy a ligninu na dávkování enzymů (pomocí FPU/g) a následnou hydrolyzu celulózy v glukózu (Mussatto et al., 2008). Kombinovanou hydrolyzu lze provádět též když je po mechanické úpravě aplikován zásaditý stupeň ($Ca(OH)_2$) a až následně enzymatický (Kim, Holtzaple, 2006).

Alternativou je provádět první hydrolyzu v kyselém prostředí. Po 5 minut se nechává působit 0,4% HNO_3 při 195°C. Při následném 6-ti násobném promytí je odebráno 95% uvolněných cukrů včetně kyseliny octové, furfuralu a HMF. Vesměs se jedná o hydrolyzáty hemicelulózy. Tato kapalina, zhruba o 5% koncentraci rozpustných látek prochází nanofiltračními membránami, které dle vybraných molekulových hmotností odebírají a koncentrují cukerné složky. Dosažená koncentrace GE po první hydrolyze činí 20% (Lombard, 2000). Nezhydrolyzované zbytky lignocelulózy jsou následně podrobeny druhé kyselé hydrolyze. Ta probíhá za použití 2% silné anorganické kyseliny (uvedena H_2SO_4 , HCl a doporučena HNO_3) při 210°C po dobu 7 minut. Tato silnější koncentrace lépe rozštěpí silné

celulózové vazby. Hydrolyzát je opět vymýván a stlačován na 50% podíl sušiny. Tím je odebráno opět 95% všech hydrolyzou uvolněných produktů. Nanofiltery je opět dosahováno 20% koncentrace cukrů. Třetí stupeň hydrolyzy je zásaditý a dochází v něm k delignifikaci lignocelulózových zbytků z předchozí kyselé fáze. 4% zásada reaguje po 4 minuty při 210°C. Tento zásaditý proces může být akcelerován antrachinonem (antracen-9,10-dion, $C_{14}H_8O_2$, dále jen AQ), či tetrahydroantrachinonem ($C_{14}H_{12}O_2$, dále jen THAQ). Smyčky mezi těmito třemi fázemi dokáží hydrolyzu dále více zefektivnit (Lombard, 2000). Konečným krokem je hydrolyza enzymatická, ve které lze odkázat na předchozí kapitolu 2.4.

3. Metodika

V praktické části byla srovnávána vhodnost škrobnaté (pro stručnost uváděno pouze kukuřičné zrno) a celulózové (pro stručnost uváděna pouze kukuřičná siláž) fytomasy k různým typům, modifikacím a stupňům intenzity hydrolyzy. Měřítkem srovnání byla dosažená hloubka hydrolyzy, která byla poměřována obsahem GE (metodika v kapitole 3.7) a výtěžkem alkoholu (dle metodiky v kapitole 3.8).

Hydrolyzy probíhaly dle příslušných metodik 3.2, 3.3 a 3.4, přičemž 0,3MPa extruze bylo dosahováno ve vyřazeném sterilizátoru Chirana HS 62A užitím silnostěné tlakové nádoby vlastní konstrukce, opatřené širohohrdlým rychlouzávěrem a tlakoměrem. 1MPa extruzi zajistil externě Ing. V. Pernica. Většinu enzymatických preparátů poskytl darem Ing. V. Antonov ze společnosti INOTEX spol. s r. o., sladové mléko bylo vlastní výroby (viz metodika 3.1, fotografie 4). α -amylázy z *Aspergillus Oryzae* a *Bacillus subtilis* byly zakoupeny u Fisher Scientific, spol. s r.o.

Grafika 22: Průvodní listy enzymatických preparátů

| INOSAMPLE HMP | | INOSAMPLE HMC | |
|------------------------------|--|------------------------------|--|
| Charakteristika : | Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem <i>Trichoderma reesei</i> . Katalyzuje rozklad hemicelulózy na oligo- a monosacharidy. <i>hemiceluláza</i> | Charakteristika : | Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem <i>Humicola insolens</i> . Katalyzuje rozklad hemicelulózy, β -glukanů a celulózy na oligo- a monosacharidy. <i>hemiceluláza</i> |
| Vlastnosti : | Žlutohnědá kapalina Rozpustný v teplé i studené vodě Neionogenní pH rozsah = 6,5 – 9 Optimální pH = 7,0 – 8,5 Teplotní rozsah = 40 – 60°C Optimální teplota = 45 – 55°C <i>pH=8</i> | Vlastnosti : | Žlutohnědá kapalina Rozpustný v teplé i studené vodě Neionogenní pH rozsah = 5 – 7 Optimální pH = 5 – 6 Teplotní rozsah = 40 – 60°C Optimální teplota = 50 – 60°C <i>pH=5,5</i> |
| Instrukce k použití : | Enzym se dávákuje do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou. Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepřišel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy). | Instrukce k použití : | Enzym se dávákuje do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou. Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepřišel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy). |
| Skladovatelnost : | Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C. | Skladovatelnost : | Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C. |

INOSAMPLE CLC

Charakteristika : Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Trichoderma reesei*.
Katalyzuje rozklad celulózy, β-glukanů a hemicelulóz na oligo- a monosacharidy. *celuláza*

Vlastnosti : Žlutohnědá kapalina
Rozpustný v teplé i studené vodě
Neionogenní
pH rozsah = 4 – 6
Optimální pH = 4,5 – 5,5 *pH = 5*
Teplotní rozsah = 50 – 65°C
Optimální teplota = 55 – 65°C

Instrukce k použití :

Enzym se dává do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou.
Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepříšel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

Skladovatelnost : Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

INOSAMPLE APN

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

Vlastnosti : Světle žlutohnědá kapalina
Rozpustný v teplé i studené vodě
Neionogenní
pH rozsah = 5 – 8
Optimální pH = 6 – 7 *pH = 7-8*
Teplotní rozsah = 40 – 60°C
Optimální teplota = 50 – 55°C

Instrukce k použití :

Enzym se dává do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou.
Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepříšel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

Skladovatelnost : Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

INOSAMPLE ASD

Charakteristika : Enzymatický prostředek ve stádiu vývoje produkovaný kmenem *Bacillus licheniformis*.
Katalyzuje rozklad škrobu na dextriny až disacharidy. *α-amyláza*

Vlastnosti : Žlutohnědá kapalina
Rozpustný v teplé i studené vodě
Neionogenní
pH rozsah = 5 – 10
Optimální pH = 6 – 8
Teplotní rozsah = 20 – 85°C
Optimální teplota = 50 – 75°C

Instrukce k použití :

Enzym se dává do vyhřáté lázně, nebo se ohřívá elektricky či nepřímou párou. Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou.
Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepříšel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

Skladovatelnost : Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

TEXAZYM BIO-TK

Charakteristika : Kombinovaný enzymatický prostředek určený pro rozklad celulóзовých a hemicelulóзовých substrátů na oligo- a monosacharidy dále zkusitelné na bioplyn, popř. biopaliva na bázi alkoholu.

Vlastnosti : Žlutohnědá kapalina
Rozpustný v teplé i studené vodě
Neionogenní
pH rozsah = 6,5 – 8,5
Optimální pH = 7,0 – 8,0
Teplotní rozsah = 40 – 60°C
Optimální teplota = 50°C

Instrukce k použití : Hydrolyza biomasy pro zvýšenou produkci bioplynu:

Doporučené dávkování: 1%hm. sušiny nebo cca 1 ml/l substrátu

Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou. Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepříšel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

Skladovatelnost : Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

TEXAZYM APC

Charakteristika : Kombinovaný enzymatický prostředek určený pro rozklad celulóзовých substrátů na oligo- a monosacharidy dále zkusitelné na bioplyn, popř. biopaliva na bázi alkoholu.

Vlastnosti : Žlutohnědá kapalina
Rozpustný v teplé i studené vodě
Neionogenní
pH rozsah = 4,5 – 8
Optimální pH = 6 – 7
Teplotní rozsah = 40 – 60°C
Optimální teplota = 50°C

Instrukce k použití : Hydrolyza biomasy pro zvýšenou produkci bioplynu:

Doporučené dávkování: 1%hm. sušiny nebo cca 1 ml/l substrátu

Je třeba vyvarovat se kontaktu enzymu s přímou párou. Je třeba dbát na to, aby při manipulaci enzym nepříšel do kontaktu s agresivními chemikáliemi (kyseliny, hydroxidy, organická rozpouštědla, kationické tenzidy).

Skladovatelnost : Doporučuje se skladovat v chladu a suchu. Skladování při teplotách okolo 25°C po dobu 3 měsíců nesnižuje aktivitu produktu. Je nutno chránit před vlhkostí a teplotami nad 30°C.

zdroj: Ing. V. Antonov, INOTEX spol. s r. o.

Grafika 23: *Sladové mléko*



zdroj: autor

Nejvíce problematické se stalo dávkování enzymů. Prvotním záměrem bylo využívat FPA, ale výsledky dosažené touto metodou byly natolik nedůvěryhodné, že bylo navrženo vlastní dávkování dle SEA a CEA (viz metodiky 3.5 a 3.6).

Hydrolyzáty byly homogenizovány míchadly HEIDOLPH RZR 1, nastavenými na 50 otáček za minutu. Temperování zajišťoval oběhový termostat JULABO ED, verze 03/04. Teplota byla monitorována soustavou čidel Papouch TMU. Protože bylo nutné data zpětně vyhodnocovat, po průchodu USB HUBy byla sváděna do PC. V OS správu dat z baterie teploměrů zajišťoval výrobcem dodávaný ovladač „Papouch TMU Thermometer VCP“, který byl spravován pod virtuálním USB Serial Portem verze 1.0.2176.0. Aby bylo možné ovladače použít i pod jinými OS, bylo třeba upravit Voltage Identification Digital (dále jen VID) a Proportional Integral Derivative Controller (dále jen PID) na hodnoty VID = 5050 HEX, PID = 0400 HEX.

TMU neumí přijímat instrukce, pouze odesílá v pravidelných intervalech (10 vteřin) hodnotu teploty fytohydrolyzátu ve formátu kompatibilním s protokolem Spinel (formát 65 B, viz <http://spinel.papouch.com>), přičemž výrobcem udávané parametry sériové linky jsou vypsány v tabulce 1. Formát dat je definován v tomto pořadí: prefix, formát, adresa, kód instrukce, teplota, zakončovací znak.

Tabulka 1: *Parametry sériové linky teploměru:*

| | |
|---------------------|-----------|
| Rychlost | 9600 Baud |
| Počet datových bitů | 8 |
| Parita | Žádná |
| Počet stopbitů | 1 |

zdroj: autor

Za základ systému pro distanční vyhodnocování průběhu změn teploty byl zvolen RRDtool 1.3 Beta 4 (viz <http://oss.oetiker.ch/rrdtool>). Software TM2web pracoval na lokálním OS a odesílal Internetem zpracovaná data protokolem GET (viz <http://www.w3.org/Protocols/rfc2616/rfc2616-sec9.html#sec9.3>) na server na kterém je přijímá a vykresluje PHP skript 1. Ten si je zaznamená pro další vyhodnocení.

Skript 1: *Přijímání dat aktuální teploty na webovém serveru*

```
<?php
```

```
if (isset($_GET["temp1"])) {
    $value=$_GET["temp1"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_1.rrd N:$value";
}
```

```
if (isset($_GET["temp2"])) {
    $merak="c2";
    $value=$_GET["temp2"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_2.rrd N:$value";
}
```

```
if (isset($_GET["temp3"])) {
    $merak="c3";
    $value=$_GET["temp3"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_3.rrd N:$value";
}
```

```
if (isset($_GET["temp4"])) {
    $merak="c4";
    $value=$_GET["temp4"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_4.rrd N:$value";
}
```

```

if (isset($_GET["temp5"])) {
    $merak="c5";
    $value=$_GET["temp5"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_5.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp6"])) {
    $merak="c6";
    $value=$_GET["temp6"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_6.rrd N:$value";
}

// $time=time();
// $cmd="rrdupdate teplota.rrd -t $merak N:$value";
// echo $cmd;
exec($cmd);

// $fh=fopen("log.txt", "a");
// fputs($fh, "$cmd\n");
// fclose($fh);
?>

```

Při požadavku na zobrazení deního průběhu teploty na webu se spustí skript 2.

Skript 2: Vykreslení hodnot za poslední hodiny

```

<html>
<head>
<META HTTP-EQUIV="CACHE-CONTROL" CONTENT="NO-CACHE">
<meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=utf-8">
<meta http-equiv="refresh" content="60" />
<title>Ing. Marousek - projekt Biobutanol</title>
</head>
<html>

<?
    $delay=180;

    $time=time()-$delay;

    $day_step=60*60*24;
    $today=floor($time/$day_step)*$day_step;
    $tomorrow=$today+$day_step;

    $hour_step=60*60;
    $thishour=$time-2*$hour_step;
    $nextrhour=$thishour+2*$hour_step;

```

```

/*
    exec("rrdtool graph c1_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c1:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 1 (den)\\"");
    exec("rrdtool graph c2_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c2:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 2 (den)\\"");
    exec("rrdtool graph c3_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c3:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 3 (den)\\"");
    exec("rrdtool graph c4_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c4:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 4 (den)\\"");
    exec("rrdtool graph c5_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c5:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 5 (den)\\"");
    exec("rrdtool graph c6_den.gif -s $today -e $tomorrow --upper-limit 50 --lower-limit 0 DEF:a=teplota.rrd:c6:AVERAGE
LINE3:a#FF0000:\\"Cidlo 6 (den)\\"");
*/

$fn="AVERAGE";
$lm="--upper-limit 40 --lower-limit 0";
$m="-W 'Ing. Marousek - projekt Biobutanol'";

    exec("rrdtool graph c1_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_1.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Anca
(hodina)\\"");
    exec("rrdtool graph c2_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_2.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Barca
(hodina)\\"");
    exec("rrdtool graph c3_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_3.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Celine
(hodina)\\"");
    exec("rrdtool graph c4_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_4.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Denisa
(hodina)\\"");
    exec("rrdtool graph c5_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_5.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Eva (hodina)\\"");
    exec("rrdtool graph c6_hodina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_6.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\\"Francis
(hodina)\\"");

?>

<center><h1>Ing. Marousek - projekt Biobutanol</h1></center>
<!--<center><h3>dne 27.1.2008 prohibaji upravy, data nemuseji odpovidat realite</h3></center>-->
<br>

<center>
Zobrazit <a href="prehled_tyden.php">tydenni prubezh</a> teploty
<br>
<br>
<table>
<tr>
<td>
<h2>Teplota Anca</h2>
<!---->

</td>

```

```

<td>
<h2>Teplota Barca</h2>
<!---->

</td>

</tr><tr>

<td>
<h2>Teplota Celine</h2>
<!---->

</td>

<td>
<h2>Teplota Denisa</h2>
<!---->

</td>

</tr><tr>

<td>
<h2>Teplota Eva</h2>
<!---->

</td>

<td>
<h2>Teplota Frencis</h2>
<!---->

</td>
</tr>
</table>
</center>
</html>

```

Při požadavku na zobrazení týdenního záznamu hodnot se spouští skript 3.

Skript 3: *Vykreslení týdenních hodnot*

```

<html>
<head>
<META HTTP-EQUIV="CACHE-CONTROL" CONTENT="NO-CACHE">
<meta http-equiv="Content-Type" content="text/html; charset=utf-8">
<meta http-equiv="refresh" content="300" />

```

```

<title>Ing. Marousek - projekt Biobutanol</title>
</head>
<html>

<?
  $delay=180;

  $time=time()-$delay;

  $day_step=60*60*24;
  $today=floor($time/$day_step)*$day_step;
  $tomorrow=$today+$day_step*7;

  $hour_step=60*60;
  $thishour=$time-$hour_step*24*7;
  $nexthour=$time+$hour_step;

  $fn="AVERAGE";
  $lm="--upper-limit 40 --lower-limit 0";
  $m="-W 'Ing. Marousek - projekt Biobutanol'";

  exec("rrdtool graph c1_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_1.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Anca (tyd.)\"");
  exec("rrdtool graph c2_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_2.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Barca (tyd.)\"");
  exec("rrdtool graph c3_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_3.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Celine (tyd.)\"");
  exec("rrdtool graph c4_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_4.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Denisa (tyd.)\"");
  exec("rrdtool graph c5_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_5.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Eva (tyd.)\"");
  exec("rrdtool graph c6_todina.gif $lm -E $m -s $thishour -e $nexthour DEF:a=teplota_6.rrd:t:$fn LINE3:a#113388:\"Francis (tyd.)\"");

?>

<center><h1>Ing. Marousek - projekt Biobutanol - tydenni prubeh</h1></center>
<!--<center><h3>dne 27.1.2008 probihaji upravy, data nemuseji odpovidat realite</h3></center>-->
<br>

<center>
Zpet na <a href="prehled.php">hodinove prubehy</a>
<br>
<br>
<table>
<tr>
<td>
<h2>Teplota Anca</h2>

</td>

<td>
<h2>Teplota Barca</h2>


```



```

</td>

</tr><tr>

<td>
<h2>Teplota Celine</h2>

</td>

<td>
<h2>Teplota Denisa</h2>

</td>

</tr><tr>

<td>
<h2>Teplota Eva</h2>

</td>

<td>
<h2>Teplota Frencis</h2>

</td>

</tr>
</table>
</center>
</html>

```

Záznam teploty provádí skript 4, který přebírá parametr tempN (kde N je pořadové číslo čidla a hodnotou parametru je teplota ve formátu desetinného čísla s čárkou, použitou jako oddělovač. Skript 4 dále provede nahrazení za tečku a volá RRDtool, kterému předá hodnotu a čas, kdy byla hodnota teploty fytohydrolyzátu naměřena.

Skript 4: Záznam pro statistické vyhodnocení

```

<?php

if (isset($_GET["temp1"])) {
    $value=$_GET["temp1"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_1.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp2"])) {
    $merak="c2";

```

```

    $value=$_GET["temp2"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_2.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp3"])) {
    $merak="c3";
    $value=$_GET["temp3"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_3.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp4"])) {
    $merak="c4";
    $value=$_GET["temp4"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_4.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp5"])) {
    $merak="c5";
    $value=$_GET["temp5"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_5.rrd N:$value";
}

if (isset($_GET["temp6"])) {
    $merak="c6";
    $value=$_GET["temp6"];
    $value=str_replace(",",".", $value);
    $cmd="rrdupdate teplota_6.rrd N:$value";
}

// $time=time();
// $cmd="rrdupdate teplota.rrd -t $merak N:$value";
// echo $cmd;
exec($cmd);

// $fh=fopen("log.txt", "a");
// fputs($fh, "$cmd\n");
// fclose($fh);
?>

```

Zbytek kódu, který je k doptání u autora, řídí přístupovou politiku a zobrazení vygenerovaných dat. Záznam a statistické vyhodnocení hodnot pH (použita soustava pH čidel PHC101-01) probíhá na analogickém principu. Z další techniky byl v návaznosti na metodiky použit titrátor Meettler Toledo DL 50, lihoměr I-A/t, spektrofotometr SPEKOL 11, mikroskopy SEM 6300 a SEM 7401F.

3.1 Sladové mléko

Pracovat nejlépe se zadním ječmenem, není-li k dispozici, pracovat s krmným ječmenem, který byl dobře hnojen dusíkem.

1) Ječmen se dá do kbelíku, či jiné nádoby a zalije se značným přebytkem 20 až 25°C teplé vody. Promíchá se a každou hodinu se voda vymění. Tento proces opakovat nejméně třikrát. Po třetím máčení se ječmen zalije už studenou vodou 10 až 15°C a máčí se tak dlouho, až je máčení ukončeno, což se projeví:

- a) Zrno se musí nechat ohnout přes nehet, aniž by se při tom zlomilo
- b) Zmáčkne-li se zrno mezi palcem a ukazováčkem, nesmí píchat
- c) Při silnějším stisknutí u ucha musí být slyšet slabé prasknutí, jak se oddělila plucha od zrna
- d) Střed rozříznutého zrna má být bílý a škrtneme-li řezem po prkně, nechá bílou čáru („zrno píše“). Dobře namočený ječmen má obsahovat 45 až 50% vody.

2) Namočený ječmen se rozprostře do 5 až 8cm silné vrstvy a každé 2 až 3 hodiny se ječmen po následující 3 dny přesype, aby se co nejvíce provzdušnil. Optimální teplota je 16 až 20°C, za 3 dny nejpozději by měl ječmen klíčit (na konci zrna se objeví malý bílý bod, příští kořínek, sládcí říkají tomuto ječmenu „pukovka“). Zrno se stále se ve 3 hodinových intervalech větrá přehazováním (na noc se dává do 1cm silné vrstvy, aby nepřeschlo, ráno do slabší). Později se větrá přehazováním jen jedenkrát denně. Teplota by měla být maximálně 18°C.

3) Když z každého zrna vyrazí 3, či 4 pokroucené kořínky, což bývá obvykle v následujících 4 dnech, začne ječmen vonět po oloupaných okurkách. Říká se mu „mladík“. Nyní by teplota měla být kolem 15°C a „mladík“ se dvakrát denně větrá přehozením. Po 4 až 5 dnech má už mladík po pluchou „pírko“ velikosti 1/3 až 1/2 zrna.

4) Po 7 až 8 dnech zmizí okurková vůně, slad se nazývá „zelený“. Pírko (zárodek listu) se nechá vyrůst na 3/4 až celou délku zrna, kořínky na 1 až 1,5 délky zrna, nyní se slad nazývá „dlouhý“. Je dobře, když slad „vrabčí“ (kořínky se spletou dohromady a celek zplstnatí).

5) Tento slad v mixéru rozšrotujeme s vodou (1:5) na „sladové mléko“

3.2 Kyselá hydrolýza

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 30 minut

3) prudká dekomprese

3.3 Zásaditá hydrolýza

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 30 minut

3) prudká dekomprese

3.4 Enzymatická hydrolýza

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 30 minut

3) prudká dekomprese

4) provede zoptimalizování pH a teploty pro vybraný enzym

5) aplikuje se 50, či 100 jednotek CEA, či SEA dle zvoleného enzymového preparátu

6) 6 hodin stálého míchání, kontroly pH a teploty

3.5 SEA

Enzymy rozkládající škrob jsou dávkovány v starch enzyme activity (mg škrobu, které za sekundu hydrolyzuje 1 gram enzymu, $S(\text{mg})/t(\text{s})/E(\text{g})$, dále jen SEA):

- 1) Do zkumavek navážit po 1,000g škrobu ($(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$)
- 2) Přidat po 0,1g testovaného enzymu (0,1g = 2 kapky). V případě slepých vzorků tento krok vynechat)
- 3) Vstříknout 10g destilované H_2O tak, aby smyla případné zachycené zbytky po stěnách zkumavky a promísila enzym se škrobem
- 4) Dle charakteristiky enzymu upravit pufrům pH (Sýkora, 1976)
- 5) Zkumavky temperovat v optimální teplotě dle charakteristiky enzymu po 30 minut
- 6) Obsah zkumavek přelít do 200ml Erlenových baněk
- 7) Přidat 15ml destilované H_2O a 10ml měďnatého roztoku (na 1000ml měďnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na_2CO_3 ve 350ml destilované H_2O + 50g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ve 100ml destilované H_2O + 25g krystalického CuSO_4 . Destilovanou H_2O doplnit do 1000ml a vyčkat na rozpuštění (za studena 24h)).
- 8) 10minut varu, následně rychlé ochlazení
- 9) 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_2O doplnit do 200ml) destilovanou H_2O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H_2SO_4 (na 1000 ml 25% H_2SO_4 : 250 ml 96% H_2SO_4 + 750ml destilované H_2O). Při použití bezvodého Na_2CO_3 v měďnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H_2SO_4)
- 10) K titracím připravit zásobu 0,05 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (dále jen sirnatan), (na 2000ml sirnatanu: 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 2000ml destilované H_2O).
- 11) titrem „X“ (kde $X \geq 0,02\text{g} \leq 0,03\text{g}$) 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_2O), se na titrátoru (pro DL 50 metodou J-titr) stanoví faktor přesnosti 0,05 M sirnatanu (dále jen „Y“)
- 12) Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby sirnatanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745. Tato hodnota je jednotkou škrob–enzymatické aktivity (SEA) a uvádí, kolik mg GE je za optimálních podmínek schopen daný enzym ($m = 0,1\text{g}$) rozštěpit z 1g škrobu za 30 minut.

3.6 CEA

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

1) Do 200ml Erlenových baněk navázat 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 H₂O tak, aby smyla případné zachycené zbytky po stěnách a promísila enzym s CMC

4) Dle charakteristiky enzymu upravit pufrům pH (Sýkora, 1976)

5) temperovat v optimální teplotě dle charakteristiky enzymu po 30 minut

6) Přidat 15ml destilované H₂O a 10ml měďnatého roztoku (na 1000ml měďnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na₂CO₃ ve 350ml destilované H₂O + 50g C₆H₈O₇ ve 100ml destilované H₂O + 25g krystalického CuSO₄. Destilovanou H₂O 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 H₂O doplnit do 200ml) destilovanou H₂O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H₂SO₄ (na 1000 ml 25% H₂SO₄: 250 ml 96% H₂SO₄ + 750ml destilované H₂O). Při použití bezvodého Na₂CO₃ v měďnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H₂SO₄)

9) K titracím připravit zásobu 0,05 M Na₂S₂O₃ · 5 H₂O (dále jen sirnatan), (na 2000ml sirnatanu: 25 g Na₂S₂O₃ · 5 H₂O + 2000ml destilované H₂O).

10) titrem „X“ (kde $X \geq 0,02g \leq 0,03g$) KIO₃ + 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 H₂O), 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.

3.7 Obsah GE

Metoda je založena na principu, kdy redukující látky za varu v alkalickém prostředí redukuje měďnatou sůl na Cu_2O . Nezareagovaný přebytek Cu-soli se stanoví jodometricky ($2\text{Cu}_2^{2+} + 4\text{J}^- \rightarrow 2\text{CuJ} + \text{J}_2$). Uvolněný jód se titruje siriťanem $\text{J}_2 + 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} \rightarrow 2\text{J}^- + \text{S}_4\text{O}_6^{2-}$.

- 1) Do 200ml Erlenových baněk navážit po 1g hydrolyzátu
- 2) Vstříknout 24g destilované H_2O a 10ml měďnatého roztoku (na 1000ml měďnatého roztoku: 388g krystalického = 143 g bezvodého Na_2CO_3 ve 350ml destilované H_2O + 50g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ve 100ml destilované H_2O + 25g krystalického CuSO_4 . Destilovanou H_2O doplnit do 1000ml a vyčkat na rozpuštění (za studena 24h)).
- 3) 10minut varu, následně rychlé ochlazení.
- 4) 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_2O doplnit do 200ml) destilovanou H_2O doplnit do 200ml) a 5ml 25% H_2SO_4 (na 1000 ml 25% H_2SO_4 : 250 ml 96% H_2SO_4 + 750ml destilované H_2O). Při použití bezvodého Na_2CO_3 v měďnatém roztoku stačí přidat jen 2,5 ml 25% H_2SO_4).
- 5) K titracím připravit zásobu 0,05 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (dále jen siriťan), (na 2000ml siriťanu: 25 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 2000ml destilované H_2O).
- 6) titrem „X“ (kde $X \geq 0,02\text{g} \leq 0,03\text{g}$) 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_2O), se na titrátoru (pro DL 50 metodou J-titr) stanoví koeficient přesnosti 0,05 M siriťanu (dále jen „Y“).
- 7) Rozdíl mezi průměrnou hodnotou spotřeby siriťanu a slepým vzorkem se násobí koeficientem „Y“ a konstantou 1,745, čímž získáme mgGE / g sušiny materiálu.

3.8 Objem 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 opatrně neutralizovat roztokem 0,1M NaOH na fenolftalein do slabě růžova.
- 6) Destilovat do 200, či 250ml odměrky daný objem (t.j. zhruba 190 či 240ml).
- 7) Vytemperovat na 20°C a doplnit destilovanou vodou po značku.
- 8) Alkoholometrem zjistit obsah alkoholu. Za výsledek se bere ta varianta, jejíž ředění je optimální, t.j. výtěžek alkoholu je po přepočtu největší.

3.9 Filtrační koeficient

- 1) Na dno uzavřené dělicí nálevky je vpravena výstelka z amfibolitových vláken.
- 2) Dělicí nálevka je do výše 5 cm zaplněna roztokem (10% sušiny) zkoumaného materiálu, který byl předem rozmixován na prach.
- 3) Do rysky ve výši 10 cm je dělicí nálevka doplněna vodou.
- 4) Po otevření kohoutu nálevky je měřena doba do vykapání 50ml a zároveň doplňována voda po rysku.
- 5) Filtrační koeficient (dále jen K_f) = $50/(S*t)$, kde S = povrch dna dělicí nálevky (cm^2), t = čas (s).

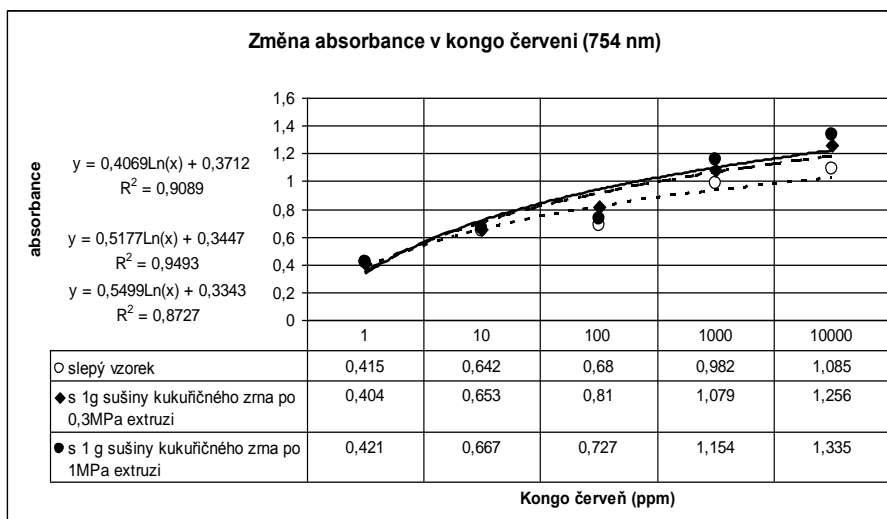
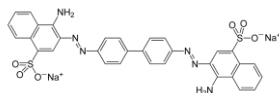
3.10 Adsorbance

- 1) Připraví se roztoky barviva o zvolených koncentracích (10 000, 1 000, 100, 10 a 1ppm)
- 2) K 250ml roztoku se naváží po 1g semletého a prosetého (oko síta 0,5mm) vzorku (sušený při 105°C).
- 3) 30 minut intenzivního třepání (300/minutu).
- 4) Vlnová délka spektrofotometru se nastaví na lokální maximum absorbance pro dané barvivo a poměřuje se absorbance filtrátu a slepého vzorku.

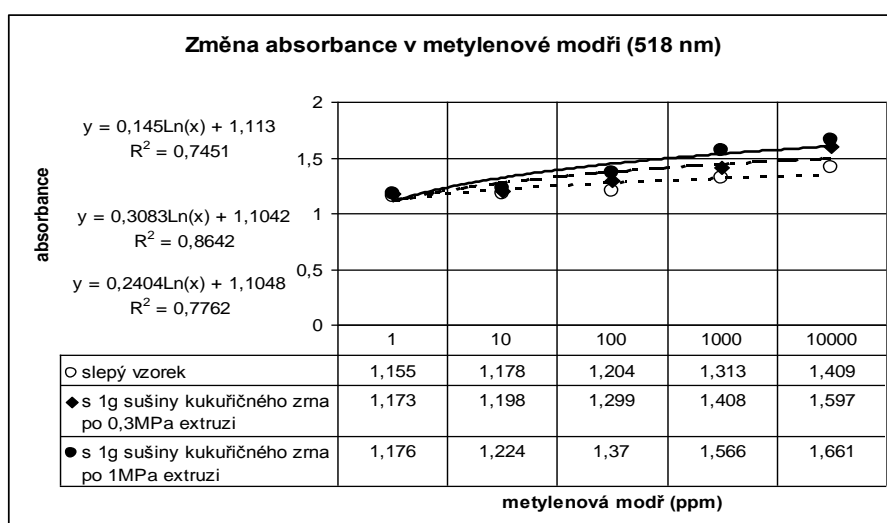
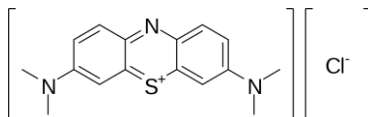
4. Výsledky

4.1 Absorbance škrobnaté fytomasy

Graf 1: Absorbance v kongočerveni ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$), (6 opakování)

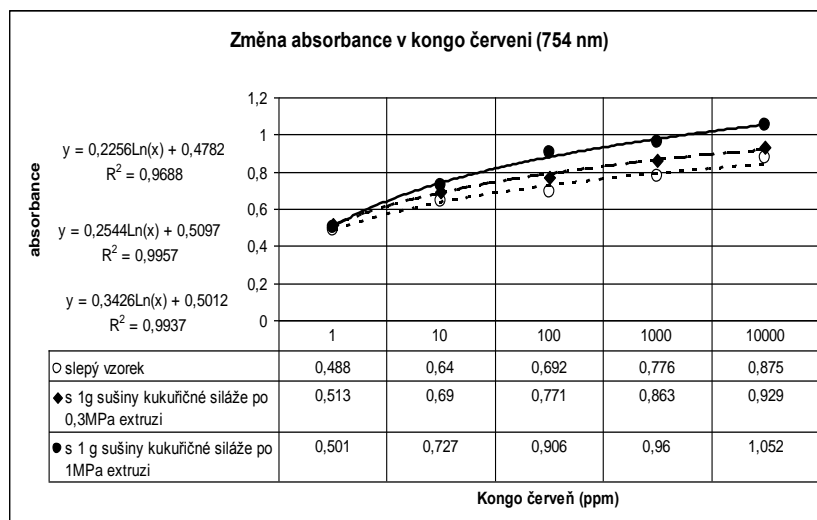
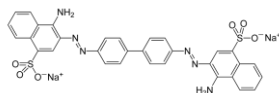


Graf 2: Absorbance v metylenové modři, ($C_{16}H_{18}N_3SCl$), (6 opakování)

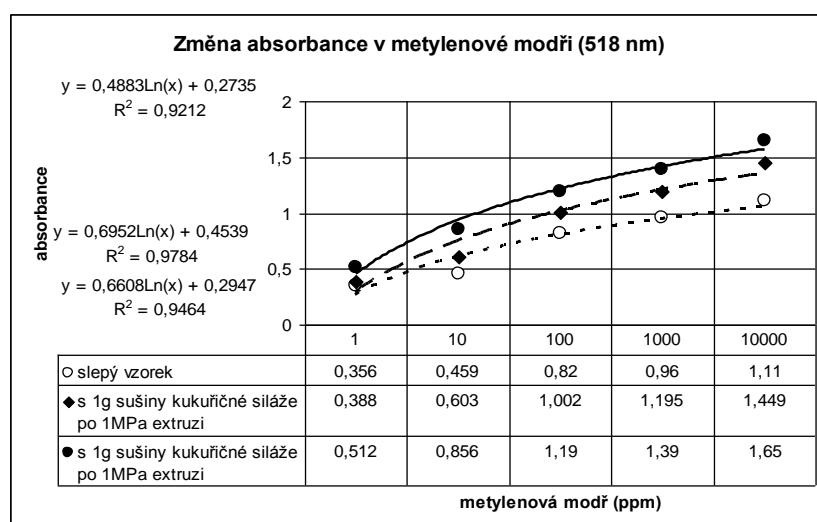
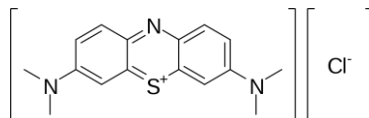


4.2 Absorbance celulóзовé fytomasy

Graf 3: Absorbance v kongočerveni ($C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$), (6 opakování)

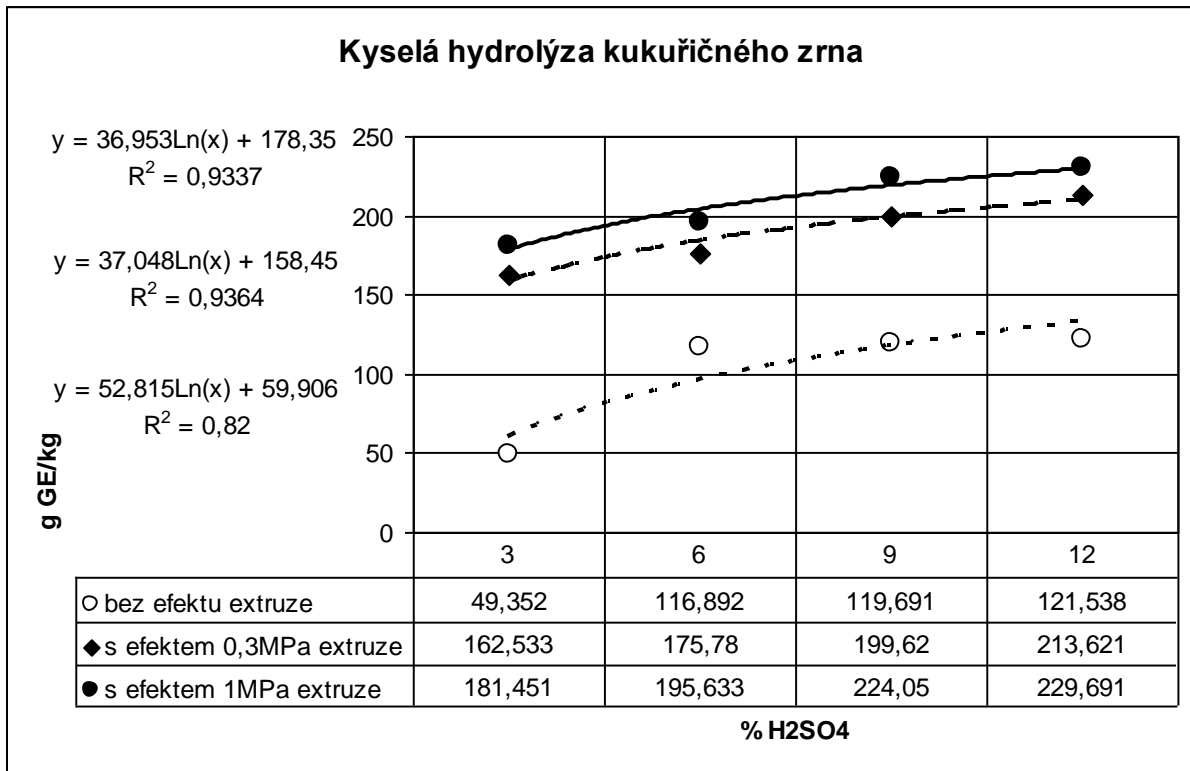


Graf 4: Absorbance v metylenové modři, ($C_{16}H_{18}N_3SCl$), (6 opakování)

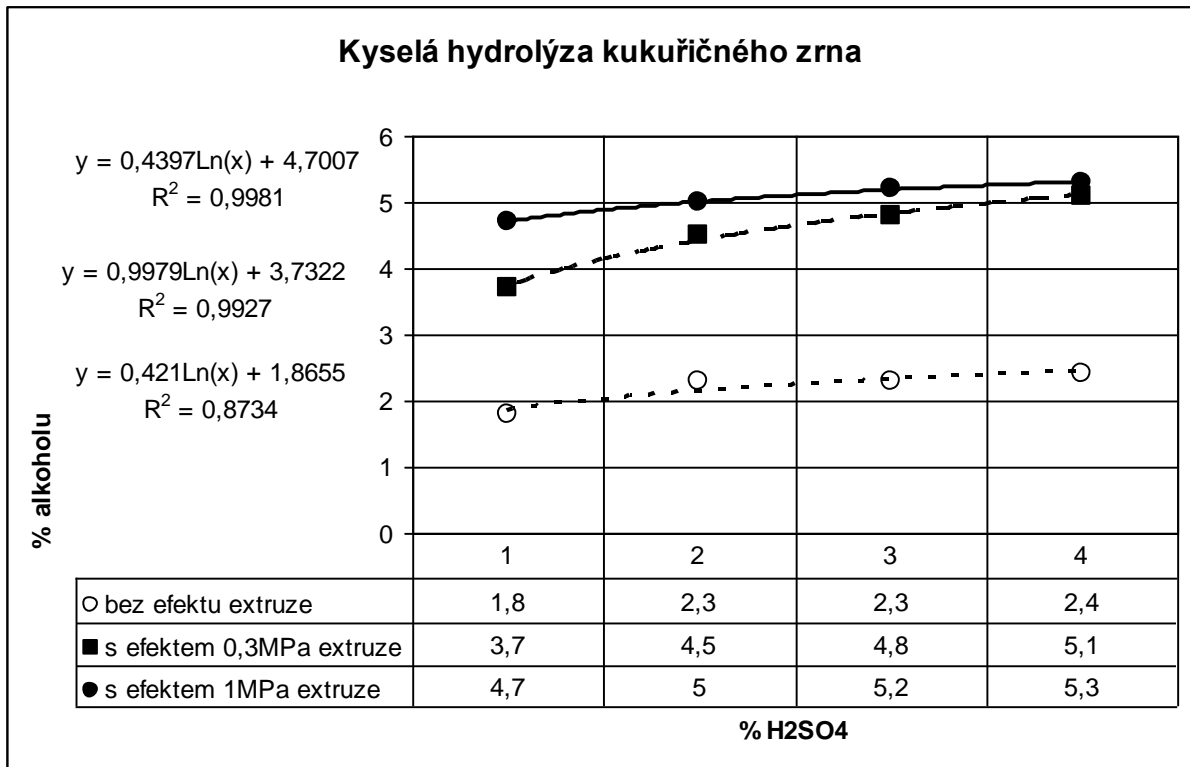


4.3 Kyselá hydrolyza škrobnaté fytomasy

Graf 5: Výtěžnost GE při kyselé hydrolyze kukuřičného zrna (3 opakování)

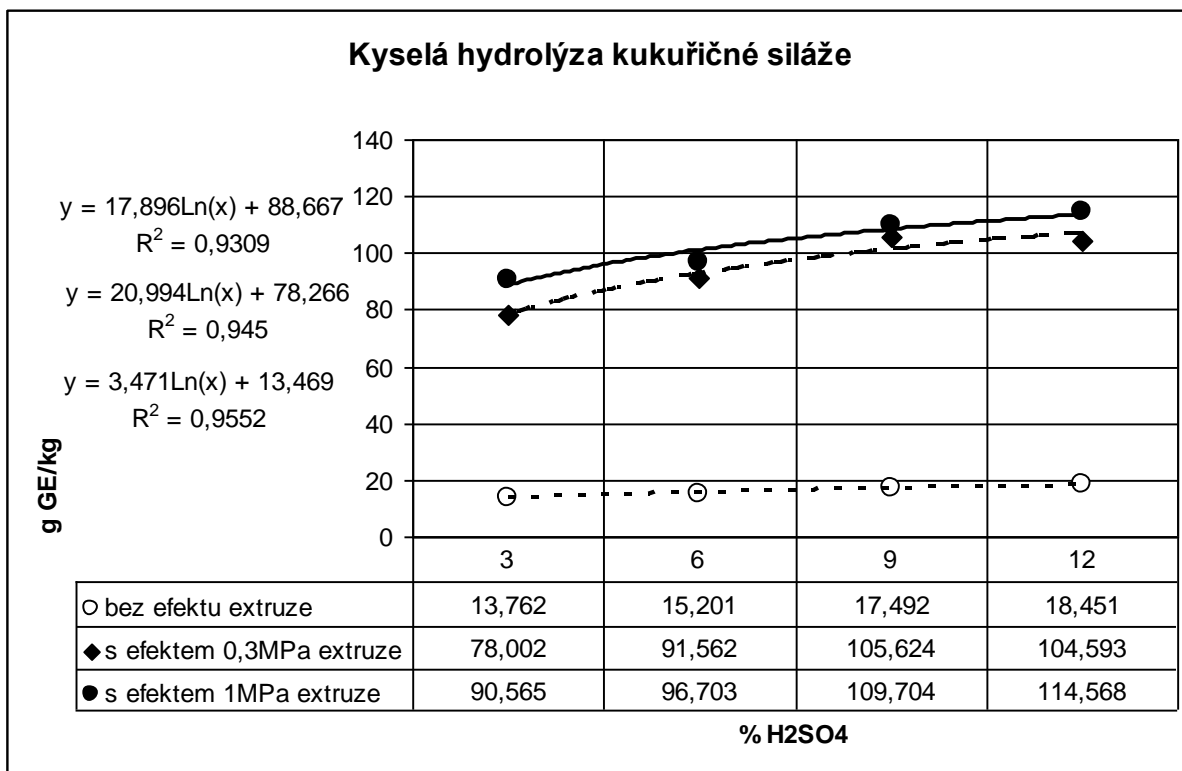


Graf 6: Výtěžnost alkoholu při kyselé hydrolyze kukuřičného zrna (3 opakování)

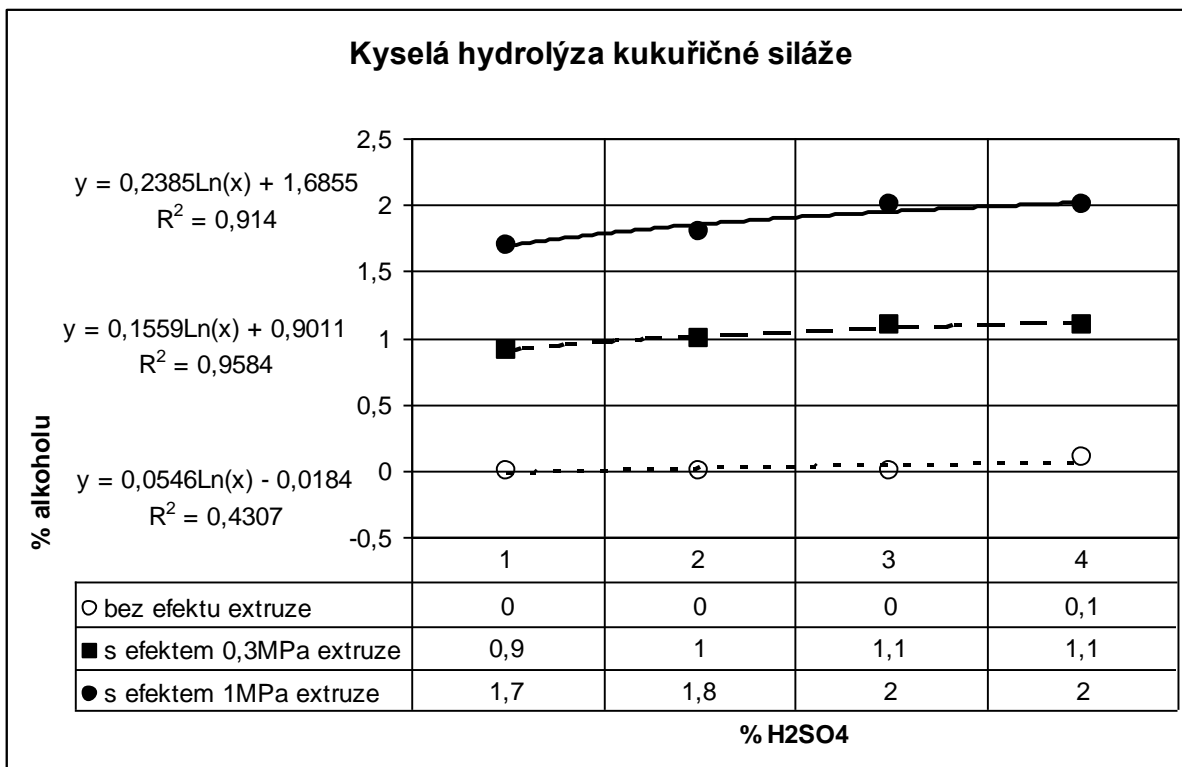


4.4 Kyselá hydrolýza celulóзовé fytomasy

Graf 7: Výtěžnost GE při kyselé hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování)

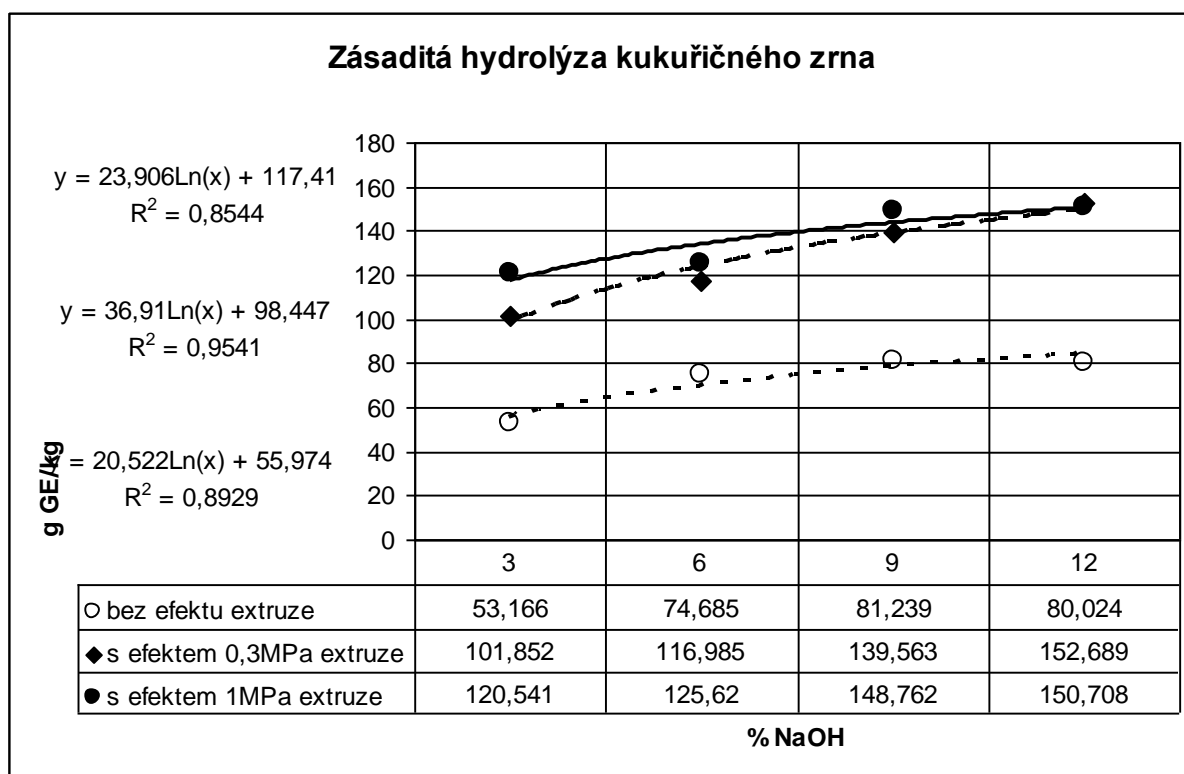


Graf 8: Výtěžnost alkoholu při kyselé hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování)

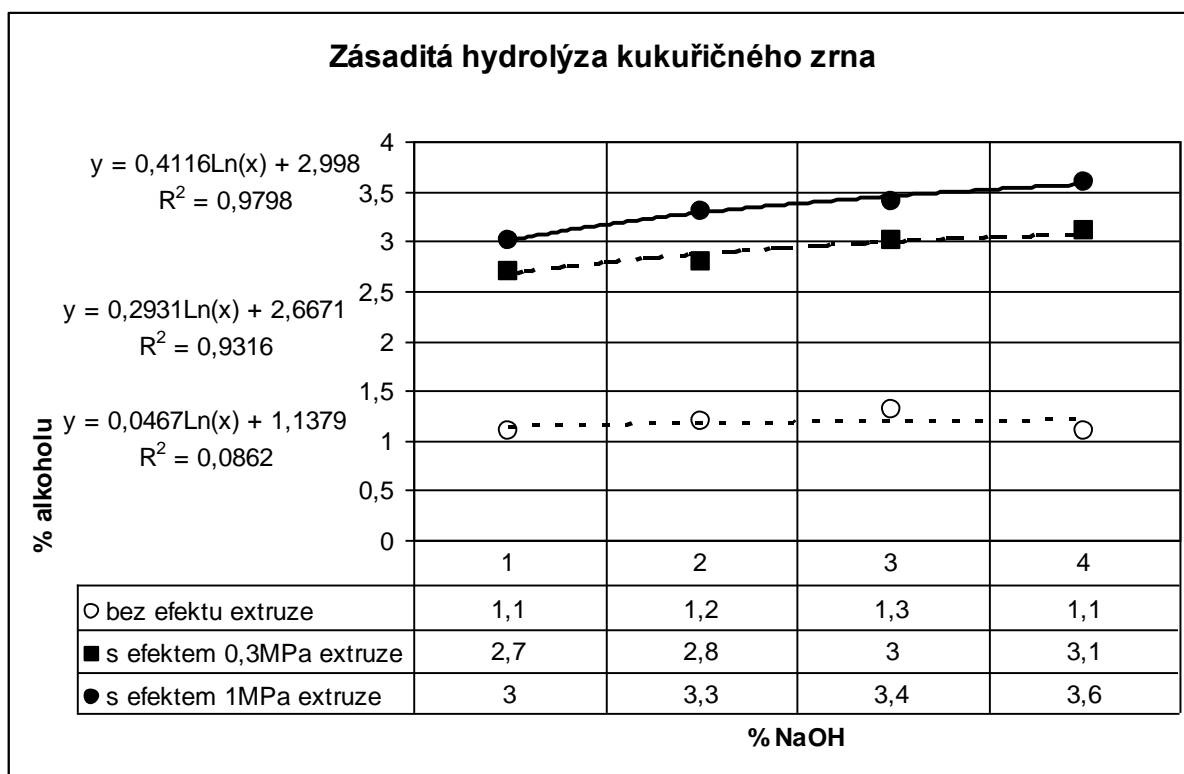


4.5 Zásaditá hydrolýza škrobnaté fytomasy

Graf 9: Výtěžnost GE při zásadité hydrolýze kukuřičného zrna (3 opakování)

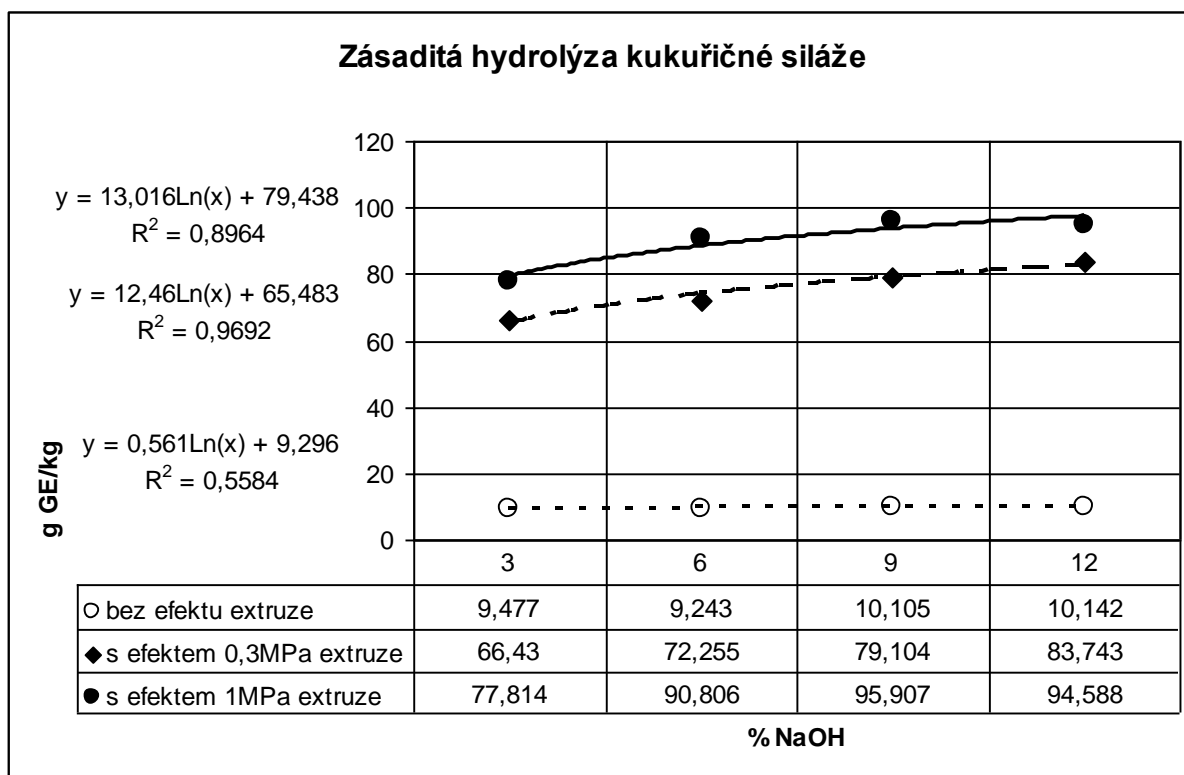


Graf 10: Výtěžnost alkoholu při zásadité hydrolýze kukuřičného zrna (3 opakování)

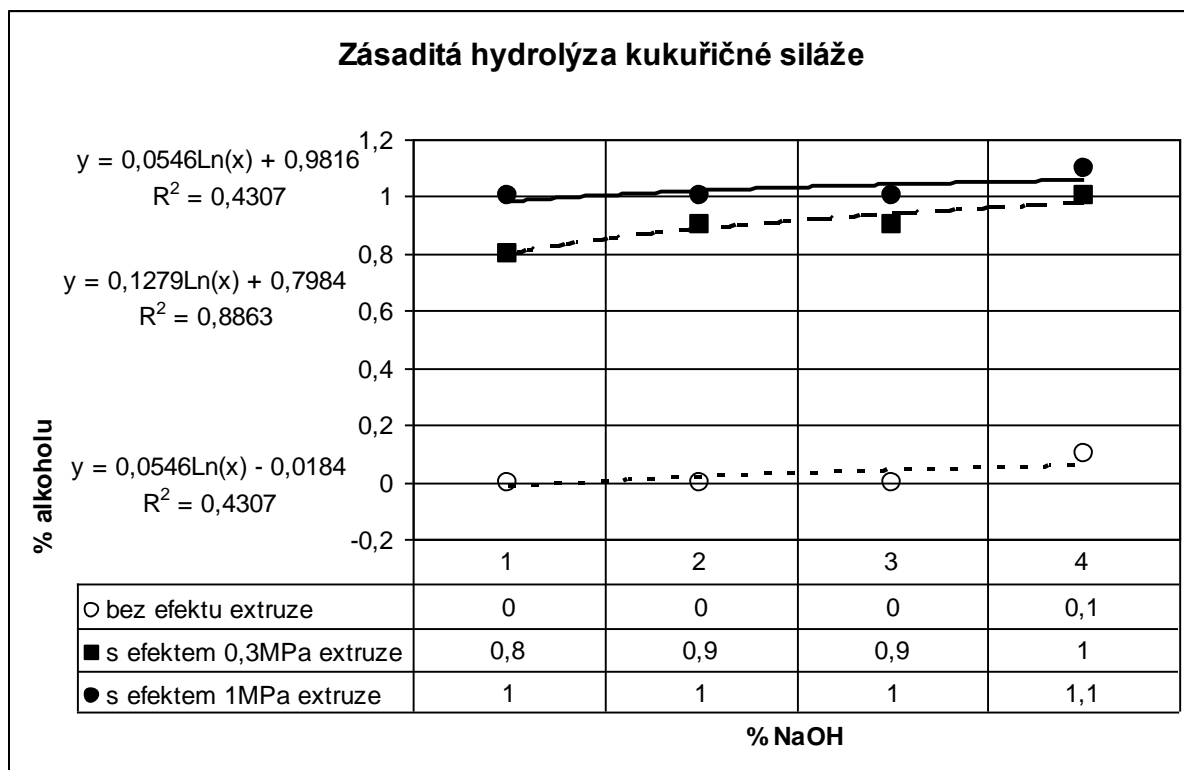


4.6 Zásaditá hydrolýza celulóзовé fytomasy

Graf 11: Výtěžnost GE při zásadité hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování)

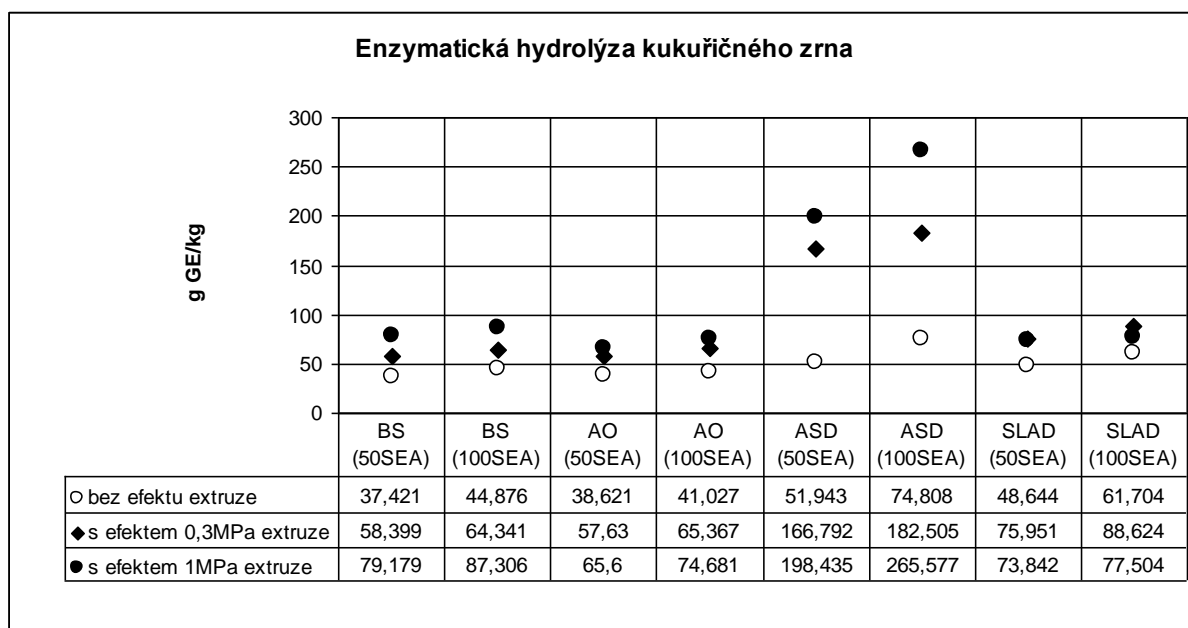


Graf 12: Výtěžnost alkoholu při zásadité hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování)

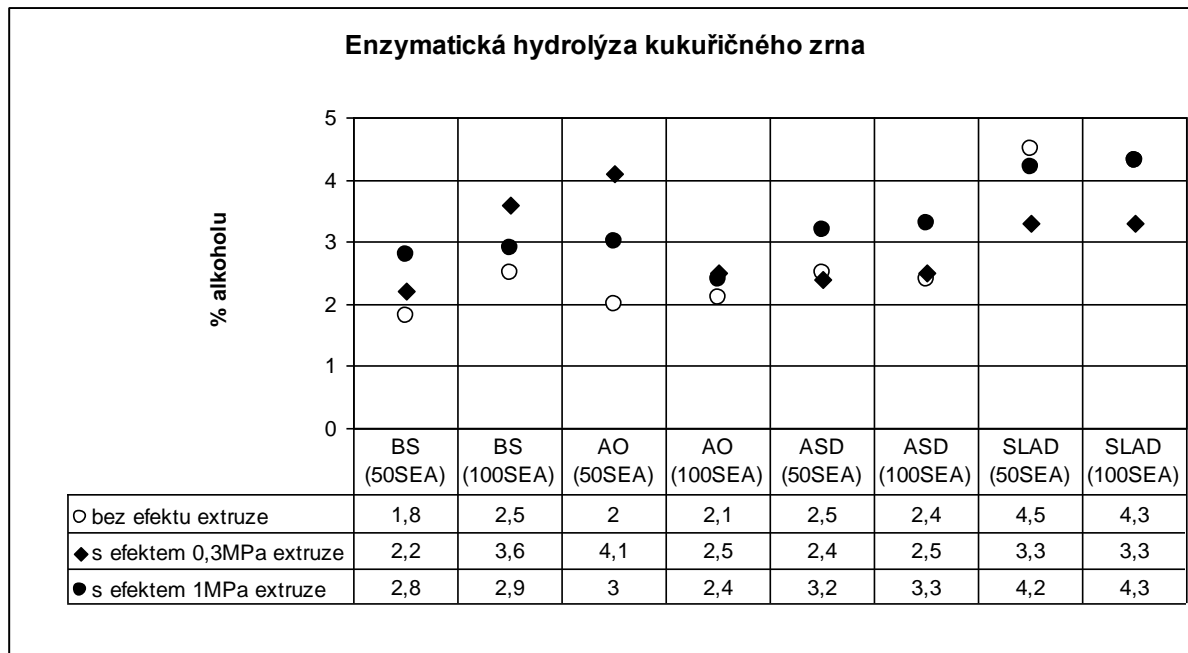


4.7 Enzymatická hydrolýza škrobnaté fytomasy

Graf 13: Výťažnost GE při enzymatické hydrolýze kukuřičného zrna (3 opakování)*



Graf 14: Výťažnost alkoholu při enzymatické hydrolýze kukuřičného zrna (3 opakování)*



* kde:

BS = α -amyláza z *Bacillus subtilis*

AO = α -amyláza z *Aspergillus Oryzae*

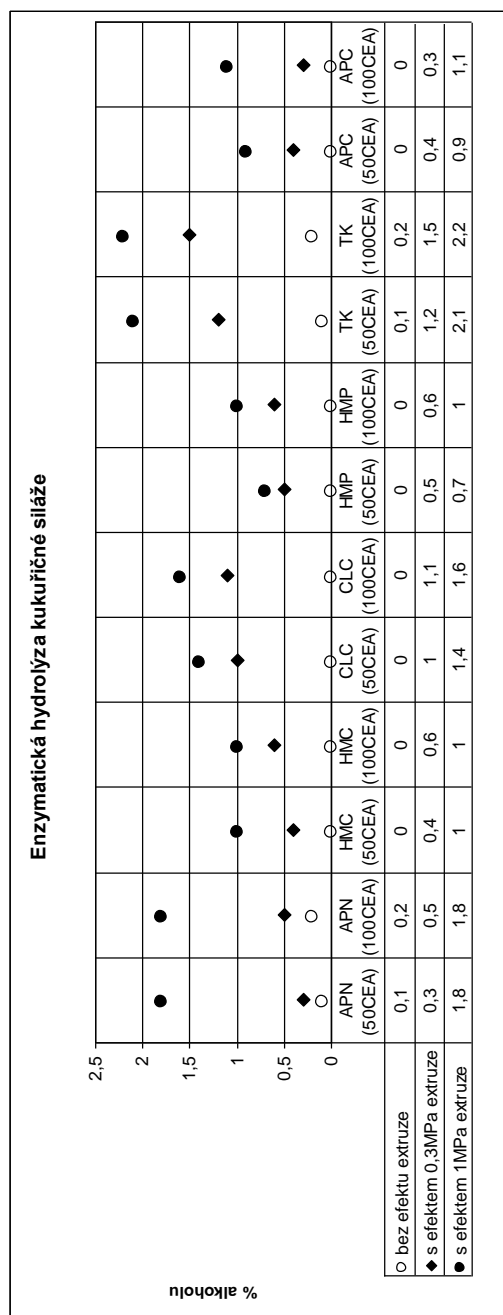
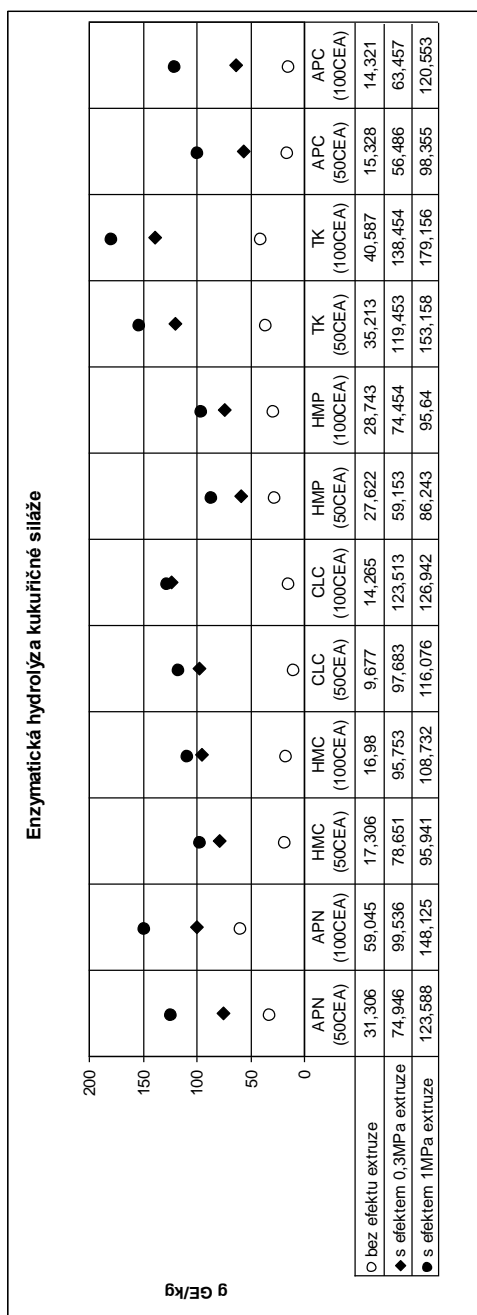
ASD = α -amyláza z *Bacillus licheniformis*

SLAD = sladové mléko

4.8 Enzymatická hydrolýza celulóznové fytomasy

Graf 15: Výťažnosť GE při enzymatické hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování) ‡

Graf 16: Výťažnosť alkoholu při enzymatické hydrolýze kukuřičné siláže (3 opakování) ‡



‡ kde:

APN = celulóza z *Aspergillus oryzae*

HMC = hemicelulóza z *Humicola insolens*

CLC = celulóza z *Trichoderma reesei*

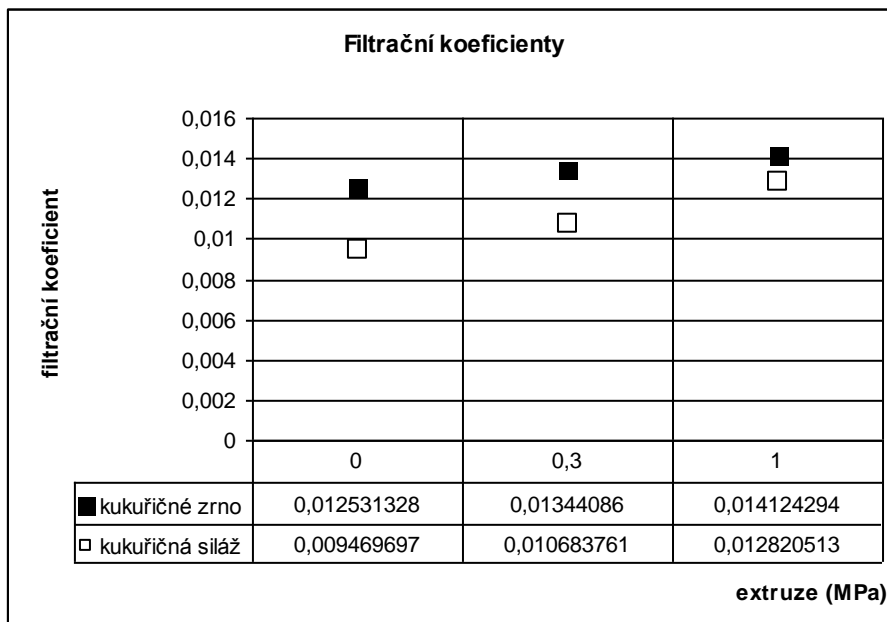
HMP = hemicelulóza z *Trichoderma reesei*

TK = průmyslový mix celuláz a hemiceluláz z více zdrojů

APC = mix celuláz a hemiceluláz z *Trichoderma reesei*

4.9 Filtrační koeficienty extrudované fytomasy

Graf 17: Filtrační koeficienty škrobnaté a celulóznové fytomasy (6 opakování)



5. Diskuze

Z lokálních autorů se hydrolyze fytohmasy věnuje například Dohányos (2008): „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 hydrolyze makromolekulárních látek“. Rozdílný názor na efekt dezintegrace nemá žádný z citovaných zdrojů. Tato skutečnost je obecně uznávaným faktem po více než století a lze ji odvodit i na základě vedlejších úkonů, které byly v rámci předkládané práce rutinně prováděny. Druhou část výroku lze polemizovat. Jakkoli i provedená měření důležitost předúpravy potvrdila, hydrolyzní efekt nebyl u žádné prováděné předúpravy pozorován. Hydrolyzní efekt, který by neměl původ v hydrolyze, ale jen v samotné předúpravě se nepodařilo dohledat ani po obsáhlé rešerši. Teoretická chemie zná jen hydrolyzu kyselinou, zásadou, či hydrolázou.

Váňa (2006) ve výzkumném záměru MZE 0002700601 uvádí: *Nejvyšší výtěžek zkvasitelných cukrů při hydrolyze pšeničné slámy byl získán při teplotě 198°C, tlaku 1,5 MPa a při expozici 11 minut s nástřikem kyseliny na pH 3,5. Za těchto podmínek bylo získáno z 1 kg pšeničné slámy 0,51 kg hydrolyzních cukrů s převahou glukózy, což umožnilo získat kvasným procesem 0,26 kg bioethanolu, tj. 0,33 l bezvodého alkoholu. Obdobná výtěžnost byla dosažena i u ostatních nedřevních rostlinných odpadů (kukuřičné oklázky, odpad ze zeleně). V nejúspěšnějším experimentu s hydrolyzou extrudovaného odpadu z lesní těžby (smrkové dřevo) při teplotě 200°C a tlaku 1,6 MPa bylo získáno v sušině hydrolyzátu 46,2% sacharidů, kdežto při hydrolyze pšeničné slámy bylo v sušině hydrolyzátu získáno 67,4% cukrů.*

V rámci řešení projektu NAZV QE 1324 dochází Váňa (2002) k závěru: *Na základě provedeného výzkumu na poloprovozním hydrolyzním zařízení MHZ-30/2 byla navržena nová technologie výroby bioethanolu ze slámy obilnin a olejnin. V této technologii je dosahováno 80% výtěžnosti cukrů ze vstupu celulózy a hemicelulózy. Výsledky byly poměřovány stejnou metodou, jako v jeho dalším projektu NAZV QH 81265: „...stanovená výtěžnost byla kontrolována refraktometrickým stanovením v nezávislé laboratoři Mikropur, s.r.o. Hradec Králové...“.*

Domnívám se, že o vypovídající hodnotě dosažených výsledků lze polemizovat ze dvou důvodů. Za prvé nelze v dané věci najít jakýkoli argument pro použití refraktometru. Za druhé lze z výpisu z obchodního rejstříku dohledat, že jedinými jednateli a společníky

nezávislé laboratoře jsou Váňovo kolegové J. Přidal a A. Urban. Obecně lze hledat novinku ve Váňovo dávkování HCl stěží. Tuto technologii již patentoval v Německu Dangelivier roku 1880 (číslo patentu 11 836).

Štěrbá (2008) publikuje: „...*štěpení lignocelulzy probíhá pomoci enzymů. Problém je v tom, že enzymy netolerují kyselé prostředí, vysokou koncentraci etanolu a teplotu, takže proces musí probíhat několika stupňově ve velkých kádích ve velkém zředění.*“ Toto Štěrbovo (2008) tvrzení zasluhuje taktéž uvést na pravou míru. Enzymové inženýrství nabízí stále tolerantnější enzymatické preparáty. I v relativně malém vzorku testovaných enzymů bylo možno najít preparát hydrolyzující i při pH = 4,5, či preparát s deklarovanou účinností i při 75°C. Ambrožová (2004) dokonce publikuje o enzymech hydrolyzujících v prostředí s pH od 2 do 10. Odčerpávání etanolu z procesu řeší kontinuální systémy na principu SSF, přičemž velké zředění je naprosto standardním zlepšujícím postupem všech technologicky obdobných procesů.

Výsledků dosažených různými modifikacemi hydrolýzy již bylo prezentováno velké množství. Nejčastěji jsou výsledky uváděny v m³ biopaliva/ha, GJ/ha, GJ/t, či výrobní ceně paliva (Hönig, Miler, Hromádko, 2008). Cenové vyjádření je zkreslující nejvíce, protože je determinováno pouze variabilními jevy.

S rizikem mylného výkladu předkládá autor ke své škodě tabulku 2, která je na základě prezentovaných výsledků tvořena s vědomím nedokonalostí použité technologie, zanedbáním ostatních nákladů a dalších faktorů. Přestože je přesnost jednotlivých údajů zcela minimální, lze při argumentaci zatížení zhruba stejnou chybou ze souboru dat vytušit některé trendy lépe, než kdyby byly údaje povýšeny kalkulací ostatních nákladů na reálnější úroveň.

Tabulka 2: *Hrubé materiálové náklady na 1kg GE*

| materiálová cena CZK/kg GE | kyselá hydrolýza | zásaditá hydrolýza | enzymatická hydrolýza |
|---|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| kukuřičné zrn (87,5% sušiny, 5120 CZK/t) | 23,5 | 37 | 22,5 |
| kukuřičná siláž (32% sušiny, 970 CZK/t) | 22 | 27,5 | 15,5 |

zdroj: autor

Při diskuzi nákladů je důležité zmínit práci Chenga a Stompové (2009) kteří nabízejí jako alternativu drobničku, která čištěním odpadních vod vytvoří intenzivní absorpci dostupných živin až 6x více škrobu než kultura pšenice.

Ani přesnější kalkulace vázané na objem získaného biopaliva taktéž nemohou z podstaty věci korelovat s hloubkou hydrolýzy fytohmoty, protože předchozí i následné fáze procesu ovlivňuje mnoho faktorů. Do kvasného procesu se zapojují z hydrolyzátů krom GE i dextriny (Kodiček, 2004), následně jsou přítomny i vyšší alkoholy, glycerín, či spektrum organických kyselin. Určitý podíl biopaliva se odpaří, či oxiduje. Ani všechny zkvasitelné látky nemusí prokvasit a při vyšší koncentraci zkvasitelných látek se zvyšuje množství neprokvašeného cukru. Spektrum chyb tím vyčerpáno není.

Hodnoty GE získané metodikami předkládané práce dosahují v kontextu provedené rešerše zhruba polovičních hodnot (Sassner et al., 2008). Důvodem je předemším to, že autorem prezentovaná měření neprobíhala v kontinuálním procesu, který by umožnil jímání hydrolyzních produktů, ke kterému například Křen (1997) uvádí: „*Hydrolýza celulosy je podpořena kontinuálním odstraňováním glukosy (zkvašováním), která působí inhibičně na celulázu.*“ K výčtu ztrát lze připojit i argument Johnsona a Elandera (2009), že při kyselé hydrolýze vedou intenzivní reakční podmínky k degradaci cukrů v aldehydy, organické kyseliny a další nežádoucí produkty. Katzen a Schell (2008) uvádějí, že se jedná i o HMF, furfural a dehty.

Naopak liché obavy panovaly ohledně nízkého extruzního tlaku (0,3 a 1MPa). K prokazatelnému zvýšení reakční plochy došlo i při 0,3MPa ačkoli McMillan (1994) shrnuje, že běžné tlaky extruze probíhají mezi 0,69 a 4,83MPa a Brownell, Yu a Saddler (2004) uvádějí, že v tlakovém rozpětí 0,34MPa až 3,24MPa nepřinášelo téměř žádný efekt (pracovali ale na fytohmotě dřevnaté povahy). Podkritický AFEX vyžaduje dokonce tlaky mezi 10,34 a 13,79 MPa (McMillan, 1994).

Základní data pro dynamiku produktů hydrolýzy za superkritických podmínek jsou již publikována (Zhao et al., 2009). Při dosahování superkritických reakčních tlaků byla ověřována hodnota 43MPa (Minami et al., 2001), přičemž superkritické vodní podmínky celulózu zcela rozloží (Matsumura et al., 2006), ale návratnost takto intenzivní operace lze zpochybňovat.

6. Závěr

Užitím výše popsaných metod lze při hydrolýze 3% H₂SO₄ užitím 1MPa extruze zvýšit výtěžek GE z kukuřičného zrna o 267,7% (na 181,451g GE/kg). U siláže je možno dosáhnout užitím stejně intenzivní extruze až šestinásobné hodnoty, avšak GE zůstávají oproti kukuřičnému zrně při stejných dávkách H₂SO₄ zhruba na poloviční úrovni. Totéž zjednodušení lze pro kyselou hydrolýzu aplikovat i na 0,3MPa extruzi.

Provádíme-li u kukuřičného zrna hydrolýzu zásaditou, se zvyšující koncentrací NaOH se vytrácí rozdíl, byla-li aplikována 0,3MPa, či 1MPa extruze. Tento trend neplatí, pokud stejnou technologií hydrolyzujeme kukuřičnou siláž.

0,3MPa extruze kukuřičného zrna upozornila na skrytý potenciál α -amyláz z *Bacillus licheniformis*. Hodnota GE, které tyto α -amylázy dosáhly po 1MPa extruzi materiálu (225,577g GE/kg) je ekvivalentní užití 9% H₂SO₄ a naznačuje, že další zvyšování extruzního tlaku je zajímavé doprovázet vyšším dávkováním enzymu. Výkonnost enzymů sladového mléka je uspokojivá, ale jejich koncentrace je v surovině řádově nižší, než je tomu u komerčních přípravků. Provozní nasazení si vyžádá práci s koncentrátem.

Při enzymatické hydrolýze kukuřičné siláže byl dle očekávání nejefektivnější průmyslově využívaný Texazym (mix celuláz a hemiceluláz z různých zdrojů), který při dávce 50CEA zareagoval na 0,3MPa extruzi zvýšením GE o 239%, při dávce 100CEA o 241%. Na intenzivnější extruzi velmi pozitivně reagovaly i *Aspergillus oryzae* (dávka 50CEA byla po 1MPa extruzi dostatečná na mírné překonání efektu 12% H₂SO₄) a *Trichoderma reesei* (dávka 50CEA po 1MPa extruzi těsně překonává efekt 6% H₂SO₄).

Test výtěžnosti alkoholu sice většinou držel u testované fytomasy stejný trend jako obsah GE, ale jeho vypovídací hodnota je velmi malá, stejně jako naměřené hodnoty a přesnost alkoholometru. Aby ho bylo možno k testování hloubky hydrolýzy doporučit, muselo by se jednat minimálně o poloprovozní kontinuální jednotku.

Trendy absorbcí dokazují zvýšení reakčního povrchu. Vůči barvivům nedošlo ke změně náboje, lze tedy vyvodit závěr, že nízkotlaká extruze nemá rozdíl od superkritických podmínek dostatečný potenciál k přímé destrukci krystalu celulózy.

Naměřené hodnoty filtračních koeficientů v návaznosti na výše uvedené, jakož i fotografie z mikroskopu (příloha 1) potvrzují, že a odkrýváním balastních látek (rozvázání hemicelulóz?, narušením kompaktnosti ligninu?) se podařilo zvětšit specifický povrch celulózy a tím zefektivnit její hydrolýzu (v méně krystalických amorfních oblastech?). Tento

efekt se projevil například i při zpřístupnění fytomasy následujícím biochemickým procesům při výrobě organominerálního hnojiva. V případě využívání odpadní fytomasy by zdokonalená modifikace výše studované technologie mohla být využita ke konzervaci energie z tepla určeného k maření.

Docházím k ekonomicky pozoruhodné hypotéze, že existuje schodová oblast extruzního tlaku p_b [Pa], který ve fytomase uvolní balast obklopující celulózní krystaly a uvolní tak jejich povrch hydrolyzním procesům. Zvyšování tlaku k p_b přináší vyšší výtěžky GE, po překonání p_b již nejsou přírůstky GE markantní.

7. Souhrn

Předkládaná práce srovnává efekt mírné extruze na škrobnatou a celulóзовou fyto masu při různých stupních intenzity kyselé (H_2SO_4 , 3, 6, 9 a 12%), zásadité (NaOH, 3, 6, 9 a 12%) a enzymatické (4 enzymatické přípravky k hydrolýze škrobu, 6 preparátů k hydrolýze celulózy a hemicelulózy) hydrolýze. K poměrování hloubky hydrolýzy je využíváno GE a doplnkově alkoholové výtěžnosti. Pozitivní dopad aplikované 0,3MPa a 1MPa extruze je zkoumán hodnotami absorpance a filtračních koeficientů.

8. Abstract

Presented work compares the effect of mild extrusion on starch and cellulose phytomass at different levels of intensity of acid (H_2SO_4 , 3, 6, 9 and 12%), alkaline (NaOH, 3, 6, 9 and 12%) and enzymatic (4 enzyme preparations to hydrolysis of starch, 6 preparations for hydrolysis of cellulose and hemicellulose) hydrolysis. To measure the depth of hydrolysis is used GE and additionally alcohol yield. The positive impact of applied 0.3 MPa and 1MPa extrusion is also investigated by absorbance values and filter coefficients.

9. Použitá literatura

ARROYO, Ethanol Fermentation of Blackstrap Molasses, United States Patent Office, Patent number: 2295150, Filing date: Nov 28, 1941, Issue date: Sep 1942.

ALLEN, D.C., GRETHLEIN, H.E., CONVERSE, A.O. Process design and economic evaluation for the production of glucose from enzymatic hydrolysis of acid pretreated mixed hardwood. *Solar Energy*. 1984, vol. 33, is. 2, s. 175-186.

ALTINTA, S., Mete, et al. Improvement of ethanol production from starch by recombinant yeast through manipulation of environmental factors. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002, no. 31, s. 640-647.

ALZOLA, F., System of Continuous Fermentation, United States Patent Office, Patent number: 2371208, Filing date: Oct 13, 1941, Issue date: Mar 1945.

AMBROŽOVÁ, J. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. [s.l.] : [s.n.], 2004. 244 s. ISBN 80-7080-534-X.

ANNENGREN, G., E., et al., Method for delignification of ligno-cellulose containing fiber material with an alkali-oxygen extraction stage, Patent number: 4451332, Filing date: Jul 29, 1982, Issue date: May 29, 1984.

ANTONI, A., ZVERLOV, V., SCHWARZ, W. Biofuels from microbes . *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 77, no. 1, s. 23-35. ISSN 0175-7598 .

ARIFEEN, N., et al. Development of novel wheat biorefining: Effect of gluten extraction from wheat on bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, vol. 2009, no. 43, s. 113-121.

BADR, H., R., TOLEDO, R., HAMDY, M., K. Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy*. 2001, vol. 20, is. 2, s. 119-132.

BAILEY, Michael, J., BIELY, Peter, POUTANEN, Kaiza. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity . *Journal of Biotechnology*. 1992, vol. 23, no. 3, s. 257-270.

BEG, Qasim Khalil, et al. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp . *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, vol. 27, is. 7, s. 459-466.

BERGEY, David Hendricks, HOLT, John G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. [s.l.] : [s.n.], 1994. 787 s. Lippincott Williams. Dostupný z WWW: <<http://books.google.com/books?id=jtMLzaa5ONcC&printsec=frontcover&hl=cs>>. ISBN 0683006037.

BLASCHEK, Hans, P.. Prospects for the New Bioeconomy [online]. University of Illinois College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, [2000] [cit. 2009-11-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.ncfap.org/documents/BEADII/UofIllinois%20Grand%20Challenge%20submission.pdf>>.

BOYLE, M, BARRON, N, MCHAYLE, A., P. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* imb3 . *Biotechnology Letters*. 2004, vol. 19, no. 1, s. 49-51.

BRINK, David, L., Method of treating biomass material, Patent number: 5221357, Filing date: Mar 28, 1991, Issue date: Jun 22, 1993.

BROWNELL, H., H., YU, E., K., C., SADDLER, J., N. Steam-explosion pretreatment of wood: Effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, vol. 28, is. 6, s. 792-801.

BUCHNER, Eduard, BUCHNER, Hans, HAHN, Martin. *Die Zymasegärung*. [s.l.] : Vdm Verlag Dr. Müller, 2007. 428 s. ISBN 10: 3-8364-1854-1.

CARDONA, C., A., SÁNCHEZ, Ó., J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007, no. 98, s. 2415-2457.

CLASSEN, A., Process for Obtaining Sugars from Substances Containing Cellulose, Patent number: 1428217, Filing date: Jun 21, 1919, Issue date: Sep 1922

CONVERSE, Alvin, GRETHLEIN, Hans. On the use of an adsorption model to represent the effect of steam explosion pretreatment on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substances. *Enzyme and Microbial Technology*. 1989, vol. 9, is. 2, s. 79-82.

DALE, Bruce E., BALAN, Vankatesh. Process for producing sugars from cellulosic biomass : Patent application title [online]. [2008] [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW: <<http://www.faqs.org/patents/app/20090011474>>.

DAVIS, Linda, et al. Evaluation of Zymomonas-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. *Biomass and Bioenergy*. 2006, no. 30, s. 809-814.

DE VRIJE, Truus, et al. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, vol. 2, no. 12, s. 1. Dostupný z WWW: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/2/1/12>>.

DECKER, Stephen, R., et al. Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology : Biotechnology for Fuels and Chemicals The Twenty-Fourth Symposium*. 2003, vol. 107, no. 1-3, s. 689-703. Dostupný z WWW: <<http://www.nrel.gov/docs/gen/fy03/34418.pdf>>.

DOHÁNYOS, Michal. Jak zvýšit efektivnost bioplynové stanice?. *Alternativní energie* [online]. 2008, roč. 6 [cit. 2009-12-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.tzb-info.cz/t.py?i=5550&t=2>>.

DREYFUS, Henry, Hydrolysis of cellulose, United States Patent Office, Patent number: 2086701, Filing date: Aug 16, 1934, Issue date: Jul 1937.

DUNNING, J., LATHROP, C., Process for Sacharifying Plant Materials, Patent number: 2450586, Filing date: Oct 31, 1944, Issue date: Apr.30, 1928.

DÜRRE, Peter. Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnology Journal*. 2007, no. 2, s. 1525-1534.

DÜRRE, Peter. Fermentative Butanol Production. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, is. 1125, s. 353-362. Dostupný z WWW: <<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?vid=1&hid=5&sid=cd159e17-2c59-48db-910c-4c68ac62138d%40sessionmgr2>>.

DURYEA, Chester, Process of producing maltose, United States Patent Office, Patent number: 746933, Filing date: Oct 2, 1902, Issue date: Dec 15, 1903.

EKSTRÖM, G., Proces for Making Grape-sugar, Patent number: 970029, Filing date: Aug 22, 1907, Issue date: Sep 1910.

EZEJI, T., C., QUERESHI, N., BLASCHEK, H., P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, vol. 18, no. 3, s. 220-227.

FAN, L., T., LEE, Y., BEARDMORE, D., H., Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 1980;22:177-199.

FORBATH, T., P., Flexible processing keys enzymes' future. *Chem. Eng.*, 64, 226-229, 1957.

GANZ, G., Způsob zpracování látek, obsahujících celulósu, za účelem získávání cukru a furfurolu, Patent number: 40731, Filing date: 29. 12. 1929, Issue date: 4.10.1930.

GARCÍA-CUBERO, Teresa, et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*. 2009, vol. 100, is. 4, s. 1608-1613.

GHOSE, T., K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.* 1987, vol. 59, no. 2, s. 257-268. Dostupný z WWW: <<http://media.iupac.org/publications/pac/1987/pdf/5902x0257.pdf>>.

GOVINDASWAMY, Shekar, VANE, Leland. Multi-stage continuous culture fermentation of glucose-xylose mixtures to fuel ethanol using genetically engineered *Saccharomyces cerevisiae* 424A. *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101, is. 4, s. 1277-1284.

GRESSEL, Jonathan. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*. 2007, vol. 174, is. 3, s. 246-263.

GRETHLEIN, Hans, CONVERSE, Alvin. Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Bioresource Technology*. 1991, vol. 36, is. 1, s. 77-82.

GRETHLEIN, Hans. Pretreatment for enhanced hydrolysis of cellulosic biomass . *Biotechnology Advances*. 1984, vol. 2, is. 1, s. 43-62.

GROUS, William, CONVERSE, Alvin, GRETHLEIN, Hans. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar . *Enzyme and Microbial Technology*. 1986, vol. 8, is. 5, s. 274-280.

GRUDININ, Vladimir, P., et al., Method for recovery of wastewater residues, Patent number: 4481072, Filing date: Aug 20, 1982, Issue date: Nov 6, 1984.

GUPTA, Rajesh, KIM, Hyun, LEE, Yoon. Substrate Dependency and Effect of Xylanase Supplementation on Enzymatic Hydrolysis of Ammonia-Treated Biomass . *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, vol. 148, no. 1-3, s. 59-70.

HAYES, Daniel. J., et al. *Biorefineries - Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. Birgit Kamm, Patrick R. Gruber, Michael Kamm. [s.l.] : [s.n.], 2008. ISBN 978-3-527-31027-2. The Biofine Process - Production of Levulinic Acid, Furfural, and Formic Acid from Lignocellulosic Feedstocks, s. 139-164.

HELLE, Steve, S., et al. Xylose fermentation by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in spent sulfite liquor. *Bioresource Technology*. 2004, no. 92, s. 163-171.

HIMMEL, M., et al. BSCL Use Plan: Solving Biomass Recalcitrance : Technical Report NREL/TP-510-37902. A national laboratory of the U.S. Department of Energy Office of

Energy Efficiency & Renewable Energy. 1st edition. [s.l.] : [s.n.], 2005. 18 s. Dostupný z WWW: <<http://www.nrel.gov/docs/fy05osti/37902.pdf>>.

HIMMEL, Michael, E. et al. Biomass Recalcitrance. [s.l.] : [s.n.], 2008. 528 s. ISBN 978-1-4051-6360-6.

HOLTZAPPLE, Mark T., et al. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX) . Applied Biochemistry and Biotechnology. 1992, vol. 1, is. 34-35, s. 5-21.

HOLTZAPPLE, Mark, T., et al., Calcium hydroxide pretreatment of biomass, Patent number: 5693296, Filingdate: Sep 6, 1994, Issue date: Dec 2, 1997.

HOOGERHEIDE., J., C., Microbial enzymes other than fungal amylases in industrial fermentations, 1957, Appl Microbiol., Vol. II, pp. 122-154. Edited by L. A. Underkofler and R. J. Hickey.

HÖNIG, Vladimír, MILER, Petr, HROMÁDKO, Jan. Bioetanol jako inspirace do budoucna. *Listy cukrovarnické a řepařské*. 2008, č. 7-8, s. 203-206. Dostupný z WWW: <http://www.cukr-listy.cz/on_line/2008/pdf/203-206.PDF>.

HUANG, Andrew A. Enzymatic hydrolysis of Cellulose to Sugar. *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*. 1975, no. 5, s. 245-252.

HUBER, George W., DALE, Bruce E. Grassoline at the Pump. Scientific American. 2009, vol. 16, is. 6, s. 52-59. Dostupný z WWW: <<http://www.chems.msu.edu/system/files/content/Grassoline-at-the-Pump.pdf>>.

CHENG, Jay, STOMP, Anne. Growing Duckweed to Recover Nutrients from Wastewaters and for Production of Fuel Ethanol and Animal Feed. Clean. 2009, vol. 37, no. 1, s. 17-26. Dostupný z WWW: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/121645918/PDFSTART>>.

CHUNDAWAT, Shishir, VENKATESH, Balan, DALE, Bruce. Enzyme Synergies in the Hydrolysis of AFEX Pretreated Biomass. Biomass Conversion Research Labs (BCRL) Dept. of Chemical Engineering & Materials Science Michigan State University [online]. 2005 [cit. 2009-10-18], s. 1-26. Dostupný z WWW: <<http://www.google.cz/url?sa=t&source=web&ct=res&cd=1&ved=0CAYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.everythingbiomass.org%2FPortals%2FEB%2FRepository%2FEnzyme%2520Synergies.ca8b2675-bedb-4f23-8e2b-5b6bf23ec88b.pdf&ei=dnPbStO4D5SEmgPJ6ozgDA&usg=AFQjCNHWIDQMNVfvH3ECsSg0-xLe-IQChw&sig2=enAi0OKP7HLv0ER9zdZafw>>.

International Union of Pure and Applied Chemistry. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology* [online]. 2007 [cit. 2009-12-15]. Dostupný z WWW: <<http://old.iupac.org/publications/compendium/>>.

JOHNSON, David, K., ELANDER, Richard, T. *Biomass Recalcitrance*. 2nd edition. Michael E. Himmel. [s.l.] : [s.n.], 2009. ISBN 978-1-4051-63. Chapter 14: Pretreatments for Enhanced Digestibility of Feedstocks, s. 436-453.

KADLEC, P. a kol. *Technologie potravin II*. 1. vyd. VŠCHT Praha, 2002. 236 s.

KAMM, Brigit, GRUBER, Patrick, KAMM, Michael. *Biorefineries - Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*. [s.l.] : [s.n.], 2006. 964 s. ISBN 978-3-527-31027-2.

KATZEN, Raphel, SCHELL, Daniel. *Biorefineries - Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions : Volume 1*. 3rd edition. Birgit Kamm, Patrick R. Gruber, Michael Kamm. [s.l.] : [s.n.], 2008. ISBN 978-3-527-31027-2. Lignocellulosic Feedstock Biorefinery: History and Pland Development for Biomass Hydrolysis, s. 129-138.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M., T., Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresource Technol.* 2006;97:583-91.

KIM, Tae Hyun, LEE, Yoon Y. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process : Coordinated Development of Leading Biomass Pretreatment Technologies . *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, is. 18, s. 2007-2013.

KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy - výkladový slovník* [online]. 2004 [cit. 2009-12-20]. Dostupný z WWW: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002_v1/hesla/dextriny.html>. ISBN 80-7080-551-X.

KODÍČEK, Milan. enzymy - kinetika. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-10-18]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=enzymy_-_kinetika>.

KODÍČEK, Milan. enzymy allosterické. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-10-18]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=enzymy_allostericke>.

KODÍČEK, Milan. inhibice enzymů substrátem. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-10-18]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-02/ebook.html?p=inhibice_enzymu_substratem>.

KODÍČEK, Milan. rychlost limitní. From *Biochemické pojmy : výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2009-10-18]. Available from www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=rychlost_limitni>.

KOKRHELOVÁ, Květoslava, JIROUT, Tomáš. Enzymatická hydrolýza lignocelulózových plodin a odpadů pro výrobu biopaliv [online]. [2003] [cit. 2009-11-12]. Dostupný z WWW: <http://www.fsid.cvut.cz/cz/u218/stc/Sbornik/S2/Kokrhelova_Kvetoslava_12118.pdf>.

KOSHIJIMA, Tetshuo, WATANABE, Takashi. Association between lignin and carbohydrates in wood and other plant tissues. [s.l.] : [s.n.], 2003. 329 s. Dostupný z WWW: <http://books.google.cz/books?id=hyDrUbKyGFEC&printsec=frontcover&source=gbs_v2_summary_r&cad=0#v=onepage&q=&f=false>. ISBN 354043805X, 97835.

KUBATA, Vojtěch, Pařákové zařízení, zejména pro přípravu zápar, (PV 1825-62), patentový spis 11 3478, 24.3.1962,.

KŘEN, Vladimír. Mikrobiální a enzymové biotransformace [online]. 1997 , 31.3.1997 [cit. 2009-12-13]. Dostupný z WWW: <<http://www.biomed.cas.cz/mbu/biotrans/vyuka>>.

LACKMAN, A., Process of Fermenting Sulfite Liquor, Patent number: 1269287, Filing date: Feb 26, 1912, Issue date: Jun 1918.

LEGG, D., CHRISTENSEN, L., Production of Butylalkohol and Acetone by Fermentation, Patent number: 1913164, Filing date: Jul 18, 1930, Issue date: Jun 6, 1933.

LESHKOV, Yuriy , CHHEDA, Juben, DUMESIC, James. Phase Modifiers Promote Efficient Production of Hydroxymethylfurfural from Fructose. *Science*. 30.6.2006, vol. 312, no. 5782, s. 1933-1937.

LILLIE, S., Aparatus for Converting Starch by a Continuous Operation into Derivatives, Dextrin, Dextrose, Patent number: 1014311, Filing date: May 23, 1910.

LINDE, M., GALBE, M., ZACCHI, G. Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process streams from a dry-mill ethanol plant. *Bioresource Technology*. 2008, no. 99, s. 6505-6511.

LIPOVSKÝ, Jakub, et al. Perspektivy produkce butanolu ze škrobnatých a celulosových materiálů. *Chemické Listy*. 2009, č. 103, s. 479-483. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_06_479-483.pdf>.

LOMBARD, Charles, K., Process for the production of organic products from diverse biomass sources, Patent number: 6409841, Filing date: Nov 2, 2000, Issue date: Jun 25, 2002, Application number: 9/705,424.

MANTANIS, G., I., YOUNG, R., A., ROWELL, R., M. Swelling of compressed cellulose fiber webs in organic liquids. *Cellulose*. 1995, no. 2, s. 1-22. Dostupný z WWW: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1995/manta95a.pdf>>.

MARCHAL, R, REBELLER, M, VANDECASTEELE, J P. Direct bioconversion of alkali-pretreated straw using simultaneous enzymatic hydrolysis and acetone-butanol fermentation. [s.l.] : [s.n.], 1984. 523 s. ISBN 0141-5492.

MARCHAND, C., Process of Treating Liquors from Wood-pulp Sulfite Plants, Patent number: 1253854, Issue date: Jan 1918.

MATSUMURA , Yukihiro, et al. SUPERCRITICAL WATER TREATMENT OF BIOMASS FOR ENERGY AND MATERIAL RECOVERY. *Combustion Science and Technology*. 2006, vol. 178, is. 1-3, s. 509-536.

MCMILLAN, James D. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. Michael E. Himmel, John O. Baker, Ralph P. Overend. [s.l.] : [s.n.], 1994. ISBN 987-0-8412-2. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass, s. 292-324.

MCMILLAN, James D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. American Chemical Society. 1994, no. Chapter 15, s. 292-324. ISSN:0097-6156.

MELZOCH, K, RYCHTERA, M. Tradiční technologie. [s.l.] : [s.n.], [1995]. 44 s. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/tradtech.pdf>>.

MEUNIER-GODDIK, Lisbeth , et al. Physicochemical properties of pretreated poplar feedstocks during simultaneous saccharification and fermentation. Elsevier Science. 1998, no. 13, s. 6.

MINAMI, E., et al. Development of the batch-type and flow-type supercritical fluid biomass conversion systems. *Graduate School of Energy Science : Kyoto University*. 2001, no. 1, s. 2. Dostupný z WWW: <<http://www.brdisolutions.com/pdfs/bcota/abstracts/17/z194.pdf>>.

MOROHOSHI, N., Chemical characterization of wood and its components. In: Hon DNS, Shiraishi N, editors. *Wood and cellulosic chemistry*. Marcel Dekker, Inc; New York, USA: 1991. pp. 331-392.

MOSIER, Nathan, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass . *Bioresource Technology*. 2005, vol. 95, is. 6, s. 673-686.

MOUSDALE, David M. *Biotechnology, Chemistry and Sustainable Development*. [s.l.] : [s.n.], 2008. 409 s. ISBN 978-1-4200-5124-7.

MURNEN, Hannah, et al. Optimization of Ammonia Fiber Expansion (AFEX) Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Miscanthus x giganteus to Fermentable Sugars. *Biotechnology Progress*. 2008, vol. 23, is. 4, s. 846-850.

MUSSATTO, Solange, et al. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, vol. 43, is. 2, s. 124-129.

National Research Council (U.S.). Board on Science and Technology for International Development.; National Research Council (U.S.). Office of International Affairs.; Indonesian National Research Council.. Workshop on biotechnology in agriculture : summary report, Jakarta, Indonesia, March 13-14, 1986 : Report prepared under a contract with the Mission to Indonesia, U.S. Agency for International Development.. [s.l.] : [s.n.], 1986. 112 s.

National Science Foundation. When Plants \"Think\" Alike : Press Release 08-084 [online]. 2009 , Nov 05 [cit. 2009-11-28]. The National Science Foundation, 4201 Wilson Boulevard, Arlington, Virginia 22230, USA. Dostupný z WWW: <http://www.nsf.gov/news/news_images.jsp?cntn_id=111597&org=IOS>.

NAZHAD, M., et al. Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper . *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, vol. 17, is. 1, s. 68-74.

NELSON, D., COX, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. [s.l.] : [s.n.], 2008. 4. ISBN 9781429208925.

NÖLLING, Jörk, et al. Genome Sequence and Comparative Analysis of the Solvent-Producing Bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* : American Society for Microbiology. 2001, vol. 183, no. 16, s. 4823-4838. 0021-9193.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, Units of Enzyme Activity. *European Journal of Biochemistry*. 1979, is. 97, s. 319-320. Dostupný z WWW: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119598327/PDFSTART>>.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Enzyme Nomenclature : Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse [online]. 2009 , Last update 1 November, 2009 [cit. 2009-11-07]. Dostupný z WWW: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>>.

OHARA, H. Biorefinery . Applied Microbiology and Biotechnology. 2003, vol. 62, no. 5, 6, s. 474-477.

OXLEY, H., GROOMBRIDGE, W., CHALLIS, W., Treatment of Cellulosic Materials, Patent number: 1964646, Filing date: Jun 2, 1931, Issue date: Jun 1934.

ÖZTÜRK, Hale Bahar, BECHTOLD, Thomas. SPLITTING TENDENCY OF CELLULOSIC FIBRES. Lenzinger Berichte, 2005, no. 84, s. 123-129.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technol. 2000;74:25-33.

PELIKÁN, Miloš, SÁKOVÁ, Lenka. Jakost a zpracování rostlinných produktů. [s.l.] : [s.n.], 2001. 235 s. ISBN 80-7040-502-3.

RAGAUSKAS, A., J., et al. The path forward for biofuels and biomaterials. Science. 2006, 311, no. 5760, s. 484-489.

RAMOS, Ludmila, et al. Influence of the Supramolecular Structure and Physicochemical Properties of Cellulose on Its Dissolution in a Lithium Chloride/N,N-Dimethylacetamide Solvent System. Biomacromolecules. 2005, vol. 6, no. 5, s. 2638-2647.

RIETTER, F.,: Two Stage Continuous Hydrolysis of Plant Biomass to Sugars, Patent number: 4427453, Filing date: Oct 15, 1981, Issue date: Jan 24, 1984.

RIVERS, Douglas B., EMERT, George H. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw. Biological Wastes. 1988, vol. 26, is. 2, s. 85-95.

ROBESON, J., Process of Treating Waste Sulfite and Compound Obtained, Patent number: 833634, Filing date: Mar 12, 1906, Issue date: Oct 16, 1906.

ROČEK, Zbyněk. Pokryv těla a opěrná soustava. Courses : Morfologie [online]. 1995 [cit. 2009-12-01]. Dostupný z WWW: <<http://rocek.gli.cas.cz/Courses/Microsoft%20Word%20-%20Morfologie4.pdf>>.

RUIZ, Encarnación , et al. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. Enzyme and Microbial Technology. 2008, vol. 42, is. 2, s. 160-166.

SADDLER, Jack, Forest Sciences Centre, The University of British Columbia, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada. <jack.saddler@ubc.ca>, 2008.

SASSNER, Per, et al. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated Salix for the production of bioethanol . Bioresource Technology. 2008, vol. 99, is. 1, s. 137-145.

SHARMA, Sanjeev , KALRA, Krishan, GREWAL, Harmeet. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks . Biomass and Bioenergy. 2002, vol. 23, no. 3, s. 237-243.

SJÖSTRÖM, E., Wood chemistry: fundamentals and applications. Academic Press; San Diego, USA: 1993.

SPX Corporation. Horizontal media mills [online]. 2009 [cit. 2009-11-08]. Dostupný z WWW: <<http://www.premiermill.com/superflx.asp>>.

STONE, J., E., et al. Cellulases and their Applications. Hajny GJ, Reese ET, editors. American Chemical Society; Washington DC, USA: 1969.

STUART, E., Treatment of Fibrous Lignocellulosic Biomass by High Shear Forces in a Turbulent Couette Flow to Make the Biomass More Susceptible to Hydrolysis, Patent number: 5370999, Filing date: Dec 17, 1992, Issue date: Dec 6, 1994.

SUN, Fubao, CHEN, Hongzhang. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment . *Bioresource Technology*. 2008, vol. 99, is. 14, s. 6156-6161.

SUN, Y., CHENG, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technol.* 2002;83:1-11.

ŠÝKORA, Václav. *Chemickoanalytické tabulky*. [s.l.] : [s.n.], 1976. 282 s. ISBN 04-609-76., s. 147.

SZCZODRAK, Janusz, FIEDUREK, Jan. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol . *Biomass and Bioenergy*. 1996, vol. 10, no. 5, 6, s. 367-375.

ŠEBOR, Gustav, POSPÍŠIL, Milan, ŽÁKOVEC, Jan. *Technicko – ekonomická analýza vhodných alternativních paliv v dopravě : 1. část (revidovaná)*. [s.l.] : [s.n.], 2006. 201 s. Dostupný z WWW: <<http://www.kraj-lbc.cz/public/doprava/prezentace07/pdfs/12a.pdf>>.

ŠTĚRBA, Mojmír. Biopaliva druhé generace vyráběná z lignocelulózy. Pro atom web [online]. 2008, č. 2008020601 [cit. 1200-12-13]. Dostupný z WWW: <<http://proatom.luksoft.cz/view.php?cisloclanku=2008020601>>.

TAHERZADEH, M., J., Ethanol from lignocellulose: physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. 1999. Ph.D thesis in Biotechnology, Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology.

TAHERZADEH, Mohammad, KARIMI, Keikhosro . Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int J Mol Sci*. 2008, vol. 9, no. 9, s. 1621-1651. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2635757/>>.

TAKAMINE, J. Process of making diastatic enzyme. U. S. Pat. 525,820 and 525,823, 1894.

TAKAMINE, J., Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry. *Ind. Eng. Chem.*, 6, 824-828, 1914.

TEYMOURI, Farzaneh , et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover . *Bioresource Technology*. 2005, vol. 96, is. 18, s. 2014-2018.

THOMPSON, David, CHEN, Hsin-Chih, GRETHLEIN, Hans. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area . In 4th International Energy Agency Workshop on Biotechnology for the Conversion of Lignocellulosics. Lund, Sweden : [s.n.], 1989. s. 3.

THOMSEN, A., Method of processing Lignified Cellulose, Patent number: 2964449, Filing date: Apr 10, 1959, Issue date: Dec 13, 1960.

TSUCHIYA, H., et al., Fermentation Process, Patent number: 2481263, Filing date: Jan 15, 1948, Issue date: Sep 1949.

TYSON, G., Production of hydrophobic fibers, Patent number: 5705216, Filing date: Aug 11, 1995, Issue date: Jan 6, 1998.

UNDERKOFER, L., A., BARTON, R., R., RENNERT, S., S. Production of Microbial Enzymes and Their Applications. *Microbiological Process Report*. 1957, no. x, s. 1-10. Takamine Laboratory, Division of Miles Laboratories, Inc., Clifton, New Jersey. Dostupný z WWW: <<http://aem.asm.org/cgi/reprint/6/3/212.pdf>>.

VÁŇA, Jaroslav, KRATOCHVÍL, Zdeněk: Vývoj technologie výroby bioetanolu ze slámy v České republice úspěšně ukončen. *Biom.cz* [online]. 2002-08-19 [cit. 2009-12-13]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/vyvoj-technologie-vyroby-bioetanolu-ze-slamy-v-ceske-republice-uspesne-ukonceni>>. ISSN: 1801-2655.

VÁŇA, Jaroslav: Trvale udržitelná výroba bioetanolu. *Biom.cz* [online]. 2006-05-02 [cit. 2009-12-13]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/trvale-udrzitelna-vyroba-bioetanolu>>. ISSN: 1801-2655.

VENKATESH, Balan, et al. Modified AFEX Pretreatment Conditions and enzymatic Hydrolysis for Poplar [online]. Michigan : Department of Chemical Engineering and Material Science , 2006 , 16th November, 2006 [cit. 2009-11-10]. Dostupný z WWW:

<<http://www.everythingbiomass.org/Portals/EB/Repository/Ven-poplar.f7ec57b3-7082-4f2f-ae25-30dd820236d0.ppt>>.

VRIJE, T. de, et al. Pretreatment of Miscanthus for hydrogen production by *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002, vol. 27, no. 11, 12, s. 1381-1390.

WALKER, L.P., WILSON, D.B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview . *Bioresource Technology*. 1991, vol. 36, is. 1, s. 3-14.

WEIL, Joseph, et al. Cellulose pretreatments of lignocellulosic substrates . *Enzyme and Microbial Technology*. 1994, vol. 16, is. 11, s. 1002-1004.

Wikipedia. *Solvolyis* [online]. 2009 [cit. 2009-12-15]. Dostupný z WWW: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Solvolyis>>.

WISEMAN, Alan. *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*. Ellis Horwood. [s.l.] : [s.n.], 1978. 294 s. ISBN 978-0853121404.

YEH, An-I, HUANG, Yi-Ching, CHEN, Shih Hsin. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose . *Carbohydrate Polymers*. 2009, vol. 79, no. 1, s. 192-199.

ZAPPE, Harold, et al. Structure of an Endo-1-1,4-Glucanase Gene from *Clostridium acetobutylicum* P262 Showing Homology with Endoglucanase Genes from *Bacillus* spp.. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* : American Society for Microbiology. 1988, vol. 54, no. 5, s. 1289-1292. University of Cape Town, Rondebosch 7700, South Africa. Dostupný z WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202643/pdf/aem00110-0227.pdf>>.

ZHANG, Percival, Y., H., HIMMEL, Michael, E., MIELENZ, Jonathan, R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006, no. 24, s. 452-481.

ZHANG, Percival, LYNDL, Lee. Determination of the Number-Average Degree of Polymerization of Cellodextrins and Cellulose with Application to Enzymatic Hydrolysis. *Biomacromolecules*. 2005, vol. 6, no. 3, s. 1510-1515.

ZHANG, Percival, Y., H., SCHELL, Daniel, J., MCMILLAN, James, D. Methodological Analysis for Determination of Enzymatic Digestibility of Cellulosic Materials. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, vol. 96, no. 1, s. 188-194.

ZHANG, Wangsun, OKUBAYASHI, Satoko, BECHTOLD, Thomas. Fibrillation Tendency of Cellulosic Fibers. Part 1: Effects of Swelling . *Cellulose*. 2005, vol. 12, no. 3, s. 267-273.

ZHANG, Wangsun, OKUBAYASHI, Satoko, BECHTOLD, Thomas. Fibrillation Tendency of Cellulosic Fibers. Part 2: Effects of Temperature . *Cellulose*. 2005, vol. 12, no. 3, s. 275-279.

ZHANG, Wangsun, OKUBAYASHI, Satoko, BECHTOLD, Thomas. Fibrillation tendency of cellulosic fibers-part 3. Effects of alkali pretreatment of lyocell fiber . *Carbohydrate Polymers*. 2005, vol. 59, is. 2, s. 173-179.

ZHANG, Wangsun, OKUBAYASHI, Satoko, BECHTOLD, Thomas. Fibrillation tendency of cellulosic fibers-part 3. Effects of alkali pretreatment of various cellulosic fibers . *Carbohydrate Polymers*. 2005, vol. 61, is. 4, s. 427-433.

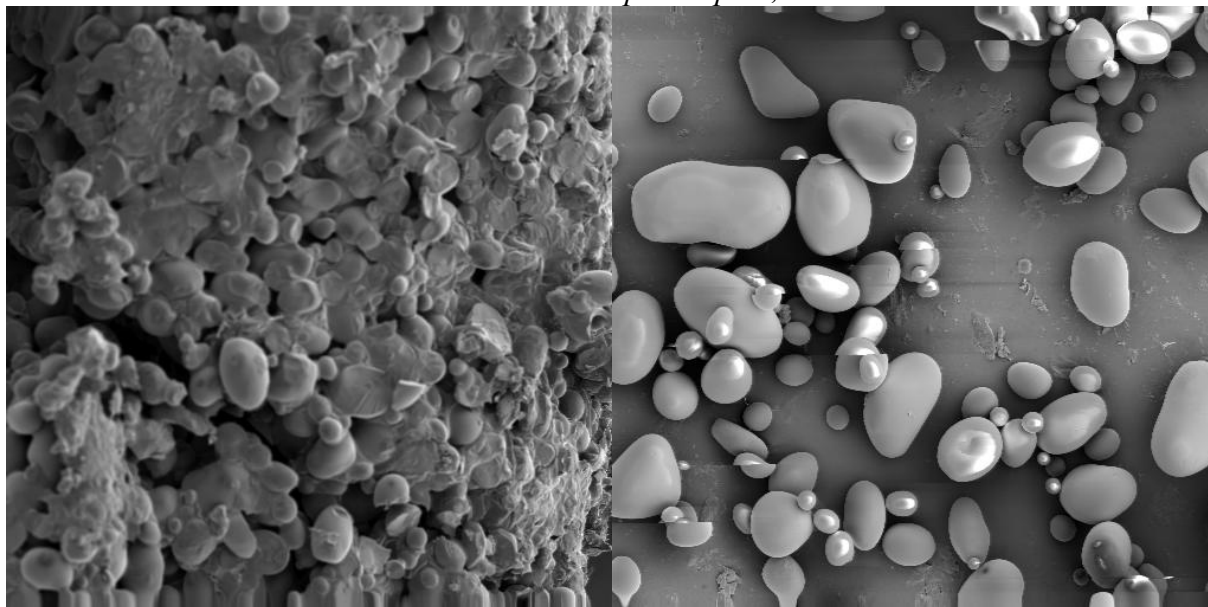
ZHAO, Jing, XIA, Liming. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. *Fuel Processing Technology*. 2009, no. 90, s. 1193-1197.

ZHAO, Yan, et al. Combined Supercritical and Subcritical Process for Cellulose Hydrolysis to Fermentable Hexoses. *Environ. Sci. Technol.*. 2009, vol. 43, no. 5, s. 1565-1570.

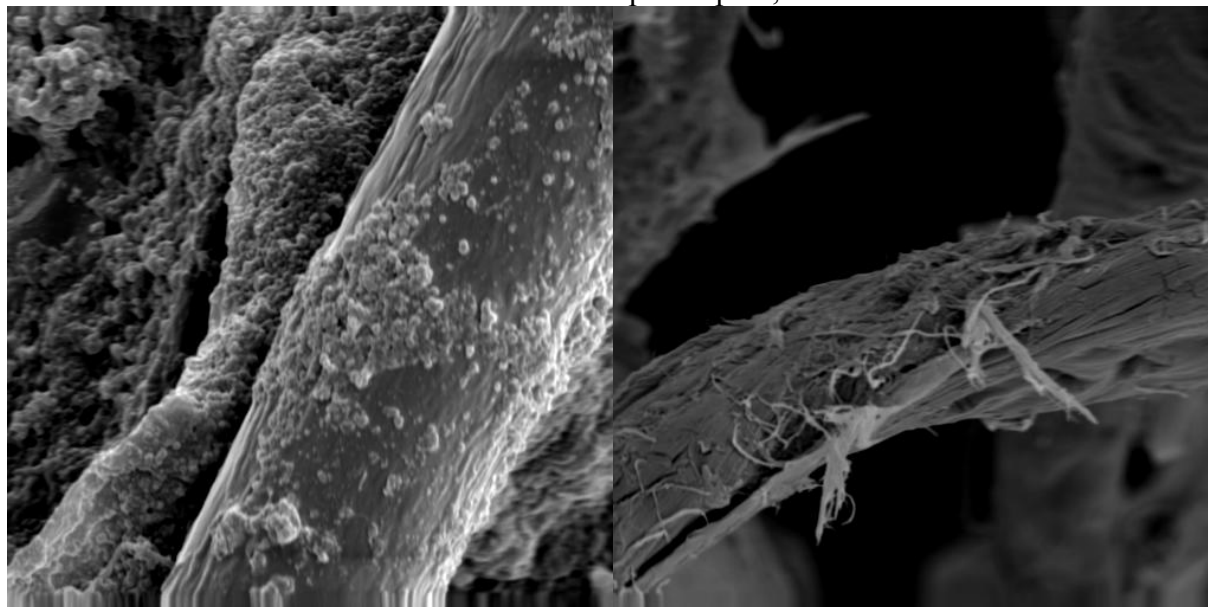
10. Přílohy

Příloha 1:

Scan 1 a 2: *Kukuřičné zrno před a po 0,3MPa extruzi*



Scan 3 a 4: *Kukuřičná siláž před a po 0,3MPa extruzi*



Příloha 2:

Scan 5: Předhydrolyzační úpravy lignocelulózové fyto­masy

Pretreatment processes of lignocellulosic materials

| Pretreatment method | Processes | Studied application | Possible changes in biomass | Notable remarks |
|--|--|---------------------|---|--|
| Physical pretreatments | Milling: - Ball milling - Two-roll milling - Hammer milling - Colloid milling - Vibro energy milling | Ethanol | | |
| | Irradiation: - Gamma-ray irradiation - Electron-beam irradiation - Microwave irradiation | Ethanol and biogas | - Increase in accessible surface area and pore size - Decrease in cellulose crystallinity - Decrease in degrees of polymerization | - Most of the methods are highly energy-demanding - Most of them cannot remove the lignin - It is preferable not to use these methods for industrial applications - No chemicals are generally required for these methods |
| | Others: - Hydrothermal - High pressure steaming - Expansion - Extrusion - Pyrolysis | Ethanol and biogas | | |
| | Explosion: - Steam explosion - Ammonia fiber explosion (AFEX) - CO ₂ explosion - SO ₂ explosion | Ethanol and biogas | | |
| | Alkali: - Sodium hydroxide - Ammonia - Ammonium Sulfite | Ethanol and biogas | | |
| | Acid: - Sulfuric acid - Hydrochloric acid - Phosphoric acid | Ethanol and biogas | - Increase in accessible surface area - Partial or nearly complete delignification | - These methods are among the most effective and include the most promising processes for industrial applications - Usually rapid treatment rate - Typically need harsh conditions - There are chemical requirements |
| Chemical and physicochemical pretreatments | Gas: - Chlorine dioxide - Nitrogen dioxide - Sulfur dioxide | Ethanol and biogas | - Decrease in cellulose crystallinity - Decrease in degrees of polymerization | |
| | Oxidizing agents: - Hydrogen peroxide - Wet oxidation - Ozone | Ethanol and biogas | - Partial or complete hydrolysis of hemicelluloses | |
| | Solvent extraction of lignin: - Butanol-water extraction - Swelling agents | Ethanol | | |
| Biological pretreatments | Fungi and actinomycetes | Ethanol and biogas | - Delignification - Reduction in degree of polymerization of cellulose - Partial hydrolysis of hemicellulose | - Low energy requirement - No chemical requirement - Mild environmental conditions - Very low treatment rate - Did not consider for commercial application |

zdroj: Taherzadeh, Karimi, 2008