

DEGRADAČNÍ PRODUKTY VZNIKAJÍCÍ PŘI FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ PŘEDÚPRAVĚ LIGNOCELULOSOVÉ BIOMASY A JEJICH VLIV NA EFEKTIVITU PROCESU VÝROBY BIOETHANOLU

LEONA PAULOVÁ, JAN KAČABA, PETRA PATÁKOVÁ, MOJMÍR RYCHTERA a KAREL MELZACH

Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
leona.paulova@vscht.cz

Došlo 21.11.11, přijato 5.1.12.

Klíčová slova: bioethanol, lignocelulosa, biomasa, fyzikálně-chemická předúprava, inhibitory, aktivita celulytických enzymů, metabolismus mikroorganismů, detoxikace

Obsah

1. Úvod
2. Složení lignocelulosa
3. Fyzikálně-chemická předúprava lignocelulosa a vznik degradačních produktů s inhibičním účinkem
4. Vliv inhibičních látek na aktivitu celulytických enzymů
5. Vliv inhibičních látek na metabolismus mikrobiálních producentů ethanolu
 - 5.1. Vliv alifatických kyselin
 - 5.2. Vliv derivátů furanu
 - 5.3. Vliv fenolových sloučenin
6. Možnosti omezení inhibičního účinku
 - 6.1. Biologické, chemické a fyzikální metody detoxikace lignocelulosových hydrolyzátů
 - 6.2. Mikrobiální kmeny se zvýšenou odolností k inhibitorům
7. Závěr

1. Úvod

Po zavedení směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2003/20/ES o podpoře využívání biopaliv nebo jiných obnovitelných zdrojů v dopravě došlo v zemích Evropského společenství ke vzrůstu výroby bioethanolu z 528 milionů litrů vyrobených v roce 2004 na 4615 milionů litrů vyprodukovaných v roce 2010, přičemž objem výroby pro rok 2011 předpokládá další zhruba 18% meziroční nárůst^{1,2}. Ačkoli se v současné době veškerý bioethanol v EU vyrábí jako ethanol první generace z cukernatých a škrobnatých plodin, v posledních desetiletích byly finančně podporovány projekty, které se snaží o zavedení technolo-

gie výroby ethanolu druhé generace s využitím surovin obsahujících celulosu. Jde především o bioethanol vyrobený z rychle rostoucích energetických plodin, zemědělských a lesních odpadů nebo komunálních odpadů.

Bohužel, vzhledem ke komplexní struktuře lignocelulosa je příprava fermentačního média ze surovin druhé generace mnohem komplikovanější a energeticky náročnější, což se odráží ve výsledné ceně produktu. Při předúpravách materiálu, které jsou nezbytné, navíc vznikají různé degradační produkty pocházející z hemicelulosa, celulosa a ligninu, které mohou mít inhibiční efekt a snižovat tak konverzi celulosa na zkvasitelné sacharidy i výtěžnost fermentačního procesu.

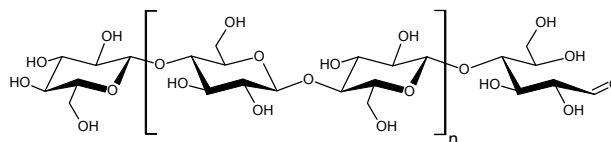
V této práci je porovnán vliv jednotlivých typů inhibičních látek vznikajících při předúpravách lignocelulosa na účinnost konverze celulosa na glukosu pomocí komerčních enzymových preparátů a je diskutován i způsob, jakým tyto látky ovlivňují růst a metabolismus hlavních zástupců mikrobiálních producentů ethanolu. Jelikož přítomnost inhibičních látek významným způsobem ovlivňuje efektivitu fermentace, pro dosažení ekonomicky akceptovatelného procesu je potřeba jejich vliv eliminovat nebo alespoň podstatně snížit. Toho je možno dosáhnout buď detoxikací hydrolyzátů po provedené předúpravě nebo využitím mikrobiálních kmenů, které budou k přítomnosti inhibitorů více odolné.

2. Složení lignocelulosa

Rostlinná biomasa je nejhojněji zastoupený obnovitelný zdroj uhlíku a energie na naší planetě³, její roční přírůstek činí zhruba $1,5 \cdot 10^{11}$ t a její hlavní složky tvoří celulosu, hemicelulosu a lignin⁴. Celulosa je vysokomolekulární polymerní struktura tvořená jednotkami glukosy, které jsou vzájemně spojeny β -1,4-glykosidickou vazbou⁵ (obr. 1).

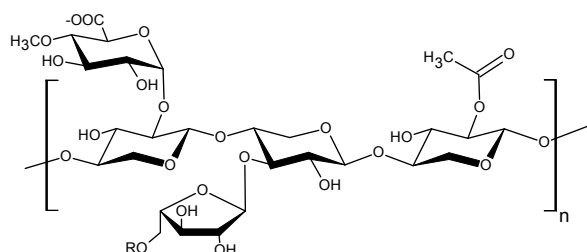
Tyto dlouhé polymerní řetězce obsahující až 10 000 glukosových jednotek jsou navzájem spojeny vodíkovými vazbami a van der Waalovými silami do mikrofibril, v nichž se střídají vysoce uspořádané krystalické struktury a méně organizované amorfní části. Tato kostra je pak prostoupena hemicelulosou, proteiny a pektinovými látkami⁴.

Hemicelulosa je rozvětvený heteropolymer tvořený



Obr. 1. Celulosa

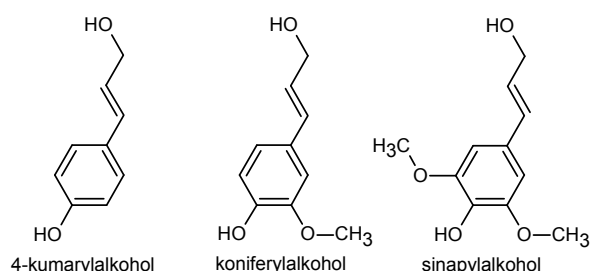
xylosou, arabinosou, galaktosou, glukosou, mannosou a dalšími minoritními složkami jako např. glukuronovou nebo galakturonovou kyselinou⁶ (obr. 2). Na rozdíl od celulosy prakticky neobsahuje krystalické části, a proto se snadněji degraduje.



Obr. 2. Hemicelulosa – xylan

Lignin je pevně svázán s celulosovými a hemicelulosovými vlákny a dodává celé struktuře pevnost a odolnost. Hlavními prekurzory pro syntézu ligninu jsou 4-kumarylalkohol, koniferylalkohol a sinapylalkohol (obr. 3), jejich spojením vzniká komplexní trojrozměrná struktura, která je hlavní překážkou chemické i biologické degradace lignocelulosoové biomasy⁷. Lignin jako jediná ze tří hlavních složek biomasy není zdrojem fermentovatelných sacharidů.

Poměr zastoupení jednotlivých polymerních složek lignocelulosoové biomasy se liší v závislosti na typu a stáří biomasy, oblasti a klimatických podmínkách, v nichž byla vypěstována. Pšeničná sláma, která je v Evropě nejběžnějším zemědělským odpadem obsahuje zhruba 30–50 % celulosy, 25–50 % hemicelulosy a 10–15 % ligninu^{5,8}. Vzhledem k vysokému obsahu sacharidické složky je lignocelulosoová biomasa vhodná pro přípravu fermentačních médií, která lze následně využít pro výrobu bioethanolu.



Obr. 3. Prekurzory pro syntézu ligninu

3. Fyzikálně-chemická předúprava lignocelulosoové biomasy a vznik inhibičních látek

Aby bylo možné lignocelulosoovou biomasu použít pro přípravu fermentačních médií, je nezbytné ji hydrolyzovat na jednoduché sacharidy, které dokážou mikrobiální producenti ethanolu využívat. To se děje většinou ve dvou po sobě následujících krocích, které zahrnují předúpravu a poté enzymovou hydrolyzu celulosy a hemicelulosy na zkvasitelné sacharidy. Ačkoli je předúprava materiálu energeticky náročná, její provedení je nezbytné pro úspěšný průběh dalších kroků procesu.

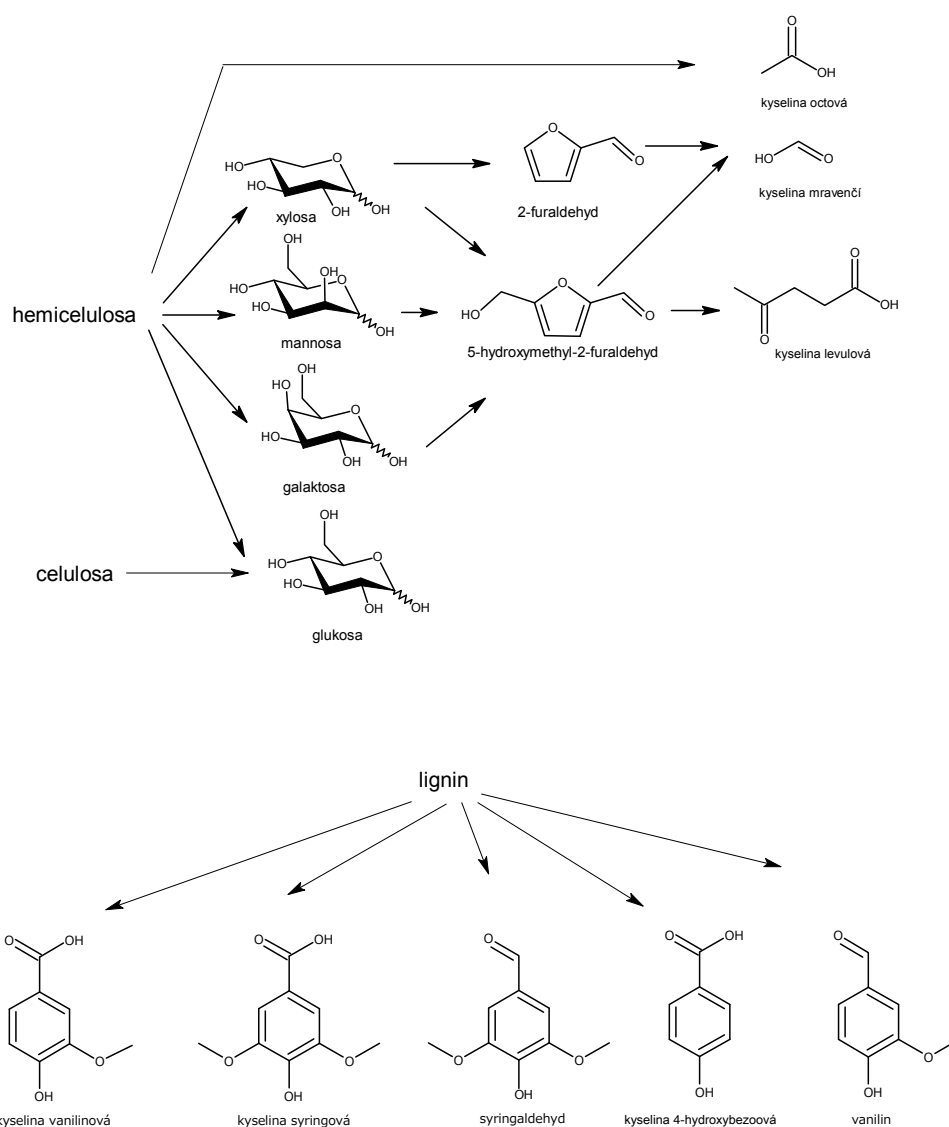
Při předúpravě dochází k rozrušení komplexní struktury materiálu, zvýšení jeho porozity a snížení krystalinity celulosy, což umožní efektivní navázání celulólytických enzymů na substrát a jeho hydrolyzu na zkvasitelné sacharidy. Ačkoli existuje mnoho postupů, kterými lze tohoto cíle dosáhnout (fyzikální, chemické a biologické metody), nejčastěji používanou metodou předúpravy zemědělských odpadů je kyselá hydrolyza biomasy. K pomleté biomase se přidá zředěný (0,4–2,0%) roztok minerální kyseliny (sírová, chlorovodíková, dusičná), celá směs se zahřeje za zvýšeného tlaku na teplotu 121–220 °C a nechá se reagovat (dvě až několik desítek minut), přičemž dojde k oddělení ligninu, rozrušení a částečné degradaci celulosové struktury a téměř kompletní degradaci hemicelulosy⁹.

Při hydrolyze dochází však nejen k žádoucímu uvolnění oligo- a monosacharidů, ale bohužel i k jejich další degradaci, která vede ke vzniku produktů, jež mohou ovlivňovat jak aktivitu enzymů při následné enzymové hydrolyze, tak i působit inhibičně na producenty ethanolu při fermentaci. Množství a spektrum vzniklých degradačních produktů závisí na typu a složení materiálu a podmínkách předúpravy.

Obecně lze tyto látky rozdělit do tří hlavních skupin – alifatické kyseliny vzniklé degradací sacharidů a ligninu, furanové deriváty vzniklé degradací sacharidů a fenolové sloučeniny a jejich deriváty, které pocházejí z ligninu. Degradací hexos vzniklých rozkladem celulosy a hemicelulosy vzniká především 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rozkladem pentos uvolněných hydrolyzou hemicelulosy vzniká 2-furaldehyd (obr. 4). V kyselých hydrolyzátech se tyto látky vyskytují v koncentracích od 0,1 do 5,0 g l⁻¹ v závislosti na typu materiálu a podmínkách předúpravy¹⁰.

Jejich dalším rozkladem vzniká kyselina mravenčí, z 2-furaldehydu se navíc tvoří ještě kyselina levulová. Při rozkladu hemicelulosy se uvolňuje kyselina octová (obr. 4). Koncentrace alifatických kyselin se v kyselých hydrolyzátech¹⁰ pohybují v rozmezí 0,9–3,0 g l⁻¹.

Mezi produkty degradace ligninu patří celá řada fenolových sloučenin, jejichž zastoupení závisí na typu materiálu, neboť struktura ligninu se může v jednotlivých rostlinách lišit. Nejčastěji se v kyselých hydrolyzátech vyskytují 4-hydroxybenzaldehyd, kyselina hydroxybenzoová, vanilin, syringaldehyd, koniferylaldehyd, kyselina vanilová, syringová a skořicová (obr. 4). Jejich množství se pohybuje v desítkách až stovkách miligramů na litr v závislosti na typu hydrolyzovaného materiálu¹¹.



Obr. 4. Přehled nejvýznamnějších inhibitorů vznikajících při předúpravě lignocelulosové biomasy

4. Vliv inhibičních látek na aktivitu celulytických enzymů

Enzymová hydrolyza předupraveného lignocelulosového hydrolyzátu probíhá většinou pomocí komerčně dostupných enzymových preparátů (největšími výrobci jsou firmy Novozyme a Genencor), které katalyzují rozklad materiálu na jednoduché sacharidy a jsou většinou směsí enzymů s endo-1,4- β -glukanasovou (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glukosidasovou (EC 3.2.1.74) a β -glukosidasovou aktivitou (EC 3.2.1.21). Enzymová hydrolyza a tím i efektivita konverze na jednoduché cukry je ovlivněna mnoha faktory, mezi nejvýznamnější patří inhibice substrátem a produktem, snižovat ji však může i přítomnost degra-

čních produktů vznikajících při předúpravě lignocelulosového materiálu.

V odborné literatuře je publikováno mnoho studií, které popisují vliv jednotlivých inhibitorů nebo jejich směsí na aktivitu komerčních enzymů. Tyto informace se však od sebe často liší, protože výsledky jsou ovlivněny nejen typem a původem enzymového preparátu, ale i jeho dávkováním a samozřejmě koncentrací přítomných inhibitorů. Obecně lze však říci, že největší inhibiční efekt na aktivitu enzymů má přítomnost kyseliny mravenčí^{12,13} a octové^{14,15}, zatímco kyselina levulová aktivitu enzymů prakticky neovlivňuje¹². Také přítomnost látek vznikajících degradací ligninu, tj. syringaldehyd, 4-hydroxybenzaldehyd, vanilín¹³, kyselina gallová, hydroxyskořicová a hydroxybenzo-

ová¹⁴ aktivitu celulólytických enzymů výrazně nesnižují. Totéž platí i pro 2-furaldehyd a 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd ať jednotlivě nebo ve směsi¹², pokud jsou přítomné v koncentracích do 2 g l⁻¹. V porovnání s inhibicí produktem, která nastává při nahromadění glukosy v médiu, nemá tedy přítomnost většiny degradačních produktů v koncentracích, které vznikají při předúpravách lignocelulosových materiálů, na aktivitu enzymů významný účinek.

5. Vliv inhibičních látek na metabolismus mikrobiálních producentů ethanolu

Přítomnost degradačních produktů vzniklých při zpracování lignocelulosové biomasy ovlivňuje metabolické funkce mikrobiálních producentů ethanolu a tím i celkovou efektivitu procesu. Jejich inhibiční efekt je dán nejen koncentrací, ve které jsou v hydrolyzátech přítomny, ale i typem a vlastnostmi mikrobiálního producenta, proto se může pro jednotlivé skupiny mikroorganismů radikálně lišit. Většina mikrobiálních producentů ethanolu, včetně průmyslově používaných kmenů, je citlivá k přítomnosti inhibitorů, a to zejména tehdy, když je v hydrolyzátech přítomno větší množství těchto degradačních produktů ve směsi, neboť tak se jejich inhibiční účinek ještě zesiluje.

5.1. Vliv alifatických kyselin

To, jakým způsobem přítomnost alifatických kyselin ovlivňuje schopnost buňky produkovat ethanol, je dáno zejména koncentrací, ve které se v hydrolyzátech vyskytují. Nízké koncentrace mravenčí, octové a levulové kyseliny (<0,5 g l⁻¹) mohou u kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*) stimulovat tvorbu ethanolu, zatímco ve vyšší koncentraci působí inhibičně¹⁶. Stimulační efekt může být vysvětlen snahou o zachování životních funkcí buňky. Nedisociované slabé kyseliny jsou schopné difundovat do buňky, uvnitř buňky disociují a tím snižují intracelulární pH. Snaha buňky o vyrovnání pH na původní hodnotu vede ve zvýšené stimulaci membránové H⁺-ATPasy, která transportuje protony ven z buňky za hydrolyzy ATP. Jedná se o složitý proces, který je regulován expresí 490–650 genů¹⁷. Vyšší spotřebu ATP kompenzuje buňka za anaerobních podmínek zvýšením rychlosti jeho tvorby (a tím i zvýšením rychlosti produkce ethanolu) a snížením jeho spotřeby na ostatní buněčné funkce (snížením rychlosti růstu), což je provázáno i změnou morfologie buněk¹⁸. Při vyšší koncentraci kyselin v prostředí však nedokáže buňka kompenzovat zvýšenou spotřebu energie, dochází k acidifikaci intracelulárního prostoru a nahromadění aniontů, což vede ke snížení jak růstové rychlosti, tak i produkce ethanolu a životaschopnosti buněk^{16, 19}. Toxický efekt jednotlivých kyselin klesá v pořadí kyselina mravenčí, kyselina levulová a kyselina octová¹⁶, v přítomnosti ethanolu se jejich toxický efekt ještě zvyšuje²⁰.

5.2. Vliv derivátů furanu

2-Furaldehyd a 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, degradační produkty pentos a hexos, jsou látky, které mají ze sloučenin přítomných v hydrolyzátech na mikrobiální buňky nejsilnější inhibiční účinek. Furanové deriváty ovlivňují jak rychlost růstu, rychlost spotřeby glukosy a rychlost tvorby ethanolu, tak i syntézu proteinů a RNA¹⁹ a inhibují enzymy alkoholdehydrogenasu (EC 1.1. 1.1), aldehyddehydrogenasu (EC 1.2.1.3) a pyruvátdehydrogenasu (EC 1.2.4.1)²¹, přičemž 2-furaldehyd má vyšší inhibiční efekt než 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd.

Přídavek 2-furaldehydu a 5-hydroxymethyl-2-furaldehydu nezpůsobuje u kvasinek snížení výtěžnosti ethanolu, ale zpomaluje jak rychlost jeho tvorby, tak i rychlost růstu a spotřeby glukosy²¹. U buněk vystavených přítomnosti těchto dvou inhibitorů lze pozorovat lag fázi, jejíž délka je závislá na koncentraci inhibitoru²¹ a pro jednotlivé druhy a kmeny kvasinek se liší. K obnovení růstu buněk a produkci ethanolu dochází poté, co kvasinky přítomné inhibiční látky zredukovat pomocí enzymu NADH-dependentní alkoholdehydrogenasy (EC 1.1. 1.1) na méně toxický 2-hydroxymethylfuran a 2,5-dihydroxymethylfuran²², přičemž rychlost jejich odbourávání je úměrná velikosti inokula. Konverze 5-hydroxymethyl-2-furaldehydu na alkohol probíhá z důvodu jeho nižší membránové permeability pomaleji, což se projevuje delší lag fází²².

Tolerance vůči vzniklým alkoholům se opět pro jednotlivé druhy liší; zatímco kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* vykazuje za anaerobních podmínek dobrou toleranci k přítomnosti 2-hydroxymethylfuranu, růst kvasinky *Pichia stipitis* je za aerobních podmínek tímto metabolitem stále částečně inhibován²². Bakterie (např. *Zymomonas mobilis*) vykazuje v porovnání s kvasinkami vyšší citlivost k přítomnosti 2-furaldehydu a 5-hydroxymethyl-2-furaldehydu, což se projevuje jak snížením růstové rychlosti, tak i snížením výtěžnosti ethanolu²³.

5.3. Vliv fenolových sloučenin

Fenolové sloučeniny mají na producenty ethanolu silný inhibiční efekt, mezi nejvíce toxické patří především nízkomolekulární degradační produkty ligninu, jejich toxicita je ovlivněna i polohou substituentu v molekule¹⁰. Předpokládá se, že způsobují především poškození integrity cytoplasmatické membrány, ale přesný mechanismus inhibice není ještě dopodrobna objasněn²².

Mezi nejtoxičtější fenolové sloučeniny vyskytující se v neupravených hydrolyzátech patří 4-hydroxybenzoová kyselina, která v koncentracích kolem 1 g l⁻¹ způsobuje u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* až 30% snížení výtěžnosti ethanolu²². Ještě vyšší inhibiční účinek má vanilin, který ve stejné koncentraci téměř úplně inhibuje růst kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* i produkci ethanolu a způsobuje 25% pokles produkce ethanolu u *Zymomonas mobilis* a 50% pokles u *Pichia stipitis*²³. Některé kvasinky využívající pentosy jsou však zřejmě schopny vanilin redukovat a tím jeho toxický účinek snižovat²³.

6. Možnosti omezení inhibičního účinku

V podstatě existují dvě cesty, jak eliminovat inhibiční účinek degradačních produktů, které vznikají při předúpravě lignocelulosoové biomasy. Jednou z nich je detoxikace hydrolyzátů před vlastní enzymovou hydrolýzou a fermentací pomocí fyzikálních, chemických nebo biologických postupů a druhou je vytvoření kmenů, které mají zvýšenou rezistenci k přítomnosti těchto degradačních produktů.

6.1. Biologické, chemické a fyzikální metody detoxikace lignocelulosových hydrolyzátů

Obsah inhibičních látek v hydrolyzátech lignocelulosových materiálů lze snížit přidavkem enzymů peroxidasy (EC 1.11.1.7) a lakasy (EC 1.10.3.2), které odbourávají fenolové monomery a fenolové kyseliny. Jejich účinek spočívá zřejmě v oxidativní polymeraci nízkomolekulárních fenolových sloučenin²⁵. Bylo publikováno, že při fermentaci hydrolyzátů ošetřených těmito enzymy, které produkuje lignolytická houba *Trametes versicolor* (outkovka pestrá), bylo dosaženo dvoj- až trojnásobné produkce ethanolu v porovnání s neošetřenými hydrolyzáty²⁶.

Také plíseň *Trichoderma reesei* je zřejmě schopna degradovat přítomné inhibiční látky, neboť po kultivaci této plísně na hydrolyzátech byla zjištěna snížená koncentrace 2-furaldehydu, kyseliny octové a benzoové a v následné fermentaci bylo dosaženo až čtyřnásobného zvýšení výtěžnosti ethanolu na spotřebovaný substrát²⁷ v porovnání s původními hydrolyzáty.

Další z možností detoxikace je odpaření těkavé frakce hydrolyzátů na rotační odparce a poté zpětná resuspendace vysušených hydrolyzátů ve fermentačním médiu. Touto metodou bylo dosaženo snížení koncentrace kyseliny octové o 54 %, vanilinu o 29 % a byl téměř úplně odstraněn 2-furaldehyd²⁵.

Jiný přístup představuje extrakce hydrolyzátů diethyletherem, čímž se odstraní kyseliny octová, mravenčí a levulová, 2-furaldehyd a fenolové sloučeniny a dojde ke zlepšení zkvasitelnosti takto upravených hydrolyzátů²⁵.

Také přidavek hydroxidu vápenatého, který způsobí vysrážení některých toxických látek, vede po odfiltrování precipitátů ke zvýšení produktivity ethanolu²⁵. Toxické látky mohou být odstraněny i adsorpcí na různé materiály, například přidavek dřevěného uhlí vede ke snížení koncentrací furanových derivátů a fenolových sloučenin.

Ačkoli některé metody detoxikace hydrolyzátů jsou účinné, problémem je další navýšení ceny konečného produktu¹³, v mnoha případech se hovoří až o 20% zvýšení konečné ceny ethanolu. Další nevýhodou je i to, že při odstraňování toxických látek dojde často i ke ztrátám sacharidů²⁵, což způsobí snížení celkové produktivity a tím opět navýšení ceny produktu.

6.2. Mikrobiální kmeny se zvýšenou odolností k inhibitorům

V souvislosti se snahou snížit inhibiční účinek toxických látek vznikajících při předúpravách lignocelulosoové biomasy je využíváno množství kmenů, které vykazují zvýšenou toleranci k přítomnosti inhibitorů. Může se jednat buď o geneticky upravené kmeny nebo mikroorganismy, které byly na přítomnost inhibitorů adaptovány.

Jak již bylo řečeno, citlivost jednotlivých producentů ethanolu k přítomnosti inhibičních látek se může významně lišit, a to dokonce i u jednotlivých kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. Jednou z možností, jak připravit kmeny tolerantní k inhibitorům, je selekce mutantů, které byly po několika desítkách generací kultivované v médiích se zvyšující se koncentrací daného inhibitoru^{21,24}. Tímto způsobem byly připraveny kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou schopny velice účinně a rychle degradovat deriváty furanu na příslušné alkoholy^{19,28}.

Další cestou je konstrukce geneticky upravených kmenů, její úspěch však závisí na pochopení inhibičního působení jednotlivých degradačních produktů²¹. V nedávné době byly vytvořeny geneticky modifikované kmeny *Saccharomyces cerevisiae* schopné extracelulárně produkovat enzym lakasu (E.C 1.10.3.2), která odbourává přítomné fenolové deriváty¹¹, což vede k významnému zkrácení doby fermentace. Naopak kmeny s naklonovanou nadprodukcí dekarboxylasy fenylakrylové kyseliny vykazují v porovnání s divokými kmeny zvýšenou růstovou rychlost a vyšší produktivitu ethanolu¹⁹.

7. Závěr

Degradační produkty celulosy, hemicelulosy a ligninu, které vznikají při předúpravě lignocelulosoové biomasy mohou významně snižovat produktivitu procesu výroby bioethanolu. Ačkoli existuje množství cest, jak snížit inhibiční účinek těchto látek, je třeba konstatovat, že ideální a obecně použitelná metoda nebyla zatím nalezena. Zkvasitelnost médií připravených z hydrolyzátů lignocelulosových materiálů závisí na množství přítomných inhibičních látek a jejich koncentraci a dále na schopnosti produkčních kmenů tolerovat tyto látky nebo je přeměňovat na méně toxické produkty. K lepší zkvasitelnosti může přispívat i vyšší koncentrace biomasy, protože zvýšení koncentrace inokula nebo kultivace hustých kultur mikroorganismů může vést k rychlejšímu zkvašování médií. Stejně tak i detoxikace hydrolyzátů před enzymovou hydrolýzou a fermentací a použití kmenů se zvýšenou tolerancí k přítomnosti inhibičních látek může zvyšovat efektivitu procesu výroby bioethanolu z lignocelulosoové biomasy.

Tato studie vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci programového projektu výzkumu a vývoje Kontakt ME10146.

LITERATURA

1. Production of bioethanol in the EU. European bioethanol fuel association: Press release, 28.7.2010, on-line. <http://www.ebio.org/uploads/100728%20PR%20on%20P&C%202009%20def.pdf>, staženo 14.10.2011.
2. F.O.Licht, 2011, Courtesy of Global Renewable Fuels Alliance, on-line. http://globalrfa.org/pr_021111.php, staženo 15.10.2011.
3. Balat M. Ayar G.: *Energ. Source* 27, 931 (2005).
4. Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J.: *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha 1998.
5. Cheng J. J., Timilsina G. R.: *Renewable Energy* 36, 3541 (2011).
6. Taherzadeh M. J., Karimi K.: *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621 (2008).
7. Sederoff R. R., MacKay J. J., Ralph J., Hatfields R.: *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 145 (1999).
8. Sun X., Cheng J.: *Bioresour. Technol.* 83, 1 (2002).
9. Mosier N., Wyman Ch., Dale B., Elander R., Lee Y. Y., Holtzapple M., Ladish M.: *Bioresour. Technol.* 96, 673 (2005).
10. Almeida J. R. M., Modig T., Petersson A., Hahn-Hägerdal B., Lidén G., Gorwa-Grauslund M. F. J.: *Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 340 (2007).
11. Klinker H. B., Thomsen A. B., Ahring B. K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10 (2004).
12. Panagiotou G., Olsson L.: *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2), 250 (2007).
13. Cantarella M., Cantarella L., Gallifuoco A., Spera A., Alfani F.: *Biotechnol. Prog.* 20, 200 (2004).
14. Ximenes E., Kim Y., Mosier N., Dien B., Ladisch M.: *Enzyme Microb. Technol.* 48, 54 (2011).
15. Jaisamut K., Patáková P., Paulová L., Rychtera M.: *Odpadové fórum 2011, Kouty nad Desnou 13.-15.4. 2011*, Sborník přednášek na CD, str. 11.
16. Larsson S., Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Tengborg Ch., Stenberg K., Zacchi G., Nilvebrant N.-O.: *Enzyme Microb. Technol.* 24, 151 (1999).
17. Mira N. P., Palma M., Guerreiro J. F., Sá-Correia I.: *Microb. Cell Fact.* 9 (79), 1 (2010).
18. Maiorella B., Blanch H. W., Wilke C. R.: *Biotechnol. Bioeng.* 25, 103 (1983).
19. Maris A. J. A., Abbot D. A., Bellissimi E., van den Brink J., Kuyper M., Lutik M. A. H., Wisselink H. W., Scheffers W. A., van Dijken J. P., Pronk J. T.: *Antonie van Leeuwenhoek* 90, 391 (2006).
20. Pampulha M. E., Loureiro-Dias M. C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 375 (1990).
21. Liu Z. L., Slininger P. J., Dien B. S., Berhow M. S., Kurtzman C. P., Gorsich S. W.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 45 (2004).
22. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B.: *Bioresour. Technol.* 74, 25 (2000).
23. Delgeners J. P., Moletta R., Navarro J. M.: *Enzyme Microb. Technol.* 19, 220 (1996).
24. Heer D., Sauer U.: *Microb. Biotechnol.* 1 (6), 497 (2008).
25. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B.: *Bioresour. Technol.* 74, 17 (2000).
26. Jönsson L. J., Palmqvist E., Nilvebrant N. O., Hahn-Hägerdal B.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 691 (1998).
27. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Szengyel Z., Zacchi G., Réczey K.: *Enzyme Microb. Technol.* 20, 286 (1997).
28. Martín C., Marcet M., Almazán O., Jönsson L. J.: *Bioresour. Technol.* 98, 1767 (2007).

L. Paulová, J. Kačaba, P. Patáková, M. Rychtera, and K. Melzoch (*Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Degradation Products Formed in Physicochemical Pretreatment of Lignocellulose Biomass and Their Influence on the Effectivity of the Ethanol Production Process**

Prior to its use as feedstock in ethanol production, lignocellulose biomass must be decomposed and hydrolysed. In mild physicochemical pretreatment a wide range of degradation products such as organic acids, furan derivatives or phenolic compounds are formed, which can act as inhibitors. The inhibitors can affect the activity of cellulosytic enzymes and the metabolism of microbial cells and thus decrease the conversion of cellulose to fermentable sugars and the efficiency of ethanol production. The effect of individual compounds on the commercially available enzymes, yeasts and bacterial strains employed in ethanol production together with the inhibition mechanism is discussed. Several strategies to minimize the inhibitory effect such as physical, chemical or biological detoxification of hydrolysates or the use of strains tolerant to inhibitors are discussed.