

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

Ing. Helena Hudečková

**VYUŽITÍ ODPADŮ Z POTRAVINÁŘSKÝCH VÝROB NA
BIOPRODUKCI KYSELINY MLÉČNÉ A ETHANOL**

Autoreferát doktorské disertační práce k získání vědecké
hodnosti „doktor“ ve zkratce „Ph.D.“

BRNO

2018

Disertační práce byla sepsána v rámci doktorského studijního programu na Vysokém učení technickém v Brně na Ústavu chemie potravin a biotechnologií v prezenční formě studia.

Uchazeč: Ing. Helena Hudečková
 Ústav chemie potravin a biotechnologií
 FCH VUT v Brně

Školitel: prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
 Ústav chemie potravin a biotechnologií
 FCH VUT v Brně

Oponenti:

Autoreferát byl odeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne v hodin před komisí pro obhajoby disertačních prací v zasedací místnosti číslo na Fakultě chemické Vysokého učení technického v Brně.

S disertační prací je možné se obeznámit v knihovně Fakulty Chemické Vysokého učení technického v Brně.

Obsah

1	Teoretická část.....	5
1.1	Legislativa o nakládání s odpady	5
1.2	Odpady a jejich využití	5
1.3	Kyselina mléčná	6
1.4	Ethanol	7
1.5	Anaerobní digesce	8
2	Cíle disertační práce	9
3	Experimentální část.....	10
3.1	Použité mikroorganismy	10
3.2	Optimalizace předúpravy jednotlivých substrátů.....	10
3.3	Metody předúpravy substrátů před fermentací.....	12
3.4	Produkce kyseliny mléčné.....	13
3.5	Produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů.....	14
3.6	Produkce ethanolu v bioreaktoru.....	14
3.7	Mikroaerobní předúpravy.....	15
4	Výsledky a diskuse	17
4.1	Charakterizace jednotlivých substrátů	17
4.2	Optimalizace hydrolyz vybraných substrátů	19
4.3	Produkce kyseliny mléčné.....	20
4.4	Produkce ethanolu	24
4.5	Mikroaerační podmínky pro zvýšení produkce organických kyselin	26
5	Závěr.....	28
	POUŽITÁ LITERATURA	32
	PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA.....	37
	ŽIVOTOPIS	38

ABSTRAKT

Předložená disertační práce je zaměřena především na mikrobiální produkci kyseliny mléčné a ethanolu z odpadů z potravinářských výroby. Jakožto substráty byly vybrány odpad z produkce kávy (káвовá sedlina), odpad z produkce vína (matoliny), odpad ze zpracování citrusových plodů (pomerančové slupky). Teoretická část se věnuje shrnutí dosavadních poznatků o odpadech z potravinářských výroby a možnostech jejich zpracování. Pojednává také o vybraných metabolitech (kyselina mléčná, ethanol), na které mohou být tyto odpady využívány.

Část experimentů se zabývala především charakterizací a optimalizací hydrolyz pro maximalizaci množství fermentovatelných sacharidů. Byly provedeny různé kombinace chemických, fyzikálních a enzymatických hydrolyz vybraných substrátů. Následně byl vybírán vhodný produkční kmen kyseliny mléčné a ethanolu. V případě produkce kyseliny mléčné bylo vybráno 7 kmenů (*Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757), které byly kultivovány nejprve na syntetických médiích s obsahem různých sacharidů a následně byly testovány na konkrétních hydrolyzáttech odpadních substrátů. V případě produkce ethanolu byly testovány 2 kmene (*S. cerevisiae* CNCTC 6646 a *S. cerevisiae* CNCTC 6651) na hydrolyzáttech jednotlivých odpadních substrátů.

Následně byla věnována část experimentů produkci kyseliny mléčné a ethanolu na hydrolyzáttech jednotlivých odpadních substrátů za kontrolovaných podmínek v bioreaktoru. Závěrečná část předložené disertační práce se zabývala testováním mikroaerobní předúpravy lignocelulosového materiálu pro zvýšení produkce organických kyselin během acetogenní fáze anaerobní digesce.

KLÍČOVÁ SLOVA: odpady z potravinářských výroby, hydrolyza, fermentace, kyselina mléčná, ethanol, anaerobní digesce

1 Teoretická část

1.1 Legislativa o nakládání s odpady

Prevence vzniku a nakládání s odpady je legislativně ošetřena. V České Republice je to konkrétně zákonem o odpadech č. 185/2001 Sb. V květnu 2010 byl tento zákon doplněn novelizací č.154/2010 Sb. Tato novelizace byla vytvořena na základě evropské směrnice 98/2008/ES [1].

Tuto směrnici přijal v roce 2008 Evropský parlament a Rada Evropské unie. Jedná se o základní evropský právní dokument odpadového hospodářství, který je platný pro všechny členské státy EU včetně České republiky. Ukládá jednotlivým státům, aby bylo o odpady postaráno a zároveň byly případně využity. Měly by být recyklovány nebo použity na výrobu energie. Pokud odpady není možno nějakým způsobem využít, mohou být bezpečně odstraněny [1][2].

1.2 Odpady a jejich využití

Odpady ze zemědělství a potravinářského průmyslu jsou v dnešní době jednou z příčin znečištění životního prostředí. Ročně jsou produkována velká množství odpadního materiálu ze zemědělství a zpracování jeho produktů. Patří zde například zbytky ze zpracování kukuřice, vylisovaná cukrová třtina, rýžová a pšeničná sláma, z nichž mnohé jsou v současnosti zkoumány jakožto potenciální suroviny pro výrobu produktů s přidanou hodnotou. Odpady z potravinářského průmyslu zůstávají prozatím z velké části nevyužity, možnosti jejich využití by však měly být intenzivně zkoumány. Mezi tyto odpady patří například výlisky z citrusů, jablek a hroznů, dále pak například řízky ze zpracování cukrové řepy na výrobu cukru. Velká množství těchto odpadů vyvolávají vážné problémy z ekonomického i ekologického hlediska. Zároveň však dochází k velkým ztrátám cenných surovin. Obsahují totiž vysoká množství polysacharidů, které mohou být dále využity [3][4].

Mnohé z těchto odpadů mají potenciál pro použití v jiných výrobních systémech. Mohly by nalézt uplatnění například v konceptu biorafinérií. V Evropské unii je v současnosti trend tzv. průmyslové symbiózy, ve které je cílem využít odpad z jednoho sektoru jako surovinu pro jiná odvětví. Potravinářský průmysl je považován za relevantní odvětví pro koncept biorafinérií, a to zejména kvůli potenciálnímu využití zbytků vznikajících v tomto průmyslu. Využití potravinářského odpadu jakožto sekundárního zdroje energie nebo substrátu pro fermentace by mohlo pomoci s eliminací konkurence využívání půdy na pěstování surovin pro potraviny a biomasy pro fermentace [3].

Pro uplatnění koncepce průmyslové symbiózy v odvětví zpracování potravin je hlavní především identifikace, kvantifikace a charakterizace průmyslových přebytků. Poté je možno nalézt možnosti jejich využití a vhodně technologie pro jejich další zpracování. Průmyslová

symbióza závisí také na dostupnosti producentů potravinového odpadu a potenciálních odběratelů [3].

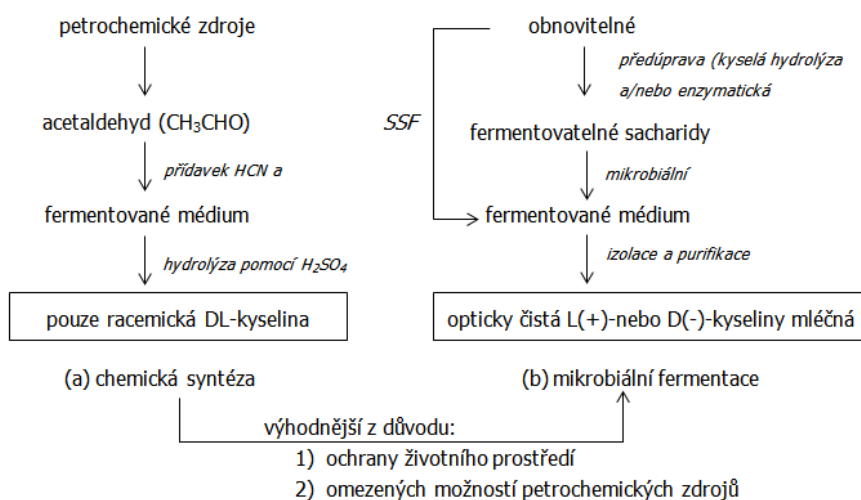
1.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (kyselina 2-hydroxypropionová) je přírodní organická kyselina. Jedná se o nejjednodušší hydroxykyselinu s asymetrickým atomem uhlíku. Nachází se ve dvou opticky aktivních formách. Oba enantiomery D(-) a L(+) mohou být produkovány použitím příslušných bakteriálních kmenů [5].

Tato kyselina je využívána převážně v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Využívá se také pro výrobu oksyložených chemikálií, regulátorů růstu rostlin a speciálních chemických meziproduktů. Nedávno se zvýšil zájem o produkci kyseliny L-mléčné, jelikož by mohla být využita jako monomer pro výrobu kyseliny polymléčné využitelné jako polymer pro lékařské a biologicky rozložitelné plasty šetrné k životnímu prostředí, které mohou nahradit synteticky vyrobené plasty z ropných surovin [5][6][7].

1.3.1 Výroba kyseliny mléčné

Kyselina mléčná může být vyrobena buď chemickou syntézou, nebo mikrobiální fermentací. Chemická syntéza z petrochemických zdrojů vede vždy k racemické směsi DL-kyseliny mléčné, což je hlavní nevýhodou této metody. Téměř všechna v současnosti vyráběná kyselina mléčná je produkována fermentačně. Jako producenti jsou nejvyužívanější bakterie mléčného kvašení, které jsou v porovnání s jinými mikroorganismy účinnější [8][9].



Obrázek 1: Porovnání chemického a biotechnologického způsobu výroby kyseliny mléčné [10]

1.3.2 Producenti kyseliny mléčné

Kyselina mléčná může být produkována mikroorganismy patřícími mezi bakterie, plísně, kvasinky, sinice a řasy. Mezi nejčastější producenty kyseliny mléčné však stále patří bakterie mléčného kvašení. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou tak nazývány vzhledem ke schopnosti produkce kyseliny mléčné jakožto hlavního (někdy jediného) produktu fermentace. V současnosti se studie přiklání k použití směsných kmenů během fermentace, což může poskytnout užitečné kombinace metabolických drah pro využití komplexních materiálů a následně zvýšení produkce kyseliny mléčné. Pro zvýšení výtěžnosti a optické čistoty kyseliny mléčné produkované různými mikroorganismy je využíváno také genetické inženýrství [8][11][12].

1.4 Ethanol

Nazývaný také ethylalkohol, alkohol nebo líh. Je kapalina s vodou neomezeně mísitelná, s teplotou varu 78 °C. Má mírné dezinfekční účinky. Fyzikálně jde o bezbarvou kapalinu ostré, ale po zředění příjemné alkoholické vůně. Je snadno zápalný, proto je klasifikován jako hořlavina 1. třídy [13].

Použití ethanolu je především ve spalovacích motorech jako pohonná hmota. Vzhledem k vlastnostem ethanolu se v praxi nepoužívá čistý, ale pouze jako přísada do konvenčních minerálních paliv v množství 5 až 10 %. [14][15][16].

Nejnámější použití ethanolu je v potravinářství na výrobu alkoholických nápojů. V lékařství a farmacii se používá jako rozpouštědlo (např. jódu, tím vzniká tzv. jodová tinktura), na extrakci nebo čištění drog/léčivých látek při přípravě některých kapalných přípravků pro vnitřní i vnější použití a k dezinfekci neporaněné kůže. V oblasti kosmetiky se uplatňuje při výrobě deodorantů. Tento alkohol má své místo i při výrobě čisticích prostředků. V chemickém průmyslu se používá jako surovina, zejména při výrobě dalších organických sloučenin: kyseliny octové, ethenu, diethyletheru, ethylacetátu, ethylakrylátu, ethylaminu, diethylaminu, triethylaminu aj. [14][15][16].

1.4.1 Výroba ethanolu

Ethanol se průmyslově vyrábí také dvěma způsoby: 1) Chemicky (kysele katalyzovanou hydratací ethenu) a 2) Biotechnologicky (fermentačním procesem).

Z celosvětové produkce ethanolu je 93 % vyrobeno fermentačně a zbylých 7 % se vyrábí chemicky hydratací ethenu [13].

1.4.2 Producenti ethanolu

Nejpoužívanějšími producenty ethanolu jsou kvasinky *S. cerevisiae* a bakterie *Zymomonas mobilis*, které jsou schopny kvasit hexosy. Momentálně je předmětem výzkumu fermentace

xylosy a ostatních pentos na ethanol pomocí kvasinek *Candida shehatae* a *Pichia stipitis*, které nabízí dobrý potenciál i přes nízkou toleranci k ethanolu a inaktivitě při nízkém pH. Bakterie *Pachysolen tannophilus* a *Escherichia coli* mají schopnost fermentovat hexosy i pentosy. *Kluyveromyces marxianus* je termofilní kvasinka s možností růstu při teplotách až 52 °C a je schopna fermentovat široké spektrum cukrů. Termofilní bakterie (např. *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Clostridium thermocellum*) jsou přísně anaerobní, odolné vůči velmi vysokým teplotám (až 70 °C). Tyto bakterie mohou fermentovat různé druhy cukrů, mají celulólytickou aktivitu, ale nízkou toleranci vůči ethanolu. Dalším předmětem výzkumu v oblasti produkce bioethanolu jsou geneticky modifikované mikroorganismy schopné produkovat vyšší množství celulas, xylanů a hemicelulas [13][15].

1.5 Anaerobní digesce

Anaerobní digesce (AD) je biochemický proces, který přeměňuje celou řadu organických látek s použitím přirozeně se vyskytujících mikroorganismů bez přístupu kyslíku za vzniku plyných směsí. Ty se skládají především z methanu a oxidu uhličitého a označují se jako bioplyn. Anaerobní digesce je používána pro výrobu bioenergie z různých organických surovin, jako jsou lesní a zemědělské zbytky, živočišný hnůj, organický odpad, potravinářský odpad a energetické plodiny. Slouží k výrobě energie z obnovitelných zdrojů, odstraňování odpadů, zmírňování emisí skleníkových plynů a zajištění energetické bezpečnosti. V roce 2013 bylo v Evropě provozováno více než 14 500 komerčních zařízení [17][18][19].

Proces anaerobní digesce je kombinací velkého množství biochemických a fyzikálně-chemických reakcí. Ty mohou být v zásadě kategorizovány jako: dezintegrace, hydrolýza, fermentace (acidogeneze), acetogeneze (tvorba acetátu) a metanogeneze (tvorba methanu) [17].

1.5.1 Produkce organických kyselin s krátkým řetězcem

Organické kyseliny s krátkým řetězcem vznikají jako meziprodukty acidogenního kroku anaerobní digesce a jsou prekurzory pro množství dalších produktů: bioplynu (pomocí metanogeneze), pohonných látek na bázi alkoholu (např. ethanol a butanol), biologicky rozložitelného plastu (polyhydroxyalkanoáty). Organické kyseliny vyrobené během AD, zejména kyselina octová, může být použita pro výrobu polyvinylacetátu. Dále je lze použít k růstu kvasinek akumulujících lipidy (*Yarrowia lipolytica*), které se dále používají jako surovina pro výrobu bionafty [20][21][22][23].

Produkce organických kyselin s krátkým řetězcem pomocí směsných mikrobiálních kultur vyžaduje potlačení mikroorganismů spotřebovávajících tyto kyseliny, zejména metanogeny. Metanogenezi lze zabránit inhibicí metanogenů chemikáliemi (např. 2-bromethansulfonát,

jodpropan), tepelnými šoky či působením kyselin. Všechny tyto způsoby inhibice jsou však problematické z hlediska průmyslového použití a kvůli vyšším provozním nákladům. V případě použití 2-bromethansulfonátu a jodpropanu byl problém při dlouhodobých procesech, poněvadž se na ně mikroorganismy adaptovaly a bylo nutno zvyšovat dávkování. Je tedy potřeba nalézt vhodné metody kontrolující methanogenní aktivitu. Tato metoda by měla být levná a použitelná ve větším měřítku, aby zároveň byla maximalizována produkce organických kyselin. Jako vhodná metoda se nabízí mikroaerace média, která inhibuje striktně anaerobní metanogenní mikroorganismy. Mikroaerace média je jednou z nejšetrnějších metod inhibice striktně anaerobních mikroorganismů k životnímu prostředí [19][20][24][25][26].

2 Cíle disertační práce

Cílem této disertační práce je sledování využitelnosti vybraných potravinářských odpadních materiálů jako potenciálního zdroje uhlíku pro růst mikroorganismů a s tím související produkci vybraných metabolitů. Součástí práce je také testování mikroaerobní předúpravy lignocelulosového materiálu před anaerobní digescí, které bylo součástí zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku.

V průběhu disertační práce byly řešeny následující dílčí kroky:

- Výběr a charakterizace vhodného odpadu z potravinářských výrobníků
- Nalezení vhodné předúpravy odpadního materiálu před fermentací
- Nalezení vhodného mikrobiálního producenta
- Provedení několika fermentací, návrh optimálních podmínek, vyhodnocení výtěžků

3 Experimentální část

3.1 Použité mikroorganismy

Vybrané bakteriální kmeny pro produkci kyseliny mléčné byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM), Masarykovy univerzity v Brně. Vybrané kvasinkové kmeny pro produkci ethanolu byly získány z České národní sbírky typových kultur v Praze (CNCTC).

Produkce kyseliny mléčné: *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T, *Streptococcus thermophilus* CCM 4757. Produkce ethanolu: *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646, *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6651. Mikroaerobní předúpravy: směsná anaerobní kultura z ČOV (ARA Wädenswil-Rietliu)

3.1.1 Použité odpadní substráty

Pro tuto práci byly pořízeny následující substráty: matoliny z červených hroznů odrůdy Svatovavřínecké (vinařství Ing. Vlastimil Krčmář, Ždánice); slupky z pomerančů (odrůda Navel); kávová sedlina (z kávovaru na FCH VUT v Brně); odpadní chléb (z kavárny Zastávka v Brně); pšeničné otruby (ZHAW, Švýcarsko).

3.2 Optimalizace předúpravy jednotlivých substrátů

Výtěžky hydrolyz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a metodou HPLC.

3.2.1 Kávová sedlina

Pro optimalizaci hydrolyz byla použita kávová sedlina, která byla získána z kávovaru umístěném na FCH VUT v Brně. Posbíraná kávová sedlina byla sušena při 80 °C po dobu 24 hodin, aby se předešlo tvorbě plísní a byla snížena vlhkost vzorku.

Nejprve byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolyzy přípravem 10% suspenze kávy a roztoku kyseliny, hydroxidů nebo vody. Pro kyselou hydrolyzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 1,35 hm.% H₂SO₄, 2,7 hm.% H₂SO₄. Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolyza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidů byla provedena pouze fyzikální hydrolyza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

Po zchlazení bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí CaCO₃ na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolyzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β-glukosidasy a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo

na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin. Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.% H₂SO₄.

3.2.2 Matoliny

Použité matoliny pro experimenty byly posbírány v regionálním vinařství a následně byly zmrazeny a uchovávány při -18 °C. Před hydrolýzami byly matoliny krátce pomlety v mixéru.

Byla provedena optimalizace hydrolýzy za různých podmínek. Nejprve byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolýzy přípravou 15% suspenze matoliny a roztoku kyseliny a hydroxidu. Pro kyselou hydrolýzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 2,7 hm.% H₂SO₄. Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolýza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidu byla provedena pouze fyzikální hydrolýza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

Po zchlazení bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí CaCO₃ na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolýzu bylo aplikováno 4% Celluclast 1.5 L; 0,4 % β-glukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolýza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů a jejich kombinace na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.% H₂SO₄ a 2 hm.% HCl. Při optimalizaci enzymatické hydrolýzy byly použity následující enzymy a množství: 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β-glukosidasa; 0,4 % Viscozyme L; 0,4 % Pectinex. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny.

3.2.3 Pomerančové slupky

Pro experimenty byly použity zmrazené slupky uchovávané při teplotě -18 °C. Před hydrolýzami byly pomerančové slupky rozemlety v mixéru.

Byla provedena optimalizace chemicko-fyzikální hydrolýzy přípravou 25% suspenze pomerančových slupek a roztoku kyseliny nebo hydroxidu. Pro kyselou hydrolýzu byly připraveny kyseliny o následujících koncentracích: 2 hm.% HCl, 2,7 hm.% H₂SO₄. Suspenze byla následně autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Byla provedena i alkalická hydrolýza pomocí 5 hm.% NaOH při 70 °C po dobu 3 hodin. Pro porovnání účinku kyselin a hydroxidu byla provedena pouze fyzikální hydrolýza, a to autoklávováním suspenze kávy s destilovanou vodou při 121 °C po dobu 15 minut.

Před enzymatickou hydrolyzou bylo upraveno pH jednotlivých suspenzí pomocí CaCO_3 na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolyzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β -glukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolyza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Byla vyzkoušena i účinnost jednotlivých enzymů a jejich kombinace na autoklávované suspenzi kávy s 2,7 hm.% H_2SO_4 a 2 hm.% HCl . Při optimalizaci enzymatické hydrolyzy byly použity následující enzymy a množství: 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β -glukosidasa; 0,4 % Viscozyme L; 0,4 % Pectinex. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Výtěžky hydrolyz byly stanoveny spektrofotometrickou metodou podle Somogyi-Nelsona a metodou HPLC.

3.3 Metody předúpravy substrátů před fermentací

Kávová sedlina

Byla vytvořena 10% suspenze kávy s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH suspenze pomocí CaCO_3 na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolyzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β -glukosidasy a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolyza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Pomerančové slupky

Před hydrolyzou byly pomerančové slupky pomlety v mixéru a následně byly podrobeny hydrolyze. Byla vytvořena 25% suspenze pomerančových slupek s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH suspenze pomocí CaCO_3 na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolyzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % β -glukosidasy, 0,4 % Pectinexu a 0,4 % Viscozyme L. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolyza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Matoliny

Byla vytvořena 15% suspenze matolin s 2,7 obj.% kyselinou sírovou. Tato suspenze byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení bylo upraveno pH suspenze pomocí CaCO_3 na hodnotu 4,5 a následně byly přidány enzymy. Pro enzymatickou hydrolyzu bylo aplikováno 4 % Celluclast 1.5 L; 0,4 % Pectinex a 0,4 % Viscozyme L. Množství

přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolyza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 50 °C s třepáním 100 rpm po dobu 48 hodin.

Odpadní chléb

Byla vytvořena 15% suspenze rozemletého odpadního chleba s destilovanou vodou. Pro enzymatickou hydrolyzu byly aplikovány postupně 2 enzymy. Jako první bylo přidáno 4 % α -amylasy a po 2 hodinách působení bylo přidáno 4 % amyloglukosidasy. Množství přidaného enzymu bylo vztaženo na hmotnost sušiny. Enzymatická hydrolyza probíhala na temperovaných třepáčkách za teploty 65 °C s třepáním 150 rpm. Celkový čas enzymatické hydrolyzy byl 3,5 hodiny.

3.4 Produkce kyseliny mléčné

3.4.1 Screening růstu mikroorganismů na různých sacharidech

Bylo připraveno 40 ml média s obsahem jednotlivých sacharidů, které bylo zaočkováno 10 ml 18hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Pro screening byly použity všichni uvedené producenti kyseliny mléčné. Kultivace byla ponechána po dobu 48 hodin. Na počátku a na konci kultivace byla změřena optická hustota. Po skončení kultivace byla změřena koncentrace vzniklé kyseliny mléčné metodou HPLC.

3.4.2 Screening růstu mikroorganismů na hydrolyzátech

Bylo připraveno 100 ml hydrolyzátů kávových sedlin, matolin, pomerančových slupek a odpadního chleba. Následně byla u části hydrolyzátů upraveno pH na hodnotu 7 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH a u druhé části hydrolyzátů nebylo pH upraveno. Hydrolyzáty byly zakultivovány 10 % 18hodinového inokula příslušného mikroorganismu (viz producenti kyseliny mléčné). Kultivace byla ponechána po dobu 48 hodin a po skončení byla stanovena koncentrace vzniklé kyseliny mléčné metodou HPLC.

3.4.3 Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru

Kultivace probíhaly v bioreaktoru BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l. Bioreaktor byl vysterilizován a naplněn 1,5 l přefiltrovaného hydrolyzátu. Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand® (Eppendorf, Německo). Během fermentací bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy a supernatant byl po užit pro analýzu metodou HPLC. Experimenty byly provedeny ve 2 opakováních.

Filtráty hydrolyzátu matolin a pomerančových slupek byly obohaceny přísadkou 3 g·l⁻¹ kvasničného extraktu a zaočkovány 10 % 18hodinového inokula (*Lbc. rhamnosus* CCM 1825). Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm a pH bylo

upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Fermentace byla ukončena po 72 hodinách.

Filtrát hydrolyzátu odpadního chleba bylo zaočkováno 10 % 18hodinového inokula (*Lbc.rhamnosus* CCM 1825). Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm, pH bylo upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Fermentace byla ukončena po 76 hodinách.

Filtráty hydrolyzátu kávové sedliny byl obohacen přídatkem 3 g·l⁻¹ kvasničného extraktu a zaočkováno 10 % 18 hodinového inokula (*Lbc. plantarum* CCM 7039 a *Bacillus coagulans* CCM 2658). Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm. V průběhu fermentace bylo pH upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin.

V rámci stáže v Rakousku bylo provedeno několik fermentací v paralelním systému bioreaktorů DASGIP (Eppendorf, Německo). Tento systém se skládal ze 4 nádob o objemu 1 l. Jednotlivé bioreaktory byly naplněny 750 ml média (hydrolyzát kávové sedliny, hydrolyzát kávové sedliny s přídatkem 3 g·l⁻¹ kvasničného extraktu a MRS médium s obsahem sacharidů podobným hydrolyzátu kávové sedliny (6,75 g l⁻¹ glukosy, 19,5 g l⁻¹ galaktosy a 2,25 g l⁻¹ arabinosy)). Bioreaktory byly zakultivovány 50 ml 18hodinového inokula (*Lbc. rhamnosus* CCM 1825). Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 37 °C, míchání 100 rpm. V průběhu fermentace bylo pH upravováno na hodnotu 6,5 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Fermentace probíhala po dobu 92 hodin a průběhu bylo odebíráno v intervalu 24 hodin 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC. Průběh fermentace byl monitorován softwarem DASware® Control (Eppendorf, Německo). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

3.5 Produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů

Byly provedeny kultivace dvěma kmeny kvasinek *S. cerevisiae* na vybraných hydrolyzátech pro produkci ethanolu. Pro fermentaci bylo použito 100 ml hydrolyzátů kávových sedlin, matolin a pomerančových slupek, u kterých bylo upraveno pH na hodnotu 6,0 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Hydrolyzáty byly zakultivovány 10 % 24hodinového inokula příslušného mikroorganismu. Kultivace byla ponechána po dobu 72 hodin. Po ukončení byla změřena koncentrace vzniklého ethanolu metodou HPLC.

3.6 Produkce ethanolu v bioreaktoru

Pro produkci ethanolu v bioreaktoru byla vybrána kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646 a jako médium byl použit přefiltrovaný hydrolyzát kávové sedliny s přídatkem 3 g·l⁻¹ kvasničného extraktu. Výběr kmene a substrátu souvisel s výsledky experimentů

provedených v předešlé kapitole. Sterilní bioreaktor BioFlo/CelliGen 115 s fermentační nádobou o objemu 2 l byl naplněn 1,5 l média a byl zaočkován 10 % 18hodinového inokula. Fermentace v bioreaktoru probíhala za teploty 30 °C, míchání 100 rpm, pH bylo upravováno na hodnotu 5,5 pomocí 5 mol·l⁻¹ NaOH. Fermentace probíhala po dobu 72 hodin. V intervalu 24 hodin bylo odebíráno 10 ml vzorku, který byl zcentrifugován. Sediment byl použit pro gravimetrické stanovení množství biomasy a supernatant byl použit pro analýzu metodou HPLC. Průběh fermentace byl monitorován softwarem Biocommand (Eppendorf, Germany). Fermentace v bioreaktoru byla provedena ve 2 opakováních.

3.7 Mikroaerobní předúpravy

Byla vytvořena 1 hm.% suspenze otrub a anaerobního kalu získaného z čističky odpadních vod (60 g otrub do 6 l kalu), která byla ponechána fermentovat v bioreaktoru o objemu 7 l. Během všech fermentací v bioreaktoru bylo odebíráno 30 ml vzorku ve 24. hodinovém intervalu a stanovováno množství a složení vznikajících plynů nad médiem, hodnoty FOS a TAC pro zjištění účinnosti procesu acidogeneze a množství vznikajících organických kyselin metodou HPLC. Během fermentace byly také snímány hodnoty pH, kyslíku a redoxního potenciálu.

Byly provedeny vsádkové, přítokované a kontinuální kultivace s různými intervaly vzdušnění. Před fermentacemi byl nastaven průtok vzduchu na 1 V, což odpovídalo množství 46,57 mL·min⁻¹ vzduchu ~ 0,44 mmol·min⁻¹ O₂. Teplota v bioreaktoru byla nastavena na 35 °C. Kultivace probíhaly za následujících podmínek:

- Batch 1 – míchání: 500 rpm; interval vzdušnění: 4 minuty pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 72 hodin
- Batch 2 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 2 minuty pauza a 120 s vzdušnění; doba fermentace: 72 hodin
- Batch 3 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 8 minut pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 96 hodin
- Batch 4 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; doba fermentace: 144 hodin
- Fed-batch 5 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 2 minuty pauza a 120 s vzdušnění;
- Fed-batch 6 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění;
- Semi-kontinuální 7 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: každých 24h 2 l kalu s 20 g otrub
- Kontinuální 8 – míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: 3 x denně 667 ml kalu s 1 hm.% otrub
- Kontinuální 9 - míchání: 600 rpm; interval vzdušnění: 81 minut pauza a 30 s vzdušnění; dávkování substrátu: 6 x denně 667 ml kalu s 1 hm.% otrub

Během přítokované fermentace bylo po 65 hodinách kultivace přidáno 400 ml suspenze kalu s přídatkem 60 g otrub. Během semikontinuální fermentace byly manuálně odebrány 2 l zfermentované suspenze z bioreaktoru a následně přidány 2 l čerstvé suspenze kalu s otrubami. Kontinuální fermentace již probíhaly pomocí systému 2 bioreaktorů. Pro přidávání čerstvého substrátu byl použit reaktor o objemu 12 l, který byl naplněn 1 hm.% suspenzí kalu a otrub. Tento reaktor byl míchán a umístěn v lednici při 6 °C. Kontinuální fermentace s označením 7 byla prováděna vypuštěním a následným napuštěním 667 ml suspenze 3krát denně, což odpovídalo výměně 2 l média denně. Kontinuální fermentace s označením 8 byla prováděna vypuštěním a následným napuštěním 667 ml suspenze 6krát denně, což odpovídalo výměně 4 l média denně.

3.8 Použité analytické metody

- Stanovení sacharidů a organických kyselin metodou HPLC
- spektrofotometrické stanovení redukujících sacharidů metodou Somogyi-Nelsona
- Stanovení anthokyanů pH-diferenciální metodou
- Stanovení obsahu polyfenolických látek
- Stanovení obsahu strukturních sacharidů a vlákniny
- Stanovení sušiny a množství vody ve vzorku
- Gravimetrické stanovení biomasy
- Stanovení poměru organických kyselin a pufruční aktivity metodou FOS/TAC
- Stanovení koncentrace plynů přístrojem Dräger X-am 7000

4 Výsledky a diskuse

4.1 Charakterizace jednotlivých substrátů

4.1.1 Složení kávové sedliny

V kávové sedlině získané z univerzitního kávovaru bylo stanovováno krom strukturních sacharidů i celkové množství polyfenolických látek a případně dalších možných inhibitorů jako například 5-hydroxy-methyl-furfural (HMF). Naměřené hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny a shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Složení kávové sedliny

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	10,01 ± 0,16
galaktosa + manosa	39,62 ± 0,66
arabinosa	3,39 ± 0,68
glycerol	0,27 ± 0,10
diacetyl	0,82 ± 0,20
kyselina levulová	0,14 ± 0,02
2 - propanol	0,06 ± 0,01
5-hydroxy-methyl-furfural	0,24 ± 0,02
furfural	0,09 ± 0,01
polyfenoly	5,78 ± 0,01
vláknina	1,64 ± 0,22
množství sušiny	95,11 ± 0,14 %

Výsledky analýzy kávové sedliny jsou porovnatelné s hodnotami uvedenými v publikacích od *Petrik a kol. 2014* a *Ballesteros a kol. 2014* [27][28], které se věnují problematice složení kávové sedliny. Jediným rozdílem je, že autoři uvádí ve složení galaktosu a manosu, zatímco námi použitou metodou byla stanovena pouze galaktosa. Součet stanovených množství galaktosy a manosy uvedených v těchto publikacích však odpovídá námi naměřené hodnotě pro galaktosu. Bylo zjištěno, že použitá kolona pro HPLC nebyla schopna odseparovat tyto dva sacharidy. Vzhledem k tomu, že galaktosa a manosa mají stejný retenční čas, byla stanovena pouze celková koncentrace obou sacharidů v jednom píku. V tabulce je tedy uvedeno množství těchto sacharidů jako suma. Stanovení jednotlivých koncentrací galaktosy a manosy však nebylo nutné, jelikož oba tyto sacharidy jsou fermentovatelné [27][28].

Důležitým faktem je, že kávová sedlina obsahuje, ve srovnání s jinými lignocelulosovými materiály, převážně hexosy jakožto dominantní sacharidy. Tento fakt je důležitý z hlediska možnosti využití tohoto odpadu jakožto substrátu pro fermentace.

4.1.2 Složení matolin

Pro experimenty byly používány matoliny odrůdy Svatovavřínecké získané z místního vinařství. Kromě stanovení množství fermentovatelných sacharidů a vlákniny, bylo stanoveno i množství celkových polyfenolických látek a anthokyanových barviv. Některé publikace se zabývají možným inhibičním efektem polyfenolických látek na růst bakterií mléčného kvašení [29][30][31][32].

Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2. Jednotlivé hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny.

Tabulka 2: Složení matolin

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	10,7 ± 0,17
fruktosa	5,05 ± 0,86
galaktosa	3,04 ± 0,36
arabiosa	0,61 ± 0,12
polyfenoly	7,47 ± 0,02
vláknina	7,05 ± 0,32
anthokyany	0,79 ± 0,01
množství sušiny	41,39 ± 0,12 %

V publikaci od *Kendalla a kol. 2015* [31] uvádí podobné složení matolin stanovené metodou podle Sluitera. Hodnoty se mírně liší, což může být způsobeno zkoumáním matolin z jiné odrůdy vinné révy. V této studii zkoumali odrůdu Cabernet Sauvignon, dalším faktorem způsobujícím rozdílnost výsledků může být i rozdílná lokalita, odkud byly matoliny získány. V této studii se uvádí ve složení matolin glukosa, xylosa a arabiosa. Vzhledem k tomu, že námi použitá kolona pro HPLC má velmi blízké retenční časy pro galaktosu a xylosu, je pravděpodobné, že se mohlo jednat o oba sacharidy. V další publikaci od *Pedrase a kol. 2017* [33] se uvádí ve složení hydrolyzátu glukosu, fruktosu, manosu, galaktosu a xylosu, nicméně pro stanovení a hydrolyzu byla použita jiná metody hydrolyzy a analýzy. Celkové množství strukturních sacharidů v matolinách v těchto publikacích se pohybuje v rozmezí 16,0 až 23,2 g na 100 g sušiny, takže námi získaná hodnota 19,4 g na 100 g sušiny je pravděpodobná. Z daných výsledků lze tedy předpokládat, že při vhodně zvoleném způsobu hydrolyzy je matolína využitelná jakožto fermentační substrát [32][33].

4.1.3 Složení pomerančových slupek

Pro experimenty byly použity slupky pomerančů z odrůdy Navel. Byla stanovena množství fermentovatelných sacharidů, vlákniny, celulosy a množství sušiny. Naměřené hodnoty jsou vztaženy na množství sušiny a shrnuty v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení pomerančových slupek

	Množství (g na 100 g sušiny)
glukosa	19,48 ± 0,81
galaktosa	3,97 ± 0,25
fruktosa	7,54 ± 2,14
arabinosa	4,50 ± 0,95
vláknina	64,46 ± 1,96
celulosa	12,64 ± 0,60
množství sušiny	22,59 ± 0,22 %

Bylo zjištěno, že kompletní hydrolyzou pomerančových slupek lze získat až 35,49 g na 100 g sušiny monosacharidů ve formě glukosy, fruktosy, arabinosy a galaktosy. Pomerančové slupky tedy obsahují poměrně vysoké množství sacharidů, což je předurčuje jako nadějný substrát pro fermentace. V publikacích věnovaných zpracování odpadů z pomerančů jsou uvedeny podobné koncentrace a složení sacharidů, jaké byly naměřeny. Existují zde odchylky, které však mohou záviset od zralosti a místa původu pomerančů, z nichž byly získány zkoumané slupky. V uvedených publikacích byly využívány i jiné metody pro zjištění daných parametrů, což může také způsobovat rozdílnost naměřených hodnot [34][35][36].

4.2 Optimalizace hydrolyz vybraných substrátů

Nazelení vhodného způsobu hydrolyzy je důležité z hlediska zpřístupnění jednoduchých fermentovatelných sacharidů pro následnou fermentaci vybranými mikroorganismy. Existuje mnoho způsobů hydrolyzy lignocelulosoových materiálů. Nevýhodou některých způsobů jsou však vyšší náklady na použité chemikálie či možnost vzniku inhibičních látek v hydrolyzátech. Z toho důvodu byly provedeny optimalizace hydrolyz jednotlivých substrátů. Bylo provedeno několik způsobů hydrolyz kombinujících fyzikální, chemické a enzymatické způsoby [37].

U vybraných odpadů z potravinářských výrob byly provedeny optimalizace hydrolyzy pomocí kombinace různých typů hydrolyz. Jednotlivé odpadní substráty byly před hydrolyzami rozemlety (kromě kávové sedliny), aby byly narušeny struktury přítomných polysacharidů. Následně byly zkoušeny různé kombinace fyzikálních (vysoká teplota), chemických (kyselá, bazická) a enzymatických typů hydrolyz.

Existuje mnoho způsobů hydrolyz lignocelulosoových materiálů. V této práci byly vybrány kyselé hydrolyzy zředěnými kyselinami (sírovou a chlorovodíkovou) za vysoké teploty (121 °C). Další možností kyselých hydrolyz je použití silné kyseliny v kombinaci s nízkou teplotou, nicméně během tohoto způsobu hydrolyzy dochází k tvorbě inhibičních látek

pro mikroorganismy (kyselina octová, furfural a 5-hydroxymethylfurfural). Dále pak byla zkoušena alkalická hydrolyza pomocí 5 hm. % hydroxidu sodného při 70 °C po dobu 3 hodin. Byla také vyzkoušena hydrolyza pouze autoklávováním suspenze substrátu s vodou, aby byl porovnán efekt přidavku kyseliny a hydroxidu na hydrolyzu [37][38][39][40].

Po chemických hydrolyzách byly provedeny enzymatické hydrolyzy, kde byly použity různé druhy enzymů, a to celulasa (Celluclast 1.5L), hemicelulasa (β -glukosidasa), pektinasa (Pectinex) a enzymatický preparát se směsí celulolytických enzymů (Viscozyme L). Enzymový preparát Viscozyme L je tvořen enzymy: arabinasou, celulasou, β -glukanasou, hemicelulasou a xylanasou. Jednotlivé enzymy byly v různých kombinacích aplikovány na vybrané substráty, které byly předupraveny hydrolyzou 2,7% kyselinou sírovou při 121 °C. Bylo vyzkoušeno i působení enzymů na substráty předupravené kyselinou chlorovodíkovou a hydroxidem sodným [41].

Bylo zjištěno, že u vybraných substrátů byl nejúčinnějším způsobem hydrolyzy kombinace zředěné kyseliny sírové (2,7 hm.%) za vysoké teploty v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolyzou. Tato dvoustupňová hydrolyza byla nejúčinnější i vzhledem k tomu, že působení kyseliny za vysoké teploty způsobí rozrušení lignocelulosové struktury a zpřístupnění celulosy a hemicelulosy pro enzymy. Ačkoliv hydroxid sodný působí také na rozrušení struktury ligninu a celulosy, dochází ke vzniku menšího množství fermentovatelných sacharidů, k čemuž došlo i v našem případě. V literatuře se uvádí, že v některých případech již není nutno po kyselé hydrolyze přidávat enzymy, nicméně v případě odpadů vybraných pro tuto práci došlo ještě k navýšení fermentovatelných sacharidů [42][43][44].

4.3 Produkce kyseliny mléčné

Pro produkci kyseliny mléčné na odpadních substrátech je nutné především nalézt vhodného producenta, který je schopen utilizace jednotlivých sacharidů obsažených v hydrolyzátu odpadního substrátu. Byla tedy sledována schopnost růstu a produkce kyseliny mléčné vybranými producenty nejprve na syntetických médiích s obsahem jednotlivých sacharidů a následně na jednotlivých hydrolyzátech odpadních substrátů.

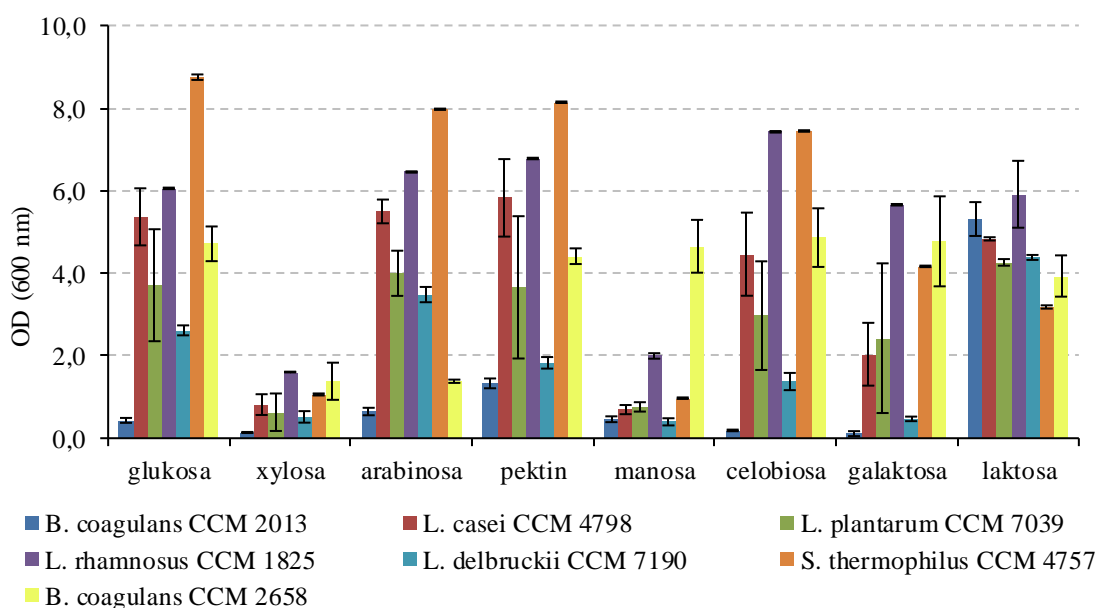
4.3.1 Screening kmenů na vybraných sacharidech

Bylo vybráno 7 producentů kyseliny mléčné pro testování schopnosti růstu a produkce kyseliny mléčné na různých sacharidech. Konkrétně byli vybráni: *Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757. Všechny tyto kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně.

Tyto kmeny byly vybrány jako reprezentativní kmeny běžně používané pro bioprodukcí kyseliny mléčné. Producenti byli vybráni i tak, aby byly vyprodukovány různé formy kyseliny mléčné, a to samostatné optické izomery i racemická směs. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* a *Streptococcus thermophilus* mají schopnost produkce L (+) izomeru. *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* produkuje D (-) izomer a *Lactobacillus plantarum* tvoří racemickou směs kyseliny mléčné. *B. coagulans* byl vybrán z důvodu schopnosti růstu a produkce za vysokých teplot. Další výhodou jsou nízké požadavky na živiny a možnost produkce opticky čisté L (+) kyseliny mléčné [9] [45][46][47][49].

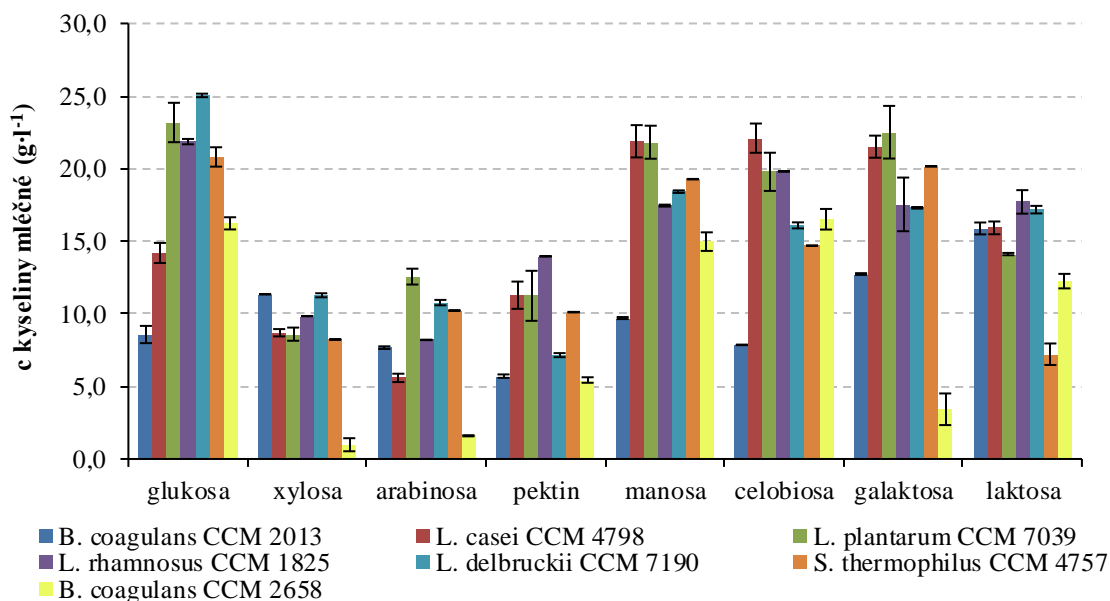
Jako médium bylo připraveno MRS médium, kde glukosa byla nahrazena jinými sacharidy, které se mohou vyskytovat v odpadech z potravinářských výrob. Konkrétně se jednalo o: glukosu, xylosu, manosu, arabinosu, celobiosu, galaktosu, pektin a laktosu.

Byly porovnány hodnoty optických hustot naměřeny po 48 hodinách kultivace jednotlivých kmenů na vybraných sacharidech, aby byla vyhodnocena schopnost růstu na těchto sacharidech (Graf 1). Dále byly porovnány dosažené koncentrace kyseliny mléčné po 48 hodinách kultivace, aby byla zjištěna schopnost utilizace jednotlivých sacharidů vybranými kmeny (Graf 2).



Graf 1: Růst mikroorganismů na jednotlivých sacharidech

Růst jednotlivých kmenů byl sledován metodou měření optické hustoty. Z výsledků je patrné, že mikroorganismy na jednotlivých sacharidech byly schopny růstu. U některých kmenů byly naměřeny nižší hodnoty optické hustoty, což však může být ovlivněno i velikostí buněk jednotlivých kmenů [48].



Graf 2: Produkce kyseliny mléčné na jednotlivých sacharidech

Bylo ověřeno, že vybrané bakteriální kmeny jsou schopny využít v syntetickém médiu jednotlivé sacharidy, které se mohou vyskytovat i v odpadech z potravinářských výrob. Porovnáním lze pozorovat, že utilizace některých sacharidů (konkrétně xylozy a arabinosy) je pro vybrané kmeny obtížnější [9][5][53].

4.3.2 Screening kmenů na jednotlivých hydrolyzátech

Po provedení kultivací vybranými mikroorganismy na syntetickém médiu byla testována schopnost produkce kyseliny mléčné i přímo na hydrolyzátech vybraných odpadních materiálů.

Z výsledků jednotlivých fermentací je patrné, že vybrané odpadní substráty jsou po hydrolyze využitelné pro produkci kyseliny mléčné. Experimenty bylo potvrzeno, že v jednotlivých hydrolyzátech před fermentací byla nutná úprava pH. Pozitivním faktem je, že jednotlivé hydrolyzáty sloužily jako substrát pro produkci kyseliny mléčné, ačkoliv nebyly přidány žádné další živiny. Tento fakt je velmi podstatný vzhledem k tomu, že bakterie mléčného kvašení jsou známy poměrně vysokými nároky na aminokyseliny, vitamíny a další komplexní živiny vyskytující se ve fermentačním médiu [12][51].

V Tabulce 4 byly porovnány jednotlivé odpadní substráty z hlediska množství vzniklé kyseliny mléčné, výtěžnostních koeficientů a produktivit. Vzhledem k tomu, že u většiny odpadních substrátů bylo nejvyšších koncentrací kyseliny mléčné dosaženo s použitím kmene *L. rhamnosus* CCM 1825, byly pro výsledné srovnání vybrány výsledky z kultivací právě tohoto kmene.

Tabulka 4: Porovnání výtěžnosti a produktivity kyseliny mléčné na jednotlivých odpadních substrátech

substrát	množství kyseliny mléčné (g·l ⁻¹)	Y _{P/S}	produktivita (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
kávová sedlina	10,79 ± 0,80	0,90	0,22
matolina	6,07 ± 0,38	0,90	0,13
odpadní pečivo	12,90 ± 0,51	0,86	0,27
pomerančové slupky	9,97 ± 1,25	0,53	0,21

Nejvyšší koncentrace a produktivity kyseliny mléčné bylo dosaženo na hydrolyzátu odpadního pečiva. Hlavním důvodem bude pravděpodobně to, že odpadní chléb obsahuje především glukosu. Ostatní vybrané substráty obsahují vedle glukosy i další sacharidy (galaktosu, manosu, arabinosu či fruktosu). Hlavní výhodou hydrolyzátu odpadního chleba je i obsah minerálních látek a živin, které mohou mít pozitivní vliv na růst a produkci vybraných mikroorganismů [31][52].

Ačkoliv byla produktivita největší na hydrolyzátu odpadního chleba, výtěžnostní koeficienty byly nejvyšší v případě hydrolyzátu kávové sedliny a matolin. Ačkoliv tyto substráty obsahují látky, které mohou inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, zdají se být také nadějnými odpadními zdroji pro produkci kyseliny mléčné [29][30][32].

4.3.3 Produkce kyseliny mléčné v bioreaktoru

Z důvodu optimalizace a zvýšení množství vyprodukované kyseliny mléčné byly provedeny také kultivace v bioreaktoru. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byl zvolen jako producent kmen *L. rhamnosus* CCM 1825. V případě hydrolyzátu kávové sedliny byly provedeny i kultivace dalších 2 kmenů (*B. coagulans* CCM 2658, *L. plantarum* CCM 7039). Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, tento kmen se jevil jako nejvhodnější producent z hlediska množství produktu vzniklého na jednotlivých hydrolyzátech odpadních substrátů, ale také z hlediska schopnosti produkovat čistou L(+) formu kyseliny mléčné.

Byly provedeny kultivace na hydrolyzátech pomerančových slupek, matolin, odpadního chleba a kávové sedliny. K jednotlivým hydrolyzáatům (kromě odpadního chleba) byl přidán kvasničný extrakt o koncentraci 3 g·l⁻¹. V případě hydrolyzátu odpadního chleba nebyl přídavek nutný vzhledem k jeho složení. Během kultivací bylo udržováno pH na hodnotě 6,5 postupným přidávkem 5 mol·l⁻¹ NaOH.

Byly porovnány výtěžky, výtěžnostní koeficienty a produktivita kyseliny mléčné získané kultivacemi kmene *L. rhamnosus* v bioreaktorech na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob (Tabulka 5). Nejvyšší výtěžek a produktivita kyseliny mléčné byla získána fermentací hydrolyzátu odpadního chleba. Tento výsledek je především z důvodu

vysokého obsahu fermentovatelných sacharidů ($74,73 \pm 2,53 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ glukosy) v tomto hydrolyzátu. Nejvyššího výtěžnostního koeficientu však bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny. Nejnižší produktivita a koncentrace kyseliny mléčné byla dosažena fermentací hydrolyzátu matolin, což vychází především z nízkého obsahu fermentovatelných sacharidů v tomto substrátu.

Tabulka 5: Produkce kyseliny mléčné na různých substrátech v bioreaktoru pomocí *L. rhamnosus* CCM 1825

druh substrátu	počáteční množství sacharidů ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	množství kyseliny mléčné ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	$Y_{P/S}$	produktivita ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
matoliny	$10,91 \pm 0,11$	$5,69 \pm 0,66$	0,54	0,12
pomerančové slupky	$58,30 \pm 1,08$	$27,20 \pm 1,72$	0,52	0,57
kávová sedlina	$36,09 \pm 0,09$	$26,26 \pm 0,65$	0,98	0,55
odpadní chléb	$74,73 \pm 2,53$	$48,97 \pm 1,83$	0,66	0,68

Získané výtěžky z vsádkových kultivací v bioreaktoru by mohly být dále navýšeny použitím přítokovaného (fed-batch) či kontinuálního procesu fermentace. Nicméně nejúčinnějším při produkci kyseliny mléčné by bylo využití membránově-recyklačního bioreaktoru, který by umožnil současné získávání kyseliny mléčné a recyklaci bakteriálních buněk, což by zvýšilo kapacitu a výtěžek při vyšších koncentracích biomasy a zabránilo by se inhibici procesu produktem [9][53].

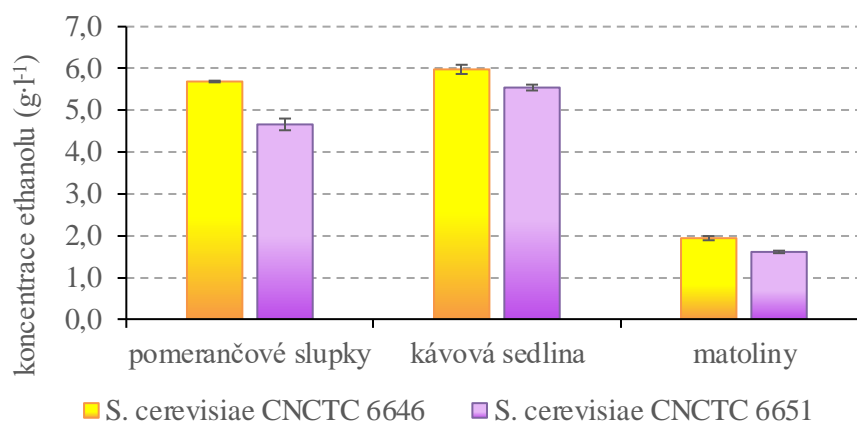
4.4 Produkce ethanolu

Tato kapitola se zabývala možností produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob, které byly vybrány i pro experimenty zabývajícími se utilizací těchto odpadů na kyselinu mléčnou. První část experimentů se věnovala kultivacím 2 vybraných kmenů rodu *Saccharomyces* v Erlenmeyerových baňkách na jednotlivých hydrolyzátech. Druhá část experimentů byla věnována produkci ethanolu v bioreaktoru použitím producenta a substrátu, kterým v předcházejících experimentech bylo dosaženo nejvyšší koncentrace ethanolu.

4.4.1 Produkce ethanolu v baňkách

Pro produkci ethanolu na vybraných odpadech byly testovány 2 kmeny *Saccharomyces cerevisiae*, a to CNCTC 6646 a CNCTC 6651. Jako substrát byly použity hydrolyzáty matolin, pomerančových slupek a kávové sedliny.

Porovnáním dosažených koncentrací ethanolu na jednotlivých hydrolyzátech (Graf 3) bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace ethanolu vyprodukoval kmen *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny.



Graf 3: Porovnání produkce ethanolu vybranými producenty na jednotlivých hydrolyzátech

Při srovnání použitých kmenů na jednotlivých hydrolyzátech lze pozorovat, že vyšší výtěžky ethanolu byly získány u kmene *S. cerevisiae* CNCTC 6646. Nicméně rozdíly v případě hydrolyzátů kávové sedliny a matolin nejsou příliš významné. V Tabulce 6 jsou kromě konkrétních hodnot dosažených koncentrací ethanolu uvedeny i výtěžnostní koeficienty a produktivity jednotlivých procesů.

Tabulka 6: Produktivita a koncentrace ethanolu na jednotlivých hydrolyzátech

Mikroorganismus/ substrát	množství ethanolu (g·l ⁻¹)	Množství spotřebovaných sacharidů (g·l ⁻¹)	Y _{P/S}	produktivita (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> CNCTC 6646				
pomerančové slupky	5,69 ± 0,02	46,30	0,12	0,12
kávová sedlina	5,98 ± 0,11	28,81	0,21	0,12
matolina	1,94 ± 0,05	5,77	0,34	0,04
<i>S. cerevisiae</i> CNCTC 6651				
pomerančové slupky	4,66 ± 0,14	48,15	0,10	0,10
kávová sedlina	5,54 ± 0,07	28,64	0,19	0,12
matolina	1,61 ± 0,03	6,20	0,26	0,03

Je patrné, že nejvyšší koncentrace ethanolu bylo dosaženo kmenem *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny. Tento substrát a producent byli proto dále vybráni pro kultivace v bioreaktoru. Nicméně nejvyššího výtěžnostního koeficientu bylo dosaženo stejným kmenem na hydrolyzátu matolin. Podobný jev, tedy nejvyšší výtěžnostní koeficient, byl pozorován také u druhého kmene na hydrolyzátu matolin. Důvod tohoto jevu není zcela jasný, nicméně výpočet výtěžnostního koeficientu nezohledňuje spotřebu sacharidů na růst mikroorganismu. U dalších substrátů, které obsahovaly vyšší počáteční koncentrace fermentovatelných sacharidů docházelo i k vyšší spotřebě, avšak dosažená koncentrace

ethanolu nedosahovala výrazně vyšších koncentrací. Lze tedy usuzovat, že v těchto substrátech byla využita část spotřebovaných sacharidů i na růst.

4.4.2 Produkce ethanolu v bioreaktoru

V závislosti na výsledcích uvedených v předešlé kapitole, byla provedena kultivace *S. cerevisiae* CNCTC 6646 v bioreaktoru na hydrolyzátu kávové sedliny.

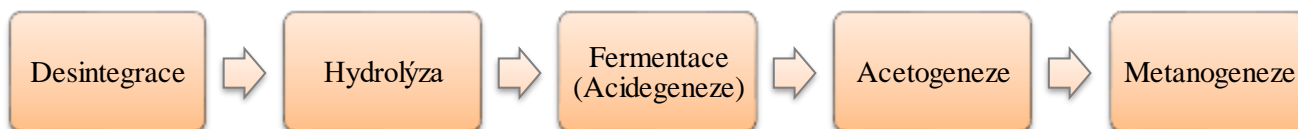
Fermentací na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru bylo dosaženo výtěžku $7,64 \pm 0,39 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ethanolu. Výtěžnostní koeficient činil $0,35 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ a produktivita v 48. hodině byla $0,16 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Porovnáním s výsledky dosaženými kultivacemi v baňkách, byla koncentrace ethanolu zvýšena o $1,66 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. Výtěžnostní koeficient se navýšil o $0,14 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ a produktivita o $0,04 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Bylo zjištěno, že výtěžnostní koeficient dosáhl maxima ve 48. hodině a produktivita byla nejvyšší ve 24. hodině.

Mussatto a kol. [54] uvádí výtěžek $11,7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ethanolu a výtěžnostní koeficient 0,26. Námi získané množství ethanolu bylo sice nižší, nicméně výtěžnostní koeficient byl vyšší. Rozdíl vzniklých koncentrací ethanolu může být způsoben i použitím rozdílného kmene *S. cerevisiae*. [55]

Podobně jako u produkce kyseliny mléčné by mohly být získané výtěžky ethanolu z vsádkových kultivací v bioreaktoru dále navýšeny použitím přítokovaného (fed-batch) či kontinuálního procesu fermentace. [55][56][57]

4.5 Mikroaerační podmínky pro zvýšení produkce organických kyselin

Tato část práce byla naměřena v rámci zahraniční stáže na ZHAW (Zurich University of Applied Sciences) ve Švýcarsku. V rámci této stáže byl zkoumán vliv různého množství přidaného kyslíku na zvýšení produkce organických kyselin během acidogenní fáze anaerobní digesce. Nalezením vhodného režimu vzdušnění vytvářejícím mikroaerobní podmínky by mělo docházet k inhibici nežádoucích mikroorganismů ve fázi acidogeneze a acetogeneze. Zároveň také dochází k inhibičnímu účinku na metanogenní mikroorganismy a zvýšení množství organických kyselin s krátkým řetězcem, především kyseliny octové. Přidáním menšího množství kyslíku do média může dojít ke zvýšení množství vyprodukovaného methanu během anaerobní digesce. *Gerritse a kol.* dokonce uvádí navýšení produkce methanu až o 20 % [17][58][59][60][61].



Obrázek 2: Fáze procesu anaerobní digesce lignocelulosových materiálů

Bylo zkoušeno několik režimů vzdušnění a přidaného kyslíku během vsádkové (batch) kultivace a následně s nejúčinnějším režimem vzdušnění bylo provedeno několik přítokovaných (fed-batch) a kontinuálních fermentací v modelovém bioreaktoru.

Tabulka 7: Celkové srovnání maximálních koncentrací organických kyselin dosažených během jednotlivých fermentací

proces	čas (h)	kyselina mléčná (g·l ⁻¹)	kyselina mravenčí (g·l ⁻¹)	kyselina octová (g·l ⁻¹)	kyselina propionová (g·l ⁻¹)	kyselina máselná (g·l ⁻¹)	kyselina valerová (g·l ⁻¹)
Batch 1	72	0,00	-	1,19	0,27	0,11	0,02
Batch 2	24	-	-	0,98	-	-	-
Batch 3	96	-	-	1,63	0,58	0,03	-
Batch 4	144	-	-	2,15	0,99	0,23	0,05
Fed-batch 5	24	0,01	-	0,51	0,04	0,11	-
Fed-batch 6	213	-	-	2,21	1,59	0,5	0,06
semi-kontinuální 7	49	-	-	0,99	0,69	0,10	0,03
kontinuální 8	125	-	-	1,36	0,64	0,16	-
kontinuální 9	45	-	-	1,05	0,51	0,19	-

Porovnáním vyprodukovaných maximálních koncentrací organických kyselin během jednotlivých procesů (Tabulka 7) bylo zjištěno, že nejúčinnějším procesem byl přítokovaný „fed-batch 6“. Vysoká výtěžnost tohoto procesu může být způsobena především dvojnásobnou koncentrací substrátu v médiu. Dále bylo zjištěno, že pro produkci organických kyselin byl nejvhodnější režim vzdušnění 81 minut pauza a 30 s vzdušnění. Při průtoku vzduchu 1 V (46,57 ml·min⁻¹ vzduchu ~ 0,44 mmol·min⁻¹ O₂) takové množství vzduchu by mělo odpovídat 30 ml kyslíku na 1 g biomasy. Takové množství kyslíku bylo definováno jako mikroaerobní i v publikaci od Sawatdeenarunat a kol. [19].

5 Závěr

Předložená disertační práce se zabývá především mikrobiální produkcí kyseliny mléčné a ethanolu s využitím odpadů z potravinářských výroby jako zdroje uhlíku. Pro experimenty byly vybrány odpady z produkce kávy (káвовá sedlina), odpady z produkce vína (matoliny) a odpady ze zpracování citrusových plodů (pomerančové slupky).

První část práce je věnována charakterizací vybraných substrátů, které byly podrobeny metodě NREL. Tato metoda je založena na principu kompletní hydrolyzy materiálu za účelem stanovení množství utilizovatelných sacharidů v daném materiálu. Dále byly stanovovány látky (například polyfenoly, anthokyanová barviva, furfural), které mohou působit inhibičně na růst mikroorganismů.

Po charakterizaci vybrané odpadní biomasy následovaly optimalizace hydrolyz. Jednotlivé odpadní substráty byly před hydrolyzami rozemlety (kromě káвовé sedliny), aby byly narušeny struktury přítomných polysacharidů. Následně byly zkoušeny různé kombinace fyzikálních (vysoká teplota), chemických (kyselá, bazická) a enzymatických typů hydrolyz. Bylo zjištěno, že u vybraných substrátů byl nejúčinnějším způsobem hydrolyzy účinek zředěné kyseliny sírové (2,7 hm.%) za vysoké teploty v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolyzou. Tato dvoustupňová hydrolyza byla nejúčinnější i vzhledem k tomu, že působení kyseliny za vysoké teploty způsobí rozrušení lignocelulosové struktury a zpřístupnění celulosy a hemicelulosy enzymům. Nejvyššího množství utilizovatelných sacharidů bylo dosaženo hydrolyzou v případě pomerančových slupek ($60,61 \pm 0,26 \text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$). Hydrolyzou káвовé sedliny bylo získáno $36,09 \pm 0,09 \text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$ a v případě matolin bylo získáno $10,91 \pm 0,11 \text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$.

Druhá část této práce byla věnována produkci kyseliny mléčné. Nejprve byly provedeny kultivace vybraných producentů kyseliny mléčné na syntetickém médiu (MRS) obsahujícím různé druhy sacharidů (glukosa, xylosa, manosa, arabinosa, celobiosa, galaktosa, pektin a laktosa), které se mohou vyskytovat v odpadní biomase. Pro produkci kyseliny mléčné bylo vybráno 7 bakteriálních kmenů (*Lactobacillus casei* CCM 4798, *Bacillus coagulans* CCM 2013, *Bacillus coagulans* CCM 2658, *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825^T, *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* CCM 7190, *Lactobacillus plantarum* CCM 7039^T a *Streptococcus thermophilus* CCM 4757). Během těchto kultivací byla zkoumána především schopnost růstu a utilizace jednotlivých zdrojů uhlíku.

Bylo ověřeno, že vybrané bakteriální kmeny byly schopny růstu a utilizace všech testovaných jednoduchých sacharidů. Z výsledků však bylo také patrné, že utilizace některých sacharidů (xylosy a arabinosy) byla pro vybrané kmeny obtížnější. Po kultivacích na syntetických médiích následovaly kultivace vybraných kmenů na jednotlivých hydrolyzáttech odpadních substrátů. Pro produkci kyseliny mléčné byl kromě hydrolyzátů káвовé sedliny,

pomerančových slupek a matolin použit i hydrolyzát odpadního chleba. Byly provedeny kultivace za dvou podmínek, a to při pH 7 a na hydrolyzátu bez úpravy pH. Hodnoty pH u hydrolyzátů byly: kávová sedlina 4,30; matoliny 3,75; pomerančové slupky 4,05 a odpadní chléb 6,50. Vzhledem k hodnotě pH hydrolyzátu odpadního chleba byly provedeny pouze kultivace bez úpravy pH.

Bylo zjištěno, že hydrolyzáty vybrané odpadní biomasy jsou utilizovatelné mléčnými bakteriemi a převedeny na kyselinu mléčnou. Vyšších výtěžků bylo dosaženo v hydrolyzáttech s upraveným pH. Bylo dosaženo poměrně dobrých výtěžností, ačkoliv hydrolyzáty nebyly obohaceny o další živiny. Tento fakt je velmi podstatný vzhledem k tomu, že bakterie mléčného kvašení jsou známy poměrně vysokými nároky na aminokyseliny, vitamíny a další komplexní živiny vyskytujícími se ve fermentačním médiu. Nejvyšších koncentrací kyseliny mléčné bylo skoro u všech hydrolyzátů dosaženo kmenem *L. rhamnosus* CCM 1825. Pouze v případě hydrolyzátu odpadního chleba bylo nejvyššího výtěžku dosaženo kmenem *B. coagulans* CCM 2658.

Porovnáním výtěžků kyseliny mléčné získaných kmenem *L. rhamnosus* na jednotlivých substrátech bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace a produktivity kyseliny mléčné bylo dosaženo na hydrolyzátu odpadního chleba ($12,90 \pm 0,51 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Hlavním důvodem bude pravděpodobně to, že hydrolyzát odpadního chleba obsahuje především glukosu. Ostatní vybrané substráty obsahují vedle glukosy i další sacharidy (galaktosu, manosu, arabinosu či fruktosu). Hlavní výhodou hydrolyzátu odpadního chleba je i obsah minerálních látek a živin, které mohou mít pozitivní vliv na růst a produkci vybraných mikroorganismů. Nicméně vyšších výtěžnostních koeficientů bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny a matolin. Ačkoliv tyto substráty obsahují látky, které mohou inhibovat růst bakterií mléčného kvašení, zdají se být také nadějnými pro produkci kyseliny mléčné.

Z důvodu optimalizace a zvýšení množství vyprodukované kyseliny mléčné byly provedeny také kultivace v bioreaktoru. Pro produkci kyseliny mléčné v bioreaktoru byl zvolen jako produkční kmen *L. rhamnosus* CCM 1825. Ten byl vybrán s ohledem na skutečnost, že na jednotlivých hydrolyzáttech produkoval nejvyšší množství kyseliny mléčné, ale také z důvodu jeho schopnosti produkovat čistou L(+) formu kyseliny mléčné. Byly provedeny kultivace na hydrolyzáttech pomerančových slupek, matolin, odpadního chleba a kávové sedliny, které byly obohaceny (kromě odpadního chleba) o $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kvasničného extraktu. V případě hydrozátu odpadního chleba nebyl přídavek nutný vzhledem k jeho složení.

Více pozornosti bylo věnováno zkoumání utilizace hydrolyzátu kávové sedliny, kde bylo provedeno více experimentů v bioreaktorech. Byl fermentován jednak hydrolyzát bez suplementace kvasničným extraktem, poté hydrolyzát obohacen o $3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ kvasničného extraktu

a syntetické médium s obsahem sacharidů podobným hydrolyzátu kávové sedliny, aby byl zjištěn efekt inhibitorů na použitý produkční kmen. Byly také provedeny kultivace v bioreaktoru i s pomocí dalších producentů (*B. coagulans* CCM 2658, *L. plantarum* CCM 7039).

Porovnáním výtěžků kyseliny mléčné získané kmenem *L. rhamnosus* na jednotlivých hydrolyzátech odpadní biomasy bylo zjištěno, že nejvyšší výtěžek a produktivita kyseliny mléčné byla získána fermentací hydrolyzátu odpadního chleba. Hlavním důvodem je především poměrně vysoký obsah fermentovatelných sacharidů ($74,73 \pm 2,53 \text{ g l}^{-1}$ glukosy) v tomto hydrolyzátu. Nejvyššího výtěžnostního koeficientu ($0,98 \text{ g g}^{-1}$) však bylo dosaženo v případě hydrolyzátu kávové sedliny. Nejnižší produktivita a koncentrace kyseliny mléčné byla dosažena fermentací hydrolyzátu matolin ($5,69 \pm 0,66 \text{ g l}^{-1}$), což vychází především z nízkého obsahu fermentovatelných sacharidů ($10,91 \pm 0,11 \text{ g l}^{-1}$) v tomto substrátu.

Srovnáním produkce kyseliny mléčné na hydrolyzátu kávové sedliny se suplementací kvasničným extraktem a bez ní bylo dosaženo velmi podobných výtěžků. Lze tedy konstatovat, že suplementace kultivačního média kvasničným extraktem není nutná k dosažení vyššího množství kyseliny mléčné. V rámci celkového ekonomického vyhodnocení procesu by se tedy muselo zvážit, zda náklady vzniklé přidáním kvasničného extraktu mohou být kompenzovány zkrácením doby fermentace. Porovnáním s kultivací na syntetickém médiu s podobným sacharidickým složením jako hydrolyzát kávové sedliny lze usuzovat, že přítomnost inhibitorů v hydrolyzátu kávové sedliny nemá negativní vliv na výtěžnost kyseliny mléčné, jelikož dosažené koncentrace kyseliny mléčné a stejně tak i výtěžnostní koeficienty jsou srovnatelné. Nicméně lze předpokládat, že použitím vhodných detoxifikačních metod pro odstranění inhibičních látek z hydrolyzátu kávové sedliny, by se mohla zkrátit doba fermentace.

Třetí část této práce se zabývá možností produkce ethanolu na hydrolyzátech vybraných odpadů z potravinářských výrob. Nejprve byly provedeny kultivace 2 vybraných kmenů (*S. cerevisiae* CNCTC 6646 a *S. cerevisiae* CNCTC 6651) v Erlenmeyerových baňkách na jednotlivých hydrolyzátech. Následně byla provedena produkce ethanolu na hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru pomocí *S. cerevisiae* CNCTC 6646.

Kultivacemi v baňkách bylo zjištěno, že nejvyšší koncentrace ethanolu bylo dosaženo u kmene *S. cerevisiae* CNCTC 6646 na hydrolyzátu kávové sedliny ($5,98 \pm 0,11 \text{ g l}^{-1}$). Tento substrát a producent byli proto dále vybráni pro kultivace v bioreaktoru. Fermentací hydrolyzátu kávové sedliny v bioreaktoru bylo dosaženo výtěžku $7,64 \pm 0,39 \text{ g l}^{-1}$ ethanolu.

Závěrečná část předložené práce se věnuje zkoumání vlivu přidaného kyslíku na zvýšení produkce organických kyselin během acidogenní fáze anaerobní digesce. Nalezením vhodného režimu vzdušnění vytvářejícím mikroaerobní podmínky by mělo docházet

k navýšení produkce organických kyselin s krátkým řetězcem (především kyseliny octové) během acidogenní fáze anaerobní digesce. Bylo provedeno několik experimentů v modelovém bioreaktoru s různými režimy vzdušnění a různými procesy fermentace (vsádkové, přítokované a kontinuální).

Bylo zjištěno, že nejúčinnějším procesem byl přítokovaný způsob fermentace s režimem vzdušnění 30 s a 81 minut pauza, kdy bylo získáno 4,36 g·l⁻¹ organických kyselin, z toho 2,21 g·l⁻¹ tvořila kyselina octová. Vysoká výtěžnost tohoto procesu byla pravděpodobně způsobena dvojnásobnou koncentrací substrátu v médiu (2 hm. %). Během tohoto režimu vzdušnění bylo přidáno cca 30 ml kyslíku na 1 g biomasy, což lze pokládat za anaerobní podmínky.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ČR. 2001. Zákon o odpadech: č. 185/2001. In: Sbíрка zákonů.
- [2] *Směrnice Evropského Parlamentu A Rady (ES) č. 98/2008*. 2008. In: Štrasburk: Evropský parlament, 98.
- [3] Mirabella, N., Castellani, V. a Sala, S. 2014. Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28-41.
- [4] Van Dyk, J.S., R. Gama, D. Morrison, S. Swart a B.I. Pletschke. 2013. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26, 521-531. ISSN 1364-0321
- [5] Castillo Martinez, F., Balciunas, E., Salgado, J., Domínguez González, J., Converti, A. & Oliveira, R.. 2013. Lactic acid properties, applications and production. *Trends in Food Science*, 30 (1), 70-83.
- [6] Ding, S. a Tan, T.. 2006. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41 (6), 1451-1454.
- [7] Siracusa, V. a Ingrao, C.. 2016. The Use of Polylactic Acid in Food Packaging, *Reference Module in Food Science*, Elsevier, ISBN 978-0-0810-0596-5
- [8] Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y. & Sonomoto, K.. 2011. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 56(4), 286-301.
- [9] Abdel-Rahman, M., Mohamed A., Tashiro, Y. a Sonomoto, K.. 2013. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31, 877-902.
- [10] Wee, Y., Kim, J. a Ryu, H. 2006. Biotechnological Production of Lactic Acid. *Food technology and biotechnology*, 44 (2). ISSN 1330-9862.
- [11] Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.A. a Gruss, A. 2012. Aerobic Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual review Food science and technology*. 3, 37-58.
- [12] Mozzi, F. 2016 Lactic Acid Bacteria, In *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 501-508, ISBN 9780123849533.
- [13] Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y. & Tan, T.. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-88.
- [14] Hromádko, J., P. Miler, V. Hönig, And P. Štěřba. 2011. Využití bioethanolu jako paliva

- ve spalovacích motorech. *Chemické listy*, 105(2), 122-128.
- [15] Balat, M., 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875.
- [16] Hromádko, J., Hromádko, J., Miller, P., Hönic, V. a Štěrbá, P. 2010. Výroba bioetanolu. *Listy lihovarnické a řepářské*, 126.
- [17] Botheju, D. a Bakke, R., 2011. Oxygen Effects in Anaerobic Digestion – A Review. *The Open Waste Management Journal*, 4, 1-19.
- [18] EBA, 2014. Biogas Production in Europe: Biogas Report 2014.
- [19] Sawatdeenarunat, Ch., Sung, S. a Khanal, S. K. 2017. Enhanced volatile fatty acids production during anaerobic digestion of lignocellulosic biomass via micro-oxygenation. *Bioresource Technology*, 237, 139-145.
- [20] Agler, M.T., Wrenn, B.A., Zinder, S.H., Angenent, L.T., 2011. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures: the carboxylate platform. *Trends Biotechnology*, 29, 70–78.
- [21] Yu, J., 2001. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 86, 105–112.
- [22] Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., Ngoh, G.C., 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*, 235, 83–99.
- [23] Fontanille, P., Kumar, V., Christophe, G., Nouaille, R., Larroche, C., 2012. Bioconversion of volatile fatty acids into lipids by the oleaginous yeast *yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology*, 114, 443–449.
- [24] Chae, K.J., Choi, M.J., Kim, K.Y., Ajayi, F.F., Chang, I.S., Kim, I.S., 2010. Selective inhibition of methanogens for the improvement of biohydrogen production in microbial electrolysis cells. *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 13379–13386.
- [25] Khanal, S.K., Chen, W.-H., Li, L., Sung, S., 2006. Biohydrogen production in continuous-flow reactor using mixed microbial culture. *Water Environment research*, 78, 110–117.
- [26] Zhu, H., Béland, M., 2006. Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge. *Int. J. Hydrogen Energy*. 31, 1980–1988.
- [27] Petrik, S., Obruča, S., Benešová, P., Márová, I., 2014. Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical Engineering Journal*. 90, 307-315.

- [28] Ballesteros, Lina F., Teixeira, J.A., a Mussatto, S.I. 2014. Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food Bioprocess Technology*. 7, 3493–3503.
- [29] Deisy, H.-H., Pintado, C., Rotger, R. a Goñi, I. 2009. Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International Journal of Food Microbiology*. 136(1), 119-122.
- [30] García-Ruiz, Almudena, M. Victoria Moreno-Arribas, Pedro J. Martín-Álvarez A Begoña Bartolomé, 2011. Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 145(2-3), 426-431.
- [31] Kendall, R. S., Yves S.Y. HSIEH, Natalie S. BETTS, et al, 2015. Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol: Chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource Technology*. 193, 76–83.
- [32] Rapeanu, G., Bahrim, G., Stanciuc, N. 2014. Chapter 38 - Microorganism Metabolic Activity Stimulation by Polyphenols, Editor(s): Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, Sherma Zibadi, *Polyphenols in Human Health and Disease*, Academic Press, 513-521, ISBN 9780123984562.
- [33] Pedras, B., Salema-Oom, M., Sá-Nogueira, I., Simões, P., Paiva, A. a Barreiros, S. 2017. Valorization of white wine grape pomace through application of subcritical water: Analysis of extraction, hydrolysis, and biological activity of the extracts obtained. *The Journal of Supercritical Fluids*. 128, 138-144.
- [34] Mamma, Diomi, Elisavet Kourtoglou A Paul Christakopoulos, 2008. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource Technology*. 99(7), 2373–2383.
- [35] Rezzadori, K., S. Benedetti A E.R. Amante, 2012. Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products. *Food and Bioproducts Processing*. 90(4), 606–614.
- [36] Oberoi, Harinder Singh, Praveen Venkata Vadlani, Ronald L. Madl, Lavudi Saida A Jithma P. Abeykoon, 2010. Ethanol Production from Orange Peels: Two-Stage Hydrolysis and Fermentation Studies Using Optimized Parameters through Experimental Design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(6), 3422–3429.
- [37] Chiaramonti, David, Matteo Prussi, Simone Ferrero, Luis Oriani, Piero Ottonello, Paolo Torre a Francesco Cherchi, 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 46, 25-35.

- [38] Kumari, Dolly a Radhika Singh, 2018. Pretreatment of lignocellulosic wastes for biofuel production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 90, 877-891.
- [39] Seidl, Peter R. a Adriana K. Goulart, 2016. Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2, 48-53.
- [40] Taherzadeh, Mohammad a Keikhosro Karimi, 2008. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9(9), 1621-1651.
- [41] Viscozyme L, 2018. *Sigma Aldrich* [online]. Darmstadt, Germany: Merck [cit. 2018-07-31]. Dostupné z: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/v2010?lang=en&ion=CZ
- [42] Hassan, Shady S., Gwilym A. Williams A Amit K. Jaiswal, 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 262, 310-318.
- [43] Zhang, Zhenting, Yuejiao Xie, Xiaolan He, et al., 2016. Comparison of high-titer lactic acid fermentation from NaOH- and NH₃-H₂O₂-pretreated corncob by *Bacillus coagulans* using simultaneous saccharification and fermentation. *Scientific reports*. 6, 37245.
- [44] Jönsson, Leif J. a Carlos Martín, 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 199, 103-112. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.009. ISBN 0960-8524.
- [45] Ma, K. et al. 2014. Open fermentative production of l-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. *Bioresource Technology*. 151, 28-35.
- [46] Büyükkileci, A. O., & Harsa, S. 2004. Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Chemical Technology*. 79(9), 1036e1040.
- [47] Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105(1), 1-14.
- [48] Rosario Muñoz, M. Victoria Moreno-Arribas, Blanca de las Rivas, 2011. Chapter 8 - Lactic Acid Bacteria, Editoři: Alfonso V. Carrascosa, Rosario Muñoz, Ramón González, *Molecular Wine Microbiology*, Academic Press, 191-226, ISBN 9780123750211
- [49] Hofvendahl, K. & Hahn-Hägerdal, B.. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2-4), 87-107.

- [50] Wang, Y., Li, Y., Pei, X., Yu, L, Feng, Y., 2007. Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. *Journal of Biotechnology*. 129(3), 510-515.
- [51] Yadav, A.K., Chaudhari, A.B., Kothari, R.M. 2011. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: An industrial view. *Crit Rev Biotechnol*. 31, 1-19.
- [52] Benabda, Olfa, Mariam Kasmi, Faten Kachouri a Moktar Hamdi, 2018. Valorization of the powdered bread waste hydrolysate as growth medium for baker yeast. *Food and Bioproducts Processing*. 109, 1-8.
- [53] Eş, Ismail, Amin Mousavi Khaneghah, Francisco J. Barba, Jorge A. Saraiva, Anderson S. Sant'ana a Seyed Mohammad Bagher Hashemi, 2018. Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International*. 107, 763-770.
- [54] Mussatto, S.I., Machado, E.M.S., Carneiro, L.M., Teixeira, J.A.. 2012. Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, *Applied Energy*, 92, 763–768.
- [55] Mohd Azhar, Siti Hajar, Rahmath Abdulla, Siti Azmah Jambo, Hartinie Marbawi, Jualang Azlan Gansau, Ainol Azifa Mohd Faik a Kenneth Francis Rodrigues, 2017. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10, 52-61.
- [56] Cheng, N.G., Hasan, M. and Kumoro, A.C., 2009. Production of ethanol by fed-batch fermentation. *Pertanika Journal of Science and Technology*, 17, 399-408.
- [57] SÁNCHEZ, Óscar J. a Carlos A. CARDONA, 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99, 5270–5295.
- [58] Pirt, S. J., Lee, Y. K., 1983. Enhancement of methanogenesis by traces of oxygen in bacterial digestion of biomass. *FEMS Microiology Letters*. 18, 61-63.
- [59] Gerritse, J., Schut, F., Gottschal, J. C., 1990. Mixed chemostat cultures of obligately aerobic and fermentative or methanogenic bacteria grown under oxygen-limiting conditions. *FEMS Microiology Letters*, 66, 87-94.
- [60] Fu, Shan-Fei, Shuai He, Xiao-Shuang Shi, Naveen Reddy Katukuri, Meng Dai A Rong-Bo Guo, 2015. The chemical properties and microbial community characterization of the thermophilic microaerobic pretreatment process. *Bioresource Technology*. 198, 497-502.
- [61] Charles, W., Walker, L., Cord-Ruwisch, R., 2009. Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste. *Bioresource Technology*. 100, 2329–2335.

PUBLIKACE A VÝSTUPY V RÁMCI STUDIA

Publikace v impaktovaném časopisu

1. HUDEČKOVÁ, H.; NEUREITER, M.; OBRUČA, S.; FRÜHAUF, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into lactic acid. *Letters In Applied Microbiology*, 66 (4), 306-312. ISSN: 0266-8254

Publikace v recenzovaných časopisech

2. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2017. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Bread before Fermentation. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65 (1), 35-40. ISSN: 1211-8516.
3. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L. 2015. Lactic acid production from waste bread. *Czech Chemical Society Symposium Series*. 13(2), 73-75. ISSN: 2336-7210.

Plné texty příspěvků a abstrakty z konferencí

1. HUDEČKOVÁ, H.; KECSKÉSOVÁ, V.; OBRUČA, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Utilization of spent coffee grounds by *Lactobacillus plantarum*. Študentská Vedecká Konference Prif Uk 2018 - Zborník Recenzovaných Príspevkov. s. 237-241. ISBN: 978-80-223-4517-0. – prezentace v anglickém jazyce
2. HUDEČKOVÁ, H.; NEUREITER, M.; OBRUČA, S.; FRUHAUF, S.; MÁROVÁ, I. 2018. Utilisation of spent coffee grounds into lactic acid. ICTB Mikulov 2018 – sborník příspěvků. - poster
3. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L.; MÁROVÁ, I. 2017. Utilization of food waste for lactic acid production. *Book of Abstracts – Biotech 2017*. s. 179. ISBN: 978-80-7080-989-1. - poster
4. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L.; MÁROVÁ, I. 2016. Utilization of grape pomace for lactic acid production. *Book of Abstracts – 8th Central European Conference “Chemistry towards Biology“*. s. 107-107. ISBN: 978-80-7305-777-0. - poster
5. HUDEČKOVÁ, H.; MYSLIVCOVÁ, P.; BABÁK, L. 2015. Porovnání účinnosti chemické, fyzikální a enzymatické hydrolyzy odpadního pečiva. *Študentská vědecká konference 2015*. s. 150. ISBN: 978-80-7464-741-3. - přednáška
6. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2015. Production of bioethanol from waste bread. *Book of abstracts – CEITEC PhD retreat*. Brno: Masaryk university. s. 51-51. ISBN: 978-80-210-7825-3. - poster
7. HUDEČKOVÁ, H.; BABÁK, L. 2015. Lactic acid production from waste bread. *Chemistry and life 2015 - Book of abstracts*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of chemistry. s. 33-34. ISBN: 978-80-214-5228-2. - poster
8. HUDEČKOVÁ, H.; ŠUPINOVÁ, P.; BABÁK, L. 2014. Use high-performance liquid chromatography for determination of saccharides after the enzymatic hydrolysis of waste bread. *CECE 2014 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis*. Ústav analytické chemie AV ČR, s. 252-255. ISBN: 978-80-904959-2-0. - poster

ŽIVOTOPIS

Osobní informace

Jméno: Helena Hudečková
Trvalé bydliště: Proskovická 664/65, 70030 Ostrava
Datum narození: 5. 11. 1989

Vzdělání

2014 – současnost Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie
2012 – 2014 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Potravinářská chemie a biotechnologie, dosažený titul Ing., téma diplomové práce: Studie možnosti využití odpadního pečiva k bioprodukcí vybraných metabolitů
2009 – 2012 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, program Chemie a technologie potravin, obor Biotechnologie, dosažený titul Bc., téma bakalářské práce: Studium růstových a metabolických vlastností vybraných mikroorganismů
2005 – 2009 Matiční gymnázium v Ostravě, maturitní zkouška: český jazyk, anglický jazyk, chemie, fyzika

Pracovní zkušenosti

11/2015 – 12/2015 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, vědecko-technický pracovník - laboratoř biotechnologií a biomateriálů
2/2016 – 9/2016 Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Centrum materiálového výzkumu, Ph.D. student - laboratoř biotechnologií a biomateriálů

Zahraniční stáže

10/2016 – 12/2016 University of Natural Resources and Life sciences (BOKU); Department of Agrobiotechnology, Institute of Environmental Biotechnology; Tulln, Austria
Náplň práce: Optimalizace fermentací kyseliny mléčné na odpadní kávu
2/2017 – 8/2017 Zurich University of Applied Sciences (ZHAW); Department of life sciences and facility management, Institute of Chemistry and Biotechnology; Wädensville, Switzerland
Náplň práce: spolupráce na projektu *Microaerobic pretreatment of Fibrous Materials for biogas production*

Pedagogická činnost

2014/2015 zimní semestr – Praktikum z bioinženýrství
2017/2018 zimní semestr – Praktikum z instrumentální a strukturní analýzy UCHPBT