



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**IZOLACE ANTIBAKTERIÁLNÍCH SLOUČENIN Z KÁVOVÉ
SEDLINY**

ISOLATION OF ANTIMICROBIAL COMPOUNDS FROM SPENT COFFEE GROUNDS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Pavlína Kurzová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1440/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Pavlína Kurzová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Izolace antibakteriálních sloučenin z kávové sedliny

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše zaměřená na dané téma.
2. Stanovení antioxidační a antimikrobiální aktivity u fenolických extraktů z kávové sedliny.
3. Modifikace kávové sedliny alkoholickým kvašením a určení antimikrobiální aktivity získaných látek.

Termín odevzdání diplomové práce: 31.7.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Pavlína Kurzová
student(ka)

doc. Ing. Adriána Kovalčík, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Kávová sedlina patří mezi velmi hodnotné lignocelulózové odpady, které by bylo možné zpracovat a využít na izolaci fenolických látek. Mnoho fenolických látek izolovaných z lignocelulózových odpadů má antimikrobiální vlastnosti. Cílem této diplomové práce bylo izolovat fenolické látky s extraktu kávové sedliny a stanovit jejich antimikrobiální vlastnosti. Tyto fenolické látky by extrahované dvěma způsoby, extrakci do rozpouštědla (hexan, 75% ethanol, 70% aceton, diethyl éther, a ethyl acetát kyseliny octové) nebo uvolněním pomocí alkoholického kvašení. Všechny izolované vzorky byly charakterizované z hlediska obsahu redukujících cukrů, polyfenolů a flavonoidů. Následně byla posouzena jejich antimikrobiální aktivita použitím agarové difúzní a bujonové diluční metody. Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity jak zástupci bakterií, tak kvasinek. Z bakterií byly vybrány dva druhy gram-pozitivních bakterií, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* a jeden druh gram-negativních a to *Serratia marcescens*. Z kvasinek byly vybrány druhy *Candida glabrata* a *Saccharomyces cerevisiae*.

Pro identifikaci fenolických látek v extraktech byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Při testech antimikrobiální aktivity fenolických extraktů byl jako nejúčinnější vyhodnocen extrakt kávové sedliny 70% acetonem, ve kterém byly, dle kapalinové chromatografie, identifikovány kyseliny chlorgenová, gallová, kávová a kumarová. Nejméně účinným pak extrakt ethyl acetátem. Následně byly fenolické extrakty lyofilizovány a testovány na antimikrobiální aktivitu. U lyofilizovaných vzorků byl jako neúčinnější inhibitor růst mikroorganismů vyhodnocen extrakt kávové sedliny 70 % ethanolem s obsahem kyselin chlorgenové, gallové a kávové.

Fermentací kávové sedliny byly izolovány vzorky s obsahem fenolických látek. Stanovením antimikrobiální aktivity těchto vzorků bylo zjištěno, že všechny vzorky mají velmi dobrý inhibiční účinek pro růst bakterií. Nefiltrované vzorky prokázaly i antimykotické vlastnosti. Ve filtrovaných i nefiltrovaných vzorcích izolovaných fermentací kávové sedliny byly identifikovány kyseliny chlorgenová, kávová a gallová.

Klíčová slova:

Káva, Kávová sedlina (SCG), antimikrobiální aktivita, polyfenoly, flavonoidy

ABSTRAKT

Coffee grounds are one of the very valuable lignocellulosic wastes that have been able to be processed and used for isolated phenolic substances. Many phenolic substances isolated from lignocellulosic wastes have antimicrobial properties.

Aim of this thesis is isolation phenolic substances from spent coffee grounds extract and their available antimicrobial properties. Two isolation ways were applied to receive phenolic substances from spent coffee grounds: 1) solvent extraction (hexane, 75% ethanol, 70% acetone, diethyl ether, and ethyl acetate) and 2) release of active substances by alcoholic fermentation. All isolated materials were characterized by the viewpoint of concentration of reducing sugars, polyphenols and flavonoids. Subsequently, their antimicrobial activity was determined by using agar diffusion and broth dilution methods. Two gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus*), one gram-negative bacteria (*Serratia marcescens*) and two yeasts (*Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*) were used for antimicrobial testing.

High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to identify phenolic substances in the extracts.

First, the results showed that the isolated sample with the highest antimicrobial activity was 70% acetone extract. This extract contained chlorogenic acid, gallic acid, caffeic acid and coumaric acid according to HPLC. The ethyl acetate extract showed the lowest antimicrobial activity. Second, after lyophilization, the isolated materials also revealed high antimicrobial activity. The highest antimicrobial activity displayed the materials obtained by the extraction with 70% ethanol. This sample contained chlorogenic acid, gallic acid and caffeic acids.

Next, samples with phenolic compounds were obtained by the alcoholic fermentation of spent coffee grounds. These samples showed similarly to the previous solution extracts significant antimicrobial activity. Interestingly, the unfiltered samples received directly after alcoholic fermentation also showed antifungal properties. The characterization of phenolic compounds by HPLC showed similarly as in previous examples that chlorogenic, caffeic and gallic acids were present in these samples.

Key words:

Coffee, Spent coffee ground, antimicrobial activity, polyphenols, flavonoids

KURZOVÁ, Pavlína. *Izolace antibakteriálních sloučenin z kávové sedliny*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123783> Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Adriána Kovalčík.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce, paní doc. Ing. Adriáně Kovalčík, Ph.D. za vedení, cenné rady, ochotu a vstřícný přístup při řešení problematiky diplomové práce. Dále pak Ing. Petře Matouškové, Ph.D. a Ing. Martinu Szotkowskému za pomoc s analytickými metodami. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, partnerovi a blízkým přátelům za podporu při práci a během celého studia na vysoké škole.

Obsah

Úvod.....	8
1 Teoretická část.....	10
1.1 Káva	10
1.1.1 Druhy kávovníku.....	11
1.2 Technologie zpracování kávy.....	11
1.2.1 Mokrý způsob	12
1.2.2 Suchý způsob	12
1.2.3 Pražení kávy.....	13
1.3 Odpadní produkty technologie zpracování kávy	13
1.3.1 Využití odpadních produktů kávového průmyslu.....	14
1.4 Kávová sedlina	14
1.4.1 Chemické složení kávové sedliny	15
1.4.2 Zpracování kávové sedliny	20
1.4.3 Využití kávové sedliny.....	21
2 Cíl práce	25
3 Experimentální část.....	26
3.1 Použité mikrorganismy, chemikálie a přístroje.....	26
3.1.1 Kávová sedlina.....	26
3.1.2 Použité mikroorganismy.....	26
3.1.3 Použité chemikálie	27
3.1.4 Laboratorní přístroje a pomůcky.....	28
3.2 Použité metody	28
3.2.1 Kultivace mikroorganismů	28
3.2.2 Příprava fenolických extraktů.....	30

3.2.3	Stanovení základních charakteristik fenolických extraktů	31
3.2.4	Fermentace kávové sedliny pomocí <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.2.5	Stanovení antimikrobiální aktivity	34
3.2.6	Stanovení základních charakteristik pomocí HPLC	35
4	Výsledky a diskuze	37
4.1	Fenolické extrakty	37
4.1.1	Stanovení základních charakteristik fenolických extraktů	37
4.1.2	Stanovení antimikrobiální aktivity fenolických extraktů	40
4.1.3	Identifikace fenolických látek pomocí HPLC	49
4.2	Fermentace kávové sedliny	50
4.2.1	Stanovení antimikrobiální aktivity	50
4.2.2	Identifikace fenolických látek pomocí HPLC	57
5	Závěr	60
6	Použitá literatura	62
7	Použité zkratky	70

ÚVOD

Káva se, díky své chuti, příjemnému aroma a povzbuzujícím účinkům stala jedním z nejpobulárnějších nápojů současnosti. Pěstování kávy je lokalizováno v oblastech s příznivým klimatem, které je především v Brazílii, Kolumbii, Etiopii, Indonésii, Indii či ve Vietnamu. Existuje několik druhů kávovníků a jejich plody lze zpracovávat různými způsoby, čím vzniká spousta variací. V současné době existuje mnoho přísad, které můžeme do kávy přidat a mnoho možností přípravy tohoto nápoje včetně bezkofeinové varianty. [1]

Pití kvalitní kávy bývá označováno za zdraví prospěšné. Pravidelní konzumenti kávy mají, dle studií, nižší pravděpodobnost výskytu cukrovky obou typů, žlučnickových a ledvinových kamenů i Parkinsonovy choroby. Konzumace kávy je spojena i s nižší úmrtností i výskytem rakoviny, především rakoviny tlustého střeva, kůže a jater. Dále je prokázán pozitivní vliv kávy na jaterní obtíže jako jaterní fibrózu, cirhózu a chronického onemocnění jater. Pozitivní vliv má konzumace kávy i na snížení výskytu kardiovaskulárního onemocnění. Pravidelná konzumace kávy má souvislost i s psychickým zdravím člověka, kdy je statisticky dokázaná souvislost s nižším výskytem depresí i Alzheimerovy choroby. Káva má však i negativní účinky při konzumaci především v těhotenství, kdy je její konzumace nebývá doporučována především v souvislosti s nízkou porodní hmotností, předčasnými porody i potraty či akutní dětskou leukémií. Prokázanou vlastností kávy je i její dehydratace konzumenta, proto je nutné kávu zapíjet vodou. [2]

V české republice je, dle statistik, průměrná konzumace kávy 1,2 šálků denně na osobu. Při zpracování kávy však vzniká i velké množství odpadních produktů, se kterými lze jen obtížně dále pracovat. Nejvýznamnějším odpadem je kávová sedlina. Na 1 tunu zelené kávy připadá až 650 kg kávové sedliny. Tento pevný podíl kávy vzniká i při výrobě instantní kávy, která tvoří zhruba poloviční produkci ve světovém měřítku. [3] [4]

Vzhledem k vysokému množství produkce odpadu kávové sedliny, je právě její zpracování aktuální tématikou. Kávová sedlina je složena z polysacharidů, oligosacharidů, lipidů, alifatických kyselin, melanoidů a těkavých sloučenin. Díky svému složení jsou atraktivní její funkční vlastnosti jako kapacita zadržování vody, zadržování oleje, stabilita a antioxidační potenciál. Vzhledem k její výživové hodnotě, lze využít jako doplněk v krmivech pro zvířata, avšak fenolové látky a kofein jsou vstřebatelné jen při nízké koncentraci. Dále se kávová sedlina často v domácnostech využívá jako půdní hnojivo. Fenolické látky a kofein jsou ve větší koncentraci toxické jak pro zvířata, tak i pro rostliny. Dle studií vyplývá, že podrobení kávové sedliny procesu kompostování před jeho aplikací, je možný způsob jak snížit její toxicitu. [4] Další z možností zpracování pevného podílu kávové sedliny je vysušení a následné využití jako topiva. [4]

Jednou ze zpracovatelských metod, která zvyšuje použitelnost kávové sedliny, je bio-rafinace. Touto metodou se zabývá Institut chemie potravin a biotechnologií, na Fakultě Chemické, VUT v Brně. Tahle diplomová práce se zabývá jednou linií takové bio-rafinace. Principiálně při zpracování dochází k uvolnění olejové a hydrofilní frakce kávové sedliny.

Hydrofilní část se dále upravuje například pomocí procesu hydrolýzy, tím se získají redukující cukry k fermentaci různých mikroorganismů, např. bakterií pro produkci polyhydroxyalkanoátů. Další možností využití je esterifikace a transesterifikace pro produkci bio- dieselu. Izolované fenolické extrakty kávové sedliny lze využít jako antioxidanty, protizánětlivé přísady či absorbéry těžkých kovů. Sacharidy přítomné v kávové sedlině jsou cenným zdrojem uhlíku pro biotechnologickou produkci polyhydroxyalkanoátů, karotenoidů a bioethanolu. [4]

Dle současných studií je zřejmé, že použití kávové sedliny má velké množství využití. Díky své dostupnosti a množství, jako odpadního produktu, by při biotechnologických procesech mohla být velmi cennou surovinou. [4]

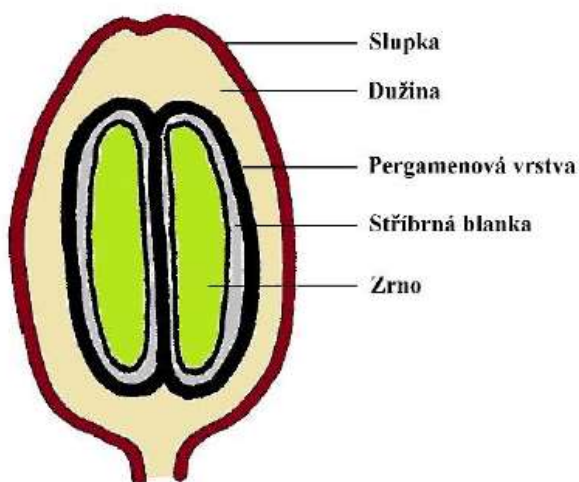
1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Káva

Pod pojmem káva si vybavíme nápoj, dle legislativy se kávou rozumí upravená semena kávovníku bohatá na alkaloidy. V potravinářské terminologii jde o pochutinu. Za pravlast kávy se považuje Etiopie, ve které se dodnes nachází volně rostoucí keře kávovníku. [2]

Kávovník je tropický až subtropický stálezelený keř řadící se k čeledi mořenovitých (*Rubiaceae*). Může dosahovat do výšky 15 metrů, záleží však na nadmořské výšce a přírodních podmínkách. Často také bývá výška keřů upravována kvůli dostupnosti plodů při sklizni. Také záleží na nadmořské výšce, přírodních podmínkách a druhu. Listy kávovníku jsou špičaté, velké a zelené s voskovitým povrchem. Okraje listů bývají mírně zvlněné. Kávovník kvete několikrát do roka bílými voňavými květy. Květ se však po pár dnech mění v zárodek plodu. Plody kávovníku jsou zelené oválné peckovice, velké zhruba 1,5 cm, které se postupně barví do červena. Plody tmavě červené až fialové barvy, označované jako kávové třešně, jsou zralé ke sklizni. [3]

Semena plodu jsou chráněna vrstvami. Vnější obal (*exokarp*) tvořený blanitou strukturou udává barvu plodu. Následuje vrstva dužiny (*mesokarp*) v níž se nacházejí dvě zelená kávová zrna. Tato zrna jsou obalena pergamenem (*endokarp*) a potažena stříbrnou blankou (*integument*). Struktura zrna kávovníku je znázorněna na obrázku 1. [2] [5]



Obrázek 1: Průřez kávovým zrnem [2]

Rostlina začíná plodit zhruba 4 roky po výsadbě. Nejlepšího produkčního období dosáhne po deseti letech a plodí přibližně 30 let, kdy se produktivita odhaduje na 0,5-1 kg produktu na rostlinu za rok. Kávovník může mít současně jak květy, tak zralé plody. [5]

Vzhledem k jeho teplomilnosti má nejvhodnější podmínky pro růst v oblasti rovníku, tudíž se nejvíce pěstuje ve státech Střední a Jižní Ameriky, v Africe, Indii a Madagaskaru a

odtud je distribuována do celého světa. Mezi největší producenty kávy patří Brazílie, Vietnam, Kolumbie, Etiopie, Indonésie a Mexiko. [1]

1.1.1 Druhy kávovníku

Existuje mnoho druhů kávovníků, kdy se druh kávy dělí na jednotlivé odrůdy podle místa pěstování. Pro potravinářské účely se celosvětově využívají především dva druhy a to arabský kávovník neboli arabika a kávovník laurentský neboli robusta. [2] [5]

Coffea arabica

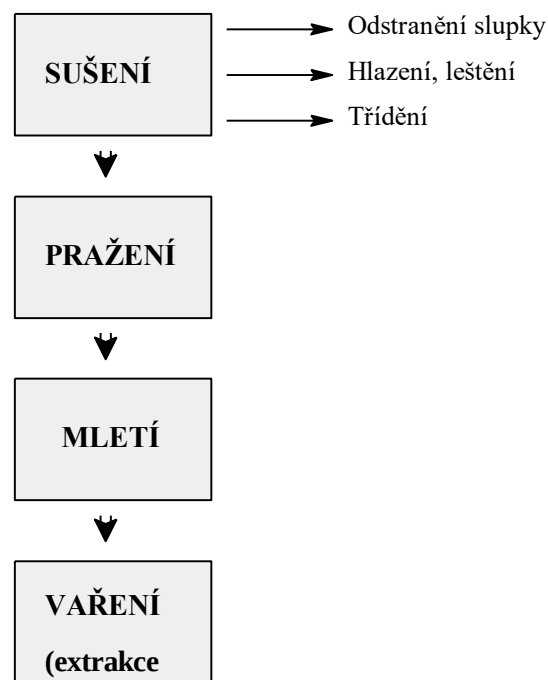
Kávovník arabský je původem z Etiopie. Roste při průměrné teplotě okolo 20°C s vysokou vlhkostí ve výšce od 600 do 2000 metrů nad mořem. V porovnání s kávou robusta má nižší obsah kofeinu (0,8 - 1,4 %), může mít kysele zbarvenou chuť a je náchylnější k chorobám. Bývá považována za nejkvalitnější kávu, a proto tvoří 70-80 % světové produkce. [3]

Coffea canephora

Takzvaná káva Robusta je druhým nejčastějším druhem kávy na trhu. Považuje se za méně kvalitnější kávu avšak odolnou proti různým chorobám. Kromě obsahem kofeinu (1,7 – 4 %) se od arabiky odlišuje i tvarem zrna, která jsou zaoblenější s rovnou rýhou uprostřed a také lepší odolností. Zrna robusty jsou silně aromatická s výrazně hořkou chutí, díky čemuž se používají především do směsí. Kávovník se nejvíce pěstuje ve Vietnamu a Brazílii v nadmořské výšce 200 až 600 metrů, při teplém a stabilním klimatu okolo 30°C . Při ideálních podmínkách dosahuje rostlina výšky 13 metrů. [2] [5]

1.2 Technologie zpracování kávy

Jakmile se kávové třešně zbarví do temně červené, jsou považovány za vyzrálé a nastává doba jejich sběru. Doba sklizně trvá i několik týdnů a provádí se buď ručně, nebo pomocí strojů. Následuje zpracování zrn, kdy se z plodů, získávají zelená zrna zbavená vrstev a dužiny. Zpracování se provádí dvěma základními způsoby, které mají vliv na kvalitu, chuť i cenu výsledného zrna. Schématické znázornění technologie zpracování kávy se nachází na obrázku 2. [3] [6]



Obrázek 2: Technologie zpracování kávy [5]

1.2.1 Mokrá způsob

Zpracování mokrou cestou je náročnější a využívá se především pro kvalitnější kávová zrna. Nejprve se ve vodních nádržích oddělí plně hodnotné kávové třešně od nečistot a nezralých, seschlých či poškozených plodů, kdy méně hodnotné plody plovají na hladině. Potom se plody pomocí stroje rozdrtí, díky čemuž se se uvolní hlavní část obalu zrna a dužiny. Zrna se ještě změkčí fermentací po dobu 1 až 2 dnů v kádích. Při fermentaci dochází pomocí působení enzymů k rozrušení dužiny a obalu semena. Následuje praní semen ve vodě. Nakonec se semena suší na vzduchu nebo v mechanických sušicích jednotkách. [3] [6]

1.2.2 Suchý způsob

Při zpracování suchou cestou se plody nejprve zbaví nečistot a následně se suší na slunci rovnoměrně rozložené na betonovém či cihlovém povrchu. V průběhu sušení se plody několikrát obračejí a znovu rozprostírají. Obal plodu působením slunce zhnědne a stane se křehkým. Následuje mechanické loupání obalu i dužiny pomocí strojů. Suchá metoda zpracování je jednodušší a méně nákladná než mokrá metoda a využívá se především pro méně kvalitní druhy kávy. [3] [6]

Zpracovaná zrna jsou tříděna podle velikosti, barvy a hustoty. Při třídění jsou zrna zbavena pergamentové slupky tzv. leštěním pomocí strojů. Takto upravená surová káva se čistí od různých nečistot a uskládá se. Poté následuje pražení. [3] [6]

1.2.3 Pražení kávy

Pražení kávy je nejdůležitější krok zpracování kávy, který ovlivňuje kvalitu kávy a aromatické a senzorické vlastnosti a barvu výsledného produktu. Tento proces se odehrává ve speciálních strojích tzv. pražičkách, které mohou být bubnové, odstředivé či fluidní. Periodické pražení se uskutečňuje při teplotě okolo 200°C v pánvi, která se točí okolo své osy. Pomocí odstředivé síly se káva pohybuje, díky čemuž dochází k rovnoměrnému upražení zrn a zabráňuje se přepražení. Celý proces trvá 10-20 minut a je individuální podle typu kávy a požadovaného stupně pražení. V důsledku působení vysokých teplot se snižuje obsah vody v zrně a celé řadě chemických reakcí, díky kterým káva mění své chemické složení, jak lze vidět v tabulce 1. Nejdůležitějším chemickým procesem při pražení kávy je neenzymatické hnědnutí, kdy káva získává svou barvu a celé řadě kondenzačním a pyrolytickým reakcím, díky kterým dostává káva svoji vůni a chuť. Mění se struktura a vlastnosti zrna, kdy se degradují proteiny na jednodušší peptidy za úniku oxidu uhličitého. Škroby se degradují na jednoduché sacharidy a reagují s bílkovinami za vzniku melanoidů, látek s antioxidačními vlastnostmi. Dále dochází k poklesu kofeinu a kyselin, na které je vázán. [2] [5] [6]

Tabulka 1: Srovnání chemického složení zelené a pražené kávy [3]

	zelená káva		pražená káva	
	arabica (hm. %)	robusta (hm. %)	arabica (hm. %)	robusta (hm. %)
bílkoviny	11-17	11-13	12-15	13-15
tuky	9-18	9-18	15-20	11-16
sacharidy	60-76	69-76	40-79	64-71
popel	4-5		4-5	
voda	8-13	12-13	4	

1.3 Odpadní produkty technologie zpracování kávy

Při zpracování kávy vzniká velké množství odpadních produktů, jako kávová dužina, slupka či stříbrná blanka z obalu kávového zrna a v neposlední řadě kávová sedlina. Množství a druh odpadního produktu závisí na zpracování kávových plodů. [7]

Při zpracování kávy mokrou cestou se získává dužina kávy, která představuje 29 % hmotnosti suchého kávového zrna. Dužina je bohatá na karbohydráty, proteiny, minerální látky a také obsahuje značné množství tříslovin, polyfenolů a kofein. Hojné zastoupení zde mají i organické složky jako třísloviny, pektinové látky, redukující cukry i neredukující cukry, kofein, kyselina chlorogenová či kyselina kávová 1,6 %. [7] [8]

Další z odpadních produktů získávaný při zpracovávání mokrou cestou, jsou kávové slupky. Ty obvykle představují asi 12 % hmotnosti bobu. Slupky se skládají z vody, popele, bílkovin, tuků a z velké části ze sacharidů. Obsahují velké množství celulózy, hemicelulózy a ligninu. [7] [8]

Při procesu pražení se získává jako odpadní produkt povlak z kávových zrn označovaný jako stříbrná blanka. Má vysokou koncentraci rozpustné dietní vlákniny, která tvoří 86 % z

celkové hmotnosti vlákniny. Další zajímavou schopností těchto blanek je vysoká antioxidační schopnost, která je dána pravděpodobně jako důsledek koncentrace fenolických sloučenin a přítomností melanoidů, které se tvoří během procesu pražení). [7] [9]

Odpadní produkty ze zpracování kávy jsou velkým zdrojem znečištění vody a půdy, čímž představují ekologický problém. Jedním z druhů znečištění může být hniloba odpadních produktů, kvůli jejich vlhkosti. Z těchto důvodů se hledají různé alternativy zpracování odpadů kávového průmyslu. [7]

1.3.1 Využití odpadních produktů kávového průmyslu

Hlavním problémem zpracování těchto odpadů je jejich toxicita, která je zapříčiněná vysokým obsahem kofeinu, volných fenolů a taninů (polyfenoly). Dle studií lze tyto toxické látky částečně eliminovat pomocí úpravy teplou vodou, mikrobiální biodegradací či aerobním kvašením. [7] [8]

V dužině a slupce se nacházejí látky anti-fyziologické a anti-nutriční. V důsledku toho, nejsou vhodnými substráty pro biokonverzi a tak zůstává většina těchto odpadů nevyužita. Pro jejich využití na biotechnologické procesy je třeba odstranění jejich toxických složek. Detoxikace kávy je již velmi probádaným tématem. [7]

Studie detoxikace slupky kávy byly prováděny pomocí tří různých kmenů plísní, a to *Rhizopus*, *Phanerochaete*, a *Aspergillus*. Z výsledků studií vyplývá, že tyto plísňové kmeny lze pro detoxikaci využívat. Další studie se zaměřují na optimalizaci různých parametrů a jejich vliv pro biotechnologické procesy, jako je pH, vlhkost a provzdušňování slupek. V případě detoxikace u dužiny kávy byly použity bakterie rodu *Streptomyces*. Při aplikaci analytické pyrolýzy a bakterií se většina toxických látek přeměnila a tak lze tento odpad použít jako krmivo a další možnosti zpracování. Největší využití nachází slupka a dužina z kávového průmyslu ve výrobě krmiv a hnojiv. Tyto odpadní produkty obsahují značné množství zkvasitelných cukrů, takže představují vhodný substrát pro pěstování plísní a kvasinek. Z tohoto důvodu se hledají mnohé aplikace jejich využití v biotechnologických procesech. [7]

1.4 Kávová sedlina

Kávová sedlina, anglicky spent coffee grounds (dále jen SCG), je pevný, nerozpustný produkt vytvořený během přípravy kávy nebo při výrobě kávy instantní. Zhruba 50% kávy se zpracovává na kávu rozpustnou, kdy nám na přípravu 1 kg rozpustné kávy vzniká 1-1,2 kg SCG. Celosvětově je téměř 50 % kávy zpracováváno na kávu rozpustnou. V průměru připadá na jednu tunu zelené kávy přibližně 650 kg SCG. [7] [10]

Chemické složení SCG je závislé na druhu rostliny, zeměpisné oblasti i nadmořské výšce pěstování, na stáří rostliny, klimatu a půdě. Obecně je SCG bohatá na hemicelulózy (30-40 hm. %), konkrétně na manózy, galaktózy a arabinózy. Přibližně 10 hm. % SCG je tvořeno celulózou. Velké množství tvoří také olej a to asi 15 hm. %. Dále je v SCG přítomen lignin (zhruba 30 hm%) a velké množství bílkovin. Zhruba 2,5 hm. % SCG je tvořeno

polyfenolickými látkami, které tvoří vysoce biologicky dostupné a bioaktivní chlorogenní kyseliny. Množství bioaktivních látek a oleje je ovlivňováno především technologickým zpracováním a způsobem přípravy kávy. V SCG je zastoupeno více lipidů než v kávě zelené nebo pražené. Množství lipidů není ovlivňováno extrakcí horkou vodou stejně u bílkovin, kde zůstává množství zastoupené v SCG po extrakci neměnné. Kofein z mleté pražené kávy je z velké části extrahován do nápoje a tak jeho množství v SCG závisí na době extrakce. Minerální látky jsou snadno rozpustné v horké vodě a tak je jejich množství nízké. [4] [11]

Pokud jsou některé složky SCG jako kofein, třísloviny a polyfenoly vypouštěny do životního prostředí, představují velké riziko znečištění. Navíc, když jsou odpady na bázi kávové sedliny nahromaděny, mohou spontánně kvasit a způsobit hoření. Právě díky těmto vlastnostem a velkému množství odpadů produkovaných kávovým průmyslem je eliminace a zpracování těchto odpadů důležitým tématem [7] [10] [12]

Byly provedeny studie zabývající se využitím SCG jako substrátu pro výrobu ethanolu, bionafty, polyhydroxyalkanoátů či polyfenolických látek. Díky své výhřevnosti, se kávová sedlina stala atraktivní, jako alternativa paliva. Avšak kávovou sedlinu je nutné posbírat, vysušit a skladovat tak, aby nebyla napadena mikroorganismy ještě před použitím. Žádná z uvedených strategií zpracování odpadu z kávového průmyslu však není příliš zavedena v průmyslu a to především kvůli logistice zpracování tohoto odpadu. Z toho důvodu bývá většina těchto odpadů nezpracována a nevyužívána, tudíž bývá spalována nebo vypouštěná do životního prostředí. [7] [10] [12] [13]

1.4.1 Chemické složení kávové sedliny

Hlavní složkou SCG jsou polysacharidy, především celulóza a hemicelulóza, která je tvořena především manany, galaktany a také arabinany. Dále zde mají své zastoupení oligosacharidy, lipidy s obsahem olejů asi 15 hm. %, alifatické kyseliny, aminokyseliny, proteiny, alkaloidy, fenoly, které se skládají především z chlorogenových kyselin, také velké množství minerálů, zejména draslík, lignin, melanoidinů a těkavých sloučenin. Stručný přehled chemického složení kávové sedliny lze najít v tabulce 2 a v tabulce 3 je uvedeno zastoupení minerálních látek v SCG. [10] [4]

Tabulka 2: Chemické složení kávy [10]

složení	%	sloučeniny	%
celkové výtěžky	51,43	dichlormethan	19,67
		ethanol	5,36
		voda	1,20
		1% NaOH	25,10
lignin	26,51	klason lignin	22,71
		rozpuštěný lignin	3,80
polysacharidy	22	glukóza	59,20
		manóza	40,80

Tabulka 3: Minerální prvky v SCG [10]

prvky	složení [g/kg]
Ca	0,771
Mg	0,178
K	0,253
Na	0,329
Fe	0,326
Cu	0,046
Zn	0,012
Mn	0,033

Po extrakci ve vhodném rozpouštědle, zpravidla se používá hexan, se získává olejová frakce. V chemickém složení takto získaného oleje mají hlavní zastoupení lipidy, jakými jsou triacylglyceroly, estery diterpenových alkoholů a mastné kyseliny. Konkrétně lze říci, že SCG olej je tvořen ze 75 % triacylglyceroly, ze 14 % terpenovými estery, dalších 5 % je z parciálních acylglycerolů, z 1 % volných mastných kyselin, 1,5 % volných sterolů, 1 % esterů sterolů a 1 % polárních lipidů. [4]

SCG materiál je lignocelulózová frakce, tvořena z celulózy, hemicelulóz a ligninu. Nejvýznamnější složkou vlákniny SCG je celulóza, která je tvořena několika stovkami až deseti tisíci jednotek D-glukózy. Tyto jednotky jsou mezi sebou propojeny $\beta(1,4)$ -glykosidovými vazbami. Molekuly celulózy se agregují na mikrofibrily a vytváří vysoce uspořádané (krystalické) nebo méně uspořádané (amorfni) oblasti. Krystalická část poskytuje tuhost a amorfni část naopak měkkost a pružnost. Amorfni část pak umožňuje vstřebávání vody a snadný a rychlý průběh hydrolýzy [28]. Hemicelulóza je v SCG tvořena především především mannany a arabinogalaktany. Mannany jsou látky tvořeny spojenými opakujícími se jednotkami mannosa, které jsou propojené $\beta(1,4)$ -glykosidovými vazbami. Arabinogalaktany jsou v kávové sedlině zastoupeny třemi typy, především však arabinogalaktany, což jsou arabino-3,6-galaktany, které jsou kovalentní vazbou připojeny k proteinům. Hemicelulózy vynikají amorfním a hydrofilním charakterem, v důsledku čehož mají vysokou mechanickou odolnost vůči vodě a tudíž jsou v porovnání s celulózou a ligninem hůře hydrolyzovatelné. [4]

Další složkou SCG je trojrozměrný amorfni přírodní polymer, složený fenylypropanových jednotek s karbonylovými, hydroxylovými a methoxylovými substituenty nazývaný lignin. Tento polymer vyniká schopností stabilizátoru proti mechanickému poškození a přispívá k vysoké výhřevnosti SCG. Aby se dalo SCG dále využívat a zpracovávat, je nutné lignin rozštěpit na zkvasitelné cukry. Štěpení ligninu se odehrává pomocí hydrolytického procesu. Hydrolýza může probíhat buď enzymaticky, nebo chemicky. [4]

1.4.1.1 Fenolické látky

Fenolické látky (FL), nazývané též jako polyfenoly, jsou sloučeniny, které obsahují aromatické kruhy s hydroxylovými skupinami. Hlavními zdroji FL jsou ovoce a zelenina, kde

se vyskytují jako sekundární metabolity chránící rostlinu před různými vlivy okolí, jako je UV záření, bakterie, viry či hmyz. Jsou to přírodní látky s antioxidační aktivitou, umožňující zachycení volných radikálů, které vznikají během metabolismu a pomáhají zabránit oxidaci tuků a tím předejít poškození buněčné membrány. V plodech dodávají produktům organoleptické vlastnosti. Hořkou chuť zajišťují především flavonony, katechiny a taniny. Antokyaniny a anthoxanthiny dávají barvu rostlinným produktům. [4], [14]

Jedná se o organické látky s minimálně jedním benzenovým jádrem a více než jednou hydroxylovou kyselinou. Syntéza fenolických látek probíhá tzv. šikimátovou dráhou. Za prekurzor FL bývá považován fenylalanin. FL jsou skupina polyfenolových esterů, mezi které patří kyselina kávová, kyselina ferulová, kyselina gallová, kyselina *p*-kumarová a chlorogenové kyseliny. Kyselina *p*-kumarová je schopná inhibovat oxidaci látek a tím zabraňuje škodlivým účinkům v živočišných tkáních. Antikarcinogenní a antiangiogenní vlastnosti má kyselina gallová i její deriváty. Jedná se o fenolickou, ve vodě rozpustnou kyselinu, která je nejvíce obsažena v černém i zeleném čaji. Fenolické kyseliny jsou účinné proti oxidaci LDL cholesterolu v organismu. Díky schopnosti vytvářet komplex s karcinogenem zabraňují šíření rakovinových buněk. [4], [14], [15]

FL patří do široké skupiny antioxidantů, především pro své antioxidační, antibakteriální, hepatoprotektivní, hypoglykemické, protinádorové a antivirotické schopnosti. Díky své schopnosti zlepšovat pružnost cév a tím i prokrvení a zásobení kyslíkem mají pozitivní vliv na činnost kardiovaskulárního systému. Mezi jejich další hlavní funkce patří prevence a léčba neurodegenerativních onemocnění (jako je Parkinsonova, či Alzheimerova choroba) a některých druhů rakoviny. Také ovlivňují enzymatické a hormonální pochody v organismu. Flavonoidy také brání tvorbě histaminu v sliznici a tím působí pozitivně proti alergiím. V důsledku studií byl prokázán obsah 4,6-9,9 mg fenolických látek na 1g SCG. FL mohou být z SCG extrahovány za použití polárního nebo středně polárního rozpouštědla, kterým je například etanol nebo metanol. [4], [15], [16]

1.4.1.2 Antioxidanty

Výsledky mnohých výzkumů dokazují, že konzumace kávy je prospěšná lidskému zdraví a napomáhá zabránit vzniku několika chronickým onemocnění. Pro testování antimikrobiální aktivity bylo použito různých antimikrobiálních testů a mikroorganismů. Jejich stručný přehled je uveden v tabulce 4. [11]

Nejvíce zastoupeným antioxidantem v kávě je kyselin chlorogenová (CQA). Jedná se o ester kyseliny kávové a kyseliny chinonové. Jedná se o hlavní polyfenolovou složku kávy. Při pražení kávy se její obsah snižuje. [11]

Další látkou s antioxidačními účinky obsažené v kávě jsou tokoferoly, známé jako vitamín E. Jedná se o látky rozpustné v tucích. V přírodě se vyskytuje osm izomerů, lišících se

svou biologickou aktivitou a působením na organismus. Jeho úlohou je chránit celé tělo před působením škodlivých toxinů. Jedná se o významnou složku lipidové frakce kávy. [17]

Diterpeny a diterpenové sloučeniny jsou dalšími antioxidačními složkami kávy. Nejvýznamnější z nich jsou složky kafestol a kaweol. Chemickou strukturou se jedná o estery mastných kyselin s pentacyklickými diterpenovými alkoholy. Podléhají izomeraci během pražení a tak je jejich zastoupení ke konci zpracování kávy poměrně malé. Jejich nejzajímavější vlastností je fakt, že vytváří řadu biochemických procesů, které vedou ke snížení genotoxicity mnohých karcinogenů. Lze tedy říci, že konzumace kávy může mít antikarcinogenní účinky. [18]

Při procesu pražení vznikají melanoidy, jejichž antimikrobiální aktivita je spojená se vznikem peroxidu vodíku při Maillardově reakci a ten potlačuje růst bakterií jako je *Escherichia coli* a *Listeria innocua*. Melanoidům je také připisována antikarcinogenní aktivita. [19]

Tabulka 4: Mikroorganismy použité pro stanovení antimikrobiální aktivity¹

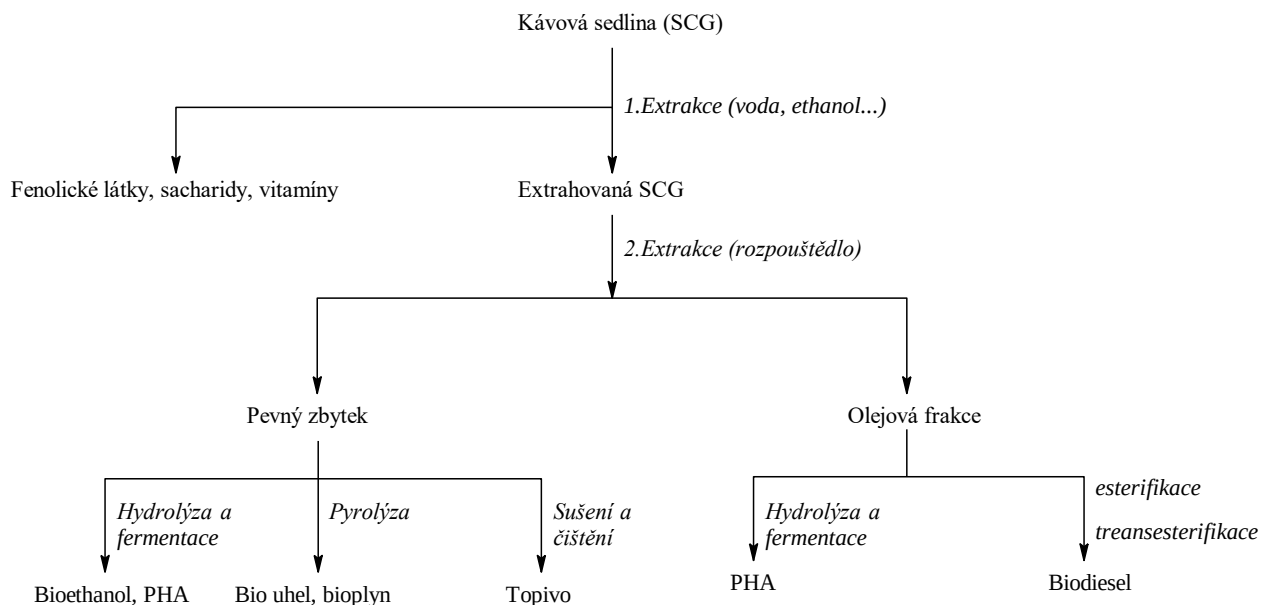
typ	jméno	Typ extrakce kávové sedliny	metoda	kultivace	výsledek	citace
bakterie G-	<i>Escherichia coli</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	++	[20]
		20% metanol	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	+	[21]
		vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	++	[22]
		4 % H ₂ SO ₄	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	+	[4]
		4 % H ₂ SO ₄	jamková difúzní	37°C, 24 h	++	[4]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	+++	[20]
		20% metanol	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	++	[21]
		vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	+++	[22]
	<i>Salmonella choleraesuis</i>	vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	+++	[22]
	<i>Salmonella thypi</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	++	[20]
	<i>Serratia marcescens</i>	4 % H ₂ SO ₄	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	++	[4]
		4 % H ₂ SO ₄	jamková difúzní	37°C, 24 h	++	[4]
bakterie G+	<i>Bacillus cereus</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	+	[20]

¹ PCA= plate count agar, bakteriologický substrát používaný pro stanovení celkového počtu živých bakterií ve vzorku, + = lehce aktivní, ++ = aktivní, +++ = velmi aktivní, - = neaktivní

	<i>Bacillus subtilis</i>	4 % H ₂ SO ₄	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	+	[4]
	<i>Enterococcus faecalis</i>	vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	+	[22]
	<i>Halomonas halophila</i>	4 % H ₂ SO ₄	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	++	[4]
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	-	[20]
	<i>Listeria monocytogenes</i>	vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	++	[22]
	<i>Micrococcus luteus</i>	4 % H ₂ SO ₄	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	++	[4]
		4 % H ₂ SO ₄	jamková difúzní	37°C, 24 h	++	[4]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	+	[20]
		20% metanol	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	+	[21]
		vodná	disková difúzní	37°C, 24 h	+++	[22]
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	20% metanol	bujonová mikrodiluční	37°C, 24 h	+	[21]
	<i>Streptococcus faecalis</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	++	[20]
	<i>Streptococcus lactis</i>	vodná	PCA	agar 37°C, 48 h	++	[20]
kvasinky	<i>Candida glabrata</i>	4 % H ₂ SO ₄	jamková difúzní	37°C, 24 h	+	[4]
	<i>Candida utilis</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
plísně	<i>Aspergillus fumigatus</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Aspergillus niger</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Aspergillus oryzae</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Mucor pumilus</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	+++	[20]
	<i>Rhizopus oryzae</i>	vodná	PCA	agar 30°C, 72 h	-	[20]

1.4.2 Zpracování kávové sedliny

SCG je, díky svému chemickému složení, potenciálním producentem širokého spektra produktů. Jen malá část z nich lze však produkovat v neupravené formě. Aby byla kávová sedlina dále zpracovávána, je třeba ji upravit pro produkci využitelných produktů. Proces přeměny kávové sedliny označujeme jako biorafinaci. Jedná se o proces, kdy dochází k přetváření biomasy na využitelné produkty za zisku energie. Zpracování a upravování kávové sedliny je stručně znázorněné na obrázku 3. [23]



Obrázek 3: Zpracování kávové sedliny [4]

Pro získání sacharidů, fenolických látek a vitaminů z SCG se využívá extrakce vodou, etanolem nebo superkritická extrakce. Výtěžek daných látek je závislý na použitém činidle extrakce a podmínkách procesu, jakými je například teplota a tlak. Nejvyšších hodnot výtěžků látek lze dosáhnout pomocí superkritické extrakce s CO_2 . Zbytek po superkritické extrakci lze dále využívat. [24]

Dalším z možností zpracování SCG je oddělení olejové frakce, která činí přibližně 15 hm. %. Olej lze z SCG získat třemi metodami a to extrakcí nepolárními rozpouštědly, především pomocí hexanu nebo ethyletheru. Dále extrakcí dle Soxhleta nebo superkritickou extrakcí pomocí CO_2 . SCG olej lze dále využívat například pro výrobu paliva nebo syntézu polyhydroxyalkanoátů (PHA). [25]

1.4.2.1 Hydrolýza kávové sedliny

SCG se skládá převážně z polysacharidů, ligninu, bílkovin, lipidů a anorganických látek. Polysacharidy, převážně celulóza a lignin se nerozpouští při extrakci a tak zůstávají v SCG. Hydrolýza je chemická reakce, při které dochází ke štěpení molekul za přítomnosti molekuly

vody a vhodného katalyzátoru. Katalýza může být kyselá i zásaditá. Při každém kroku je spotřebována jedna molekula vody. Ta se štěpí za vzniku dvou iontů a to vodíkového a hydroxylového. Během procesu hydrolyzy tak jeden fragment původní molekuly získá vodíkový iont vody a druhý fragment hydroxylový iont vody. [26] [27]

1.4.2.1.1 Chemická hydrolyza

Proces chemické hydrolyzy se provádí pomocí kyselin, vysoké teploty a tlaku. Materiál se po přidání zpravidla zředěné kyseliny (Například kyselina sírová) přizpůsobí procesu hydrolyzy. Sacharidy se tak extrahují a rozkládají na jednoduché cukry. Kyseliny mohou díky malé velikosti svých molekul procházet do krystalické struktury celulózy. Čímž dochází k uvolnění glukózových monomerních jednotek z řetězce celulózy. Při použití zředěné kyseliny je třeba vyšších teplot (vyšší než 160°C), díky čemuž dochází k rozkladu glukózy. Při použití koncentrované kyseliny není třeba použití tak vysokých teplot. Hemicelulózu lze hydrolyzovat přidávkou vody. Zředěné kyseliny také katalyzují hydrolyzu hemicelulózy při teplotách 100 – 200 °C. [28]

1.4.2.1.2 Enzymatická hydrolyza

Rozpustnost pevných látek způsobená degradací stěn rostlinných buněk, je uskutečněna pomocí procesu enzymatické hydrolyzy. Hlavní složkou SCG jsou dva polysacharidy a to celulóza a hemicelulóza, z níž nejvýznamnější složkou je galaktomanan. Dále jsou zde také v malém množství zastoupeny xylany, arabinany a galaktany. Enzymatická hydrolyza SCG probíhá pomocí enzymů celulázou, manázami (hlavně galaktomanáza), xylanázami a endoglukanázami. V průběhu reakce dochází v hlavním řetězci mananu a jeho derivátů k rozštěpení β -1,4-manopyranosylových vazeb. Tato katalýza je možná díky endomananázám. Celulóza je štěpena třemi enzymy endoglukanázou, exoglukanázou a β -D-glukozidázou. [28]

1.4.3 Využití kávové sedliny

1.4.3.1 Palivo

SCG se díky své vysoké tepelné kapacitě používá jako palivo či topivo. Při využití pro spalování za vzniku energie se extrahovaná SCG vysuší, vyčistí a následně se často tvaruje do pelet. Při tomto způsobu využití SCG se však vytvářejí skleníkové plyny, které jsou uvolňovány do ovzduší, čímž přispívají k jeho znečištění. [23] [29]

Jedna z problematik dnešní doby je hledání alternativních zdrojů paliv, které by byly šetrné k životnímu prostředí. Jednou z možností je bionafta, která je netoxická a biologicky odbouratelná avšak poměrně drahá. Bionafta je tvořena především methylestery mastných kyselin rostlinných olejů nebo živočišných tuků. V důsledku toho obsahuje minimální množství aromatických látek a síry, díky čemuž produkuje méně CO, CO₂ a uhlovodíků ve srovnání s klasickou naftou. [30]

Výroba bionafty je možná z odpadů biomasy, živočišných tuků či rostlinných olejů. Olej získaný extrakcí z kávové sedliny je, pro svoji kvalitu a efektivitu takřka ideální surovinou.

Získaný olej SCG je podroben dvou katalyzovaných kroků pro přeměnu na bionaftu. Nejdříve projde procesem kysele katalyzované esterifikace, která je následována procesem transesterifikace za využití katalyzátorů NaOH či KOH. Výsledným produktem je levnější a stabilnější bionafta. Vzhledem k vysokému obsahu oleje v kávové sedlině by tato výroba po aplikaci do velkopřemyslového zpracování mohla činit až 3,5 % světové produkce. [25] [30]

1.4.3.2 Polyhydroxyalkanoáty

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou polymery přírodního původu, syntetizované mnoha bakteriemi jak gram-pozitivními a gram-negativními, tak i archeálními kmeny. Lze také říci, že se jedná o materiály podobné, díky svým vlastnostem, plastům-syntetickým polymerům. Avšak nezatěžují přírodní prostředí. Bakterie si tyto biopolymery ukládají jako zásoby energie a záložní zdroj uhlíku. V buňkách jsou shromážděny ve formě intracelulárních zrn neboli granulí. [31]

Fyzikální i chemické vlastnosti těchto přírodních polyesterů jako nerozpustnost ve vodě, odolnost vůči hydrolýze a hlavně rozložitelnost v přírodě, jsou pro nás atraktivními. Jejich nejzajímavějšími a pro nás nejdůležitějšími vlastnostmi jsou biodegradabilita a biokompatibilita. Biodegradabilita je proces biologického odbourávání, v podstatě se jedná o přirozený rozklad a biokompatibilita je biologická snášenlivost, kdy při specifické aplikaci je materiál snášen živým organismem. Můžeme říct, že PHA jsou biologicky odbouratelné polymery degradující jak za aerobních podmínek, tak i za podmínek anaerobních. [32] [33] [34]

V případě SCG je získání PHA možný přeměnou olejové frakce nebo z hydrolyzátu SCG. Na 1 gram buněčné sušiny lze pomocí bakterií získat z oleje až 89 hm. % PHA a z hydrolyzátu kávy téměř 55 hm. %. Přeměna je však ekonomicky náročnější a tak není zatím zavedena při velkovýrobě. [10] [24]

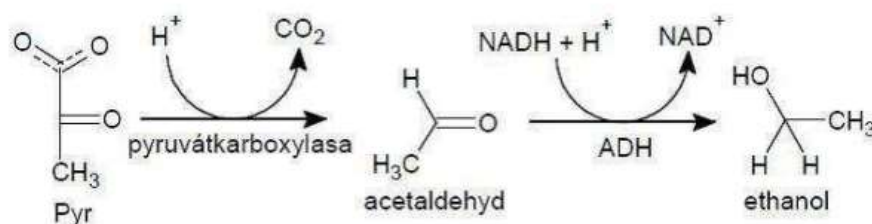
1.4.3.3 Bioetanol

Etanol produkovaný fermentací v biotechnologických procesech se nazývá bioetanol. SCG je, díky svému obsahu sacharidů, atraktivní pro výrobu bioetanolu. Nejvíce využívané mikroorganismy pro tuto produkci jsou kvasinky rodu *Saccharomyces cerevisiae*. Pro výrobu etanolu lze využít i bakterií rodu *Zymomonas mobilis*. Oba tyto mikroorganismy mají vysokou toleranci k alkoholu. Celý proces probíhá převážně v anaerobním prostředí při přibližně 30°C. Pro lepší nárůst buněk a jejich následnou aktivitu je vhodné provzdušnění média ze začátku fermentace. [25] [35]

Kvasinky umí přímého zkvašování pouze u monosacharidů. Z tohoto důvodu je nutné polysacharidy nejdříve hydrolyzovat na monosacharidy. Proces hydrolýzy probíhá pomocí enzymů nebo přidáním látek, zpravidla kyselin, například kyselinou sírovou. Při hydrolýze polysacharidů dochází k rozpadu lignocelulózových řetězců na jednodušší a pro bakterie lépe metabolizovatelné sacharidy. [25] [35]

1.4.3.3.1 Etanolové kvašení

Proces výrobu etanolu, etanolové kvašení, je založen na rozkladu sacharidů působením enzymů mikrobiálních buněk, zpravidla kvasinek. Schéma procesu je uvedeno na obrázku 4. Celý proces probíhá bez přístupu vzduchu, tedy anaerobně. V případě kvasinek jednat o striktně anaerobní proces, kdy mírné provzdušnění na začátku fermentačního procesu může být žádoucí pro lepší nárůst mikroorganismů a zvýšení jejich aktivity. Při rozkladu sacharidů dochází k uvolňování energie, která je z části fixovaná ve formě ATP a zbytek se uvolňuje ve formě tepla do okolí. [36]



Obrázek 4: Schéma alkoholového kvašení [36]

1.4.3.4 Produkty pyrolýzy-bioplýny, bio-uhlí i bio-oleje

Proces termochemické přeměny materiálu nazýváme pyrolýza. Výsledkem tohoto procesu je přeměna materiálu na plyn, uhlí a olej. Proces probíhá za anaerobních podmínek. Jedná-li se o spalování biomasy, vznikají tak produkty označované bio, tudíž bioplýny, bio uhlí a bio olej. Produkty tohoto procesu lze dále zpracovávat a využívat. Bioplýny, produkované biomasou lze využívat jako zdroj paliva a energie. Zpravidla se jedná o těkavé plyny jako CO , CO_2 , CH_4 a vyšší uhlíkové sloučeniny. Bio uhlí lze využít například jako přísadku do půd. Vzhledem ke své struktuře dokáže uhlí dobře vázat vodu, umožňuje provzdušňování půdy, podporuje aktivitu mikroorganismů a průchod živin. Bio olej lze využít jako alternativní zdroj ropy. Jeho potenciál je daný faktem, že při přímém spalování oleje je produkováno velké množství energie. [37]

1.4.3.5 SCG v zemědělství

Velké využití má kávová sedlina také v zemědělství. Již výše zmíněný bio-uhlí získaný bio-rafinací zlepšuje fyzikální vlastnosti půd. Velký potenciál má SCG jako taková. Velký význam mají totiž minerální látky, na které je velmi bohatá. Ty přispívají k obohacování půdy nezbytně důležitými vitamíny a stopovými prvky, čímž podporují růst a vývoj rostlin. Nejčastěji bývá SCG kompostována ve směsi s organickým odpadem a tím dochází k odstranění jejich fytotoxických sloučenin. Tento proces probíhá při neustálém provzdušňování. V procesu kompostování SCG dochází ke změnám jejího chemického složení, jako například k poklesu obsahu fenolů a taninů, ke snížení emisí CH_4 a N_2O a k tvorbě vysoce kvalitního hnojiva. Použití SCG jako aditiva v půdě ovlivňuje především hydrologické vlastnosti a pH. Velikost ovlivnění je závislá na druhu půdy a použitém kompostu. V půdě dochází ke zvýšení vodní kapacity, což má za následek zadržování vláhy v půdě a zvýšení acidity. [29] [38]

1.4.3.6 Kvantové tečky

1.4.3.6.1 Syntéza kvantových teček z kávy

Vzhledem k atraktivním vlastnostem a chemické struktuře je káva předmětem mnoha výzkumů jako prekurzor pro kvantové tečky (QD). Kvantové nanočástice neboli anglicky Quantum dots (QD) jsou anorganické polovodičové nanokrystaly o velikosti 1-20 nm. Každou kvantovou tečku tvoří 100 až 100 000 atomů. Oceňované jsou především pro svoji fluorescenci. Dalšími výhodami je jejich poskytování vysokých kvantových výtěžků, mají vysoký molární extinkční koeficient, který představuje schopnost molekuly absorbovat světlo, dále také snížené meze detekce a odolnost k chemickému rozpadu a zhasnutí. Vyšší odolnost a životnost umožňuje opakování měření vzorku bez ztráty intenzity signálu. Struktura QD je tvořena polovodičovým jádrem, která bývá obalena anorganickými látkami, nejčastěji CdS, ZnS, CdSe a CdTe což zvýší jeho stabilitu [39]

V současné době mají QDs velmi dobrý potenciál využití především v oblasti medicíny a farmakologie. Jedním z možností využití QDs je při zkoumání nádorových buněk. Je zde snaha využít je pro léčbu rakovinotvorných buněk. V oblasti farmakologie a diagnostiky mají potenciál při monitorování transportu léčiva do tkáně či jako nosič léků. Transport léků a léčivých přípravků se uskutečňuje uhlovodíkovými nanotrubicemi, které snadno pronikají přes buněčnou membránu. Při označení zmíněných nanotubic lze pak transport vizuálně zobrazit právě díky fluorescenci léčiva navázaného na QDs, představující nosič. K dopravě do cílové buňky dojde pomocí specifických receptorů na povrchu buňky, které jsou rozpoznány speciálními prvky na povrchu nosiče (nanočástice), či samotnou nanočásticí. Právě jejich malá velikost umožňuje snadný transport k cílovým orgánům a při vhodné úpravě povrchu se sníží jejich toxicita. [40]

Jeden z výzkumů dokazuje výrobu QD z kávových zrn hydrotermální cestou. V tomto případě byla zrna nejdříve rozemleta a poté extrahována horkou vodou. Pevný podíl kávy, tedy SCG byl vysušen v peci. Poté se 0,1g vysušené SCG s 1m hydrazinhydrátu rozpustilo v 10 ml vody pomocí ultrazvuku. Následně byla tato směs přenesena do autoklávu potažená teflonem a zde byla při 150 až 200°C ponechána po dobu 6 až 10 hodin. Poté následovalo ochlazení a filtrování přes mikroporézní membránu, k odstranění uhlíkových nerozpustných zbytků. Následovalo stání v dialyzačním vaku po dobu 2 týdnů. Výsledné QDs byly přečištěny, charakterizovány a používány. [41]

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce byla extrakce fenolických extraktů z kávové sedliny a sledování jejich antimikrobiální aktivity. Ta byla stanovována pomocí vybraných mikroorganismů. Dalším důležitým cílem práce byla modifikace kávové sedliny pomocí alkoholového kvašení a určení antimikrobiální aktivity vyizolovaných látek. Konkrétní zadání mělo znění:

- 1) Literární rešerše zaměřená na dané téma.
- 2) Stanovení antioxidační a antimikrobiální aktivity u fenolických extraktů z kávové sedliny.
- 3) Modifikace kávové sedliny alkoholickým kvašením a určení antimikrobiální aktivity získaných látek.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikrororganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Kávová sedlina

Pro tuto diplomovou práci byla použita kávová sedlina získaná od kavárenské společnosti Costa Coffe v Brně. Jedná se o směs kávy, kdy na jeden díl kávy Robusta, připadá šest dílů kávy Arabica. Kávová sedlina byla po sesbírání sušena v troubě při 50°C do sucha a uložena bez přístupu vzduchu.

3.1.2 Použité mikroorganismy

Pro stanovení antimikrobiální aktivity byly použity jak zástupci bakterií, tak kvasinek. Z bakterií byly vybrány dva druhy gram-pozitivních bakterií, *Bacillus subtilis* (CCM 1999) a *Micrococcus luteus* (CCM 1569) a jeden druh gram-negativních a to *Serratia marcescens* (CCM 8587). Z kvasinek byly vybrány druhy *Candida glabrata* (CCM 8270) a *Saccharomyces cerevisiae* (CCM 8191).

Bacillus subtilis

Jedná se o gram-pozitivní aerobní bakterii z rodu *Bacillus* tvořící spory. Tato bakterie je schopna růst v médiu s minimálním množstvím živin a esenciálních látek. Patří mezi nejpoužívanější grampozitivní bakterie v průmyslové produkci rekombinantních proteinů. *Bacillus subtilis* produkuje antibiotika polypeptidového charakteru. Dále se z této bakterie získávají amylázy, které mají hojné využití v pivovarnictví a textilním průmyslu a proteinázy, využívané v pracích prostředcích. V potravinářství má na svědomí nežádostivou nitkovitost chleba. [42]

Micrococcus Luteus

Micrococcus luteus z rodu *Micrococcus* je striktně anaerobní, chemoorganotrofní nesporeující bakterie patřící do skupiny gram-pozitivních bakterií. Produkuje žluté až intenzivně růžové zbarvení kolonií. Toto barvivo, označováno jako lutein, chrání buňku před působením UV a řadí se mezi karotenoidní barviva. Velkou výhodou této bakterie je přežití i za stresových podmínek, kterými mohou být nízká teplota, či nedostatek živin. Vyskytuje se ve střevní mikroflóře savců, na kůži člověka a lze ji nalézt i ve vzduchu, vodě a půdě. U člověka kolonizuje sliznice horních dýchacích cest a ústní dutiny, kde při sníženém imunitickém systému vyvolává infekce a onemocnění, například meningitidu nebo endokarditidu. Dle některých studií mohou mít tyto bakterie vliv na snižování rizika kožních karcinomů. [43], [44]

Serratia marcescens

Serratia marcescens patřící do rodu *Enterobacteriaceae* je fakultativně anaerobní chemotrofní gram-negativní bakterie. Vytváří nesporeující kolonie, které lze nalézt v půdě a vodě. Tato bakterie je charakteristická svojí produkcí prodigiosinu, červeného pigmentového

barviva. Předpokládá se, že biosyntéza pigmentu působí jako ochranný mechanismus v nepříznivých podmínkách, je důvodem rezistence bakterie vůči antibiotikům a má důležitou roli pro respiraci. U lidí s oslabeným imunitním systémem může způsobovat infekce močových i dýchacích cest, zápal plic či sepsi. [42], [44]

Saccharomyces cerevisiae

Saccharomyces cerevisiae z rodu *Saccharomyces* patří mezi vřeckovýtrusné houby (Ascomycota). Tato kvasinka bývá, především pro svoji jednoduchost a snadnou kultivaci, využívána jako modelový organismus pro studium eukaryotní buňky. Jedná se o velmi využívanou kvasinku v potravinářství, především díky své schopnosti zkvasit cukry. Dle způsobu využití rozlišujeme pивní, pekařskou či vinnou kvasinku. [45]

Candida glabrata

Tato haploidní kvasinka patřící do rodu *Candida* se v menším množství přirozeně nachází na kůži, v ústní dutině i jako součást střevní mikroflóry. Také ji lze najít v urogenitálním traktu a u lidí s oslabeným imunitním systémem může způsobovat kandidózy nebo plicní houbová onemocnění. Díky rezistenci k mnohým antimykotikům, lze infekce způsobené *C. glabrata* velmi obtížně léčit a je považována za patogen. Dalším faktorem přispívajícím k patogenitě této kvasinky je exprese adhesinových genů. Jedná se o mechanismus, kdy *C. glabrata* tvoří houbovitě filmy, které jsou velmi rezistentní vůči antimykotům. [46]

3.1.3 Použité chemikálie

Chemikálie pro přípravu médií

Nutrien Broth w/1% peptone, HiMedia Laboratories, Indie
Kvasničný extrakt, HiMedia Laboratories, Indie
Pepton bakteriální, HiMedia Laboratories, Indie
Dextrose anhydrous, HiMedia Laboratories, Indie
Agar, bakteriální, HiMedia Laboratories, Indie

Chemikálie pro přípravu extraktů

n-Hexane, Merck, Německo
Ethanol absolute, Merck, Německo
Aceton p.a., Penta, Česká Republika
Diethyl ether p.a., Penta, Česká Republika
Ethyl acetate, Merck, Německo

Chemikálie pro stanovení základních charakteristik

Dinitrosalicylová kyselina, Sigma Aldrich, Německo
Uhličitan sodný bezvodý, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenuhlíčan sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Síran sodný bezvodý, Lach-Ner s.r.o., Česká republika
Vínan sodno-draselný, Lachema, Česká republika

Síran měďnatý heptahydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Molybdenan amonný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát, Lachema, Česká republika
D-glukosa monohydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Folin-Ciocaltevo činidlo, p.a., Penta, Česká republika
Uhličitan sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kyselina gallová, Sigma Aldrich, Německo
Chlorid hlinitý, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Dusitan sodný, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Katechin, Sigma Aldrich, Německo

Chemikálie pro fermentaci

Síran hořečnatý, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Chlorid sodný, HiMedia Laboratories, Indie
Dusičnan vápenatý, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Hydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
D-glukosa monohydrát, p.a., Lach-Ner, s.r.o., Česká republika
Kvasničný extrakt, HiMedia Laboratories, Indie
Kvasničný autolyzát, HiMedia Laboratories, Indie

3.1.4 Laboratorní přístroje a pomůcky

Soxtherm, C. Gerhard- Analytical systems, Indonésie
Rotační vakuová odparka RV 06, IKA, SRN
Třepačka, Orbital shaker – Incubator ES 20, Biosan, Litva
UV/VIS Spektrofotometr Helios, Thermo Spectronic, USA
HPLC/PDA sestava: Sestava HPLC (Thermo Fischer Scientific, USA)
ELISA Synergy HTX multi mode reader (Biotek)
Lyofilizátor Labconco FreeZone 4.5 Freeze Dryer (USA)
Destilovaná voda, očkovací box, laboratorní sklo, aparatura Soxhlet, topné hnízdo, mikropipety

3.2 Použité metody

3.2.1 Kultivace mikroorganismů

Na kultivaci byly použity bakteriální kmeny *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens* a *Micrococcus luteus* a kvasinky *Candida glabrata* a *Saccharomyces cerevisiae*. Práce s mikroorganismy probíhala v sterilním boxu za dodržení aseptických podmínek. Kultivace mikroorganismů probíhala jak na tuhém agarovém médiu, tak v kapalném médiu. Před kultivací byla média vždy sterilizovaná v tlakovém hrnci při teplotě 120°C po dobu 30 minut. Kultivace na pevném médiu byla prováděna přenesením kultury z pevného média křížovým roztěrem. Kultivace v kapalném médiu probíhala v Erlenmeyerových baňkách o objemu 100 ml

přenesením kultury z pevného média. Inkubace zaočkovaných tuhých i kapalných médií probíhala na temperované třepačce při 30°C po dobu 24 hodin.

3.2.1.1 Příprava médií

Média pro kultivaci bakterií

Pro kultivaci bakteriálních kmenů bylo použito živné médium Nutrient Broth w/1% peptone (NB), jehož složení je uvedeno v tabulce 5. Pevné médium bylo připraveno ze 100 ml média. Následovala sterilizace média a následně jeho rozlití na Petriho misky. Po ztuhnutí byly na a médium naočkovány kultury mikroorganismů křížovým roztěrem (Obrázek 5). Kultivace mikroorganismů v kapalných médiích probíhala v Erlenmayerových baňkách o objemu 50 ml, které byly zaočkovány dvěma kličkami daného mikroorganismu.

Tabulka 5: Složení kultivačního média pro bakteriální kmeny

typ média	látko	[g/l]
kapalné	Nutrient Broth	25
	Nutrient Broth	25
	Agar	20

Média pro kultivaci kvasinek

Pro přípravu média kvasinek bylo použité živné médium Yeast Extrakt-Peptone-Dextrose (YPD). Složení média je uvedeno v tabulce 6. Postup přípravy kapalného i tuhého média pro kvasinky byl obdobný přípravě bakteriálního média.

Tabulka 6: Složení kultivačního média pro kmeny kvasinek

typ média	látko	[g/l]
kapalné	Yeast extract	10
	Peptone	20
	Dextroze	20
pevné	Yeast extract	10
	Peptone	20
	Dextroze	20
	Agar	20



Obrázek 5: Kultivace mikroorganismů – křížový roztěr

3.2.2 Příprava fenolických extraktů

3.2.2.1 *Extrakce pomocí Soxthermu*

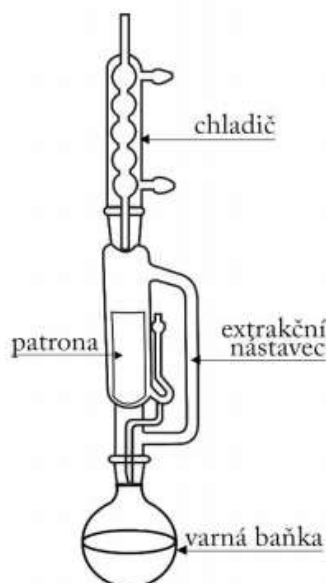
Pro získání fenolických extraktů byla nejprve provedena extrakce kávové sedliny v přístroji Soxtherm, který pracuje na principu Soxhleta. Vzorek je umístěn do roztoku rozpouštědla, díky čemuž dojde k dočasné zvýšení teploty reakce. Výhodou je automatizovaný systém a malá spotřeba rozpouštědla. Při velmi vysoké teplotě reakce však může dojít k degradaci méně stabilních sloučenin. [47]

Do patrony bylo naváženo zhruba 15 gramů kávové sedliny a patrona, společně se vzorkem byla zadělána vatou. Takto připravený vzorek byl vložen do skleněné nádoby, jenž je součástí přístroje Soxtherm. Následně byly na dno skleněné nádoby přidány varné kamínky a nádoba byla zalita rozpouštědlem. Automatická extrakce byla nastavena dle uvedených parametrů pro konkrétní rozpouštědlo. Po ukončení extrakce, byl roztok extrahovanou SCG slit a umístěn na vakuovou odparku. Díky extrakci v hexanu byla získána olejová frakce, která byla zakonzentrována na rotační vakuové odparce. Takto připravený extrakt kávového oleje byl označen E1. Odtučněná SCG se dále extrahovala ethanolem, acetonem, diethyl etherem a ethyl acetátem dle Soxhleta.

3.2.2.2 *Extrakce dle Soxhleta*

Některá rozpouštědla nelze využít v přístroji Soxtherm a proto byla provedena extrakce dle Soxhleta. Metoda extrakce dle Soxhleta, patří mezi nejstarší extrakční techniky. Principem je navážení tuhého vzorku do patrony, která je umístěna v tzv. Soxhletově aparatuře. Rozpouštědlo kondenzuje do patrony a tím vymývá rozpustné komponenty z tuhé matrice vzorku. Tento roztok, obsahující rozpuštěné analyty, je pak vrácen přepadem do varné baňky a celý proces se několikrát opakuje. Výhodou použití této extrakční techniky je její pořizovací cena a jednoduchá obsluha. Jedná se o normovanou metodu, tudíž její nutné ji pro různá

rozpouštědla optimalizovat. Nevýhodou využití extrakce dle Soxhleta je časová náročnost a velká spotřeba rozpouštědla. [47]



Obrázek 6: Soxhletova aparatura [48]

Postup extrakce obdobný extrakci v přístroji Soxtherm. Patrona s naváženou SCG byla překryta vatou, umístěna do aparatury a zalita daným rozpouštědlem. Bylo zkontrolováno správné zapnutí chlazení, sestavení aparatury a po zapnutí topného hnízda byla zahájena extrakce.

Metodou extrakce dle Soxthermu byly to získány fenolické extrakty SCG v 75% ethanolu (E2), 70% acetonu (E3), diethyl etheru (E4) a ethyl acetátu (E5).

3.2.3 Stanovení základních charakteristik fenolických extraktů

3.2.3.1 Stanovení celkového obsahu redukujících cukrů

Pro stanovení redukujících cukrů byla použita metoda pomocí 3,5-dinitrosalicylové kyseliny (DNS). Principem této metody je redukce 3,5-dinitrosalicylové kyseliny na 3-amino-5-nitrosalicylát za pomoci D-glukózy. Činidlo DNS obsahuje fenolovou složku, Rochellovu sůl, kyselinu 3,5-dinitrosalicylovou, hydrogen siřičitan sodný a hydroxid sodný. Rochellerova sůl zabráňuje reakci z rozpuštění kyslíku, fenolická látka slouží k zvýšení barvy roztoku a bisulfit získanou barvu stabilizuje. Zásadová složka činidla slouží k redukci působení glukózy na kyselinu 3,5-dinitrosalicylovou. Změnu barvy roztoku lze detekovat kolorimetricky, kdy se původně žlutá barva změní na tmavě oranžovou barvu. [49]

Postup stanovení byl proveden napipetováním 0,5 ml vzorku do zkumavky a následným přidáním 0,5 ml DNS činidla. Poté byly vzorky inkubovány na vodní lázni při 70°C po dobu 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 10 ml destilované vody. Takto připravený roztok vzorku byl promíchán a byla měřena jeho absorbance při 540 nm. Jako slepý

vzorek byla použita destilovaná voda. Stejným postupem byla změřena i kalibrační křivka, kde byla obsažena glukóza o koncentracích 0,1 – 1 g/l, jako redukující cukr. Přesný postup je publikovaný v bakalářské práci Bc. Radima Stříže

3.2.3.2 Stanovení celkových polyfenolů

Stanovení polyfenolů probíhalo kalorimetricky metodou dle Folin-Ciocalteu. Polyfenoly reagují se specifickými redoxními činidly za vzniku modrého zbarvení, které je detekováno ve viditelné oblasti. Modré zbarvení roztoku je dáno redukcí směsi fosfomolybdenanem a fosfowolframem. Principem této metody je reakce polyfenolů s Folin-Ciocalteovým činidlem. Aktivita této reakce je úměrná koncentraci hydroxylových skupin přítomných na aromatickém jádře, které ovlivňují redukční potenciál na molekule látky. [50]

Přesný postup byl publikovaný v bakalářské práci Bc. Radima Stříže. V metodice se používalo Folin-Ciocalteova činidlo zředěné destilovanou vodou v poměru 1:9. Do zkumavky s 1 ml činidla a 1 ml destilované vody bylo přidáno 100 μ l vzorku a roztok byl promíchán. Po 5ti minutách byl k roztoku vzorku přidán 1 ml nasyceného roztoku Na_2CO_3 . Roztok byl promíchán a ponechán v klidu při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Následně byla měřena absorbance při 750 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 100 μ l destilované vody. Stejným postupem byla změřena kalibrační závislost s obsahem kyseliny gallové o koncentracích 0,1-0,35 g/l.

3.2.3.3 Stanovení celkových flavonoidů

V kyselém prostředí reagují hydroxylové skupiny flavonoidů s chromogenem p-dimethylaminocinnamaldehydem za vzniku barevných pigmentů. Po přidání chloridu hlinitého ke vzorku se na α - anebo β - kruhu flavonoidů tvoří komplexy s ortho-dihydroxylovými skupinami. [51]

Stanovení bylo provedeno dle postupu publikovaném v bakalářské práci Bc. Radima Stříže. Byl připraven roztok o obsahu 0,5 ml vzorku, 1,5 ml destilované vody a 0,2 ml NaNO_2 . Takto vzniklý roztok byl promíchán a ponechán v klidu při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 0,2 ml AlCl_3 . Roztok byl opět promíchán a ponechán v klidu při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Dále bylo přidáno 1,5 ml NaOH a 1 ml destilované vody. Roztok byl opět promíchán a ponechán v klidu při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Následně byla měřena absorbance při 510 nm. Jako slepý vzorek bylo použito 0,5 ml destilované vody. Stejným postupem byla stanovena kalibrační závislost pomocí katechinu o koncentracích 0,05-0,3 g/l.

Na fenolických extraktech byl testován antimikrobiální efekt, viz kapitola 3.2.5. Dále byly analyzovány pomocí HPLC viz kapitola 3.2.6

3.2.4 Fermentace kávové sedliny pomocí *Saccharomyces cerevisiae*

Princip reakce je založen na schopnosti *Saccharomyces cerevisiae* zkvasit cukry. Alkoholická fermentace probíhala v tzv. Readers mediu, jehož složení je uvedeno v tabulce 7. [52]

Tabulka 7: Složení Readers media

MgSO ₄	0,7 g/l
NaCl	0,5 g/l
Ca(NO ₃) ₂	0,4 g/l
KH ₂ PO ₄	1,0 g/l
K ₂ HPO ₄	0,1 g/l
Glukóza	190 g/l
Kvasniční extrakt	25,0 ml/l
Kvasniční autolýzát	15,2 ml/l

Do Erlenových baněk bylo naváženo po 0,5 g a 1 g SCG a po sterilizaci bylo do každé baňky přidáno 50 ml sterilního Readers media. Do takto připraveného roztoku byly pipetovány různé koncentrace 24 hodinové kultury kvasinky a to 2,5, 5 a 10%. Poté se baňky nechaly stát při 30°C po dobu 23 dní. Přesné navážky a koncentrace kultury kvasinky v Erlenmayerových baňkách, jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Navážky SCG a koncentrace zaočkované kultury v daných vzorcích

vzorek	navážka [g]	Obsah <i>S. cerevisiae</i> [obj.%]
SCG 1	0,5	2,5
SCG 2	0,5	5,0
SCG 3	0,5	10,0
SCG 4	1	2,5
SCG 5	1	5,0
SCG 6	1	10,0

Po ukončení kultivační doby byly vzorky lyofilizovány a následně podrobeny antimikrobiálním testům a analýze pomocí HPLC.

Experiment byl proveden dvakrát. Při opakování byla navážka kávové sedliny 0,5 g a 1 g do 50 ml Readers media v Erlenmayerových baňkách. Do roztoků byla zaočkována 24 hodinová kultura kvasinek o koncentraci 2,5 a 5 obj %. Takto připravené Erlenmayerovy baňky

byly ponechány při 30°C po dobu 23 dní a po ukončení experimentu byly vzorky filtrovány a následně lyofilizovány. Přesné navážky a koncentrace kultury kvasinky v Erlenmayerových baňkách, jsou uvedeny v tabulce 9.

Tabulka 9: Navážka SCG a koncentrace zaočkované kultury kvasinky ve vzorcích

vzorek	navážka [g]	Obsah <i>S. cerevisiae</i> [obj. %]
F1	0,5	2,5
F2	0,5	5,0
F3	1	2,5
F4	1	5,0

3.2.5 Stanovení antimikrobiální aktivity

K testování antimikrobiální aktivity se využívají metody difúzní a diluční. Difúzní metody jsou využívány především pro svoji jednoduchost, nízkou cenu a snadnou dostupnost všech potřebným propriet. Principem je dynamika šíření (difuze) růstu mikroorganismů v agarovém tuhém médiu. [53]

3.2.5.1 Jamková difúzní metoda

Jamková difúzní metoda je využívána k vyhodnocení antimikrobiální aktivity rostlinných a mikrobiálních extraktů. Agarový disk je na povrchu naočkován daným mikroorganismem. Následně jsou v agaru asepticky vytvořeny jamky pomocí korkorytu či sterilní špičky. Do připravených jamek je pipetováno antibakteriální činidlo, nebo analyzované látky s antimikrobiální aktivitou. Antimikrobiální látky difundují, po kontaktu s inokulovaným agarem, do prostředí agaru a vytváří dynamicky se měnící gradient. Ten se mění v závislosti na koncentraci antimikrobiální látky. Okraj inhibiční zóny vzniká v místě, kde je ještě antimikrobiální látka schopna inhibovat růst mikroorganismu. [53], [54]

Diluční metody se využívají především pro určení hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a kvantifikaci. MIC hodnota udává nejnížší koncentraci látky, která viditelně inhibuje růst mikroorganismu. Vyhodnocuje se zde růst mikroorganismu při kultivaci s analyzovanou látkou. Podstatou dilučních metod je přidání velmi přesného množství analyzované látky. Tyto testy lze provádět na kapalných i tuhých médiích. [55]

3.2.5.2 Bujonová diluční metoda

Bujonová diluční metoda je jednou z nejzákladnějších metod testování citlivosti mikroorganismu na antimikrobiální látky. Experiment se provádí na mikrotitrační destičce či v řadě zkumavek s kultivačním médiem. Do jamek na destičce, nebo do zkumavek se napipetuje

antimikrobiální látka a následně je očkováno inokulum testovaného mikrobiálního kmene. Následně jsou zkumavky nebo titrační destička inkubovány za podmínek vhodných pro daný mikroorganismus. Po uplynutí kultivační doby se hodnotí růst mikroorganismu, který je signalizován zákalem měřeným turbidimetricky či spektrofotometricky. [53] [56]

3.2.5.3 Příprava vzorků.

Jamková difúzní metoda

Pro stanovení bylo třeba naočkovat 24 hodinou kulturu daného mikroorganismu na Petriho misky obsahující tuhé médium. Na agar bylo napipetováno vždy 100 µl tekutého média s danou kulturou, které bylo rozetřeno sterilní hokejkou po agaru. Takto připravené misky byly ponechány v klidu do vstřebání kultury. Následně byly do misek vyhloubeny jamky pomocí sterilního skleněného korkovrtu. Do takto vyhloubených jamek bylo pipetováno 100 µl kultury. Porovnávání aktivity dané látky bylo proti blanku, kterým bylo 100 µl rozpouštědla. Petriho misky byly následně inkubované při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Následně byla měřená velikost inhibičních zón.

Bujonová diluční metoda

Při bujonové diluční metodě byl sledován růst mikroorganismu na mikrotitračních destičkách. K 50 µl testovaného vzorku bylo přidáno 50 µl 24 hodinové mikrobiální kultury. Pomocí ELISA readeru byl sledován nárůst buněk po 24 hodinách kultivace. Měření bylo prováděno spektrofotometricky při 630 nm.

3.2.6 Stanovení základních charakteristik pomocí HPLC

Ke stanovení obsahu a identifikaci fenolických látek ve vzorcích byly použity standardy různých flavonoidních i neflavonoidních látek. Například kyselina gallová, kyselina kávová, kyselina chlorgenová či katechin.

Vzorky byly nejprve rozpuštěny ve směsi methanolu s hexanem (v poměru 1:1) a protřepány. Methanolvá fáze byla odebrána a filtrována přes filtr PTFE 0,45 µm do vialky. Poté byla provedena analýza fenolických látek. Analýza probíhala za podmínek gradientové eluce uvedené v tabulce 10. Jako mobilní fáze A byl použit 0.1% roztok kyseliny trifluoroctové v miliQ vodě a mobilní fáze B byl acetonitril. Analýza probíhala při 35 °C a průtoku 0,4 ml/min na koloně Kinatex F o rozměru 150 x 4,6x 2,6 mm. Kolona byla použita z důvodu využití gradientové eluce. Složení mobilní fáze při gradientové eluci je znázorněno v tabulce 10. Jednotlivé vzorky byly dávkovány na kolonu dávkovací smyčkou o objemu 20 µl. Fenolické látky byly detekovány spektrofotometricky při vlnových délkách 260, 280 a 300 nm.

Tabulka 10: Složení mobilní fáze při gradientové eluci

čas [min]	MF A [%]	MF B [%]
0	90	10
1	90	10
5	88	12
10	75	25
15	60	40
20	45	55
22	30	70
30	90	10

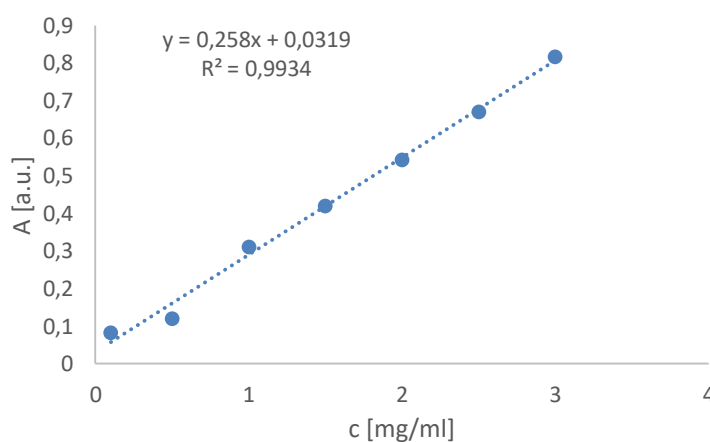
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Fenolické extrakty

4.1.1 Stanovení základních charakteristik fenolických extraktů

4.1.1.1 Stanovení celkového obsahu redukujících cukrů

Celkový obsah redukujících cukrů byl stanoven pomocí metody DNS. Každý vzorek byl třikrát měřen a získané hodnoty byly zprůměrovány. Měření bylo opakováno pro dosažení přesnějších výsledků. Dle získaných absorbancí standardu, tedy glukózy byla sestrojena kalibrační přímka, pomocí které byla získána rovnice lineární regrese znázorněná v grafu 1:



Graf 1: Kalibrační křivka pro stanovení redukujících cukrů- glukóza

Pomocí této rovnice byl vypočítán obsah redukujících cukrů ve fenolických extraktech. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11.

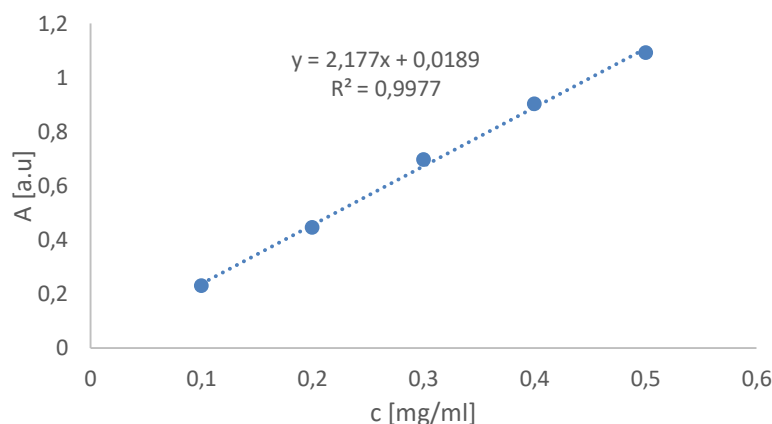
Tabulka 11: Koncentrace redukujících cukrů v extraktech

extrakt	Absorbance A [nm]			průměr A [nm]	ředění	c [mg/ml]	c [mg/g]
E1- Hexan	0,521	0,517	0,519	0,519	3	1,43	1,59
E2- 75% Ethanol	0,537	0,539	0,535	0,537	1	0,41	2,97
E3- 70% Aceton	0,144	0,145	0,146	0,145	2	0,17	1,26
E4- Diethyl ether	0,474	0,475	0,476	0,475	2	0,83	0,60
E5- Ethyl acetát	0,426	0,427	0,425	0,426	1	0,30	0,45

Z tabulky lze vyčíst, že nejvyšší koncentrace redukujících cukrů v přepočtu na gram kávové sedliny je v extraktu 75% ethanolu. Vysokou koncentraci, v porovnání s ostatními vzorky, redukujících cukrů má i kávový olej a extrakt 70 % acetonem. Extrakce redukujících cukrů je vedlejším produktem extrakce SCG. Pro jejich získání se nejprve kávová sedlina upravuje hydrolytickým procesem. Nízké koncentrace redukujících cukrů jsou tedy očekávány. Z naměřených hodnot lze pozorovat, že pro extrakci redukujících cukrů jsou vhodná jak polární, tak i nepolární rozpouštědla.

4.1.1.2 Stanovení celkového obsahu polyfenolů

Toto stanovení proběhlo za použití Folin-Ciocalteuho činidla. Každý vzorek byl třikrát proměřen a získané hodnoty byly zprůměrovány. Měření bylo opakováno pro dosažení co nejpřesnějších výsledků. Z naměřených absorbancí standardu a to kyseliny gallové, byla sestrojena kalibrační přímka, díky níž byla získána rovnice lineární regrese, uvedené v grafu 2:



Graf 2: Kalibrační křivka pro stanovení polyfenolů – kyselina gallová

Z této rovnice byl následně dopočítán obsah polyfenolů ve fenolických extraktech. Vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Koncentrace polyfenolů ve fenolických extraktech

extrakt	Absorbance A [nm]			průměr A [nm]	ředění	c [mg/ml]	c [mg/g]
E1- Hexan	0,716	0,716	0,711	0,714	5	3,56	3,94
E2- 75% Ethanol	0,615	0,618	0,621	0,618	4	2,46	17,68
E3- 70% Aceton	0,741	0,739	0,738	0,739	1	0,73	5,55
E4- Diethyl ether	0,447	0,445	0,446	0,446	1	0,44	0,32
E5- Ethyl acetát	0,521	0,523	0,525	0,523	1	0,51	0,77

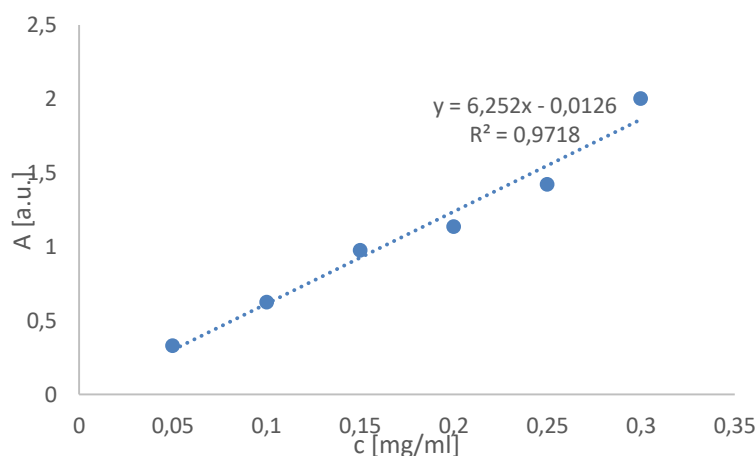
Byly použity rozpouštědla s různou polaritou. Kávovalá sedlina obsahuje celou škálu fenolických látek s různou rozpustností v použitých rozpouštědlech. Každý extrakt proto měl jiný charakter a obsahoval jiné množství uvolněných fenolických látek. Z naměřených hodnot je patrné, že nejvíce fenolických látek obsahoval extrakt E2. Tento extrakt získaný extrakcí v 75 % etanolu obsahoval až 17,68 mg fenolických látek na gram kávové sedliny. Účinnost použitých rozpouštědel se dá zařadit následovně: E2_{75%ethanol} > E3_{aceton} > E1_{hexan} > E5_{ethyl acetát} > E4_{diethyl ether}

Naměřené hodnoty potvrzují studie, že pro získání sacharidů se využívá nejčastěji extrakce SCG vodou, etanolem nebo superkritickou extrakcí, viz kapitola 1.4.2. Hodnoty získané koncentrace cukrů v extraktu hexanen i acetonem naznačují dobrý zisk redukujících cukrů polárními i nepolárními rozpouštědly.

Pro srovnání lze uvést extrakci kávové sedliny směsí vody s ethanolem, při které byla koncentrace polyfenolů stanovena na 17 mg na gram kávové sedliny. [57] Tento typ extrakce je, dle naměřených hodnot extrahovaných polyfenolů, srovnatelný s extrakcí 75% ethanolem.

4.1.1.3 Stanovení celkového obsahu flavonoidů

Stanovení obsahu flavonoidů proběhlo dle kapitoly 3.2.3.3. Každý vzorek byl třikrát proměřen a získané hodnoty byly zprůměrovány. Měření bylo opakováno pro dosažení co nejpřesnějších výsledků. Z naměřených absorbancí katechinu, jako použitého standardu, byla sestrojena kalibrační přímka a získána rovnice lineární regrese. Kalibrační křivka je znázorněna v grafu 3:



Graf 3: Kalibrační křivka pro stanovení obsahu flavonoidů- katechin

Pomocí této rovnice byl následně vypočítán obsah flavonoidů ve fenolických extraktech. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 13.

Tabulka 13: Koncentrace flavonoidů ve fenolických extraktech

extrakt	Absorbance A [nm]			průměr A [nm]	ředění	c [g/l]	c [mg/g]
E1- Hexan	0,148	0,151	0,149	0,149	1	0,15	0,17
E2- 75% Ethanol	0,883	0,885	0,884	0,884	2	1,77	12,71
E3- 70% Aceton	0,542	0,543	0,541	0,542	1	0,54	4,13
E4- Diethyl ether	0,872	0,874	0,871	0,872	1	0,87	0,63
E5- Ethyl acetát	1,001	0,999	0,999	0,100	0,5	0,50	0,75

Díky různorodosti použitých rozpouštědel je zde i různorodost extrahovaných látek ve vzorcích. Z naměřených hodnot je patrná velmi vysoká koncentrace flavonoidů v extraktu 75 % ethanolem a to 12,71 mg na gram kávové sedliny. Vysoké množství koncentrace flavonoidů na gram kávové sedliny je patrný i v extraktu 70 % acetonem. Dle naměřených hodnot koncentrace flavonoidů v extraktech, lze účinnost rozpouštědel zařadit následovně: E2_{75%ethanol} > E3_{aceton} > E5_{ethyl acetát} > E4_{diethyl ether} > E1_{hexan}. V porovnání s naměřenými hodnotami obsahu polyfenolů je zde rozdíl u kávového oleje, tudíž extraktu hexanem (E1). Tento extrakt má z naměřené koncentrace polyfenolů 3,94 mg/g výtěžek pouze 0,17 mg flavonoidů na gram kávové sedliny.

Pro srovnání lze interpretovat výsledky studií extrakce SCG 60 % methanolem, kde byla naměřená koncentrace flavonoidních látek 1,81 mg/g a 60% ethanolem, kde se koncentrace flavonoidů pohybovala v rozmezí 2,11-8,033 mg/g. Další studie zaměřené na extrakci SCG hydrotermální metodou udává koncentraci naměřených flavonoidů 24,5-23,5 mg na gram kávové sedliny. Z uvedených hodnot dosahuje nejlepších výsledku pro izolaci flavonoidů extrakce SCG pomocí hydrotermální metody. [58]

4.1.2 Stanovení antimikrobiální aktivity fenolických extraktů

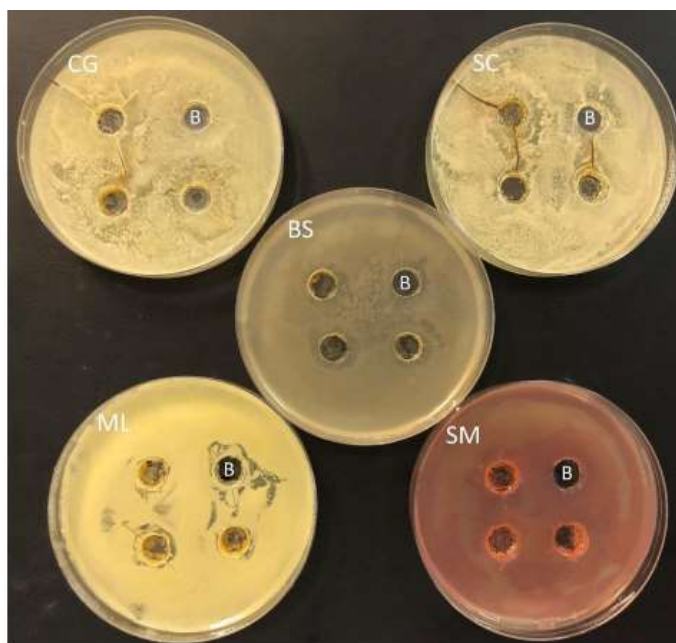
4.1.2.1 Jamková difúzní metoda

Pomocí jamkové difúzní metody byly testovány všechny roztoky. Dle antimikrobiální aktivity pak byly některé extrakty vynechány a metoda byla optimalizována. Testy byly provedeny dvakrát pro všechny mikroorganismy i extrakty. Byly změřeny velikosti inhibičních zón a údaje byly zprůměrovány a zpracovány do tabulky 14.

Tabulka 14: Shrnutí velikosti inhibičních zón, rozměry jsou udávány v mm

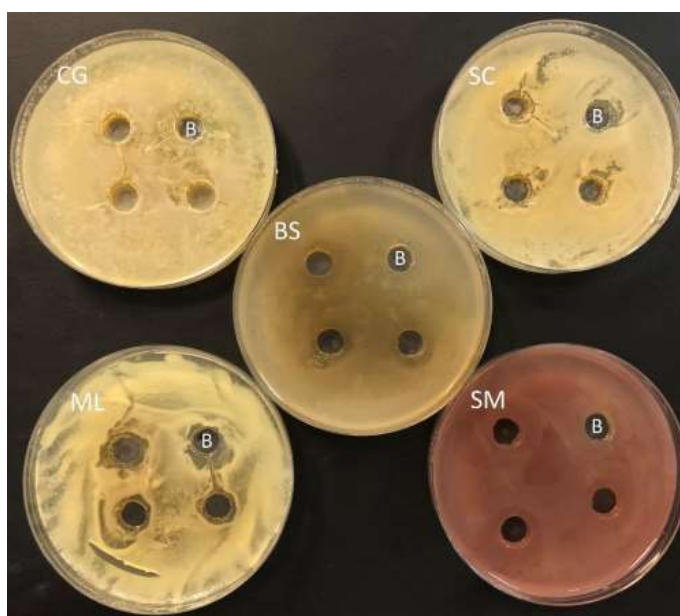
extrakt		<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>
E1	1	3	2	2	2	2
= hexan	2	4	1	2	1	1
	3	4	2	2	2	1
	Ø	3,67	1,67	2,00	1,67	1,33
	blank	2	1	2	1	1
E2	1	2	1	2	2	2
= 75 %	2	2	2	2	3	2
Ethanol	3	1	1	3	2	2
	Ø	1,67	1,33	2,33	2,33	2,00
	blank	1	1	1	2	2
E3	1	3	2	2	5	2
= 70%	2	2	2	3	4	2
Aceton	3	3	2	2	4	1
	Ø	2,67	2,00	2,33	4,33	1,67
	blank	2	1	1	2	1
E4	1	1	3	2	2	2
= diethyl	2	2	4	3	3	2
ether	3	1	4	2	2	1
	Ø	1,33	3,67	2,33	2,33	1,67
	blank	1	2	2	2	1
E5	1	2	2	1	1	1
= ethyl	2	3	2	2	2	1
acetát	3	2	3	2	2	1
	Ø	2,33	2,33	1,67	1,67	1,00
	blank	2	1	2	2	1

Z naměřených dat lze jako nejúčinnější extrakt vyhodnotit vzorek E3 (70% aceton). Tento vzorek je nejúčinnější proti testovaným gramnegativním i grampozitivním bakteriím. Nejúčinnějším extraktem proti kvasinkám byly vzorky E1 (hexan) a E4 (diethyl ether). Výsledkem experimentu je vyřazení rozpouštědla E5 (ethyl acetátu), který v porovnání s ostatními extrakty neprokazoval antimikrobiální vlastnosti. Extrakt v diethyl etheru (E4) byl ponechán pro měření antimikrobiální aktivity s kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae*.



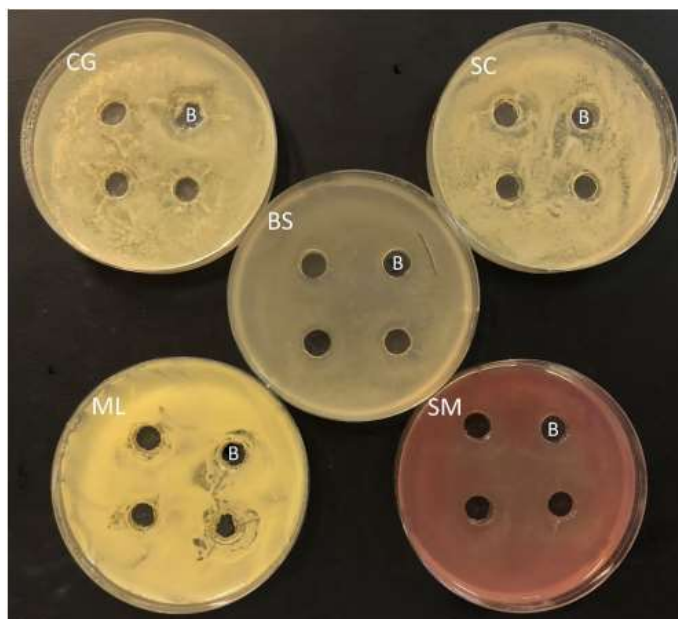
Obrázek 7: Antimikrobiální testy E1 (olejový extrakt SCG)

Na obrázku 7 je srovnání měření inhibičních zón při použití extraktu E1, tedy olejového extraktu kávové sedliny. Jako blank byla použita destilovaná voda. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval extrakt při použití kvasinky *Candida glabrata*.



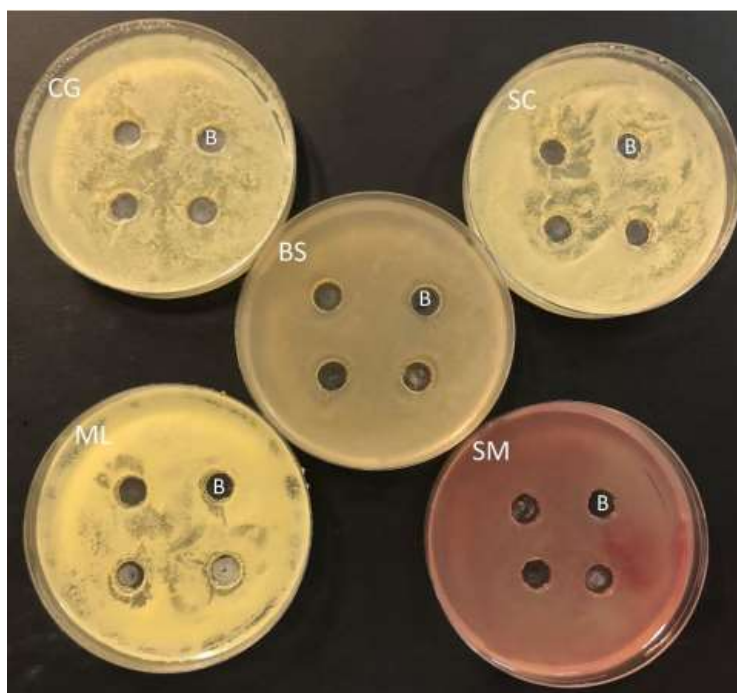
Obrázek 8: Antimikrobiální testy E2 (extrakt SCG v 75% Ethanolu)

Z obrázku 8 je vidět srovnání inhibičních zón u různých mikroorganismů při použití extraktu E2, kdy jako blank bylo použit roztok 75% Ethanolu. Největší velikost inhibičních zón v porovnání s blankem vykazovaly mikroorganismy *Candida glabrata* a *Bacillus subtilis*.



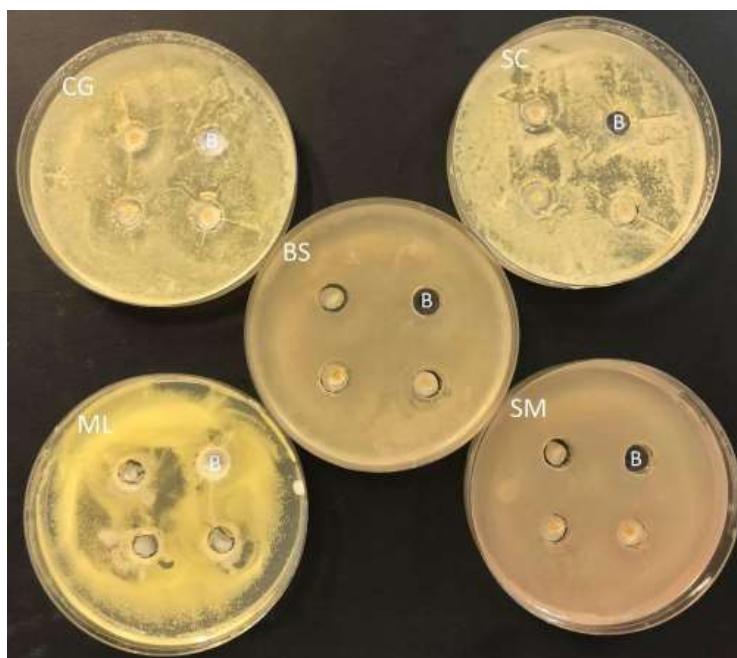
Obrázek 9: Antimikrobiální testy E3 (extrakt SCG v 70 % Acetonu)

Srovnání inhibičních zon u extraktu SCG v 70% acetonu, tedy E3 znázorněno na obrázku 9. Blankem zde byl roztok rozpouštědla. Nejvyšší velikost inhibičních zón je patrné při použití bakterie *Serratia marcescens*.



Obrázek 10: Antimikrobiální testy E4 (extrakt SCG v diethyletheru)

Srovnání stanovení antimikrobiální aktivity extraktu kávové sedliny v diethyletheru, tedy E4, lze vidět z obrázku 10, kde největší velikost, v porovnání s blankem (rozpouštědlo) měly inhibiční zóny při použití kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Vzhledem k malé odlišnosti inhibičních zón rozpouštědla a blanku, byl tento extrakt dále používán pouze u antimikrobiálních testů se *Saccharomyces cerevisiae*.



Obrázek 11: Antimikrobiální testy E5 (extrakt SCG v ethylacetátu)

Obrázek 11 srovnává stanovení antimikrobiální aktivity u extraktu E5, tedy extraktu kávové sedliny v ethyl acetátu. Největší inhibiční zóny v porovnání se zóny blanku, kterým bylo dané rozpouštědlo, se projevily u *Saccharomyces cerevisiae*. Inhibiční zóny extraktu u všech daných mikroorganismů jsou však srovnatelné s inhibičními zónami rozpouštědla. Z tohoto důvodu se následující testy s extraktem E5 neprováděly.

4.1.2.2 Optimalizace stanovení antimikrobiální aktivity lyofilizací extraktů

Z důvodu nepříliš velké odlišnosti inhibičních zón extraktů a rozpouštědel, byly extrakty E2, E3 a E4 udělány znovu dle uvedeného postupu. Následně byly umístěny na vakuovou rotační odparku a ponechány zde do odpaření rozpouštědla. Poté byly zmrazeny po dobu 72 hodin. Následně byly vysušeny na lyofilizátoru.

Zlyofilizované extrakty byly přeneseny do ependorfových zkumavek o přibližné navážce 0,0050 g. Následně k nim bylo přidáno 100 µl destilované vody. Takto připravené vzorky byly zvortexovány a ponechány ve sterilním prostředí po dobu 24 hodin. Poté byly vzorky přeneseny do prohloubených jamek v inokulovaném agaru. Testy byly provedeny dvakrát pro každý mikroorganismu a extrakt. Jako blank byla použita destilovaná voda.

Po uplynutí inkubační doby 48 hodin byly měřeny inhibiční zóny a výsledky byly zpracovány do tabulky 15.

Tabulka 15: Srovnání velikosti inhibičních zón, rozměry jsou uvedené v mm

extrakt		<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>
E1	1	3	3	2	2	3
	2	2	2	2	3	4
	3	2	3	3	3	2
	Ø	2,33	2,67	2,33	2,67	3,00
	blank	1	2	1	2	1
E2	1	3	1	5	2	3
	2	2	3	4	4	3
	3	1	2	4	4	3
	Ø	2,00	2,00	4,33	3,33	3,00
	blank	1	1	2	1	1
E3	1	2	3	3	2	2
	2	2	2	4	3	3
	3	2	1	2	2	3
	Ø	2,00	2,00	3,00	2,33	2,67
	blank	1	1	1	1	2
E4	1		2			
	2		3			
	3		3			
	Ø		2,67			
	blank		2			

Z údajů uvedených v tabulce lze vyčíst, že E1 (kávový olej, získaný extrakcí SCG hexanem) má nejvyšší antimikrobiální aktivitu proti bakterii *Micrococcus luteus* a z kvasinek proti *Candida glabrata*. Inhibiční zóny extraktu E2 (extraktu SCG 75% Ethanolem) jsou nejvíce patrné u bakterií *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Taktéž extrakt 70% Acetonem (E3) má největší inhibiční zóny při použití bakterií *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus*. Extrakt kávové sedliny v diethyletheru (E4) byl kultivován pouze na agaru s inokulovanou *Saccharomyces cerevisiae*. Velikost inhibičních zón tohoto extraktu v porovnání s blankem je však skoro srovnatelná.

Díky optimalizaci metody lyofilizací extraktů byly prokázány antibakteriální vlastnosti u testovaných vzorků. Lyofilizací bylo dosaženo silnější antimikrobiální aktivity u vzorků E1 (hexan) a E2 (75% ethanol). Vzorek E3 (70% aceton) prokazoval stejně silnou antimikrobiální schopnost jak ve formě extraktu, tak i lyofilizátu.

4.1.2.3 Bujonová diluční metoda

Pomocí bujonové diluční metody byla hledána antimikrobiální účinnost fenolických lyofilizátů. Účinek byl testovaný na vybraných zástupcích mikroorganismů a extraktech vyhodnocených z kapitoly 4.1.2.2. Antimikrobiální aktivita byla měřena na základě změny zákalu po kultivační době. Jako 100% růst mikroorganismu byly použity naměřená spektrální data na základě růstu daného mikroorganismu s použitím destilované vody jako inhibitoru.

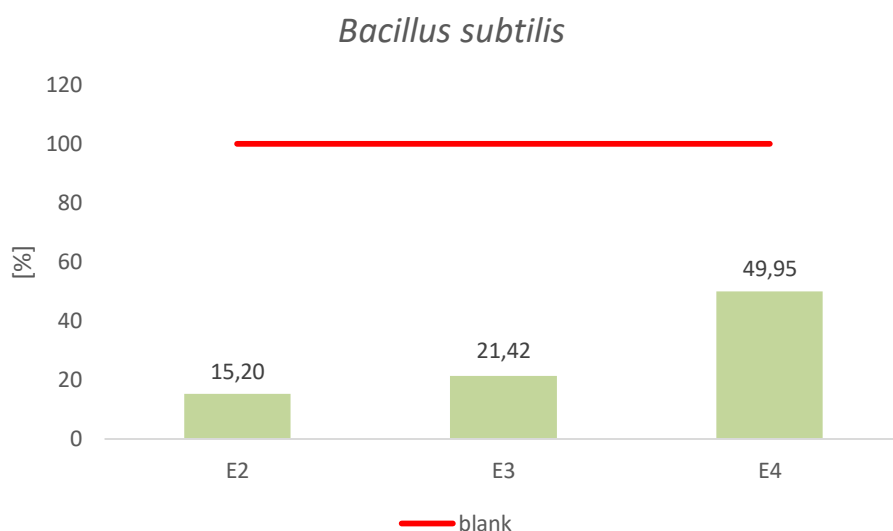
Z naměřených dat byly vypočteny % účinnosti. Od 0 do 10% lze inhibici považovat za neúčinnou, 10-40% málo účinnou a od 40 % více za účinnou.

Bacillus subtilis

V tabulce 16 jsou shrnuty naměřená data lyofilizátů použitých na stanovení antimikrobiální aktivity proti bakterii *B. subtilis*. $A_{\text{blank}} = 0,408$.

Tabulka 16: Antimikrobiální aktivita fenolických extraktů u *Bacillus subtilis*

	E2	E3	E4
A	0,062	0,087	0,204
%	15,196	21,422	49,951
účinnost [%]	84,804	78,578	50,049



Graf 4: Růst bacillu subtilis při použití fenolických extraktů

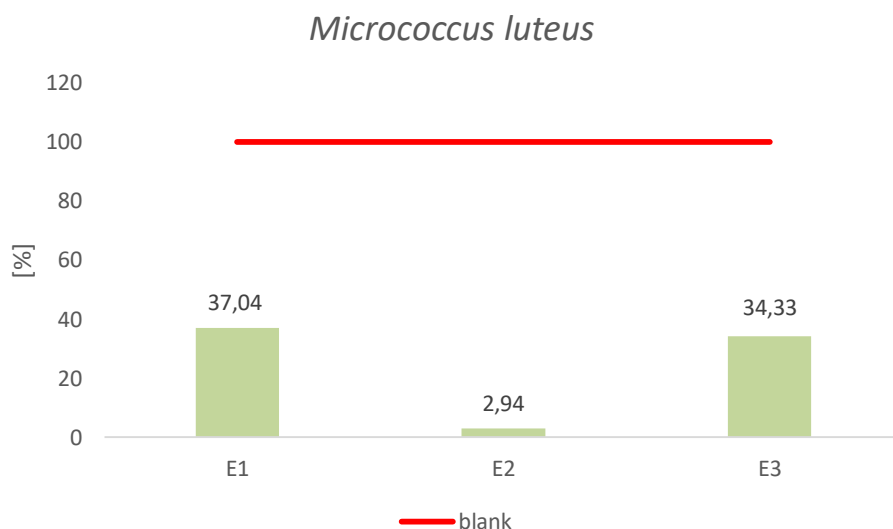
Z naměřených hodnot vyobrazených v grafu 4, lze vyčíst, že všechny vybrané extrakty byly schopné inhibovat růst mikroorganismu *B. Subtilis*. Nejvíce inhibujícím je extrakt SCG 75% Ethanolem, kde růst mikroorganismu probíhal pouze na 15 % z možných 100%. Všechny vybrané extrakty inhibovaly růst mikroorganismu a více než polovinu jeho růstu, která byla měřena při inhibici vodou.

Micrococcus luteus

Naměřená data antimikrobiální aktivity fenolických extraktů při použití mikroorganismu *Micrococcus luteus* jsou shrnuta v tabulce 17, kdy $A_{\text{blank}} = 0,886$.

Tabulka 17: Antimikrobiální aktivita fenolických extraktů u *Micrococcus luteus*

	E1	E2	E3
A	0,328	0,026	0,304
%	37,041	2,936	34,330
účinnost [%]	62,959	97,064	65,669



Graf 5: Růst mikroorganismu *Micrococcus luteus* při použití fenolických extraktů

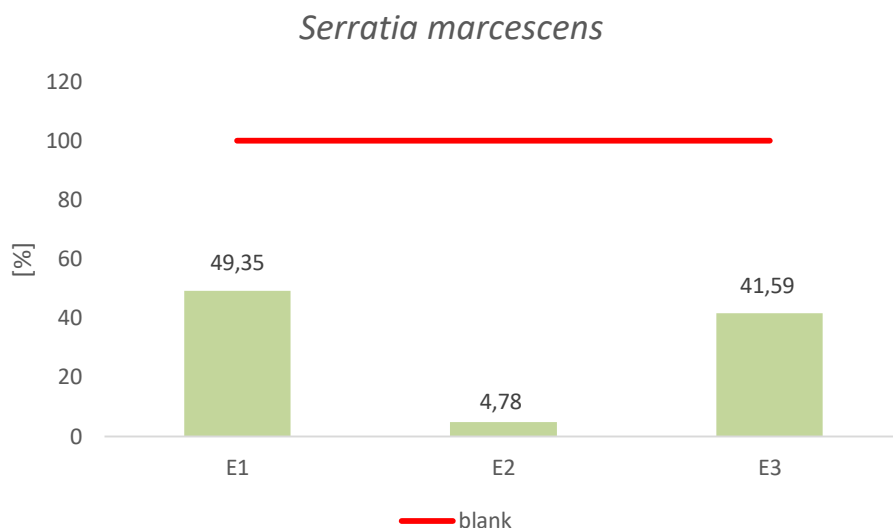
Z grafu 5 lze vyčíst, že všechny vybrané extrakty byly schopné inhibovat růst *M. luteus* o více než polovinu jeho růstu. Nejvíce antibakteriální se ukazuje extrakt E2 získaný extrakcí SCG 75% Ethanolem.

Serratia marcescens

Naměřená data antimikrobiální aktivity fenolických extraktů při použití mikroorganismu *Serratia marcescens* jsou shrnuta v tabulce 18, kdy $A_{\text{blank}} = 0,885$.

Tabulka 18: Antimikrobiální aktivita fenolických extraktů u *Serratia marcescens*

	E1	E2	E3
A	0,437	0,042	0,368
%	49,3501	4,777	41,587
účinnost [%]	50,649	95,223	58,413



Graf 6: Růst mikroorganismu *Serratia marcescens* při použití fenolických extraktů

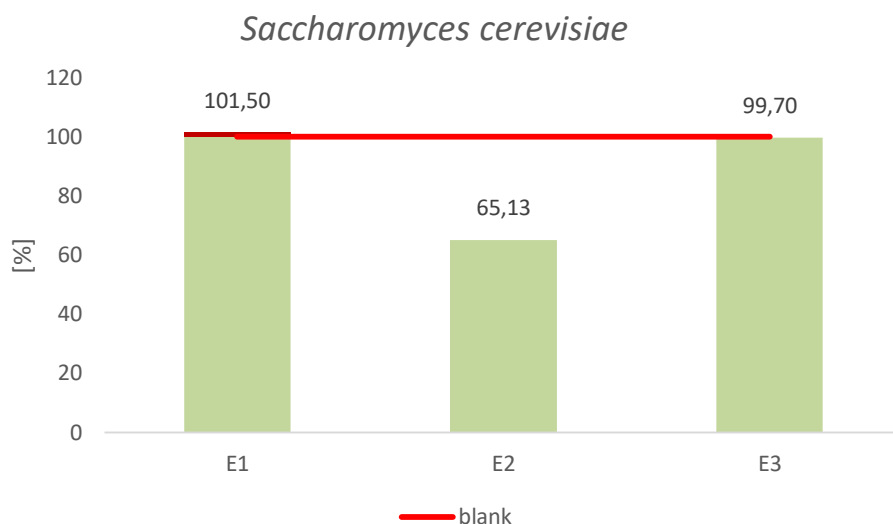
Z grafického zobrazení v grafu 6 lze vyčíst, že všechny vybrané extrakty prokázaly schopnost inhibovat růst mikroorganismu o více než polovinu jeho růstu. Nejvíce antibakteriální se ukazuje extrakt E2 získaný extrakcí SCG 75% Ethanolem

Saccharomyces cerevisiae

Naměřená data antimikrobiální aktivity fenolických extraktů při použití kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* jsou shrnuta v tabulce 19, kdy $A_{\text{blank}} = 0,903$.

Tabulka 19: antimikrobiální aktivita fenolických extraktů u *Saccharomyces cerevisiae*

	E1	E2	E3
A	0,916	0,588	0,900
%	101,496	65,130	99,695
účinnost [%]	-1,496	34,870	0,305



Graf 7: Růst kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* při použití fenolických extraktů

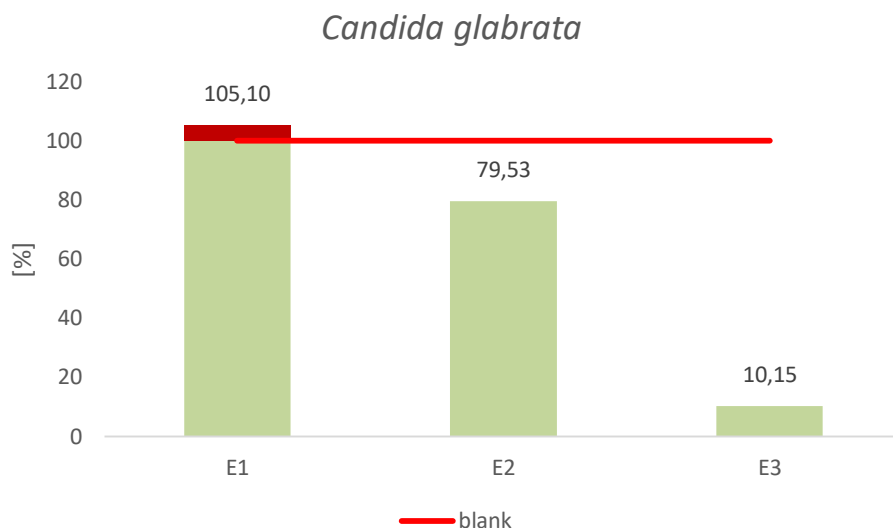
Dle naměřených hodnot v grafu 7 je patrné, že schopnost inhibovat růst kvasinky *S. cerevisiae* je schopný inhibovat pouze extrakt získaný extrakcí SCG 75% Ethanolem. Další testované extrakty se schopností inhibovat růst dané kvasinky příliš neliší ve srovnání s blankem.

Candida glabrata

Naměřená data antimikrobiální aktivity fenolických extraktů při použití mikroorganismu *Candida glabrata* jsou shrnuta v tabulce 20, kdy $A_{\text{blank}} = 1,251$.

Tabulka 20: Antimikrobiální aktivita fenolických extraktů u *Candida glabrata*

	E1	E2	E3
A	1,310	0,991	0,127
%	105,0963	79,5345	10,1525
účinnost [%]	-5,0963	20,4655	89,8475



Graf 8: Růst mikrororganismu *Candida glabrata* při použití fenolických extraktů

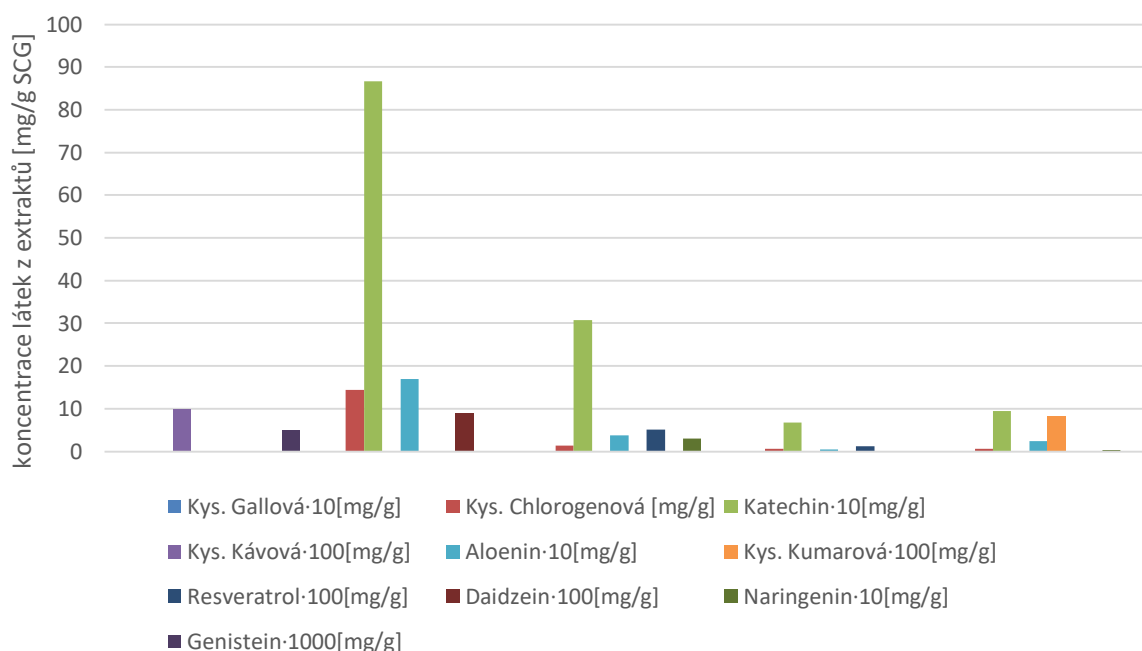
Z grafického zobrazení (Graf 8) je patrné, že kávový olej spíše podporuje růst *C. glabrata*. Naopak jako velmi inhibující pro růst této kvasinky se jeví extrakt E3 (získaný extrakcí SCG 70 % Acetonem). Extrakt SCG 75% Ethanolem inhibuje růst kvasinky přibližně o 20% v porovnání s blankem.

4.1.3 Identifikace fenolických látek pomocí HPLC

Dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.6 bylo stanoveno zastoupení fenolických látek v extraktech. Naměřená data jsou shrnuta v tabulce 21 a znázorněna v grafu 9.

Tabulka 21: Identifikace látek ve fenolických extraktech pomocí HPLC, koncentrace jsou uvedeny v mg/g kávové sedliny

látká	E1	E2	E3	E4	E5
Kys. Gallová	n.a.	1,44	0,14	0,06	0,07
Kys. Chlorogenová	n.a.	86,72	30,82	6,73	9,48
Katechin	1,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Kys. Kávová	n.a.	0,17	0,04	0,01	0,03
Aloenin	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,82
Kys. Kumarová	n.a.	n.a.	0,05	0,01	n.a.
Resveratrol	n.a.	0,09	n.a.	n.a.	n.a.
Daidzein	n.a.	n.a.	0,03	n.a.	0,01
Naringenin	0,50	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Genistein	0,01	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.



Graf 9: Zastoupení fenolických látek v extraktech

Z naměřených hodnot je patrná různorodost zastoupení fenolických látek v extraktech. V kávovém oleji byl identifikován Katechin o koncentraci 1 mg na 1 g kávové sedliny. Dále zde byl identifikován Naringerin o koncentraci 0,50 mg/g a ve velmi malém zastoupení Genistein o koncentraci 0,005 m/g. V extraktu SCG 75% Ethanolem bylo identifikováno velké množství kyseliny chlorogenové o koncentraci 86,77 mg/g. Identifikována byla v tomto extraktu i kyselina gallová, kyselina kávová a v malém množství i resveratrol. Ve vzorku E3 (extrakce SCG 70% Acetonem) bylo identifikováno velké množství kyseliny chlorogenové, a to o koncentraci 30,82 mg/g, dále také kyselina gallová, kyselina kávová, kyselina kumerová a diadzein. V extraktu SCG diethyletherem (E4) byla v největším množství zastoupena kyselina chlorogenová. V malém množství zde byly identifikovány kyselina gallová, kávová a kumerová. V extraktu pomocí ethylacetátu (E5) byla identifikována kyselina chlorogenová a Aloenin. V menší koncentraci zde byly zastoupeny i kyseliny gallová a kávová i Daidzein. Z uvedených dat vyplývá, že největší koncentraci kyselin chlorogenové, gallové i kávové obsahuje vzorek E2.

Vzorek E2 měl největší antimikrobiální aktivitu vůči bakteriím i kvasinkám a tento extrakt obsahoval největší množství kyseliny chlorogenové, až 86, 7 mg na 1 g SCG. Tyto výsledky se shodují s literaturou [57], kde je kyselina chlorogenová označena jako odpovědná za antimikrobiální aktivitu.

4.2 Fermentace kávové sedliny

4.2.1 Stanovení antimikrobiální aktivity

4.2.1.1 Jamková difúzní metoda

Metoda byla provedena dle postupu uvedeném v kapitole 3.2.5.1. Zlyofilizované vzorky byly zředěny vodou a v množství 100 μ m pipetovány do jamek vyhloubených v agaru se

zaočkovaným mikroorganismem. Následně byly takto připravené misky kultivovány při 30 a 37°C po dobu 48 hodin. Testy byly provedeny několikrát a výsledky byly zprůměrovány. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 22.

Tabulka 22: Naměřené inhibiční zóny

extrakt	vzorek	<i>C. glabrata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. luteus</i>
SCG 1	1	2	2	2	1	2
	2	2	1	1	2	3
	3	1	2	1	2	1
	Ø	1,67	1,67	1,33	1,67	2,00
	blank	1	1	1	1	1
SCG 2	1	1	1	3	1	3
	2	2	2	2	1	2
	3	2	1	2	2	2
	Ø	1,67	1,33	2,33	1,33	2,33
	blank	1	1	1	1	1
SCG 3	1	1	2	2	1	2
	2	1	1	2	2	2
	3	2	2	7	1	5
	Ø	1,33	1,67	3,67	1,33	3,00
	blank	1	1	1	1	1
SCG4	1	1	1	3	2	3
	2	2	1	5	1	2
	3	1	2	4	2	2
	Ø	1,33	1,33	4,00	1,67	2,33
	blank	1	2	1	1	1
SCG 5	1	1	2	6	1	2
	2	2	2	3	2	3
	3	1	1	5	2	2
	Ø	1,33	1,67	4,67	1,67	2,33
	blank	1	1	1	1	1
SCG 6	1	2	1	6	1	3
	2	1	1	8	1	2
	3	2	2	6	2	2
	Ø	1,67	1,33	6,67	1,33	2,33
	blank	1	2	2	1	1
F1	1	2	2	2	2	5
	2	1	2	3,5	3,5	5
	3	1,5	1	5	2,5	5
	Ø	1,50	1,67	3,50	2,67	5,00
	blank	1	1	1	1	2
F2	1	2	1	3	2	7
	2	4	1	5	2	6
	3	3	2	7	2	5

	Ø	3,00	1,33	5,00	2,00	6,00
	blank	1	2		1	2
F3	1	2	2	2	2	4
	2	2	2	4	2	1
	3	2	1	2	2	5
	Ø	2,00	1,67	2,67	2,00	3,33
	blank	1	1	1	1	1
F4	1	2	2	6	2	5
	2	2	2	7	2	5
	3	1	1	5	2	4
	Ø	1,67	1,67	6,00	2,00	4,33
	blank	1	1	2	1	2

Z naměřených dat lze usuzovat, že antimikrobiální aktivitu mají všechny zkoumané vzorky. Získané lyofilizáty mají nejlepší antimikrobiální aktivitu vůči bakterii *B. subtilis*. Z naměřených výsledků je patrná velká antibakteriální schopnost zkoumaných extraktů. Antimykotické vlastnosti zkoumaných extraktů se v porovnání antibakteriálními, nezdají příliš velké. Dle získaných hodnot, lze účinnost nefiltrovaných vzorků seřadit následovně: SCG 6 > SCG 5 > SCG 4 > SCG 3 > SCG 2 > SCG 1. Je zde klesající účinnost nefiltrovaných vzorků závislá na koncentraci zaočkované kultury a velikosti navážky v médiu při procesu fermentace. Lze tedy říci, že s vyšší koncentrací zaočkované kultury a množství SCG, tím vyšší antimikrobiální účinek. U filtrovaných vzorků je možné zařadit účinnost v následujícím pořadí: F4 > F2 > F2 > F3. Z těchto hodnot lze vypočítat závislost účinnosti na koncentraci kultury v médiu. S větší koncentrací kultury zaočkované do média při fermentaci roste i antimikrobiální účinek filtrovaných vzorků.

4.2.1.2 Bujonová diluční metoda

Pomocí bujonové diluční metody byla hledána antimikrobiální účinnost fenolických extraktů. Účinek byl testovaný na vybraných zástupcích mikroorganismů a extraktech vyhodnocených z kapitoly 4.1.2.2. Antimikrobiální aktivita byla měřena na základě změny zákalu po kultivační době. Jako 100% růst mikroorganismu byla použita naměřená spektrální data na základě růstu daného mikroorganismu s použitím destilované vody jako inhibitoru. Z naměřených dat byly vypočteny % účinnosti. Od 0 do 10% lze inhibici považovat za neúčinnou, 10-40% málo účinnou a od 40 % více za účinnou.

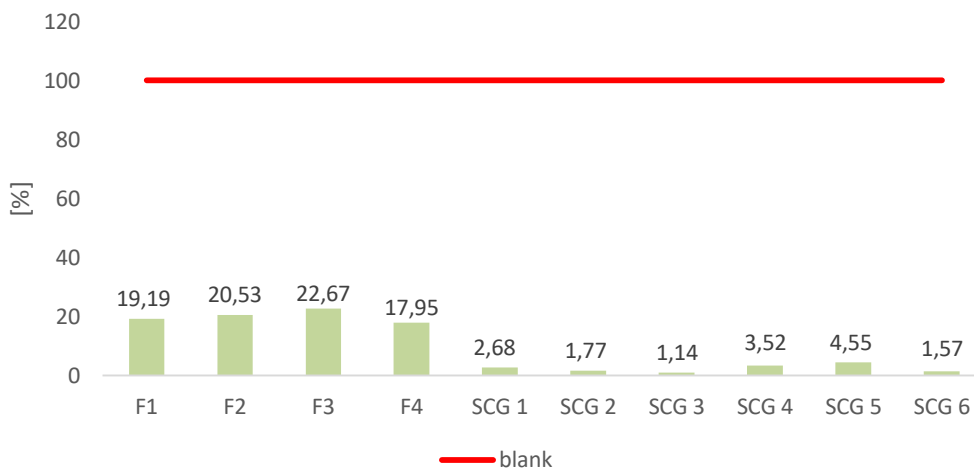
Bacillus subtilis

Tabulka 23: Antimikrobiální aktivita vzorků získaných fermentací kávové sedliny

	SCG 1	SCG 2	SCG 3	SCG 4	SCG 5	SCG 6
A	0,020	0,013	0,009	0,026	0,034	0,012
%	2,679	1,775	1,139	3,5164	4,555	1,574
účinnost [%]	97,321	98,225	98,861	96,4836	95,445	98,426
	F1	F2	F3	F4		
A	0,143	0,153	0,169	0,134		

%	19,190	20,529	22,673	17,950
účinnost [%]	80,810	79,471	77,328	82,050

Bacillus subtilis



Graf 10: Růst mikroorganismu *B. subtilis* při inhibici analyzovaných vzorků

Z naměřených hodnot v tabulce 23 a grafického zobrazení (Graf 10) jsou patrné inhibiční schopnosti všech analyzovaných vzorků. Růst mikroorganismu *B. subtilis* nedosahuje ani 30% své růstové rychlosti při srovnání s inhibicí blankem. Z naměřených dat není patrný velký rozdíl inhibičního účinku mezi jednotlivými vzorky. Vzorky, které byly filtrovány před lyofilizací, však prokazují nižší antimikrobiální aktivitu, než vzorky nefiltrované.

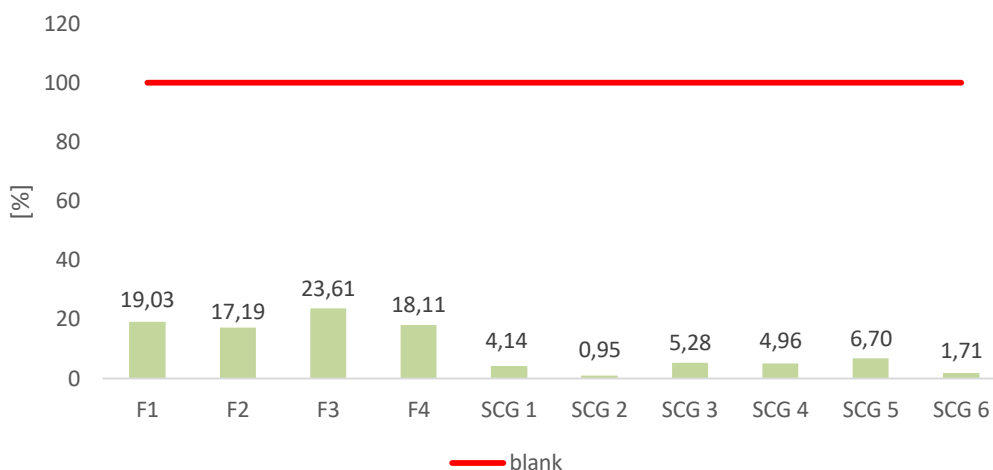
Micrococcus luteus

Naměřená data byla zaznamenána do tabulky 24.

Tabulka 24: Antimikrobiální aktivita vzorků získaných fermentací kávové sedliny

	SCG 1	SCG 2	SCG 3	SCG 4	SCG 5	SCG 6
A	0,033	0,008	0,042	0,039	0,053	0,014
%	4,140	0,948	5,278	4,962	6,700	1,707
účinnost [%]	95,860	99,052	94,722	95,038	93,300	98,293
	F1	F2	F3	F4		
A	0,151	0,136	0,187	0,143		
%	19,027	17,193	23,609	18,110		
účinnost [%]	80,974	82,807	76,391	81,890		

Micrococcus luteus



Graf 11: Růst mikroorganismu M. luteus při inhibici vzorků získaných fermentací kávové sedliny

Z grafického zobrazení (Graf 11) jsou patrné schopnosti inhibovat růst *M. luteus* u všech analyzovaných vzorků. Filtrované vzorky vykazují poněkud nižší antibakteriální aktivitu, než vzorky nefiltrované. Je zde patrný malý rozdíl mezi vzorky F1, F3, kde byla při fermentaci zaočkována 2,5 % kultura a vzorky F2, F4, kde byla zaočkována 5 % kultura při fermentaci. Z uvedených hodnot filtrovaných vzorků lze usuzovat, že koncentrovanější inokulum produkuje látky s menší antibakteriální aktivitou, než inokulum s vyšší koncentrací kultury.

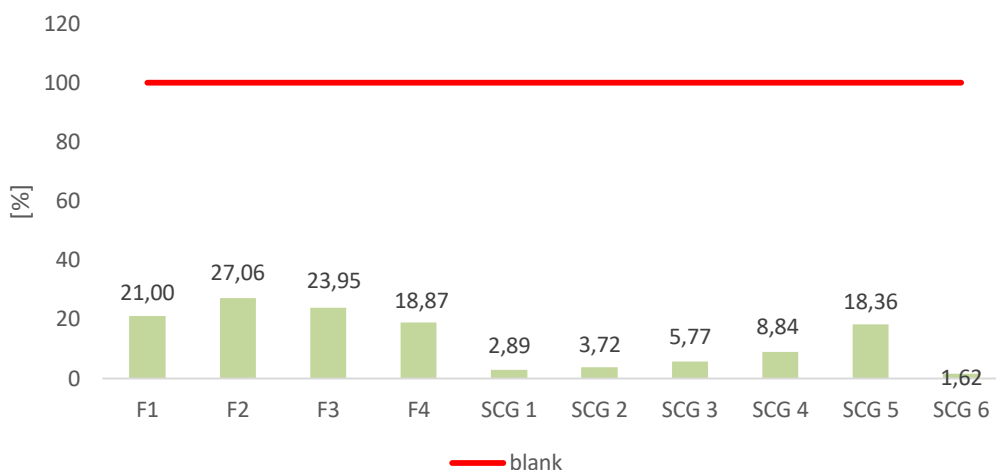
Serratia marcescens

Tabulka 25 shrnuje naměřená data antimikrobiální aktivity.

Tabulka 25: antibakteriální aktivita vzorků získaných fermentací kávové sedliny

	SCG 1	SCG 2	SCG 3	SCG 4	SCG 5	SCG 6
A	0,020	0,026	0,040	0,061	0,127	0,011
%	2,886	3,716	5,772	8,838	18,362	1,623
účinnost [%]	97,114	96,284	94,228	91,162	81,638	98,377
	F1	F2	F3	F4		
A	0,146	0,188	0,166	0,131		
%	20,996	27,056	23,954	18,867		
účinnost [%]	79,004	72,944	76,046	81,133		

Serratia marcescens



Graf 12: Růst mikroorganismu *Serratia marcescens* při inhibici látkami získanými fermentací kávovou sedlinou.

Z grafického zobrazení (Graf 12) jsou patrné inhibiční schopnosti všech analyzovaných vzorků. Růst mikroorganismu *S. marcescens* je inhibován o více než 70 % své růstové rychlosti při srovnání s inhibicí blankem. Z naměřených dat není patrný velký rozdíl inhibičního účinku mezi jednotlivými vzorky.

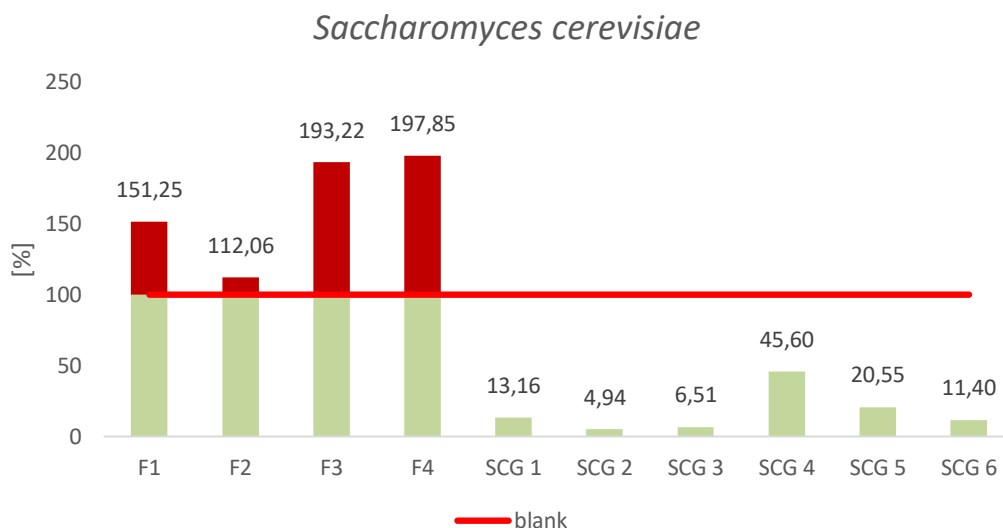
Saccharomyces cerevisiae

Naměřená data jsou shrnuta v tabulce 26 a následně znázorněna v grafu 13.

Tabulka 26: antibakteriální aktivita vzorků získaných fermentací kávové sedliny

	SCG 1	SCG 2	SCG 3	SCG 4	SCG 5	SCG 6
A	0,045	0,017	0,022	0,155	0,070	0,039
%	13,161	4,941	6,507	45,597	20,548	11,399
účinnost [%]	86,840	95,059	93,493	54,403	79,452	88,601

	F1	F2	F3	F4
A	0,515	0,382	0,658	0,674
%	151,247	112,060	193,224	197,847
účinnost [%]	-51,247	-12,060	-93,224	-97,847



Graf 13: Růst mikroorganismu *S. cerevisiae* při inhibici vzorky získaných fermentací kávové sedliny

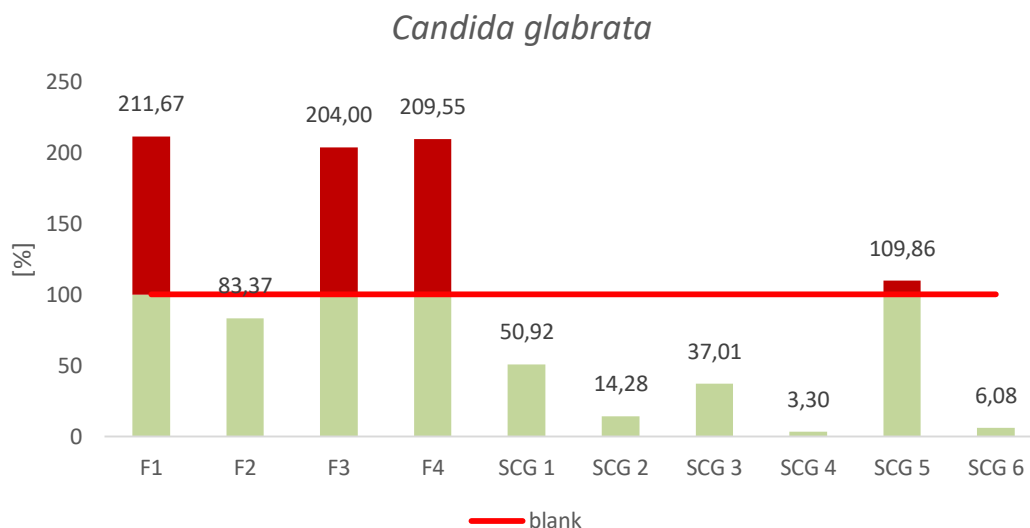
Z grafického zobrazení je patrný rozdíl mezi vzorky filtrovanými a nefiltrovaným. Filtrované vzorky neprokazují schopnost antitymykoly a lze usoudit, že slouží jako dobrý substrát pro růst *S. cerevisiae*. Nefiltrované vzorky prokazují dobrý antitymykoly účinek. Nejmenší schopnost inhibice z nefiltrovaných vzorků prokazuje vzorek SCG 4, který je získán z navážky 1g SCG a koncentrace 2,5% kultury. Dále lze z grafu u nefiltrovaných vzorků vyčíst klesající růst mikroorganismu se zvyšující se koncentrací kultury zaočkované do média při fermentaci vzorků.

Candida glabrata

Naměřená data jsou shrnuta v tabulce 27.

Tabulka 27: antibakteriální aktivita vzorků získaných fermentací kávové sedliny

	SCG 1	SCG 2	SCG 3	SCG 4	SCG 5	SCG 6
A	0,319	0,089	0,232	0,021	0,687	0,038
%	211,671	83,373	203,997	209,552	50,919	14,282
účinnost [%]	-111,671	16,627	-103,997	-109,552	49,081	85,718
	F1	F2	F3	F4		
A	1,324	0,522	1,276	1,311		
%	211,671	83,373	203,997	209,552		
účinnost [%]	-111,671	16,627	-103,997	-109,552		



Graf 14: růst mikroorganismu při inhibici vzorky získaných fermentací kávové sedliny

Z grafu 14 lze vyčíst, že filtrované vzorky neprokazují schopnost antimykotického působení a jsou vhodným substrátem pro růst *C. glabrata*. Lze usoudit, že slouží jako dobrý substrát. Nefiltrované vzorky prokazují dobrý antimykotický účinek až na vzorek SCG 5, který je získán z navážky 1 g SCG a koncentrace 5% kultury.

4.2.2 Identifikace fenolických látek pomocí HPLC

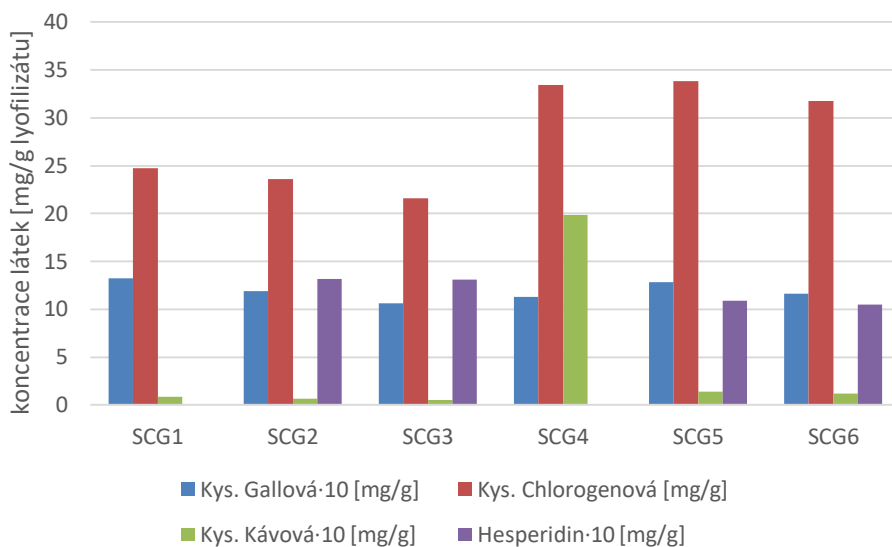
Dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.6 byly stanoveny fenolické látky v extraktech. Výsledky jsou znázorněny v tabulce 28 a tabulce 29.

Tabulka 28: Identifikace látek v analyzovaných vzorcích pomocí HPLC, koncentrace jsou uvedeny v mg/g kávové sedliny

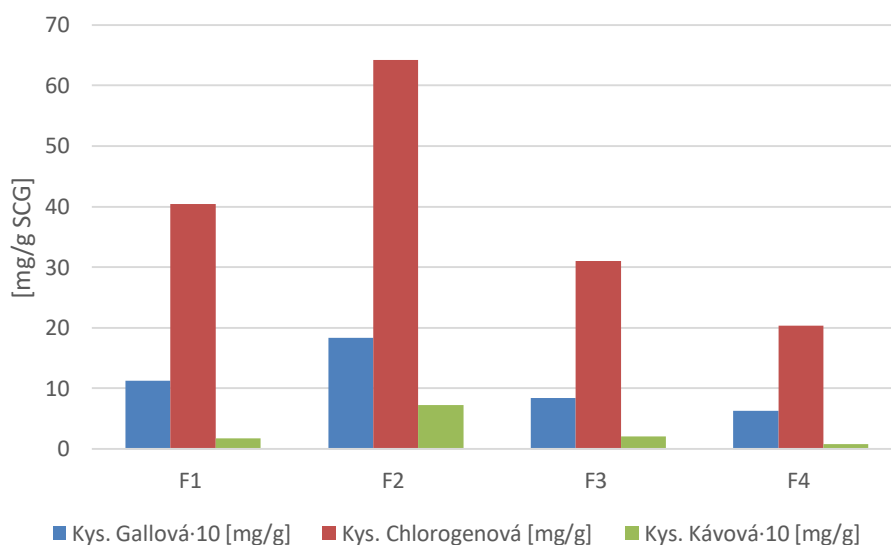
látk	SCG1	SCG2	SCG3	SCG4	SCG5	SCG6
Kys. Gallová	1,32	1,189	1,06	1,13	1,28	1,16
Kys. Chlorogenová	24,71	23,59	21,56	33,41	33,85	31,76
Kys. Kávová	0,08	0,07	0,06	1,99	0,14	0,12
Hesperidin	n.a.	1,32	1,31	n.a.	1,09	1,05

Tabulka 29: Identifikace látek v analyzovaných nefiltrovaných vzorcích pomocí HPLC, koncentrace jsou uvedeny v mg/ml

látk	F1	F2	F3	F4
Kys. Gallová	1,12	1,84	0,84	0,63
Kys. Chlorogenová	40,49	64,24	30,99	20,41
Kys. Kávová	0,18	0,73	0,21	0,08



Graf 15: Zastoupení fenolických látek v nefiltrovaných vzorcích získaných fermentací kávové sedliny.



Graf 16: Zastoupení fenolických látek ve filtrovaných vzorcích získaných fermentací kávové sedliny.

Z naměřených hodnot u nefiltrovaných vzorků (Graf 15), lze identifikovat velké množství kyseliny chlorogenové a v menším množství i kyseliny kávové. Koncentrace obou kyselin jsou mezi nefiltrovanými vzorky velmi podobné. Dále zde byla identifikována kyselina kávová, která má o něco menší koncentraci ve vzorcích připravených z navážky 0,5 g kávové sedliny na fermentaci (SCG 1, SCG 2 a SCG 3) než ve vzorcích z navážky 1 g kávové sedliny. U nefiltrovaných vzorků s koncentrací kultury 5 a 10 % (SCG 2, SCG 3, SCG 5, SCG 6) byl identifikován bioflavonoid Hesperidin.

Z naměřených dat u filtrovaných vzorků (Graf 16) byla stanovena vysoká koncentrace kyseliny chlorgenové. Dále zde byly identifikovány kyseliny gallová a kávová. Nejvyšší koncentrace kyseliny chlorgenové byla změřena ve vzorku F2, který byl připraven z navážky 0,5 g kávové sedliny a koncentrace 5 % kultury při fermentaci. Tento vzorek obsahoval i největší koncentrace kyseliny gallové a kávové.

5 ZÁVĚR

Káva je nejpopulárnější nápoj dnešní doby, a proto neustále vznikají odpadní produkty, jako je kávová sedlina. SCG obsahuje spoustu organických i anorganických sloučenin, jež mohou být použity jako cenné vedlejší produkty v mnoha průmyslových odvětvích. Tato diplomová práce byla cílena na antimikrobiální aktivitu fenolických extraktů, na podrobení kávové sedliny procesu fermentace a antimikrobiální aktivitu vzorků získaných fermentačním procesem. U všech vzorků byla testována antimikrobiální aktivita, pro možnost jejich využití v odvětví medicíny.

Fenolické extrakty byly získány extrakcí kávové sedliny polárními i nepolárními rozpouštědly a to hexanem, 70% Ethanolem, 75% Acetonem, Diethyletherem a Ethylacetátem kyseliny octové. Pro antimikrobiální testy byly použity kultury kmenů gram-pozitivních bakterií, *Bacillus subtilis* a *Micrococcus luteus* a jeden druh gram-negativních a to *Serratia marcescens*. Dále byly použity druhy kvasinek *Candida glabrata* a *Saccharomyces cerevisiae*. Všechny kmeny byly kultivovány za vhodných podmínek.

Fenolické extrakty byly nejprve podrobeny antimikrobiální testům, konkrétně jamkové difúzní metodě. Výsledkem prvního experimentu byla optimalizována příprava fenolických extraktů a z testů vyřazeno rozpouštědlo E5, tedy extrakt kávové sedliny ethyl acetátem. Po optimalizaci metody byly jamkové difúzní testy několikrát opakovány pro dosažení optimálních výsledků. Tímto experimentem byla prokázána antimikrobiální účinnost fenolických extraktů. Z naměřených dat lze pozorovat velmi dobré antibakteriální schopnosti použitých extraktů. Nejlépe prokazatelné byly inhibiční zóny u bakteriálního kmene *B. subtilis* lyofilizovanými extrakty 75 % ethanolem a 70% acetonem. Největší antibakteriální účinnost zde prokázal extrakt E2 (75 % ethanol) v podobě lyofilizátu. Extrakt E3 byl druhým vhodným antimikrobiálním extraktem jak už v podobě extraktu, tak i lyofilizátu. Dalším provedeným experimentem na testování antimikrobiální aktivity byla bujonová diluční metoda. V tomto experimentu došlo k ověření velmi dobré schopnosti fenolických extraktů inhibovat růst bakterií. Schopnost inhibovat růst obou použitých druhů kvasinek prokázal extrakt získaný extrakcí kávové sedliny 75% Ethanolem. Inhibovat růst kvasinky *C. glabrata* prokázal i vzorek E3, získaný extrakcí kávové sedliny 70% acetonem. Fenolické extrakty byly také podrobeny metodám identifikace. Jako první bylo provedeno stanovení redukujících cukrů pomocí kyseliny 3,5-dinitrosalicylové (DNS). Principem této metody je redukce 3,5-dinitrosalicylové kyseliny na 3-amino-5-nitrosalicylát za pomoci D-glukózy, kdy změnu lze detekovat kalorimetricky. Touto metodou byla stanovena koncentrace redukujících cukrů v extraktu kávové sedliny 75% ethanolem a to 2,97 mg/g kávové sedliny. Pro získání redukujících cukrů z kávové sedliny se využívá proces hydrolýzy. Extrakcí kávové sedliny jsou tedy nízké koncentrace redukujících cukrů očekávány. Jako další bylo určeno celkové množství polyfenolů. V tomto experimentu byla stanovena nejvyšší koncentrace polyfenolů v extraktu 75% ethanolem a to konkrétně 17,68 mg/g. Následně byla stanovena celková koncentrace flavonoidů, kde nejvyšší dosažená koncentrace flavonoidů byla naměřena také u extraktu 75% ethanolem a to 12,71 mg/g. Tyto výsledky se shodují se studiemi, kdy se pro získání sacharidů, fenolických látek i vitamínů využívá nejvíce extrakce kávové sedliny ethanolem. Z naměřených

dat vyplývá, že velmi dobrý zisk polyfenolů a flavonoidů je možný také použitím polárních (aceton) i nepolárních (hexan) rozpouštědel. Dále byla provedena identifikace fenolických látek pomocí kapalinové chromatografie. Z výsledných hodnot vyplývají rozdíly mezi extrakty. V kávovém oleji, tudíž v extraktu kávové sedliny hexanem, byl identifikován Katechin, Nanirgerin a v malém množství Genistein. U extraktu 75% ethanolem byla identifikována kyselina chlorgenová, kyselina gallová, kyselina kávová a v malém množství Resveratrol. Při analýze extraktu 70% acetonem byla identifikována kyselina chlorgenová, kyselina gallová, kyselina kávová, kyselina kumarová a diadzein. Kyseliny chlorgenová, gallová, kávová i kumerové byly také identifikovány v extraktu kávové sedliny diethyl etherem. Ve vzorku po extrakci kávové sedliny ethyl acetátem byla identifikována kyselina chlorgenová, aloenin, kyselina kávová, gallová a daidzein. Naměřená data prokázala antimikrobiální vlastnosti použitých fenolických extraktů. Z výsledků lze usoudit, že nejlepšími, ze stanovovaných rozpouštědel, se jeví ethanol a aceton.

Dále byla kávová sedlina podrobena procesu fermentace, kdy byla navážena do Readers media a po zaočkování kulturou kvasinky *S. cerevisiae*, byla ponechána v klidu po dobu 23 dní. Poté byl supernatan zfiltrován a lyofilizován. Takto připravené vzorky byly podrobeny antibakteriálním testům a identifikačnímu stanovení pomocí kapalinové chromatografie. Vzorky získané fermentací kávové sedliny prokázaly antibakteriální schopnost. Nefiltrované vzorky se však ukázaly být dobrým substrátem pro růst kvasinek. Antimikrobiální vlastnosti vzorků by se daly využít pro syntézu kvantových teček z kávové sedliny, avšak by měla být metoda ještě modifikována pro získání i antitumorových vlastností vzorků.

Antimikrobiální vlastnosti byly potvrzeny u všech zkoumaných vzorků. Nejslibnější výsledky antimikrobiálních testů měl lyofilizát extraktu 75 % ethanolem, který měl dobré výsledky pro inhibici růst bakterií i kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinka *Candida glabrata* byla nejvíce inhibována lyofilizátem extraktu 70% acetonem. Lyofilizát extraktu 75 % ethanolem měl také nejvyšší naměřenou koncentraci kyseliny chlorgenové, a to 86,7 mg na 1 g SCG, která je zodpovědná za antimikrobiální aktivitu. Obsah kyseliny chlorgenové ve filtrovaných vzorcích z fermentace kávové sedliny se pohyboval v rozmezí 20,4-64,2 mg/g a v nefiltrovaných vzorcích v rozmezí 21,6-33,9 mg/g.

Vzhledem k velkému množství a snadné dostupnosti kávové sedliny naznačují výsledky této práce možnost jednoduchého získání antimikrobiálního extraktu. Takový extrakt by bylo možné použít pro stabilizaci roztoků, dezinfekci například povrchů nebo jako přísada pro stabilizaci krémů. V budoucnu by bylo vhodné provést stabilitní testy získaných extraktů pro následné použití. Dále by bylo vhodné provést zkoušky na toxicitu vůči buňkám a to především v případě použití extraktu v medicíně a farmacii, například pro syntézu kvantových teček, či pro kožní aplikace.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BRZOŇOVÁ, Lenka. *Svět kávy*. 2. přepracované vydání. Praha: Sdružení českých spotřebitelů, z.ú., 2017. Jak poznáme kvalitu?. ISBN 978-80-87719-53-4.
- [2] AUGUSTÍN, Jozef. *U kávy o kávě a kávovinách*. V Brně: Jota, 2016. ISBN 978-80-7462-850-4.
- [3] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-208-2.
- [4] KOVALCIK, Adriana, Stanislav OBRUCA a Ivana MAROVA. Valorization of spent coffee grounds: A review. *Food and Bioprocess Technology*. 2018, **11**, 104-119. DOI: 10.1016/j.fbp.2018.05.002. ISSN 09603085. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308518302797>
- [5] DAVIES VESELÁ, Petra. *Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu*. Praha: Smart Press, 2010. ISBN 978-80-87049-34-1.
- [6] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967-0641-1.
- [7] MURTHY, Pushpa a M. MADHAVA NAIDU. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resources, Conservation and Recycling*. 2012, **66**, 45-58. DOI: 10.1016/j.resconrec.2012.06.005. ISSN 09213449. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921344912000894>
- [8] ESQUIVEL, Patricia a Víctor JIMÉNEZ. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*. 2012, **46**(2), 488-495. DOI:

10.1016/j.foodres.2011.05.028. ISSN 09639969. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996911003449>

- [9] NARITA, Yusaku a Kuniyo INOUE. Review on utilization and composition of coffee silverskin. *Food Research International*. 2014, **61**, 16-22. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.01.023. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996914000295>
- [10] OBRUCA, Stanislav, Pavla BENESOVA, Dan KUCERA, Sinisa PETRIK a Ivana MAROVA. Biotechnological conversion of spent coffee grounds into polyhydroxyalkanoates and carotenoids. *New Biotechnology*. 2015, **32**(6), 569-574. DOI: 10.1016/j.nbt.2015.02.008. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678415000333>
- [11] MASSEY, John. *Coffee: production, consumption and health benefits*. New York: Nova Publishers, 2016. Food and beverage consumption and health series. ISBN 978-163-4847-148.
- [12] SILVA, M.A., S.A. NEBRA, M.J. MACHADO SILVA a C.G. SANCHEZ. THE USE OF BIOMASS RESIDUES IN THE BRAZILIAN SOLUBLE COFFEE INDUSTRY. *Biomass and Bioenergy*. 1998, **14**(5-6), 457-467. DOI: 10.1016/S0961-9534(97)10034-4. ISSN 09619534. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953497100344>
- [13] MUSSATTO, Solange, Ercília MACHADO, Livia CARNEIRO a José TEIXEIRA. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*. 2012, **92**, 763-768. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.08.020. ISSN 03062619. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261911005162>
- [14] MAROUNEK, Milan a Jaroslav HAVLÍK. *Živiny a živinové potřeby člověka: učebnice pro studenty ČZU v Praze*. 3. vydání. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2020. ISBN 978-80-213-3018-4.
- [15] VOLF, Karel a František ANDRS. *Flavonoidy a jejich biologické působení*. 1. [Česko: s.n.], 2008. ISBN 978-80-254-4225-8.
- [16] SEO, Ho a Byung PARK. Phenolic compound extraction from spent coffee grounds for antioxidant recovery. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2019,

36(2), 186-190. DOI: 10.1007/s11814-018-0208-4. ISSN 0256-1115. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11814-018-0208-4>

- [17] ZIELINSKA, Aleksandra a I NOWAK. Tocopherols and rocotrienols as vitamin E. *CHEMIK*. 2014, **68**, 585-591.
- [18] CAVIN, C, D HOLZHAUSER, G SCHARF, A CONSTABLE, W.W HUBER a B SCHILTER. Cafestol and kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2002, **40**(8), 1155-1163. DOI: 10.1016/S0278-6915(02)00029-7. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691502000297>
- [19] MUELLER, Ulla, Tanja SAUER, Ingrid WEIGEL, Rohtraud PICHNER a Monika PISCHETSRIEDER. Identification of H₂O₂ as a major antimicrobial component in coffee. *Food & Function*. 2011, **2**(5). DOI: 10.1039/c0fo00180e. ISSN 2042-6496. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0fo00180e>
- [20] SRIKANDI, Fardiaz. Antimicrobial Activity of Coffe (coffea robusta) Extract. *ASEAN Food Journal*. 1995, **10**(3), 103-106.
- [21] DUANGJAI, Acharaporn, Nungruthai SUPHROM, Jukkrit WUNGRATH, Atcharaporn ONTAWONG, Nitra NUENGCHAMNONG a Atchariya YOSBOONRUANG. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (Coffea arabica L.) pulp aqueous extracts. *Integrative Medicine Research*. 2016, **5**(4), 324-331. DOI: 10.1016/j.imr.2016.09.001. ISSN 22134220. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213422016300932>
- [22] MARTÍNEZ-TOMÉ, Magdalena, Antonia JIMÉNEZ-MONREAL, Laura GARCÍA-JIMÉNEZ, Luis ALMELA, Luis GARCÍA-DIZ, Miguel MARISCAL-ARCAS a M. MURCIA. Assessment of antimicrobial activity of coffee brewed in three different ways from different origins. *European Food Research and Technology*. 2011, **233**(3), 497-505. DOI: 10.1007/s00217-011-1539-0. ISSN 1438-2377. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-011-1539-0>
- [23] MATA, Teresa, António MARTINS a Nídia CAETANO. Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*. 2018, **247**, 1077-1084. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.106. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417316711>

- [24] KOURMENTZA, C., Ch.N. ECONOMOU, P. TSAFRAKIDOU a M. KORNAROS. Spent coffee grounds make much more than waste: Exploring recent advances and future exploitation strategies for the valorization of an emerging food waste stream. *Journal of Cleaner Production*. 2018, **172**, 980-992. DOI: 10.1016/j.jclepro.2017.10.088. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652617323788>
- [25] KARMEE, Sanjib. A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste Management*. 2018, **72**, 240-254. DOI: 10.1016/j.wasman.2017.10.042. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X17307882>
- [26] JOOSTE, T., M. GARCÍA-APARICIO, M. BRIENZO, W. VAN ZYL a J. GÖRGENS. Enzymatic Hydrolysis of Spent Coffee Ground. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, **169**(8), 2248-2262. DOI: 10.1007/s12010-013-0134-1. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-013-0134-1>
- [27] CHIYANZY, Idan, Michel BRIENZO, Maria GARCÍA-APARICIO, Roberto AGUDELO a Johann GÖRGENS. Spent coffee ground mass solubilisation by steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology*. 2015, **90**(3), 449-458. DOI: 10.1002/jctb.4313. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4313>
- [28] PULS, Jürgen. Chemistry and biochemistry of hemicelluloses: Relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. *Macromolecular Symposia*. 1997, **120**(1), 183-196. DOI: 10.1002/masy.19971200119. ISSN 10221360. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/masy.19971200119>
- [29] SANTOS, Cátia, João FONSECA, Alfredo AIRES, João COUTINHO a Henrique TRINDADE. Effect of different rates of spent coffee grounds (SCG) on composting process, gaseous emissions and quality of end-product. *Waste Management*. 2017, **59**, 37-47. DOI: 10.1016/j.wasman.2016.10.020. ISSN 0956053X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X16305918>

- [30] AL-HAMAMRE, Zayed, Sascha FOERSTER, Franziska HARTMANN, Michael KRÖGER a Martin KALTSCHMITT. Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*. 2012, **96**, 70-76. DOI: 10.1016/j.fuel.2012.01.023. ISSN 00162361. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016236112000464>
- [31] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI a V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137-146 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/S0960-8524(02)00212-2. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852402002122>
- [32] STEINBÜCHEL, Alexander, ed. *Biopolymers Online* [online]. [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1002/3527600035.
- [33] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503-1555 [cit. 2019-11-30]. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00796700000000356>
- [34] VOLOVA, T. *Polyhydroxyalkanoates--plastic materials of the 21st century: production, properties, applications*. 1. Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, 2004. ISBN 15-903-3992-4.
- [35] HROMÁDKO, Jan, J HROMÁDKO, P MILER, V HÖNIG a P ŠTĚRBA. Využití bioethanolu jako paliva ve spalovacích motorech. *Chemické listy*. 2011, **105**(2), 122-128. ISSN 0009-2770.
- [36] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [37] LI, Xiaofeng, Vladimir STREZOV a Tao KAN. Energy recovery potential analysis of spent coffee grounds pyrolysis products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2014, **110**, 79-87. DOI: 10.1016/j.jaap.2014.08.012. ISSN 01652370. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165237014001909>

- [38] HARDGROVE, Sarah a Stephen LIVESLEY. *Applying spent coffee grounds directly to urban agriculture soils greatly reduces plant growth*. 2016, **18**, 1-8. DOI: 10.1016/j.ufug.2016.02.015. ISSN 16188667. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1618866716300103>
- [39] DING, Hui, Li-Wei CHENG, Ying-Ying MA, Ji-Lie KONG a Huan-Ming XIONG. Luminescent carbon quantum dots and their application in cell imaging. *New Journal of Chemistry*. 2013, **37**(8). DOI: 10.1039/c3nj00366c. ISSN 1144-0546. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3nj00366c>
- [40] DEVI, Pooja, Shefali SAINI a Ki-Hyun KIM. The advanced role of carbon quantum dots in nanomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2019, **141**. DOI: 10.1016/j.bios.2019.02.059. ISSN 09565663. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566319301794>
- [41] WANG, Liang, Weitao LI, Bin WU, Zhen LI, Shilong WANG, Yuan LIU, Dengyu PAN a Minghong WU. Facile synthesis of fluorescent graphene quantum dots from coffee grounds for bioimaging and sensing. *Chemical Engineering Journal*. 2016, **300**, 75-82. DOI: 10.1016/j.cej.2016.04.123. ISSN 13858947. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894716305733>
- [42] MOSIO, Petra. *Atlas bakterií*. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. ISBN 978-80-7395-467-3.
- [43] SEIFERT, Harald, Matthias KALTHEUNER a Francoise PERDREAU-REMY. Micrococcus luteus endocarditis: Case report and review of the literature. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1995, **282**(4), 431-435. DOI: 10.1016/S0934-8840(11)80715-2. ISSN 09348840. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0934884011807152>
- [44] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- [45] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.

- [46] FIDEL, Paul, Jose VAZQUEZ a Jack SOBEL. *Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, **12**(1), 80-96. DOI: 10.1128/CMR.12.1.80. ISSN 1098-6618. Dostupné z: <https://CMR.asm.org/content/12/1/80>
- [47] ZYGLER, A., M. SŁOMIŃSKA a J. NAMIEŚNIK. Soxhlet Extraction and New Developments Such as Soxtec. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*. Elsevier, 2012, **2**(1), 65-82. DOI: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00037-5. ISBN 9780123813749. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123813732000375>
- [48] SHAMSUDDIN, Nur'Atiqah, Suzana YUSUP, Wan IBRAHIM, Awais BOKHARI a LAI FATT CHUAH. Oil extraction from *Calophyllum inophyllum* L. via Soxhlet extraction: Optimization using response surface methodology (RSM). *2015 10th Asian Control Conference (ASCC)*. IEEE, 2015, , 1-6. DOI: 10.1109/ASCC.2015.7244791. ISBN 978-1-4799-7862-5. Dostupné z: <http://ieeexplore.ieee.org/document/7244791/>
- [49] MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, **31**(3), 426-428. DOI: 10.1021/ac60147a030. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>
- [50] SÁNCHEZ-RANGEL, Juan, Jorge BENAVIDES, J. HEREDIA, Luis CISNEROS-ZEVALLOS a Daniel JACOBO-VELÁZQUEZ. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*. 2013, **5**(21), 5990–5999. DOI: 10.1039/c3ay41125g. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3ay41125g>
- [51] BLAINSKI, Andressa, Gisely LOPES a João DE MELLO. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 2013, **18**(6), 6852-6865. DOI: 10.3390/molecules18066852. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/18/6/6852>
- [52] BEZHUASHVILI, M., R. NUTSUBIDZE a M. PATARAYA. Conversion of lignins from solid parts of grapes during alcoholic fermentation. *Applied*

Biochemistry and Microbiology. 2000, **36**(2), 142-145. DOI: 10.1007/BF02737909. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02737909>

- [53] BALOUIRI, Mounyr, Moulay SADIKI a Saad IBNSOUDA. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016, **6**(2), 71-79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005. ISSN 20951779. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095177915300150>

- [54] VALGAS, Cleidson, Simone SOUZA, Elza SMÂNIA a Artur SMÂNIA JR. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007, **38**(2), 369-380. DOI: 10.1590/S1517-83822007000200034. ISSN 1517-8382.

- [55] WIEGAND, Irith, Kai HILPERT a Robert HANCOCK. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. 2008, **3**(2), 163-175. DOI: 10.1038/nprot.2007.521. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.521>

- [56] JORGENSEN, James H. a Mary Jane FERRARO. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, **49**(11), 1749-1755. DOI: 10.1086/647952. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/647952>

- [57] BOYADZHIEVA, S., G. ANGELOV, S. GEORGIEVA a D. YANKOV. Characterization of polyphenol content and antioxidant capacity of spent coffee grounds. *Bulgarian Chemical Communications: Special Issue C*. 2018, **50**(1), 85-89.

- [58] WU, Chin-Tung, Dinesh Chandra AGRAWAL, Wen-Ying HUANG, Hsiu-Cheng HSU, Shang-Jhen YANG, Shu-Ling HUANG a Yung-Sheng LIN. Functionality Analysis of Spent Coffee Ground Extracts Obtained by the Hydrothermal Method. *Journal of Chemistry*. 2019, **2019**(1), 1-8. DOI: 10.1155/2019/4671438. ISSN 2090-9063. Dostupné také z: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2019/4671438/>

7 POUŽITÉ ZKRATKY

CO	Oxid uhelnatý
CO ₂	Oxid uhličitý
CQDs	Carbon quantum dots (Karbonové kvantové částice)
CH ₄	Methan
HPLC	Vysokoúčinná Kapalinová chromatografie
KOH	Hydroxid draselný
NaOH	Hydroxid sodný
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
QDs	Quantum dots (Kvantové tečky)
SCG	Spent coffee ground (Kávová sedlina)