



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

VYUŽITÍ TERMOTOLERANTNÍCH KMENŮ K PŘÍPRAVĚ VYBRANÝCH METABOLITŮ NA HYDROLYZÁTECH ODPADŮ

THERMOTOLERANT STRAINS APPLICATION FOR PREPARATION OF SELECTED
METABOLITES ON WASTE HYDROLYSATES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kristína Musilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA

BRNO 2016

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1027/2015
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Kristína Musilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA**
Akademický rok: 2015/16

Název bakalářské práce:

Využití termotolerantních kmenů k přípravě vybraných metabolitů na hydrolyzátech odpadů

Zadání bakalářské práce zadání:

- 1) rešerše literatury na téma práce,
- 2) popis metodiky SHF a používaných analytických systémů,
- 3) výběr mikrobiálních kmenů a vhodných metabolitů k detekci, provedení experimentů metodou SHF na hydrolyzátech,
- 4) diskuse, vyhodnocení,
- 5) závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kristína Musilová
student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca sa zaoberá prípravou vybraného metabolitu na hydrolyzátoch odpadov využitím termotolerantných kmeňov. Zvoleným odpadom sú pomarančové šupy – odpad, ktorého množstvo každoročne stúpa, pretože sú zložené zo štruktúrnych polysacharidov, ako celulóza, hemicelulóza a pektín, ktorých vhodnou úpravou vznikajú skvasiteľné cukry. Na fermentačný proces sa kvôli jeho výnimočným vlastnostiam vybral termotolerantný kmeň *Bacillus coagulans*, ktorého primárnym metabolitom je kyselina mliečna, látka s veľkou perspektívou. Na začiatku experimentu sa stanovili optimálne podmienky pre rast zvoleného mikroorganizmu, ktoré sa uplatňovali pri fermentáciách. Fermentácií sa vykonalo niekoľko za rôznych podmienok, pokým sa nezistili tie podmienky, za ktorých kyselina mliečna vznikala. Výťažky fermentácií sa stanovili metódou HPLC a úbytok sacharidov sa určil metódou Somogyiho a Nelsona. Aby kyselina mliečna vznikala bolo nevyhnutné pripraviť z pomarančových šúp hydrolyzáty, ktoré pred samotnou hydrolyzou bolo nutné extrahovať organickým činidlom, aby sa odstránili látky spôsobujúce inhibíciu rastu mikroorganizmov, ako napr. d-limonén. Metódou SHF sa získali vyššie výťažky, no najväčšie výťažky sa získali pomocou kmeňa *Lactobacillus casei*.

ABSTRACT

This Bachelor's Thesis deals with the preparation of the selected metabolite on hydrolysates of orange fruit waste, specifically on orange peel hydrolysates using thermotolerant strains. The thermotolerant *Bacillus coagulans* strain having lactic acid as the primary metabolite, a substance with a great perspective, was selected for the fermentation process for its exceptional properties. At the beginning of the experiment, optimal conditions for the growth of the selected microorganism were determined; these were applied during the fermentations. Several fermentations were performed under various conditions until those conditions were determined, in which lactic acid was produced. The fermentation production was determined by the HPLC method and the saccharide decrease by the Somogyi-Nelson method. To achieve lactic acid production, it was necessary to extract the orange peels by an organic agent before fermentation, in order to eliminate substances causing inhibition of micro-organism growth. Higher yields were achieved by the SHF method, but the highest by using the *Lactobacillus casei* strain.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

fermentácia, *Bacillus coagulans*, kyselina mliečna, odpad, pomarančové šupky

KEY WORDS

fermentation, *Bacillus coagulans*, lactic acid, waste, orange peels

MUSILOVÁ, K. *Využití termotolerantních kmenů k přípravě vybraných metabolitů na hydrolyzátech odpadů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 56 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....
podpis študenta

Pod'akovanie:

Rada by som sa poďakovala vedúcemu svojej bakalárskej práce Ing. Mgr. Liborovi Babákovi, Ph.D., MBA za vedenie, konzultácie a odborné rady, Ing. Helene Hudečkovej za pomoc s praktickou časťou v laboratóriu a všetkým, ktorí akýmkoľvek spôsobom prispeli k vzniku tejto bakalárskej práce.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	Potravinový odpad.....	9
2.2	Odpadové polysacharidy	9
2.2.1	Celulóza.....	10
2.2.2	Hemicelulóza.....	10
2.2.3	Pektín.....	11
2.3	Citrusové šupky	11
2.3.1	Zloženie	12
2.4	Predúprava substrátu fermentácie.....	14
2.4.1	Mletie	14
2.4.2	Tepelná predúprava	14
2.4.3	Mikrovlnné žiarenie	14
2.4.4	Kyslá hydrolýza.....	15
2.4.5	Alkalická hydrolýza	15
2.4.6	Enzymatická hydrolýza	15
2.4.7	Metabolizmus glukózy	15
2.4.8	Glykolýza	16
2.4.9	Homofermentácia	18
2.4.10	Heterofermentácia	18
2.5	Hydrolýza a fermentácia.....	19
2.5.1	SHF.....	19
2.5.2	SSF	19
2.5.3	Mechanizmus kultivácie.....	19
2.6	Kyselina mliečna	20
2.6.1	Použitie.....	20
2.6.2	Vlastnosti.....	21
2.7	Termotolerantné kmene	21
2.7.1	Bacillus coagulans.....	22
2.8	Rastová krivka	24
2.9	Použité analytické metódy	25

2.9.1	Turbidimetria.....	25
2.9.2	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC.....	25
2.9.3	Metóda podľa Nelsona a Somogyiho	26
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1	Použité chemikálie.....	26
3.1.1	Stanovenie rastových kriviek mikroorganizmu.....	26
3.1.2	Stanovenie obsahu vlákniny podľa Henneberga a Stohmanna	27
3.1.3	Stanovenie obsahu celulózy	27
3.1.4	Extrakcia hexánom.....	27
3.1.5	SSF	27
3.1.6	Stanovenie podľa metódy Somogyiho a Nelsona	27
3.1.7	Príprava mobilnej fázy pre HPLC	28
3.1.8	Príprava kalibračných roztokov kyseliny mliečnej a kyseliny octovej	28
3.1.9	Úprava pH	28
3.2	Použité prístroje a pomôcky	28
3.3	Použitý software	28
3.4	Použitá kultúra	29
3.5	Použitý substrát.....	29
3.6	Príprava roztokov, vzoriek a činidiel.....	29
3.6.1	Príprava živných médií pre stanovenie rastových kriviek	29
3.6.2	Mechanická predúprava substrátu	29
3.6.3	Príprava vzorky pre fermentácie	30
3.6.4	Príprava zásobného roztoku glukózy o koncentrácii $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	30
3.6.5	Príprava roztokov pre stanovenie redukujúcich cukrov	30
3.6.6	Príprava mobilnej fázy pre HPLC	30
3.6.7	Príprava kalibračných roztokov kyseliny mliečnej a kyseliny octovej a kyseliny citrónovej.....	31
3.6.8	Príprava 2% roztoku NaOH na úpravu pH.....	31
3.6.9	Príprava 1% roztoku H_2SO_4 na úpravu pH	31
3.7	Odber vzoriek	31
3.8	Pracovné postupy jednotlivých metód.....	31
3.8.1	Stanovenie rastových kriviek mikroorganizmu.....	31
3.8.2	Stanovenie sušiny substrátu	32

3.8.3	Stanovenie obsahu vlákniny podľa Henneberga a Stohmanna	32
3.8.4	Stanovenie obsahu celulózy	32
3.8.5	Extrakcia hexánom	33
3.8.6	Fermentácie	33
3.8.7	Stanovenie kalibračnej krivky glukózy podľa metódy Somogyiho a Nelsona ..	34
3.8.8	Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa metódy Somogyiho a Nelsona	34
3.8.9	Analýza pomocou HPLC	34
3.9	Štatistické spracovanie výsledkov	34
4	VÝSLEDKY A DISKUSIA	35
4.1	Turbidimetrické stanovenie rastových kriviek	35
4.2	Stanovenie sušiny substrátu	37
4.3	Stanovenie obsahu vlákniny podľa Henneberga a Stohmanna	37
4.4	Stanovenie obsahu celulózy	38
4.5	Stanovenie obsahu kyseliny citrónovej	38
4.6	Fermentácie	38
5	ZÁVER	42
6	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	43
7	ZOZNAM OBRÁZKOV	46
8	ZOZNAM GRAFOV	46
9	ZOZNAM TABULIEK	48
10	ZOZNAM PRÍLOH	49
11	PRÍLOHA I	49
12	PRÍLOHA II	542
13	PRÍLOHA III	53
14	PRÍLOHA IV	54

1 ÚVOD

Svetová výroba citrusových plodov sa výrazne zvýšila od 80. rokov minulého storočia a rýchlo sa rozšírilo aj priemyselné odvetvie venujúce sa spracovaniu citrusových plodov, najmä v rozvinutých krajinách. Odhaduje sa, že napríklad v roku 2010 sa dopestovalo 66,4 Mt pomarančov, čo je o 14% viac než v rokoch 1997-1999. Asi 30,1 Mt dopestovaných pomarančov sa spracuje na džús, esenciálne oleje a iné vedľajšie produkty. To znamená, že každý rok sa veľké množstvo odpadu zo spracovania citrusových plodov bude ustavične zvyšovať hlavne vo forme dužiny, čo je polotuhý vedľajší produkt získaný po extrakcii šťavy. Likvidácia odpadu zo spracovania citrusových plodov súvisí s viacerými ekonomickými a environmentálnymi problémami, ako je vysoké organické zaťaženie, nedostatok dostupných miest na likvidáciu, zvýšenie prepravných nákladov. Preto sa na výrobu produktov s pridanou hodnotou z pomarančového odpadu navrhujú rôzne mikroorganizmy v kvapalných alebo tuhých fermentačných procesoch, či už s chemickou a enzymatickou predúpravou alebo bez nej. [1]

Baktérie mliečneho kvasenia patria medzi najviac študované mikroorganizmy. Ich produktom je kyselina mliečna, ktorá nachádza široké spektrum využitia napríklad v potravinárskom, farmaceutickom, kozmetickom a garbiarskom priemysle. Polymerizáciou kyseliny mliečnej vzniká polymér polylaktid (PLA), z ktorého sa vyrábajú biodegradabilné plasty, ktorých vlastnosti sa približujú plastom na báze ropy. [2]

Biodegradabilné plasty sú plasty, ktoré sú schopné úplne sa rozložiť na skládkach, v kompostéroch alebo v čistiarnach odpadových vôd pôsobením prirodzene sa vyskytujúcich mikroorganizmov. Skutočne biodegradabilné plasty nezanechávajú po degradácii nijaké toxické, viditeľné alebo rozoznatelné zvyšky. Ich biodegradabilita je v ostrom rozpore s väčšinou plastov na báze ropy, ktoré sú v biologickom kontexte v podstate nezničitelné. Keďže plasty na báze ropy sú prítomné všade, zotrvávajú v prírode veľmi dlho a sú vyrobené z fosílnych palív, skúmajú sa možnosti výroby alternatív k týmto tradičným plastom. [3]

Táto bakalárska práca je zameraná práve na produkciu kyseliny mliečnej z odpadu pomarančových plodov, kvôli jej rôznorodému uplatneniu v priemysle, no najmä pre jej výnimočné využitie vo výrobe biologicky odbúrateľných plastov.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Potravínový odpad

Odpadový materiál z rôznych poľnohospodárskych a priemyselných procesov sa môže využiť ako substrát pre mikrobiálny rast. Väčšina tohto odpadu nie je vhodná ako krmivo pre zvieratá, predovšetkým kvôli jeho vysokému obsahu vlákniny – čím vyšší podiel tvorí vlákna, tým nižšia je stráviteľnosť krmiva. [4, 5]

Do poľnohospodárskeho odpadu zaraďujeme kukuričnú siláž, cukrovú trstinu, vylisovanú cukrovú trstinu (bagasa), ryžovú a pšeničnú slamu, z ktorých sa mnohé v súčasnosti skúmajú ako možné východiskové suroviny pre výrobu produktov s pridanou hodnotou, ako je bioetanol. Iná kategória odpadu z výroby potravín ostáva vo veľkej miere nevyužitá. Patria sem zbytky citrusov, jablák a hrozna – výlisky alebo aj zbytky po spracovaní cukrovej repy. [6]

Tuhá zložka odpadu je tá časť počiatočného materiálu, ktorú nemožno použiť na výrobu zamýšľaných výrobkov, ako sú šupky, jadierka a vlákna ovocia, ktoré sa odstraňujú pri výrobe džúsu. [6]

Tabuľka 1: Chemické zloženie poľnohospodárskeho odpadu [7]

	Celulóza [%]	Hemicelulóza [%]	Lignín [%]	Proteín [%]	Anorganický zvyšok [%]
Ryžová slama	32,0-47,0	19,0-27,0	5,0-24,0	-	12,4
Pšeničná slama	35,0-45,0	20,0-30,0	8,0-15,0	3,1	10,1
Kukuričná slama	42,6	21,3	8,2	5,1	4,3
Bagasa	65,0		18,4	3,0	2,4

2.2 Odpadové polysacharidy

Polysacharidy sú najhojnejšie sa vyskytujúce prírodné biopolyméry a predstavujú rozhodne najväčšiu skupinu polymérov vyrábaných na svete. Každý rok sa vyrobí viac ako 150 000 Mt (megaton) polysacharidov v porovnaní s asi 140 Mt syntetických polymérov. [8]

Možno ich nájsť v rastlinách, živočíchoch a v mikroorganizmoch, kde plnia rôzne základné biologické funkcie. V závislosti od ich funkcie ich možno rozdeliť na látky so zásobnou funkciou (napr. škrob alebo inulín v rastlinách, glykogén v živočíchoch), so stavebnou funkciou, zachovávajúce mechanický tvar a pevnosť buniek (celulóza, hemicelulóza a pektín v stenách rastlinných buniek) a prvky viažuce vodu (agar, pektín a algináty v rastlinách, mukopolysacharidy v živočíchoch). [8]

Asi 99% celkových prírodných polysacharidov sa nachádza v rastlinách a zelenine, predstavujúcich významný obnoviteľný zdroj týchto biopolymérov, ktoré sa dajú využiť na rôzne účely. Polysacharidy sa v súčasnosti používajú vo všetkých sektoroch ľudských činností a vo viacerých oblastiach, napr. potravinové živiny, potravinárske prísady a výroba krmív; materiálová veda týkajúca sa formulácie polymerických materiálov pre rôzne

biotechnologické aplikácie; zdravotná starostlivosť týkajúca sa biokompatibilných materiálov; podávanie liekov alebo ako zdroj biologicky aktívnych molekúl; trvalo udržateľná výroba energie prostredníctvom výroby biopalív. [8]

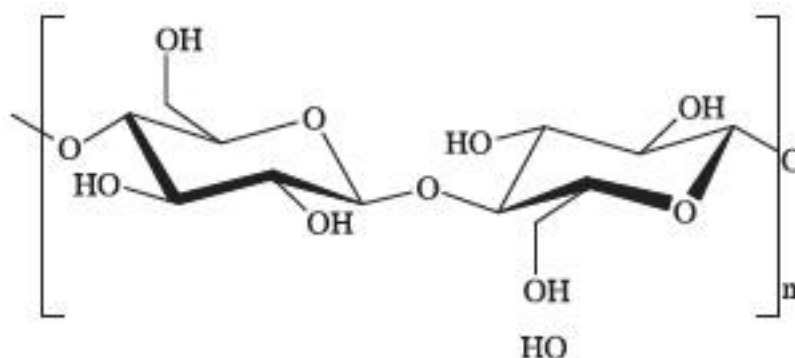
Hlavné a najhojnejšie polysacharidy z rastlín a zeleniny obsahujú škrob, celulózu a hemicelulózu, inulín a pektíny, ktoré sa zvyčajne využívajú vo vyššie uvedených oblastiach vďaka ich užitočným fyzikálno-chemickým vlastnostiam, ako je emulgačná schopnosť, viskoelasticita, polyelektrolytová štruktúra, priľnavosť, biokompatibilita, stabilizačná sila, atď. Okrem toho, sa neustále izolujú viaceré ďalšie polysacharidy s inými štruktúrami a vlastnosťami, a skúmajú sa ich vlastnosti a potenciálne využitie vo viacerých priemyselných odvetviach. [8]

V nasledujúcich odsekoch budú opísané niektoré polysacharidy týkajúce sa experimentálnej časti tejto bakalárskej práce.

2.2.1 Celulóza

Najrozšírenejšou organickou zlúčeninou biosféry je celulóza. Tvorí podstatnú časť bunkových stien rastlín, niektorých baktérií a je hlavnou súčasťou podporných tkanív rastlín. Vlákňité molekuly celulózy vznikajú spojovaním 1 400-10 000 D-glukózových podjednotiek β -1,4-glykozidickými väzbami. Čiastočnou hydrolýzou celulózy vzniká prevažne celobióza, ktorú považujeme za jej stavebnú jednotku. [9]

V rastlinách sa celulóza vyskytuje s usporiadanou (kryštalickou) štruktúrou alebo s neusporiadanou (amorfnou) štruktúrou. Stavebný materiál rastlín vzniká spojením niekoľkých paralelne usporiadaných celulóзовých reťazcov. Tieto reťazce sú stabilizované vodíkovými mostíkmi a tmel medzi nimi vytvára ďalší polysacharid hemicelulóza. [9, 10]

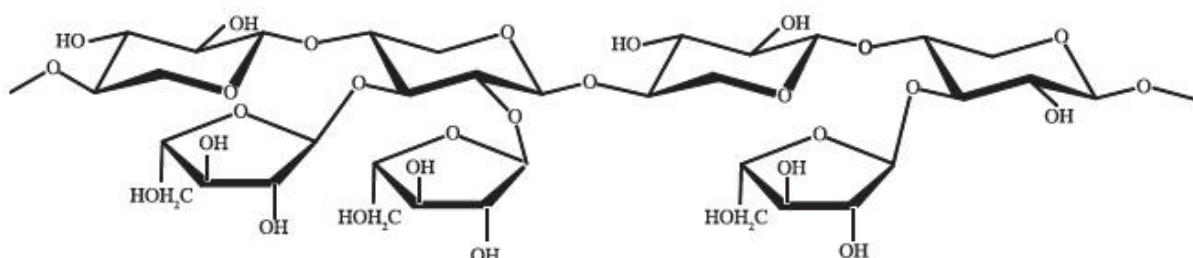


Obrázok 1: Štruktúra celulózy [11]

2.2.2 Hemicelulóza

V prírodných materiáloch sa celulóza vyskytuje vedľa hemicelulózy alebo aj vedľa ťažko odstrániteľného lignínu s ťažko definovateľnou štruktúrou. Hemicelulóza má komplexnú štruktúru obsahujúcu pentózy (xylóza, arabinóza), hexózy (manóza, glukóza, galaktóza) a urónové kyseliny. Dominantným komponentom hemicelulózy v tvrdých drevnatých častiach, ako sú drevo a slama, je xylán, zatiaľ čo v mäkkých drevách prevláda glukomanan. [9, 10, 12]

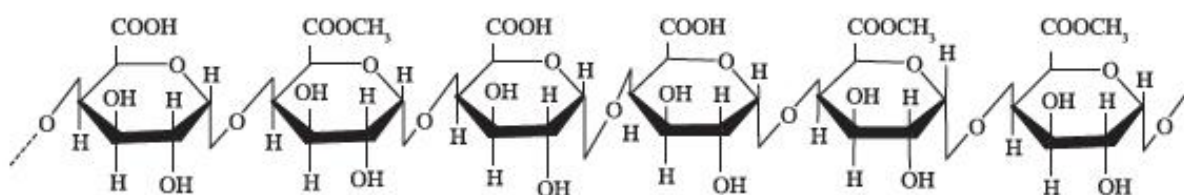
Hemicelulóza má menšiu molekulovú hmotnosť než celulóza a je termo-chemicky citlivejšia. Štruktúra hemicelulózy má hlavný reťazec s krátkymi postrannými reťazcami pozostávajúcimi z rôznych cukrov, ktoré sú ľahko hydrolyzovateľné. [10]



Obrázok 2: Štruktúra hemicelulózy [11]

2.2.3 Pektín

Matricu, v ktorej sú uložené celulóзовé fibrily môžu okrem hemicelulózy a lignínu tvoriť tiež pektíny. Pektíny sa vyskytujú v strednej bunkovej lamele ovocia a v iných rastlinných pletivách. Sú to čiastočne metylované poly-D-galakturónové kyseliny viazané α -1,4-glykozidickými väzbami. [9]



Obrázok 3: Štruktúra pektínu [11]

2.3 Citrusové šupky

Citrusy sú najhojnejšou plodinou na svete. Celkovo sa ich vypestuje viac ako $88 \cdot 10^6$ ton a jedna tretina sa spracúva. Pomaranče, citróny, grapefruity a mandarínky predstavujú približne 98 % priemyselne spracúvaných citrusov, pričom pomaranče tvoria približne 82 % z celkového množstva. Citrusové plodiny sa spracúvajú, najmä za účelom výroby džúsu, ale aj v konzervárskom priemysle, na výrobu marmelád, mandarínkového kompótu a v chemickom priemysle na extrahovanie flavonoidov a esenciálnych olejov. Množstvo celosvetového priemyselného odpadu z citrusov sa odhaduje na viac ako $15 \cdot 10^6$ ton. Získaný zvyšok po spracovaní tvorí 50 % pôvodnej hmotnosti plodov. Skladá sa zo šupiek – skoro jedna štvrtina hmotnosti celého plodu, semienok a dužiny. [13]

2.3.1 Zloženie

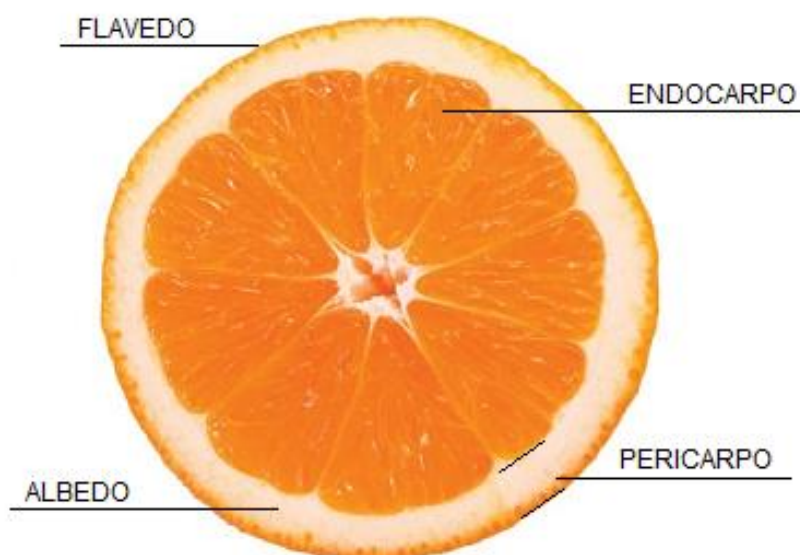
Základné morfológické štruktúry pomarančov, ako aj citrusových plodov vo všeobecnosti, sú *flavedo*, *albedo*, *pericarpo* a *endocarpo*. [14]

Flavedo alebo vonkajšia šupa tvorí 10 % celkovej stavby plodu. Je to vrstva tkaniva nachádzajúca sa pod epidermou a obsahuje chromoplasty a olejové vaky. [14]

Albedo, či vnútorná šupa je vrstva špongiovitého bieleho tkaniva pod *flavedom* a tvorí 12-30 % plodu. *Albedo* a jadro, alebo stredová os, obsahujú cievny (vaskulárny) systém, ktorý zásobuje plody vodou a živinami. [14]

Šupa alebo aj *pericarpo* je *flavedo* spolu s *albedom*. Šťava zo šupy je voľná tekutina zo šupy, ktorá sa extrahuje mechanicky. [14]

Endokarp tvorí 50-80 % z celého plodu a v rámci šupy sa niekedy nazýva dužina. Je hlavnou jedlou časťou citrusových plodov. Pozostáva z viacerých segmentov. Každý z nich pozostáva z hutnej masy predĺžených mechúrikov s tenkými stenami. [14]



Obrázok 4: Morfológické zloženie pomaranča [15]

Chemické zloženie citrusových plodov pozostáva z viacerých známych základných zložiek, ako sú cukry, kyseliny a minerály a zo zložiek vyskytujúcich sa v menšom množstve – zlúčeniny dusíka, pigmenty, flavonoidy a vitamíny. [14]

Citrusy sú tvorené rozpustnými a štruktúrnymi sacharidmi. K ich analýze sa zoberali šupa, dužina a šťava citrusových plodov a najprv sa rozdelili na zložky rozpustné a nerozpustné v 80%-nom etanole. Frakcia rozpustná v alkohole obsahovala rozpustné mono- a disacharidy, neprchavé organické kyseliny, aminokyseliny a iné menej významné zložky, zatiaľ čo frakcia nerozpustná v alkohole obsahovala karbohydráty, ktoré prispievajú k tvorbe buniek, a niektoré proteíny. Tuhé látky nerozpustné v alkohole sa ďalej extrahovali pomocou vody a riedenej

kyseliny, aby sa získali pektínové látky rozpustné vo vode a v kyseline, potom pomocou 2% kyseliny chlorovodíkovej, aby sa získala „hemicelulóza“, a nakoniec pomocou chloridu zinočnatého a kyseliny chlorovodíkovej, aby sa získala celulóza. [14]

Pomarančová šťava potvrdila prítomnosť α -glukózy, β -glukózy, fruktózy a sacharózy a tiež malé množstvo galaktózy. Tuhé látky rozpustné v alkohole tvoria 30-50 % suchej váhy šupiek, pričom sa tento podiel zvyšoval s rastúcou zrelosťou ovocia. Celkový obsah cukru bol asi 80 % a prítomné boli tieto cukry – glukóza, fruktóza, sacharóza so stopami xylózy a ramnózy. Obsah sacharózy bol vo všeobecnosti nižší ako celkový obsah redukujúcich cukrov. [14]

Na začiatku rastu sa vyžaduje prítomnosť štruktúrnych sacharidov, takže na začiatku dochádza k prudkému zvýšeniu obsahu pektínových látok, ktoré dosahujú vrchol asi po 4 mesiacoch, a potom pomaly klesajú (v rámci celkového obsahu tuhých látok) z dôvodu akumulácie rozpustných sacharidov. „Pektínová“ frakcia priniesla arabinózu, galaktózu a kyselinu galakturónovú; „hemicelulózová“ frakcia priniesla xylózu, arabinózu, galaktózu, glukózu a stopy ramnózy a kyseliny urónovej; a nakoniec „celulózová“ frakcia hlavne glukózu so xylózou, arabinózou, kyselinami urónovými a stopami galaktózy a manózy. [14]

Vysušený citrusový odpad (10 % vlhkosti) obsahuje 15-25 % pektínu, 8-10 % celulózy a 5-7 % hemicelulózy. Lignín sa vyskytuje len v stopových množstvách (cca 2 hm. %). [16]

Kyselina citrónová je dominantná vo všetkých odrodách pomarančov, no okrem nej sa obvykle vyskytujú ešte kyseliny mliečna, jablčná, malónová, benzoová, glukurónová, jantárová, adipová atď. a v stopových množstvách kyseliny isocitrónová, vinná, akonitová atď. V šupkách sa preukázali kyseliny šťaveľová, jablčná, malónová a citrónová, zvyčajne v uvedenom poradí koncentrácie. Kyselinu malónovú vždy sprevádza iná kyselina – pravdepodobne kyselina chlorogénová. [14]

Kyselina askorbová bola jediný vitamín prítomný v množstvách, ktoré mali veľký význam z nutričného hľadiska. [14]

U mladých plodov dosahoval proteínový dusík 71 % celkového dusíka, ale tento podiel klesol na 58 % v zrelom ovocí, keď sa rozpustné zlúčeniny dusíka nahromadili v šťave. Celkový obsah dusíka sa teda zvyšuje s postupujúcim dozrievaním a je vyšší v neskorých pomarančoch než v odrodách, ktoré dozrievajú skoro alebo uprostred sezóny, a teda nevisia tak dlho na strome. Viac než 70 % celkového rozpustného dusíka v citrusových šťavách je prítomných vo forme voľných aminokyselín. Prolín je prevládajúcou aminokyselinou vo všetkých plodoch okrem grapefruitu, kde je až druhý po kyseline asparágovej. [14]

K hlavnej akumulácii lipidov v citrusových plodoch dochádza v semenách, ktoré však obsahujú oleje, medzi ktorými prevládajú glyceridy nenasýtených mastných kyselín. [14]

Olej z pomarančových šupiek má vysoký obsah monoterpénov, a hlavnou zložkou je d-limonén, ktorý tvorí asi 90 % oleja. Limonén môže mať inhibičné účinky na rast niektorých mikroorganizmov, ako napríklad *Bacillus thuringiensis*. [14, 17]

2.4 Predúprava substrátu fermentácie

Hlavnou prekážkou masívneho využitia odpadovej fytomasy je najmä komplexnosť materiálu. Predúpravou materiálu sa znižuje veľkosť častíc substrátu, čím sa získa väčší špecifický povrch, čo vedie k zlepšeniu prístupnosti materiálu. Tento materiál obsahuje okrem celulózy aj hemicelulózu, lignín, pektíny alebo aj proteíny, minerálne látky, taníny a tuky, ktoré sú navzájom pevne previazané a tvoria komplexnú rigidnú maticu. [18, 19]

2.4.1 Mletie

Mletie je mechanická predúprava, pri ktorej sa biomasa rozomelie na menšie kúsky. Podstatou mechanickej predúpravy je zmenšenie veľkosti materiálu a jeho kryštalickej štruktúry. Zmenšenie veľkosti materiálu vedie ku zväčšeniu dostupného špecifického povrchu a k zníženiu polymeračného stupňa. Zväčšenie špecifického povrchu, zmenšenie polymeračného stupňa a strih sú faktory, ktoré zvyšujú výťažnosť hydrolýzy a tiež skracujú čas [10]

2.4.2 Tepelná predúprava

Keď teplota stúpne nad 150-180 °C v biomase sa pôsobením tepelnej energie začne rozpúšťať hemicelulóza. Zloženie hlavného reťazca hemicelulózy a vetviacich sa skupín určuje tepelnú, kyselinovú a zásaditú stabilitu hemicelulózy. Z dvoch dominantných zložiek hemicelulózy (xylán a glukomanan) sú xylány najmenej tepelne stabilné, ale rozdiel pri glukomanane je veľmi malý. Počas termálnych procesov hemicelulóza hydrolyzuje a vytvára kyseliny. Predpokladá sa, že tieto kyseliny sú katalyzátorom pre ďalšiu hydrolýzu hemicelulózy. [10]

Tepelná predúprava, pri ktorej vznikajú rozpustné zlúčeniny hemicelulózy, prináša so sebou riziko tvorby fenolových a heterocyklických zlúčenín, ako je vanilín, vanilínový alkohol, furfural a HMF (hydroxymetylfurfural), najmä v kyslom prostredí. Takto vytvorené zlúčeniny môžu mať inhibičný účinok a tiež inhibičný alebo toxický účinok na baktérie a kvasinky. [10]

Počas predúpravy sa treba vyhnúť teplotám 250 °C a viac, keďže pri takýchto teplotách začne dochádzať k neželaným pyrolytickým reakciám. [10]

2.4.3 Mikrovlnné žiarenie

Mikrovlnné žiarenie sa v dnešnej dobe skúma ako sľubná fyzikálna predúprava materiálu na zefektívnenie samotnej enzymatickej hydrolýzy. Mnohokrát sa táto predúprava využíva v kombinácii s kyslou alebo alkalickou hydrolýzou kvôli vyššiemu výnosu. Celulóзовé zložky degradujú pomocou mikrovln na krehké vlákna a oligosacharidy s nízkymi molekulovými hmotnosťami. Hoci možno dosiahnuť rozklad celulózy až na celobiózu, táto metóda je náročnejšia na spotrebu elektrickej energie a preto nenašla výrazné priemyselné uplatnenie. [20]

2.4.4 Kyslá hydrolýza

Predúprava materiálu pomocou kyseliny sa využíva na rozpustenie hemicelulózy a lepšie sprístupnenie celulózy. Na predúpravu sa využívajú zriedené aj nezriedené kyseliny. Hlavným dejom predúpravy kyselinou je hydrolýza hemicelulózy, najmä xylánu, keďže glukomanan je relatívne stabilný voči kyselinám, pričom vznikajú monoméry, furfural, HMF a iné prchavé látky. Rozpúšťanie hemicelulózy je zreteľnejšie po predúprave koncentrovanejšími kyselinami ako po predúprave zriedenými kyselinami. No i napriek tomu, predúprava koncentrovanými kyselinami je pre fermentáciu neatraktívna, pretože sa zvyšuje riziko vzniku inhibičných látok. [10]

2.4.5 Alkalická hydrolýza

Pri alkalickej predúprave sú prvými reakciami rozpúšťanie a zmydelňovanie. Tieto procesy spôsobia „nabobtnanie“ biomasy, a tým zlepšia aj prístupnosť pre enzýmy a baktérie. Použitím koncentrovaných roztokov môže dochádzať k „odpadávaniu“ koncových skupín, k hydrolýze, degradácii a dekompozícii rozpustených polysacharidov. Tieto zmeny sú výhodné pre ďalšiu premenu, no zároveň dochádza k degradácii a strate uhlíka vo forme oxidu uhličitého. Strata skvasiteľných cukrov a možný vznik inhibičných látok zapríčiňujú nevhodnosť alkalickej hydrolýzy pre fermentáciu. [10]

2.4.6 Enzymatická hydrolýza

Enzymatická hydrolýza pomarančovej biomasy je citlivá na komplexné štruktúry polysacharidov (pektín, celulóza, hemicelulóza). Aby výťažnosť hydrolýzy bola čo najvyššia, vyžaduje sa kombinácia celulolytických, pektinolytických a hemicelulolytických enzýmov. Najväčšou prekážkou enzymatickej hydrolýzy je kompaktná štruktúra a vzájomné prepletenie polysacharidov. Predúpravou celulóзовých materiálov sa sprístupnia citrusové polysacharidy a tým sa stanú dosiahnuteľnými pre enzýmy. [16]

2.4.7 Metabolizmus glukózy

V metabolizme glukózy dochádza k premene glukózy na pyruvát. Porozumenie metabolizmu glukózy, najmä glykolýzy, má bohatú históriu. Rozvoj biochémie a popis glykolýzy išli ruka v ruku. Kľúčový objav pochádza z roku 1897 a vznikol celkom náhodou. Hans Buchner a Eduard Buchner sa zaujímali o výrobu extraktu z kvasníc bez buniek. Kvasničné extrakty nemožno uchovávať za použitia antiseptík, ako je napríklad fenol, a preto sa rozhodli vyskúšať sacharózu, bežne používaný konzervant v kuchynskej chémii. Tým získali východiskové výsledky: sacharóza rýchlo skvasila na alkohol kvasničnou šťavou. [9, 21]

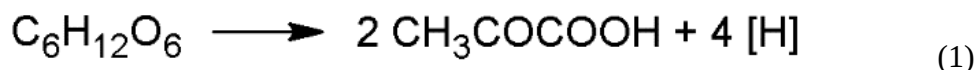
Metabolické odbúravanie glukózy alebo iného sacharidu glykolýzou je proces vykonávaný takmer všetkými bunkami. Následný proces, pri ktorom je kyselina pyrohroznová metabolizovaná bez prístupu kyslíka sa nazýva fermentácia (kvasenie). Fermentácia je výsledkom potreby recyklácie NAD s obmedzeným množstvom, prenášaním elektrónov z redukovaného NAD na iné molekuly. [22]

Fermentáciu rozdeľujeme na homofermentatívne a heterofermentatívne kvasenie. Na svoj chod nevyžadujú energiu z ATP, no obe dráhy sa redukujú redukovaným NAD, aby NAD mohlo pokračovať v elektrón-akceptórnej funkcii. [22]

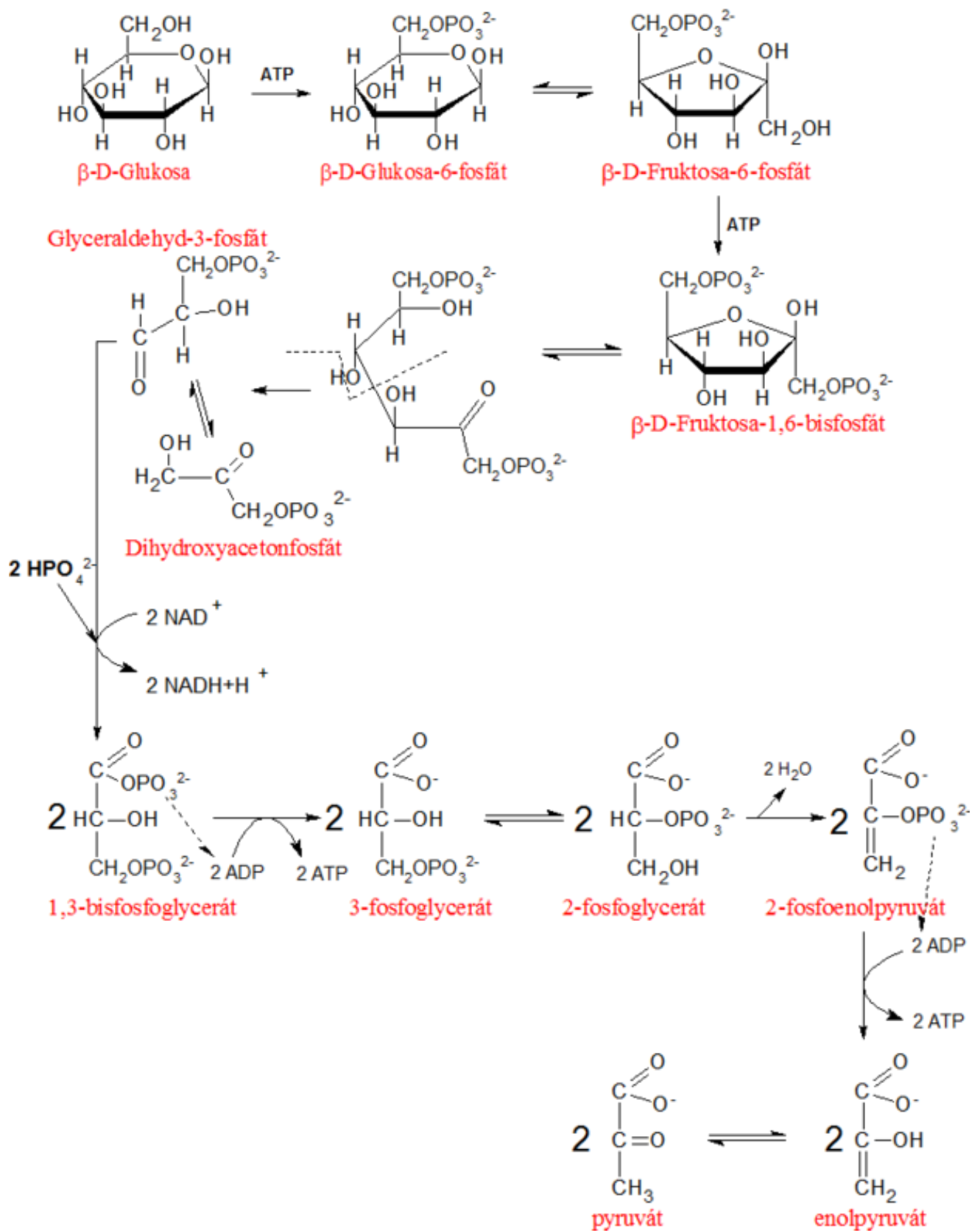
2.4.8 Glykolýza

Hlavnú cestu odbúravania glukózy, ktorá pochádza z rozštiepených sacharidových zložiek v potrave, nazývame glykolýza. Pomocou tejto dráhy bunky získavajú energiu uvoľnenú z molekúl sacharidov. V bunkách cicavcov sa glykolýzou spracováva až 70-80 % sacharidov prijatých v potrave. [9]

Glukóza sama nie je donorom vodíkových atómov a preto sa vyžaduje jej dvojitá fosforylácia. Premena glukózy na energeticky bohatý fruktóza-1,6-bisfosfát vyžaduje spotrebu dvoch molekúl ATP, ktoré sa v ďalších krokoch odbúravania získajú späť. Fruktóza-1,6-bisfosfát sa štiepi na triózy. Trióza prechádza mnohými premenami a odovzdáva dva atómy vodíka pyridinóvemu nukleotidu NAD za vzniku NADH. V dvoch fázach premeny triózy dochádza k substrátovej fosforylácii ADP a energia sa ukladá vo forme ATP – navrátenie dvoch molekúl ATP spotrebovaných na začiatku glykolýzy. Celkovú reakciu premeny glukózy na pyruvát možno vyjadriť jednoduchou sumárnou rovnicou: [9]



Úplná schéma glykolýzy bola objasnená v roku 1940, na čom sa podieľalo mnoho výskumníkov, ako G. Embden, O. Meyerhof, J. Parnas atď. Preto sa proces glykolýzy zvykne nazývať aj Embden-Meyerhofova schéma. [9]



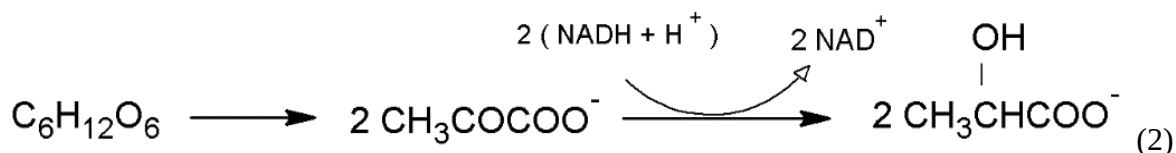
Obrázok 5: Schéma glykolízy [23]

2.4.9 Homofermentácia

Pri homofermentatívnom mliečnom kvasení vzniká prakticky iba kyselina mliečna (90 %). Je to jedno z najjednoduchších riešení na nájdenie vhodného akceptora vodíkových atómov, pretože akceptorom je sám pyruvát. Premena pyruvátu na laktát prebieha pomocou enzýmu laktátdehydrogenáza. [9]

Mliečnu fermentáciu vykonáva početná skupina mikroorganizmov zvaných laktobacily a vedľa nich aj rôzne koky, ako napr. rod *Streptococcus*. Laktobacily vyrábajú prevažne D-laktát, zatiaľ čo živočíchy pri nedostatku kyslíku tvoria výhradne L-formu laktátu. [9]

Laktát je pravdepodobne najčastejší produkt kvasenia cukrov a vzniká pri väčšine kvasných procesov v mliekarenskom priemysle. Ak sa postupne neutralizuje vznikajúci laktát (napr. mletým CaCO_3), je možné získať až 90 % pôvodného substrátu. Samovoľné mliečne kvasenie sa okrem syrárstva a pri výrobe kvasených mliečnych nápojov využíva aj pri konzervácii kapusty alebo uhoriek, pretože kyselina mliečna zabraňuje rastu hnilobných baktérií. [9]

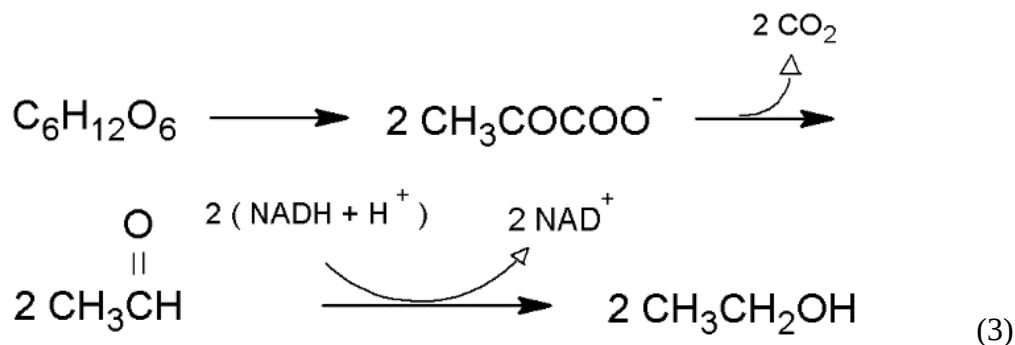


2.4.10 Heterofermentácia

Niektoré baktérie neobsahujú aldózu a tak odbúravajú glukózu kombináciou pentózového cyklu a glykolytického systému. Na laktát sa premení iba časť glukózy a zo zvyšku sa tvorí etanol a oxid uhličitý. V takomto prípade hovoríme o heterofermentatívnom kvasení. Pri etanolovej fermentácii sa pyruvát dekarboxiluje na acetaldehyd, ktorý je vhodným akceptorom vodíkových atómov a jednoducho sa redukuje na etanol. [9]

Takto sacharidy odbúravajú kvasinky rodu *Sacharomyces* a v menšej miere aj iné kvasinky a niektoré baktérie. Obsahujú enzým pyruvátdekarboxylázu, ktorá dekarboxyluje pyruvát bez toho, aby došlo k súčasnej oxidácii. Následnú redukciu vzniknutého acetaldehydu sprostredkováva alkoholdehydrogenáza. [9]

Etanolová fermentácia je jedna z najstarších technológií vôbec. Dnes sa s ňou stretávame či už pri spontánných rozkladoch cukornatých hmôt, tak aj pri zámernom skvasovaní rmutov a štiav pri biologických konzervačných procesoch alebo pri veľkovýrobe etanolu v potravinárstve a pre lekárske účely a pri veľkoprodukcii alkoholických nápojov. [9]



2.5 Hydrolýza a fermentácia

2.5.1 SHF

Keď sa enzymatická hydrolýza a fermentácia uskutočnia následne jedna za druhou, označujú sa ako samostatná hydrolýza a fermentácia (SHF – separate hydrolysis and fermentation). Hydrolýzou vzniká zmes obsahujúca fermentovateľné cukry. Až v ďalšom kroku sa hydrolyzáty fermentujú. [24, 25]

SHF je výhodná v tom, že hydrolýza aj fermentácia prebiehajú pri ich optimálnych podmienkach. No enzymatickým štiepením celulózy vzniká celobióza, ktorá sa akumuluje a inhibuje enzýmy endoglukanázu a celobiohydrolázu, čo je značnou nevýhodou. Taktiež príliš vysoká koncentrácia vznikajúcej glukózy spôsobuje inhibíciu enzýmu β -glukozidáza. Vysoké koncentrácie celobiózy zapríčiňujú zníženú výťažnosť výsledného produktu. [24]

2.5.2 SSF

Hydrolýzu a fermentáciu možno uskutočniť súčasne, t.j. súčasná sacharifikácia a fermentácia (SSF – simultaneous saccharification and fermentation). Túto metódu ako prví vykonali Takagi a kol. v roku 1977. [24, 25]

Pri SSF nedochádza k inhibícii enzýmu produktom fermentácie, pretože glukóza, ktorá vzniká enzymovou hydrolýzou sa rýchlo spotrebuje mikroorganizmami a tým sa zabráňuje jej nahromadeniu, čo spôsobuje inhibíciu. Kombinácia hydrolýzy a fermentácie takisto vedie k nižším investičným nákladom, pretože táto metóda prekonáva hlavnú nevýhodu hydrolýzy a teda znižuje objem (zaťaženie, dodávanie) enzýmov a tým aj výrobné náklady. [24, 25]

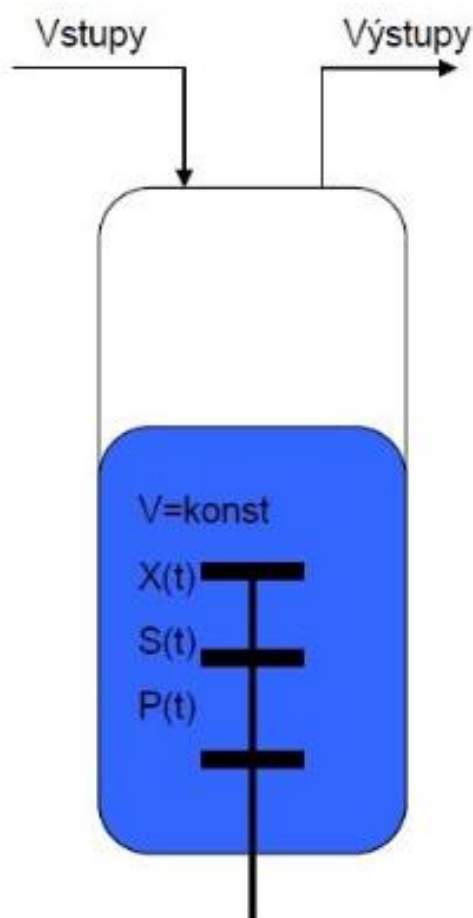
Napriek ekonomickej výhode SSF v porovnaní so samostatnou hydrolýzou a fermentáciou, kritickým problémom SSF je rozdiel v teplotných optimách pre enzýmy a fermentačné mikroorganizmy. [26]

2.5.3 Mechanizmus kultivácie

Fermentácia sa najčastejšie vykonáva vo vsádzkových fermentoroch. Na začiatku sa vloží fermentačné médium a inokulum do reaktora a pri vopred zvolených podmienkach v reaktore rastie biomasa, prípadne dochádza k tvorbe žiadaných metabolitov, produkovanými mikroorganizmom. Proces sa preruší až po dosiahnutí určených parametrov alebo po úplnom spotrebovaní substrátu. Následne sa reaktor vyprázdni a pripraví na novú vsádzku. [27]

Výhody vsádzkového usporiadania spočívajú v tom, že médium sa ľahko sterilizuje a pri obmedzenom trvaní vsádzkovej fermentácie sa redukuje nebezpečie kontaminácií a mutácií. Taktiež je jednoduché meniť reakčné podmienky jednotlivých vsádok. Na rozdiel od prítokového a kontinuálneho usporiadania sa mnohokrát spotrebuje výrazne menej drahého média a inokula (obzvlášť pri výskume). Pri vsádzkovej fermentácii je možné oddeliť fázu rastu mikroorganizmu od produkčnej fázy, napríklad pre výrobu sekundárnych metabolitov. [27]

Na druhej strane sú nevýhodou časové straty, ktoré vznikajú pri opakovanom vyprázdňovaní, čistení a napúšťaní reaktora. Taktiež je vsádzku vždy nutné sterilizovať. Ďalšie časové straty vznikajú v dôsledku lag-fázy, kedy v organizmoch vložených do prostredia nastávajú zložité metabolické procesy a rast je potlačený. [27]



Obrázok 6: Schéma vsádkového spôsobu fermentácie [27]

2.6 Kyselina mliečna

Kyselina mliečna alebo kyselina 2-hydroxypropánová je organická kyselina vyskytujúca sa v mnohých produktoch prírodného pôvodu. Prvé správy o izolácii kyseliny mliečnej z mlieka pochádzajú už z roku 1780. Kyselina mliečna sa vyrába chemickou syntézou alebo procesom fermentácie. No v posledných rokoch sa zvýšilo množstvo kyseliny mliečnej získanej biotechnologickou metódou. [28, 29]

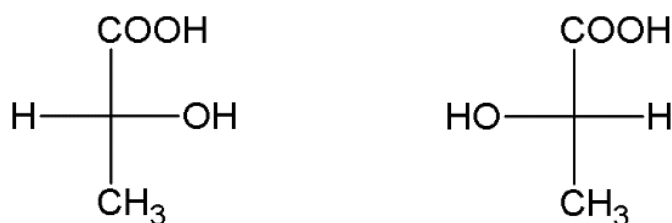
2.6.1 Použitie

Kyselina mliečna je priemyselne dôležitý produkt s veľkým a rýchlo rastúcim trhom z dôvodu jeho zaujímavých vlastností. Je to viacfunkčná organická kyselina. Kyselina mliečna sa v rozsiahlej miere využíva ako okysľovací prostriedok, tlmivý roztok, ochucovadlo alebo konzervačný prípravok, vo farmaceutickom, kozmetickom, garbiarskom a textilnom priemysle. Jeho najslubnejším využitím v súčasnosti je výroba biodegradabilných a biokompatibilných polylaktátových polymérov (polylaktidov), ako ekologická alternatíva za konvenčné nebiodegradabilné plasty odvodené od petrochemických produktov. Tieto polyméry majú

potenciálne veľké trhy v oblasti balenia tovaru a pre lekárske účely, ako napríklad chirurgický materiál na šitie, protézy a riadený systém na dodávku liekov. To má za následok, že o kyselinu mliečnu je čím ďalej, tým väčší záujem a má väčší trh. [30]

2.6.2 Vlastnosti

Kyselina mliečna je jedna z najmenších opticky aktívnych molekúl. Môže sa vyskytovať ako L (+) alebo D (–) stereoizomér. Kyselina mliečna je v prírode produkovaná živočíchmi, rastlinami alebo mikroorganizmami. L-mliečna kyselina sa vyskytuje u cicavcov, zatiaľ čo v bakteriálnych systémoch nachádzame oba stereoizoméry. [29]



Obrázok 7: D-mliečna kyselina (vľavo), L-mliečna kyselina (vpravo) (Chemické vzorce boli vytvorené v programe ChemSketch)

Tabuľka 2: Vlastnosti kyseliny mliečnej [2]

Chemický názov	2-hydroxypropánová kyselina
Registračné číslo CAS	50-21-5
Hustota	1,209 g·cm ⁻³
Teplota varu	122 °C pri 20 hPa
Teplota topenia	53 °C
Spalné teplo ΔH _c	1361 KJ·mol ⁻¹
Merné teplo C _p pri 20 °C	190 J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Disociačná konštanta pK _a	3,86
Molekulová hmotnosť	90,08 g·mol ⁻¹

2.7 Termotolerantné kmene

Teplota okolitého prostredia je jedným z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúcich rýchlosť rozmnožovania mikroorganizmov a možnosti ich života. Podľa vzťahu k teplote rozdeľujeme mikroorganizmy do troch hlavných skupín, ktorými sú psychrofilné, mezofilné a termofilné mikroorganizmy. Termotolerantné kmene sú mezofilné mikroorganizmy, ktoré dokážu rásť aj pri teplotách o 5-10 °C vyšších než bežné mezofilné kmene. To ich liší od termofilných mikroorganizmov, ktoré sú definované ako kmene, prežívajúce teploty vyššie ako 60 °C. [31, 32]

Medzi termotolerantné kmene patrí baktéria *Bacillus coagulans*, ktorá je schopná účinne fermentovať cukry až pri teplote 50 °C. [33]

2.7.1 *Bacillus coagulans*

Doména	<i>Bacteria</i>
Kmeň	<i>Firmicutes</i>
Trieda	<i>Bacilli</i>
Rad	<i>Bacillales</i>
Čeľaď	<i>Bacillaceae</i>
Rod	<i>Bacillus</i>
Druh	<i>coagulans</i>

Prokaryotické mikroorganizmy sa vo veľkej miere nachádzajú v ľudskom tele a v okolitom prostredí. Taxonómia prokaryotov sa zaoberá dvomi doménami *Bacteria* a *Archaea*. [34]

Baktérie sú s najväčšou pravdepodobnosťou najpočetnejšia biotická zložka zo všetkých organizmov na Zemi. Vyskytujú sa v pôde, vode, vzduchu alebo žijú v symbióze s inými organizmami – niektoré baktérie sú patogénne. Na rozdiel od eukaryotických buniek (rastliny, huby) ich bunkovú stenu tvorí peptidoglykán. V porovnaní s eukaryotickými bunkami je ich intracelulárna štruktúra výrazne jednoduchšia – neobsahujú jadro a niektoré ďalšie organely ako napr. mitochondrie a chloroplasty. Pohyb bakteriálnych buniek zabezpečujú bičíky. Chromozóm baktérií je tvorený prepleteným reťazcom DNA. [34]

Baktérie patriace do kmeňa *Firmicutes* majú vo všeobecnosti nízky obsah G + C v DNA. Do tejto početnej skupiny patrí viac než tisíc päťsto platných druhov, ktoré sa zadeľujú do troch tried. [34]

Triedu *Bacilli* tvoria grampozitívne koky a tyčinky, aeróbne alebo aj fakultatívne aeróbne. Tyčinky obvykle produkujú endospóry. Vysporulované kultúry dokážu prežiť zahriatie na teplotu 70 až 80 °C po dobu 10 minút. Tvorbu spór možno dokázať testom prežitia v 95% etanole po dobu 40 minút a pri teplote 20°C. Sporuláciu je možné potlačovať alebo stimulovať rôznymi podmienkami. [34]

Charakteristika radu *Bacillales* sa zhoduje s popisom triedy *Bacilli*. Bunky sa farbja grampozitívne – silná a pevná mureinová stena obsahuje kyselinu teichoovú a tiež lipoteichoovú kyselinu. Jednotliví zástupcovia sa fenotypovo veľmi líšia. Napríklad niektorí žijú saprofyticky v prostredí, kde rozkladajú organický materiál, niektorí produkujú látky antibiotickej povahy a iní môžu spôsobovať vážne komplikácie, ako antrax (*Bacillus anthracis*). [34, 35]

Čeľaď *Bacillaceae* bola popísaná už v roku 1895 a v súčasnosti zahŕňa veľké množstvo rodov a druhov. Obvykle osídľujú prostredie, niektoré môžu byť patogénne pre človeka, zvieratá, či bezstavovce. [34]

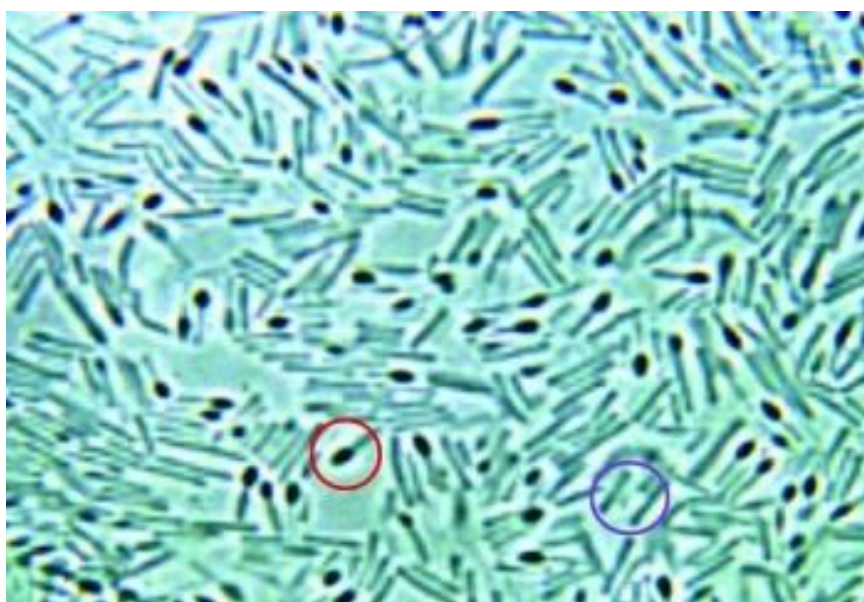
Bunky rodu *Bacillus* majú tvar tyčiniek s rôznou dĺžkou, často usporiadané vo dvojiciach alebo reťazcoch, buď so štvorcovými alebo zaguľatenými koncami. Pohybujú sa pomocou peritrichálnych bičíkov. Endospóry zvyknú mať oválny alebo guľatý tvar a sú veľmi rezistentné voči mnohým nepriaznivým podmienkam. V bunke sa tvorí najviac jedna spóra a sporulácia

nie je potlačená prítomnosťou vzduchu. Endospóry môžu byť v bunke uložené centrálné, paracentrálné, subterminálne, terminálne alebo laterálne. [34]

Baktérie rodu *Bacillus* sú aeróbne alebo fakultatívne aeróbne mikroorganizmy so širokou škálou fyziologických schopností (pH, teplota, salinita). Ich optimálna rastová teplota sa pohybuje v oblasti 15-55 °C. Sú to chemoorganotrofné organizmy s fermentatorným alebo respiratorným metabolizmom. Nachádzajú sa v pôde, vzduchu a vode. Využívajú sa pre komerčnú výrobu antibiotík a enzýmov. Hrajú významnú rolu pri kazení potravín. Tepelná rezistencia termofilných spór je veľký problém pri výrobe sušených mliečnych produktov. [34, 36]

Ďalšia diferenciácia rodu *Bacillus* (druhovú) je veľmi náročná. V taxonómii sa využívajú na charakterizáciu jednotlivých druhov tvarov endospór a materskej bunky. Na základe týchto znakov možno viac než 60 zástupcov rodu *Bacillus* rozdeliť do troch morfológických skupín a celkovo je popísaných 77 druhov. [34, 36]

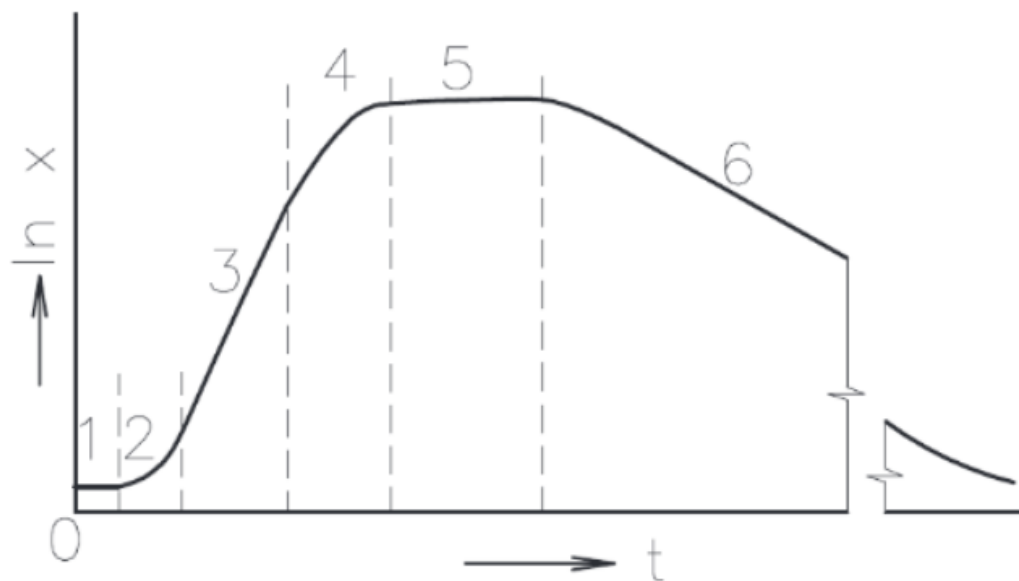
Bacillus coagulans má endospóry oválneho typu a zásadne zdurujú materskú bunku. Je to prospešná baktéria, tiež známa ako *Lactobacillus sporogenes* vďaka svojej schopnosti produkovať spóry. Využíva sa ako bezpečné účinné probiotikum, ktoré nevyžaduje žiadnu špeciálnu manipuláciu. Dokážu prežiť v žalúdočnej kyseline a dostanú sa až do tenkého čreva bez akejkoľvek výraznej straty živých organizmov. Väčšina probiotík nemá schopnosť prežiť teplotu a pH žalúdka. *Bacillus coagulans* funguje aj v oblastiach, v ktorých ostatné probiotiká už nie. [34, 36, 37]



Obrázok 8: *Bacillus coagulans* (modrý krúžok) a sporujúci *B. coagulans* (červený krúžok) [37]

2.8 Rastová krivka

Ak vložíme mikrobiálnu kultúru do nového životného prostredia a budeme sledovať zmenu množstva mikroorganizmov v závislosti od času, získame takzvanú rastovú krivku. Táto krivka má zvyčajne tvar, ktorý je zobrazený na Obr. 8 a môžeme na nej pozorovať niekoľko charakteristických fáz. [38]



Obrázok 9: Priebeh rastu mikroorganizmov: 1 – lag fáza, 2 – prechodná akceleračná fáza, 3 – fáza exponenciálneho rastu, 4 – „deceleračná“ fáza, 5 – stacionárna fáza, 6 – fáza odumierania. [39]

Lag fáza nastáva po zahájení kultivácie a môže mať rôznu dĺžku. Jej trvanie závisí od podmienok, od veľkosti inokula a jeho fyziologického stavu. Z priemyselného hľadiska je lag fáza nežiadúca, pretože v tejto fáze sa kultúra adaptuje na nové prostredie a množstvo mikroorganizmov sa nemení. [38, 40]

Vo fáze zrýchľujúceho rastu (prechodná akceleračná fáza) sa nameria zrýchľujúci prírastok mikroorganizmov, pretože väčšina dokončila fázu adaptácie a začína sa postupne deliť. [27, 38]

Exponenciálna fáza rastu je fáza, kedy sa mikroorganizmy delia v pravidelných krátkych intervaloch. Je dôležité aby médium obsahovalo dostatok živín. V tejto fáze dochádza k najväčšej produkcii primárnych metabolitov, ako sú etanol a kyselina mliečna. Na konci exponenciálnej fázy dosahujú bunky svoju maximálnu rýchlosť rastu. [38, 40]

Vo fáze spomaľujúceho sa rastu („deceleračná“ fáza) sa začína prejavovať vyčerpanie živín a hromadenie splodín metabolizmu. Mikroorganizmy sa prestávajú množiť, začína sa zvyšovať počet odumretých buniek a celkový rast sa spomaľuje. [38]

Stacionárna fáza označuje dobu, kedy koncentrácia mikroorganizmov ostáva konštantná. Proces je výrazne inhibovaný niektorou zo živín a organizmy aktivujú obranné mechanizmy.

Postupne sa mení fyziológia väčšiny populácie a aktivuje sa sekundárny metabolizmus, čo má význam pre priemysel. [38, 40]

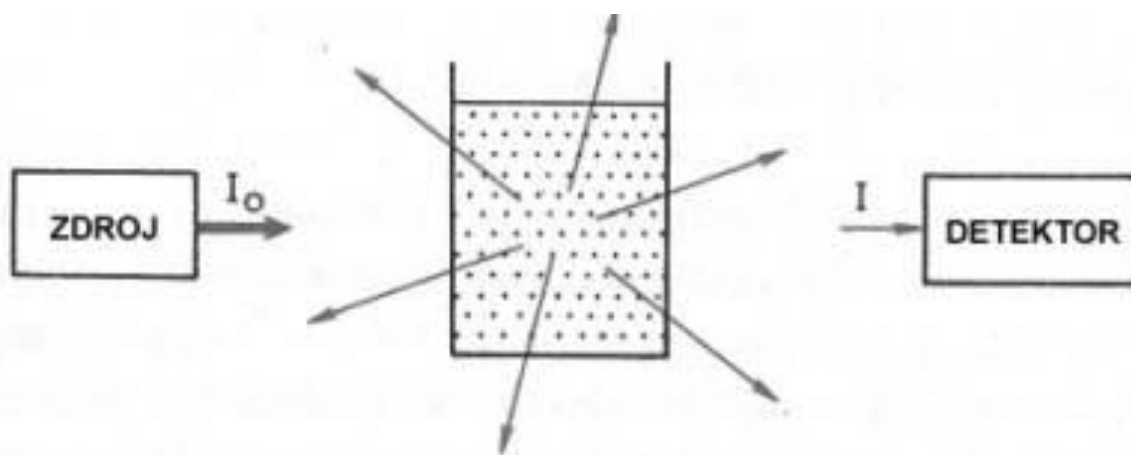
Vo fáze odumierania dochádza z dôvodu výrazného nedostatku živín a inhibičných faktorov k lýze buniek. [38]

2.9 Použité analytické metódy

2.9.1 Turbidimetria

Turbidimetria je optická metóda, ktorá meria stupeň zakalenia (turbiditu) koloidných roztokov a suspenzií. Dochádza k čiastočnému pohlteniu žiarenia časticami a k jeho čiastočnému rozptylu. Detektor sleduje pokles intenzity žiarenia prechádzajúceho absorbujúcou a rozptyľujúcou vrstvou. Na rozdiel od nefelometrie je detektor umiestnený v smere osi lúča – žiarenie, ktoré prejde vzorkou je ochudobnené o rozptýlenú zložku žiarenia. Turbidimetria je vhodná pre koncentrovanejšie roztoky. [41, 42, 43]

Výsledky merania sú značne ovplyvnené podmienkami stanovovania. Hlavný vplyv na namerané hodnoty má veľkosť a tvar častíc. Dôležitú úlohu hrá aj faktor času. Je nutné dodržiavať okamih odčítania hodnoty na prístroji. Kvantifikácia je možná metódou kalibračnej krivky. [41]



Obrázok 10: Schéma turbidimetrie [43]

2.9.2 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia – HPLC

Chromatografia je separačná metóda, ktorá slúži predovšetkým na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu vzoriek. Vzorka sa vnáša medzi vzájomne nemiešateľné fázy, ktoré nazývame stacionárna (nepohyblivá) a mobilná (pohyblivá) fáza. Vzorka sa umiestňuje na začiatok stacionárnej fázy a pohybom mobilnej fázy cez fázu stacionárnu je vzorka touto sústavou unášaná. Analyt sa behom separácie rozdeľuje medzi stacionárnu a mobilnú fázu. Čas strávený v jednej alebo druhej fáze závisí od afinity látky k jednotlivým fázam. V kvapalinovej chromatografii je mobilnou fázou kvapalina. [41, 44]

Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) predstavuje najúčinnnejšiu metódu chromatografického delenia s možnosťou stanovenia

analytov s veľmi nízkymi koncentráciami, najmä organických látok i v komplikovaných matriciach. Jej hlavnými súčasťami sú zásobník mobilnej fázy, pumpa, zariadenie pre dávkovanie vzorky, kolóna, detektor spojený so zapisovačom. Jednotlivé súčasti chromatografu sú zoradené tak ako nimi postupne prechádza mobilná fáza. [41]

Kvapalinu pretláča systémom pumpa. Pre účinnú separáciu je nutné použiť sorbent s dostatočne malými časticami (rádovo stotiny mm), čo v kvapaline vytvára značný odpor. Preto pumpa pracuje pod vysokým tlakom až niekoľkých MPa. Dávkovaciu slučku so známym objemom naplníme roztokom vzorky a otočením ventilu túto slučku zaradíme do prúdu mobilnej fázy, ktorá unáša vzorku kolónou. [41, 44]

Kolóna je trubica plnená stacionárnou fázou s veľkým povrchom. Využívajú sa náplňové kolóny s veľmi malými časticami, približnej veľkosti 5-10 μm . Tu dochádza ku chromatografickému deleniu. [41, 44]

Detektor analyzuje mobilnú fázu na výstupe z kolóny a podáva informáciu o jej zložení. Predpokladá sa, že detektor je selektívny pre analyt a málo citlivý na mobilnú fázu. Využívajú sa detektory optické a elektrochemické. Najčastejšie používané detektory sú fotometrické, refraktometrické a fluorescenčné, patriace do skupiny optických detektorov. Ak roztoky obsahujú zložky oxidovateľné alebo redukovateľné na polarizovateľnej elektróde, možno použiť elektrochemické detektory – voltametrické alebo vodivostné. [41]

Charakteristika analytu je zaznamenaná v chromatograme, teda závislosti signálu detektora od času. Látku identifikujeme pomocou umiestnenia maxima píku v chromatograme, ktoré závisí od doby zdržania (retencie) danej látky v kolóne. Množstvo látky určíme pomocou plochy píku. Čím vyšší je obsah zložky vo vzorke, tým väčšia je plocha píku a jeho výška. [41, 44]

2.9.3 Metóda podľa Nelsona a Somogyiho

Táto metóda sa radí medzi spektrofotometrické metódy stanovovania cukrov. Metódy spektrálnej analýzy všeobecne sú založené na interakcii hmoty a elektromagnetického žiarenia. Fotometricky sa stanovujú farebné látky alebo látky, ktoré absorbujú UV žiarenie. Bezfarebné alebo málo farebné látky sa chemickou reakciou prevedú na intenzívne absorbujúce zlúčeniny. [44, 45]

Metóda Somogyiho a Nelsona je založená na redukčných účinkoch cukrov. Reakciou mednatých iónov (Cu^{2+}) s redukujúcimi cukrami vznikajú medné ióny (Cu^+), ktoré ďalej redukujú arzenomolybdénovú kyselinu na molybdénovú modrú. [45]

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité chemikálie

3.1.1 Stanovenie rastových kriviek mikroorganizmu

- Lactobacillus MRS Broth (MRS Broth), HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
- Peptone, Bacteriological, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
- Beef Extract Powder, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
- Yeast Extract Powder, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.

- di-Ammoniumhydrogencitrate $\geq 98\%$ p.a., ACS, Carl Roth GmbH + Co. KG
- Octan sodný bezvodý p.a., $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$, Lach-Ner s.r.o.
- Síran horečnatý bezvodý čistý, MgSO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Síran manganatý monohydrát čistý, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner s.r.o.
- Hydrogénfosforečnan didraselný p.a., K_2HPO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Galaktosa DAB 6, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Lachema a.s.
- d-Xylosa nejčistší, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$, Spolek pro chemickou a hutní výrobu a.s.

3.1.2 Stanovenie obsahu vlákniny podľa Henneberga a Stohmanna

- Kyselina sírová 96% p.a., H_2SO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Hydroxid sodný, mikroperly p.a., NaOH , Lach-Ner s.r.o.
- Etanol absolútny p.a., $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck

3.1.3 Stanovenie obsahu celulózy

- Kyselina octová 99% p.a., $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina dusičná 65% p.a., HNO_3 , Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina sírová 96% p.a., H_2SO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Etanol absolútny p.a., $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck

3.1.4 Extrakcia hexánom

- Hexán č., C_6H_{14} , Lach-Ner s.r.o.

3.1.5 SSF

- Novozymes 50013 (celulázový komplex)
- Novozymes 50010 (β -glukozidáza)

3.1.6 Stanovenie podľa metódy Somogyiho a Nelsona

- D-Glukóza bezvodá p.a., $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Lach-Ner s.r.o.
- Vínan sodno-draselný tetrahydrát č., $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner s.r.o.
- Hydrogénuhličitan sodný p.a., NaHCO_3 , Lachema a.s.
- Síran sodný bezvodý č., Na_2SO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Uhličitan sodný bezvodý, Na_2CO_3 , PENTA
- Síran meďnatý pentahydrát p.a., $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner s.r.o.
- Síran sodný, Na_2SO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Molybdénan amónny pentahydrát p.a., $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Lach-Ner s.r.o.,
- Kyselina sírová 96% p.a., H_2SO_4 , Lach-Ner s.r.o.
- Hydrogénarzéničnan sodný heptahydrát, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, AlfaAesar

3.1.7 Príprava mobilnej fázy pre HPLC

- Kyselina sírová 96% p.a., H₂SO₄, Lach-Ner s.r.o.

3.1.8 Príprava kalibračných roztokov kyseliny mliečnej a kyseliny octovej

- Kyselina L(+)-mliečná 80 %, C₃H₆O₃, PENTA s.r.o.
- Kyselina octová 99% p.a., C₂H₄O₂, Lach-Ner s.r.o.

3.1.9 Úprava pH

- Kyselina sírová 96% p.a., H₂SO₄, Lach-Ner s.r.o.
- Hydroxid sodný, mikroperly p.a., NaOH, Lach-Ner s.r.o.

3.2 Použité prístroje a pomôcky

- Analytické váhy Pioneer™ Ohaus
- Váhy elektronické Helago TS-300
- Váhy elektronické Scaltec SAS 50
- pH metr InoLab 720 SET, Merci s.r.o.
- Trepáčka IKA lab dancer vario
- Spektrofotometer ThermoSpectronic Helios δ
- Sušiareň Binder FD 53
- Centrifúga Eppendorf Centrifuge 5417 R
- Chladnička Indesit
- Chladnička Gorenje
- Dvojplatňový varič Eta
- Termostat biologický INB 300
- Trepáčka Heidolph unimax 1010
- Inkubátor Heidolph inkubátor 1000
- Tlakový hrniec Fagor Rapid Xpress
- Elektrický mixér Hyundai CHO 110, 300 W
- UV sterilný box BioAir Aura mini
- Mikropipety a bežné laboratórne sklo
- Trepací inkubátor BioSan ES-20
- Turbidimeter Ultrospec 10

3.3 Použitý software

- Microsoft Word 2013
- Microsoft Excel 2013
- ChemSketch
- Empower Pro

3.4 Použitá kultúra

Pre fermentáciu sa použila kultúra *Bacillus coagulans* CCM 2013 a kultúra *Lactobacillus casei* CCM 4798, ktoré pochádzajú z českej národnej zbierky typových kultúr.

3.5 Použitý substrát

Za substrát sa použili šupky zo zreých pomarančových plodov odrody *Navel* pochádzajúcej zo Španielska.

3.6 Príprava roztokov, vzoriek a činidiel

3.6.1 Príprava živných médií pre stanovenie rastových kriviek

Živné média sa pripravovali dvojakým spôsobom. Pre kultivácie, pri ktorých sa porovnával rast mikroorganizmu pri rozdielnych teplotách a hodnotách pH, sa pripravilo kultivačné médium rozpustením 5,52 g práškoveho média (MRS) v 100 ml destilovanej vody. Pre kultiváciu, pri ktorej sa porovnával rast mikroorganizmu na rôznych sacharidoch sa pripravili médiá so zložením podľa tabuľky 3.

Tabuľka 3: Navážky jednotlivých zložiek média na 100 ml destilovanej vody

Zložka média	m zložka [g]	
	1.	2.
Pepton	1,000	
Hovädzí extrakt	1,000	
Kvasničný extrakt	0,500	
Galaktóza	2,000	-
Xylóza	-	2,000
Citran sodný	0,200	
Hydrogénfosforečnan didraselný	0,200	
Octan sodný	0,500	
Síran horečnatý	0,010	
Síran manganatý	0,005	

Médiá sa pripravovali v Erlenmeyerových bankách, ktoré sa uzatvárali zátkou. Pripravené médiá sa pred samotným zaočkovaním vždy sterilizovali.

3.6.2 Mechanická predúprava substrátu

Pomarančové šupky z pomarančov odšŕavených domácim odšŕavovačom sa mleli v mixéri cca 2 minúty, aby sa získali častice s menším rozmerom v rozpätí 0,3-0,9 cm. Rozmixované pomarančové šupky sa udržiavali v chlade v uzavretých plastových nádobách.

3.6.3 Príprava vzorky pre fermentácie

Fermentácie sa vykonávali na pôvodných pomarančových šupkách a na hydrolyzátach pomarančových šupiek. Pre fermentácie na pomarančových šupkách bez úpravy sa využívali suspenzie s rozmixovanými pomarančovými šupkami s koncentráciou 25 % w/v, ktoré sa pripravili navážením 25 g mletých pomarančových šupiek a pridaním 75 ml destilovanej vody. Takto pripravená vzorka má hodnotu pH $2,8 \pm 0,1$.

Paralelne s mojou bakalárskou prácou sa robila bakalárska práca na tému *Využití odpadních materiálů k přípravě hydrolyzátů pro fermentační fázi*, z ktorej sa použili produkty hydrolýzy s najväčšou výťažnosťou glukózy. Najúčinnjšou hydrolýzou bola enzymatická hydrolýza kombináciou enzýmov celulóza a β -glukozidáza.

3.6.4 Príprava zásobného roztoku glukózy o koncentrácii $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

K príprave zásobného roztoku glukózy bolo navážených 0,05 g glukózy s presnosťou na štyri desatinné miesta. Následne bola navážka glukózy kvantitatívne prevedená do odmernej banky a doplnená na 100 ml.

3.6.5 Príprava roztokov pre stanovenie redukujúcich cukrov

3.6.5.1 Somogyiho činidlo I

Na prípravu Somogyiho činidla I sa v 200 ml destilovanej vody rozpustilo a zmiešalo 12 g vínanu draselno-sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného a 18 g uhličitanu sodného. Potom sa navážilo 144 g síranu sodného. Pripravená navážka Na_2SO_4 sa za stáleho miešania pomaly pridávala do 600 ml teplej vody. Pripravené roztoky sa zmiešali a získalo sa 800 ml Somogyiho činidla I, ktoré sa uchovávalo na tmavom mieste vo fľaši z tmavého skla.

3.6.5.2 Somogyiho činidlo II

Na prípravu Somogyiho činidla II sa navážili 4 g pentahydrátu síranu meďnatého a 36 g bezvodého síranu sodného. Navážky sa rozpustili a zmiešali v 200 ml destilovanej vody. Činidlo sa uchovávalo na tmavom mieste vo fľaši z tmavého skla.

3.6.5.3 Nelsonovo činidlo

Nelsonovo činidlo sa pripravilo prvotne rozpustením 25 g molybdénanu amónneho v 450 ml destilovanej vody a pridaním 21 ml koncentrovanej kyseliny sírovej. Ďalej sa k roztoku pridali 2 g heptahydrátu hydrogénarzéničnanu sodného rozpustené v 25 ml destilovanej vody. Skôr ako sa činidlo použilo bolo nutné ho nechať 48 hodín v termostate nastavenom na teplote 37°C bez prístupu svetla. Činidlo sa uchovávalo na tmavom mieste vo fľaši z tmavého skla.

3.6.6 Príprava mobilnej fázy pre HPLC

Ako mobilná fáza na analýzu kyseliny mliečnej, kyseliny octovej a kyseliny citrónovej metódou HPLC sa použil roztok kyseliny sírovej s koncentráciou $10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Tento roztok sa pripravil v odmernej banke s objemom 1000 ml. Do odmernej banky sa pipetovalo 539 μl

koncentrovanej kyseliny sírovej a objem sa doplnil destilovanou a deionizovanou vodou po rysku.

3.6.7 Príprava kalibračných roztokov kyseliny mliečnej a kyseliny octovej a kyseliny citrónovej

Pripravili sa kalibračné roztoky kyseliny mliečnej a kyseliny octovej tak, že najprv sa pripravil roztok s najväčšou koncentráciou. Následne sa postupným riedením pripravili roztoky s nižšími koncentraciami. Pre kalibráciu kyseliny mliečnej sa pripravilo 5 roztokov s koncentraciami 0,1; 0,3; 0,5, 0,7 a $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Pre kalibráciu kyseliny octovej a kyseliny citrónovej sa pripravili 3 roztoky s koncentraciami 0,1; 0,25 a $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.6.8 Príprava 2% roztoku NaOH na úpravu pH

K príprave 2% roztoku NaOH bolo navážených 0,2 g NaOH s presnosťou na štyri desatinné miesta. Následne bola navážka hydroxidu kvantitatívne prevedená do odmernej banky a doplnená na 100 ml.

3.6.9 Príprava 1% roztoku H_2SO_4 na úpravu pH

K príprave 1% roztoku H_2SO_4 bolo napipetovaných 1,04 ml 96% H_2SO_4 do odmernej banky a následne bola banka doplnená po rysku na 100 ml.

3.7 Odber vzoriek

Na analýzu bolo odoberaných 1,5 ml vzorky do centrifugačných skúmaviek s objemom 2 ml..

3.8 Pracovné postupy jednotlivých metód

3.8.1 Stanovenie rastových kriviek mikroorganizmu

Najprv sa pripravilo 24-hodinové inokulum mikroorganizmu *Bacillus coagulans*. Z inokula sa odobralo 10 ml, ktorými sa zaočkovali všetky kultivačné médiá s objemom 100 ml, ktoré sa pripravili podľa postupu prípravy v kapitole 3.6.1.. Banky s kultivačnými médiami sa umiestnili na trepačky nastavené na 150 otáčok za minútu. Aby sa pokryla rastová krivka aj počas noci, bolo nutné pripraviť 2 sady baniek s časovým rozstupom 12 hodín.

Sledoval sa priebeh rastu mikroorganizmu pri rôznych teplotách, pri rôznych hodnotách pH a za použitia rôznych sacharidov v kultivačnom médiu. Kultivácia prebiehala pri teplotách 35 °C, 45 °C a 55 °C nastavených pomocou termostatu pri pôvodnom pH ($6,5 \pm 0,2$). Ďalej prebiehala kultivácia pri pH 3, pH 5 a pH 7, každá pri teplote nastavenej na 45 °C. A na záver sa kultivovalo na médiách pripravených podľa postupu prípravy v kapitole 3.6.1. tak, že sa sacharid glukóza nahradil v jednom médiu galaktózou a v druhom xylózou – vyskytujúce sa v pomarančových plodoch. Táto kultivácia prebiehala pri pôvodnom pH a s teplotou nastavenou na 45 °C.

Vzorky sa odoberali každé 2 hodiny po dobu 36 hodín do konštantnej hodnoty optickej hustoty. Pre stanovenie priebehu rastu sa merala optická hustota pomocou turbidimetra.

3.8.2 Stanovenie sušiny substrátu

Najprv sa miska nechala 1 hodinu v sušiarňi sušiť pri teplote 105 °C. Po vychladnutí sa miska zvážila a následne sa do misky navážilo 5 g vzorky pomarančových šupiek s presnosťou na štyri desatinné miesta. Miska s naváženími šupkami sa nechala v sušiarňi sušiť po dobu 90 minút a na teplote 130 °C. Po vysušení sa miska nechala vychladnúť v exsíkátore a po uplynutí cca 40 minút sa miska so vzorkou zvážila s presnosťou na 4 desatinné miesta. Meranie sa vykonalo pre kontrolu tri krát. Obsah sušiny sa vypočítal podľa nasledujúcich vzťahov:

$$\%_{\text{sušina}} = \frac{(m_{\text{miska so vzorkou}} - m_{\text{suchá miska}})}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 \quad (4)$$

3.8.3 Stanovenie obsahu vlákničky podľa Henneberga a Stohmanna

Do 500 ml destilačnej banky sa navážili 2-3 g rozmixovanej vzorky pomarančových šupiek. Do banky sa pridalo 200 ml 5% kyseliny sírovej a banka sa varila 30 minút pod spätným chladičom. Behom mierneho varu sa bankou niekoľkokrát zamiešalo. Po 30 minútach sa ešte za horúca roztok filtroval cez fritu M2 a premýval horúcou destilovanou vodou. Zvyšok po filtrácii vo frite sa kvantitatívne previedol späť do destilačnej banky pomocou 200 ml 5% hydroxidu sodného. Banka sa varila ďalších 30 minút pod spätným chladičom. Po uplynutí 30 minút sa roztok v banke znova filtroval cez fritu a premýval horúcou vodou a etanolom. Obsah frity sa sušil pri 105 °C. Po vysušení a vychladnutí sa fritu zvážila a vložila do muflovej pece, kde sa obsah frity spálil pri teplote 650 °C. Po vychladnutí sa fritu zvážila.

$$m_{\text{vláknina}} = m_{\text{po sušení}} - m_{\text{po spaľovaní}} \quad (5)$$

$$\%_{\text{vláknina}} = \frac{m_{\text{vláknina}}}{m_{\text{navážka pomarančo}}} \cdot 100 \quad (6)$$

3.8.4 Stanovenie obsahu celulózy

Do 100 ml Erlenmeyerovej banky sa navážilo 0,8 g vzorky pomarančových šupiek s presnosťou na 4 desatinné miesta. Vzápätí sa do banky pridalo 30 ml kyseliny octovej a dusičnej (80% kyselina octová : konc. kyselina dusičná = 10 : 1). Banka sa ponorila do vriacej vodnej lázne a po uplynutí 1 hodiny sa obsah banky kvantitatívne previedol pomocou etanolu do vopred zváženej frity S3 a potom sa filtroval. Fritu so vzorkou sa po premytí etanolom sušila 4 hodiny v sušiarňi pri teplote 105 °C. Po uplynutí 4 hodín sa fritu so vzorkou nechala chladiť v exsíkátore a po vychladnutí sa zvážila. Vzorka sa pomocou etanolu previedla do 100 ml Erlenmeyerovej banky. Banka sa so vzorkou a etanolom nechala vo vriacej vodnej lázni, až kým sa všetok etanol neodparil. Na to sa do banky pridalo 20 ml 72% kyseliny sírovej. Vzorka sa nechala hydrolyzovať na trepačke (120 rpm) pri teplote 30 °C. Obsah banky sa kvantitatívne previedol do frity S3 s vopred zmeranou hmotnosťou pomocou etanolu, filtroval sa a nechal sa sušiť 4 hodiny v sušiarňi. Po uplynutí tejto doby sa fritu nechala chladiť

v exsikátore a po ochladení sa zvažila. Obsah celulózy vo vzorke sa vypočítal pomocou nasledujúcich vzťahov.

$$\%_{\text{celulóza}} = \frac{(m_{\text{frita} + \text{vzorka po 1. sušení}} - m_{\text{frita}}) - (m_{\text{frita} + \text{vzorka po hydrolýze}} - m_{\text{frita}})}{m_{\text{vzorka}}} \cdot 100 \quad (7)$$

3.8.5 Extrakcia hexánom

Oleje nachádzajúce sa v pomarančových šupkách, ktoré spôsobujú inhibíciu rastu mikroorganizmov sa extrahovali hexánom. Pomleté pomarančové šupky sa vložili do Erlemeyerových baniek a pridal sa hexán tak, aby boli všetky šupky zaliate. Banky so šupkami sa nechali trepať na trepačkách 12 hodín. Po uplynutí 12 hodín sa šupky prefiltrovali a premývali destilovanou vodou až do vymiznutia organickej fázy.

3.8.6 Fermentácie

3.8.6.1 SHF

Fermentácií sa vykonalo niekoľko vždy podľa stanovených optimálnych podmienok mikroorganizmu, teda pri pH 7 a pri teplote 45 °C nastavenej v termostate.

V prvej sade sa fermentovalo na 25% w/v suspenziách rozmixovaných pomarančových šupiek, kde prvý typ suspenzie bol pripravený zo šupiek extrahovaných hexánom podľa postupu popísanom v kapitole 3.8.5. a druhý typ suspenzie bol pripravený z neextrahovaných šupiek. Takto pripravené suspenzie sa zaočkovali 10 ml 24-hodinového inokula kmeňa *Bacillus coagulans*.

V druhej sade fermentácií boli substrátmi produkty pochádzajúce z paralelne prebiehajúcej bakalárskej práce *Využití odpadních materiálů k přípravě hydrolyzátů pro fermentační fázi*, teda hydrolyzáty pripravené z neextrahovaných pomarančových šupiek. Prvým typom bol hydrolyzát pripravený z 25% w/v suspenzie pomletých šupiek za použitia enzýmu celulóza. Druhým typom bol hydrolyzát z 25% w/v suspenzie šupiek s využitím kombinácie enzýmov celulóza a β-glukozidáza. Hydrolyzáty sa zaočkovali 10 ml 24 hodinového inokula kmeňa *Bacillus coagulans*.

V poslednej sade boli rozmixované šupky najprv extrahované hexánom (viz 3.8.5.). Po extrakcii sa 25% w/v suspenzia podrobila hydrolýze za použitia kombinácie enzýmov celulóza a β-glukozidáza (viz *Využití odpadních materiálů k přípravě hydrolyzátů pro fermentační fázi*). V prvom prípade bol takto pripravený hydrolyzát zaočkovaný 10 ml 24 hodinového inokula kmeňa *Bacillus coagulans*. V druhom prípade sa hydrolyzát zaočkoval 10 ml 24-hodinového inokula kmeňa *Lactobacillus casei*.

Vzorky sa odoberali už od času 0 v 12-hodinových intervaloch po dobu 84 hodín.

3.8.6.2 SSF

Simultánna sacharifikácia a fermentácia sa vykonávala na dvoch typoch rozmixovaných pomarančových šupiek. V prvom prípade sa mleté pomarančové šupky extrahovali hexánom (viz 2.8.5.) a v druhom prípade sa použili mleté pomarančové šupky, ktoré sa nepodrobili extrakcii. V pripravenej 25% w/v suspenzii šupiek sa upravilo pH na hodnotu pH 7. Ďalej sa k suspenzii šupiek pridalo 833 μl enzýmu celulóza a 83,3 μl enzýmu β-glukozidázy. Táto zmes

sa zaočkovala 10 ml 24-hodinového inokula kmeňa *Bacillus coagulans*. Kultivácie prebiehali na trepačkách nastavených na 130 otáčok za minútu, temperovaných na teplotu 45 °C po dobu 84 h. Prvá vzorka bola odobratá už v čase 0 a ďalej sa vzorky odoberali v 12-hodinových intervaloch.

3.8.7 Stanovenie kalibračnej krivky glukózy podľa metódy Somogyiho a Nelsona

Na zostrojenie kalibračnej krivky bol použitý zásobný roztok glukózy s koncentráciou 0,5 g·l⁻¹, z ktorého sa pripravil kalibračný rad s koncentraciami glukózy v jednotlivých vzorkách od 0,02 g·l⁻¹ po 0,2 g·l⁻¹ s krokom 0,02 g·l⁻¹.

Do každej skúmavky sa pipetovalo 0,5 ml vzorky a 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v pomere 4:1). Skúmavky sa 10 minút zahrievali vo vriacej vodnej lázni. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa do každej skúmavky pridalo 0,5 ml Nelsonovho činidla a 3,5 ml destilovanej vody. Skúmavky sa premiešali na vortexe a zmerala sa absorbancia na spektrofotometri jednotlivých vzoriek proti blanku pri vlnovej dĺžke 530 nm. Blank bol pripravený obdobne ako vzorky, no namiesto 0,5 ml vzorky sa napipetovalo 0,5 ml destilovanej vody.

3.8.8 Stanovenie redukujúcich sacharidov podľa metódy Somogyiho a Nelsona

Odobrané vzorky behom fermentácie sa dali centrifugovať (10 000 rpm po dobu 10 minút), aby sa odstránil pevný podiel. Do každej skúmavky sa pipetovalo 0,5 ml 500 krát zriedeného supernatantu a 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v pomere 4:1). Skúmavky sa 10 minút zahrievali vo vriacej vodnej lázni. Po ochladení na laboratórnu teplotu sa do každej skúmavky pridalo 0,5 ml Nelsonovho činidla a 3,5 ml destilovanej vody. Skúmavky sa premiešali na vortexe a zmerala sa absorbancia na spektrofotometri jednotlivých vzoriek proti blanku pri vlnovej dĺžke 530 nm. Blank sa pripravil obdobne ako vzorky, no namiesto 0,5 ml vzorky sa napipetovalo 0,5 ml destilovanej vody.

3.8.9 Analýza pomocou HPLC

Vzorky odobraté behom fermentácie sa centrifugovali (10 000 rpm po dobu 10 minút), aby sa odstránil pevný podiel. Supernant sa podľa potreby riedil 10 alebo 20-krát destilovanou vodou. Zriedený supernant sa prefiltroval do vialiek cez nylónový filter s veľkosťou pórov 45 µl pomocou striekačiek. Za mobilnú fázu pre stanovenie kyseliny mliečnej, kyseliny octovej a kyseliny citrónovej sa použil roztok kyseliny sírovej s koncentráciou 10·10⁻³ M. Analýza prebiehala za prietoku 1ml·min⁻¹. Na stanovovanie bola použitá, kolóna Watrex Polymer IEX H-form o rozmeroch 8 × 250 mm s predkolónou Watrex Polymer IEX H-form o rozmeroch 40 × 8 mm. Pre detekciu bol použitý UV/VIS detektor (Watters), ktorý bol nastavený na vlnovú dĺžku 210 nm.

3.9 Štatistické spracovanie výsledkov

Všetky namerané hodnoty boli stanovované trikrát a následne sa vypočítal priemer týchto hodnôt pomocou funkcie PRIEMER v programe Microsoft Excel 2013. Hodnota intervalu

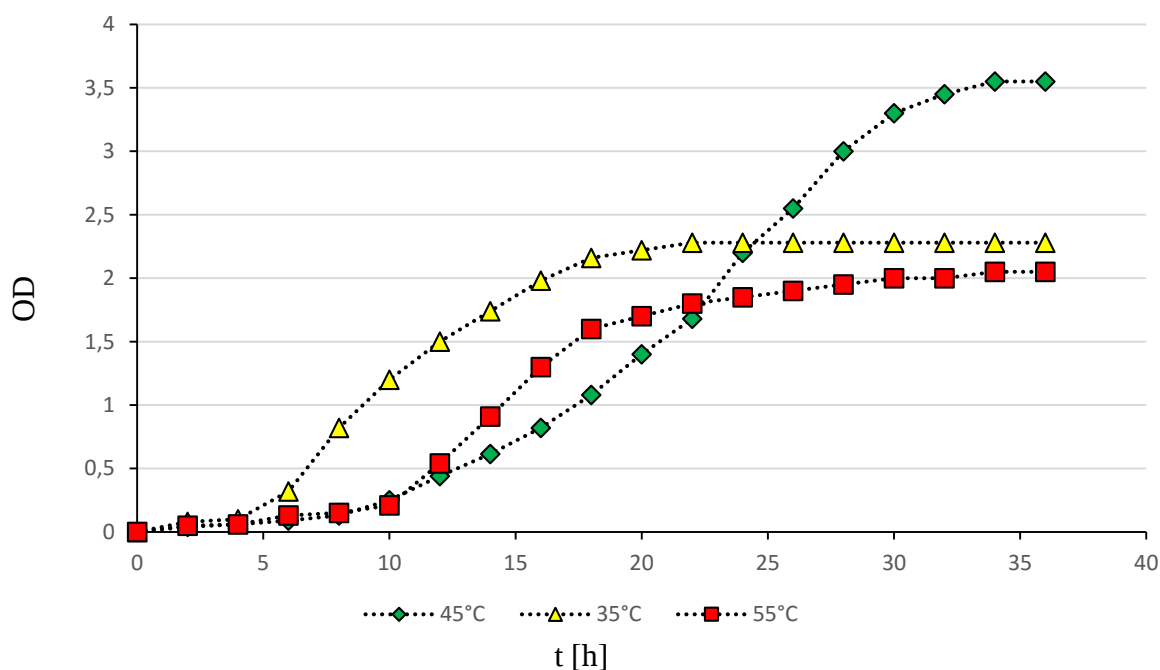
spoľahlivosti sa získala pomocou funkcie CONFIDENCE v tom istom programe. Ako hladina štatistickej významnosti sa zvolila hodnota $\alpha = 0,05$.

4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

4.1 Turbidimetrické stanovenie rastových kriviek

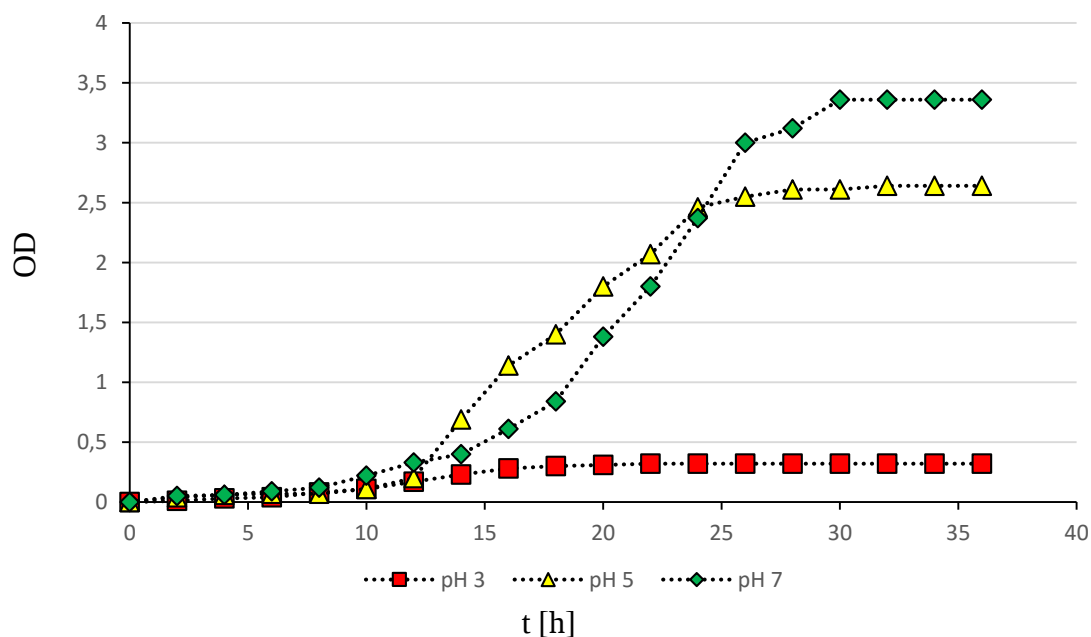
Sledoval sa priebeh rastu baktérie *Bacillus coagulans* za rôznych podmienok, ktoré sú približené v kapitole 3.8.1.. Priebeh rastu sa zaznamenal ako závislosť turbidimetricky stanovenej optickej hustoty (OD) na čase. Všetky namerané hodnoty spolu s intervalom spoľahlivosti sú uvedené v tabuľkách v prílohe I. Chybové úsečky sú príliš malé, preto sa do grafov neuvádzali.

Graf 1: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri rozdielnych teplotách



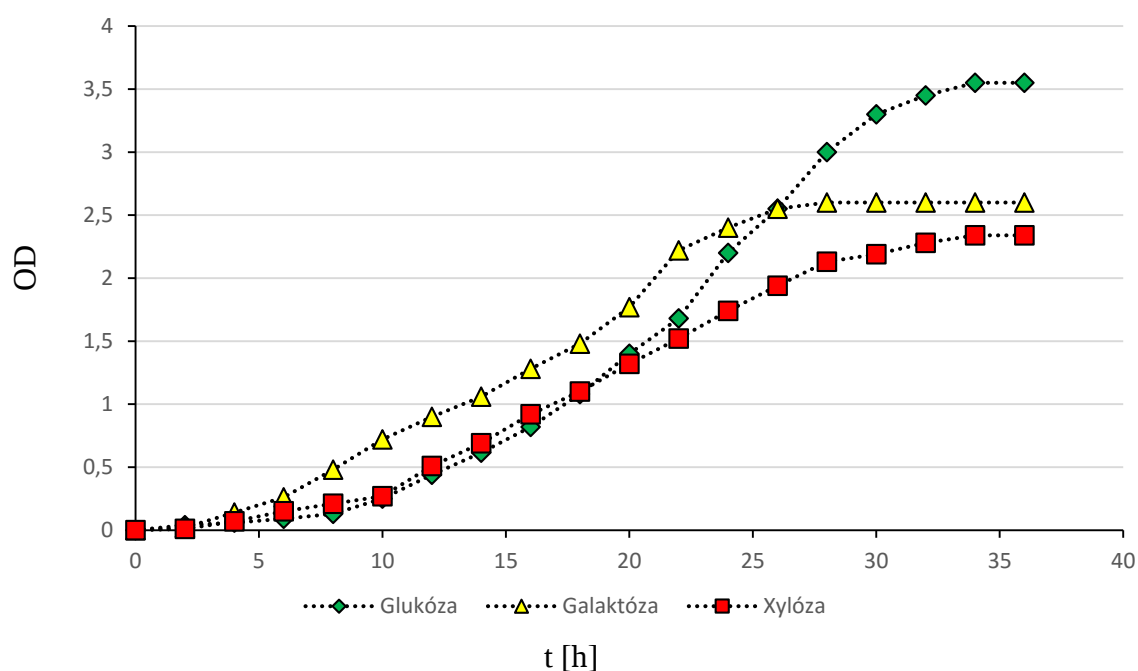
Na grafe 1 je zobrazené porovnanie rastu mikroorganizmu *Bacillus coagulans* pri rôznych teplotách. Vo všetkých prípadoch mala lag fáza trvanie asi 4 hodiny. Počas tejto fázy sa bunky prispôbovali prostrediu. Ďalej nasledovala fáza exponenciálneho rastu. Pri teplote 35 °C nastala stacionárna fáza už asi v 20. hodine, zatiaľ čo pri teplote 45 °C nastala stacionárna fáza asi v 34. hodine. Hoci pri teplote 55 °C nastala stacionárna fáza v 34. hodine, tak ako pri teplote 45 °C, výťažky biomasy sú skoro dvojnásobne nižšie. Preto sa pre fermentácie zvolila teplota 45 °C.

Graf 2: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri rozdielnych pH



Na grafe 2 sú porovnané rastové krivky mikroorganizmu pri rôznych hodnotách pH. Pri každej hodnote pH trvala lag fáza až 6 hodín, čo mohlo byť spôsobené nedostatočným predhriatím živných médií pred zaočkovaním. Pri hodnote pH 3 sa dosahovali príliš nízke výtťažky biomasy, z čoho sa usúdilo, že bolo nutné upravovať pH substrátu pred fermentáciami, ktorého pôvodná hodnota bola $2,82 \pm 0,14$, pravdepodobne kvôli veľkému výskytu kyseliny citrónovej v pomarančových šupkách. Pri hodnote pH 5 nastala stacionárna fáza asi v 28. hodine. Najvyššie výtťažky biomasy sa dosiahli pri pH 7 a preto sa táto hodnota zvolila pre fermentácie. Tu stacionárna fáza nastala v 28. hodine.

Graf 3: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri raste na rozdielnych sacharidoch



V grafe 3 sú porovnané priebehy rastu mikroorganizmu na živných médiách obsahujúcich rôzne cukry, konkrétne galaktózu a xylózu, ktoré sa vyskytujú v pomarančových plodoch. Na krivku popisujúcu priebeh rastu na glukóze sa použili rovnaké hodnoty ako v tabuľke 1 v prílohe I, pri teplote 45 °C, pretože médium obsahuje sacharid glukózu. Z grafu 3 možno vidieť, že lag fáza mala pri všetkých krivkách približne rovnaké trvanie a to asi 4 hodiny. Rast mikroorganizmu na galaktóze dosiahol stacionárnu fázu asi v 28. hodine. Stacionárna fáza pri raste na glukóze a xylóze nastáva asi v 34. hodine, no najvyššie výťažky vôbec dosahoval mikroorganizmus na živnom médiu obsahujúcom glukózu.

4.2 Stanovenie sušiny substrátu

Tabuľka 4: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia vlhkosti pomarančových šupiek

Číslo vzorky	m suchá miska [g]	m miska so vzorkou [g]	m vysušená navážka [g]	m navážka [g]	Sušina [%]	Priemerná hodnota [%]
1.	1,1758	2,3020	1,1262	5,0003	22,5227	22,6 ± 0,2
2.	1,1847	2,3047	1,1200	5,0001	22,3996	
3.	1,1806	2,3233	1,1427	5,0001	22,8535	

Obsah sušiny pomarančových šupiek sa stanovil pomocou vzťahu:

$$\%_{\text{sušina}} = \frac{(m_{\text{miska so vzorkou}} - m_{\text{suchá miska}})}{m_{\text{navážka}}} \cdot 100 \quad (4)$$

Pomarančové šupky obsahujú 22,6 ± 0,2 % sušiny.

4.3 Stanovenie obsahu vlákniny podľa Henneberga a Stohmanna

Tabuľka 5: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pomarančových šupkách

Číslo vzorky	m navážka pomaranča [g]	m po sušení [g]	m po spaľovaní [g]	m vláknina [g]	Obsah vlákniny [%]	Priemerná hodnota [%]
1.	2,5003	20,4050	18,8286	1,5764	63,0484	64,5 ± 2,0
2.	2,5385	21,8822	20,2101	1,6721	65,8696	

Obsah vlákniny v pomarančových šupkách bol stanovený podľa vzťahov:

$$m_{\text{vláknina}} = m_{\text{po sušení}} - m_{\text{po spaľovaní}} \quad (5)$$

$$\%_{\text{vláknina}} = \frac{m_{\text{vláknina}}}{m_{\text{navážka pomaranča}}} \cdot 100 \quad (6)$$

Obsah vlákniny v pomarančových šupkách bol stanovený na 63,05 % a kontrolné meranie na 65,87 %. Priemerná hodnota obsahu vlákniny je približne 64,5 ± 2,0 %.

4.4 Stanovenie obsahu celulózy

Tabuľka 6: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pôvodných pomarančových šupkách

Číslo vzorky	m suchá frita [g]	m navážka [g]	m frita + vzorka po 1. sušení [g]	m frita + vzorka po hydrolýze [g]	Obsah celulózy [%]	Priemerná hodnota [%]
1.	46,5870	0,8000	46,6981	46,5970	12,6375	13,1 ± 0,6
2.	43,5085	0,8001	43,6181	43,5101	13,4983	

Tabuľka 7: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pomarančových šupkách po enzymatickej hydrolýze kombináciou enzýmov celulózy a β-glukozidázy

Číslo vzorky	m suchá frita [g]	m navážka [g]	m frita + vzorka po 1. sušení [g]	m frita 1 vzorka po hydrolýze [g]	Obsah celulózy [%]	Priemerná hodnota [%]
1.	40,0686	0,8003	40,0892	40,0689	2,5366	2,6 ± 0,1
2.	43,2451	0,8001	43,2669	43,2459	2,6247	

Obsah celulózy v pôvodných pomarančových šupkách a v hydrolyzáte pomarančových šupiek sa stanovil podľa vzorca:

$$\%_{\text{celulóza}} = \frac{(m_{\text{frita} + \text{vzorka po 1. sušení}} - m_{\text{frita}}) - (m_{\text{frita} + \text{vzorka po hydrolýze}} - m_{\text{frita}})}{m_{\text{vzorka}}} \cdot 100 \quad (7)$$

Obsah celulózy v pôvodných pomarančových šupkách sa stanovil na 13,1 ± 0,6 %. Obsah celulózy v hydrolyzáte pomarančových šupiek sa stanovil na 2,6 ± 0,1 %. Pôsobením kombináciou enzýmov celulózy a β-glukozidázy zhydrolyzovalo 80,25 % pôvodného množstva celulózy v pomarančových šupkách.

4.5 Stanovenie obsahu kyseliny citrónovej

Obsah kyseliny citrónovej v substráte sa stanovil metódou HPLC. Koncentrácia sa vypočítala pomocou kalibračnej krivky uvedenej v prílohe bakalárskej práce. Priemerná hodnota obsahu kyseliny citrónovej v substráte bola 0,2236 ± 0,0007 g·l⁻¹.

4.6 Fermentácie

Fermentácie sa vykonávali podľa postupu uvedeného v kapitole 3.8.6.. V jednotlivých vzorkách odobratých počas fermentácie v časových intervaloch uvedených v postupe sa stanovoval obsah redukujúcich sacharidov, kyseliny mliečnej a kyseliny octovej. Obsah redukujúcich sacharidov sa stanovil metódou Somogyiho-Nelsona podľa postupu uvedeného v kapitole 3.8.8. a obsah kyseliny mliečnej a kyseliny octovej sa stanovil pomocou HPLC podľa postupu uvedeného v kapitole 3.8.9..

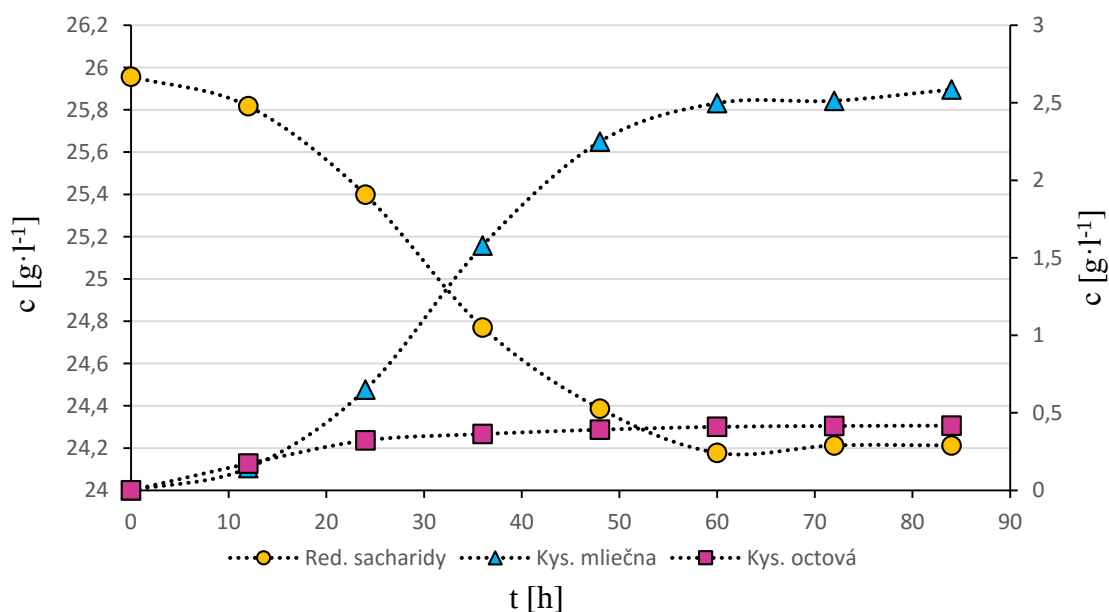
Prvá sada fermentácií na extrahovaných a neextrahovaných mletých pomarančových šupkách mala nulové výťažky kyseliny mliečnej a kyseliny octovej. Metódou Somogyiho

a Nelsona sa preukázalo, že obsah skvasiteľných cukrov v substráte bol príliš nízky, aby mikroorganizmus rástol. Substrát obsahoval najmä štruktúrne polysacharidy.

V druhej sade fermentácií na substrátoch obsahujúcich hydrolyzáty (viz 3.6.3.) sa preukázala prítomnosť redukujúcich cukrov metódou Somogyiho a Nelsona, no ich koncentrácia bola počas celého priebehu fermentácie konštantná. Taktiež metódou HPLC sa potvrdilo, že za celú dobu fermentácie nevznikala kyselina mliečna a ani kyselina octová. Pomarančové šupky, z ktorých sa pripravili hydrolyzáty neboli extrahované a pravdepodobne dochádzalo k inhibícii limonénom.

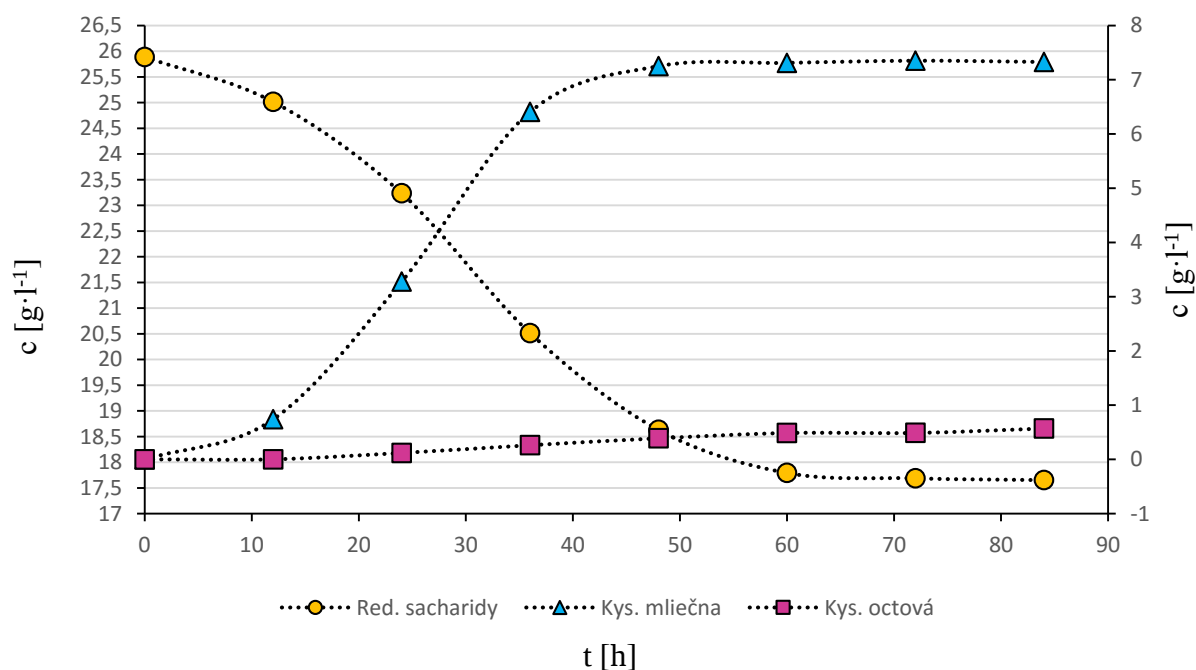
V tretej sade fermentácií, kde hydrolyzáty pochádzali z extrahovaných pomarančov sa k fermentácii použili mikroorganizmy *Bacillus coagulans* a *Lactobacillus casei*. Somogyi-Nelsonovou metódou sa zaznamenal úbytok redukujúcich sacharidov, s ktorým vznikala kyselina mliečna a kyselina octová, ktoré sa analyzovali pomocou metódy HPLC. Koncentrácie jednotlivých látok sa vypočítali pomocou kalibračných kriviek uvedených v prílohe. Hodnoty koncentrácií jednotlivých látok spolu s intervalom spoľahlivosti sú uvedené v tabuľke 1 v prílohe II. Tak ako pri rastových krivkách, chybové úsečky sú príliš malé aby sa uviedli do grafov.

Graf 4: Priebeh fermentácie metódou SHF využitím kmeňa *Bacillus coagulans*



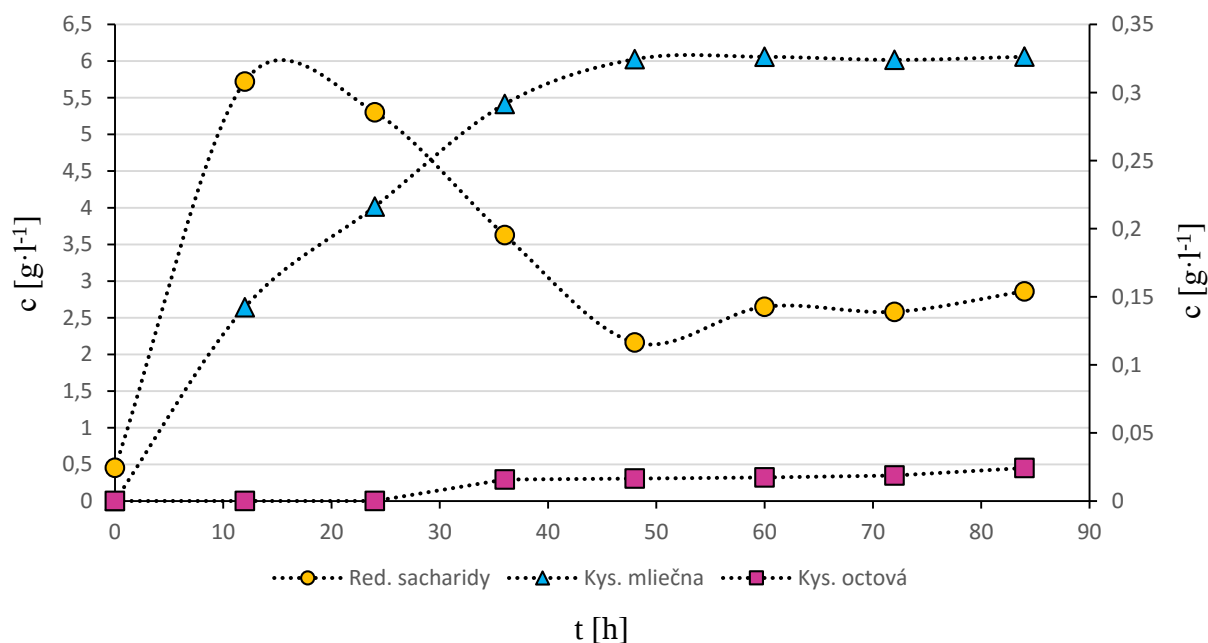
Namerané hodnoty z tabuľky 1 v prílohe II sa vyniesli do grafu 4. V grafe je možné pozorovať úbytok redukujúcich sacharidov, ktorý sa ustálil asi v 60. hodine fermentácie. Redukujúce sacharidy sa spotrebovávali na rast buniek kmeňa *Bacillus coagulans* a produkciu metabolitov, ako kyselina mliečna a kyselina octová. Z grafu možno usúdiť, že kyselina mliečna a kyselina octová sa už od 60. hodiny ďalej netvorili.

Graf 5: Pribeh fermentácie metódou SHF využitím kmeňa *Lactobacillus casei*



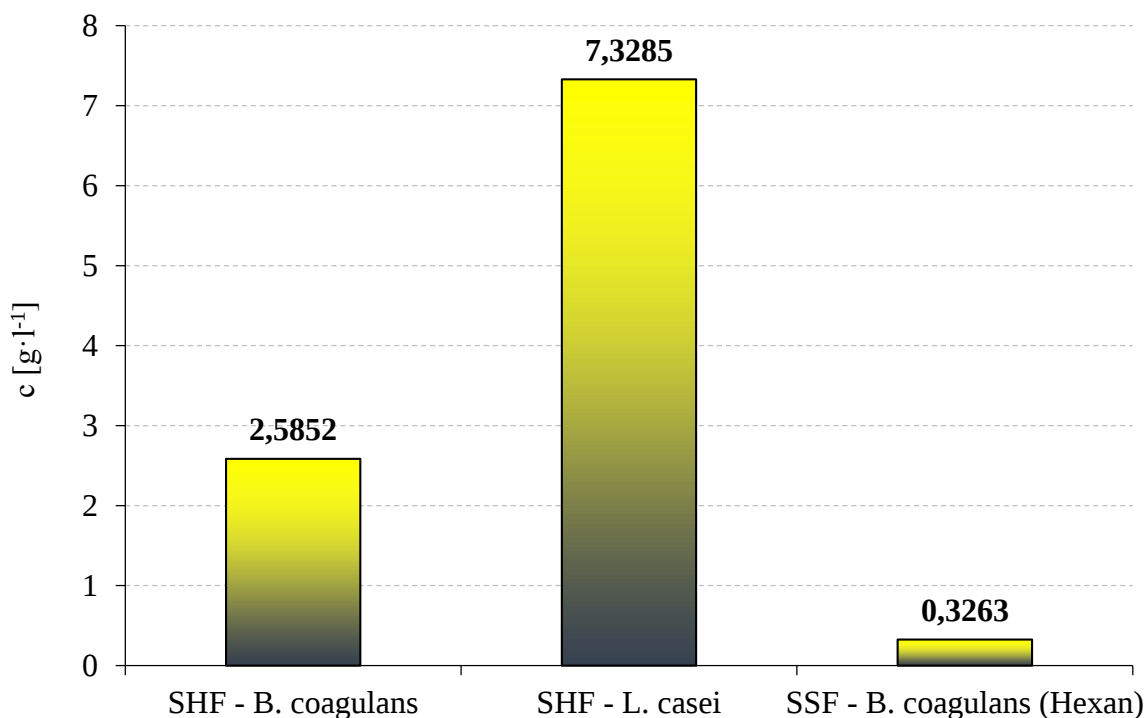
Z nameraných hodnôt uvedených v tabuľkách 1 a 2 v prílohe II je vidieť, že pri fermentácii mikroorganizmom *Lactobacillus casei* došlo k väčšej spotrebe redukujúcich sacharidov, no najmä k ďaleko vyššej produkcii kyseliny mliečnej ako v prípade fermentácie bunkami kmeňa *Bacillus coagulans*. Spotreba redukujúcich sacharidov od 60. hodiny ostala nezmenená. Produkcia kyseliny mliečnej sa ustálila v 48. hodine. Počas fermentácie dochádzalo tiež k produkcii kyseliny octovej, ktorej koncentrácia sa od 60. hodiny nemenila.

Graf 6: Pribeh fermentácie metódou SSF využitím kmeňa *Bacillus coagulans*



Simultánnou sacharifikáciou a fermentáciou vznikala kyselina mliečna iba vtedy, keď pomarančové šupky boli extrahované hexánom podľa postupu uvedeného v kapitole 3.8.6.2.. Na začiatku bola koncentrácia redukujúcich sacharidov veľmi nízka, no v 12. hodine sa jej koncentrácia značne zvýšila, keď už dochádzalo aj k tvorbe kyseliny mliečnej, ktorej produkcia sa ustálila v 48. hodine. K produkcii kyseliny octovej dlhú dobu nedochádzalo. Jej tvorba nastala medzi 24. a 36. hodinou, no koncentrácia kyseliny sa príliš nezväčšovala.

Graf 7: Celkové porovnanie výťažkov kyseliny mliečnej



Výtázky kyseliny mliečnej sa získali iba z hydrolyzátov z pomarančových šupiek extrahovaných hexánom. Tieto fermentácie sú navzájom porovnané v grafe 7. Porovnávací graf zobrazuje, že *Lactobacillus casei* má výrazne väčšiu výťažnosť kyseliny mliečnej ako *Bacillus coagulans*. Výtázky kyseliny mliečnej metódou SSF sú minimálne, čo mohlo byť spôsobené rozdielnymi optimálnymi podmienkami pre mikroorganizmus a pre kombináciu enzýmov.

5 ZÁVER

Bakalárska práca je zameraná na využitie termotolerantných kmeňov na prípravu vybraných metabolitov na hydrolyzátoch potravinového odpadu. Za potravinový odpad boli vybrané šupy z citrusových plodov, konkrétne pomarančové šupky. A preto zvoleným termotolerantným kmeňom bol *Bacillus coagulans* pre jeho výnimočné vlastnosti, keďže znáša vysoké teploty a nízke hodnoty pH. Primárnym metabolitom tohto kmeňa je kyselina mliečna, ktorá má veľkú perspektívu v oblasti biologicky rozložiteľných plastov. Experimentálna časť tejto bakalárskej práce sa zaoberala predovšetkým prípravou tejto kyseliny pomocou metódy samostatnej hydrolýzy a fermentácie (SHF).

Pred samotným začatím fermentácií sa zisťovalo za akých podmienok dochádza k najväčšej produkcii biomasy. Zistilo sa, že najväčší nárast biomasy sa dosiahol pri teplote 45 °C a pH 7. Tieto podmienky sa aplikovali pri fermentáciách.

V prvej sade fermentácií sa ako substrát použili pomleté šupy z plodov pomarančov. Koncentrácia substrátu bola 25 % w/v. V prvom prípade sa pomarančové šupy extrahovali organickým činidlom hexánom a v druhom prípade sa šupky neextrahovali. Tieto fermentácie boli neúspešné, pretože kyselina mliečna nevznikala. K produkcii metabolitov nedochádzalo, pretože v substráte sa nenachádzalo dostatočné množstvo skvasiteľných sacharidov.

V druhej sade fermentácií boli substrátom hydrolyzáty z pomarančov, ktoré sa neextrahovali hexánom. Hydrolyzáty pochádzali z enzymatickej hydrolýzy 25% w/v suspenzie pomarančových šupiek, konkrétne išlo o hydrolýzu enzýmom celulóza a o hydrolýzu kombináciou enzýmov β -glukozidázy a celulózy. Ani tieto fermentácie neboli úspešné. Kyselina mliečna nevznikala zrejme preto, lebo šupy, z ktorých sa hydrolyzáty pripravovali, neboli extrahované hexánom, a teda sa v substráte vyskytovalo množstvo esenciálnych olejov, spôsobujúcich inhibíciu rastu mikroorganizmov, ako je napríklad d-limonén.

V tretej sade sa na fermentáciu použili dva rôzne mikroorganizmy, aby sa zistilo, či kyselina mliečna nevznikala kvôli nevhodnému substrátu alebo mikroorganizmu. Druhým mikroorganizmom bol *Lactobacillus casei*, ktorý má vyššiu výťažnosť kyseliny mliečnej. Substrátom bol hydrolyzáť z 25% w/v suspenzie pomarančových šupiek extrahovaných hexánom. Na hydrolýzu sa použila kombinácia enzýmov celulóza a β -glukozidáza. V tejto sade kyselina mliečna vznikala. *Bacillus coagulans* vyprodukoval $2,585 \pm 0,009 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a *Lactobacillus casei* dokonca až $7,33 \pm 0,06 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Z toho vyplynulo, že pre fermentáciu šupiek z pomarančových plodov odrody Navel bolo nevyhnutné šupy extrahovať organickým činidlom, aby sa odstránili oleje inhibujúce rast buniek.

Na záver sa testovala súčasná sacharifikácia a fermentácia (SSF) na extrahovaných a neextrahovaných šupách hexánom, využitím kmeňa *Bacillus coagulans*. Fermentácia na neextrahovaných šupách dopadla opäť neúspešne, no fermentáciou na šupách extrahovaných hexánom kyselina mliečna vznikala. Výťažok SSF činí $0,33 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, čo je veľmi nízka hodnota. To je pravdepodobne spôsobené rozdielnymi optimálnymi podmienkami pre kmeň *Bacillus coagulans* a pre kombináciu enzýmov celulóza a β -glukozidáza. Optimálne podmienky pre rast organizmu *Bacillus coagulans* sú 45 °C a pH 7. Hoci optimálna teplota pre kombináciu enzýmov celulóza a β -glukozidáza je 45 °C, optimálnou hodnotou pH je 4,5.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] PLESSAS, S., et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, 2007, 98.4: 860-865.
- [2] NARAYANAN, Niju; ROYCHOUDHURY, Pradip K.; SRIVASTAVA, Aradhana. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 2004, 7.2: 167-178.
- [3] MOONEY, BrianáP. The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal*, 2009, 418.2: 219-232.
- [4] MAHMOOD, A. U.; GREENMAN, J.; SCRAGG, A. H. Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme and microbial technology*, 1998, 22.2: 130-137.
- [5] SUCHÝ, MVDr Ing Pavel, et al. Vědecký výbor výživy zvířat.
- [6] VAN DYK, J. S., et al. Food processing waste: Problems, current management and prospects for utilisation of the lignocellulose component through enzyme synergistic degradation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 26: 521-531.
- [7] SARKAR, Nibedita, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 2012, 37.1: 19-27.
- [8] ELNASHAR, Magdy. *Biotechnology of Biopolymers*. Rijeka: InTech, 2011. ISBN 978-953-3071-794.
- [9] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. Vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [10] HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource technology*, 2009, 100.1: 10-18.
- [11] COMA, Véronique. Polysaccharide-based biomaterials with antimicrobial and antioxidant properties. *Polímeros*, 2013, 23.3: 287-297.
- [12] CARRIER, Marion, et al. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35.1: 298-307.
- [13] MARÍN, Francisco R., et al. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 2007, 100.2: 736-741.
- [14] KEFFORD, J a B CHANDLER. The chemical constituents of citrus fruits. New York: Academic Press, 1970. ISBN 0120164620
- [15] Life Terpene: gli agrumi. *Contento Trade srl* [online]. Via Vieris 11, 2013 [cit. 2016-05-08]. Dostupné z: <http://www.it.contentotrade.net/siti-progetti-eu/life-terpene/gli-agrumi>
- [16] WIDMER, Wilbur; ZHOU, Weiyang; GROHMANN, Karel. Pretreatment effects on orange processing waste for making ethanol by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource technology*, 2010, 101.14: 5242-5249.

- [17] ANDREWS, R. E.; PARKS, L. W.; SPENCE, K. D. Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, 40.2: 301-304.
- [18] PAULOVÁ, Leona: Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. <http://www.chemagazin.cz/>
- [19] ZHU, J. Y., et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*, 2009, 64.3: 474-485.
- [20] TAHERZADEH, Mohammad J.; KARIMI, Keikhosro. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 2008, 9.9: 1621-1651.
- [21] BERG, Jeremy M, John L TYMOCZKO a Lubert STRYER. *Biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman, c2012. ISBN 978-1-4292-2936-4.
- [22] BLACK, Jacquelyn G, Laura J BLACK a Lubert STRYER. *Microbiology: principles and explorations*. 9th ed. Hoboken: Wiley, c2015. ISBN 978-1-118-74316-4.
- [23] Autor neznámý. <http://kabinet-chemie.webnode.cz> [cit. 10. 11. 2014] Dostupné na www: <http://kabinet-chemie.webnode.cz/images/200000190-812858180e-public/Glykol%C3%Bdza.png>
- [24] CHEN, Hongzhang. *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice* [online]. New York: Chemical Industry Press, 2014 [cit. 2016-04-17]. ISBN 71-221-8975-9.
- [25] ÖHGREN, Karin, et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*, 2007, 42.5: 834-839.
- [26] KÁDÁR, Zs; SZENGYEL, Zs; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*, 2004, 20.1: 103-110.
- [27] KAŠTÁNEK, František, Laura J BLACK a Lubert STRYER. *Bioinženýrství: principles and explorations*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001. ISBN 80-200-0768-7.
- [28] GONZALEZ, M. I., et al. Economic evaluation of an integrated 44ikrob for lactic acid production from ultrafiltered whey. *Journal of food engineering*, 2007, 80.2: 553-561.
- [29] SÖDERGÅRD, Anders; STOLT, Mikael. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in polymer science*, 2002, 27.6: 1123-1163.
- [30] MARQUES, Susana, et al. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemical engineering journal*, 2008, 41.3: 210-216.
- [31] SOEMPHOL, Wichai, et al. Global analysis of the genes involved in the thermotolerance mechanism of thermotolerant *Acetobacter tropicalis* SKU1100. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2011, 75.10: 1921-1928.

- [32] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., opr. A dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [33] OU, Mark S.; INGRAM, Lonnie O.; SHANMUGAM, K. T. L (+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 2011, 38.5: 599-605.
- [34] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [35] ELSCHNER, Mandy C. *BSL3 and BSL4 agents: epidemiology, microbiology, and practical guidelines*. Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell, c2012. ISBN 978-3-527-31715-8.
- [36] HORÁČKOVÁ, Šárka. Nové trendy v probiotikách. *Dairy Industries*, 2010, 28: 4.
- [37] *Bacillus Coagulans (Lactobacillus Sporogenes)-The King of Probiotics*. In: *FEBICO* [online]. Far East Bio-Tec Co., 2016 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://www.febico.com/en/page/FL-3-Bacillus-Coagulans.html>
- [38] Rozmnožování mikroorganismů [online]. Citováno 4. 5. 2010. Dostupné z: fzp.ujep.cz/~trogl/3Rozmnzovani.pdf
- [39] ROSYPAL, S. *Obecná bakteriologie*. 1. Vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981, 749 s.
- [40] RYCHTERA, Mojmír a Jan PÁČA. *Bioinženýrství kvasných procesů*. 2. opr. Vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1987.
- [41] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. A dopl. Vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [42] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [43] VÁVROVÁ, Jaroslava. In: *Datový standard MZ ČR* [online]. 2006 [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVABU.htm>
- [44] BARTUŠEK, Miloš a Jiří PAZOUŘEK. *Základy metod analytické chemie* [online]. In: . [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf
- [45] KOPLÍK, R. *Sacharidy* [online]. In: . [cit. 2016-04-17]. Dostupné z: <http://web.vscht.cz/~koplikr/Sacharidy.pdf>

7 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Štruktúra celulózy [11]	10
Obrázok 2: Štruktúra hemicelulózy [11]	11
Obrázok 3: Štruktúra pektínu [11]	11
Obrázok 4: Morfológické zloženie pomaranča [15]	12
Obrázok 5: Schéma glykolýzy [23]	17
Obrázok 6: Schéma vsádkového spôsobu fermentácie [27]	20
Obrázok 7: D-mliečna kyselina (vľavo), L-mliečna kyselina (vpravo) (Chemické vzorce boli vytvorené v programe ChemSketch)	21
Obrázok 8: Bacillus coagulans (modrý krúžok) a sporulujúci B. coagulans (červený krúžok) [37]	23
Obrázok 9: Priebeh rastu mikroorganizmov [39]	24
Obrázok 10: Schéma turbidimetrie [43]	25

8 ZOZNAM GRAFOV

Graf 1: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri rozdielnych teplotách	35
Graf 2: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri rozdielnych pH.....	36
Graf 3: Porovnanie závislostí optických hustôt na čase pri raste na rozdielnych sacharidoch .	36
Graf 4: Priebeh fermentácie metódou SHF využitím kmeňa <i>Bacillus coagulans</i>	39
Graf 5: Priebeh fermentácie metódou SHF využitím kmeňa <i>Lactobacillus casei</i>	40
Graf 6: Priebeh fermentácie metódou SSF využitím kmeňa <i>Bacillus coagulans</i>	40
Graf 7: Celkové porovnanie výťažkov kyseliny mliečnej.....	41

9 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Chemické zloženie poľnohospodárskeho odpadu [7].....	9
Tabuľka 2: Vlastnosti kyseliny mliečnej [2].....	21
Tabuľka 3: Navážky jednotlivých zložiek média na 100 ml destilovanej vody.....	29
Tabuľka 4: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia vlhkosti pomarančových šupiek.....	37
Tabuľka 5: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pomarančových šupkách.....	37
Tabuľka 6: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pôvodných pomarančových šupkách.....	38
Tabuľka 7: Namerané hodnoty a výsledky stanovenia obsahu celulózy v pomarančových šupkách po enzymatickej hydrolýze kombináciou enzýmov celulózy a β -glukosidázy.....	38

10 ZOZNAM PRÍLOH

Príloha I – Rastové krivky – tabuľky nameraných hodnôt

Príloha II – Fermentácie – tabuľky nameraných hodnôt

Príloha III – Kalibračná krivka . metóda Somogyiho a Nelsona

Príloha IV – Kalibračná krivka – metóda HPLC

11 PRÍLOHA I

Tabuľka 1: Namerané hodnoty optických hustôt pri rôznych teplotách

čas [h]	OD		
	35 °C	45 °C	55 °C
0	-	-	-
2	0,04 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01
4	0,06 ± 0,04	0,1,0 ± 0,02	0,06 ± 0,04
6	0,09 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,134 ± 0,006
8	0,13 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,15 ± 0,03
10	0,25 ± 0,02	1,20 ± 0,05	0,21 ± 0,02
12	0,44 ± 0,02	1,50 ± 0,07	0,54 ± 0,01
14	0,62 ± 0,04	1,74 ± 0,02	0,91 ± 0,02
16	0,82 ± 0,03	1,98 ± 0,05	1,30 ± 0,04
18	1,08 ± 0,01	2,16 ± 0,04	1,60 ± 0,03
20	1,40 ± 0,05	2,22 ± 0,03	1,70 ± 0,05
22	1,68 ± 0,07	2,28 ± 0,05	1,80 ± 0,02
24	2,20 ± 0,04	2,279 ± 0,003	1,85 ± 0,08
26	2,55 ± 0,05	2,28 ± 0,02	1,90 ± 0,04
28	3,00 ± 0,002	2,28 ± 0,05	1,95 ± 0,02
30	3,30 ± 0,03	2,28 ± 0,03	2,00 ± 0,04
32	3,45 ± 0,02	2,278 ± 0,001	2,005 ± 0,008
34	3,55 ± 0,01	2,28 ± 0,01	2,05 ± 0,05
36	3,55 ± 0,001	2,28 ± 0,01	2,05 ± 0,01

Tabuľka 2: Namerané hodnoty optických hustôt pri rôznych hodnotách pH

čas [h]	OD		
	pH 3	pH 5	pH 7
0	-	-	-
2	$0,01 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$
4	$0,03 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,02$
6	$0,04 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,05$	$0,09 \pm 0,01$
8	$0,08 \pm 0,04$	$0,07 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,02$
10	$0,11 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,04$
12	$0,17 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,07$
14	$0,23 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,02$
16	$0,28 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,02$	$0,61 \pm 0,05$
18	$0,30 \pm 0,06$	$1,403 \pm 0,005$	$0,84 \pm 0,03$
20	$0,31 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,03$	$1,38 \pm 0,06$
22	$0,32 \pm 0,07$	$2,07 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,04$
24	$0,32 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,05$	$2,37 \pm 0,02$
26	$0,32 \pm 0,05$	$2,55 \pm 0,01$	$3,00 \pm 0,04$
28	$0,32 \pm 0,02$	$2,610 \pm 0,007$	$3,12 \pm 0,05$
30	$0,32 \pm 0,03$	$2,61 \pm 0,02$	$3,36 \pm 0,02$
32	$0,319 \pm 0,003$	$2,64 \pm 0,03$	$3,36 \pm 0,03$
34	$0,320 \pm 0,005$	$2,64 \pm 0,01$	$3,359 \pm 0,009$
36	$0,32 \pm 0,01$	$2,64 \pm 0,01$	$3,36 \pm 0,01$

Tabuľka 3: Namerané hodnoty optických hustôt pri raste na rozdielnych sacharidoch

čas [h]	OD	
	Galaktóza	Xylóza
0	-	-
2	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$
4	$0,14 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,02$
6	$0,26 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$
8	$0,48 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,05$
10	$0,72 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,07$
12	$0,90 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,05$
14	$1,06 \pm 0,04$	$0,687 \pm 0,003$
16	$1,28 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,01$
18	$1,48 \pm 0,01$	$1,10 \pm 0,02$
20	$1,772 \pm 0,006$	$1,32 \pm 0,04$
22	$2,22 \pm 0,05$	$1,52 \pm 0,04$
24	$2,40 \pm 0,04$	$1,74 \pm 0,02$
26	$2,55 \pm 0,02$	$1,94 \pm 0,01$
28	$2,60 \pm 0,01$	$2,13 \pm 0,04$
30	$2,60 \pm 0,01$	$2,19 \pm 0,06$
32	$2,60 \pm 0,01$	$2,28 \pm 0,03$
34	$2,598 \pm 0,004$	$2,34 \pm 0,01$
36	$2,60 \pm 0,01$	$2,34 \pm 0,01$

12 PRÍLOHA II

Tabuľka 1: Namerané hodnoty koncentrácií redukujúcich sacharidov, kyseliny mliečnej a kyseliny octovej počas fermentácie metódou SHF využitím kmeňa *Bacillus coagulans*

čas [h]	C red. sacharidy [g·l ⁻¹]	C kys. mliečna [g·l ⁻¹]	C kys. octová [g·l ⁻¹]
0	26,0 ± 0,3	-	-
12	25,8 ± 0,2	0,144 ± 0,004	0,172 ± 0,009
24	25,4 ± 0,2	0,65 ± 0,02	0,32 ± 0,01
36	24,8 ± 0,2	1,58 ± 0,01	0,363 ± 0,003
48	24,39 ± 0,00	2,25 ± 0,03	0,392 ± 0,004
60	24,2 ± 0,3	2,50 ± 0,04	0,410 ± 0,005
72	24,2 ± 0,4	2,51 ± 0,05	0,416 ± 0,003
84	24,2 ± 0,2	2,59 ± 0,01	0,418 ± 0,003

Tabuľka 2: Namerané hodnoty koncentrácií redukujúcich sacharidov, kyseliny mliečnej a kyseliny octovej počas fermentácie metódou SHF využitím kmeňa *Lactobacillus casei*

čas [h]	C red. sacharidy [g·l ⁻¹]	C kys. mliečna [g·l ⁻¹]	C kys. octová [g·l ⁻¹]
0	25,9 ± 0,2	-	-
12	25,7 ± 0,1	0,74 ± 0,05	-
24	25,1 ± 0,2	3,28 ± 0,06	0,118 ± 0,003
36	24,2 ± 0,3	6,41 ± 0,02	0,261 ± 0,001
48	23,8 ± 0,2	7,25 ± 0,03	0,389 ± 0,001
60	23,8 ± 0,4	7,31 ± 0,02	0,487 ± 0,001
72	23,8 ± 0,3	7,35 ± 0,07	0,488 ± 0,003
84	23,8 ± 0,2	7,33 ± 0,06	0,57 ± 0,03

Tabuľka 3: Namerané hodnoty koncentrácií redukujúcich sacharidov, kyseliny mliečnej a kyseliny octovej počas fermentácie metódou SSF využitím kmeňa *Bacillus coagulans*

čas [h]	C red. sacharidy [g·l ⁻¹]	C kys. mliečna [g·l ⁻¹]	C kys. octová [g·l ⁻¹]
0	0,45 ± 0,14	-	-
12	5,7 ± 0,3	0,14 ± 0,01	-
24	5,3 ± 0,8	0,22 ± 0,01	-
36	3,6 ± 0,4	0,29 ± 0,00	0,0158 ± 0,0001
48	2,2 ± 0,2	0,32 ± 0,01	0,017 ± 0,001
60	2,7 ± 0,1	0,33 ± 0,01	0,0173 ± 0,0002
72	2,6 ± 0,2	0,32 ± 0,01	0,0188 ± 0,0002
84	2,9 ± 0,1	0,33 ± 0,01	0,024 ± 0,001

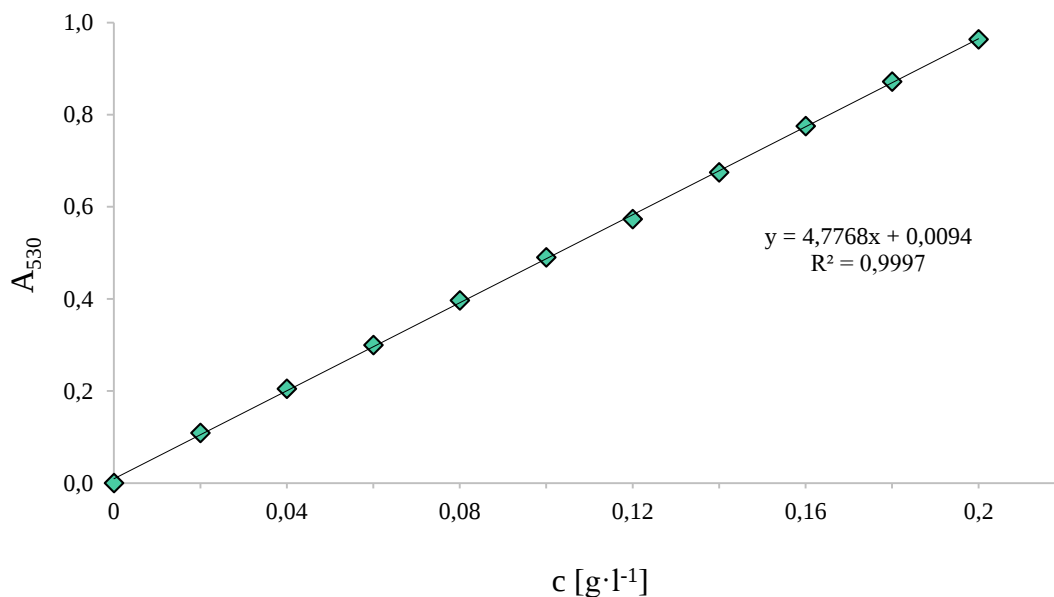
13 PRÍLOHA III

Kalibračná krivka pre glukózu sa stanovila metódou Somogyiho a Nelsona podľa postupu uvedeného v kapitole 2.8.7.. Namerané hodnoty spolu s intervalom spoľahlivosti sú uvedené v tabuľke 1. Kalibračná krivka, regresná priamka a regresná rovnica sú uvedené v grafe 1.

Tabuľka 1: Kalibračná krivka glukózy (metóda Somogyiho a Nelsona)

c [g·l ⁻¹]	A ₅₃₀
0,02	0,109 ± 0,001
0,04	0,205 ± 0,001
0,06	0,300 ± 0,001
0,08	0,397 ± 0,001
0,1	0,490 ± 0,001
0,12	0,573 ± 0,001
0,14	0,675 ± 0,005
0,16	0,775 ± 0,001
0,18	0,872 ± 0,001
0,2	0,964 ± 0,001

Graf 1: Kalibračná krivka glukózy (metóda Somogyiho a Nelsona)



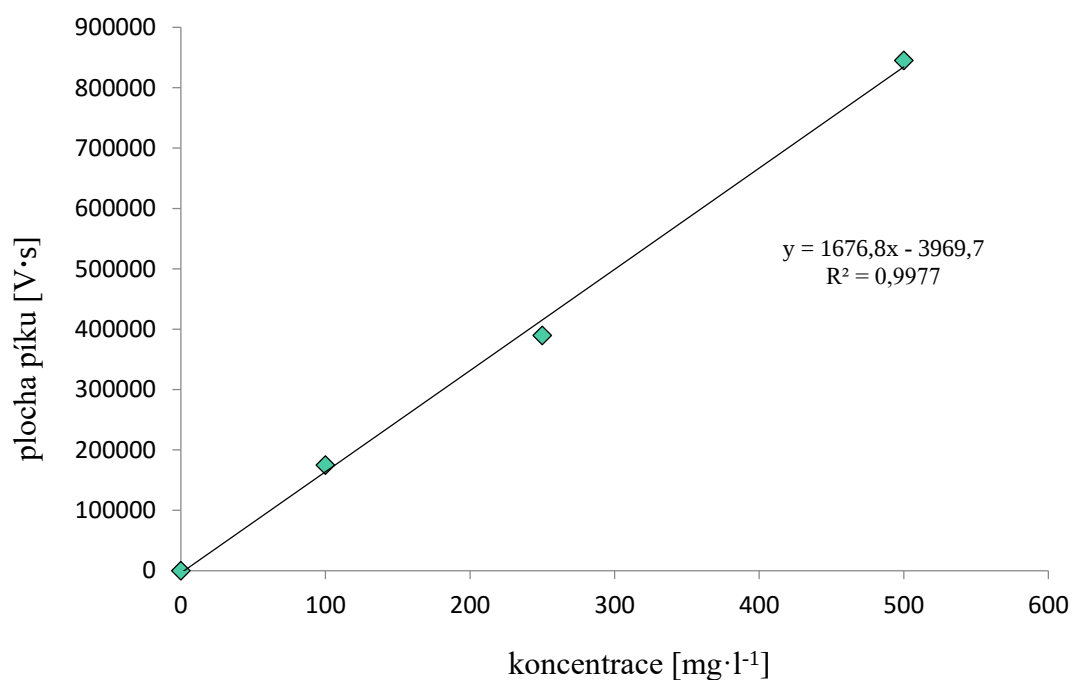
14 PRÍLOHA IV

Kalibračné krivky pre kyselinu citrónovú, kyselinu mliečnu a kyselinu octovú boli stanovené metódou HPLC s kolónou Watrex PolymerIEX H-forma o rozmeroch 8×250 mm a detektorom Watters UV/VIS, ktorý meral pri vlnovej dĺžke 210 nm. Kalibračné roztoky sa pripravili podľa postupu prípravy v kapitole 2.6.7.. Výsledky a ich intervaly spoľahlivosti sú uvedené v tabuľkách 1, 2 a 3. Kalibračné krivky, regresné priamky a regresné rovnice sú uvedené v grafoch 1, 2 a 3.

Tabuľka 1: Kalibračná krivka kyseliny citrónovej (metóda HPLC)

Koncentrácia [mg·l ⁻¹]	Plocha píku [V·s]
0	0 ± 0
100	174813 ± 46984
250	389530 ± 74562
500	845064 ± 60072

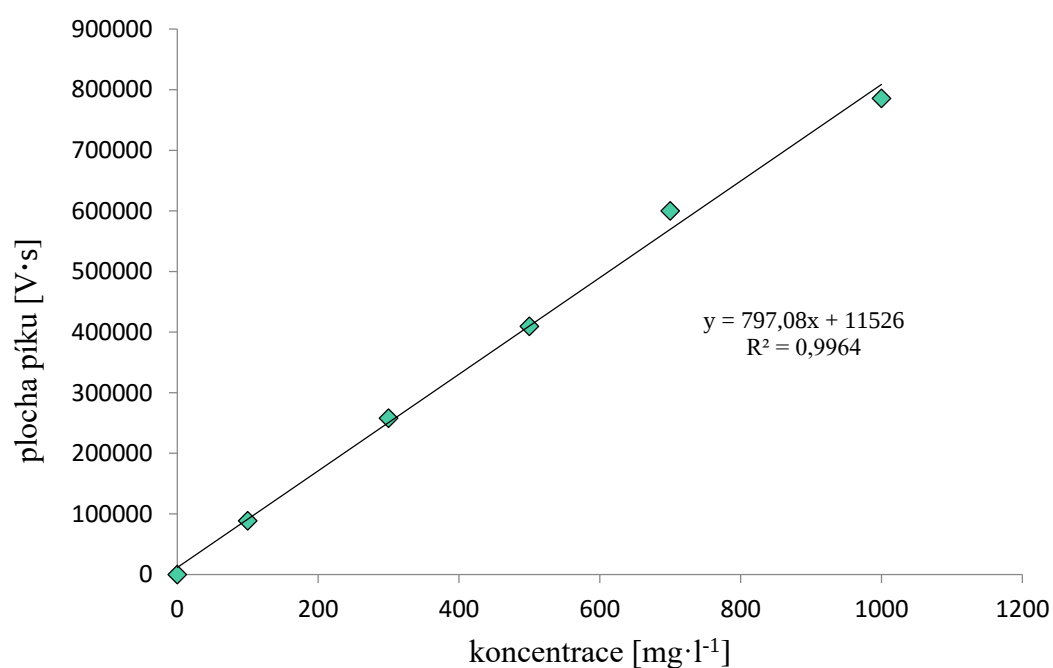
Graf 1: Kalibračná krivka kyseliny citrónovej (metóda HPLC)



Tabuľka 2: Kalibračná krivka kyseliny mliečnej (metóda HPLC)

Koncentrácia [mg·l ⁻¹]	Plocha píku [V·s]
0	0 ± 0
100	88547 ± 2947
300	257942 ± 3692
500	409481 ± 2618
700	599914 ± 40967
1000	785671 ± 43006

Graf 2: Kalibračná krivka kyseliny mliečnej (metóda HPLC)



Tabuľka 3: Kalibračná krivka kyseliny octovej (metóda HPLC)

Koncentrácia [mg·l ⁻¹]	Plocha píku [V·s]
0	0 ± 0
100	14364 ± 2930
250	47586 ± 15361
500	102454 ± 3641

Graf 3: Kalibračná krivka kyseliny octovej (metóda HPLC)

