



**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 ODPADNÍCH MATERIÁLŮ K PŘÍPRAVĚ  
HYDROLYZÁTŮ PRO FERMENTAČNÍ FÁZI**

WASTE MATERIALS UTILIZATION FOR PREPARING HYDROLYSATES FOR THE FERMENTATION  
PHASE

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Natália Vadovičová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA**

**BRNO 2016**



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK1039/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Natália Vadovičová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA</b>	
Konzultanti:	Ing. Helena Hudečková	

### Název bakalářské práce:

Využití odpadních materiálů k přípravě hydrolyzátů pro fermentační fázi.

### Zadání bakalářské práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce,
- 2) popis metodik úprav odpadu a hydrolyzy vč. analytických systémů,
- 3) výběr vhodného systému na vlastní experiment a jeho provedení za účelem maximalizace jednoduchých sacharidů,
- 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.

-----  
Natália Vadovičová  
Student(ka)

-----  
Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na studium a porovnání různých druhů hydrolyz, jejich optimalizaci a také maximalizaci výtěžků nejjvhodnější hydrolyzy pro navazující fermentaci. Jako substrát byly zvoleny pomerančové slupky. Substrát byl nejdříve mechanicky rozmělněn a poté z něj byla připravena suspenze, která podstoupila jednu ze zkoumaných metod předúpravy. Provedly se hydrolyzy fyzikální, jako mikrovlny, zvýšená teplota či ultrazvuk, nebo hydrolyzy chemické, a to kyselé i alkalické. Byly použity i kombinace fyzikálních a chemických metod. Optimalizace enzymatické hydrolyzy materiálu proběhla s použitím enzymů *Novozymes® NS50013* a *NS50010*. Dále byla studována produkce celulytických a pektolytických enzymů po dobu 10 dní procesem SSF za použití kmenu *A. niger*. U všech provedených hydrolyz proběhlo stanovení výtěžku redukcujících cukrů pomocí metody dle Somogyi-Nelsona.

Z různých metod předúprav se jako neúspěšnější prokázala enzymatická hydrolyza, a to kombinace obou enzymů při kultivaci trvající 96 hodin, o pH = 4,5 a teplotě 45 °C. Výtěžky redukcujících sacharidů v těchto hydrolyzáttech dosahovaly  $27,4241 \pm 0,0007 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## ABSTRACT

Bachelor thesis focuses on the study and comparison of different types of hydrolysis, their optimization and maximization of yields for the upcoming fermentation. Orange peel was chosen as a substrate to conduct the experiments. First, the substrate was mechanically grinded to form a suspension. Each suspension then underwent one out of the examined methods of hydrolysis. Chosen methods were physical, such as microwaves, increased temperature or ultrasound, and chemical – acidic and alkaline. Combinations of both types were also examined. The last optimized method was enzymatic hydrolysis. First set of experiments was conducted using enzymes *Novozymes® NS50013* and *NS50010*. Production of cellulase and pectinase enzymes by *A. niger* during solid-state fermentation that lasted 10 days was also studied. The yields of reducing sugars of all the experiments were calculated using the Somogyi-Nelson method.

Enzymatic hydrolysis was proven to be the most effective using the combination of both of the enzymes for a period of 96 hours at pH = 4.5 and temperature 45 °C. Yield of the reducing sugars under these conditions reached  $27,4241 \pm 0,0007 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## KLÍČOVÁ SLOVA

potravinový odpad, pomerančové slupky, enzymatická hydrolyza, redukcující cukry, celulóza, *Aspergillus niger*, solid-state fermentation

## KEYWORDS

food waste, orange peel, enzymatic hydrolysis, reducing sugars, cellulase, *Aspergillus niger*, solid-state fermentation

VADOVIČOVÁ, N. *Využití odpadních materiálů k přípravě hydrolyzátů pro fermentační fázi*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 66 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA.

## PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

*Chtěla bych poděkovat za odborné vedení při vypracování mé bakalářské práce a cenné rady a připomínky vedoucímu práce, panu Ing. Mgr. Liboru Babákovi, Ph.D., MBA. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Heleně Hudečkové za čas, ochotu a věcné připomínky při řešení experimentální části v laboratoři.*

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
2.1	Biomasa .....	9
2.2	Odpad potravinářského průmyslu .....	9
2.3	Charakteristika citrusových plodů .....	10
2.3.1	Morfologie citrusových plodů .....	10
2.3.2	Látkové složení citrusových plodů .....	11
2.4	Pomeranče .....	12
2.5	Odpadní polysacharidy .....	12
2.6	Celulóza .....	13
2.6.1	Struktura .....	13
2.6.2	Vlastnosti .....	14
2.7	Hemicelulóza .....	15
2.8	Pektin .....	16
2.9	Metody předúpravy odpadního materiálu .....	17
2.9.1	Fyzikální předúprava .....	18
2.9.2	Chemická hydrolýza .....	18
2.10	Enzymatická hydrolýza .....	19
2.10.1	Celulolytické enzymy .....	19
A.	Endoglukanáza .....	19
B.	Exoglukanáza .....	20
2.10.2	Pektolytické enzymy .....	20
A.	Polygalakturonáza .....	21
B.	Pektinesteráza .....	21
C.	Pektátlyáza .....	21
2.11	Mikrobiální produkce enzymů .....	22
2.11.1	Aspergillus niger .....	22
2.12	Analytické metody pro stanovení výsledků hydrolýz .....	23
2.13	Metody stanovení počtu spor .....	23
2.14	Další zpracování hydrolyzátů .....	24

<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>25</b>
3.1	Cíl práce.....	25
3.2	Použitý substrát.....	25
3.3	Seznam použitých chemikálií a enzymů .....	25
3.3.1	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona.....	25
3.3.2	Stanovení celulózy .....	25
3.3.3	Stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmanna.....	25
3.3.4	Chemické a fyzikální hydrolýzy .....	25
3.3.5	Enzymatické hydrolýzy.....	26
3.3.6	Použitá kultura a chemikálie na stanovení mikrobiální produkce enzymů .....	26
3.4	Seznam použitých přístrojů a pomůcek.....	26
3.4.1	Použitý software.....	26
3.4.2	Použité přístroje.....	26
3.5	Příprava roztoků a činidel.....	27
3.5.1	Příprava roztoků pro stanovení redukujících sacharidů .....	27
3.5.1.1	Somogyiho činidlo I.....	27
3.5.1.2	Somogyiho činidlo II .....	27
3.5.1.3	Nelsonovo činidlo .....	27
3.5.2	Příprava zásobního roztoku glukózy o koncentraci $0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	27
3.5.3	Příprava roztoku hydroxidu sodného na úpravu pH.....	27
3.5.4	Příprava roztoku kyseliny sírové na úpravu pH .....	27
3.5.5	Příprava základního roztoku octanu sodného $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ .....	28
3.5.6	Příprava 0,5% roztoku pektanu sodného v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanovém pufru o pH = 4,2.....	28
3.5.7	Příprava 1% roztoku CMC v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanovém pufru o pH = 5,4 .....	28
3.6	Příprava materiálu.....	28
3.6.1	Příprava vzorku pro experiment.....	28
3.7	Stanovení počátečních základních vlastností materiálu .....	28
3.7.1	Stanovení sušiny vzorku.....	28
3.7.2	Stanovení obsahu vlákniny.....	28
3.7.3	Stanovení obsahu celulózy .....	29
3.8	Stanovení kalibrační křivky glukózy pro metodu Somogyi-Nelsona.....	29
3.9	Proces hydrolýz .....	30

3.9.1	Fyzikální hydrolýza – mikrovlny, ultrazvuk, tlakový hrnec .....	30
3.9.2	Kyselá hydrolýza.....	30
3.9.3	Alkalická hydrolýza .....	30
3.9.4	Enzymatická hydrolýza .....	31
3.10	Stacionární kultivace pomocí <i>A. niger</i> .....	32
3.10.1	Stanovení počtu spor .....	33
3.11	Stanovení obsahu redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona .....	33
3.12	Stanovení aktivity enzymů produkovaných během kultivace <i>A. niger</i> .....	33
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>34</b>
4.1	Výsledky stanovení počátečních základních vlastností materiálu.....	34
4.1.1	Stanovení sušiny.....	34
4.1.2	Stanovení vlákniny podle Henneberga a Stohmana .....	34
4.2	Stanovení celulózy v základním materiálu a v hydrolyzátu .....	35
4.3	Kalibrační křivka glukózy .....	35
4.4	Fyzikální hydrolýza a kombinace.....	36
4.5	Chemická hydrolýza .....	38
4.6	Enzymatická hydrolýza .....	41
4.7	Mikrobiální produkce enzymů.....	46
4.7.1	Stanovení počtu spor .....	46
4.7.2	Aktivita enzymů a obsah redukujících sacharidů.....	46
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM GRAFŮ.....</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>59</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>61</b>

# 1 ÚVOD

Se zvyšujícím se počtem obyvatelstva na Zemi roste nejen poptávka po palivech a chemikáliích, ale také množství odpadů, jak zemědělského, tak potravinářského průmyslu. Tyto odpady představují nemalou zátěž pro životní prostředí. S nárůstem odpadů a s hrozbou globálního oteplování se ale také našťěstí zvyšuje snaha o jejich využití a recyklaci. Jedním ze směrů, kterým se tato snaha ubírá v posledních letech, je výroba biopaliv.

V současné době je již zavedeno zpracování škrobových plodin (kukuřice, pšenice) či cukrové řepy a olejnin na výrobu biopaliv 1. generace. Míchají se s konvenčními palivy.

U biopaliv 2. generace se jedná o využití zejména lignocelulózového odpadu (dřevní zbytky), zemědělského odpadu (sláma, seno, řepkové výlisky aj.), ale i biologického odpadu z domácností a potravinářského odpadu. Využití průmyslových a potravinových odpadů, jako je například papír, vinné výlisky nebo odpadní olej, je environmentálně přívětivé řešení, a zároveň se s nimi nepojí konkurenční střet tak, jako s biopalivy 1. generace, ze kterých se mohou krom biopaliv vyrábět i potraviny pro člověka [1].

Jedním z nových směrů v oblasti využití potravinového odpadu je využití odpadních citrusových slupek, a to hlavně pomerančových. Zejména produkce džusů za sebou zanechává množství nevyužitého odpadu, z kterého je využit pouze zlomek, a to jako krmivo pro hospodářská zvířata. Budoucnost zpracování tohoto odpadu by kromě ekologického hlediska mohla spočívat i v množství dalších produktů. Šetrné zpracování by totiž mimo biopaliva mělo zajistit extrakci i jiných hodnotných látek, jako je pektin, hojně využívaný v potravinářství, kyselina mléčná a její biodegradabilní polymer, nebo limonen a jiné hodnotné chemikálie [2].

Na produkci biopaliv se využívá biomasa, která přímo obsahuje jednoduché zkvasitelné cukry, nebo polysacharidická biomasa, která se na zkvasitelné cukry převede vhodnou metodou předúpravy. Výběr vhodné metody předúpravy a její optimalizace je dlouhý proces, jehož parametry se odvíjí od použitého substrátu.

Následná konverze závisí na úspěšnosti předcházející předúpravy, proto je pro maximalizaci výtěžků biopaliva důležité provést předúpravu co nejefektivněji, nejrychleji, ekologicky, ekonomicky výhodně a také bez vedlejších inhibičních produktů.

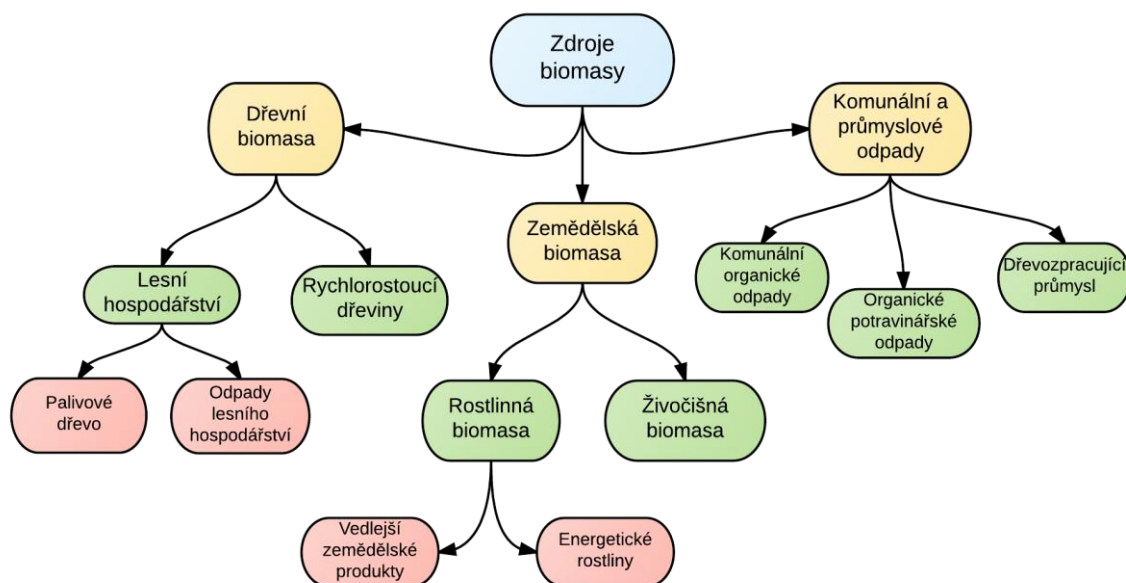
Práce se zabývá porovnáním a optimalizací různých metod předúprav na pomerančových slupkách, jakožto nově využívaným potravinářským odpadem, a je cílena maximalizace zkvasitelných sacharidů pro následující konverzi na hodnotné produkty, jako je bioethanol či kyselina mléčná.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Biomasa

Biomasa je podle vyhlášky č. 252/2000 Sb. definována jako organický materiál (rostlinného, nebo živočišného původu), který je možno použít jako surovinu pro výrobu energie. Může to být materiál jak ze zemědělské, tak lesnické výroby, či z vedlejších produktů, jako městských nebo průmyslových odpadů (viz Obrázek 1). Zahrnuje fytomasu (rostlinnou biomasu), dendromasu (dřevní biomasu) či biomasu živočišného původu. Její nejčastější využití spočívá zejména v přímém spalování pevného materiálu pro výrobu tepla a energie, nebo pro výrobu kapalných biopaliv a bioplynu [3, 4].

Při výrobě bionafty se jedná o substráty bohaté na oleje, v případě bioethanolu jsou to suroviny bohaté na škrob, nebo cukry. V České republice se tento průmysl týká zejména obilovin, řepky olejné či cukrové řepy. Všechna takto vzniklá biopaliva se mohou smíchat s konvenčními palivy [5].



*Obrázek 1: Schéma zdrojů biomasy [5], vlastní úprava*

### 2.2 Odpad potravinářského průmyslu

Potravinářský průmysl vyprodukuje v Evropě ročně více než 89 milionů tun odpadu (2010) [6].

V mnoha případech jsou odpady z potravinářských výroby použity jako krmivo pro zvířata, ale pokud jsou příliš vláknité a nestravitelné, postrádají využití. Do tohoto typu odpadu patří např. rýžové slupky, kukuřičné či pšeničné otruby, odpadní vinná réva, jablečné výlisky, sójový odpad, nebo právě citrusové slupky [7].

Výroba džusů a z ní plynoucí produkce odpadních citrusových slupek přináší vhodný substrát pro budoucí zpracování a produkci biopaliv. Při výrobě pomerančového džusu tvoří odpadní zbytky po vylisování téměř 50 % původní hmotnosti plodu. Celosvětově zaujímá

odpad z citrusových slupek 15,6 milionů tun ročně, z čehož jen samotná Brazílie vyprodukuje 9,5 milionu tun. [8] Tyto slupky byly doposud zejména spalovány, což přinášelo velké množství oxidu uhličitého a dalších skleníkových plynů, nebo zanechány na skládce. V minoritním zastoupení byly využity jako krmivo pro hospodářská zvířata, ale to až po usušení a detoxikaci, což je časově i ekonomicky náročné [9], [10].

Řešením narůstajícího množství odpadu z citrusových slupek může být činnost nové organizace OPEC (Orange Peel Exploitation Company), která se ve spojení s univerzitami v Yorku a Sao Paulu zabývá výzkumem vlivu mikrovln o vysoké intenzitě a nízké teplotě na extrakci zbylých využitelných látek z citrusových slupek. Tato extrakce přináší podle dosavadních výsledků vyšší výtěžky i ekologičtější řešení, než metody chemické hydrolyzy, kde je problémem odpadní voda po kyselých hydrolyzách. V současné době pracuje OPEC v malém měřítku v Brazílii či jižní Evropě a jejich cílem je instalace mikrovlnných zařízení v blízkosti míst na zpracování pomerančů [11].

Po oddělení celulózy a dostupných kapalných látek by teoretickými hodnotnými produkty měla být nejenom biopaliva, ale i produkty obsahující limonen, jako jsou vůně, osvěžovače či domácí prostředky, nebo produkty obsahující pektin, který je výborným zahušťovadlem a používá se jak v potravinářství, tak v kosmetickém nebo farmaceutickém průmyslu [11, 12].

## **2.3 Charakteristika citrusových plodů**

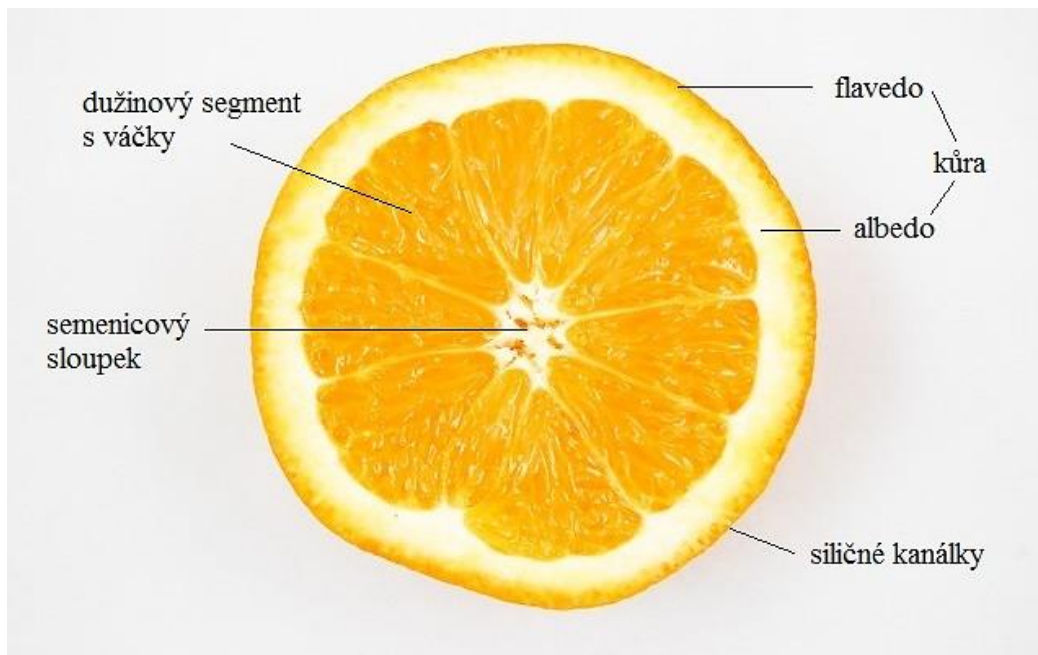
Chemické složení jakéhokoliv plodu závisí na mnoha faktorech. Hlavním je zralost, ale velkou roli hraje i způsob a doba skladování. Například u citrusových plodů se po utrnutí výrazně snižuje kyselost a plod obecně ztrácí svou hmotnost. I věk stromu či velikost ovoce ovlivňuje složení – menší pomeranče či grepy bývají sladší, než ty velké. Dalšími faktory jsou klimatické podmínky regionu, výživa stromu či chemické postřiky. Citrusy obecně jsou bohaté na cukry, kyseliny, minerální látky, ale i vitamíny, pigmenty či flavonoidy [13].

### **2.3.1 Morfologie citrusových plodů**

Rod *Citrus* je poměrně rozsáhlá skupina dvouděložných rostlin z čeledi routovitých. Původ rodu je zařazen do jihovýchodní Asie a samotný název rodu má spojitost s vonnými částmi stromu - listy a dřevem. Plodem těchto nízkých stromů či keřů je zvláštní typ bobule, dužnaté hesperidium [14].

Hesperidia jsou bobule typická právě pro citrusy – nejběžnější citrony, pomeranče, grepy, mandarinky, pomela, či limety. Od ostatních typů bobulí se liší tím, že rozlišujeme jeho oplodí na exokarp – zbarvené flavedo, a mezokarp – bílé, houbovitě albedo. Flavedo a albedo tvoří dohromady souhrnným obecným pojmenováním slupku plodu. Morfologie plodu je zobrazena na Obrázku 2 [13, 14].

Flavedo je ochranná, tvrdá pokožka plodu a ve svých chromoplastech obsahuje významný podíl barviv – karotenoidů, a jsou v něm uloženy i vonné silice, esenciální oleje a vysoké procento vitamínu C. Albedo je také bohaté na bioaktivní látky, zejména hesperidin [15].



**Obrázek 2:** Morfologie pomerančového plodu [16]

Vnitřní částí plodu citrusů je dužina, neboli endokarp, a tvoří 50–80 % velikosti plodu. Je to požitelná složka plodu, skládá se ze série (většinou 8 až 14) blanitých, klínovitých segmentů, kde je každý segment tvořen množstvím váčků. Šťáva obsažená v těchto váčcích tvoří 35–55 % endokarpu a získáváme ji mechanickým lisováním.

V každém segmentu může být žádné, nebo až několik semen. Chybějící semena jsou typická pro vysoce prošlechtěné odrůdy. Tyto měsíčkovité segmenty jsou uprostřed drženy na semenicovém sloupku, ze kterého vybíhají další bílé, vláknité cévní svazky, které jsou látkovým složením velmi podobné albedu [14, 15].

### 2.3.2 Látkové složení citrusových plodů

Citrusy jsou obecně skvělým zdrojem minerálních látek i vitaminů. Jsou zde zastoupeny jak vitamin C, tak vitaminy skupiny B, B<sub>1</sub> a B<sub>2</sub>, z minerálních látek to jsou zejména draslík, vápník a hořčík. Jejich významnou složkou je i terpen limonen, hlavní složka vůně citrusů, dále obsahují kumariny, polyfenoly, steroly, či hydroxybenzoové kyseliny [15].

V závislosti na typu citrusového plodu se liší poměry uvedených látek v celkovém složení, např. citrony obsahují větší množství kyselin, jak napovídá jejich chuť. Také v jednotlivých druzích ovoce jsou obsažena odlišná barviva i jejich odlišné množství. Grapefruit má ze všech citrusů významně vysoký obsah limonenu a obsahuje vyšší podíl naringinu a naringeninu, které způsobují typickou nahořklou chuť. Kůra citrusových plodů bývá v průmyslu hojně ošetřována fungicidy, proto se nedoporučuje její konzumace ani po zpracování [13, 15].

**Tabulka 1: Látkové složení citrusových plodů [15]**

Druh ovoce	Bílkoviny	Tuky	Sacharidy	Vláknina nerozpustná	Vláknina rozpustná	Draslík	Vitamin C
	[g·kg <sup>-1</sup> ]					[mg·kg <sup>-1</sup> ]	
Grapefruit	5,7	2,1	100,0	5,4	20,4	1795,7	427,78
Citron	6,6	5,3	92,1	10,8	36,2	1787,0	486,39
Pomeranč	9,2	2,2	110,4	8,3	30,7	2143,7	506,55
Mandarinka	7,2	3,0	93,9	6,2	17,0	2286,0	315,48

## 2.4 Pomeranče

Pomeranče v současnosti představují až dvě třetiny celkové světové produkce citrusových plodů. Do České republiky se dováží zejména ze Španělska, Řecka, a Itálie [15].

Albedo mají pomeranče, na rozdíl od jiných citrusů, většinou tenké. Flavedo s dužinou mohou být zbarveny žlutě, oranžově až červeně a podle tohoto zbarvení se i klasifikují. Nejběžněji je rozdělujeme na žlutomasé, krvavé, a pupečné. Jak můžeme vidět v Tabulce 1, pomeranče jsou oproti jiným citrusům bohatší na bílkoviny i sacharidy. Ze sacharidů je v pomerančích obsažena zejména manóza (32 g·kg<sup>-1</sup>) a sacharóza (27,3 g·kg<sup>-1</sup>). Kromě výše zmíněných minerálních látek mají i vyšší obsah selenu a železa [14, 15].

**Tabulka 2: Složení pomerančů v závislosti na jednotlivých částech plodu [%] [13]**

	Pektin	Hemicelulóza	Celulóza	Dusík
frakce A <sup>1</sup>	63	19	11	4,2
albedo	44	13	32	0,7
dužina	57	19	19	2,8
šťáva	80	1	2	6,0
blanité cévní svazky segmentů	52	15	32	0,7

<sup>1)</sup> frakce A je primární surovina - kalná šťáva získaná po extrakci dužiny, obdobná, jako při zpracování ovoce a výrobě džusů

## 2.5 Odpadní polysacharidy

Jak plyne z Tabulky 1 v kapitole 2.3.2, pomeranče a jejich slupky jsou významným zdrojem rozpustné i nerozpustné vlákniny. Vláknina zahrnuje zbytky rostlinných buněčných stěn a polysacharidy, které nelze strávit v lidském tenkém střevě, přičemž v tlustém střevě dochází k jejich úplné nebo částečné fermentaci.

Vláknina má pozitivní účinek na snižování cholesterolu a glukózy v krvi a podporuje čištění střev. Dle typu základní polysacharidové stavební složky rozlišujeme vlákninu na rozpustnou a nerozpustnou. Nerozpustná vláknina není viskózní, ani není fermentovatelná. Je zodpovědná

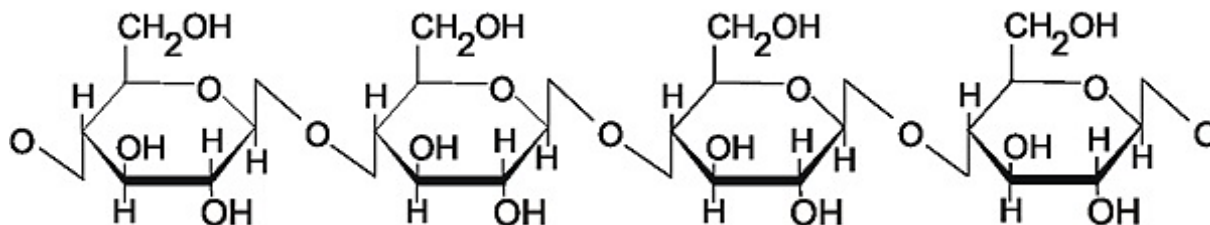
za správnou hustotu stolice a jinak nemá zásadní vliv na metabolismus látek. Její hlavní složkou je celulóza, hemicelulóza a lignin. Rozpustná vláknina je fermentovatelná i viskózní, je schopna absorbovat vodu a reguluje funkce trávicího traktu, např. složení střevní mikroflóry. Mezi rozpustnou vlákninu patří pektiny, gumy a slizy [17].

## 2.6 Celulóza

Celulóza je základní polysacharid buněčných stěn všech rostlin. Dodává jim pevnost a pružnost, tvoří významnou složku zejména stonků, stopek, slupek a dalších dřevnatých částí rostlin. Samotné dřevo se z největší části skládá právě z celulózy a například bavlník je téměř čistá celulóza. Celulóza je důležitou složkou i v buněčné stěně hub a mořských řas, či v těle bezobratlých a mořských živočichů [18].

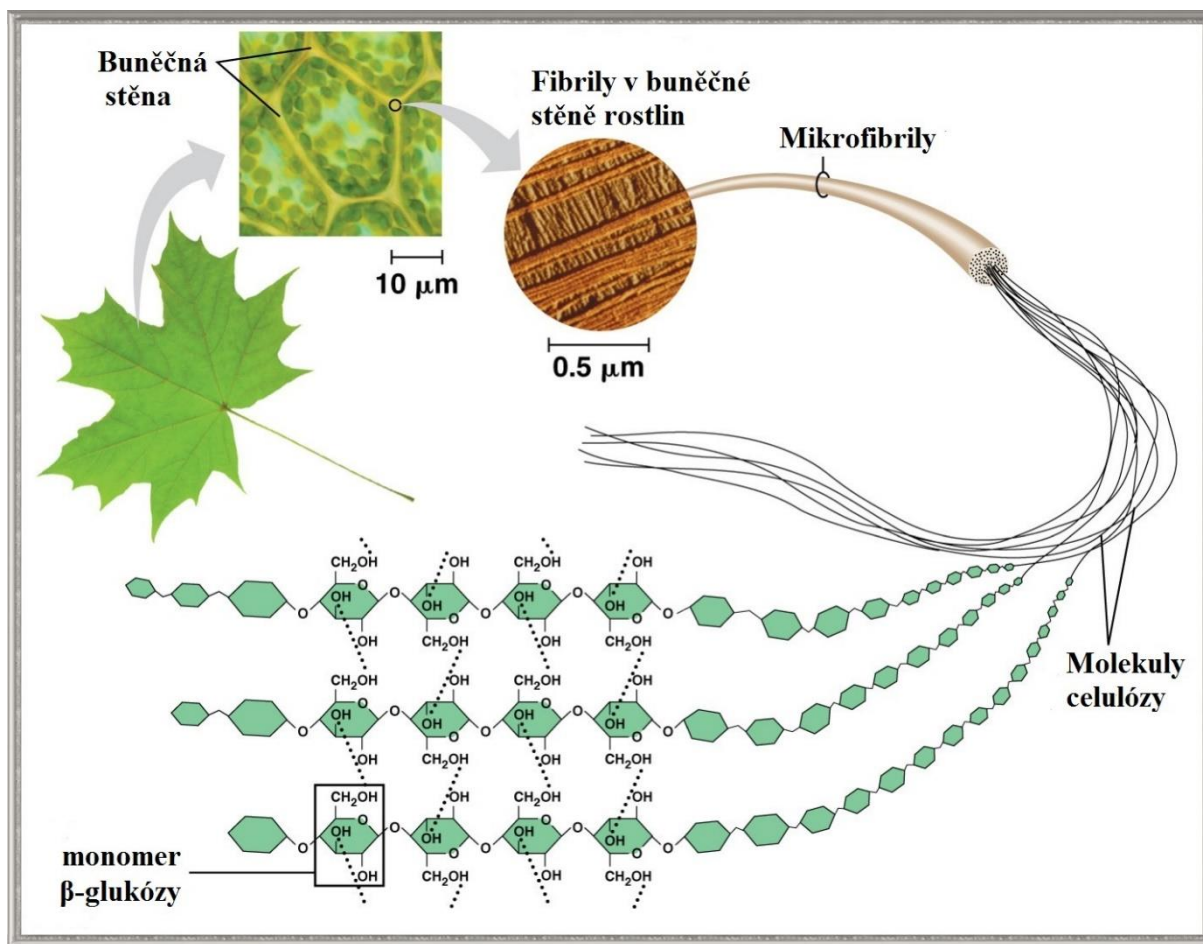
### 2.6.1 Struktura

Molekula celulózy je podobně, jako molekula amylozy, lineární nerozvětvený polymer. Stupeň polymerace, tedy počet monomerních jednotek glukózy, se pohybuje od 10 000 do 15 000. Stejně jako u amylozy je základní jednotkou glukóza, ale rozdílem je její konfigurace. U amylozy jsou jednotlivé glukózy spojeny  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidovou vazbou, kdežto u celulózy jsou spojeny  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidovými vazbami. Tento rozdíl v konfiguraci způsobí, že se výrazně změní prostorové uspořádání i skládání celé molekuly celulózy, a tím i její makroskopická struktura a fyzikální vlastnosti. Plochý řetězec glukóz je zpevněn intramolekulárními vodíkovými můstky mezi dvěma hydroxyly sousedních molekul, a to na C<sub>2</sub> jedné molekuly a C<sub>6</sub> druhé molekuly. Dále je zpevněn intermolekulárními vodíkovými můstky mezi jednotlivými řetězci, které propojují hydroxylové skupiny na C<sub>3</sub> a C<sub>6</sub> [19, 20].



**Obrázek 3:** Molekula celulózy [21]

Lineární celulózové řetězce se spojují do souběžných kompaktních a pevných vláken, která se nazývají mikrofibrily. Mikrofibrily jsou složeny z 50–70 vláken celulózy, které jsou nad sebou drženy vodíkovými můstky. Vznikne tak nerozpustná, trojrozměrná a vysoce uspořádaná struktura, na kterou se ale mohou navázat další molekuly polysacharidů, např. hemicelulóza, což výslednou pevnost a komplexnost struktur ještě zvýší. Pevnost mikrofibril o tloušťce 10–20 nm, složených do makrofibril o tloušťce 0,5  $\mu$ m údajně odpovídá pevnosti stejně tlustého ocelového drátu. Složitá struktura celulózy je zobrazena na Obrázku 4 [22].



**Obrázek 4:** Strukturální uspořádání v buněčné stěně rostlin [23, s. 119]

## 2.6.2 Vlastnosti

Unikátní tuhá a vláknitá struktura celulózy umožňuje široké využití v průmyslové výrobě, např. lepenky, izolace, nebo lněného či bavlněného materiálu [20].

Naopak kvůli vlastnostem způsobeným změnou konfigurace není možné pro většinu obratlovců využít celulózu jako energetický zdroj. U glykogenu nebo škrobu, které přijímají savci v potravě, jsou molekuly enzymaticky rozkládány už ve slinách nebo střevě,  $\alpha$ -amylázou a glykosidázou, které štěpí  $\alpha$ -(1→4)-glykosidovou vazbu mezi jednotkami glukózy. Ale enzymatický aparát pro štěpení  $\beta$ -(1→4) vazeb obratlovců, až na výjimky, nemají. Naopak bezobratlí jsou schopni štěpit  $\beta$ -(1→4) vazby v celulóze, a to díky symbiontním mikroorganismům v jejich trávicím traktu. Například termity, schopní využít dřevo jako zdroj energie, mají ve svém trávicím traktu bičikatého prvoka, *Trichonympha*, který produkuje enzymový komplex celulózu – ta je zodpovědná za štěpení  $\beta$ -(1→4) vazeb [23].

Výjimky ve světě obratlovců, které by byly schopné rozkládat celulózu, jsou býložravci. Nejlépe z nich stráví celulózu přežvýkavci. Kozy, ovce, či krávy hostí v první části svého žaludku, v bachoru, bakterie rodu *Ruminococcus* a *Fibrobacter*, které také produkují celulózu, a tedy opět rozloží celulózu na jednotlivé monosacharidy místo hostitele. Avšak úspěšně rozloží pouze celulózu pocházející z travnatých zdrojů, nikoli dřevnatých, kde je překážkou lignin (tvořící až 30 % dřevnatých částí), kovalentně spojený s molekulami celulózy a komplikující

rozklad celulázami. Člověk ani většina savců tedy nemá enzymatický aparát na kompletní rozklad celulózy, což napomáhá čištění střev a zdravému trávení [24].

Celulóza je ve většině rozpouštědel nerozpustná. Rozpouští se v koncentrovaných kyselinách a za vyšší teploty, podléhá i enzymatické hydrolýze. Enzymy, schopné hydrolyzovat celulózu jsou endoglukanáza, exoglukanáza a  $\beta$ -glukosidáza. Hydrolýzou celulózy celulázou (celulázovým komplexem) získáme směs disacharidů, trisacharidů a tetrasacharidů. Hlavní část po této hydrolýze tvoří celobióza, disacharid glukózy. Pro štěpení celobiózy je potřeba enzymu  $\beta$ -glukosidázy, který se postará o vazby mezi monomery glukózy. Celulázový komplex bude více diskutován v kapitole 2.10.1 [25].

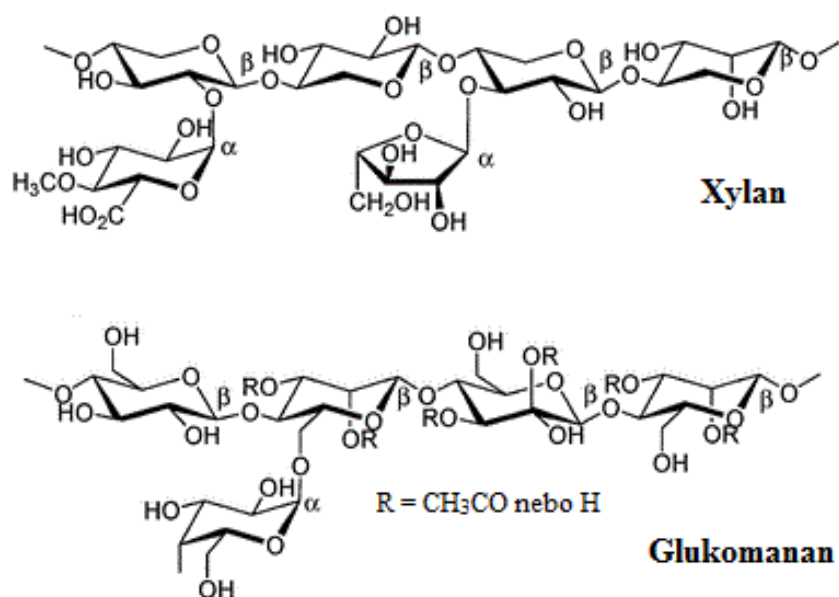
V potravinách je celulóza hojně zastoupena, např. v obilovinách a luštěninách je obsaženo 2–4 % celulózy, v ovoci a zelenině 1–2 % [26].

Průmyslově se získává zejména ze dřeva, bavlny, nebo slámy a je důležitá pro výrobu mnoha produktů denní potřeby, jako je papír, vata, nebo textil. Deriváty celulózy mohou sloužit jako zahušťovadla či stabilizátory [19, 27].

## 2.7 Hemicelulóza

Hemicelulóza je heterogenní polymer tvořen lineárními, rozvětvenými a nepravidelnými řetězci, její polymerační stupeň je 200. Je to souhrnné označení pro necelulózové polysacharidy schopné vmezeření se mezi molekuly celulózy. Řetězce hemicelulózy obsahují jak pentózy, tak hexózy, z pentóz nejčastěji  $\beta$ -D-glukózu a  $\alpha$ -D-arabinózu, z hexóz  $\beta$ -D-manózu,  $\beta$ -D-glukosu,  $\alpha$ -D-galaktózu a v minoritním množství je zastoupena například i  $\alpha$ -L-rhamnóza. Dále se v řetězci nachází cukerné kyseliny, kyseliny uronové -  $\alpha$ -D-glukoronová kyselina a  $\alpha$ -D-galakturonová kyselina. Zastoupení jednotlivých cukrů a složek je dáno typem rostlinného materiálu [28].

Značná část hemicelulózy je tvořena xylanem, což je lineární polysacharid sestávající z jednotek D-xylózy (xylopyranózy), které jsou vázány  $\beta$ -(1→4)-glykosidovými vazbami.



**Obrázek 5:** Xylan a glukomanan, nejčastější polysacharidy hemicelulózy [30]

Kromě xylopyranózy mohou řetězce obsahovat i arabinózu nebo kyselinu ferulovou a octovou, jednotky kyseliny glukuronové jsou v řetězci substituovány nebo acetylovány. Tyto substituce jsou příčinou zesíťování s ligninem. Xylan tvoří u obilovin jejich hlavní složku vlákniny [29, 30, 31].

U měkkých dřevin se vyskytuje ve větší míře glukomanan, sestávající z glukózy a manózy, další skupinou hemicelulóz jsou například  $\beta$ -glukany nebo xyloglukany [32].

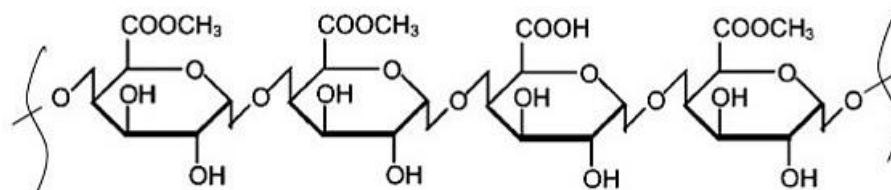
U vyšších rostlin je typický xyloglukan, 300 až 3 000 dlouhý polymer glukózy, který má na C<sub>6</sub> uhlíku glukózy v hlavním řetězci připojeny postranní xylopyranózové řetězce. Xyloglukan má použití jako tamarindová guma (získávána ze semen tropického stromu tamarind východní), ať už v průmyslu textilním, nebo jako zahušťovadlo v průmyslu potravinářském [26].

Hemicelulóza má v rostlinných částech podobnou funkci jako celulóza, zejména tvorbu a pevnost buněčné stěny, ale může sloužit i jako zásobárna polysacharidů v semenech rostlin. Co se týče rozkladu na jednoduché cukry, je hemicelulóza méně odolná hydrolyzám, než celulóza. K jejímu štěpení dochází pomocí enzymů ze skupiny hemiceluláz, a to zejména xylanáz. Je i tepelně méně odolná a v lignocelulózovém materiálu tvoří nejméně stabilní složku. Je možné ji hydrolyzovat také zředěnými kyselinami za zvýšené teploty [33, 34].

## 2.8 Pektin

Pektin je stavební polysacharid s lineárním základním řetězcem, který je tvořen molekulami kyseliny D-galakturonové (asi 25 až 100 jednotek), vázané  $\alpha$ -(1→4)-glykosidovými vazbami. Další větvení je různorodé dle typu plodu, například u řepného pektinu jsou na lineární řetězec pravidelně vázané molekuly L-rhamnózy, dále mohou být na řetězec navázány i molekuly galaktózy, xylózy nebo arabinózy. Řetězce substituované L-rhamnózou  $\alpha$ -(1→4)-glykosidovou vazbou se nazývají rhamnogalakturonany. Špenátový i řepný pektin obsahují také kyselinu ferulovou. Citrusový pektin je naopak jednodušší a tvoří nejčastěji jednochodou, dvouchodou anebo trojchodou šroubovici [19, 26, 35].

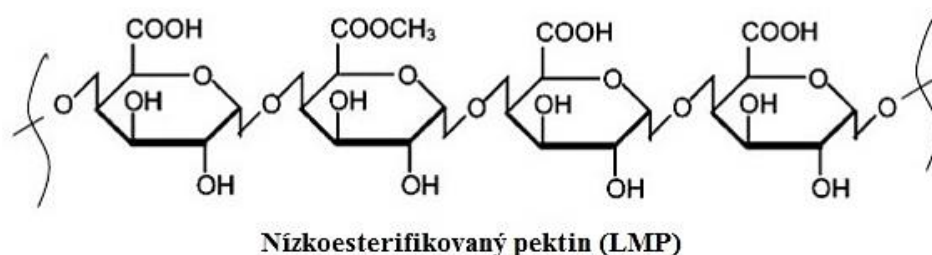
Kyseliny D-galakturonové jsou v řetězci částečně esterifikovány methanolem a jejich volné karboxylové skupiny mohou být neutralizovány vápenatými ionty. Dle počtu esterifikovaných skupin můžeme rozlišit pektin na HMP (vysokoesterifikovaný pektin, Obrázek 6) a LMP (nízkoesterifikovaný pektin, Obrázek 7). Pektin, který má více než 50 % methylesterových skupin, je vysokoesterifikovaný. Nízkoesterifikovaný má nižší obsah těchto skupin [19].



Vysokoesterifikovaný pektin (HMP)

**Obrázek 6:** Vysokoesterifikovaný pektin [36]

Pokud má pektin vyšší stupeň esterifikace, způsobí to vyšší rozpustnost ve vodě. Molekuly se lépe hydratují a tvoří gel. U obou skupin pektinů je tvorba gelu závislá na určitých podmínkách.



**Obrázek 7:** Nízkoesterifikovaný pektin [36]

Základním rozdílem je pH, kdy HMP tvoří gel při  $\text{pH} = 3,2\text{--}3,5$ , zatímco LMP tvoří gel při  $\text{pH} > 3,8$ . Důležitá je i koncentrace sacharózy (pro HMP) a vápenatých iontů (pro LMP). Koncentrace sacharózy potlačí hydrataci řetězců a může se tak vytvořit struktura gelu s vodíkovými můstky, která není tepelně reverzibilní. HMP s řízenou želírující rychlostí gelu mají využití v potravinářství, při výrobě želé cukrovinek a džemů. LMP musí mít pro správné gelovatění přítomné vápenaté a další dvoumocné ionty. Je tepelně reverzibilní a využívá se při výrobě plev nebo nízkoenergetických a diabetických potravin [19].

Vysoký obsah pektinu mají především nezralé plody a kořenové druhy zeleniny (řepa, mrkev). V praxi se v Americe a jižní Evropě vyrábí zejména z citrusových slupek (z albeda) a ve střední Evropě z dužiny jablek a z cukrové řepy [37].

## 2.9 Metody předúpravy odpadního materiálu

Pro co nejvyšší výtěžek fermentace je potřeba provést co nejúčinnější hydrolýzu a tedy co největší zisk jednoduchých sacharidů z odpadního materiálu. Většinou se předúprava materiálu skládá z několika kroků. Nejdříve je nutné mechanické rozmělnění substrátu, poté fyzikálně-chemické porušení struktury a uvolnění sacharidů. Během tohoto procesu dochází konkrétně u citrusových slupek k přeměně celulózy na amorfni formu až k jejímu rozkladu, a také k rozkladu pektinu a zničení dalších složek, jako je hemicelulóza. Účinek rozkladných metod na materiál a jeho komplexnost se mění v závislosti na typu a látkovém složení materiálu. Podle látkového složení se proto volí optimální metoda na daný substrát a často se využívají i kombinace různých druhů předúprav [38].

Mezi nejčastější metody předúpravy patří kyselá nebo alkalická hydrolýza, parní exploze, ozonolýza, či exploze za přítomnosti  $\text{NH}_3$  nebo  $\text{SO}_2$ . Metody mají krom účinnosti na daný substrát i rozdílné cenové nároky v závislosti na použitém zařízení. Je vhodné při předúpravě sledovat vznik vedlejších produktů, které by mohly působit inhibičně a zpomalovat až zastavit hydrolýzu [39].

V praxi se tyto metody používají pouze jako zpřístupňující proces jednoduchých sacharidů, a poté většinou následuje enzymatická hydrolýza celulytickými a dalšími hydrolytickými enzymy opět v závislosti na substrátu. Po enzymatické hydrolýze následuje fermentace, a tato postupná metoda o jednotlivých krocích se označuje jako SHF – separátní hydrolýza

a fermentace. Další možností, používanou pro vyhnutí se vzniku nadbytku inhibičních produktů, je metoda SSF, neboli simultánní sacharifikace a fermentace. Metoda SSF umožňuje za pomoci enzymů a mikroorganismů hydrolýzu na monosacharidy souběžnou s fermentací těchto monosacharidů. Výhody metody SSF spočívají v dvojnásobně kratší době procesu, který probíhá v jednom bioreaktoru, a tedy nižšími provozními nároky. Problémem SSF může být nesoulad v teplotních optimech použitých enzymů a mikroorganismů, kdy enzymy pro hydrolýzu vyžadují vyšší teploty, např. kolem 45 °C, kdežto používané mikroorganismy jsou většinou mezofilní, preferující teploty okolo 25–30 °C [38, 40].

### **2.9.1 Fyzikální předúprava**

Mezi základní fyzikální procesy předúpravy patří zejména mletí, tepelná hydrolýza či ozáření. Mletí (nebo sekání či drcení) materiálu je nezbytným krokem pro zmenšení velikosti částic a tedy zvětšení měrného specifického povrchu substrátu. Rozrušuje krystalickou strukturu celulózy a zpřístupňuje tak materiál pro další kroky, jako je enzymatická hydrolýza. Částice, které mletím získáváme, by pro efektivnost hydrolýzy měly mít velikost maximálně v řádech milimetrů [41, 42]

Mikrovlnné záření je aktuálně nejvíc studovanou metodou předúpravy, a to v kombinaci s následnou enzymatickou hydrolýzou. Také se může, pro zvýšení výtěžnosti, kombinovat s alkalickou či kyselou předúpravou. Mikrovlny způsobí degradaci celulózy na jednotlivá tenká vlákna z kratších oligosacharidů. Nevýhodou metody je energetická náročnost při vyšším výkonu [43]

Při úpravě materiálu vysokou teplotou dochází k rozkladu celulózy a hemicelulózy. Teplotní rozmezí pro rozklad se pohybuje mezi 150–180 °C. Teploty vyšší, než toto rozmezí, by způsobily pyrolytické reakce a tedy vznik nežádoucích plynných látek a uhlíkatých zbytků [43].

### **2.9.2 Chemická hydrolýza**

Pro chemickou hydrolýzu materiálu se využívají jak koncentrované či ředěné kyseliny, tak hydroxidy. U kyselých hydrolýz se jedná nejčastěji o kyselinu sírovou, chlorovodíkovou, dusičnou či fosforečnou, a u alkalické hydrolýzy o hydroxid draselný, sodný, vápenatý, či amonný.

Působením kyselin na materiál se dobře rozkládá hemicelulóza, a to hlavně xylylan, který není odolný kyselinám tak, jako glukomanan. Hemicelulóza by v kombinaci zředěné kyseliny a zvýšené teploty měla podlehnout skoro úplné degradaci. Koncentrované kyseliny jsou sice vhodné, ale z důvodu vzniku možných inhibičních produktů, jako je například furfural, se nevyužívají tolik, jako zředěné kyseliny, které jsou i ekonomicky přijatelnější. Inhibiční produkty jsou nežádoucí zejména z důvodu následné fermentace mikroorganismy, pro které by mohly být tyto látky toxické [43].

Při alkalické hydrolýze dochází v první fázi k rozpouštění, zmýdelnění esterových vazeb hemicelulózy a následnému bobtnání materiálu, který má tímto zvětšený specifický povrch a je přístupnější pro různé enzymy a mikroorganismy. Alkalická hydrolýza může probíhat jak při mírných teplotách, kdy sice nevyžaduje vysoké provozní náklady, ale trvá v řádu hodin, nebo i za zvýšených teplot v rozmezí 100–120 °C [44].

## 2.10 Enzymatická hydrolýza

Na enzymatickou hydrolýzu citrusových slupek je nezbytné působení více druhů enzymů. Dle látkového složení slupek jsou potřebné jak pektolytické, tak celulolytické a hemicelulolytické enzymy, které by dohromady měly zajistit dokonalou konverzi na monosacharidy. Pevná, propletená struktura citrusových slupek je překážkou pro dobrou přístupnost povrchu materiálu, proto je před samotnou hydrolýzou vítaná mechanická předúprava materiálu. Enzymatická hydrolýza patří mezi nejvhodnější druhy hydrolýz, zejména pro svoji vysokou výtěžnost a pro menší množství možných inhibičních produktů, což dovoluje následnou úspěšnou fermentaci [9].

Enzymy jsou přírodní katalyzátory. Jsou to bílkovinné molekuly, často spojené s různými kofaktory nebo prostetickými skupinami. Řídí všechny biochemické procesy, urychlují chemické reakce a vyznačují se většinou vysokou substrátovou specifitou. Každý biologický druh má i druhově specifické enzymy, proto je celkové množství různých enzymů v řádech miliard. Přírodou vytvořené biokatalyzátory jsou díky své regulovatelné aktivitě a malému množství vedlejších produktů účinnější a dokonalejší než chemické katalyzátory. Jejich reakce jsou přesně řízeny nároky daného metabolismu a mají na sebe návaznost, jsou netoxické, snadno regulovatelné a mají mírnější požadavky na podmínky pro průběh reakce.

Enzymy klasifikujeme podle typu reakce, kterou katalyzují. Rozlišujeme šest hlavních tříd, a to Oxidoreduktázy, Transferázy, Hydrolázy, Lyázy, Ligázy a Izomerázy. Transferázy mají z tohoto výčtu největší zastoupení [25].

### 2.10.1 Celulolytické enzymy

Enzymy schopné rozkládat celulózu tvoří složitý enzymový komplex - celulózu. V přírodě celulolytické enzymy produkují některé mikroorganismy, vyšší houby a prvoci. Každý druh mikroorganismů má jiný mechanismus odbourávání celulózy a i jiný poměr složek celulózy komplexu. Enzymy produkované mikroorganismy mají průmyslový význam, celulózy preparáty se v praxi vyrábí hlavně pomocí kmenů *Aspergillus niger* a *Trichoderma viride* [45].

Celulózy komplex se skládá ze tří hlavních složek. První z nich, se systematickým názvem 1,4- $\beta$ -D-glukan-4-glukanohydroláza (EC 3.2.1.4), je endoglukanáza, a je schopná štěpit dlouhé, lineární řetězce na kratší. Umožňuje to rozpojením vodíkových vazeb, které se nachází mezi molekulami celulózy. Zpřístupňuje vlákna celulózy pro další enzymy schopné hydrolýzy. Dalším enzymem je exoglukanáza, 1,4- $\beta$ -D-glukancelobiohydroláza (EC 3.2.1.91). Ta štěpí řetězce na molekuly celobiózy, dimeru glukózy. Posledním enzymem, který přemění celobiózy na redukující cukry, je  $\beta$ -glukosidáza (3.2.1.21) [46].

#### A. Endoglukanáza

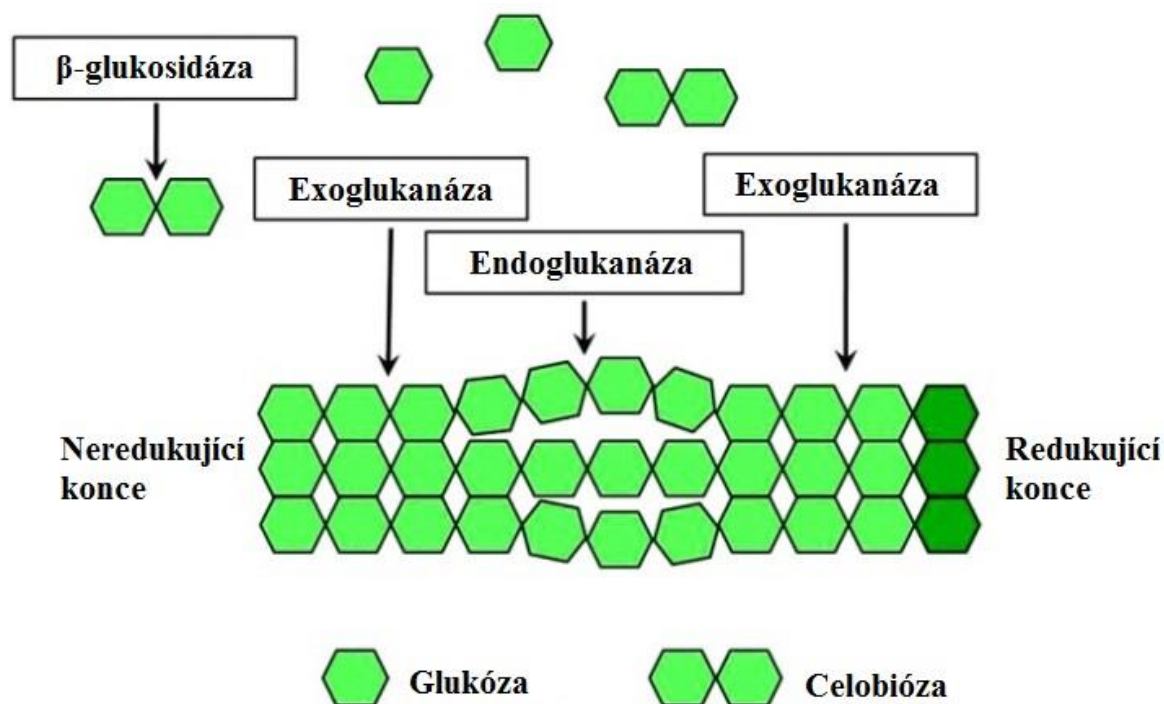
Endoglukanáza náhodně štěpí vnitřní vazby v dlouhých řetězcích na kratší úseky. Štěpí intramolekulární  $\beta$ -(1,4)-glykosidové vazby za vzniku celobiózy a glukooligosacharidů [26, 25].

## B. Exoglukanáza

Exoglukanáza postupuje od přístupných konců celulózy a odštěpuje molekuly celobiózy.

## C. $\beta$ -glukosidáza

$\beta$ -glukosidáza patří do skupiny glykosidáz, skupiny hydrolyzující glykosidové vazby mezi cukernými jednotkami. Glykosidázy mají vysokou specifitu, kterou ovlivňuje několik faktorů, například konfigurace cukru D-, nebo L-, dále konfigurace anomerního uhlíku  $\alpha$ - nebo  $\beta$ -, nebo charakter cukerného kruhu [29].



**Obrázek 8:** Působení celulolytických enzymů [48]

### 2.10.2 Pektolytické enzymy

Pektiny mají v potravinářském průmyslu vedle role pozitivní, jako při výrobě džemů, i roli negativní, například při filtraci ovocných šťáv, kde je nutné jejich rozrušení. Jejich hydrolyza je složitější, díky propletené struktuře je potřeba více skupin enzymů. Dělí se na pektinesterázy, deesterifikační enzymy, a depolymerázy, enzymy štěpící polysacharidový řetězec. Polysacharidový řetězec může být štěpen dvěma cestami. Buď hydrolyzou glykosidových vazeb (pomocí polygalakturonáz) nebo  $\beta$ -eliminací, což způsobí lyázy, přesněji pektinlyázy.

Rychlost hydrolyzy je krom velikosti molekuly závislá hlavně na stupni esterifikace. Pektolytické enzymy mají velké uplatnění při výrobě ovocných nápojů a šťáv – v číření po lisování ovoce, a to nejčastěji v kombinaci s celulolytickými enzymy. Složení pektolytických preparátů se odvíjí od typu ovoce, protože různé druhy obsahují různé pektiny, LMP či HMP. V ovoci jsou také přítomné polyfenoly, které způsobují inhibici pektolytických enzymů. Tomu je možno předcházet provzdušněním [25].

### A. Polygalakturonáza

Polygalakturonázy se vyskytují u vyšších rostlin, hub, a mikroorganismů. Průmyslově jsou získávány zejména z plísní, jako je *Aspergillus niger*, a preparáty připravené pomocí různých druhů mikroorganismů mají stejně, jako u celuláz, různé poměry jednotlivých specifických enzymů.

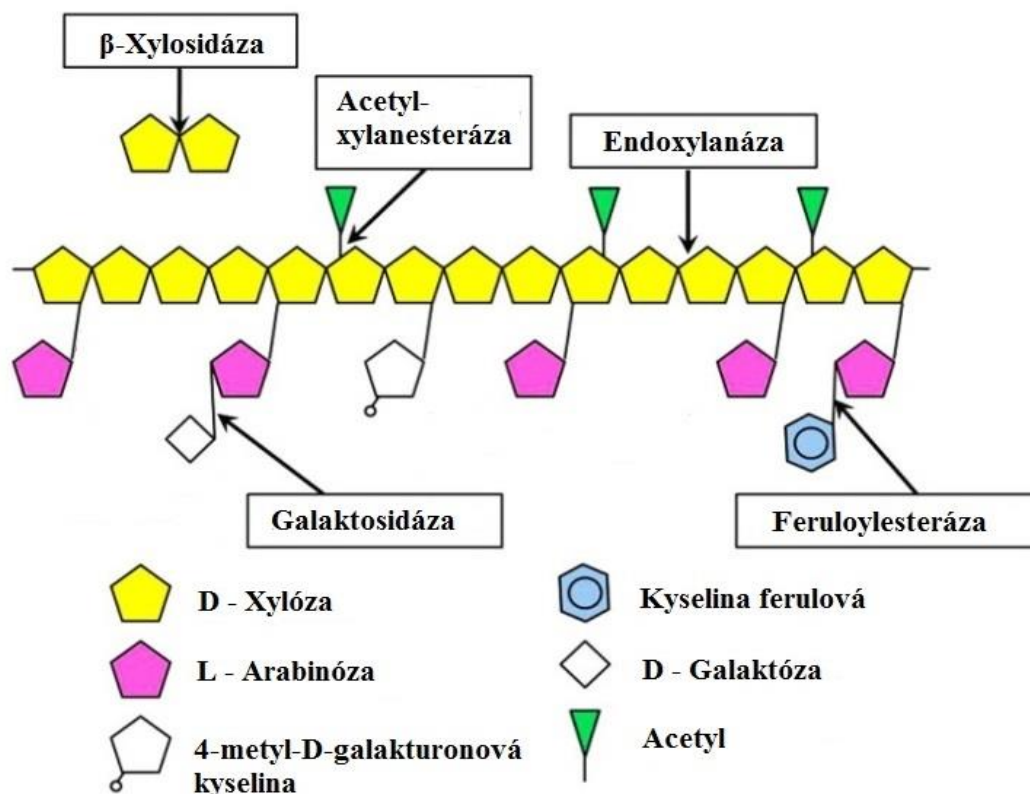
Polygalakturonázy štěpí  $\alpha$ -(1,4)-glykosidové vazby a rozlišujeme je dle místa jejich ataku na molekulu polymeru na endo- (3.2.1.15) a exo- (3.2.1.67) působící enzymy. Produktem jsou různě dlouhé oligomery i monomery. *A. niger* produkuje oba typy těchto enzymů. Některé mikroorganismy produkují navíc různě specifické enzymy, například u rodu *Bacillus* je to enzym štěpící molekuly oligogalakturonázy na monomery kyseliny galakturonové [47].

### B. Pektinesteráza

Pektinesterázy (Pektinmethylesteráza 3.1.1.11) patří do skupiny hydroláz. Jejich účinek se liší dle původu, například mikrobiální pektinesteráza funguje náhodně a štěpí řetězovým mechanismem methylesterové vazby. Při deesterifikaci vzniká methanol a pektát, který je dále štěpen lyázami a polygalakturonázami [47].

### C. Pektátlyáza

Pektátlyázy využívají k hydrolýze pektinových látek odlišného mechanismu než polygalakturonázy, a to  $\beta$ -eliminaci. Jsou typicky produkovány bakteriemi a plísněmi. Polymethylgalakturonátlyáza je jediným enzymem, který je schopen štěpit, bez předchozí účasti jiných enzymů,  $\alpha$ -(1,4)-glykosidové vazby HMP [47].



**Obrázek 9:** Působení pektolytických enzymů [48]

## 2.11 Mikrobiální produkce enzymů

Produkce enzymů pomocí mikroorganismů se v praxi provádí zejména dvěma metodami. První z nich je metoda SmF, neboli submerzní kultivace. Submerzní kultivace je ekonomicky náročnější než druhá metoda, a to SSF – „solid-state fermentation“. Metoda SmF se vyznačuje provzdušňováním, mícháním, a tedy stejnoměrným růstem mikroorganismů a stejnoměrným vyčerpáním živin média. Používá se jak pro produkci enzymů, tak vitaminů či antibiotik.

Naopak metoda SSF spočívá v kultivaci na pevném, jemně zvlhčeném substrátu bez míchání či jiného zásahu, bez přítomnosti volné vody, a její aktivita by měla být pod hodnotou 1. Substrátů vhodných pro metodu SSF je celá řada, používají se jak škrobnaté (rýže, kukuřičná mouka), tak celulózové/lignocelulózové suroviny (dřevní odpad, sláma), nebo jiný potravinový odpad (hroznové výlisky či kávové zbytky) [49].

Mikroorganismy vhodné pro tento způsob kultivace jsou zejména plísně (rod *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, a jiné), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) či bakterie (*Bacillus subtilis*). Významný je zejména rod *Aspergillus*, který produkuje až přes 20 různých enzymů. Důležitými faktory, které ovlivňují mikrobiální růst v procesu SSF, jsou teplota, doba kultivace, předúprava substrátu, množství inokula a produkce CO<sub>2</sub> a vedlejších produktů [49, 50].

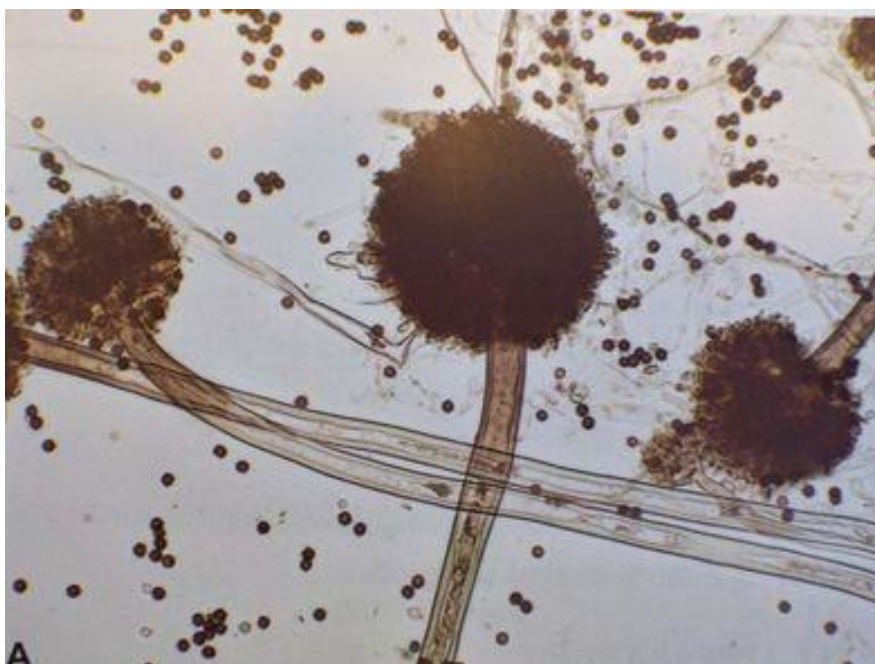
### 2.11.1 *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* (Obrázek 10) patří do skupiny vřeckovýtrusných hub rodu *Aspergillus* a je to celosvětově nejvíce rozšířený druh tohoto rodu. Vyskytuje se zejména v teplejších oblastech. V přírodě se vyskytuje hojně, hlavně v půdě, na skladovaném obilí, zkaženém ovoci a zelenině, na mléčných výrobcích, nebo na textiliích a kůži. Způsobuje tzv. „černou plíseň“ [51, 45].

Teplotní optimum *A. niger* se pohybuje v rozmezí 35–37 °C. Má rychle rostoucí kolonie, které tvoří nejdříve bílé a vatovité mycelium, následně v době zralosti konidií povrch pokryjí černohnědé konidiofory. Konidiofory jsou hladké a dlouhé i 1–3 mm, zakončené kulovitým měchýřkem, pokrytým vrstvou metul s bradavčitými, kulovitými konidii [51, 52].

Průmyslově se *A. niger* hojně využívá na výrobu organických kyselin, produkuje kyselinu šťavelovou, citronovou, gallovou či fumarovou. Dále se používá jako biologický test, a to na zjištění obsahu fosforu v půdě, nebo jako testovací organismus na fungicidy v textilním průmyslu. Jeho mycelium může být po citronovém kvašení zdrojem pro výrobu vitamínu D [45, 52].

Produkuje nebezpečný mykotoxin ochratoxin A, a využívá se pro produkci celé řady enzymů - produkuje celulolytické, pektolytické, amylytické a další hydrolytické enzymy [51].



**Obrázek 10:** *Aspergillus niger* [42]

## 2.12 Analytické metody pro stanovení výsledků hydrolýz

Cílem porovnání různých druhů hydrolýz je zjištění nejvhodnější hydrolýzy pro maximalizaci obsahu redukcujících sacharidů. Základní metodou pro zjištění obsahu redukcujících látek je metoda Somogyi-Nelsonova. Její princip spočívá v redukci oxidačního činidla poloacetalovou skupinou cukrů. Roli oxidačního činidla zde má měďnatá sůl obsažená v Somogyiho činidle II. Redukcí vzniká měďná sůl, která po reakci s arsenomolybdenanem v Nelsonově činidle tvoří modrozeleně zbarvený komplex, který se měří spektrofotometricky při 530 nm [53, 54].

Spektrofotometrie je metoda patřící do spektrálních metod, které jsou založené na interakci hmoty a elektromagnetického záření. Zde jde o sledování změn, které nastanou ve sloučeninách po absorpci záření v oblasti UV–VIS (200 až 800 nm). Při průchodu světla zbarveným roztokem je díky naměřené absorpenci možné určit koncentraci sledovaného roztoku. Korelace absorbance a koncentrace je vyjádřena Lambert-Beerovým zákonem [55].

## 2.13 Metody stanovení počtu spor

Ke stanovení počtu buněk je možné využít metodu nepřímou, založenou na počítání kolonií na Petriho misce, nebo metodu přímou, mikroskopickou. Metoda přímá spočívá v stanovení celkového počtu buněk v jednotce objemu, za využití počítací komůrky, např. Bürkerovy nebo Thomovy. Bürkerova komůrka je podložka se silného skla a nachází se na ní dvě vyryté mřížky. V prostoru mřížky, nižším než ostatní plochy, je po přikrytí krycím sklíčkem přesně daná hloubka. Prostor komůrky má ještě další, nižší části, rýhy, sloužící k odtékání přebytečné kapaliny po položení krycího sklíčka. Krycí sklíčko se uchytí díky šroubovacím klapkám umístěným po stranách komůrky. Jedna čtvercová mřížka je rozdělena na 25 velkých čtverečků, z čehož každý z nich je dále rozdělen na 16 menších čtverečků. Pod mikroskopem se následně počítá počet buněk v daném množství čtverečků [52].

## 2.14 Další zpracování hydrolyzátů

Po optimalizaci nejvhodnější metody předúpravy a maximalizaci výtěžku redukujících sacharidů je více možností, jak tyto redukující sacharidy převést na hodnotný produkt. Schéma procesu je znázorněno na Obrázku 11. Nejvýznamnějším a nejvíce zkoumaným produktem v této oblasti je bioethanol [56].

Bioethanol je získáván procesem fermentace pomocí mikroorganismů, která spočívá v přeměně – oxidaci sacharidů na produkty metabolismu, jakými mohou být alkoholy, plyny, nebo kyseliny. V praxi známé kvašení je krom alkoholového kvašení také mléčné, kdy je bakteriemi za anaerobních podmínek skutečně přeměna cukrů na kyselinu mléčnou. Pokud je vznikajícím produktem zejména kyselina mléčná, hovoříme o homofermentativním mléčném kvašení, pokud jsou přítomny i jiné metabolity, jako  $\text{CO}_2$  či ethanol, hovoříme o heterofermentativním mléčném kvašení. Mléčné kvašení je typické zejména pro rod *Lactobacillus*. Kyselina mléčná je také studována jako vhodný produkt po fermentaci potravinového odpadu, jelikož má významné vlastnosti pro použití v průmyslu. Používá se například jako konzervační prostředek, v posledních letech je významné použití pro výrobu biodegradabilních polymerů – polylaktidových vláken, které mají využití například jako chirurgický materiál, a slouží jako alternativa neekologických polymerů [57].

Pro produkci bioethanolu se nejčastěji používají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Kluyveromyces marxianus*. Je požadováno, aby měl použitý mikroorganismus co nejvyšší výtěžnost ethanolu, a zároveň aby byl odolný proti možným vznikajícím inhibičním produktům. Je obtížné najít mikroorganismus splňující všechny požadavky, proto jsou používané mikroorganismy zatím pouze kompromisem a předmětem optimalizace výtěžnosti [2, 58].



**Obrázek 11:** Schéma procesu zpracování potravinového odpadu

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Cíl práce

Cílem experimentální části bylo studium a porovnání různých metod předúprav odpadního materiálu pro nalezení metody s nejvyššími výtěžky redukcí sacharidů. Výtěžky hydrolyz byly stanoveny metodou Somogyi-Nelsona. Hydrolyzáty s nejlepšími výtěžky redukcí sacharidů a zjištěné poznatky byly použity pro navazující fermentace v bakalářské práci kolegyně Kristíny Musilové (*Využití termotolerantních kmenů k přípravě vybraných metabolitů na hydrolyzátech odpadů*. Brno: VUT v Brně, Fakulta chemická, 2016).

### 3.2 Použitý substrát

Jako substrát byly použity zralé slupky z pomerančových plodů původem ze Španělska, odrůda Navel.

### 3.3 Seznam použitých chemikálií a enzymů

#### 3.3.1 Stanovení redukcí sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

- D-glukóza bezvodá p.a.,  $C_6H_{12}O_6$ , Lach-Ner s.r.o.
- Hydrogenarseničnan sodný heptahydrát,  $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ , AlfaAesar
- Hydrogenuhličitan sodný p.a.,  $NaHCO_3$ , Lachema a.s.
- Kyselina sírová 96 % p.a.,  $H_2SO_4$ , Lach-Ner s.r.o.
- Molybdenan amonný pentahydrát p.a.,  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 5H_2O$ , Lach-Ner s.r.o.
- Síran sodný bezvodý č.,  $Na_2SO_4$ , Lach-Ner s.r.o.
- Síran měďnatý pentahydrát p.a.,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , Lach-Ner s.r.o.
- Síran sodný,  $Na_2SO_4$ , Lach-Ner s.r.o.
- Uhličitan sodný bezvodý,  $Na_2CO_3$ , PENTA
- Vínan sodno-draselný tetrahydrát č.,  $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ , Lach-Ner s.r.o.

#### 3.3.2 Stanovení celulózy

- Ethanol absolutní p.a.,  $C_2H_5OH$ , Merck
- Kyselina octová 99 %, p.a.,  $CH_3COOH$ , 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.

#### 3.3.3 Stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmanna

- Ethanol absolutní p.a.,  $C_2H_5OH$ , Merck
- Hydroxid sodný, mikroperly p.a.,  $NaOH$ , Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina sírová 96 % p.a.,  $H_2SO_4$ , Lach-Ner s.r.o.

#### 3.3.4 Chemické a fyzikální hydrolyzy

- Hydroxid draselný p.a,  $KOH$ , Lach-Ner s.r.o.
- Hydroxid sodný, mikroperly p.a.,  $NaOH$ , Lach-Ner s.r.o.

- Kyselina dusičná 65 % p.a. HNO<sub>3</sub>, Lach-Ner s.r.o.
- Kyselina fosforečná 85 % p.a., H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, LACHEMA a.s.
- Kyselina sírová 96 % p.a., H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Lach-Ner s.r.o.

### 3.3.5 Enzymatické hydrolýzy

- Novozymes® NS50013 (celulázový komplex)
- Novozymes® NS50010 (β-glukosidáza)

### 3.3.6 Použitá kultura a chemikálie na stanovení mikrobiální produkce enzymů

- Karboxymethylcelulóza (CMC), Serva
- Kyselina polygalakturonová (PGA), Sigma-Aldrich s.r.o.
- Tween® 80, Carl ROTH
- Octan sodný CH<sub>3</sub>COONa · 3H<sub>2</sub>O, Lach-Ner s.r.o.
- kultura *Aspergillus niger* z České sbírky mikroorganismů (CCM) v Brně, F-8189

## 3.4 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

### 3.4.1 Použitý software

- ChemSketch
- Microsoft Office Word 2013
- Microsoft Office Excel 2013
- Adobe Reader XI
- Lucidchart

### 3.4.2 Použité přístroje

- analytické váhy Pioneer Ohaus
- váhy elektronické Helago TS-300
- váhy elektronické Scaltec SAS 50
- pH metr InoLab 720 SET, Merci s.r.o.
- třepačka IKA lab dancer vario
- inkubátor LTE Scientific IP IOO-U
- ultrazvuková čistička Elma Ultrasound
- mikrovlnná trouba Daewoo, 700 W
- spektrofotometr ThermoSpectronic Helios δ
- temperovaná vodní lázeň Polystat cc 1
- sušárna Binder FD 53
- centrifuga Eppendorf centrifuge 5417 R
- lednička Indesit
- chladnička Gorenje
- dvouplotýnkový vařič Eta
- termostat biologický INB 300
- třepačka Heidolph unimax 1010

- inkubátor Heidolph inkubátor 1000
- tlakový hrnec Fagor Rapid xpress
- elektrický mixér Hyundai CHO 110, 300 W
- UV sterilní box BioAir Aura mini
- světelný mikroskop
- mikropipety a běžné laboratorní sklo

### **3.5 Příprava roztoků a činidel**

#### **3.5.1 Příprava roztoků pro stanovení redukcí sacharidů**

##### *3.5.1.1 Somogyiho činidlo I*

Pro přípravu prvního roztoku bylo smícháno 12 g vlnanu draselno-sodného, 16 g hydrogenuhličitanu sodného, 18 g uhličitanu sodného a vše bylo rozpuštěno ve 200 ml destilované vody. Dále bylo naváženo 144 g síranu sodného, který byl následně za stálého míchání pomalu přidáván do 600 ml teplé destilované vody. 200 ml i 600 ml připravených roztoků bylo následně smícháno pro 800 ml požadovaného Somogyiho činidla I. Roztok byl ponechán v lahvi z tmavého skla.

##### *3.5.1.2 Somogyiho činidlo II*

Druhý roztok byl připraven smícháním 4 g pentahydrátu síranu měďnatého a 36 g bezvodého síranu sodného, navážky byly kvantitativně rozpuštěny v destilované vodě a následně doplněny do objemu 200 ml. Roztok byl ponechán v lahvi z tmavého skla.

##### *3.5.1.3 Nelsonovo činidlo*

Třetí roztok byl připraven rozpuštěním 25 g molybdenanu amonného v 450 ml destilované vody, k tomuto roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové a roztok připravený rozpuštěním 2 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného v 25 ml destilované vody. Před použitím byl roztok ponechán 48 hodin v termostatu na 37 °C za nepřístupu světla a následně byl přechováván v lahvi z tmavého skla [53].

#### **3.5.2 Příprava zásobního roztoku glukózy o koncentraci 0,5 g·l<sup>-1</sup>**

Na přípravu zásobního roztoku glukózy o koncentraci 0,5 g·l<sup>-1</sup> bylo naváženo 0,05 g glukózy s přesností na čtyři desetinná místa. Poté byla navážka glukózy kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a ta byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### **3.5.3 Příprava roztoku hydroxidu sodného na úpravu pH**

Na přípravu 2% roztoku hydroxidu sodného bylo s přesností na 4 desetinná místa naváženo 0,2 g NaOH. Poté byla navážka hydroxidu kvantitativně převedena do odměrné baňky na 100 ml a ta byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### **3.5.4 Příprava roztoku kyseliny sírové na úpravu pH**

Na přípravu 1 % roztoku kyseliny sírové bylo pipetováno 1,0417 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do odměrné baňky na 100 ml, která byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

### 3.5.5 Příprava základního roztoku octanu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Na přípravu základního roztoku octanu sodného bylo naváženo  $27,2 \text{ g CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 1 litr a doplněno destilovanou vodou.

### 3.5.6 Příprava 0,5% roztoku pektanu sodného v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanovém pufru o $\text{pH} = 4,2$

Pro přípravu roztoku pektanu sodného v octanovém pufru bylo naváženo  $0,5 \text{ g PGA}$  a následně byla navážka za intenzivního míchání přidávána k  $50 \text{ ml}$  destilované vody. Po rozpuštění bylo k roztoku přidáno  $13,2 \text{ ml}$   $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octanu sodného a bylo upraveno  $\text{pH}$  na hodnotu  $4,2$  pomocí kyseliny octové. Nakonec byl roztok doplněn destilovanou vodou do  $100 \text{ ml}$ .

### 3.5.7 Příprava 1% roztoku CMC v $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanovém pufru o $\text{pH} = 5,4$

Pro přípravu roztoku karboxymethylcelulózy v octanovém pufru byl navážen  $1 \text{ g CMC}$  a následně byla navážka za intenzivního míchání přidávána k  $40 \text{ ml}$  destilované vody. Po rozpuštění bylo k roztoku přidáno  $41,2 \text{ ml}$   $0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  octanu sodného, bylo upraveno  $\text{pH}$  na hodnotu  $5,4$  pomocí kyseliny octové. Nakonec byl roztok doplněn destilovanou vodou do  $100 \text{ ml}$ .

## 3.6 Příprava materiálu

Pomerančové slupky, odšťavněné v domácím odšťavňovači byly vloženy do mixéru Hyundai a 3 minuty rozmělnovány na menší částice o velikosti v rozpětí  $0,3\text{--}0,9 \text{ cm}$ . Po rozmixování byly slupky uchovány v chladu v uzavřené plastové dóze.

### 3.6.1 Příprava vzorku pro experiment

Všechny experimenty byly prováděny s  $25\% \text{ w/v}$  suspenzí, pro kterou bylo naváženo  $25 \text{ g}$  rozmělněných pomerančových slupek a přidáno  $75 \text{ ml}$  destilované vody.

## 3.7 Stanovení počátečních základních vlastností materiálu

### 3.7.1 Stanovení sušiny vzorku

Byla provedena tři souběžná kontrolní stanovení. Nejdříve byl každý kelímek vysušen v sušárně při  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí byly kelímky zváženy. Poté bylo do kelímku naváženo vždy  $5 \text{ g}$  vzorku slupek s přesností na 4 desetinná místa. Kelímek se vzorkem byl vložen do sušárny na 90 minut na  $130 \text{ }^\circ\text{C}$  a po vysušení a cca 40 minutovém ponechání v exsikátoru byl opět zvážen na analytických vahách.

$$\%_{\text{sušina}} = \frac{(m_{\text{kelímek se vzorkem}} - m_{\text{kelímek}})}{m_{\text{vzorek}}} \cdot 100 \quad (1)$$

### 3.7.2 Stanovení obsahu vlákniny

Byla provedena dvě souběžná kontrolní stanovení. Do  $500 \text{ ml}$  destilační baňky bylo naváženo  $2\text{--}3 \text{ g}$  vzorku slupek s přesností na 4 desetinná místa. Do baňky bylo přidáno  $200 \text{ ml}$

5% kyseliny sírové a baňka se vařila 30 minut pod zpětným chladičem. Během vaření byla baňka několikrát promíchána. Poté byl obsah baňky za horka zfiltrován přes filtrační kelímek a promyt horkou vodou. Zbytek ve filtračním kelímku se převedl zpět do destilační baňky s 200 ml 5% hydroxidu sodného a baňka se znovu vařila po dobu 30 minut. Po skončení byl roztok v baňce znovu zfiltrován přes suchý filtrační kelímek a promyt horkou vodou a ethanolem. Obsah filtračního kelímku byl vysušen při 105 °C, po vychladnutí zvážen a poté vložen do muflové pece, kde byl obsah kelímku spálen při teplotě kolem 650 °C. Po vychladnutí byl kelímek znovu zvážen.

$$m_{\text{vláknina}} = m_{\text{po sušení}} - m_{\text{po spálení}} \quad (2)$$

$$\% \text{ vláknina} = \frac{m_{\text{vláknina}}}{m_{\text{vzorek}}} \cdot 100 \quad (3)$$

### 3.7.3 Stanovení obsahu celulózy

Byla provedena dvě souběžná kontrolní stanovení. Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 0,8 g vzorku slupek, a to s přesností na 4 desetinná místa. Do baňky bylo přidáno 30 ml směsi kyselin octové a dusičné (v poměru 10:1 při 80% kyselině octové a koncentrované kyselině dusičné) a baňka byla poté ponořena ve vroucí vodní lázni. Po uplynutí 1 hodiny byl obsah baňky kvantitativně převeden stříčkou s ethanolem do frity S3 o známé hmotnosti a poté byl zfiltrován. Frita se vzorkem byla promyta ethanolem a na 4 hod. vysušena v sušárně při teplotě 105 °C. Po uplynutí doby v sušárně byla frita ponechána v exsikátoru, zvážena a vzorek byl pomocí ethanolu převeden do 100 ml Erlenmeyerovy baňky. Baňka se vzorkem a ethanolem byla poté ponechána ve vroucí vodní lázni až do odpaření veškerého ethanolu. Poté bylo do baňky přidáno 20 ml 72% kyseliny sírové a baňka byla na jednu hodinu ponechána hydrolyzovat, umístěná na třepačku (120 ot/min) temperovanou na 30 °C. Obsah baňky byl převeden pomocí stříčky s ethanolem do frity S3 o známé hmotnosti, zfiltrován a ponechán v sušárně na dobu 4 hodin. Po uplynutí doby byla frita ze sušárny vyjmuta, ponechána v exsikátoru a zvážena.

$$\% \text{ celulóza} = \frac{(m_{\text{frita 1+vzorek}} - m_{\text{frita 1}}) \cdot (m_{\text{frita 2+vzorek}} - m_{\text{frita 2}})}{m_{\text{vzorek}}} \cdot 100 \quad (4)$$

### 3.8 Stanovení kalibrační křivky glukózy pro metodu Somogyi-Nelsona

Na sestavení kalibrační křivky byl použitý zásobní roztok glukózy o koncentraci 0,5 g·l<sup>-1</sup>, z kterého byla připravena kalibrační řada deseti roztoků s koncentracemi glukózy od 0,02 g·l<sup>-1</sup> po 0,2 g·l<sup>-1</sup> s krokem 0,02 g·l<sup>-1</sup>.

Do každé zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml vzorku a 0,5 ml Somogyiho činidla (I + II v poměru 4:1). Zkumavky byly následně na 10 minut vloženy do vroucí vodní lázně. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo do každé zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Po promíchání na vortexu byla na spektrofotometru měřena absorbance roztoku proti blanku, a to při vlnové délce 530 nm. Blank byl připraven stejným způsobem, jako vzorky, ale namísto 0,5 ml vzorku bylo pipetováno 0,5 ml destilované vody.

## **3.9 Proces hydrolýz**

### **3.9.1 Fyzikální hydrolýza – mikrovlny, ultrazvuk, tlakový hrnec**

Jako fyzikální metody hydrolýzy byly použity mikrovlny, ultrazvuk, zvýšená teplota – vodní lázeň (50 °C a 100 °C) a také hydrolýza v tlakovém hrnci. Byly použity i fyzikální metody v kombinaci s chemickými, a to konkrétně tlakový hrnec v kombinaci s 2% kyselinou sírovou a mikrovlny v kombinaci s 2% kyselinou sírovou. Dále byla provedena závislost koncentrace redukujících sacharidů na době působení mikrovln.

Pro hydrolýzu mikrovlnami byla do Erlenmeyerovy baňky na 250 ml připravena 25% w/v suspenze materiálu a baňka byla vložena do mikrovlnné trouby. Mikrovlnná trouba byla spuštěna na jeden ze tří stupňů výkonu (385 W, 540 W, 700 W) a doba působení mikrovln na materiál byla 5 minut. Před počátkem hydrolýzy byl vždy odebrán kontrolní vzorek pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona, stejně tak i na konci hydrolýzy.

Pro kombinaci mikrovln a kyseliny byla připravena 25% w/v suspenze s kyselinou o koncentraci 2 % a mikrovlnná trouba byla spuštěna na 3. stupeň výkonu (700 W) na dobu 5 minut, během které byl po každé minutě odebrán 1 ml vzorku pro stanovení obsahu redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona. Před počátkem hydrolýzy byl také odebrán vzorek pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů.

Pro hydrolýzu zvýšenou teplotou byla rovněž do baňky připravena 25% w/v suspenze materiálu a baňka byla následně vložena do temperované vodní lázně na 50 °C, nebo na 100 °C. Doba hydrolýzy byla 60 minut. Před počátkem hydrolýzy i na konci hydrolýzy byl vždy odebrán vzorek pro stanovení nárůstu koncentrace redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona.

Pro hydrolýzu ultrazvukem a v tlakovém hrnci byla do baňky vždy připravena 25% w/v suspenze, byl odebrán vzorek pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů a poté byla baňka uzavřena a vložena na 30 minut do ultrazvuku nebo do tlakového hrnce. Po skončení hydrolýzy byl opět odebrán vzorek pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona.

### **3.9.2 Kyselá hydrolýza**

Na kyselou hydrolýzu materiálu byla použita kyselina sírová, kyselina dusičná, a kyselina fosforečná. Zvolené koncentrace kyselin byly vždy 0,5 %, 2 % a 5 %. Každá hydrolýza byla provedena při laboratorní teplotě, při 50 °C a při 100 °C. Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 25 g materiálu a k tomu bylo přidáno 75 ml kyseliny o požadované koncentraci. Byl proveden odběr v čase 0 pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů a následně byla baňka uzavřena a hodinu ponechána při laboratorní teplotě nebo ve vodní lázni. Po skončení byl odebrán vzorek pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona.

### **3.9.3 Alkalická hydrolýza**

Na alkalickou hydrolýzu materiálu byl použit hydroxid sodný a hydroxid draselný. Zvolené koncentrace hydroxidů byly vždy 5 %, 10 % a 15 %. Všechny hydrolýzy byly provedeny

při 100 °C. Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 25 g materiálu a k tomu bylo přidáno 75 ml hydroxidu o požadované koncentraci. Byl proveden odběr v čase 0 pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů a následně byla baňka uzavřena a hodinu ponechána ve vodní lázni temperované na 100 °C. Po skončení byl odebrán vzorek pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona.

### 3.9.4 Enzymatická hydrolýza

Na enzymatickou hydrolýzu materiálu byl použit enzymatický celulózový komplex Novozymes® NS50013 a  $\beta$ -glukosidáza – Novozymes® NS50010. Enzymy byly použity samostatně i v kombinaci. Jejich charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Charakteristiky použitých enzymů

	pH optimum	teplotní optimum [°C]	množství (% w/w)
NS50010	2,5 – 6,5	45 – 70°C	0,2 – 0,6
NS50013	4,5 – 6,5	45 – 50°C	2 – 6

Pro enzymatickou hydrolýzu byla do Erlenmeyerovy baňky připravena 25% w/v suspenze materiálu, ke které bylo následně přidáno potřebné množství enzymu tak, aby koncentrace enzymu činila 2, 4, 6 % w/w nebo 0,2; 0,4; 0,6 % w/w. V každé baňce bylo následně upraveno pH na požadovanou hodnotu. Po úpravě pH byla baňka vložena na třepačku s inkubátorem a byla nastavena teplota (40, 45, nebo 50 °C) a byly nastaveny otáčky (140 ot/min). Přehled vykonaných hydrolýz je uveden v Tabulce 4. Hydrolýza byla v závislosti na použitém enzymu sledována 96 nebo 51 hodin, vzorky byly odebírány v intervalu 6 hodin při 96 hodin trvající hydrolýze a v intervalu 3 hodin při 51 hodin trvající hydrolýze. Před započítáním hydrolýzy byl odebrán vzorek v čase 0 pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů.

**Tabulka 4:** Přehled provedených hydrolyz a jejich parametrů

Hydrolyza č.	Použitý enzym	koncentrace enzymu [% w/w]	pH	Teplota [°C]	Doba trvání [hod]
1	NS50013	2	5	45	96
2	NS50013	4	5	45	96
3	NS50013	6	5	45	96
4	NS50013	4	4,5	45	96
5	NS50013	4	5,5	45	96
6	NS50013	4	6,5	45	96
7	NS50013	4	5	40	96
8	NS50013	4	5	50	96
9	NS50010	0,2	5	55	51
10	NS50010	0,4	5	55	51
11	NS50010	0,6	5	55	51
12	NS50010	0,4	5	45	51
13 kombinace enzymů	NS50013	4	5	45	96
	NS50010	0,4			

### 3.10 Stacionární kultivace pomocí *A. niger*

Pro sledování produkce enzymů byl použit *A. niger* z České sbírky mikroorganismů, označení F-8189. Inokulum bylo očkováno na agarové plotny a mikroorganismus se nechal 8 dní narůst při 30 °C.

Poté byly spory z dvou Petriho misek opatrně převedeny 100 ml 0,3% roztoku Tweenu 80 do Erlenmeyerovy baňky. Tato baňka byla dále použita pro stanovení počtu spor v inokulu. Pro kultivaci SSF bylo do každé baňky naváženo 2,5 g substrátu, ke kterému byly přidány 3 ml inokula. Baňky, z nichž každá byla určena pro jeden den kultivace, byly poté vloženy do termostatu na 37 °C a během 10 dní byla sledována produkce enzymů a obsah redukujících sacharidů. Každý den byla postupně odebrána jedna baňka z termostatu a suspenze v ní byla zfiltrována. Filtrát byl použit na stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona a na stanovení aktivity enzymů.

### 3.10.1 Stanovení počtu spor

Ke stanovení počtu buněk byla využita metoda přímá, mikroskopická. Pro stanovení počtu buněk byl pipetován 1 ml inokula na mřížku v Bürkerově komůrce. Plocha komůrky byla překryta krycím sklíčkem a to bylo pevně zafixováno bočními klapkami. Přebytná kapalina v rýhách a po stranách sklíčka byla odsáta. Následně byla komůrka vložena pod mikroskop a byl pozorován počet spor v čtvercích 5×5.

### 3.11 Stanovení obsahu redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Odebrané vzorky hydrolyz byly nejdříve centrifugovány při 10 000 ot/min po dobu 10 minut a při teplotě 15 °C pro odstranění pevného podílu. Do každé zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml 500krát zředěného supernatantu a 0,5 ml Somogyiho činidel (I + II v poměru 4:1). Zkumavky byly následně na 10 minut vloženy do vroucí vodní lázně. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo do každé zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Po promíchání na vortexu byla na spektrofotometru měřena absorbance roztoku proti blanku, a to při vlnové délce 530 nm. Blank byl připraven stejným způsobem, jako vzorky, ale namísto 0,5 ml vzorku bylo pipetováno 0,5 ml destilované vody. Stanovení obsahu redukujících sacharidů během kultivace *A. niger* probíhalo také uvedeným postupem, do zkumavky bylo pipetováno 0,5 ml z filtrátu, stejně, jako u stanovení aktivity enzymů (3.12) [53].

### 3.12 Stanovení aktivity enzymů produkovaných během kultivace *A. niger*

Pro stanovení aktivity celulózy a pektinázy byl nejdříve obsah baňky zfiltrován za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku. Z filtrátu bylo do zkumavky vždy pipetováno 0,5 ml a k tomu bylo přidáno 0,5 ml 0,5% roztoku pektanu sodného (stanovení pektinázy) nebo 0,5 ml 1% roztoku CMC (stanovení celulózy). Zkumavka pro stanovení pektinázy byla poté ponechána 1 hodinu při laboratorní teplotě, zkumavka pro stanovení celulózy byla ponechána 1 hodinu ve vodní lázni o 50°C. Po uplynutí hodiny bylo do zkumavek přidáno 0,5 ml Somogyiho činidel (I a II v poměru 4:1) a zkumavky byly ponořeny na deset minut do vroucí vodní lázně. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo do každé zkumavky přidáno 0,5 ml Nelsonova činidla a 3,5 ml destilované vody. Po promíchání na vortexu byla na spektrofotometru měřena absorbance roztoku proti blanku, a to při vlnové délce 530 nm. Blanky byly připraveny stejně, jako ostatní zkumavky, ale Somogyiho činidla byla přidána ihned a zkumavky byly povařeny okamžitě, ne až po uplynutí jedné hodiny. Postup byl dále stejný.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Všechny výsledky a grafy byly zpracovány v programu Excel 2013. Vzorčky pro stanovení obsahu redukujících sacharidů byly proměřeny třikrát, byla vypočtena výsledná hodnota pomocí funkce PRŮMĚR a dále interval spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE. Jako hladina statistické významnosti byla zvolena  $\alpha = 0,05$ . Výsledky hydrolýz jsou pro přehlednost porovnání zpracovány jako výtěžnost, tedy rozdíl konečné koncentrace redukujících sacharidů po hydrolýze a počáteční koncentrace redukujících sacharidů před hydrolýzou. Výsledky měření kalibrační křivky a provedených hydrolýz jsou znázorněny graficky, tabulky s číselnými hodnotami jsou uvedeny v přílohách.

### 4.1 Výsledky stanovení počátečních základních vlastností materiálu

#### 4.1.1 Stanovení sušiny

Byl stanoven obsah sušiny v materiálu podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.1. Ze tří souběžných stanovení byl vypočten průměr a odchylka. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 5.

**Tabulka 5:** Výsledky stanovení sušiny materiálu

<i>miska</i>	<i>m<sub>1</sub> [g]</i>	<i>m<sub>2</sub> [g]</i>	<i>m<sub>3</sub> [g]</i>	<i>%sušina</i>
č. 1	1,1758	2,3020	5,0003	22,5227
č. 2	1,1847	2,3047	5,0001	22,3996
č. 3	1,1806	2,3233	5,0001	22,8535
průměr:				22,6 ± 0,2

*m<sub>1</sub>....hmotnost kelímku*

*m<sub>2</sub>....hmotnost kelímku se vzorkem po spálení*

*m<sub>3</sub>....hmotnost navážky pomerančových slupek*

#### 4.1.2 Stanovení vlákniny podle Henneberga a Stohmana

Byl stanoven obsah vlákniny v základním materiálu podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.2. Ze dvou souběžných stanovení byl vypočten průměr i odchylka. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Výsledky stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmana

<i>frita</i>	<i>m<sub>1</sub> [g]</i>	<i>m<sub>2</sub> [g]</i>	<i>m<sub>3</sub> [g]</i>	<i>m<sub>vláknina</sub> [g]</i>	<i>%vláknina</i>
č. 1	2,5003	20,4050	18,8286	1,5764	63,0484
č. 2	2,5385	21,8822	20,2101	1,6721	65,8696
průměr:					65 ± 2

*m<sub>1</sub>....hmotnost navážky pomerančových slupek*

*m<sub>2</sub>....hmotnost po sušení*

*m<sub>3</sub>....hmotnost po spálení*

## 4.2 Stanovení celulózy v základním materiálu a v hydrolyzátu

Byl stanoven obsah celulózy v základním materiálu podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.3. Pro porovnání s původním složením materiálu bylo provedeno stanovení celulózy také v produktu enzymatické hydrolýzy, navážku tvořila suspenze hydrolyzátu a je možné porovnat obsah celulózy v materiálu před hydrolýzou a po hydrolýze (Hydrolýza kombinací enzymů, Graf 16). Vždy ze dvou souběžných stanovení byl vypočten průměr i odchylka. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 7.

**Tabulka 7:** Stanovení celulózy v původním materiálu a v hydrolyzátu

	$m_1$ [g]	navážka [g]	$m_2$ [g]	$m_3$ [g]	%celulóza
<b>původní materiál</b>	46,5870	0,8000	46,6981	46,5970	12,6375
	43,5085	0,8001	43,6181	43,5101	13,4983
	<i>průměr:</i>				13,1 ± 0,6
<b>hydrolyzát</b>	40,0686	0,8003	40,0892	40,0689	2,5366
	43,2451	0,8001	43,2669	43,2459	2,6247
	<i>průměr:</i>				2,58 ± 0,06

$m_1$ ...hmotnost původní suché frity

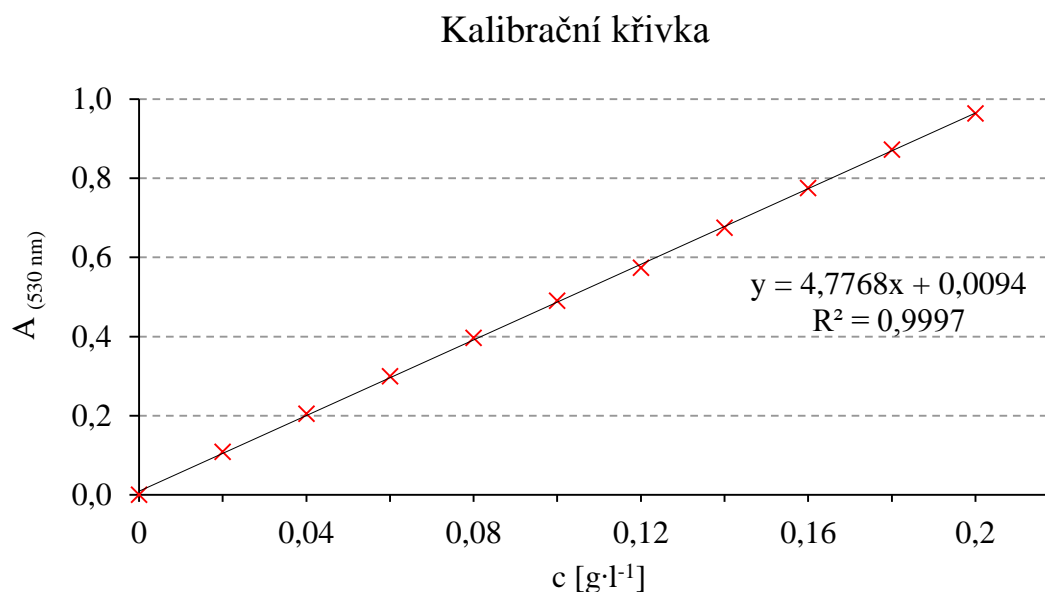
$m_2$ ...hmotnost po 1. sušení

$m_3$ ...hmotnost po 2. sušení

## 4.3 Kalibrační křivka glukózy

Podle postupu v kapitole 3.8 byla sestrojena kalibrační křivka glukózy. (Graf 1).

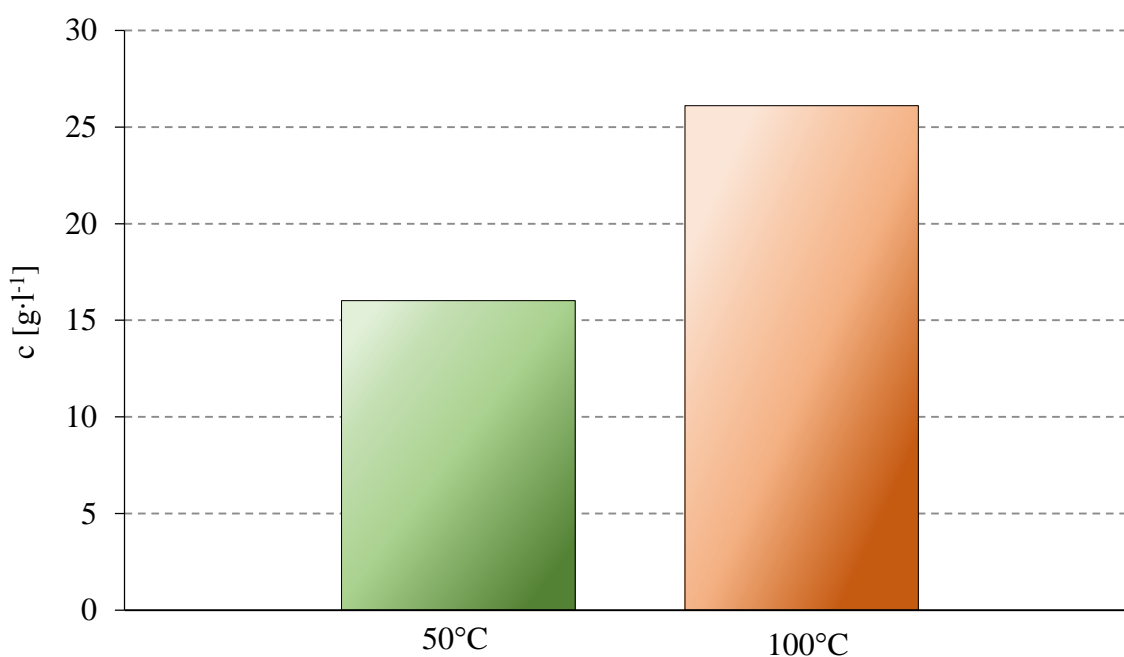
**Graf 1:** Kalibrační křivka glukózy



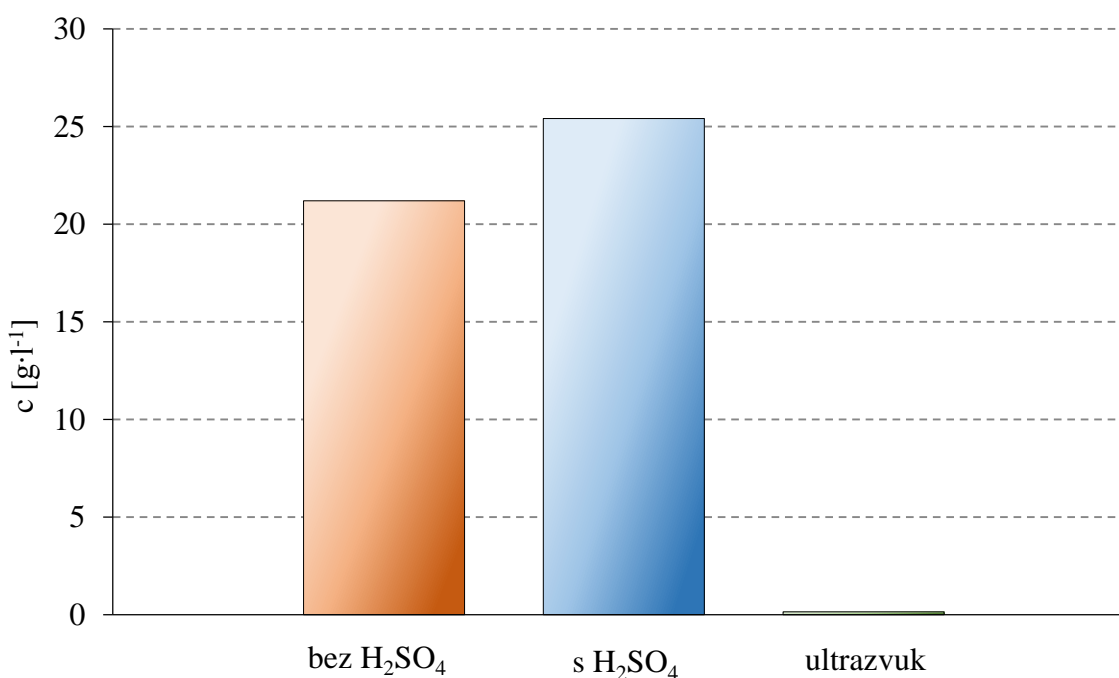
#### 4.4 Fyzikální hydrolýza a kombinace

Podle postupů v kapitole 3.9.1 byly provedeny fyzikální hydrolýzy a kombinace fyzikálních a chemických hydrolýz. Pro stanovení výtěžku hydrolýzy byla použita metoda dle Somogyi-Nelsona (kapitola 3.11), a to z rozdílu počáteční hodnoty obsahu redukujících sacharidů a hodnoty redukujících sacharidů po hydrolýze. Pro výpočet koncentrace redukujících sacharidů byla použita kalibrační křivka glukózy (Graf 1). Porovnání výtěžků fyzikálních hydrolýz je znázorněno v Grafech 2 až 5.

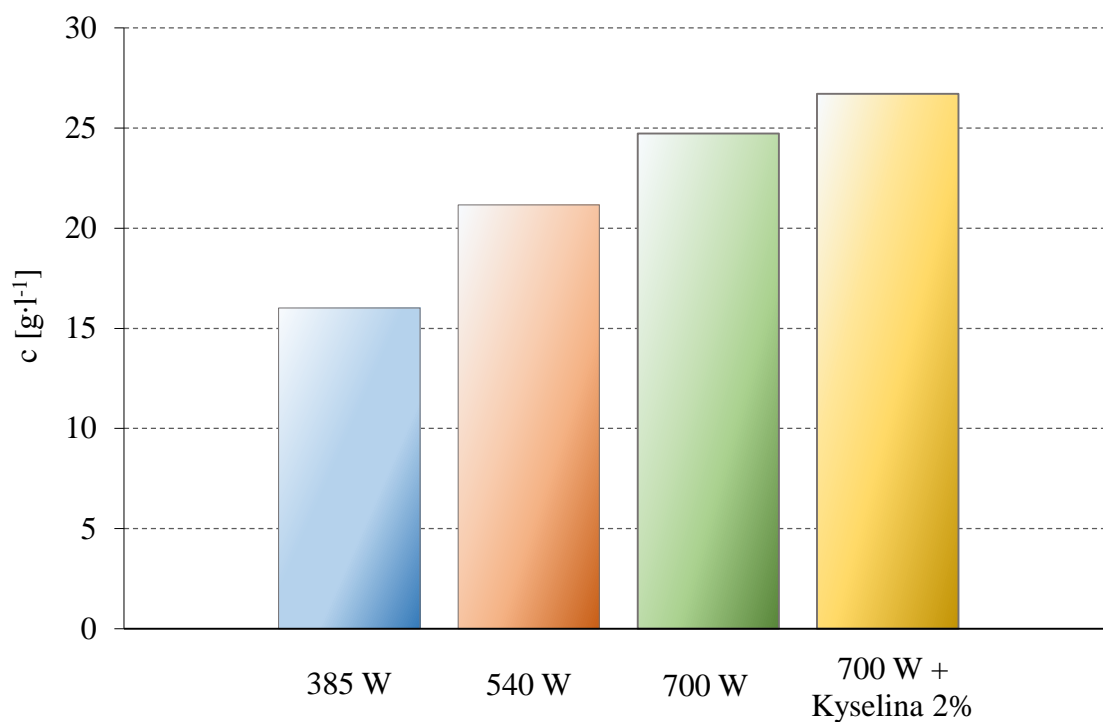
**Graf 2:** Výtěžky hydrolýz zvýšenou teplotou



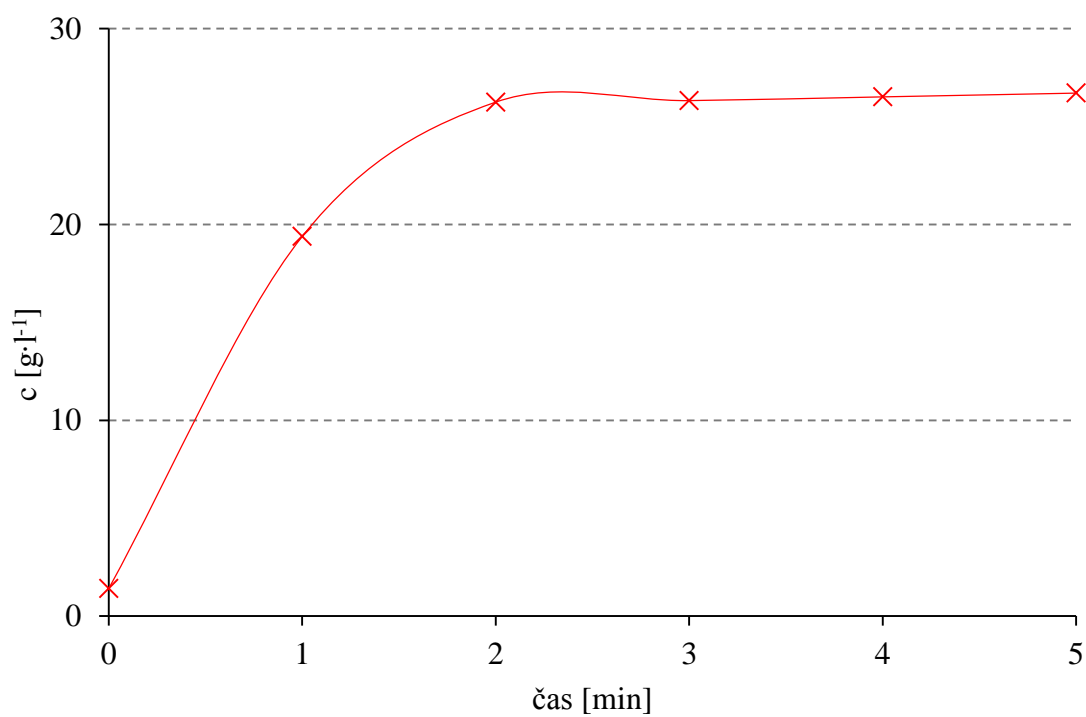
**Graf 3:** Výtěžky hydrolýz v tlakovém hrnci a hydrolýzy ultrazvukem



**Graf 4:** Výtěžky hydrolyz mikrovlnami



**Graf 5:** Časová závislost koncentrace redukujících sacharidů na době působení mikrovln s 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>



Srovnáním hydrolyz pomocí zvýšené teploty byly zjištěny vyšší výtěžky u hydrolyzy vodní lázni o 100 °C. Jak je vidět v Grafu č. 3, hydrolyza v tlakovém hrnci nebyla o moc účinnější než hydrolyza samotnou zvýšenou teplotou, a to ani v kombinaci s 2% kyselinou sírovou. Tedy lze předpokládat, že teplota vyšší než 100 °C už neovlivní výtěžek hydrolyzy, jelikož v tlakovém hrnci je teplota vyšší, ale zároveň zde nebyl zjištěn vyšší výtěžek. Hydrolyza pomocí ultrazvuku se při době působení 30 minut prokázala jako neúčinná.

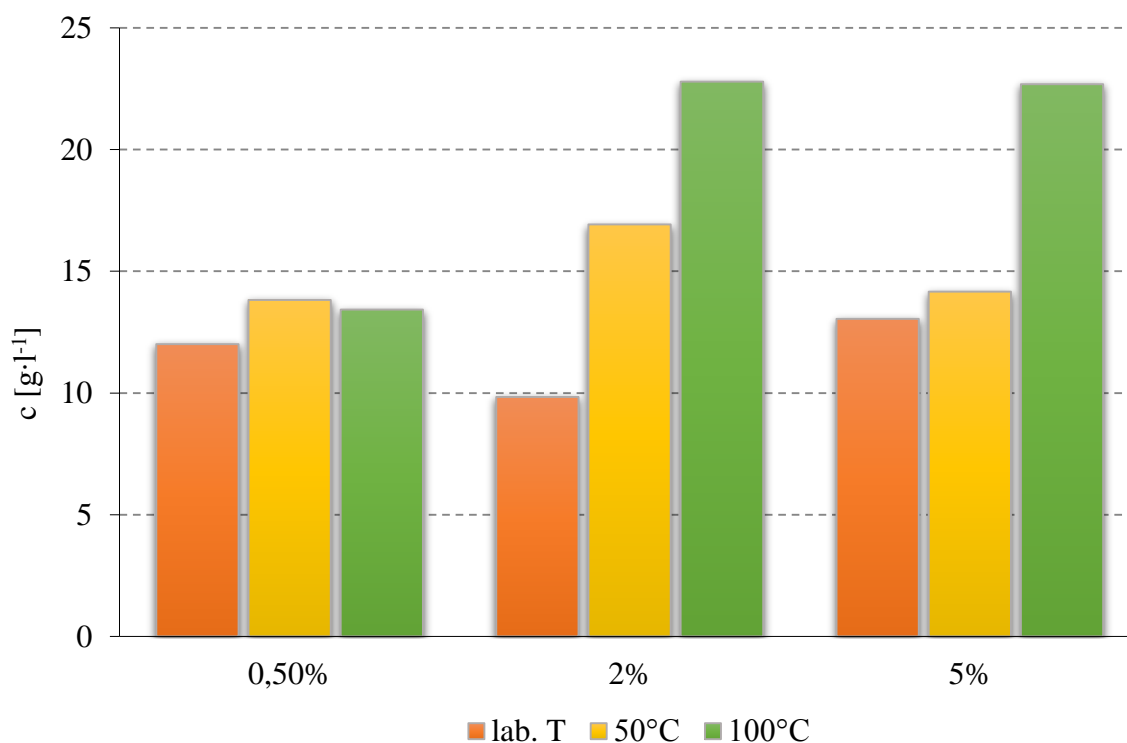
Pro porovnání různých stupňů výkonu mikrovlnné trouby byla zvolena doba působení 5 minut. V Grafu 4 jsou znázorněny výtěžky hydrolyz při třech různých stupních výkonu, kde nejvyšší výkon 700 W poskytl i nejvyšší výtěžek redukcí sacharidů.

Pro zjištění dostačující doby působení mikrovln pro hydrolyzu byla sledována časová závislost koncentrace redukcí sacharidů, která měla prudký nárůst během první minuty mikrovlnné hydrolyzy a po 3. minutě již byla konstantní. Tuto závislost zachycuje Graf 5.

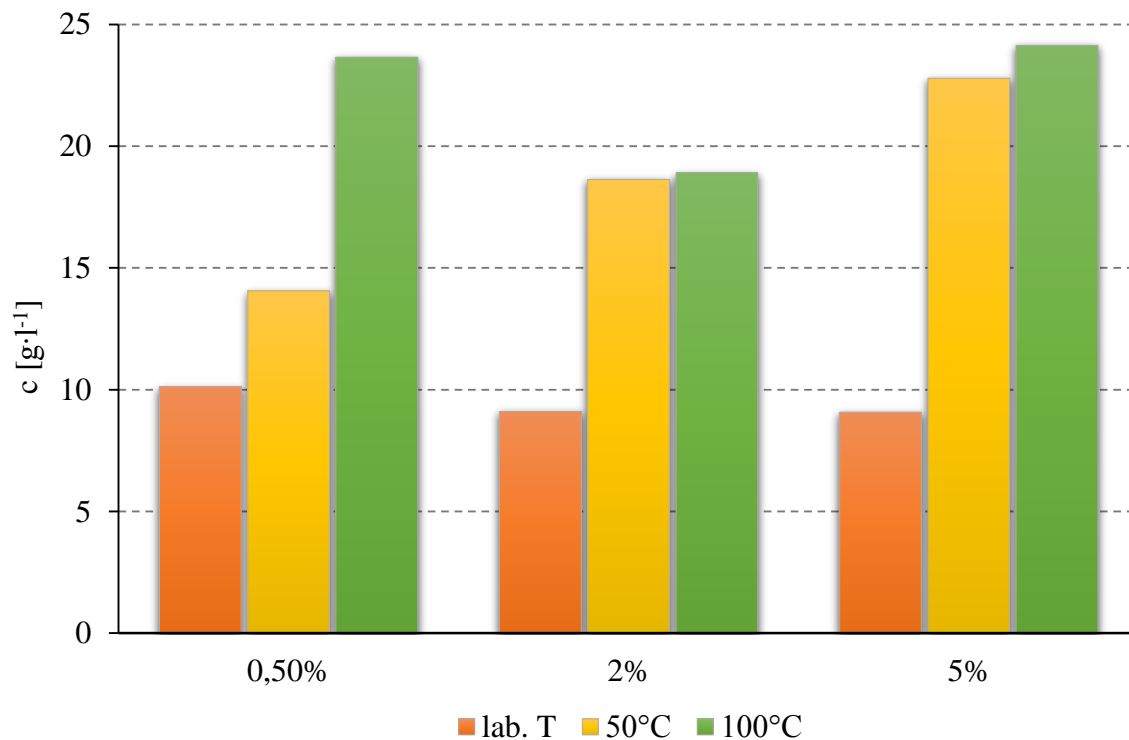
#### 4.5 Chemická hydrolyza

Podle postupů v kapitole 3.9 byly provedeny chemické hydrolyzy pomocí tří kyselin a dvou hydroxidů. Pro stanovení výtěžku hydrolyzy byla použita metoda dle Somogyi-Nelsona (kapitola 3.11), a to vždy z rozdílu počáteční hodnoty obsahu redukcí sacharidů a hodnoty redukcí sacharidů po hydrolyze. Pro výpočet koncentrace redukcí sacharidů byla použita kalibrační křivka glukózy (kapitola 4.3). Porovnání výtěžků chemických hydrolyz je znázorněno v Grafech 6 až 9.

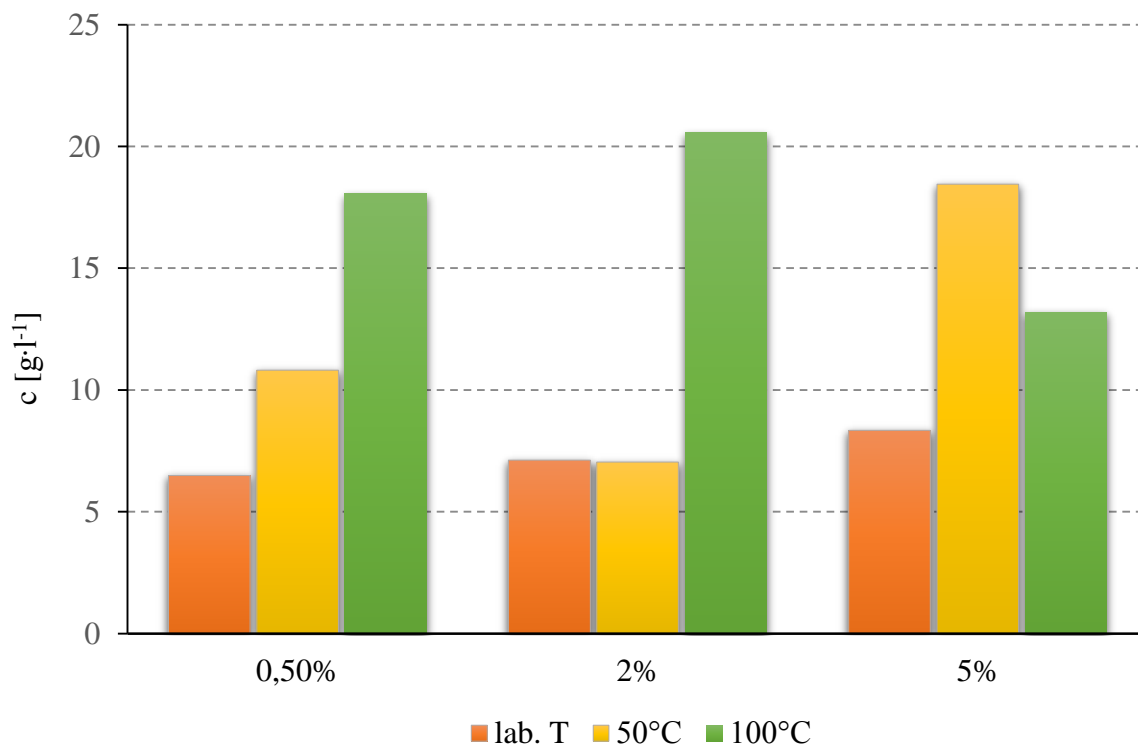
**Graf 6:** Výtěžky hydrolyz kyselinou sírovou o třech koncentracích a třech teplotách



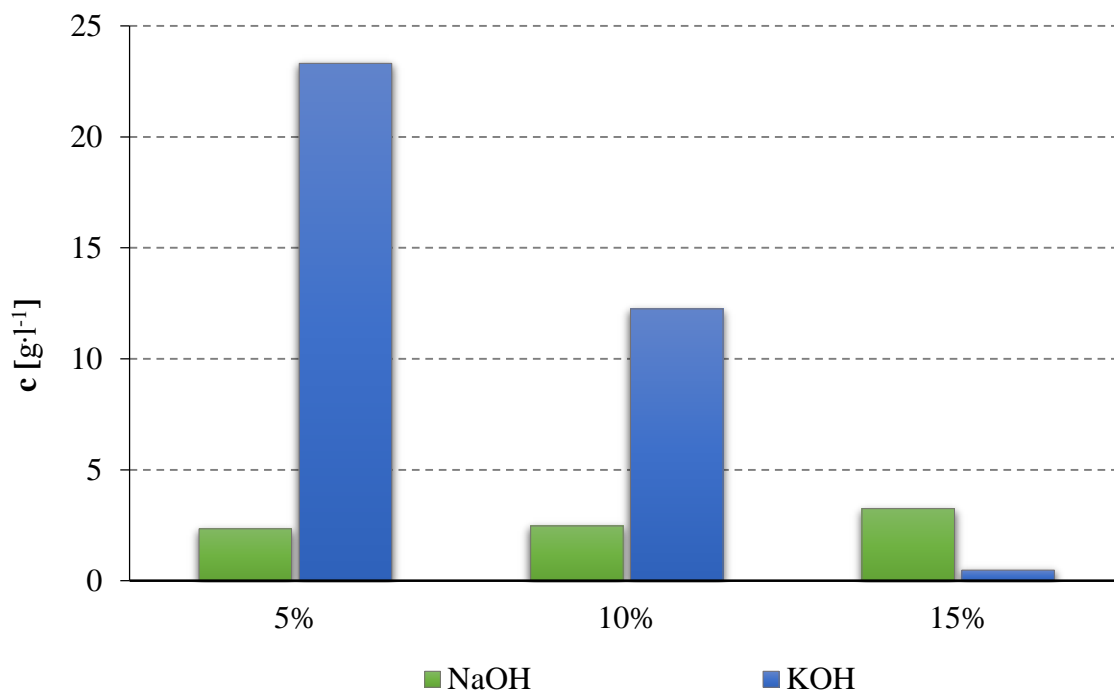
**Graf 7:** Výtěžky hydrolyz kyselinou dusičnou při třech koncentracích a třech teplotách



**Graf 8:** Výtěžky hydrolyz kyselinou fosforečnou při třech teplotách a třech koncentracích



**Graf 9:** Výtěžky alkalických hydrolyz při 100 °C



V Grafu 6 je znázorněno srovnání výtěžku hydrolyz pomocí kyseliny sírové o různých koncentracích. Je patrné, že jako nejúspěšnější se prokázala hydrolyza při teplotě 100 °C, a to při koncentraci kyseliny sírové 2 % a 5 %, kde je výtěžek srovnatelně vysoký. Lze také konstatovat, že na kyselinu o koncentraci 0,5 % nemá teplota významný vliv, protože výtěžky u všech teplot jsou srovnatelné.

Jak je znázorněno v Grafu 7, kyselina dusičná se prokázala jako nejúspěšnější také při teplotě 100 °C, kdy již při nízké koncentraci dosáhla hydrolyza vysokého výtěžku. Vyšší výtěžek byl ale dle očekávání u 5% kyseliny dusičné. Při porovnání teplot je u 100 °C patrné jen mírné zvýšení výtěžku hydrolyzy oproti 50 °C. Laboratorní teplota měla u všech tří koncentrací srovnatelné nevelké výtěžky.

V Grafu 8 je znázorněna účinnost hydrolyzy kyselinou fosforečnou. Kyselina fosforečná se jako nejúspěšnější prokázala při kombinaci nižších koncentrací – 0,5 % a 2 %, a vyšší teploty – 100 °C. Při koncentraci 5% byla vhodnější teplota 50°C. Laboratorní teplota neměla na hydrolyzu velký vliv, výtěžky jsou srovnatelné u všech tří koncentrací.

U alkalické hydrolyzy znázorněné v Grafu 9 je patrná závislost klesajícího výtěžku hydrolyzy na zvyšující se koncentraci hydroxidu draselného, kde 5% hydroxid draselný poskytl nejvyšší výtěžek. U hydroxidu sodného proběhla hydrolyza bez většího efektu, výtěžky byly nízké a srovnatelné u všech použitých koncentrací. Vyšší koncentrace použitého hydroxidu draselného měla negativní efekt, krom degradace materiálu pravděpodobně i degradaci vznikajících cukrů.

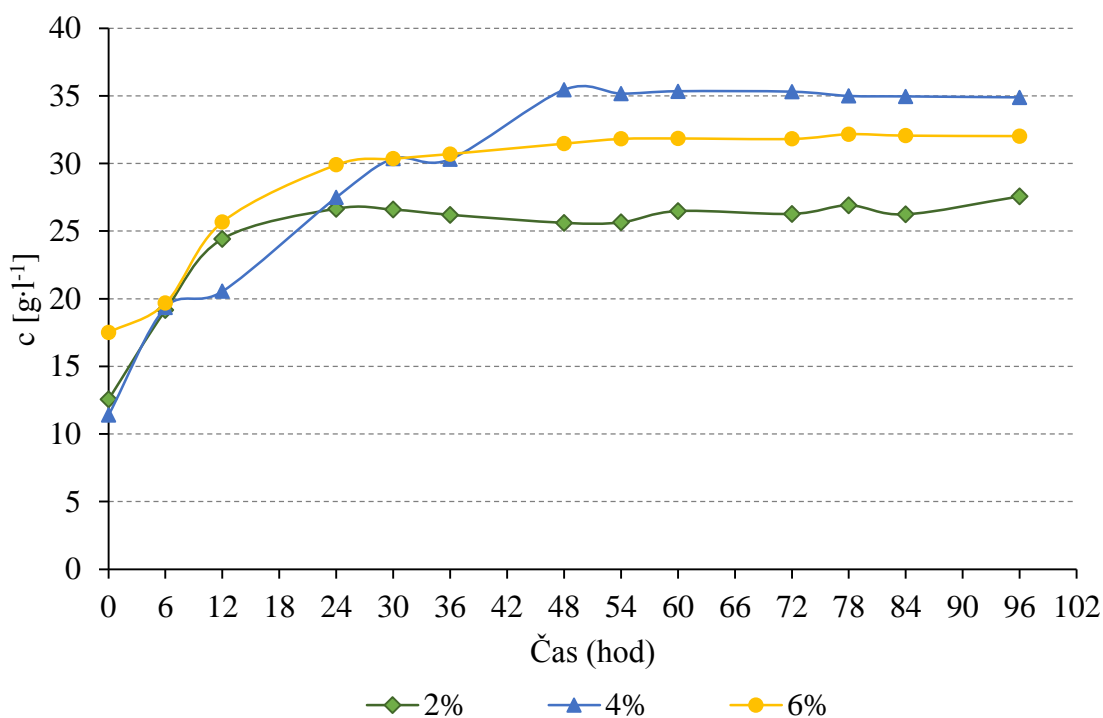
## 4.6 Enzymatická hydrolýza

Podle postupů v kapitole 3.9.4 byly provedeny enzymatické hydrolýzy pomocí dvou enzymů a také jejich kombinace. Podmínky hydrolýz byly zvoleny na základě pH optima a teplotního optima daných enzymů a byly dále optimalizovány. Pro stanovení konečného výtěžku hydrolýzy byla použita metoda dle Somogyi-Nelsona (kapitola 3.11). Pro výpočet koncentrace redukujících sacharidů byla použita kalibrační křivka glukózy (kapitola 4.3).

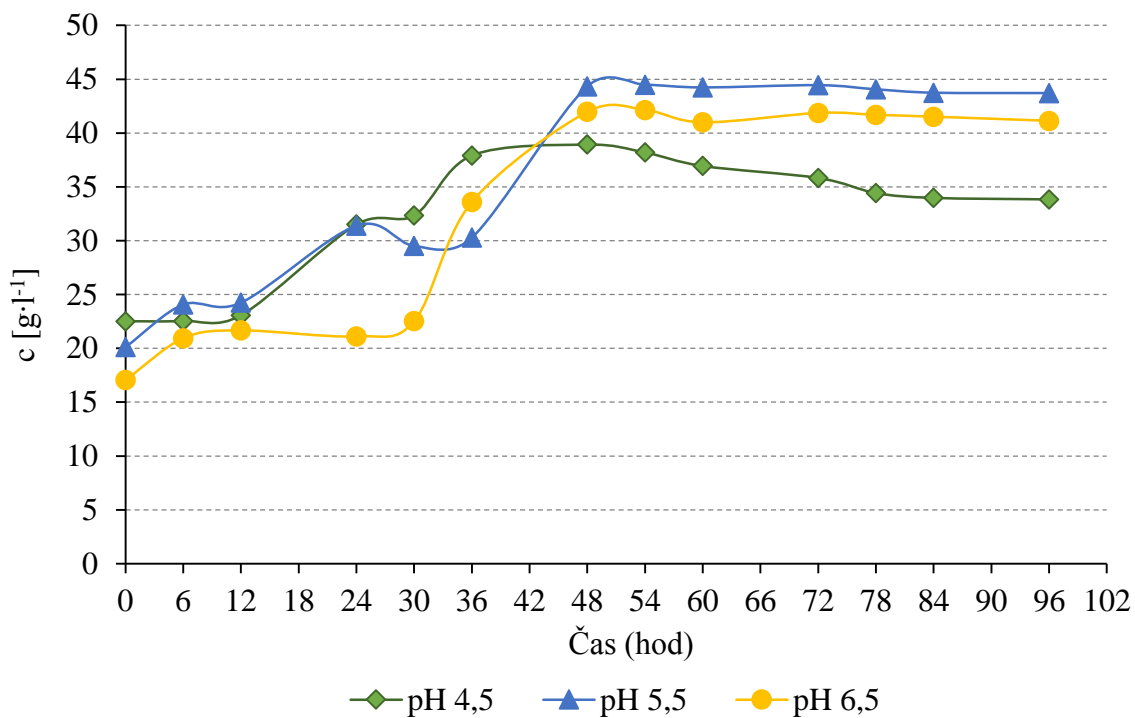
Doba trvání hydrolýzy byla při použití celulázového komplexu a při kombinaci enzymů 96 hodin, vzorky pro stanovení redukujících sacharidů byly odebírány vždy před počátkem hydrolýzy a následně každých 6 hodin. Při použité enzymu  $\beta$ -glukosidázy byla doba trvání hydrolýzy 51 hodin a vzorky byly odebírány každé 3 hodiny.

Časová závislost enzymatických hydrolýz je znázorněna v Grafech 10 až 17.

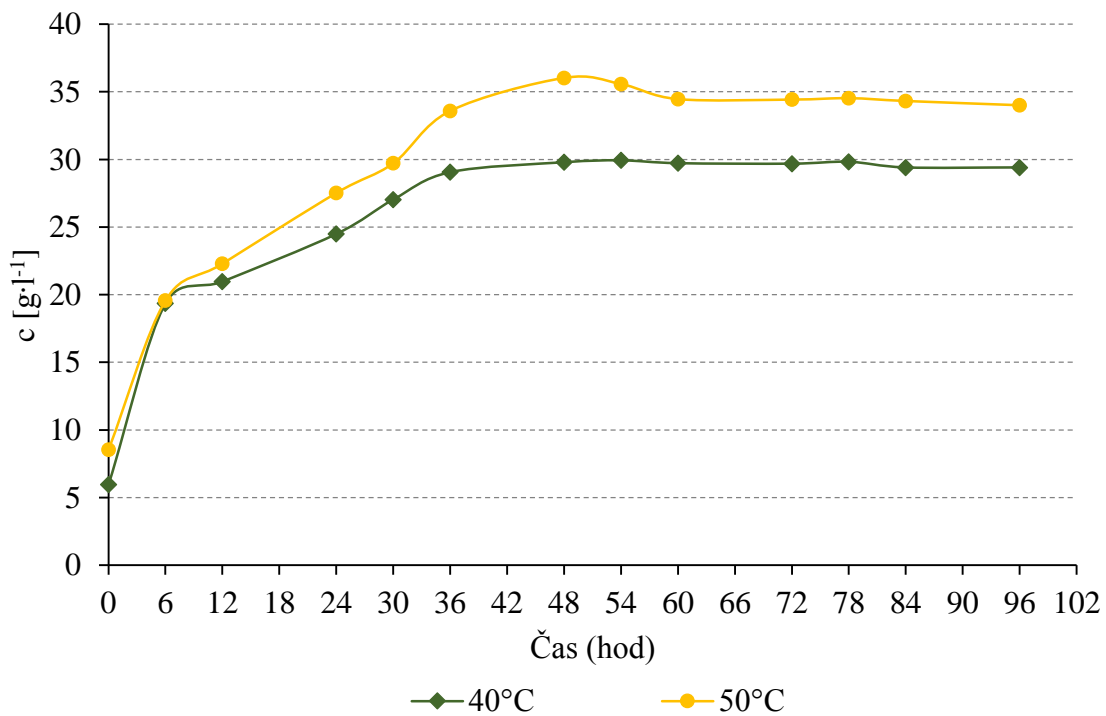
**Graf 10:** Průběh hydrolýz pomocí celulázového komplexu, 3 různé koncentrace při  $pH = 5$ ,  $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$



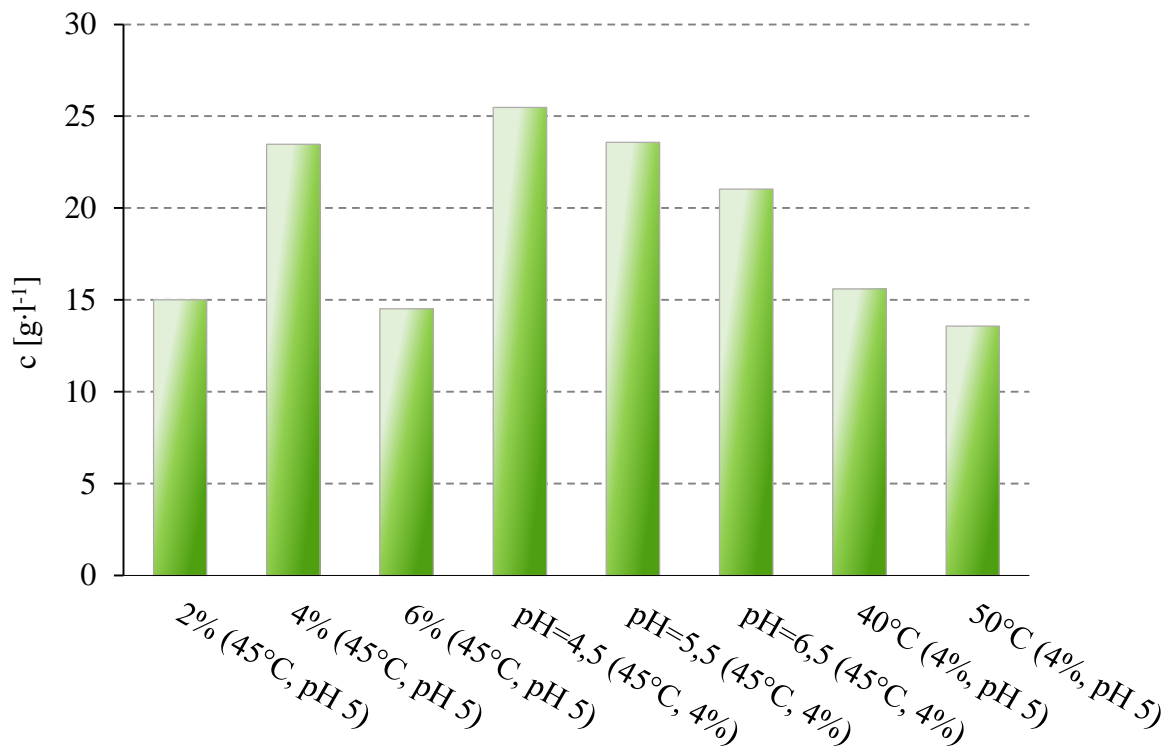
**Graf 11:** Průběh hydrolyzy pomocí celulóзовého komplexu, 3 různá pH, při  $c = 4\%$ ,  $T = 45\text{ }^\circ\text{C}$



**Graf 12:** Průběh hydrolyzy pomocí celulóзовého komplexu, 3 různé teploty, při  $\text{pH} = 5$

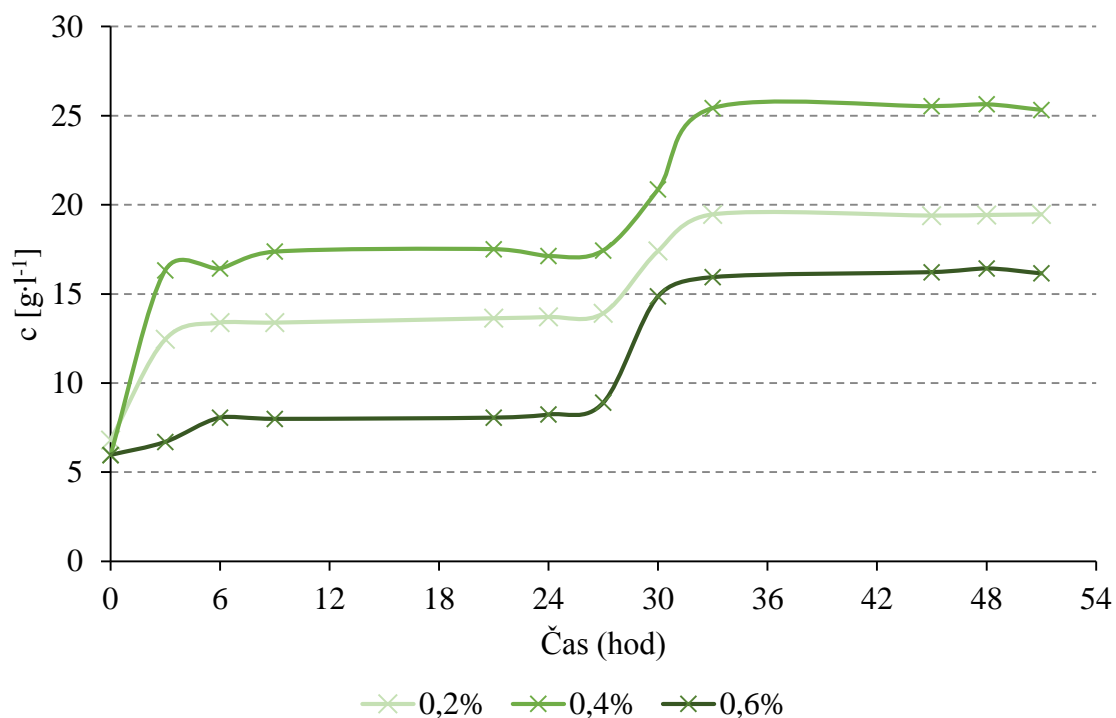


**Graf 13:** Srovnání výtěžků všech hydrolyz pomocí celulázového komplexu

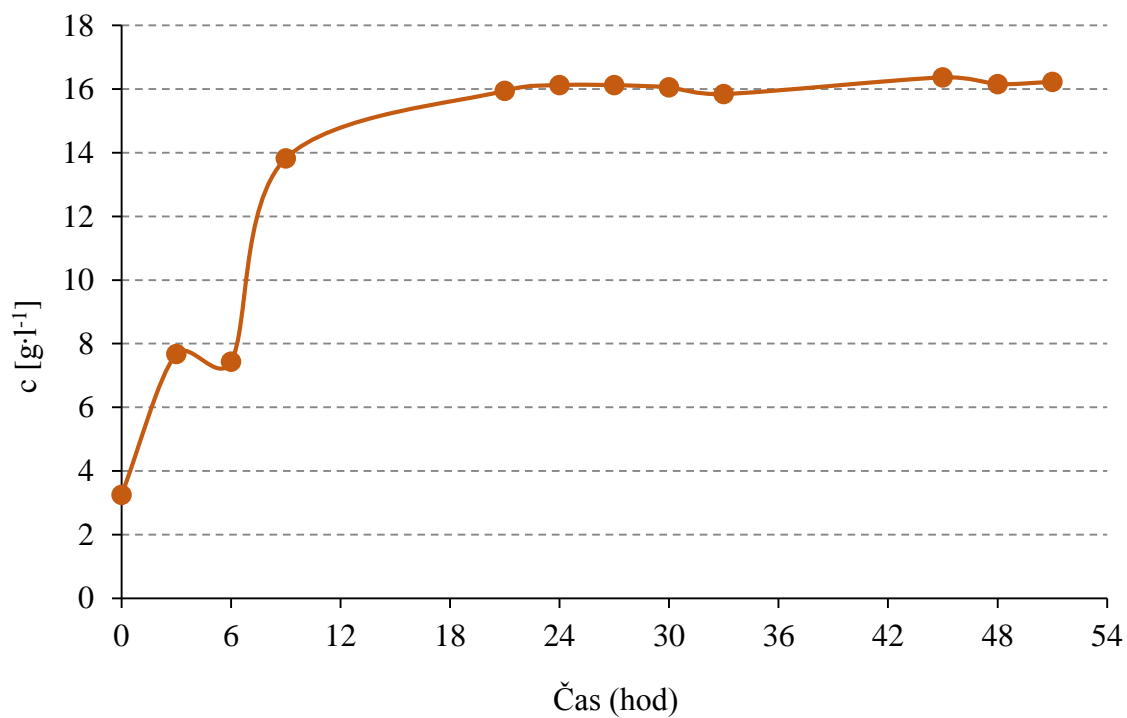


Pro přehledné znázornění byl vytvořen Graf 13, kde jsou srovnány výtěžky jednotlivých hydrolyz pomocí celulázového komplexu. Výtěžky jsou zpracovány jako rozdíl konečné a počáteční koncentrace redukujících sacharidů v substrátu. Jako nejvhodnější koncentrace z trojice stanovených se jeví koncentrace 4 %, a jako nejvhodnější pH pro hydrolyzu bylo zjištěno pH = 4,5.

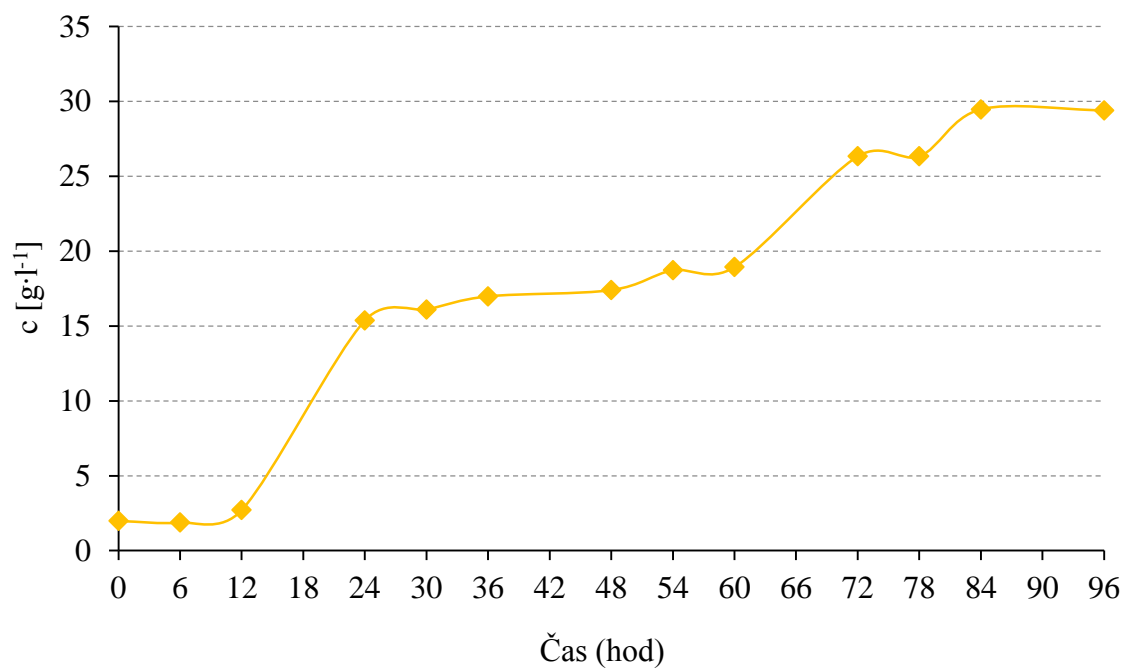
**Graf 14:** Hydrolyza pomocí  $\beta$ -glukosidázy, tři různé koncentrace při  $pH = 5$  a  $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$



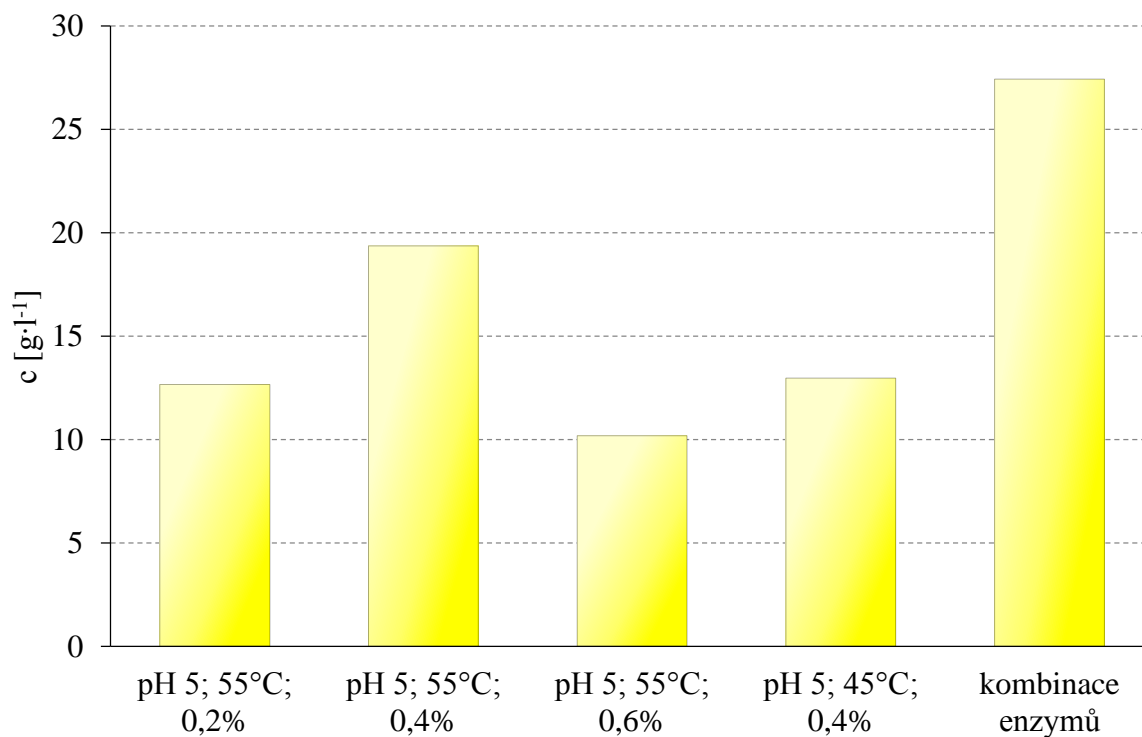
**Graf 15:** Hydrolyza pomocí  $\beta$ -glukosidázy o  $c = 0,4\%$ ,  $pH = 5$ ,  $T = 45\text{ }^\circ\text{C}$



**Graf 16:** Hydrolyza pomocí kombinace enzymů, při  $pH = 4,5$  a  $T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$



**Graf 17:** Srovnání výtěžků všech hydrolyz pomocí  $\beta$ -glukosidázy



V Grafu 16 je opět znázorněno přehledné porovnání výtěžků hydrolýz pomocí  $\beta$ -glukosidázy a také pomocí kombinace enzymů. Jako nejvhodnější koncentrace pro hydrolýzu se u  $\beta$ -glukosidázy prokázala koncentrace 0,4 %. Teplota 55 °C se jevila jako vhodnější v porovnání s 45 °C, nicméně pro hydrolýzu kombinací enzymů byla zvolena teplota 45 °C z důvodu optima celulóзовého komplexu zjištěného v předchozích hydrolýzách (Graf 13). Jako nejvhodnější pH u hydrolýzy  $\beta$ -glukosidázou se také potvrdilo pH = 4,5, stejně, jako v případě hydrolýzy celulóзовým komplexem, proto bylo toto pH zvoleno i při kombinaci enzymů.

Hydrolýza kombinací enzymů poskytla dle očekávání nejvyšší výtěžky z celé série enzymatických hydrolýz, a to  $27,4241 \pm 0,0007 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 4.7 Mikrobiální produkce enzymů

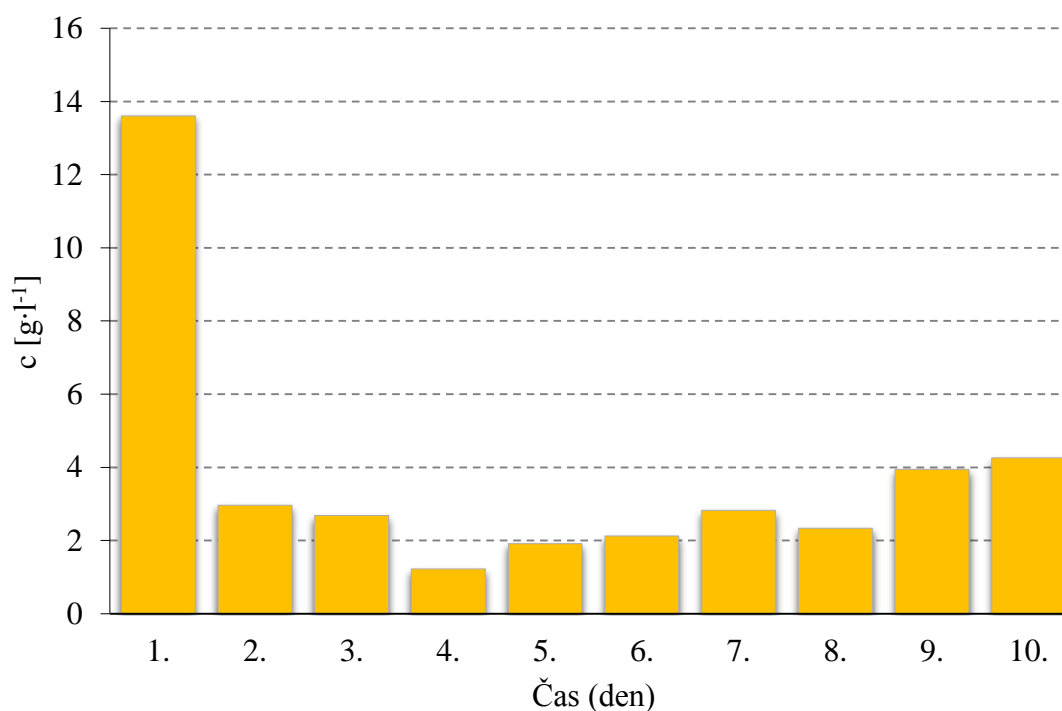
### 4.7.1 Stanovení počtu spor

V inokulu připraveném dle postupu v kapitole 3.10.1 byl mikroskopicky zjištěn počet spor v 1 ml kultury počítáním na Bürkerově komůrce. Počet spor byl stanoven na  $7,84 \cdot 10^6$  v ml.

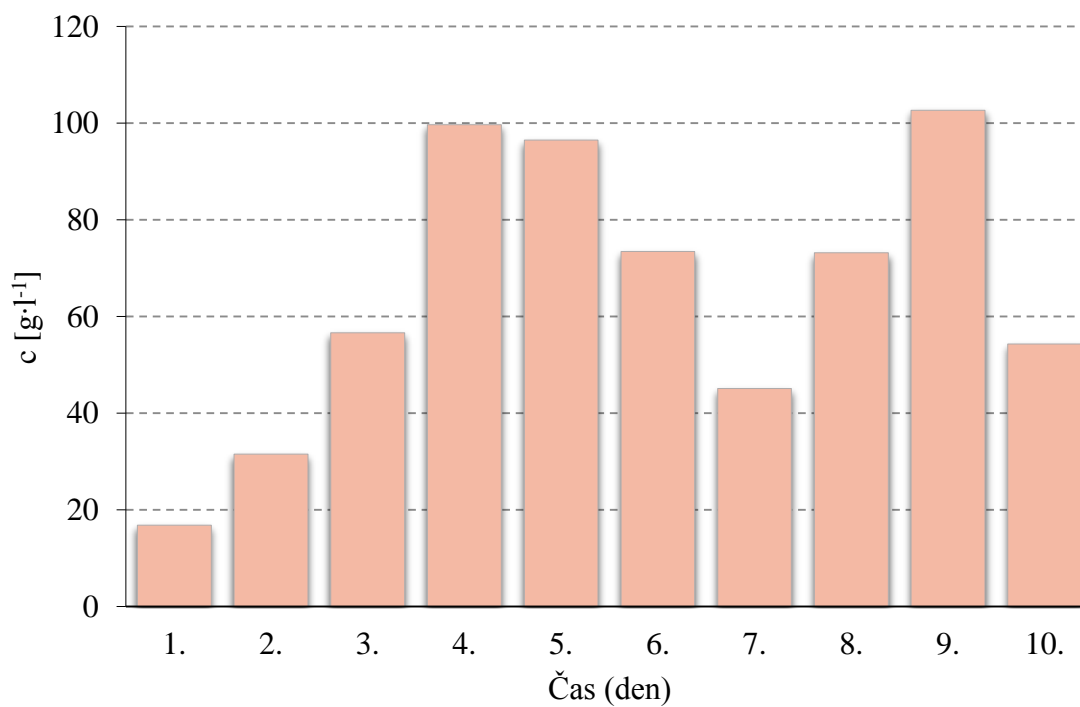
### 4.7.2 Aktivita enzymů a obsah redukujících sacharidů

U plísně *Aspergillus niger* byla po dobu 10 dní kultivace sledována produkce pektolytických a celulólytických enzymů a také obsah redukujících sacharidů v substrátu. Pozorování jsou znázorněna v Grafech 18 až 20.

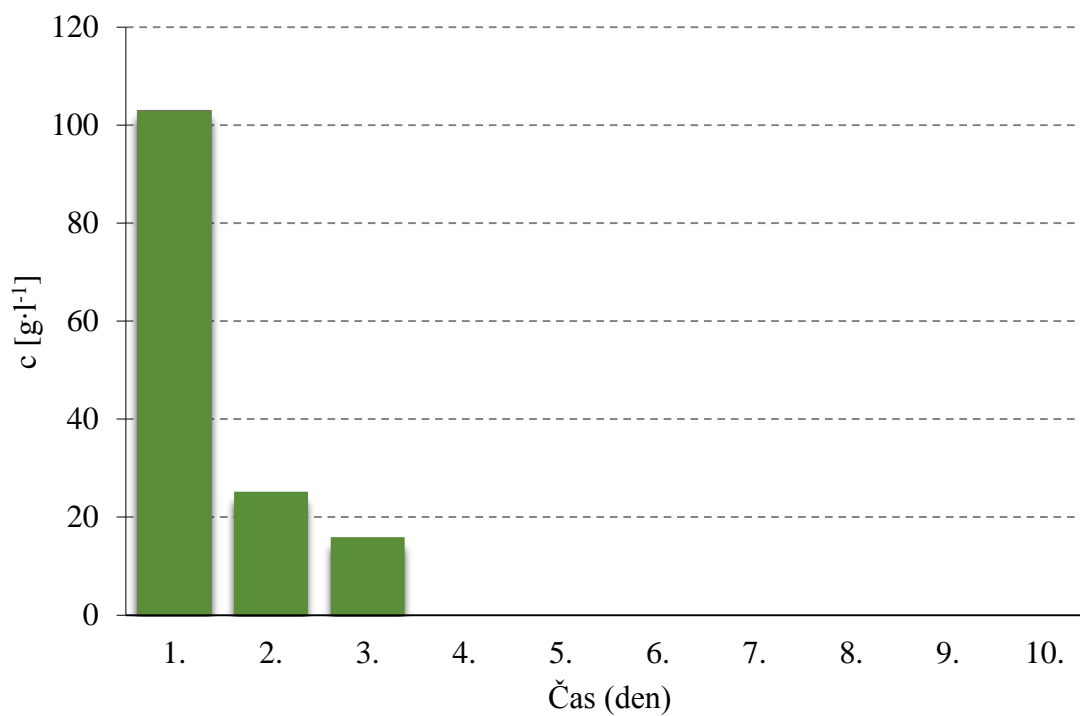
**Graf 18:** Sledování obsahu redukujících sacharidů v průběhu SSF kultivace *A. niger*



**Graf 19:** Aktivita celulózy v průběhu SSF kultivace



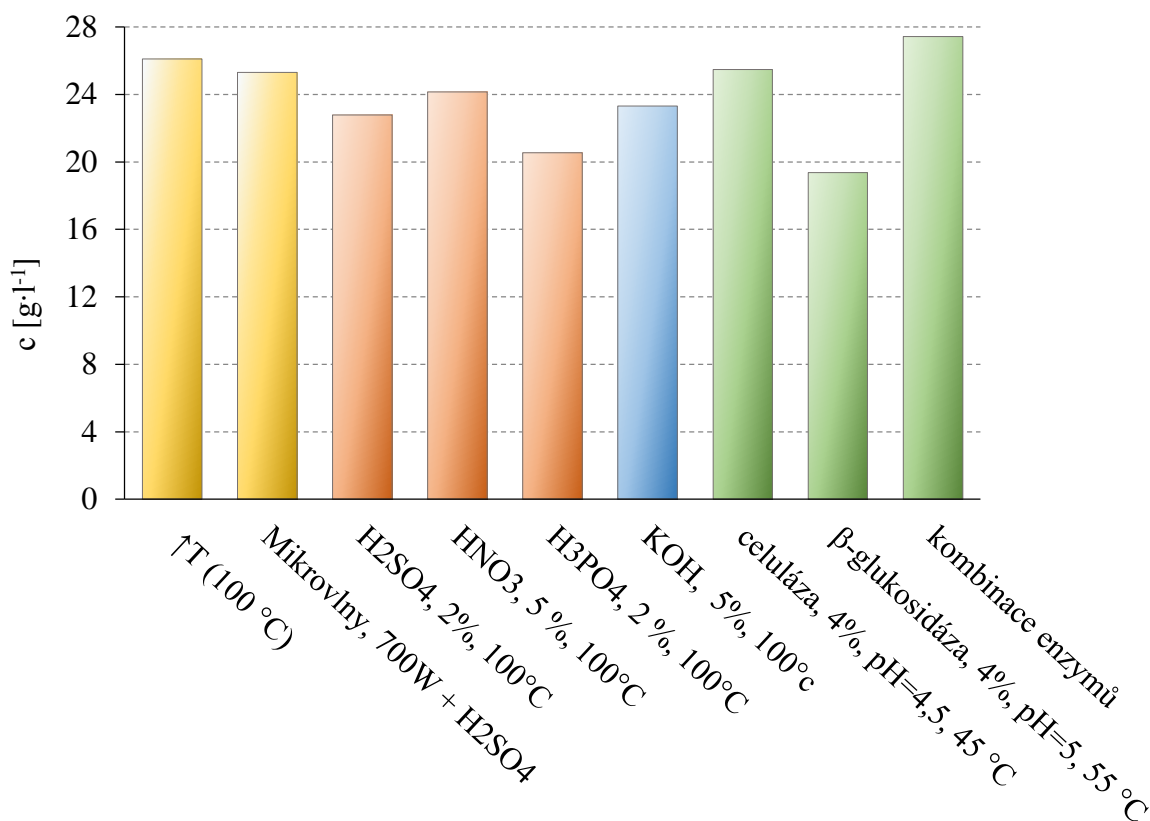
**Graf 20:** Aktivita pektinázy v průběhu SSF kultivace



Během desetidenní kultivace metodou SSF byla sledována produkce enzymů degradující polysacharidy v odpadních slupkách, a to celulózy a pektinázy, konkrétně polygalakturonázy. Dále bylo během kultivace sledováno množství redukujících sacharidů v substrátu. Produkce celulózy byla detekována po celou dobu trvání kultivace, kdežto produkce pektinázy pouze v prvních třech dnech. Aktivita celulózy v prvních dnech nejdříve pravidelně rostla, od pátého dne byla její aktivita proměnná. Aktivita pektinázy pozvolně klesala až do zastavení produkce. Důvodem zastavení produkce pektinázy může být dokončení hydrolýzy pektinu již do třetího dne kultivace či produkce dalších enzymů.

V Grafu 18 je nejdříve v prvním dni kultivace patrný vysoký obsah redukujících sacharidů, který potvrzuje degradaci materiálu produkovanými enzymy, nicméně v následujících dnech obsah redukujících sacharidů pozvolna klesá, tedy byly sacharidy spotřebovány mikroorganismem na svůj růst.

**Graf 21:** Celkové porovnání výtěžků nejlepších hydrolýz



V Grafu 21 je znázorněno porovnání nejlepších hydrolýz z jednotlivých skupin metod předúprav. Z fyzikálních metod, které jsou zde znázorněny žlutě, byla vybrána hydrolýza zvýšenou teplotou (100 °C) a mikrovlny o nejvyšším stupni intenzity v kombinaci s kyselinou sírovou. Z kyselých hydrolýz byly vybrány nejlepší parametry pro každou z kyselin – u všech kyselin se jedná o hydrolýzu při 100 °C, koncentrace byla u kyseliny sírové a fosforečné nejúčinnější 2 %, u kyseliny dusičné 5 %. Kyselé hydrolýzy jsou znázorněny červeně. Modře je znázorněna jediná účinná alkalická hydrolýza, a to KOH o koncentraci 5 %. Zeleně jsou znázorněny nejúspěšnější enzymatické hydrolýzy pro každý z enzymů. Koncentrace enzymů při těchto hydrolýzách byly poté použity pro hydrolýzu kombinací enzymů, která měla nejvyšší výtěžek zkvasitelných sacharidů, a to  $27,4241 \pm 0,0007 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 5 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo studium různých metod předúprav polysacharidového odpadního materiálu a zvolení nejúčinnější metody za účelem maximalizace jednoduchých sacharidů. Jako substrát byly zvoleny odpadní pomerančové slupky. Experimentální část práce sestávala z optimalizace parametrů zvolených hydrolyz (fyzikální, chemické, enzymatické). Výtěžky redukujících sacharidů byly stanoveny spektrofotometricky, metodou dle Somogyi-Nelsona.

Z fyzikálních hydrolyz byly použity metody zvýšené teploty, mikrovln, tlakového hrnce a ultrazvuku, z chemických hydrolyz to byly metody kyselé a alkalické. Byly použity kyseliny sírová, dusičná, a fosforečná, a hydroxid sodný a draselný. Enzymatická hydrolyza byla prováděna pomocí enzymů od firmy *Novozymes*® *NS50013* a *NS50010*. Byly optimalizovány podmínky pro každý enzym a následně aplikovány i na kombinaci obou uvedených enzymů.

Před uvedenými hydrolyzami byla z odpadního materiálu připravena vždy obdobná 25% w/v suspenze materiálu ve vodě, který byl předtím několik minut homogenizován v mixéru na částičky o velikosti 0,3–0,9 cm. Před každou hydrolyzou byl odebrán vzorek pro stanovení počáteční koncentrace redukujících sacharidů, všechny výtěžky byly následně spočítány jako rozdíl konečné a počáteční koncentrace redukujících sacharidů. Potravinový odpad byl před započítáním hydrolyz charakterizován stanovením sušiny, vlákniny a celulózy. Obsah sušiny v původním odpadu byl stanoven na  $22,6 \pm 0,2$  %. Obsah vlákniny v původním odpadu tvořil  $65 \pm 2$  % a obsah celulózy v původním odpadu byl stanoven na  $13,1 \pm 0,6$  %. Celulóza byla následně stanovena i po proběhnuté nejúspěšnější hydrolyze. Obsah celulózy po této hydrolyze činil  $2,58 \pm 0,06$  %.

Jako nejlepší metoda předúpravy se z fyzikálních hydrolyz prokázala metoda zvýšenou teplotou, a to 100 °C. Výtěžky redukujících sacharidů činily po hydrolyze  $26,103 \pm 0,002$  g·l<sup>-1</sup>. Z kyselých metod předúprav byla nejlepší kyselina dusičná, a to při teplotě 100 °C a koncentraci 5 %. Výtěžek po hydrolyze byl stanoven na  $24,1424 \pm 0,0019$  g·l<sup>-1</sup>.

Enzymatická hydrolyza kombinací obou enzymů byla nejúspěšnější ze všech studovaných hydrolyz. Optimalizací procesu byly zjištěny nejvhodnější koncentrace enzymů, a to 4 % pro celulázový komplex a 0,4 % pro enzym  $\beta$ -glukosidázu. Průběh hydrolyzy byl z hlediska pH nejúčinnější při pH = 4,5 a teplotní optimum bylo zjištěno 45 °C. Při těchto parametrech poskytla enzymatická hydrolyza výtěžek redukujících sacharidů  $27,4241 \pm 0,0007$  g·l<sup>-1</sup>.

Jako doplněk byla sledována produkce enzymů metodou stacionární kultivace (SSF) na daném odpadním materiálu, a to za použití kmene *Aspergillus niger*. Během desetidenní kultivace byly odebírány vzorky pro stanovení celulózy, pektinázy a obsahu redukujících sacharidů. Oba enzymy byly detekovány, pektináza pouze po dobu prvních tří dnů. Bylo zjištěno, že tento odpadní materiál je vhodný pro produkci enzymů. Předmětem dalšího studia by mohla být izolace vyprodukovaných enzymů a jejich použití na další hydrolyzy.

Enzymatická hydrolyza se sice prokázala jako ta, která přináší nejvyšší výtěžky redukujících sacharidů, avšak její nevýhodou může být pořizovací cena enzymů a poměrně dlouhá doba procesu. Fyzikální a kyselé hydrolyzy se ukázaly taktéž jako poměrně účinné, ale problémem

by v praxi mohla být odpadní voda a vznik nežádoucích vedlejších produktů, které u enzymatické hydrolýzy nepozorujeme. V praxi se v posledních letech začíná uplatňovat způsob hydrolýzy mikrovlnami o nízké intenzitě a vysoké teplotě, nebo způsob simultánní sacharifikace a fermentace jak na slupkách z pomerančů, tak mandarinek. Potravinový odpad je díky nižšímu obsahu ligninu, a tedy snazší dostupnosti sacharidů vhodným budoucím substrátem pro produkci hodnotných produktů a biopaliv, a mohl by nahradit méně výnosné lignocelulózové materiály.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ŠOOŠ, Lubomír, Milan KOLEJÁK a František URBAN. *Biomasa - obnovitelný zdroj energie*. 1. vyd. Bratislava: VERT, 2012. Edícia vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-970957-3-4.
- [2] LIN, Carol Sze Ki, Apostolis A. KOUTINAS, Katerina STAMATELATOU et al. Current and future trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: a global perspective. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2014, **8**(5), 686-715. DOI: 10.1002/bbb.1506. ISSN 1932104x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bbb.1506>
- [3] OCHODEK, Tadeáš. *Možnosti energetického využití biomasy: sborník příspěvků ze semináře : Penzion Beskydy, Visalaje 27.-29.4.2005*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita, 2005. ISBN 80-248-0834-X.
- [4] *Možnosti energetického využití biomasy: sborník příspěvků ze semináře : Penzion Beskydy, Visalaje 27.-29.4.2005*. Ostrava: VŠB - Technická univerzita, 2005. ISBN 80-248-0834-X.
- [5] TRÁVNÍČEK, Petr. *Technologie zpracování biomasy za účelem energetického využití*. Vyd. 1. Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2015. ISBN 978-80-7509-206-9.
- [6] MONIER, Véronique et al. *Preparatory study on food waste across EU 27*. S.l.: European Commission, 2010. ISBN 978-927-9221-385.
- [7] BOTELLA, C., I. de ORY, C. WEBB, D. CANTERO a A. BLANDINO Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, **26**(2-3), 100-106. DOI: 10.1016/j.bej.2005.04.020. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X0500104X>
- [8] PFALTZGRAFF, Lucie. *The study & development of an integrated & additive-free waste orange peel biorefinery*. York, 2014. Dostupné také z: <http://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/7605>. PhD thesis. University of York.
- [9] GROHMANN, K. a E.A. BALDWIN Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. *Biotechnology letters*. Florida, 1992, **14**(12), 1169-1174.
- [10] BOLUDA-AGUILAR, María, Lidia GARCÍA-VIDAL, Fayiny del Pilar GONZÁLEZ-CASTAÑEDA a Antonio LÓPEZ-GÓMEZ. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2010, **101**(10), 3506-3513. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.063. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409017283>

- [11] JARRELL, Allison. Squeezing Oranges to Reduce Waste. In: *Inside Science News Service* [online]. Maryland, 2012 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <https://www.insidescience.org/content/squeezing-oranges-reduce-waste/732>
- [12] LIN, Carol Sze Ki, Lucie A. PFALTZGRAFF, Lorenzo HERRERO-DAVILA et al.. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science* [online]. 2013, **6**(2), 426-464 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1039/c2ee23440h. ISSN 1754-5692. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2ee23440h>
- [13] KEFFORD, J a B CHANDLER. *The chemical constituents of citrus fruits*. New York: Academic Press, 1970. ISBN 0120164620.
- [14] VALÍČEK, Pavel. *Užitkové rostliny tropů a subtropů*. Vyd. 2., upr. a dopl. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0939-6.
- [15] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Vyd. 1. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [16] Gewinnspiel: Natürliche Orangen. *Green Family* [online]. 2015 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.greenfamily.de/gewinnspiel-natuerliche-orangen/>
- [17] CHO, Sungsoo, Leon PROSKY a Mark L DREHER. *Complex carbohydrates in foods*. New York: M. Dekker, 1999. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 93. ISBN 0-8247-0187-9.
- [18] LAVOINE, Nathalie, Isabelle DESLOGES, Alain DUFRESNE a Julien BRAS. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. In: *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, **90**(2), s. 735-764 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.026. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014486171200447X>
- [19] ČOPIKOVÁ, Jana. *Chemie a analytika sacharidů*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0306-1.
- [20] LEHNINGER, Albert L, David L NELSON a Michael M COX. *Lehninger principles of biochemistry*. 6th ed. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 978-1-4292-3414-6.
- [21] HELD, Paul. Enzymatic Digestion of Polysaccharides Part II: Optimization of Polymer Digestion and Glucose Production in Microplates. *BioTek Instruments, Inc.* [online]. 2012 [cit. 2016-03-25]. Dostupné z: <http://www.biotek.com/resources/articles/enzymatic-digestion-of-polysaccharides-2.html>
- [22] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vyd. Praha: Powerprint, 2012. ISBN 978-80-87415-53-5.

- [23] REECE, Jane B. *Campbell biology*. 9th ed. Boston: Pearson, 2011. ISBN 978-0-321-73975-9.
- [24] WEIMER, Paul J. Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster?. *Journal of Dairy Science*. 1996, **79**(8), 1496-1502. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76509-8. ISSN 00220302. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030296765098>
- [25] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [26] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin: výkladový slovník*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [27] DAVÍDEK, Jiří. *Chemie potravin*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986.
- [28] GÍRIO, F.M., C. FONSECA, F. CARVALHEIRO, L.C. DUARTE, S. MARQUES a R. BOGEL-LUKASIK Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, **101**(13), 4775-4800. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852410001744>
- [29] SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 2003, **30**(5), 279-291 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1007/s10295-003-0049-x. ISSN 1367-5435. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10295-003-0049-x>
- [30] DUTTA, Saikat, Sudipta DE, Basudeb SAHA a Md. Imteyaz ALAM. Advances in conversion of hemicellulosic biomass to furfural and upgrading to biofuels. *Catalysis Science*. 2012, **2**(10), 2025-2036. DOI: 10.1039/c2cy20235b. ISSN 2044-4753. Dostupné také z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cy20235b>
- [31] CHINIQUY, D., V. SHARMA, A. SCHULTINK et al. XAX1 from glycosyltransferase family 61 mediates xylosyltransfer to rice xylan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012, **109**(42), 17117-17122. DOI: 10.1073/pnas.1202079109. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1202079109>
- [32] EBRINGEROVÁ, Anna, Zdenka HROMÁDKOVÁ a Thomas HEINZE. Hemicellulose. *Polysaccharides I* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, s. 1 [cit. 2016-03-20]. DOI: 10.1007/b136816. ISBN 3-540-26112-5. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/b136816>
- [33] DUMITRIU, Severian. *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2005. ISBN 08-247-5480-8.
- [34] ŠARAPATKA, Bořivoj. *Pedologie a ochrana půdy*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-3736-1.

- [35] OPLETAL, Lubomír. *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1884-5.
- [36] GHANBARZADEH, Babak a Hadi ALMASI. Biodegradable Polymers. *Biodegradation - Life of Science*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/56230. ISBN 978-953-51-1154-2. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biodegradable-polymers>
- [37] KALACĚ, Pavel. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, 2001. ISBN 80-704-0520-1.
- [38] PAULOVÁ, L. Využití odpadních materiálů na bázi lignocelulózy jako suroviny pro výrobu bioetanolu. *CHEMAGAZÍN* [online]. 2010, **20**(5), 16-18 [cit. 2016-04-18].
- [39] SUN, Ye a Jiayang CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, **83**(1), 1-11. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>
- [40] ÖHGREN, Karin, Renata BURA, Gary LESNICKI, Jack SADDLER a Guido ZACCHI. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*. 2007, **42**(5), 834-839. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.02.003. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135951130700058X>
- [41] LIN, Zengxiang, He HUANG, Hongman ZHANG, Lin ZHANG, Lishi YAN a Jingwen CHEN. Ball Milling Pretreatment of Corn Stover for Enhancing the Efficiency of Enzymatic Hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, **162**(7), 1872-1880. DOI: 10.1007/s12010-010-8965-5. ISSN 0273-2289. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-010-8965-5>
- [42] HIDENO, Akihiro, Hiroyuki INOUE a Kenichiro TSUKAHARA. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(10), 2706-2711. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.12.057. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408011371>
- [43] TAHERZADEH, Mohammad J. a Keikhosro KARIMI. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, **9**(9), 1621-1651. DOI: 10.3390/ijms9091621. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/>
- [44] HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(1), 10-18. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. ISSN 09608524. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>

- [45] HAMPL, Bohuš a Ludmila ŠILHÁNKOVÁ. *Klíč k určování technicky důležitých plísní*. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1957.
- [46] BEGUIN, P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 1994, **13**(1), 25-58. DOI: 10.1016/0168-6445(94)90099-X. ISSN 01686445. Dostupné také z: [http://doi.wiley.com/10.1016/0168-6445\(94\)90099-X](http://doi.wiley.com/10.1016/0168-6445(94)90099-X)
- [47] JAYANI, Ranveer Singh, Shivalika SAXENA a Reena GUPTA. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*. 2005, **40**(9), 2931-2944. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.03.026. ISSN 13595113. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511305001765>
- [48] RATANAKHANOKCHAI, Khanok, Rattiya WAEONUKUL, Patthra PASON, Chakrit TACHAAPAIKOON, Khin LAY, Kazuo SAKKA, Akihiko KOSUGI a Yutaka MORI. Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. *Biomass Now - Cultivation and Utilization*. InTech, 2013. DOI: 10.5772/51820. ISBN 978-953-51-1106-1. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/paenibacillus-curdlanolyticus-strain-b-6-multienzyme-complex-a-novel-system-for-biomass-utilization>
- [49] PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 2003, **13**(2-3), 81-84. DOI: 10.1016/S1369-703X(02)00121-3. ISSN 1369703x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X02001213>
- [50] MANPREET, S, S SAWRAJ a D SACHIN. Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal Microbiology*. 2005, **1**(2), 1-9.
- [51] KUBÁTOVÁ, A. Miniatlás mikroorganismů: Aspergillus niger. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2006 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/asp-ni.htm>
- [52] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. ISBN 80-214-2567-9.
- [53] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [54] SOMOGYI, Michael. Notes on sugar determination. *Journal of biological chemistry*. 1952, **195**(1), 19-23.
- [55] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [56] KIM, Seungdo a Bruce E. DALE Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*. 2004, **26**(4), 361-375. DOI:

10.1016/j.biombioe.2003.08.002. ISSN 09619534. Dostupné také z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953403001375>

- [57] KUCHARCZYK, Pavel. *Kyselina mléčná a syntéza polylaktidu*. Zlín, 2008. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/7183>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav inženýrství polymerů. Vedoucí práce Ivo Kuřitka.
- [58] REBROŠ, Martin, Michal ROSENBERG a Ľudmila KRIŠTOFÍKOVÁ. Mikrobiálna produkcia palivového etanolu: Baktérie alebo kvasinky. *Chemické listy*, 2005. 2005, **2005**(99), 402-409.

## 7 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Schéma zdrojů biomasy [3], vlastní úprava .....	9
<b>Obrázek 2:</b> Morfologie pomerančového plodu [14] .....	11
<b>Obrázek 3:</b> Molekula celulózy [19] .....	13
<b>Obrázek 4:</b> Strukturní uspořádání v buněčné stěně rostlin [55], strana 119 .....	14
<b>Obrázek 5:</b> Xylan a glukomanan, nejčastější polysacharidy hemicelulózy [25] .....	15
<b>Obrázek 6:</b> Vysokoesterifikovaný pektin [31] .....	16
<b>Obrázek 7:</b> Nízkoesterifikovaný pektin [31] .....	17
<b>Obrázek 8:</b> Působení celulolytických enzymů [43] .....	20
<b>Obrázek 9:</b> Působení pektolytických enzymů [43] .....	21
<b>Obrázek 10:</b> <i>Aspergillus niger</i> [42] .....	23
<b>Obrázek 11:</b> Schéma procesu zpracování potravinového odpadu .....	24

## 8 SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1:</b> Kalibrační křivka glukózy .....	36
<b>Graf 2:</b> Výtěžky hydrolýz zvýšenou teplotou .....	36
<b>Graf 3:</b> Výtěžky hydrolýz v tlakovém hrnci a hydrolýzy ultrazvukem .....	37
<b>Graf 4:</b> Výtěžky hydrolýz mikrovlnami .....	37
<b>Graf 5:</b> Časová závislost koncentrace redukujících sacharidů na době působení mikrovln s 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	38
<b>Graf 6:</b> Výtěžky hydrolýz kyselinou sírovou o třech koncentracích a třech teplotách .....	39
<b>Graf 7:</b> Výtěžky hydrolýz kyselinou dusičnou při třech koncentracích a třech teplotách .....	39
<b>Graf 8:</b> Výtěžky hydrolýz kyselinou fosforečnou při třech teplotách a třech koncentracích..	40
<b>Graf 9:</b> Výtěžky alkalických hydrolýz při 100 °C .....	40
<b>Graf 10:</b> Průběh hydrolýz pomocí celulózoového komplexu, 3 různé koncentrace při pH = 5, T = 45 °C .....	42
<b>Graf 11:</b> Průběh hydrolýz pomocí celulózoového komplexu, 3 různá pH, při c = 4 %, T = 45 °C .....	43
<b>Graf 12:</b> Průběh hydrolýzy pomocí celulózoového komplexu, 3 různé teploty, při pH = 5 .....	43
<b>Graf 13:</b> Srovnání výtěžků všech hydrolýz pomocí celulózoového komplexu .....	44
<b>Graf 14:</b> Hydrolýza pomocí β-glukosidázy, tři různé koncentrace při pH = 5 a T = 55 °C....	45
<b>Graf 15:</b> Hydrolýza pomocí β-glukosidázy o c = 0,4 %, pH = 5, T = 45 °C .....	45
<b>Graf 16:</b> Hydrolýza pomocí kombinace enzymů, při pH = 4,5 a T = 45 °C .....	46
<b>Graf 17:</b> Srovnání výtěžků všech hydrolýz pomocí β-glukosidázy .....	46
<b>Graf 18:</b> Sledování obsahu redukujících sacharidů v průběhu SSF kultivace A. niger .....	47
<b>Graf 19:</b> Aktivita celulózy v průběhu SSF kultivace .....	48
<b>Graf 20:</b> Aktivita pektinázy v průběhu SSF kultivace .....	48
<b>Graf 21:</b> Celkové porovnání výtěžků nejlepších hydrolýz.....	49

## 9 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Látkové složení citrusových plodů [14] .....	12
<b>Tabulka 2:</b> Složení pomerančů v závislosti na jednotlivých částech plodu [%] [12] .....	12
<b>Tabulka 3:</b> Charakteristiky použitých enzymů .....	31
<b>Tabulka 4:</b> Přehled provedených hydrolyz a jejich parametrů .....	32
<b>Tabulka 5:</b> Výsledky stanovení sušiny materiálu .....	34
<b>Tabulka 6:</b> Výsledky stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmana .....	34
<b>Tabulka 7:</b> Stanovení celulózy v původním materiálu a v hydrolyzátu .....	35

## 10 SEZNAM PŘÍLOH

<b>Příloha 1:</b> Kalibrační křivka glukózy .....	62
<b>Příloha 2:</b> Výtěžky a parametry fyzikálních hydrolýz .....	62
<b>Příloha 3:</b> Výtěžky a parametry kyselých hydrolýz .....	63
<b>Příloha 4:</b> Výtěžky a parametry alkalických hydrolýz .....	63
<b>Příloha 5:</b> Výsledky enzymatických hydrolýz (celuláza) - tři různé koncentrace .....	64
<b>Příloha 6:</b> Výsledky enzymatických hydrolýz (celuláza) - tři různá pH .....	65
<b>Příloha 7:</b> Výsledky enzymatických hydrolýz (celuláza) - dvě různé teploty .....	65
<b>Příloha 8:</b> Výsledky enzymatických hydrolýz ( $\beta$ -glukosidáza) .....	66
<b>Příloha 9:</b> Výsledky hydrolýzy při použití kombinace enzymů .....	67
<b>Příloha 10:</b> Sledování produkce enzymů a koncentrace redukujících sacharidů při SSF kultivaci s <i>A.niger</i> .....	67

## 11 PŘÍLOHY

*Příloha 1: Kalibrační křivka glukózy*

<b>c [g·l<sup>-1</sup>]</b>	<b>A (530 nm)</b>
0,02	0,1087 ± 0,0005
0,04	0,2047 ± 0,0005
0,06	0,2997 ± 0,0005
0,08	0,3967 ± 0,0011
0,10	0,4900 ± 0,0009
0,12	0,5733 ± 0,0011
0,14	0,674 ± 0,005
0,16	0,7753 ± 0,0005
0,18	0,8717 ± 0,0005
0,20	0,9637 ± 0,0011

*Příloha 2: Výtěžky a parametry fyzikálních hydrolyz*

<b>hydrolyza</b>		<b>čas [min]</b>	<b>c [g·l<sup>-1</sup>]</b>
vodní lázeň ΔT	50 °C	60	16,022 ± 0,004
	100 °C		26,103 ± 0,002
tlakový hrnec	bez H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15	21,1964 ± 0,0012
	2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		25,413 ± 0,003
ultrazvuk		30	0,153 ± 0,003
mikrovlny	385 W	5	16,022 ± 0,002
	540 W		21,158 ± 0,003
	700 W		24,7228 ± 0,0009
časová závislost mikrovln	700 W + 2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0. min	1,417 ± 0,003
		1. min	19,394 ± 0,003
		2. min	26,2551 ± 0,0005
		3. min	26,3317 ± 0,0008
		4. min	26,5234 ± 0,0005
		5. min	26,715 ± 0,002
		<i>výtěžek</i>	25,297 ± 0,002

*Příloha 3: Výtěžky a parametry kyselých hydrolyz*

teplota	koncentrace	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HNO <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
		c [g·l <sup>-1</sup> ]		
laboratorní	0,5 %	12,0004 ± 0,0014	10,1163 ± 0,0005	6,4877 ± 0,0016
	2 %	9,837 ± 0,002	9,1045 ± 0,0009	7,1157 ± 0,0018
	5 %	13,0472 ± 0,0019	9,0696 ± 0,0005	8,3369 ± 0,0014
50 °C	0,5 %	13,8148 ± 0,0018	14,0590 ± 0,0005	10,8141 ± 0,0014
	2 %	16,9200 ± 0,0019	18,6297 ± 0,0009	7,0460 ± 0,0011
	5 %	14,1637 ± 0,0011	22,7817 ± 0,0005	18,4552 ± 0,0019
100 °C	0,5 %	13,4310 ± 0,0005	23,6539 ± 0,0009	18,0714 ± 0,0014
	2 %	22,782 ± 0,003	18,9088 ± 0,0005	20,5487 ± 0,0005
	5 %	22,6770 ± 0,0014	24,1424 ± 0,0019	13,1867 ± 0,0009

*Příloha 4: Výtěžky a parametry alkalických hydrolyz*

koncentrace	NaOH	KOH
	c [g·l <sup>-1</sup> ]	
5 %	2,3357 ± 0,0014	23,3050 ± 0,0014
10 %	2,4753 ± 0,0005	12,2447 ± 0,0009
15 %	3,2427 ± 0,0009	0,4865 ± 0,0005

*Příloha 5: Výsledky enzymatických hydrolyz (celuláza) - tři různé koncentrace*

	<b>45 °C, pH = 5; [g·l<sup>-1</sup>]</b>		
<b>t [hod]</b>	<b>2 %</b>	<b>4 %</b>	<b>6 %</b>
0	12,5587 ± 0,0005	11,4073 ± 0,0011	17,5132 ± 0,0005
6	19,1530 ± 0,0009	19,3624 ± 0,0009	19,6764 ± 0,0009
12	24,4215 ± 0,0005	20,5487 ± 0,0011	25,6776 ± 0,0005
24	26,6545 ± 0,0019	27,4919 ± 0,0005	29,8994 ± 0,0014
30	26,5848 ± 0,0016	30,3530 ± 0,0009	30,3530 ± 0,0009
36	26,2010 ± 0,0005	30,3181 ± 0,0005	30,7019 ± 0,0005
48	25,6078 ± 0,0005	35,4470 ± 0,0014	31,4695 ± 0,0005
54	25,6427 ± 0,0009	35,1679 ± 0,0009	31,8184 ± 0,0009
60	26,4801 ± 0,0009	35,3423 ± 0,0014	31,8533 ± 0,0005
72	26,2707 ± 0,0009	35,3074 ± 0,0005	31,8184 ± 0,0009
78	26,8988 ± 0,0009	34,9934 ± 0,0014	32,1673 ± 0,0005
84	26,2359 ± 0,0005	34,9585 ± 0,0009	32,0626 ± 0,0005
96	27,5617 ± 0,0014	34,8888 ± 0,0014	32,0277 ± 0,0009
<i>výtěžek</i>	15,0030 ± 0,0009	23,4815 ± 0,0005	14,5145 ± 0,0009

**Příloha 6: Výsledky enzymatických hydrolyz (celuláza) - tři různá pH**

t [hod]	45 °C, 4 %; [g·l <sup>-1</sup> ]		
	pH = 4,5	pH = 5,5	pH = 6,5
0	8,3718 ± 0,0009	20,1300 ± 0,0005	20,0951 ± 0,0009
6	22,5374 ± 0,0005	24,0726 ± 0,0009	20,9325 ± 0,0009
12	23,0608 ± 0,0011	24,2471 ± 0,0005	21,6652 ± 0,0016
24	31,5044 ± 0,0009	31,3997 ± 0,0009	21,1069 ± 0,0014
30	32,3417 ± 0,0009	29,5156 ± 0,0009	22,5374 ± 0,0005
36	37,9242 ± 0,0005	30,2832 ± 0,0011	33,5978 ± 0,0009
48	38,9361 ± 0,0009	44,3441 ± 0,0005	41,9716 ± 0,0009
54	38,2034 ± 0,0016	44,4837 ± 0,0009	42,1460 ± 0,0005
60	36,9473 ± 0,0009	44,2395 ± 0,0005	40,9946 ± 0,0011
72	35,8308 ± 0,0005	44,4488 ± 0,0005	41,8669 ± 0,0009
78	34,4352 ± 0,0009	44,0650 ± 0,0009	41,6924 ± 0,0005
84	33,9816 ± 0,0014	43,7510 ± 0,0009	41,5180 ± 0,0014
96	33,8420 ± 0,0005	43,7161 ± 0,0014	41,1342 ± 0,0009
výtěžek	25,4702 ± 0,0014	23,5861 ± 0,0009	21,0391 ± 0,0009

**Příloha 7: Výsledky enzymatických hydrolyz (celuláza) - dvě různé teploty**

t [hod]	4 %, pH = 5; [g·l <sup>-1</sup> ]	
	40 °C	50 °C
0	5,964 ± 0,002	8,5463 ± 0,0011
6	19,3624 ± 0,0009	19,5717 ± 0,0009
12	20,9674 ± 0,0005	22,2932 ± 0,0009
24	24,4913 ± 0,0009	27,5268 ± 0,0009
30	27,0383 ± 0,0014	29,7249 ± 0,0009
36	29,0620 ± 0,0014	33,5978 ± 0,0009
48	29,7947 ± 0,0005	36,0401 ± 0,0005
54	29,9343 ± 0,0009	35,5866 ± 0,0009
60	29,7249 ± 0,0009	34,4701 ± 0,0005
72	29,6900 ± 0,0005	34,4352 ± 0,0009
78	29,8296 ± 0,0009	34,5398 ± 0,0009
84	29,4109 ± 0,0009	34,3305 ± 0,0009
96	29,4109 ± 0,0009	34,0165 ± 0,0009
výtěžek	23,4466 ± 0,0014	25,4702 ± 0,0005

**Příloha 8: Výsledky enzymatických hydrolyz (β-glukosidáza)**

t [hod]	55 °C, pH = 5; [g·l <sup>-1</sup> ]			45 °C, pH = 5; [g·l <sup>-1</sup> ]
	0,2 %	0,4 %	0,6 %	0,4 %
0	6,8017 ± 0,0005	5,9643 ± 0,0009	5,9643 ± 0,0009	3,2429 ± 0,0009
3	12,4540 ± 0,0009	16,3269 ± 0,0009	6,6970 ± 0,0009	7,6740 ± 0,0005
6	13,3961 ± 0,0009	16,4316 ± 0,0009	8,0578 ± 0,0009	7,4297 ± 0,0009
9	13,3961 ± 0,0009	17,3736 ± 0,0009	7,9880 ± 0,0014	13,8148 ± 0,0018
21	13,6403 ± 0,0005	17,5132 ± 0,0005	8,0578 ± 0,0009	15,9431 ± 0,0005
24	13,7101 ± 0,0009	17,1294 ± 0,0014	8,2322 ± 0,0005	16,1175 ± 0,0009
27	13,9194 ± 0,0009	17,4434 ± 0,0011	8,8952 ± 0,0009	16,1175 ± 0,0009
30	17,4085 ± 0,0005	20,8627 ± 0,0005	14,8615 ± 0,0009	16,0478 ± 0,0019
33	19,4671 ± 0,0009	25,4334 ± 0,0009	15,9431 ± 0,0014	15,8384 ± 0,0035
45	19,3973 ± 0,0005	25,5380 ± 0,0009	16,2222 ± 0,0009	16,3618 ± 0,0005
48	19,4322 ± 0,0014	25,6427 ± 0,0009	16,4316 ± 0,0009	16,1524 ± 0,0019
51	19,4671 ± 0,0009	25,3287 ± 0,0009	16,1524 ± 0,0019	16,2222 ± 0,0009
výtěžek	12,6653 ± 0,0009	19,3644 ± 0,0009	10,1881 ± 0,0010	12,9794 ± 0,0009

**Příloha 9:** Výsledky hydrolýzy při použití kombinace enzymů

kombinace (celuláza, $\beta$ -glukosidáza)	
t [hod]	45 °C, pH = 4,5; [g·l <sup>-1</sup> ]
0	1,9868 ± 0,0009
6	1,8821 ± 0,0009
12	2,7195 ± 0,0009
24	15,3848 ± 0,0009
30	16,1175 ± 0,0009
36	16,9898 ± 0,0005
48	17,4085 ± 0,0005
54	18,7343 ± 0,0009
60	18,9437 ± 0,0009
72	26,3405 ± 0,0005
78	26,3405 ± 0,0005
84	29,4807 ± 0,0009
96	29,4109 ± 0,0009
výtěžek	27,4241 ± 0,0007

**Příloha 10:** Sledování produkce enzymů a koncentrace redukujících sacharidů při SSF kultivaci s *A.niger*

t [den]	cukry	celuláza	pektináza
	c [g·l <sup>-1</sup> ]		
1.	13,6054 ± 0,0009	16,8502 ± 0,0009	102,996 ± 0,003
2.	2,9637 ± 0,0014	31,5392 ± 0,0014	25,1542 ± 0,0005
3.	2,6846 ± 0,0019	56,6606 ± 0,0005	15,9082 ± 0,0009
4.	1,2192 ± 0,0005	99,716 ± 0,003	-
5.	1,9170 ± 0,0014	96,5407 ± 0,0019	-
6.	2,1264 ± 0,0005	73,478 ± 0,002	-
7.	2,8242 ± 0,0009	45,1117 ± 0,0009	-
8.	2,3357 ± 0,0014	73,2337 ± 0,0014	-
9.	3,9407 ± 0,0011	102,6814 ± 0,0009	-
10.	4,2547 ± 0,0005	54,3229 ± 0,0009	-