

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**ANAEROBNÍ FERMENTACE A SLEDOVÁNÍ ZMĚN
V PROFILU CHLOROGENOVÝCH KYSELIN
V KAVÁRENSKÉM ODPADU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Studijní obor:

Vedoucí práce:

Konzultant práce:

Bc. Marie Bobková

Analytická chemie

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

2019 Olomoouc

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala katedře analytické chemie, že mi zde umožnila zpracovávat mou diplomovou práci. Mému vedoucímu doc. RNDr. Petrovi Bednářovi, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Lukášovi Kučerovi, Ph.D. děkuji za odborné vedení, cenné rady, připomínky, a především trpělivost a ochotu. Za elementární analýzu kavárenského odpadu děkuji pracovníkům Katedry anorganické chemie, PŘF UP. Nakonec bych chtěla poděkovat celé mé rodině a partnerovi, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení studenta: Bc. Marie Bobková

Název práce: Anaerobní fermentace a sledování změn v profilu chlorogenových kyselin v kavářenském odpadu

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra analytické chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

Anotace:

Během anaerobní fermentace dochází ke vzniku bioplynu a kapalného podílu - digestátu. Cílem této práce bylo optimalizovat anaerobní fermentaci kavářenského odpadu v laboratorním měřítku a diskontinuálním provedení. Významným parametrem optimalizace byl poměr obsahu kavářenského odpadu a vepřové kejdy, použité jako vhodný kofermentační substrát. Chemické složení plynné fáze v reaktoru při anaerobní fermentaci bylo sledováno pomocí plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Vzniklý digestát byl analyzován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS). Experimenty potvrdily významný úbytek chlorogenových kyselin (významných polyfenolických látek charakteristických pro kávu a kavářenský odpad) v průběhu anaerobní fermentace.

Klíčová slova: anaerobní fermentace, chlorogenová kyselina, kavářenský odpad, chromatografie, hmotnostní spektrometrie

Počet stran: 70

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Marie Bobková

Title: Anaerobic fermentation and analysis of chlorogenic acids profile in waste from coffee preparation

Type of thesis: Master's

Department: Department of Analytical Chemistry

Supervisor: doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Consultant: RNDr. Lukáš Kučera, Ph.D.

Annotation:

During anaerobic fermentation biogas and a liquid fraction – digestate is produced. The aim of this thesis was to optimize anaerobic fermentation of coffee waste in laboratory scale and discontinual design. The ratio of content of coffee waste and a pork slurry used as suitable co-fermentation substrate appeared to be important parameter for gasification and was optimized. The chemical composition of the gas phase in the reactor during anaerobic fermentation was monitored by gas chromatography with detection by a mass spectrometer (GC/MS). The formed digestate was analyzed by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (HPLC/MS). The experiments confirmed significant decrease of chlorogenic acids (significant polyphenolic substances characteristic for coffee and coffee waste) during anaerobic fermentation.

Keywords: anaerobic fermentation, chlorogenic acid, coffee waste, chromatography, mass spectrometry

Keywords: anaerobic fermentation, chlorogenic acid, waste from coffee preparation, chromatography, mass spectrometry

Number of pages: 70

Number of appendices: 0

Language: czech

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Anaerobní fermentace pro získání bioplynu	8
2.1.1. Parametry anaerobní fermentace	9
2.1.2. Analýza procesu anaerobní fermentace a chemické složení digestátu.....	12
2.1.2.1. Využití chromatografických metod při studiu anaerobní fermentace a složení digestátu.....	13
2.2. Káva – historie, složení, zpracování a využití	14
2.2.1. Zpracování kávových zrn	16
2.2.2. Příprava kávy.....	18
2.2.3. Chemické složení kávových zrn, kávy a odpadu vznikajícího při její přípravě.....	21
2.3. Chlorogenové kyseliny	24
2.3.1. Analýza chlorogenových kyselin.....	28
3. Experimentální část	30
3.1. Přístrojové vybavení a laboratorní materiál	30
3.2. Chemikálie	31
3.3. Pracovní postupy	32
3.3.1. Charakterizace materiálu	32
3.3.2. Optimalizace poměru vstupních surovin pro dosažení methanogeneze	33
3.3.3. Analýza složení plynné fáze a vzniklého digestátu v průběhu hlavního fermentačního experimentu.....	34
3.4. Výsledky a diskuze.....	36
3.4.1. Charakterizace materiálu	36
3.4.2. Volba vhodného složení organického substrátu pro hlavní fermentační experiment	37
3.4.3. Analýza složení plynné fáze při hlavním fermentačním experimentu.....	40
3.4.5. Analýza složení digestátu a změn profilu chlorogenových kyselin.....	51
4. Závěr	63
5. Literatura	64

Zkratky

AD	anaerobní digesce
ATR	atraktylosidové deriváty
CGA	chlorogenové kyseliny
CGL	laktony chlorogenových kyselin
CQA	kyselina kaffeoylchinová
DAD	detektor diodového pole
DESI	desorpční elektrosprej
di-CQA	dikaffeoylchinová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
FID	plamenový ionizační detektor
FQA	kyselina feruloylchinová
GC	plynová chromatografie
GCxGC	dvourozměrná plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě
LC	kapalinová chromatografie
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometr
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NIRS	blízká infračervená spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
p-CoQA	kyselina p-kumaroylchinová
PTFE	polytetrafluorethylen
RT	retenční čas
SF	kyselina p-kumaroylchinová
SPE	extrakce tuhou fází
SPME	mikroextrakce tuhou fází
TCD	tepelný vodivostní detektor
TIC	celkový iontový proud
TOF	analyzátor doby letu
UV/VIS	spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti
VL	vláknina

1. Úvod

Anaerobní fermentace, jinak také anaerobní digesce (AD), je proces rozkladu organické hmoty bez přístupu kyslíku, při kterém dochází ke vzniku plynu a kapalného (nebo směsi kapalného a pevného) podílu (digestátu) s určitými vlastnostmi. Takovýto digestát je bohatý na dusík a pokud v něm nejsou přítomny toxické složky, může být využíván v zemědělství jako hnojivo. Vyráběný, tzv. surový, bioplyn se skládá přibližně z 65 % CH₄, 35 % CO₂ a ze stopových plynů jako je H₂S, H₂ a N₂. AD je vhodný prostředek pro ekologické zpracování odpadu za současného získání levné elektrické a tepelné energie. Tohoto procesu využívají bioplynové stanice, kde jako vstupní materiál se používají nejrůznější organické substráty jako jsou kaly z čistíren odpadních vod, hnůj z chovu dobytka a potravinové odpady. Často se u AD používá ko-digesce, kdy dochází k AD dvou organických substrátů. Ko-digesce obvykle zvyšuje výtěžky methanu.

Kavárenský odpad je potravinový odpad, který by mohl být využit jako organický substrát v bioplynových stanicích. Káva se těší čím dál tím větší oblibě a tím i roste produkce odpadu s ní související. Na chemické složení kávy má vliv několik faktorů, mezi které patří původní složení zelené nezralé kávy, tedy odrůda kávovníku (genetické vlivy), na sezóně sklizně (klimatické vlivy) a zeměpisném původu. Dále na zpracování před a po sklizni, přítomnosti vadných bobů a stupni zralosti. Další velmi důležitý faktor je tepelný profil, který se použije během procesu pražení, kdy se mění profil chlorogenových kyselin (CGA) a produkty jejich tepelné přeměny způsobují hořkou chuť.

Chlorogenové kyseliny jsou estery kyseliny kávové a kyseliny chinové. Jako nejznámější CGA se uvádí 5-kaffeoylchinová kyselina (5-CQA), protože je z CGA nejvíce zastoupena. Kromě kávy, kde jsou CGA bohatě zastoupeny, se dále vyskytují např. v bramborách, švestkách nebo zelí. CGA vykazují řadu pozitivních účinků. Působí proti obezitě, antidiabeticky, antihypertenzně a antimikrobiálně. Kávové semeno chrání před UV zářením, mikrobiálními infekcemi a býložravci.

Cílem této práce bylo optimalizovat AD pro zplyňování kavárenského odpadu v laboratorních podmínkách (v mikroměřítku) v diskontinuálním uspořádání. Prostudovat složení plynné fáze v reaktoru během fermentace, zejména s ohledem na vznik methanu, pomocí plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, a změny v zastoupení chlorogenových kyselin (jako charakteristických zástupců polyfenolických látek přítomných v kávě) v digestátu během zplyňování pomocí spojení kapalinové chromatografie s vysokorozlišujícím tandemovým hmotnostním spektrometrem.

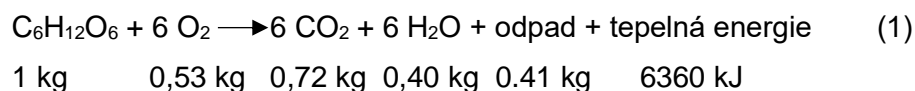
2. Teoretická část

2.1. Anaerobní fermentace pro získání bioplynu

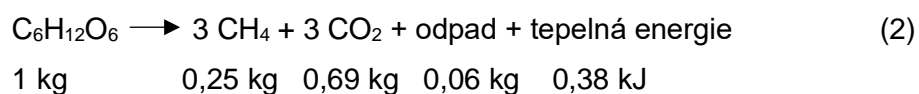
Anaerobní fermentace je proces rozkladu organické hmoty bez přístupu kyslíku. Probíhá například v bažiništích, na dně jezer nebo na skládkách komunálního odpadu. Tento biochemický rozklad organické hmoty je v dnešní době hojně využíván v bioplynových stanicích. Jiným názvem tohoto procesu je anaerobní digesce (AD) [1].

Anaerobní fermentací dochází ke vzniku plynu a kapalného (nebo směsi kapalného a pevného) podílu (digestátu) s určitými vlastnostmi. Výhodou AD je, že proces probíhá v systému odděleném od okolního prostředí, tedy nedochází ke ztrátám živin a oproti volnému skládkování a kompostování se zabrání ztrátám dusíku v rozsahu 20-40 %. Rozdíly mezi aerobní a anaerobní fermentací jsou ukázány na rozkladu glukózy (rov. 1-2). Během AD dochází k uvolnění dostatku energie, aby se udržel optimální stav systému pro její plynulý průběh. Je to díky tomu, že tato uvolněná energie je schopná udržet optimální teplotu. Takovýto digestát je bohatý na dusík a pokud v něm nejsou přítomny toxické složky, může být využíván v zemědělství jako hnojivo. Vyráběný bioplyn se skládá přibližně z 65 % CH₄, 35 % CO₂ a ze stopových plynů jako je H₂S, H₂ a N₂. [2-4]. Bioplynu o takovémto procentuálním složení methanu a oxidu uhličitém se říká surový a pro další využití ho je nutné přečistit. Mezi metody přečištění bioplynu patří fyzikální a chemická adsorpce, biologický rozklad, molekulární síta (filtry), membránové separace apod. [5, 6].

Aerobní fermentace



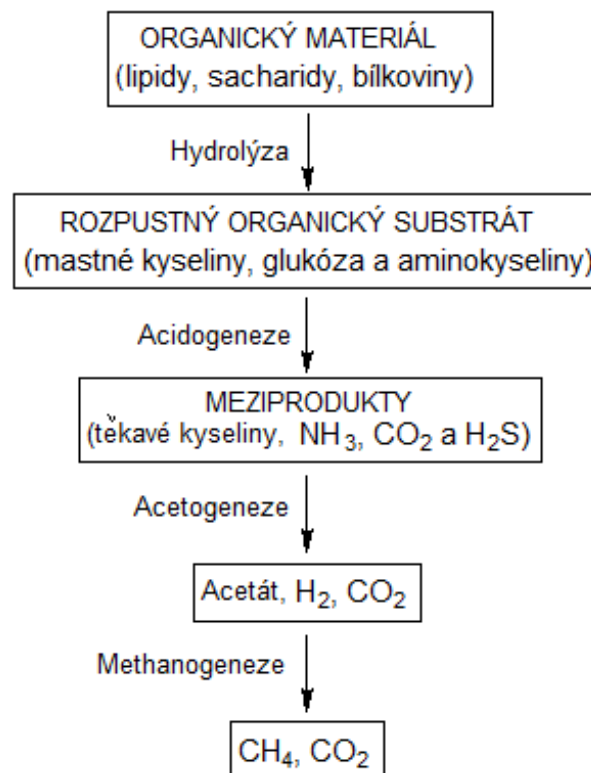
Anaerobní fermentace



AD je vhodný prostředek pro ekologické zpracování odpadu za současného získání levné elektrické a tepelné energie. Bioplynové stanice rozlišujeme na zemědělské, odpadní a průmyslové [4]. Jako vstupní materiál do bioplynových stanic se používají odpadní vody a surové kaly, které dělíme na komunální (z čistíren odpadních vod), a surové kaly průmyslové a zemědělské [7].

Proces biodegradace anaerobní fermentací zahrnuje čtyři kroky, a to hydrolýzu, acidogenezi, acetogenezi a methanogenezi. Na počátku celého procesu se vysokomolekulární organické látky (lipidy, poly/oligosacharidy, bílkoviny) hydrolyzují

fermentačními bakteriemi na menší molekuly, jako jsou mastné kyseliny, mono/disacharidy a aminokyseliny. V následné fázi (acidogenezi) dochází k další degradaci na těkavé kyseliny (např. acetát, propionát a butyrát) a k tvorbě vedlejších produktů (např. NH_3 , CO_2 a H_2S). Organické substráty produkované při acidogenezi jsou dále tráveny bakteriemi na acetát, H_2 , CO_2 (acetogeneze). V posledním kroku již dochází k produkci methanu a oxidu uhličitého za pomoci methanogenních bakterií (Obr. 1) [7, 8].



Obr. 1: Schéma anaerobní fermentace.

2.1.1. Parametry anaerobní fermentace

AD potravinového odpadu je komplexní proces, během kterého by mělo docházet k rozkladu všech organických látek v jednostupňovitém systému [8]. Což znamená, že fermentační proces probíhá v jednom prostředí, v nádobě, fermentoru. Naproti tomu vícestupňovité systémy probíhají ve dvou a více spojených fermentorech [9]. Dvoustupňové systémy většinou zahrnují dva reaktory. V prvním dochází k okyselení, získaný výluh poté putuje do reaktoru druhého, kde už probíhá methanogeneze [10].

AD je atraktivní metoda zpracování odpadů, neboť dokáže využít velké portfolio zemědělských a průmyslových odpadů, které v sobě obsahují vysoké množství snadno biologicky rozložitelného materiálu. Nicméně v průběhu celého procesu může dojít k různým problémům jež mají za následek nízké výtěžky methanu a nestabilitu AD [9]. Mezi

nejvýznamnější parametry ovlivňující methanogenezi patří teplota, koncentrace těkavých mastných kyselin, obsah NH_3 , poměr obsahu uhlíku a dusíku (C/N), pH, obsah stopových prvků (Zn, Fe, Mo, Cu, Al atd.) a makroelementů (Na, K, Mg) [8].

Teplota je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících AD, protože nejen, že ovlivňuje aktivitu enzymů a koenzymů, ale má velký vliv na množství produkovaného methanu a kvalitu digestátu. Obecně platí, že anaerobní bakterie mohou růst při psychrofilních (10-30 °C), mezofilních (30-40 °C) a termofilních (50-60 °C) podmínkách. Výhodami termofilních podmínek je vyšší rychlost metabolismu, vyšší stupeň destrukce patogenů a vyšší produkce bioplynu. Bylo také prokázáno, že výroba bioplynu v podmínkách s termofilní teplotou (55 °C) byla více než dvojnásobná než u podmínek psychrofilních (15 °C). Účinnost organické degradace dusíku a asimilace fosforu (který je rovněž pro AD významným prvkem) se navíc zvýšila s teplotou. Z termodynamiky vyplývá, že vyšší teplota je přínosem pro endergonické reakce (např. rozpad propionátu na acetát, CO_2 , H_2), ale není příznivá pro exergonické reakce, jako jsou hydrotrofní reakce a methanogeneze [8]. Teplota by navíc mohla ovlivnit pasivní oddělení pevných látek, u nichž je prokázáno, že je lepší v termofilních než psychrofilních podmínkách. Je to z důvodu, že při vysoké teplotě a nízké viskozitě je vysoká aktivita bioplynu (flotace a produkce plynu), což napomáhá procesu separace [11]. Ačkoli jsou zde značné výhody termofilních podmínek, je třeba vzít v úvahu i nevýhody termofilního procesu. Termofilní proces je citlivý na výkyvy teploty a lehce může nastat selhání a zastavení celého procesu. Nárůst teploty za den nesmí být větší než 1 °C a zároveň nesmí být nižší než 0,6 °C. Nedávný výzkum navíc ukázal, že celková rychlost solubilizace potravinového odpadu byla významně nižší při termofilních podmínkách než při mezofilních. Z tohoto důvodu se mezofilní podmínky jeví jako nejstabilnější a nejvhodnější [8, 12, 13].

Semitěkavé kyseliny, zejména kyselina octová, propionová, máselná a valerová, jsou produkty vznikající během AD organických odpadů. Obecně lze předpokládat, že těkavé mastné kyseliny vyrobené v anaerobním procesu mohou být nakonec transformovány na CH_4 a CO_2 pomocí syntetických acetogenních a methanogenních bakterií. Avšak těkavé mastné kyseliny mohou při vysokém organickém zatížení být v reaktoru nahromaděny, což vede ke snížení pH a dokonce k selhání anaerobní digesce. Ze uvedených čtyř kyselin hrají dominantní roli v produkci bioplynu kyselina octová a kyselina propionová, a jejich koncentrace může být použita jako jeden z ukazatelů průběhu anaerobní digesce. Pokud je poměr kyseliny propionové ke kyselině octové vyšší než 1,4 nebo koncentrace kyseliny octové vyšší než 0,8 g/l, vede to k selhání anaerobní digesce a celý proces se ukončí. Sledováním tohoto poměru lze i určit, kdy se AD ukončí [8].

Jak již bylo uvedeno, těkavé mastné kyseliny určují pH, které je jedním z nejdůležitějších parametrů ovlivňujících AD. Anaerobní bakterie potřebují různé rozmezí pH

pro své množení. Např. kvasinkové bakterie se množí v širším rozsahu pH 4,0-8,5, zatímco rozsah 6,5-7,2 je příznivý pro růst methanogenů [8]. Při nízkém pH jsou hlavními těkavými mastnými kyselinami kyselina octová a kyselina máselná, protože při pH 6 převládají bakterie *Clostridium butyricum*, které produkují hlavně butyrát, acetát, oxid uhličitý a vodík. Zatímco kyselina octová a kyselina propionová hrají dominantní roli, když je pH 8,0, kdy převládají bakterie *Propionibacterium*, které tvoří acetát, propionát a oxid uhličitý z glukózy [14].

Výkon AD je významně ovlivněn poměrem C/N. Pro AD je nutno dosáhnout vhodného poměru C/N, protože anaerobní bakterie potřebují pro svůj optimální růst příznivou rovnováhu živin, stejně jako udržitelné stabilní prostředí. Obecně se dá říct, že poměr C/N mezi 20-30:1 je pro AD optimální [8, 12, 15]. Zároveň je nutné držet obsah amoniaku v průběhu AD při nízkých hodnotách, aby nedocházelo k inhibici činnosti mikroorganismů. Například při zvýšení koncentrace amoniaku na hodnoty 1,7-14 g/l dojde až k 50 % snížení výtěžku methanu [13]. Toto rozmezí je poměrně vysoké, protože koncentrace amoniaku pro způsobení inhibice je závislá na složení organických substrátů, typu reaktoru, vnějšímú přidavku sloučenin a podmínkách prostředí [16].

Na, K a Mg působí jako antagonisti inhibice amoniaku, kdy toxicita jednoho iontu je snížena přítomností jiného iontu [13]. Stopové prvky hrají důležitou roli v syntéze enzymů a zachování enzymové aktivity. K inhibici dochází, pokud jejich koncentrace by byla příliš vysoká [8].

Odpad potravinářského průmyslu se jeví jako vhodná vstupní surovina pro anaerobní digesce za účelem výroby methanu. Avšak v dlouhotrvajícím procesu nejsou živiny a poměr C/N trvale ve vhodném rozmezí. Zatímco například stopové prvky (Zn, Fe, Mo atd.) jsou v nedostatečném množství, makroelementy (Na, K atd.) jsou v přebytku [8, 15].

Aby se zabránilo této inhibici a překonaly se nevýhody v použití potravinového odpadu, byla provedena ko-digesce potravinového odpadu s jinými organickými substráty, jako je odpadní voda, splaškový kal, hnůj hovězího dobytka nebo zelený odpad. Bylo prokázáno, že ko-digesce je výhodnější než mono-digesce díky větší různorodosti surovin vedoucí ke stabilitě a účinnosti [17]. Ko-digesce poskytuje nadbytek živin, která urychluje biologický rozklad pevného organického odpadu prostřednictvím biostimulace (přidání živin pro podporu růstu mikroorganismů [18]). Zvyšuje se rychlost štěpení a stabilizace, což je za zapříčiněno velkým množstvím bakterií, které se v běžných ko-substrátech vyskytují. Během AD dochází ke snižování pH, avšak druhý organický substrát, což bývá nejčastěji alkalická směs typu vepřové kejdy, dokáže toto pH zneutralizovat. Stabilizovaná směs ko-digesce, která se přivádí do bioreaktoru zlepšuje poměr C/N a snižuje koncentraci dusíku [17].

2.1.2. Analýza procesu anaerobní fermentace a chemické složení digestátu

Anaerobní rozklad lze sledovat různými metodami jako je např. fluorescenční, infračervená, UV a VIS spektrometrie, elektronickými jazyky a nosy, a samozřejmě nejčastěji pomocí plynové chromatografie (GC) [19]. Elektronické nosy pracují na principu elektronické olfaktometrie. Elektronické jazyky používají řadu systému, které reagují na soli, kyseliny, cukry atd. [20]. Elektronické nosy a jazyky mají společný problém jako je nízká selektivita, citlivost na znečištění a degradace v důsledku agresivního chemického prostředí. Naproti tomu jsou levné a robustní [19]. Digestát z AD lze nejjednodušeji zanalyzovat pomocí termogravimetrické analýzy, kdy se měří změny v hmotnosti vzorku během jeho programovaného zahřívání při předem daných podmínkách atmosféry [21]. Kromě toho byly publikovány studie používající blízkou infračervenou spektroskopii (NIRS) [22] nebo kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektroskopií (LC-MS/MS) [23].

Vysoký rozvoj bioplynových stanic je spojen se zvýšenou produkcí digestátu a vyvstává otázka, jak jej co nejefektivněji zpracovávat. V konvenčně řízeném provozu bioplynových stanic je digestát skladovaný několik měsíců v digestační akumulární nádrží a následně je přímo transportován na pole. Ve variantě pásové sušičky se míchá čerstvý digestát se sušeným materiálem, aby se dosáhlo obsahu vody kolem 20 %. V sušičce fouká nad substrátem vzduch s maximální teplotou 85 °C. Digestát opouští sušičku s průměrným obsahem sušiny kolem 85 %. Následně se k sušině digestátu přidává škrob a vápenná mouka, aby se dosáhlo optimální konzistence. Tato směs nakonec slouží k hnojení v zemědělství, pro terénní úpravy a v zahradnictví. Ve variantě mechanické bubnové sušičky je digestát nejprve předběžně zpracován kompostováním a potom se kontinuálně aplikuje jako tenký film do rotujícího bubnu. Buben je zevnitř zahříván a digestát na povrchu bubnu schne. Poté co digestát uschne, zpracuje se stejně jako u varianty pásové sušičky [24]. Solární sušička je hala s betonovou základnou a skleníkovou konstrukcí pokrytou průhledným polykarbonátem. Dále obsahuje míchací zařízení a ventilátory [24, 25]. Další používané uspořádání bioplynových stanic vychází z metody tepelné koncentrace. Zde se používá dekantér pro oddělení pevné a kapalné frakce. Pevná fáze se aplikuje na pole bez dalšího zpracování, zatím co kapalná fáze se nechá odpařit. Ke kapalné fázi se přidává kyselina sírová, aby se vyloučil oxid uhličitý a upravila se hodnota pH na 4,4-4,8. Získá se koncentrát s vysokým obsahem živin. Na základě obsahu těchto živin se používá pro ředění fermentačních substrátů, může se dále zpracovávat v čističkách odpadních vod nebo může být transportován do oblasti s deficitem živin. Ve variantě fyzikálně-chemické úpravy rovněž dochází k oddělení pevné a kapalné fáze. Kapalná fáze se následně zpracovává ultrafiltrací za použití membrán a tlaku mezi 2-10 bary. Substrát se separuje v permeátu, kterým je voda s nízkomolekulárními látkami a retentátu se zbývajícími koncentrovanými

vysokomolekulárními látkami. Permeát se dále zpracovává reverzní osmózou. Semipermeabilní membrána zadržuje rozpouštěné látky v rozpouštědle pomocí tlaku 40-100 barů. Retentáty z ultrafiltrace a reverzní osmózy se smísí a skladují před přepravou do oblasti použití. Permeát může být použit jako zavlažovací voda v zemědělských aplikacích [24].

Během anaerobní fermentace samozřejmě dochází ke změnám složení digestátu. Tambone a spol. [26] analyzovali složení tohoto digestátu získaného anaerobní fermentací zemědělsko-průmyslového odpadu, bez ohledu na vývin methanu. V anaerobní fermentaci se obsah těkavých pevných látek a celkového organického uhlíku v digestátu snížily, a to v důsledku mineralizace organické hmoty. Celková degradace těkavých pevných látek a celkového organického uhlíku v průběhu anaerobní fermentace činila 75 % a 71 %. Hodnota pH díky přítomnosti těkavých kyselin byla velmi nízká (3,68) a po anaerobní reakci se pH zvýšilo na 8,65 v důsledku degradace těkavých kyselin a produkce amoniaku. Vzhledem k degradaci celkového organického uhlíku a koncentraci dusíku se poměr C/N snížil z hodnoty 13,43 na 3,43.

2.1.2.1. Využití chromatografických metod při studiu anaerobní fermentace a složení digestátu

On-line sledování plynovou chromatografií (GC) se běžně používá pro analýzu složení bioplynu. Využíván je často tepelně vodivostní detektor (GC-TCD) anebo, zejména pro jednotlivé těkavé kyseliny, plamenově ionizační detektor (GC-FID). Sledování jednotlivých těkavých kyselin (např. acetát, propionát, butyrát nebo valerát) umožňuje účinnou a včasnou indikaci pro rozrušení AD. Pro optimální GC analýzu je vhodné kyseliny derivatizovat [27]. Provádí se buď kyselá nebo bazická reesterifikace [28].

Pind a kol. [29] použili pro analýzu těkavých kyselin pomocí GC-FID techniky úpravu vzorku vycházející z několika kroků. Nejprve byla provedena předfiltrace a ultrafiltrace. Vzorek se poté promíchal s kyselinou fosforečnou a nastripoval se CO₂. Odpadní a proplachovací čerpadlo musí být konfigurováno třikrát větším průtokem, aby se zabránilo nárůstu tlaku a přetečení vlivem stripování CO₂. Poté se nechala vialka se vzorkem 20-30 s stát, aby se odstranil nastripovaný CO₂. Tímto postupem však dochází k okyselení vzorků a vysrážení některých solí. Proto byla do postupu zahrnuta dodatečná filtrace a k rozpuštění solí se použil neutralizační roztok NaOH. Liner v plynovém chromatografu zachytával anorganické složky a byl z důvodu kontaminace vyměňován po každých 200-400 vzorcích.

Diamantis a kol. [30] využili kapilární GC-FID ke stanovení těkavých kyselin v bioplynu. V této práci byl vyvinut on-line monitorovací a kontrolní systém, který byl připojen k fermentoru pomocí automatického vzorkovacího zařízení, které bylo schopno provádět

odběr vzorku, filtraci, ředění a závěrečné vstřikování do GC. Boe a kol. [31] rovněž stanovovali on-line těkavé kyseliny. Použili headspace GC-FID. Vzorky před analýzou upravovali pomocí H_3PO_4 a $NaHSO_4$, H_3PO_4 ke snížení pH < 2 a $NaHSO_4$ pro snížení rozpustnosti těkavých kyselin v roztoku. Analýza pomocí headspace je výhodná, protože dochází k menší kontaminaci v porovnání s nástřikem roztoku vzorku. V tomto případě nebylo tedy potřeba filtrační jednotky, jak tomu u obdobných systému je. Použitá metoda je vhodná i pro analýzu složitějších materiálů jako je kejda a pevný odpad.

Schiffels a kol. [32] analyzovali derivatizované mastné kyseliny s krátkým řetězcem (C2-C6) v digestátu pomocí HPLC-UV. Pro extrakce vzorků byl zvolen diethylether, ale jeho těkavost a nekvalitní fázový přenos kyseliny octové a propionové zhoršovaly analytické parametry metody. Dobré reprodukovatelnosti bylo dosaženo přidáním vnitřního standardu, kyseliny pelargonové přímo do etheru. Volné kyseliny byly nejprve převedeny na příslušné acylchloridy pomocí oxalylchloridem ve směsi N,N-dimethylformamid/acetonitril 1:100 (v/v). Takto vytvořené chloridy kyselin byly převedeny na nitrofenolové estery přebytkem 50 mM 4-nitrofenolu rozpuštěného ve roztoku pyridinu v acetonitrilu (500 mM). Tyto připravené vzorky byly stabilní několik týdnů, byly čiré, a vhodné pro automatizovanou HPLC-UV analýzu. Nitrofenolové estery karboxylových kyselin jsou snadno detekovatelné při 295 nm.

Widyasari-Mehta a kol. [23] analyzovali pomocí LC-MS/MS s elektrosprejem zbytková antibiotika v digestátu, který byl tvořen zplyňovaným hnojem z chovu prasat. V konvenčním chovu prasat se běžně používají antibiotika, která se spolu s exkrementy dostávají do tekutých hnojiv (organické půdní hnojivo) nebo do vstupního materiálu pro bioplynové stanice. V této studii byl nejprve zanalyzován hnůj, jako vstupní materiál a následně vzniklý digestát. Analýzou vzorků na 21 farmách bylo identifikováno 34 různých antibiotik patřících do 11 tříd. I přes to, že se během anaerobní digesce koncentrace antibiotických zbytků snížila, tak tento proces nezajistil jejich úplné odstranění. Spielmeyer a kol. rovněž využili metodu LC-MS/MS pro analýzu zbytkových antibiotik v digestátu [33, 34]. Zaměřili se na deset sulfonamidových a čtyři tetracyklinová antibiotika. Ať už drobné změny matrice, nebo zcela jiné struktury byly pozorovány v měřítku 14-89 %. Došli tedy k totožnému závěru, že proces anaerobní fermentace obsah těchto antibiotik dokáže snížit, avšak k jejich úplné eliminaci nedojde.

2.2. Káva – historie, složení, zpracování a využití

Počátek historie kávy můžeme nalézt v dnešním Jemenu a Etiopii. Podle historických záznamů v roce 1598 v Cañihradu ochutnali první Češi kávový nápoj, avšak do Českých zemí se káva dostala až o 100 let později a byla dostupná pouze pro vybranou

společnost. Roku 1714 byla otevřena v Praze na Malé Straně první kavárna a koncem 18. století bylo v Praze už na stovky kaváren, kterým se říkalo kafírny [35].

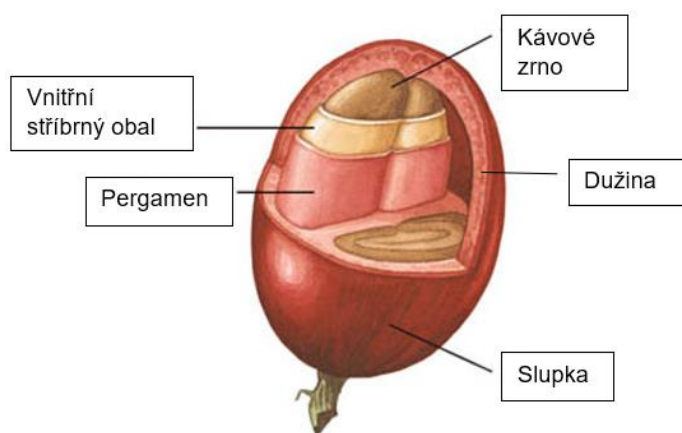
Přibližně 5-6 milionů tun zelené kávy je z producentských zemí každý rok exportováno do celého světa a tento export stále stoupá [36]. Nejvíce kávy dnes produkují Brazílie, Kolumbie, Mexiko, Indie, Pobřeží slonoviny, Indonésie a Etiopie [37].

Káva se získává z ovocné dřeviny kávovníku (*Coffea*, čeleď Mořenovité, Rubiaceae), která se vyskytuje v tropickém a subtropickém pásmu vysoko v horách [35, 36] Kávovníky mohou dorůstat rozličných výšek, mohou mít velikost keře, ale i stromu, který dosáhne výšky 15 metrů. Na plantážích se zpravidla udržuje výška taková, aby se mohla káva lehce sbírat. Několikrát do roka kávovníky kvetou drobnými bílými květy, které připomínají květy jasmínu. Takto kvetou pouze pár dní a poté z nich vyrostou plody, kterým se přezdívá kávové třešně (Obr. 2) [36]. Tyto plody jsou nejdříve zelenožluté a poté dozrají do červené až červenofialové barvy [37]. Plody zrají 9-14 měsíců, a proto se na jednom kávovníku mohou vyskytovat v jeden okamžik jak květy, tak i nezralé a zralé plody. Podle polohy plantáže, zemědělci sklízí kávové třešně několikrát do roka [36].



Obr. 2: Kávovník s bílými květy a zralými a nezralými plody [35].

Zrna jsou v peckovicích, které jsou velké asi 1,5 cm. Toto kávové zrno má několik vrstev obalu. Na povrchu peckovice je slupka a pod ní je dužina, která obsahuje nasádlou gumovitou hmotu. Dalšími vrstvami jsou pergamen a vnitřní stříbřitý obal. V dužině mohou být uchována buď dvě kávová zrna nebo jedno zrno (Obr. 3). Dvě jsou k sobě otočena plochou stranou a pokud je zde jen jedno, tak je větší a je kulovité. Takovému zrnu se říká perlové [35, 36]. Dužina je složena z polysacharidu. Z 30 % pektických látek, 8 % celulózy a z 18 % necelulózoovitých polysacharidů [39]. Vnitřní stříbrný obal je rovněž bohatý na cukry, a na rozpustné a nerozpustné vlákniny [40].



Obr.3: Schéma plodu kávovníku (převzato z odkazu [36]).

Existuje mnoho druhů kávovníku a ty nejznámější jsou arabika (*Coffea arabica*) a robusta (*Coffea robusta*). Asi 75 % světové produkce představuje káva arabika a zbylých 25 % káva robusta. Arabika se nachází ve Střední a Jižní Americe, Austrálii a částečně také v Africe. Robusta je domovem v Asii, částečně v Africe a Jižní Americe. Oba typy se od sebe liší tím, že arabika se pěstuje ve vysokohorských oblastech (ve výškách mezi 600 až 2000 m), kdežto robusta se pěstuje i v nižších nadmořských výškách (obvykle 200-600 m). Robusta nemá tak lahodnou chuť a aroma jakou má arabika. Arabika dává úrodu až po 6 letech pěstování, zatímco robusta již po 2-3 letech. Také výškou celé rostliny se tyto dvě odrůdy liší. Arabika dorůstá výšky 3-5 m, zatímco robusta až 13 m. Arabice vyhovuje teplota v rozmezí 15-24 °C. Oproti tomu Robusta vyžaduje stabilní klima s teplotou 24-29 °C [35, 36]. Robusta je odolnější vůči napadání hmyzem, což má souvislost s až dvakrát větším obsahem kofeinu v porovnání s arabikou. Hollingsworth a kol. [42] dokonce prokázali že kofein působí odpudivě a toxicky na slimáky a šneky, a lze jej tedy používat jakožto přírodní produkt k ochraně plodin.

2.2.1. Zpracování kávových zrn

Sběr kávy začíná v nižších nadmořských výškách, kde plody kávovníku uzrávají rychleji díky teplejším podmínkám. Káva z vyšších nadmořských výšek je kvalitnější, protože zrna mají delší dobu dozrávání. Sběr může být prováděn buď ručně nebo strojově. Nejlepší káva je sbírána ručně. Ruční sběr nepoškodí plody kávovníku a jsou sbírány pouze plody kvalitní a uzrálé [36].

Kávová zrna lze zpracovat dvěma způsoby, a to buď mokrou (mytím) nebo suchou metodou. Pro převážnou část zrn arabika je používána metoda mytí, která je vysvětlena

dále v textu. Suchá metoda využívá ke zpracování horký vzduch a slunce a je používána na méně kvalitní zrna. Těmito postupy se zrno zbaví tvrdého obalu a odhalí jádro zrna [37].

Při suchém zpracování jsou kávové plody po sběru rozprostřeny na zemi, kde působením slunce a vzduchu postupně schnou. Jedná se o nejstarší a nejjednodušší způsob zpracování kávy. Tyto plody musí být pravidelně obráceny, aby uschly rovnoměrně. Na noc jsou přikrývány, aby nenavlhly a zrna nezačala předčasně kvasit [43]. Poté co vlhkost klesne na 10-11 %, tak během 10-25 dne dochází k přirozené mikrobiální fermentaci, kdy pomocí enzymů začne praskat buničina [16]. Tento proces sušení trvá zhruba jeden měsíc a bývá někdy urychlován mechanickými sušičkami. Po usušení jsou zrna oloupána, nejčastěji pomocí loupacích strojů [36]. Suchá metoda se většinou používá v oblastech s nedostatkem vody, nízkým úhrnem srážek a dlouhým obdobím slunečního svitu [43].

Vzhledem k tomu, že metoda mytí se provádí především pro hodnotnější kávu arabiku a speciální kávy, tak je prováděna s větší technologickou přesností. V prvním kroku mytí se zrna sypou do velkého kontejneru s vodou, kde mačkadla odstraní ze zrn vnější obal a část dužiny [35, 36]. Po oloupání putují zrna do kvasné nádrže, kde probíhá fermentace. Při fermentaci enzymy uvolní zbytek lepkavé vrstvy, která pokrývá pergamenovou slupku semen a následně pergamen samotný. Doba fermentace je až 36 hod. Pokud by fermentace trvala déle, mohla by zrna začít hnit. Následujících 14 dní se zrna suší, aby se zbavila přebytečné vlhkosti, která činí asi 50 % a díky které by mohla zrna začít plesnivět. Suší se buď pomocí sušících strojů, horkým vzduchem nebo na přímém slunci. Stejně jako u suché metody musí být zrna obrácena a na noc a při dešti přikrývána. Metoda mytí je finančně náročnější z důvodu použití velkého množství vody, kdy na 1 kg kávy se spotřebuje 130 až 150 l vody [36].

Poslední metodou je takzvané „polopromyté“ zpracování. Obdobně jako u mokrého způsobu jsou nejprve kávové plody uloženy do vodních lázní, kde probíhá selekce zralých a nezralých kávových třešinek. Následně v loupacích strojích jsou vytríděné plody zbaveny vrchní slupky a části dužiny. Sušení na slunci probíhá stále se zbytkem dužiny a v pergamenu. Opět probíhá proces otáčení. Jelikož tyto zrna stále obsahují svrchní obal, kde je vysoké procento cukrů, které postupně fermentují, nemají tyto kávy příliš kyselé tóny v chuti připraveného nápoje. Na některých farmách se plody pouze oloupou ze slupky a nechají se sušit. Po sušení je pak ze zrn jen sundána dužina. Výhodou této metody je, že se nespotřebuje tolik vody [36].

Nezbytným krokem při zpracování kávy je proces čištění od nečistot jako jsou kamínky, větvičky, hlína a poškozená zrna. Poté je to sušení, kdy optimální obsah vody v zrně po usušení je 13 %. Třídění se opět může provádět pomocí modernější techniky, strojů, nebo klasicky ručně. Zrna se třídí podle barvy, hustoty a velikosti [35].

Moderní pražení kávy je náročná disciplína, která v dnešní moderní době zahrnuje stroje s měřicími přístroji a velmi přesnými teploměry. Pražič musí své umění dobře ovládat, nastavovat správné proudění vzduchu, hlídat časy jednotlivých fází procesu, zdroj tepla a interní teplotu. Pražič také musí umět dobře namíchat kávovou směs, aby se jednotlivé složky doplňovaly a vznikla chutná káva. Dalším významným faktorem pražení je přítomnost rozpustných látek a vody. Pyrolýza je jeden z nejdůležitějších chemických procesů doprovázejících pražení kávy [35].

V pražičkách jsou během celého procesu pražení vysoké teploty, které se různě mění. Během této doby se škroby mění na jednodušší cukry, které dále karamelizují. Odbourávají se kyseliny a tvoří se nové, např. kyselina propanová vzniká ze ztráty methylové skupiny 3-methylbutanové kyseliny. Bílkoviny se postupně rozkládají na peptidy, buněčná struktura praská a na povrchu kávových zrněk můžeme pozorovat oleje. Pražením se ze zrněk odpařuje vlhkost a uniká CO₂. Zároveň dochází ke vzniku Maillardových produktů, které ovlivňují aroma a chuť a káva získává tmavší barvu. Za tmavnutí jsou nejvíce odpovědny právě koncové produkty Maillardovy reakce-melanoidiny. Téměř všechny látky, které jsou obsažené v pražených zrnkách, jsou ve vodě rozpustné a díky tomu jsou schopny se louhovat [35, 36, 44, 45].

2.2.2. Příprava kávy

Předpokladem pro přípravu lahodného nápoje je čerstvá a dobře umletá káva. K umletí kávy se kdysi používal mlýnský kámen, což byla ale těžká a časově náročná práce. O něco jednodušší bylo použití hmoždíře a paličky. V dnešní době se však používají elektrické mlýnky, které umožňují rychlé a jednoduché mletí. [35]

Zrnka kávy jsou schopny pohlcovat vlhkost a pachy. Zároveň kávu degraduje kyslík a světlo, což je důvod, proč je vhodné kávu vždy kupovat čerstvou nebo ji dobře skladovat a mlít, pokud možno těsně před přípravou kávy. Čím jemněji je káva namletá, tím kratší doba louhování je potřeba [36].

Správné espresso má přesně dané parametry, jak by se mělo připravovat. Připravuje se z 8 g namleté kávy, má objem 25-35 ml, teče 20-30 s, tlak musí být 9 barů a teplota vody je okolo 90 °C. Správná pěna na espresso by měla být krémová s oříškově-čokoládovou barvou a s červenými až tygrovými odlesky. Měla by být bez velkých bublinek a při rozhrnutí lžičkou by se měla vracet nazpět. Espresso těchto kvalit lze připravit pouze profesionálním kávovarem [36].

Domácí poloautomatické a automatické kávovary mají různou konstrukci. Mohou být pákové, bezpákové nebo plně automatické. Některé mají v sobě dokonce zabudovaný elektrický mlýnek. Nedostatkem u těchto domácích kávovarů je, že používají slabší

vibračního čerpadlo, a ne klasické čerpadlo jako u profesionálního kávovaru, které vidáme v kavárnách. Tlak pak při přípravě kávy kolísá a nedokážeme dosáhnout na tlak 9 barů, který je potřeba k přípravě kvalitního espressa [36].

Kapslové kávovary fungují na jiném principu než klasické velké kávovary. Díky vibračnímu čerpadlu dojde spíše k překapávání než k přetlačení, jako u espressa. V kapslích je namletá káva o různé kvalitě a vakuově uzavřena. Z hlediska tvorby odpadu je zde tedy kromě samotné kávy navíc plastová či hliníková kapsle [36].

Mezi pomůcky, které nepotřebují elektroniku a jsou skladnější, patří french press, vakuum pot, džezva nebo moka express. Mezi další pomůcky, jak připravit kávu řadíme chemex, aeropress, coffe dripper (V60) nebo hand espresso [36]. Káva připravená těmito pomůckami má jiný charakter než klasické espresso. Každý způsob přípravy kávy má své příznivce. Lze předpokládat, že odpad vznikající různým způsobem přípravy kávy se liší a bylo by zajímavým námětem pro budoucí studie sledovat rozdíly v odpadech z různých způsobů přípravy kávy a možnosti jejich zpracování. Dále budou krátce popsány tyto další způsoby přípravy kávy.

French-press je nádoba s filtrem, která byla vynalezena ve Francii, a jedná se o přípravu kávy, která patří mezi nejjednodušší. Pro výrobu kávy z french pressu je potřeba více hrubě namletá káva. Další pravidlem je, že se káva nesmí zalívat vroucí vodou. Ideální teplota je okolo 92-96 °C a doba extrakce nesmí přesáhnout 3-4 minuty. Pokud by se louhovalo déle, došlo by k vyextrahování tříslovin do kávy. Proto je nutné po stlačení kávy ihned podávat nebo přelít do jiné konvice [36].

Pomocí vakuum potu si lze velmi efektivně připravit poměrně kvalitní kávu. Vakuum pot se skládá ze dvou skleněných baněk, které jsou spojeny trubicemi a odděleny filtrem. Některé vakuum poty obsahují tento filtr skleněný, takže ho nemusíme vyměňovat a nevzniká tímto další odpad v podobě papírového filtru, avšak se s ním hůře pracuje. Vedle toho se používají látkové filtry, které je ale třeba oplachovat a v určitých intervalech vyměňovat. Do spodní skleněné nádoby se nalije voda, která se nechá vařit nad vařičem. Při zahřívání vzniká pára a tlak, který vytlačí vodu ze spodní baňky přes trubici do vrchní nádoby. V okamžiku, kdy je vrchní nádoba plná vody, tak se do vrchní části nasype káva (60 g kávy na 1 l vody). Existuje také varianta, kdy je káva ve vrchní nádobě přítomna už před „nasátím“ vody. Asi jednu minutu se káva louhuje a suspenzi mícháme dřevěnou vařečkou. Poté se zhasne kahan, ve spodní části se pára začne smršťovat, vytvoří se podtlak a vylouhovaná káva začne stékat zpět dolů [36].

Moka express je konvička, která dokáže nejlépe nahradit chuť espressa, neboť káva z ní je opravdu silná. Moka konvička má tři části. Do spodní nádobky se nalije voda, nad nádobkou s vodou je střední sítko na kávu a ve vrchní části nám vzniká výsledná káva. Tento princip je podobný vakuum potu. Při ohřívání vody dochází k uvolňování páry,

v nádobce se zvyšuje tlak a pára se roztahuje. Tím to se voda vytlačí přes sítko s kávou. Káva nakonec vyteče přes trysku, která je ve vrchní části nádoby [36].

Příprava kávy v džezvě patří mezi nejstarší způsoby. Je potřeba, aby káva byla opravdu jemně namletá a džezva se postupně, pomalu ohřívala a nechá se třikrát vzkypět. Turecká káva, jak se přezdívá kávě z džezvy, se málokdy vaří samotná. Přidávají se do ní další ingredience jako je např. cukr, různé sirupy, alkohol, vanilka, čokoláda, pepř nebo chilli [36].

Po klasickém zpracování kávových zrn, lze dalším postupem získat instantní kávu. Pražená namletá káva se uvaří s vodou a následným odpařením vody a vysušením se získá kávový extrakt. Sušení může probíhat buď metodou rozprašování (sprejováním) nebo sušení mražením. Sušení rozprašování spočívá ve společném vstříkávání kávového extraktu s horkým vzduchem do vysoké věže. Díky horkému vzduchu se voda vypaří a na dnu věže je pouze vysušený kávový extrakt. Nevýhodou instantní kávy je samozřejmě její chuť, která se klasické kávě příliš nepodobá. Instantní kávu také musíme dodatečně chemicky aromatizovat, aby získaly svou typickou kávovou vůni a chuť. Pomocí metody sušení mražením, která je nákladnější, lze tolik ceněné aroma zachovat. Sušení probíhá při teplotě kolem $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, s následným využitím sublimace je led extrahován ze zmražených granulí kávy [46].

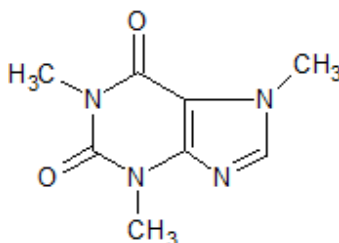
Ať už ze zdravotních důvodů nebo jiných, tak mnozí lidé upřednostňují kávu bez kofeinu. Káva bez kofeinu byla objevena náhodou, kdy kávová zrna byly znehodnocena mořskou vodou po potopení lodi. Prodejce po přípravě kávy z těchto zrn, ochutnání a analýze zjistil, že kromě slaného nádechu káva neutrpěla na chuti a je zbavena kofeinu. Právě kvůli nežádoucím účinkům kávy byla bezkofeinová káva objevena a propagována nacisty, kteří vedli zdravotní kampaň, jako součást politiky pro zachování árijské rasy [47]. Kofein se z kávy odstraňuje dvěma způsoby. První je tzv. „evropský proces“, kdy se káva namáčí ve vodě a poté se promývá methylenchloridem, který absorbuje kofein z kávových bobů. I přesto, že se káva poté opláchne vodou a vysuší, tak v chuti zůstanou náznaky chemické příchutě. Na druhou stranu káva neztrácí svou chuť a aroma. Druhý proces je tzv. „Švýcarský vodní proces“, kde se nevyužívá žádné přidané chemikálie. Káva se luhuje v horké vodě. Kofein se poté odstraní pomocí filtru s aktivním uhlím, a poté se kávové boby opět namáčí ve stejném roztoku, který je již zbaven kofeinu. Taková to zrna tedy v sobě neobsahují žádnou chemickou pachut', ale na filtru jsou zachytávány i éterické oleje a aromata, čímž tedy káva ztrácí chuť a aroma. Proto se pro tuto metodu spíše využívá káva arabika, která na své kvalitě utrpí méně než káva robusta [48, 49].

2.2.3. Chemické složení kávových zrn, kávy a odpadu vznikajícího při její přípravě

Složení kávových zrn a následně kávy se dramaticky liší v závislosti na tepelném profilu, který se používá během procesu pražení. Složení také závisí na původním složení zelené nezralé kávy, tedy v genetických rozdílech v rostlině, na sezóně sklizně a zeměpisném původu. V neposlední řadě závisí na zpracování před a po sklizni, stejně jako na přítomnosti vadných bobů a stupni zralosti [45]. Předchozí kapitoly rovněž ukazují, že chemické složení nápoje je významně ovlivněno technikou jeho přípravy (způsobem extrakce).

Mezi nejznámější a nejdůležitější látky, které kávová zrna a samotná káva obsahuje, patří kofein, jehož fyziologické účinky byly hojně prostudovány. Další látky, které jsou v kávě obsaženy, jsou melanoidiny, fenolické látky, mezi nimi s velkým významem potom chlorogenové kyseliny (CGA), kávová kyselina, chinová kyselina, polysacharidy, proteiny, tuky, voda, minerální látky a řada těkavých látek [50]. Mezi těkavější sloučeniny přítomné v pražené kávě patří aldehydy, ketony, alkoholy, estery, heterocykly obsahující dusík (pyrazin, pyridin, pyrol), furany, kyseliny (kyselina octová, kyselina propanová, kyselina 3-methyl-2-butenová), těkavé fenolické sloučeniny [45].

Kofein je purinový alkaloid, 1,3,5-trimethylxanthin (Obr. 4). Kofein se vyskytuje v listech, semenech a v plodech u více jak 60 druhů rostlin. Množství kofeinu v připraveném nápoji lze ovlivnit způsobem přípravy nálevu (teplotou vody, dobou extrakce apod.) [51]. Pro příklad překapávaná káva obsahuje 115-175 mg kofeinu ve 100 ml a instantní káva 60-100 mg [52]. Několik studií naznačuje, že pomocí kávy lze předcházet několika chronickým onemocněním včetně diabetu typu 2. Avšak větší spotřeba kávy je spojena s větším rizikem kardiovaskulárních onemocnění a zvýšením krevního tlaku. Obzvláště některé skupiny lidí, včetně dětí a starších osob, mohou být náchylnější k negativním účinkům kofeinu [53].



Obr. 4: Struktura kofeinu.

Další typické sloučeniny v kávě, které jsou důležité pro chuť nebo její bioaktivitu jsou trigonelin, kyselina nikotinová a sacharóza. Trigonelin je pyridinový derivát, který nepřímo přispívá ke tvorbě již zmíněných aromatických produktů (furan, pyrazin apod.) při

pražení kávy. Demethylací trogenelinu při pražení kávy vzniká kyselina nikotinová a ve vodě rozpustný vitamín B₃ známý také jako niacin. Káva je významným zdrojem kyseliny nikotinové. Navíc, byly popsány protirakovinové účinky trigonelinu. Obsah kofeinu, trigonelinu, kyseliny nikotinové a sacharózy v komerční kávě je ovlivněn druhem kávy [54]. Poměr obsahu trigonelinu a kofeinu také může být jedním z indikátorů stupně pražení v kávovém průmyslu, kdy obsah trigonelinu ve srovnání s obsahem kofeinu klesá [52, 54, 55].

Polyfenolické sloučeniny vyskytující se v kávě vykazují různou biologickou aktivitu a mají mnoho potenciálních přínosů pro zdraví. Chemická struktura některých polyfenolů (diadzin, rutin, genistin atd.), složená z několika aromatických kruhů a hydroxylových skupin se podobá struktuře 17 β -estradiolu. Díky tomu jsou označovány jako „fytoestrogeny“. Některé fytoestrogeny vykazují slabou estrogení aktivitu a byly klasifikovány jako „látky poškozující endokrinní aktivitu“. Na druhou stranu, je potenciálně možné je využívat jako přirozené hormony pro léčbu rakoviny, postmenopauzálních symptomů, zlepšování mužských reprodukčních schopností, antioxidační látky, látky snižující riziko kardiovaskulárních chorob atd. [56].

V průběhu pražení kávových zrn dochází k Maillardově reakci mezi sacharidy a proteiny (peptidy či volnými aminokyselinami) za vzniku melanoidinů (vysoko a nízkomolekulární produkty Maillardovy reakce). Melanoidiny ovlivňují organoleptické vlastnosti kávy a nápoji poskytují příjemnou chuť a vůni. Melanoidiny mají antimikrobiální, antioxidační, antiradikální a chelatační aktivitu. Byly však popsány i jejich negativní účinky jako je mutagenita, karcinogenita nebo jejich cytotoxicita [57].

Nicméně, v případě delšího pražení začnou převažovat látky jež jsou původci hořké a spálené příchutě a vůně. Hořkost kávy způsobují především produkty dehydratace, dekarboxylace a následných reakcí chlorogenových kyselin. Jsou to především laktony pocházející z chlorogenové kyseliny a fenylyndany, což jsou produkty rozkladných reakcí laktonů, které způsobují hořkou chuť. Bylo odhadnuto, že jen asi z 10-30 % je hořká chuť způsobena kofeinem [51, 58].

Další sloučeninou, kterou lze nalézt v pražených kávových zrnech jsou atraktylosidové deriváty (ATR). Tyto diterpenoidní glykosidy se přirozeně vyskytují v rostlinách a bývají součástí i přírodních doplňků pro své žádoucí účinky, kdy působí jako antipyretikum a diuretikum. Na druhé straně ATR mají i toxické účinky. Bylo popsáno, že inhibují mitochondriální oxidační fosforylaci, kdy dochází k blokování přenosu adenosin nukleotidu [57, 59].

Třísloviny, nebo také taniny, jsou fenolové sloučeniny, které jsou příčinou trpké, či svíravé chuti. Tato trpkost lze u kávy odstranit, či zmírnit, přidáním mléka, kdy dochází k interakci tříslovin s proteiny mléka. Rozlišujeme hydrolyzovatelné třísloviny a

kondenzované třísloviny. Hydrolyzovatelné třísloviny jsou polymery esterů kyseliny gallové. Kondenzované třísloviny jsou polymery proanthokyanidinů, např. katechninu. Kombinací hydrolyzovatelných a kondenzovaných taninů vznikají komplexní taniny [51].

Odpad vznikající při přípravě kávy má obdobné složení jako kávová zrna a káva. Stejně jako kávová zrna je kávový odpad bohatý na polysacharidy, které mají strukturu celulózy a hemicelulózy. Strukturu hemicelulózy tvoří manóza, galaktóza, glukóza a arabinóza. Dále je bohatý na ligniny a bílkoviny [40, 58n]. Zatímco Mussatto a kol. [58n] uvádějí, že v kávovém odpadu je nejhojněji zastoupen K, následován P a Mg, Ballesteros a kol. [40] uvádějí, že z minerálních prvků je největší množství Fe, a K je až na sedmém místě po Na, Mn, Al, Cu, Co. Z tohoto je patrné, že složení kávového odpadu se může různit a závisí hned na několika aspektech jako je chemické složení zelených kávových zrn a jejich následném zpracování.

2.2.3.1. Analýza složení kávy chromatografickými metodami

Kávu lze analyzovat řadou instrumentálních analytických metod. Velmi významná je nukleární magnetická rezonance (NMR) [61, 62], dále je používána UV/VIS spektroskopie [63], NIRS [64]. Zásadní význam mají v analýze kávy metody chromatografické, zejména plynová a kapalinová chromatografie.

Ryan a spol. [65] analyzoval těkavé látky z pražených kávových zrn (arabika a robusta) pomocí dvourozměrné plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem, který byl vybaven analyzátozem doby letu (GCxGC-TOFMS) a svá data porovnávali s daty z dvourozměrné plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem (GCxGC-FID). Vzorky byly upravovány mikroextrakcí tuhou fází (SPME) a zvláštní pozornost byla věnována pyrazinovým složkám vyskytujícím se na povrchu pražených zrn. Jak je zmíněno výše, pyraziny hrají významnou roli v aromatickém profilu kávy. Tato studie potvrzuje identifikaci jednotlivých analyzovaných látek.

Polyfenolové a fenolové sloučeniny se v kávě stanovují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS a fluorescenční detekcí (LC-UV). Velmi významnou technikou je spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (MS), nejčastěji s ionizací elektrosprejem (LC-ESI-MS). Často je využíváno tandemových hmotnostních spektrometrů nabízejících vysokou selektivitu a identifikační schopnosti (LC-MS/MS) [54, 56, 66].

Metoda HPLC-UV je vhodná pro kombinovanou analýzu kofeinu, trigonelinu a kyseliny nikotinové. Analýza sacharózy a dalších sacharidů, které se rovněž v kávě vyskytují, se obvykle provádí pomocí HPLC s detekcí indexu lomu [54]. Z důvodu tedy, že tyto čtyři látky nejde současně analyzovat vedle sebe pomocí jedné metody se Perrone a spol. [54] snažili vyvinout metodu LC-MS s ionizací elektrosprejem pro současnou

kvantifikaci všech těchto látek. Pro chromatografickou separaci byla zvolena kolona Spherisorb S5 ODS2 Microbore, která byla udržovaná na konstantní teplotě. Mobilní fáze byla složena z 0,3 % HCOOH ve vodě (A) a methanolu (B), při průtoku 0,2 ml/min. Kolona byla ekvilibrována na 25 % B a po nástřiku vzorku gradientovou elucí byl tento poměr změněn na 60 % B do konce analýzy (6 min). Od 0 do 2,2 min byl ESI zdroj v negativním módu pro analýzu aduktu kyseliny mravenčí a sacharózy $[M+HCOO]^-$ a poté byl ionizační mód přepnut do pozitivního režimu (2,2 do 6 min), kdy byl analyzován $[M+H]^+$ kofein, trigonelin a kyselina nikotinová. Analýza různých komerčních vzorků kávy ukázala, že tato metoda může být aplikována na širokou škálu káv nabízených na trhu a je dobrou alternativou pro rutinní analýzu díky své stálosti a citlivosti.

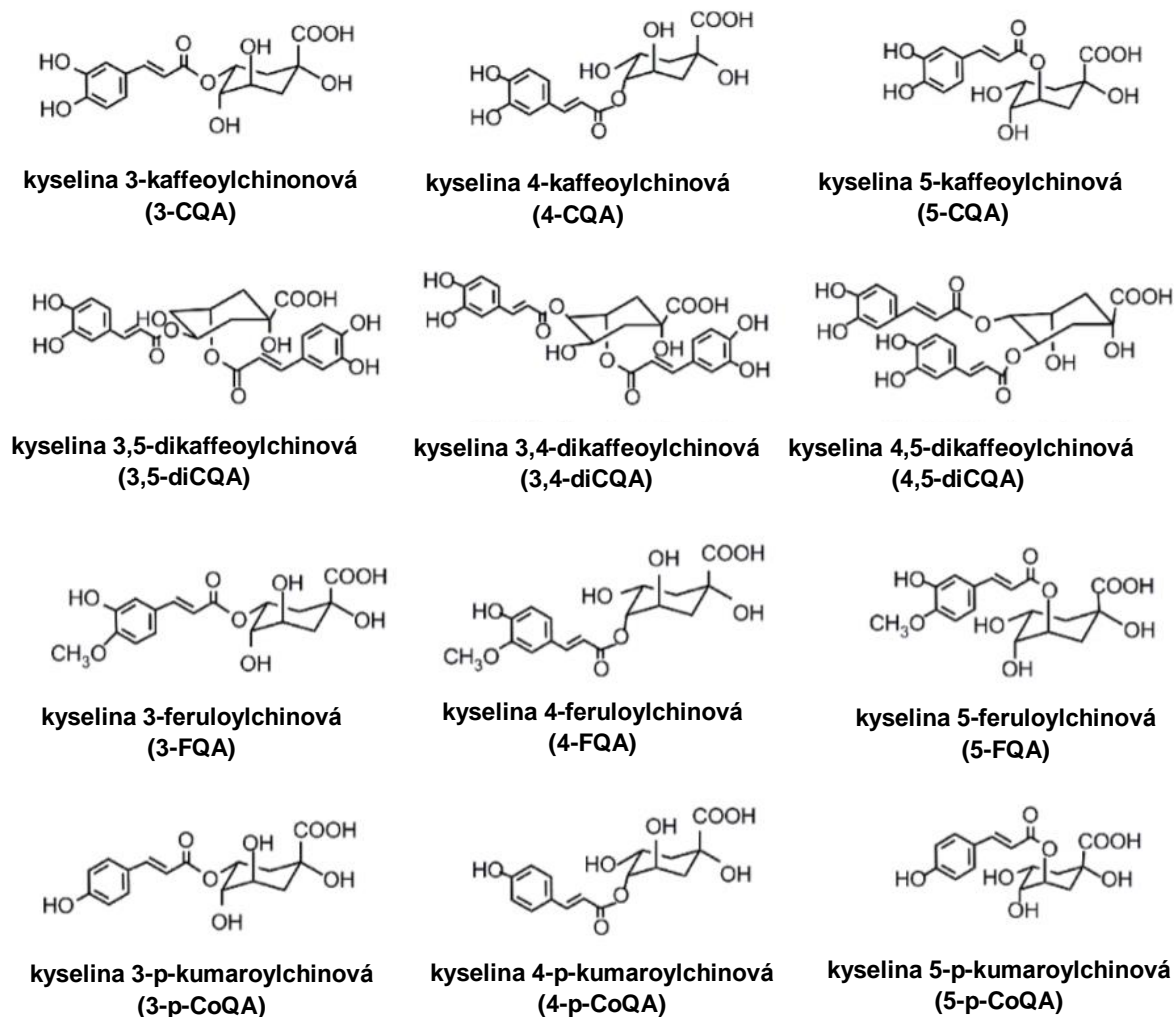
Techniky používané pro extrakci polyfenolů z kapalných vzorků (např. káva, zelený čaj, hroznový džus) zahrnují extrakci kapalina-kapalina, SPE a SPME. Tyto techniky jsou však časově náročné, dochází ke spotřebě organických rozpouštědel a SPE/SPME materiálů. Rychlejší a jednodušší způsob přípravy je postup „zředit a střílet“ (dilute and shoot), která poskytuje dostatečnou citlivost a selektivitu ve zředěných vzorcích [56]. Tuto techniku „zředit a střílet“ využila pro LC-MS/MS analýzu Sapozhniková a kol. [56]. Metoda umožňovala stanovení celé řady polyfenolických látek (isoflavony, lignany, flavony, flavan-3-oly, anthokyanidy, fenolické kyseliny). Vzorky byly desetkrát zředěny 0,05 % vodným roztokem kyseliny mravenčí a 0,2 ml vzorku bylo zfiltrováno. Interní standard genisteinu-d4 byl připraven v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ v methanolu a na jeden vzorek bylo aplikováno 0,02 ml tohoto roztoku (100 ng). Po několika sekundách byla vialka zvortexována a 20 μl vzorku bylo dávkováno. Technika LC-MS/MS byla také aplikovaná Kučerou a spol. [37] viz. kapitola 1.3. Analýza chlorogenových kyselin.

Rostagno a spol. [66] rovněž použili rychlou HPLC metodu s detektorem diodového pole (DAD) a fluorescenčním detektorem pro analýzu fenolových kyselin, flavan-3-olů, flavonů, flavonolů a kofeinu v různých typech vzorků.

2.3. Chlorogenové kyseliny

Chlorogenové kyseliny (CGA) jsou estery kyseliny kávové a kyseliny chinové. Řada konjugovaných struktur, jako jsou například kaffeoylchinové kyseliny (CQA), dikaffeoylchinové kyseliny (di-CQA), kyseliny feruloylchinové (FQA) a kyseliny p-kumaroylchinové (p-CoQA) existují v kávě v několika izomerních formách. Mezi hlavní CGA v kávě patří kyseliny 3-kaffeoylchinonová (3-CQA), 4-kaffeoylchinová (4-CQA), 5-kaffeoylchinová (5-CQA), 3,4-dikaffeochinová (3,4-diCQA), 3,5-dikaffeoylchinová (3,5-diCQA) a 4,5-dikaffeoylchinová (4,5-diCQA). Dále v menším množství jsou přítomny v kávových nápojích kyseliny 3-feruloylchinová (3-FQA), 4-feruloylchinová (4-FQA), 5-feruloylchinová (5-FQA), 3-p-kumaroylchinová (3-p-CoQA), kyselina 4-p-kumaroylchinová

(4-p-CoQA) a 5-p-kumaroylchinová (5-p-CoQA) (Obr. 5) [67]. Jako nejznámější CGA se uvádí 5-CQA, protože je z CGA nejvíce zastoupena [53].



Obr. 5: Chemická struktura nejvýznamnějších chlorogenových kyselin (převzato z článku [67]).

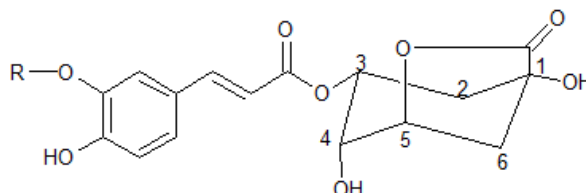
CGA jsou jedním z hlavních polyfenolů, které přijmeme pitím kávy. Tyto látky mají mnoho vlastností podporující zdraví a ovlivňují chuť kávy jako je hořkost. Kromě kávy se CGA nachází v potravinách, jako jsou jablka, artyčoky, mrkev, hrozny, kiwi, hrušky, švestky, brambory, čaj, rajčata, meruňky, zelí, lopuch a tabákové listy [51, 68, 69].

CGA jsou důležitými sloučeninami pro ochranu kávového semene před UV zářením a obranou před mikrobiálními infekcemi a býložravci [51]. CGA vykazují mnoho biologických vlastností, včetně antibakteriální, antioxidační a protizánětlivé aktivity. O CGA se rovněž ví, že působí proti obezitě, působí antidiabeticky a antihypertenzně. CGA se používá při léčbě poruch souvisejících s metabolickým syndromem, což je skupina

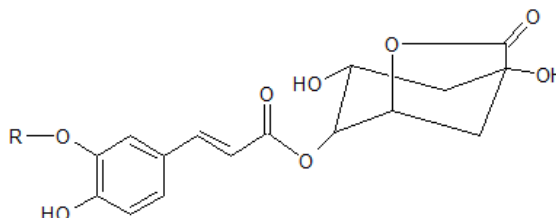
vzájemně propojených fyziologických, biochemických, klinických a metabolických faktorů, které zvyšují riziko např. kardiovaskulárních onemocnění. Proto se CGA používají jako potravinové doplňky. CGA mají antimikrobiální účinek proti širokému spektru mikroorganismů, inhibuje oxidaci lipidů, zabraňují degradaci dalších bioaktivních sloučenin a mohou tedy fungovat jako prebiotika. [57, 67-71].

Profil CGA v zeleném kávovém zrně je poměrně složitý a částečně se mění podle odrůdy kávy, zeměpisné polohy, postupem zpracování a způsobem praní/sušení, které předcházejí pražení kávových zrn [67]. Vysušený extrakt kávových zrn obsahuje 6-10 % CGA [72]. 5-CQA je nejvíce zastoupená chlorogenová kyselina v zeleném kávovém zrně v relativním obsahu až 76-84 % z celkového množství CGA [67]. Během pražení kávových zrn dochází ke snižování koncentrací CGA a to o 30-70 %, a následnou přípravou kávy se CGA dále degradují [57, 72]. Jedna porce kávy arabika obsahuje mezi 70-200 mg CGA a šálek kávy robusty 70-300 mg CGA v závislosti na stupni pražení a množství kávových zrn [71].

Během procesu pražení se sloučeniny CGA dehydratují a vznikají laktony (CGL). Mezi hlavní laktony v pražené kávě jsou γ -laktony odvozené od 3-O-cinnamoyl-L-chinové (chlorogenové) kyseliny a 4-O-cinnamoyl-L-chinové (krytochlorogenové) kyseliny, tj. 3-O-kaffeoyl-L-chino-1,5-lakton (3-O-kaffeoyl- γ -chinid, Obr. 6) a 4-O-kaffeoyl-L-chino-1,5-lakton (4-O-kaffeoyl- γ -chinid, Obr. 7). Poté to jsou také γ -laktony odvozené od 3-O- a 4-O-feruloyl-L-chinové kyseliny a jiných esterů [51].

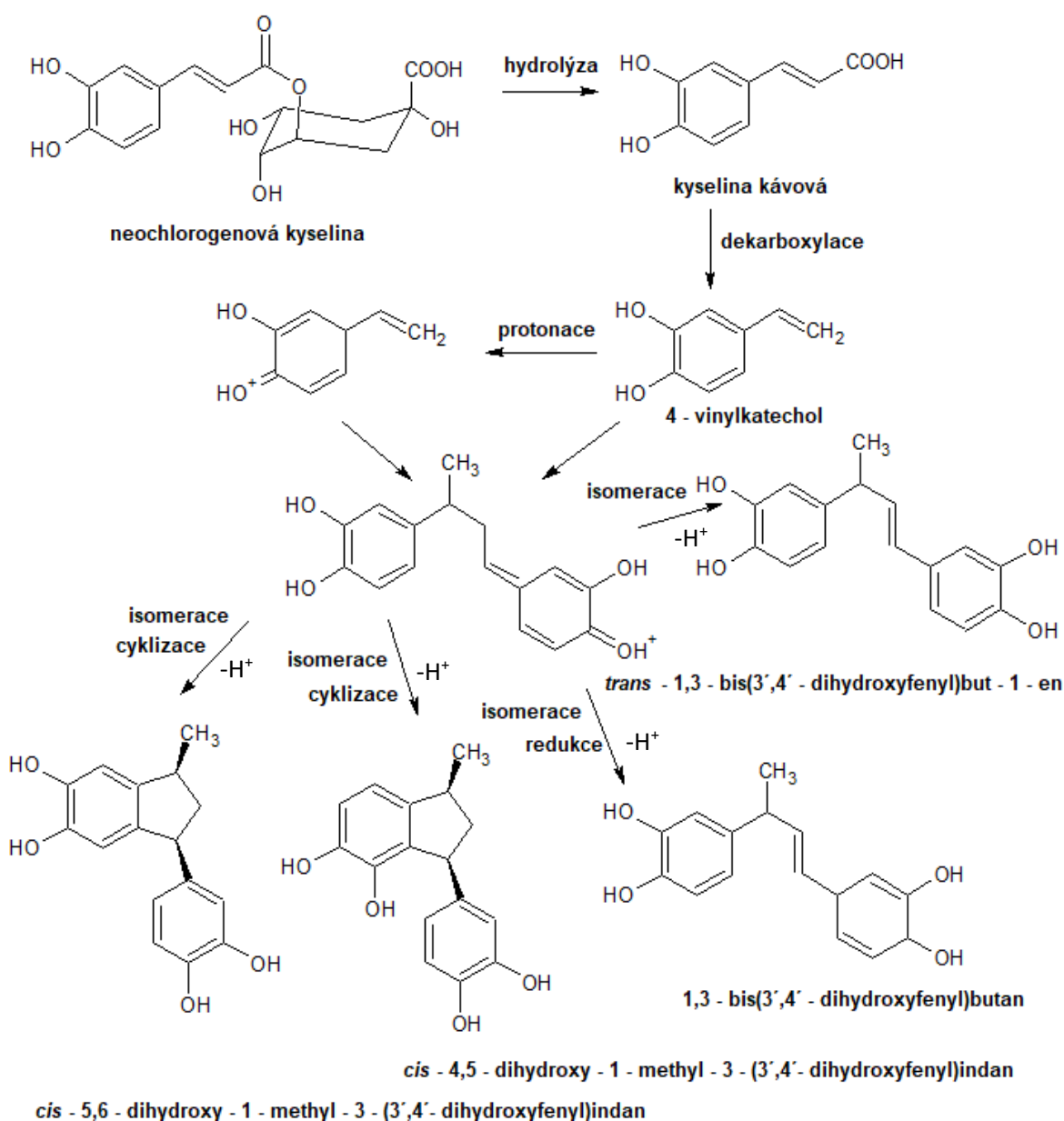


Obr. 6: 3-O-kaffeoyl-L-chino-1,5-lakton $R=H$, 3-O-feruloyl-L-chino-1,5-lakton $R=CH_3$ (převzato z knihy [51]).



Obr. 7: 4-O-kaffeoyl-L-chino-1,5-lakton $R=H$, 4-O-feruloyl-L-chino-1,5-lakton $R=CH_3$ (převzato z knihy [51]).

Nejprve probíhá hydrolýza a poté současně běží dehydratace a dekarboxylace CGA. Na obr. 8 můžeme vidět příklad, kdy z neochlorogenové kyseliny 5-O-kafeoyl-L-chinové hydrolýzou vzniká kyselina kávová a ta dekarboxylací, nebo syn-eliminací chinové kyseliny, poskytuje 4-vinylkatechol. A ten následně protonací poskytuje reaktivní elektrofilní kation se strukturou chinonmethidu. Poté probíhá kondenzace s 4-vinylkatecholem a následnými reakcemi vzniká 1,3-bis(3',4'-dihydroxyfenyl)butan, trans-1,3-bis(3',4'-dihydroxyfenyl)but-1-en, cis- a trans-5,6-dihydroxy-1-methyl-3-(3',4'-dihydroxyfenyl)-indan, cis- a trans-4,5-dihydroxy-1-methyl-3-(3',4'-dihydroxyfenyl)indan. Reakcí 4-vinylkatecholu s dalším kationtem se tvoří vyšší oligomery [51].



Obr. 8: Vznik hořkých látek z kyseliny neochlorogenové a kávové, jsou zde uvedeny pouze cis-isomery indanů (převzato z knihy [51]).

2.3.1. Analýza chlorogenových kyselin

CGA a její související laktony byly analyzovány Kučerou a spol. [57] pomocí HPLC-MS/MS. V této práci bylo zkoumáno chemické složení espressa ze 4 různě upražených kávových zrn brazilské kávy arabika (lehce, středně, středně tmavě a tmavě pražené). Na základě chemického složení, včetně obsahu CGA, pak bylo možno charakterizovat rozsah pražení v hotovém nápoji. I Clifford a kol. [73] použili techniku HPLC-MS/MS a to k rozlišení cis a trans izomerů CGA. Biosyntetické dráhy produkují trans izomery a cis izomery se získávají po ozáření UV zářením. Listy kávy obsahují více cis izomerů než trans ve srovnání s kávovými zrny. Příčinou je, že listy kávovníku jsou přirozeně více vystaveny UV zářením. Matsui a kol. [74] pomocí LC-ESI-MS/MS analyzovali devět CGA, tři izomery z CQA, FQA, diCQA a dva metabolity, kyselinu kávovou a ferulovou v lidské plazmě. Kontrolní lidská plazma byla obohacena 11 standardy těchto látek. Všechny 11 látek bylo detekováno s dostatečnou citlivostí a linearitou. Po orálním požití 250 ml nápoje obsahující extrakt ze zelených kávových zrn byla odebrána plazma, v níž byly všechny látky detekovány. Williems a spol. [75] pomocí HPLC-MS/MS analyzovali 3-CQA, 4-CQA a 5-CQA v ovocných nápojích.

Urakova a spol. [76] použili dvě chromatografické metody, vysokoúčinnou chromatografii na tenké vrstvě (HPTLC) a HPLC, pro separaci a kvantitativní stanovení CGA v extraktech zelených kávových zrn. HPTLC analýza byla prováděna na skleněných destičkách 10x10 cm Kieselgel 60 F 254 (Merck), přičemž jako mobilní fáze byla použita směs ethylacetát/dichlormethan/kyselina mravenčí/kyselina octová/voda (100/25/10/10/11, v/v/v/v/v). Detekce probíhala denzitometrickým skenováním při 330 nm bez derivatizace. Pro HPLC měření byla použita gradientová eluce s lineárním gradientem z 10 % acetonitrilu v 0,03 % trifluoroctové kyselině ve vodě na 100 % acetonitril, UV detekce byla prováděna při 330 nm. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi metodou HPTLC a HPLC pro stanovení CGA.

Gouveia a kol. [77] použili HPLC-DAD-ESI-MS/MS techniku pro stanovení CGA v rostlinách rodu helichrysum, která má řadu léčivých účinků. Metoda se ukázala být reprodukovatelná a přesná umožňující kvantifikaci 7 kaffeoylchinových kyselin (jedné monoCQA, pěti diCQA a jednoho izomeru triCQA). Během 30 minutové analýzy byly rozlišeny i izomery 1,5-O-diCQA a 3,5-O-diCQA, které jsou obvykle těžko oddělitelné. Farah a kol. [59] HPLC-DAD-MS analyzovali CGA v plazmě a lidské moči pro získání jejich farmakokinetického profilu. V plazmě byly identifikovány tři CQA, 3-diCQA, kyselina kávová, ferulová, isoferulová a p-kumarová. V moči byly identifikovány 4 fenolické sloučeniny po konzumaci CGA a to kyseliny sinapová, gallová, p-hydroxybenzoová a dihydrogenfosforečná, které odpovídají metabolické dráze CGA. Avšak jejich nízké obsahy v moči ukazují, že moč nemusí být preferovanou cestou kudy se CGA a jejich metabolity

vylučují. Na druhou stranu je velmi pravděpodobné, že mnoho metabolitů v moči odvozené od CGA nebyly pravděpodobně identifikovány.

Garrett a spol. [70] využili desorpční elektrosprej DESI-MS k analýze průřezu zeleného kávového zrna. Odhalilo se nehomogenní rozložení chlorogenových kyselin přes endosperm zrna. Kyselina chinová a kyselina feruloylchinová byly ve vysokých hladinách hlavně v tvrdém vnějším endospermu, zatímco kyselina kaffeoylchinová byla přítomná hlavně v měkkém vnitřním endospermu. Sacharóza byla přítomná v celém endospermu. Je zajímavé, že v oblasti, kde bylo zrno napadnuto hmyzem se vyskytovaly zvýšené obsahy kyseliny palmitové, kyseliny linolové, kyseliny stearové a kyseliny kaffeoyl-sinapoylchinové ve srovnání s oblastmi endospermu kávy bez příznaku napadení hmyzem. Tyto sloučeniny mohou tedy mít souvislost s obrannou funkcí při interakci mezi kávovými zrny a hmyzem.

3. Experimentální část

3.1. Přístrojové vybavení a laboratorní materiál

Po celou dobu experimentální práce byly využívány váhy Satorius (Satorius AG, Goettingen, Německo) a ultrazvuková lázeň Elma, S 40 H, Elmasonic, (Elma Hans Schmidbauer, Singen, Německo) sloužila k dodatečnému rozpouštění látek. Ke stanovení popele byl použit filtrační papír (černá páska, velikost pórů 7–8 μm , Schleicher & Schuell A.G., Feldmeilen, Švýcarsko). Centrifugace probíhala pomocí centrifugy Hettich EBA 20 a Hettich centrifugy mikro 120 (Hettich s.r.o., ČR). N pH metru WTW inoLab (INOLAB spol. s.r.o., ČR) byly měřeny hodnoty pH vzorků před započítáním anaerobní fermentace a k následné úpravě pH. Orientační měření pH vzorků digestátu po anaerobní fermentaci bylo prováděno universálními indikátorovými papírky pro pH 0-12 (Lach-ner s.r.o., ČR). Kávový odpad byl sušen sušárnou Memmert UN 110 (Memmert GmbH + Co. KG, Swabach, Německo) a zpopelněn v muflové peci laboratorní LMH (LAC s.r.o., ČR). K přečištění vzorků byla použita SPE extrakce s kolonkami Strata SDB-L (100 μm , 260 Å) 200 mg/3 ml (styren-divinylbenzen) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Pro zvýšení rychlosti SPE extrakce byl použit vakuový systém VisiprepTM SPE Vacuum Manifold (Sigma Aldrich, MO, USA). Experimenty anaerobní fermentace probíhaly na topné desce HT 11 (MERCİ s.r.o., ČR).

Složení plynné fáze anaerobní fermentace bylo analyzováno plynovým chromatografem Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) spojeným s hmotnostním spektrometrem Agilent 5975C (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Počáteční teplota kolony byla 70 °C a teplotní gradient byl následující: 0-5 min (70 °C); 5-16,33 min (70-240 °C); 16,33-20,33 min (240-300 °C); 20,33-25,33 min (300 °C). Další parametry měření byly: nástřik vzorku 1 μl , kolona Zebron ZB-5ms (5 % fenyl-arylen-95 % dimethylpolysiloxan), nosný plyn helium, průtok plynu 0,9 ml/min, rozsah MS skenu 12-120 Da, ionizace elektronem 70 eV. Kvantifikace byla prováděna vnitřní normalizací (plocha píku v rekonstruovaném chromatogramu pro studovaný plyn byla dělena celkovou plochou píku, hodnotou celkového iontového proudu, TIC, měřeného přes chromatografický pík) a vyjádřena v procentech.

Chromatografická separace digestátu byla prováděna pomocí kapalinového chromatografu Acquity UPLC (Waters, Milford, MA, USA) opatřeného binární pumpou a DAD detektorem. Separace probíhala na koloně s reverzní povrchově porézní stacionární fází Ascentis Express (100 mm x 2.1 mm, 2.7 μm , Supelco, USA). Mobilní fáze byla složena z kyseliny mravenčí ve vodě 0,1 % (v/v) (mobilní fáze, MF, A) a kyseliny mravenčí v methanolu 0,1 % (v/v) (MF B). Profil gradientu byl následující (% v/v): 0-5 min (10 % B),

5-55 min (10-100 % B) a 55-60 min (100-10 % B). Mobilní fáze měla po celou dobu analýzy průtok 0,35 ml/l, teplota autosampleru byla 10 °C a vyhřívání kolony bylo nastaveno na 25°C. Nástřikový objem byl 5 ul. Detekce byla mimo DAD také prováděna s využitím vysokorozlišujícího tandemového hmotnostního spektrometru Synapt G2-S (Waters). Parametry přístroje byly: ionizace elektrosprejem v negativním módu, napětí 2,5 kV, teplota zdroje 120 °C, sample cone 40 V, teplota desolvatačního plynu 400 °C, průtok cone gas 100 l/h a průtok desolvatačního plynu 600 l/h. Jako desolvatační plyn byl použit dusík. Měření probíhalo ve dvou cyklicky se opakujících skenech s nízkou (CE = 4 eV) a vyšší kolizní energií (CE = 20 eV) vkládanou na kolizní celu Trap. Doba analýzy byla 60 min. Sběr a vyhodnocení dat probíhalo v programu MassLynx 4.1 (Waters).

3.2. Chemikálie

K anaerobní fermentaci byl použit kávový odpad z kávy tvořené z 80 % odrůdou arabika (Brazílie, Indie, přesný poměr je chráněn obchodním tajemstvím) a ze zbylých 20 % robustou (Indie) (KAFFE KÓDO s.r.o., ČR). Pro zvýšení efektivity anaerobní fermentace byl kávový odpad smíchan s vepřovou kejdou dodanou panem Květoslavem Mückem. K charakterizaci kávového odpadu byly použity následující chemikálie: H₂SO₄ 95% (p.a., PENTA, ČR), KOH (p.a., PENTA, ČR), NH₄OH (p.a., PENTA, ČR), HCl 35% (p.a., Lachner s.r.o., ČR), hexan (p.a., Lachner s.r.o., ČR) a ethanol (Fischer Chemicals, Švýcarsko). Roztok Fehling I byl připraven rozpuštěním 6,9 g CuSO₄·5H₂O (p.a., PENTA, ČR) ve 100 ml H₂O a Fehling II rozpuštěním 34 g KNaC₄H₄O₆·4H₂O (p.a., PENTA, ČR) a 10 g NaOH (p.a., PENTA, ČR) také ve 100 ml H₂O. Carrezův roztok I byl připraven rozpuštěním 15 g K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O ve 100 ml H₂O a Carrezův roztok II rozpuštěním 30 g ZnSO₄·7H₂O rovněž ve 100 ml H₂O. Dalším používaným materiálem byly methanogení bakterie APD BIO GAS (MetBac, BAKTOMA s.r.o., ČR) a thioglykolátové médium (TGM, NEOGEN, MI, USA). Pro SPE metodu, následnou přípravu vzorků a MF se používal methanol (HPLC grade, VWR Chemicals, PA, USA) a HCOOH 99,7% (p.a., Lachner s.r.o., ČR). Deionizovaná voda byla získána z dvoustupňové deionizační stanice Milipore Direct Q UV (Milipore S.A.S, Francie).

3.3. Pracovní postupy

3.3.1. Charakterizace materiálu

Ve vzorku kavárenského odpadu, kterému se dále v textu říká zkráceně káva, byly na počátku experimentu stanoveny následující parametry: vláknina, cukr, škrob, tuk a popel. Metody pro stanovení cukru a tuku byly modifikovány, jak je uvedeno dále. Elementární analýza kávy byla provedena na Katedře anorganické chemie, PŘF UP.

Vláknina se stanovovala metodou podle Henneberga a Stohmanna. 5 g suchého vzorku bylo přesypáno do 500 ml Erlenmayerovy baňky s rovným dnem. Přidalo se 200 ml 1,25% H_2SO_4 . Tato suspenze se vařila pod zpětným chladičem na vodní lázni 45 min, přičemž během této doby se několikrát obsah opatrně promíchal. Následně se baňka ochladila a obsah se odstředil na centrifuze při 6000 ot/min po dobu 5 min a byl vzniklý supernatant oddělen. K nerozpustnému zbytku bylo přidáno 200 ml 1,25% KOH. Tato směs se směs vařila na vroucí vodní lázni pod zpětným chladičem 30 min a byla průběžně opatrně promíchávána. Baňka se nechala 5 min stát a tuhý podíl se odfiltroval přes dva na sobě položené a předem zvážené filtrační papíry nízké hustoty přes Büchnerovu nálevku, a to nejprve za atmosférického tlaku a poté za mírného podtlaku. Ke zbylému podílu v Erlenmayerově baňce se přidalo 100 ml horké destilované vody a vzniklá suspenze byla převedena na filtrační papír. Tuhý podíl na filtračním papíru se následně promyl 30 ml ethanolu. Filtrační papír s tuhým podílem na předem zvážených Petriho miskách byl sušen při 105 °C po dobu 40 min. Tento postup byl převzat z literatury [78].

Při vážkovém stanovení cukru se 2 g vzorku 3x extrahovaly destilovanou vodou, pokaždé 10 min v ultrazvuku. Následně se vzorek zcentrifugoval a supernatant se dekantoval do 25 ml odměrné baňky a přidalo se 0,5 ml Carrezova roztoku I a po promíchání 0,5 ml Carrezova roztoku II. Sraženina se odfiltrovala, promyla a přefiltrovaný roztok se přelil zpátky do 25 ml odměrné baňky. Následovala inverze cukrů pomocí 2 ml HCl při 70 °C po dobu 10-15 min, poté neutralizace 4 ml 5M NaOH a vzorek byl doplněn na celkový objem 25 ml. Po centrifugaci se vzorek povařil s 15 ml roztoků Fehling I +a II v kádince po dobu 10 min. Nakonec proběhla filtrace přes předem zváženou fritu a sušení vzniklého produktu při 80 °C po dobu 2 hodin. Postup byl převzat z literatury [79] a modifikován.

Škrob byl stanoven metodou podle Raska. 2 g vzorku byly rozetřeny v kádince s 10 ml 20% HCl. Do kádinky bylo přidáno přibližně stejné množství vody, jaký byl objem suspenze v kádince. Následně se provedla filtrace a filtrát se vysrážel 25 ml ethanolu. Centrifugace proběhla v předem zvážené zkumavce a poté se zkumavka sušila při 70 °C 2 hod [80].

Pro stanovení tuků se 2 g vzorku navážily do plastové centrifugační zkumavky, přidal se hexan o objemu 10 ml a vzorek byl protřepáván, aby došlo k rozptýlení kavárenského odpadu v rozpouštědle. Následně byla zkumavka vložena do ultrazvukové lázně po dobu 15 min. Vzorek byl poté zcentrifugován a supernatan odebrán do čisté vialky o objemu 20 ml. Celý proces se vzorkem se následně opakoval, ale po ultrazvukové lázni byl vzorek navíc vložen do sušárny na 10 min při teplotě 70 °C. Po vytáhnutí se zkumavka protřepala, zcentrifugovala, hexanový roztok byl převeden do malé kádinky již obsahující první hexanový extrakt, rozpouštědlo bylo odfoukáno a netěkavý tukový podíl byl zvážen. Postup byl převzat z práce [79] a modifikován.

Popel byl se stanoven po spálení a vyžihání v muflové peci při 600 °C po dobu 60 min v předem zváženém porcelánovém kelímku s 0,5 g kávy. Vlhkost se stanovovala v porcelánovém kelímku s 5 g kávy sušením v sušárně při 105 °C 2 hod [79].

3.3.2. Optimalizace poměru vstupních surovin pro dosažení methanogeneze

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je potřeba do roztoku kávy a vody přidat methanogenní bakterie a/nebo činidlo thioglykolát, které se používají k usnadnění degradace organického materiálu v čističkách odpadních vod, když je anaerobní bakteriální aktivita snížena [81].

Pro sledování průběhu AD byly založeny tři reakční směsi. Vzorek 1: 4,5 g kávy + 30 ml H₂O, vzorek 2. 4,5 g kávy + 30 ml H₂O + 300 µl bakterií a vzorek 3: 4,5 g kávy + 30 ml roztoku thioglykolátu + 300 µl bakterií. Roztok bakterií měl koncentraci 5 mg/100 ml a roztok thioglykolátu měl koncentraci 29,8 g/l. V průběhu anaerobní fermentace dochází v první fázi k tvorbě oxidu uhličitého, který výrazně snižuje pH celé reakční směsi. Optimální podmínky pro methanogenní bakterie se pohybují v rozmezí pH 6,5-7,2 [8]. Pro zajištění optimálního pH pro fermentaci bylo provedeno měření pH vodného výluhu kavárenského odpadu o koncentraci 1,5 g/10 ml. pH roztoku bylo 5,85. Bylo tedy nutné zvýšit pH. To bylo provedeno 2 M NH₄OH (250 µl/10ml). Takto bylo pH zvýšeno na 8,13. Na základě tohoto pokusu se do vzorků 1-3 přidalo po 750 µl 2 M NH₄OH. Vzorky byly uzavřeny šroubovým uzávěrem s PTFE/silikonovým těsněním v 60 ml lahvičkách a zahřívány na 37 °C. Fermentační experiment s těmito vzorky probíhal 2 týdny. Stanovení plyných složek ve vnitřní atmosféře reaktoru bylo provedeno pomocí plynového chromatografu ihned po zahájení pokusu a po 2 týdnech. Pro zjištění vlivu atmosférického kyslíku na proces anaerobní fermentace byl tento experiment opakován a nově připravené vzorky 1-3 byly profouknuty N₂.

Následně byl založen experiment, kde se do 60 ml lahviček navážily různé poměry vepřové kejdy a kávy (Tab. I). Snahou bylo docílit co nejefektivnější anaerobní fermentace a tento proces měla podpořit vepřová kejda, jakožto další organický substrát v praxi široce

využívaný ke ko-digesci. Všechny těchto devět směsí bylo uzavřeno šroubovým uzávěrem s PTFE/silikonovým těsněním v 60 ml lahvičkách a zahříváno tři týdny na 37 °C, přičemž plynná fáze se na GC měřila každých 7 dní po dobu třech týdnů. Naměřená data umožnila vybrat nejvhodnější poměr kejda:káva pro následující hlavní fermentační experiment. Pro zabránění přetlaku v reakčních nádobách byly všechny uzávěry opatřeny bublátkem (jehla s hadičkou vyvedenou do kádinky s vodou).

Tab. 1.: Poměr kavárenského odpadu a kofermentoru (kejdy) ve studovaných směsích (vyjádřeno hmotnostmi složek)

Směs	Kejda [g]	Káva [g]
1	10	0
2	9	1
3	7,5	2,5
4	7	3
5	6,5	3,5
6	6	4
7	5	5
8	2,5	7,5
9	1	9

3.3.3. Analýza složení plynné fáze a vzniklého digestátu v průběhu hlavního fermentačního experimentu

Hlavní fermentační experimenty byly provedeny dvěma způsoby: 1) ve vnitřním prostoru reaktoru byla okolní atmosféra (anaerobní fermentace 1); 2) reaktor byl profouknut dusíkem a kyslík obsažený v atmosféře byl z plynné fáze fermentoru odstraněn (anaerobní fermentace 2). Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv vzdušného kyslíku na počátek anaerobní digesce se zaměřením na methanogenezi.

Pro hlavní experiment anaerobní fermentace 1 kavárenského odpadu byla vybrána směs kejda:káva 1:1. Do 250 ml nádob (Pyrex) bylo naváženo 20 g vepřové kejdy a 20 g kavárenského odpadu a přidáno 120 ml destilované vody. Nádoby byly následně uzavřeny pomocí šroubovacích víček s provrtanými otvory a septy. Z důvodu vznikajícího přetlaku a bezpečnosti, byly nádoby opatřeny jehlou s hadičkou, která byla ponořena do vody (Obr. 9). Pro hlavní experiment byly připraveny tři série vzorků (po třech opakování) o různém složení: tj. kejda:káva 1:1 (m/m; 1A, 1B a 1C), kejda:káva 1:9 (m/m; 2A, 2B a 2C; 4 g kejdy, 36 g kávy a 120 ml H₂O), čistá kejda (3A, 3B a 3C; 40 g kejdy a 120 ml H₂O).

Směs s poměrem keřda:káva 1:9 je uvažována jako směs, ve které je stále přítomný kavárenský odpad, ale nedochází k efektivnímu nastartování anaerobní fermentace a ke tvorbě methanu (methanogenezi). Anaerobní fermentace probíhala 32 dnů při 37 °C. Odběr nejprve plynné fáze (1,5 ml) a následně kapalné fáze (2 ml) probíhal ihned po spuštění experimentu a poté po čtyřech dnech. Plynná fáze byla analyzována ihned, přičemž dávkovaný objem byl 1 ml. Kapalná fáze byla zamrazena při -20 °C, a takto uchována pro pozdější zpracování pomocí SPE za účelem LC/MS analýzy. Ke zmrazení došlo ihned po odebrání kapalné fáze a po provedení SPE a vysušení. Vzorek pro analýzu digestátu byl přečištěn pomocí SPE extrakce. Hodnota pH vzorků digestátu po anaerobní fermentaci byla měřena před SPE pomocí pH papírku.



Obr. 9: Probíhající anaerobní fermentace 1.

Při anaerobní fermentaci 2 došlo kromě nastavení inertní atmosféry uvnitř reaktoru také k úpravě hodnot pH pomocí konc. NH_4OH na finální koncentraci ve směsi 0,12727 M. Ve směsi s poměrem keřda:káva 1:1 došlo ke zvýšení pH z hodnoty 7,6 na 8,1. Ve směsi s poměrem keřda:káva 1:9 z 6,6 na 7,3. U vzorku obsahujícího samotnou keřdu byla hodnota pH zvýšena z 8,2 na 8,5. V průběhu experimentu byly pro lepší těsnost reaktoru s víčky omotány Parafilmem. Anaerobní fermentace 2 probíhala 36 dnů při 37 °C. Odběr vzorků a jeho úprava byly totožné s experimenty při anaerobní fermentaci 1.

Odebraná kapalná fáze digestátu z anaerobní fermentace 1 a 2 byla zpracovávána následujícím způsobem. SPE kolonky byly připojeny k vakuovému manifoldu a stacionární fáze (SF) kolonky Strata SDB-L byla aktivována 2 ml methanolu. Následně bylo organické rozpouštědlo vymyto 2 ml deionizované vody a pro zadržení látek na SF byly dávkovány 2 ml 5% kyseliny mravenčí. Následně byl nanesen 1 ml zcentrifugovaného digestátu, který byl následně promyt 1 ml 5% kyseliny mravenčí pro odstranění solí a případných dalších silně polárních složek matrice. Eluce látek z SPE kolonky byla provedena pomocí 2 ml methanolu. Získané extrakty byly odfoukány do sucha pomocí proudu dusíku. Odfoukané vzorky byly do doby analýzy uloženy při -20 °C. Odfoukaný vzorek byl rekonstituován směsí mobilních fází A a B (800 µl MF A a 200 µl MF B) v ultrazvukové lázni a před LC/MS měření byl vzniklý roztok centrifugován.

3.4. Výsledky a diskuze

3.4.1. Charakterizace materiálu

Při charakterizaci materiálu se stanovovaly tuky, cukry, vláknina, škrob, popel, vlhkost a obsah dusíkatých látek (elementární analýza). Množství vlákniny se vypočetlo podle vzorce (3), a zjištěný obsah popela byl odečten od hmotnosti vlákniny. Obsah cukrů byl získán přepočtem z Cu_2O na invertní cukr. Zjištěný obsah těchto složek v použitém kavárenském odpadu je v Tab. II. K získání obsahu dusíkatých látek (bílkoviny, alkaloidy) se použil obsah dusíku z elementární analýzy a přepočítávací faktor 6,25. Elementární analýza se prováděla na dva standardy, sulfanilamid (Tab. III) a kalibrant s obsahem 0,5 % S (Tab. IV).

$$VL = \frac{m_v}{n} 100 [\%] \quad (3)$$

m_v ... hmotnost vlákniny po vysušení v g

n ... navážka analyzovaného vzorku v g

Tab. II: Chemické složení kávy v [%]

	Obsah [%]
Vláknina	46,26
Cukry	0,26
Tuky	11,7
Škrob	3,07
Popel	2,1
N látky	14,22
Vlhkost	53,8

Tab. III: Elementární analýza kávy na standard sulfanilamid v [%]

N	C	H	S
2,25	51,17	7,12	0

Tab. IV: Elementární analýza na kalibrant s obsahem 0,5 % S v [%]

N	C	H	S
2,3	50,98	7,12	0

Součet obsahů stanovovaných složek v sušině kavárenského odpadu (vláknina, cukry, tuky, škrob, popel, N-látky) činil 77,61 %. Na základě této charakterizace můžeme říci, že odpad obsahuje přibližně 1/3 snadno rozložitelných živin (cukry, tuky, škrob, N látky) v sušině. Takovýto obsah je pro AD velmi vhodný a velmi se blíží součtu makroživin u běžně používané kukuřičné siláže (38 % v sušině) [82]. Jak již bylo poznamenáno v teoretické části diplomové práce, optimální poměr C/N pro AD je 20-30:1 [8, 12, 15]. Pro kavárenský odpad činí tato hodnota přibližně 22:1. Z těchto důvodů se jeví kavárenský odpad jako vhodný vstupní materiál do bioplynových stanic.

Významným parametrem pro správné nastavení podmínek pro anaerobní fermentaci je vlhkost materiálu. Obsah sušiny na počátku procesu by měla být do 13 % [83, 84]. Za předpokladu, že vepřová kejda obsahuje 6-8 % sušiny, by se vhodná navážka měla pohybovat kolem 15 g vysušené kávy na 100 ml vody/roztoku.

3.4.2. Volba vhodného složení organického substrátu pro hlavní fermentační experiment

Po dvou týdnech anaerobní fermentace vzorků 1-3 (1: 4,5 g kávy + 30 ml H₂O; 2: 4,5 g kávy + 30 ml H₂O + 300 µl bakterií; 3 s 4,5 g kávy + 30 ml roztoku thioglykolátu +

300 µl bakterií) byl proveden odběr plynné fáze (1,5 ml) a analýza na GC/MS. Výsledky ukázaly, že vzorek 1, kde byla obsažena pouze káva s vodou, po dvou týdnech vyprodukoval 0,913 % methanu, což je výrazně více, než ve vzorku 2 (0,014 %) a vzorku 3 (0,004 %) (Tab. V). Je překvapující, že vzorky anaerobní fermentace s atmosférou dusíku methan neposkytly (Tab. VI). V Tab. VI můžeme rovněž pozorovat vyšší množství kyslíku v reaktoru po 2 týdnech anaerobní fermentace, které bylo pravděpodobně způsobeno netěsností systému. Ze získaných výsledků byla pro další experimenty s prasečí kejdou zvolena káva s vodou bez umělého přídavku bakterií a thioglykolátového roztoku, neboť samotný roztok kávy bez podpory bakterií byl schopen účinné anaerobní fermentace. A z důvodu negativních výsledků s atmosférou dusíku, se vzorky v následujícím experimentu dusíkem neprofoukávaly.

Tab. V: Chemické složení plynné fáze po 2 týdnech anaerobní fermentace (uvedena jsou relativní procenta plynného obsahu [%])

	Po zahájení anaerobní fermentace			Po 2 týdnech		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
N₂	73,404	74,224	72,410	59,061	58,854	48,028
O₂	24,215	23,486	25,060	15,242	1,838	1,735
CO₂	0,212	0,202	0,253	17,647	34,821	47,363
Ar	2,168	2,088	2,278	4,411	4,474	2,87
CH₄	0	0	0	0,913	0,014	0,004

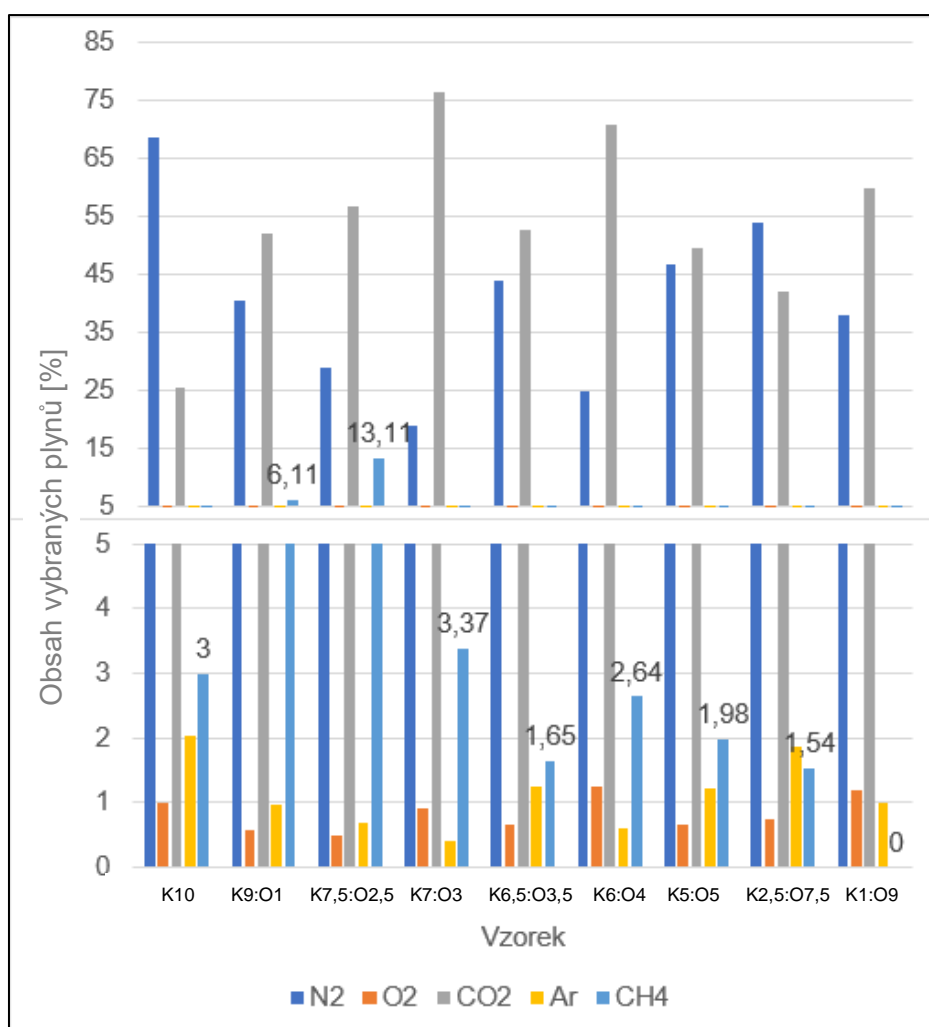
Tab. VI: Chemické složení plynné fáze po 2 týdnech anaerobní fermentace s atmosférou N₂ (uvedena jsou relativní procenta plynného obsahu [%])

	Po zahájení anaerobní fermentace			Po 2 týdnech		
	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
N₂	90,329	96,374	93,078	66,265	92,638	56,459
O₂	8,849	3,306	6,336	29,528	6,405	4,477
CO₂	0,038	0,023	0,03	1,134	0,078	38,408
Ar	0,785	0,297	0,555	3,073	0,88	0,245
CH₄	0	0	0	0	0	0

Experiment sledující vliv obsahu kejdy jako ko-fermentoru ukázal, že methan poskytují všechny připravené směsi kromě směsi 9, kde bylo přítomno největší množství kávy a nejmenší množství kejdy (Tab. VII, Obr. 10, přehled složení viz Tab. I). Na základě této informace bylo rozhodnuto, že směs kejda:káva 1:9 bude sloužit v následujících experimentech, jako směs, u které se neočekává methanogeneze.

Tab.VII: Množství CH₄ [%] během anaerobní fermentace v 1.-3. týdnu ve směsích 1-9

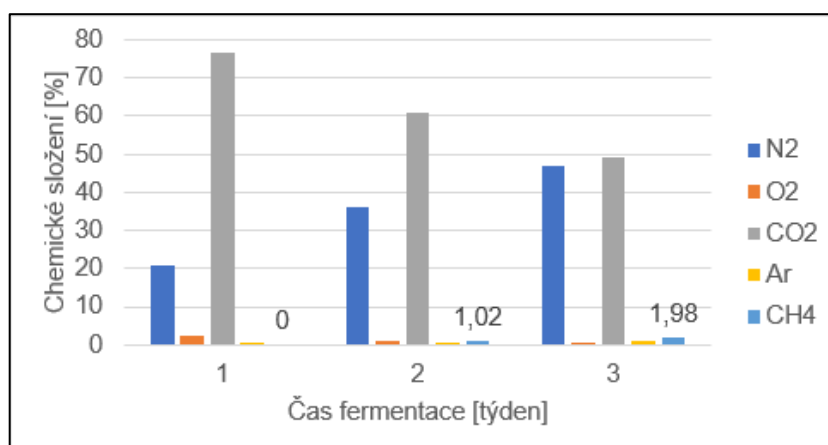
Směs	1. týden	2. týden	3. týden
1	0,42	1,83	3,00
2	0,79	2,16	6,11
3	0,002	3,24	13,11
4	0,006	2,03	3,37
5	0,16	1,34	1,65
6	0,13	1,10	2,64
7	0	1,02	1,98
8	0	0	1,54
9	0	0	0



Obr. 10: Složení plyné fáze po 3 týdnech anaerobní fermentace. K – kejda, O – kavárenský odpad (např. K9:O1 – kejda 9 g + káva 1 g).

Experiment dále ukázal, že směs 1 se samotnou kejdou sice methan produkovala už během prvního týdne anaerobní fermentace (0,42 %), ale ve směsích, kde byla přítomna i káva je obsah vznikajícího methanu vyšší. Konkrétně směs 2 (9 g kejdou a 1 g kávy) vyprodukovala už během prvního týdne 0,79 % methanu a po třech týdnech již 6,11 %. Směs 1 vyprodukovala o polovinu methanu méně, tj. 3 %. Největší výtěžek methanu byl pozorován u směsi 3 a to po třech týdnech 13,11 % (směs 7,5 g kejdou a 2,5 g kávy).

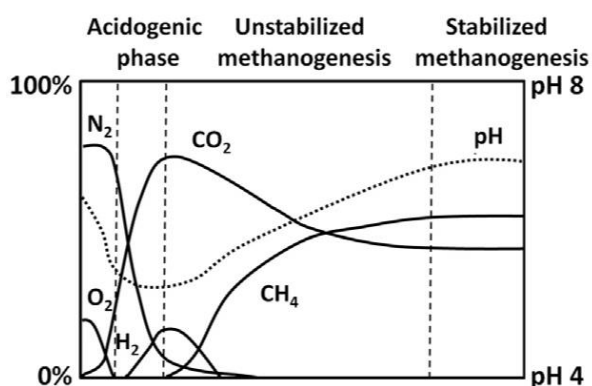
Jedním z cílů práce bylo sledovat podmínky, za kterých je možno poměrně stabilně a efektivně zplyňovat vysoký obsah kávového odpadu ve fermentační směsi. Směs 8, která obsahuje velmi vysoké množství kávy (7,5 g), sice methan po třech týdnech vyprodukovala (1,54 %), ale nástup stabilní methanogeneze nastával příliš pozdě. Z tohoto důvodu byla pro hlavní část této studie zvolena směs 7 (kejdou 5 g + káva 5 g) (Obr. 11), neboť obsahovala poměrně velké množství kávy a zároveň vyprodukovala methan po dvou týdnech anaerobní fermentace (1,02 %) a po dalším týdnu se obsah vyprodukovaného methanu skoro zdvojnásobil (1,98 %). Toto množství svědčí o stabilním procesu fermentace i v mikroměřítku za diskontinuálních podmínek, a směs 7 je tedy vhodná pro další studium složení digestátu. Od obsahu kejdou 5 g a výše, vzorky produkovaly methan už během prvního týdne anaerobní fermentace.



Obr. 11: Změny ve složení plyné fáze během anaerobní fermentace směsi 7 (obsah kejdou 5 g a kávy 5 g).

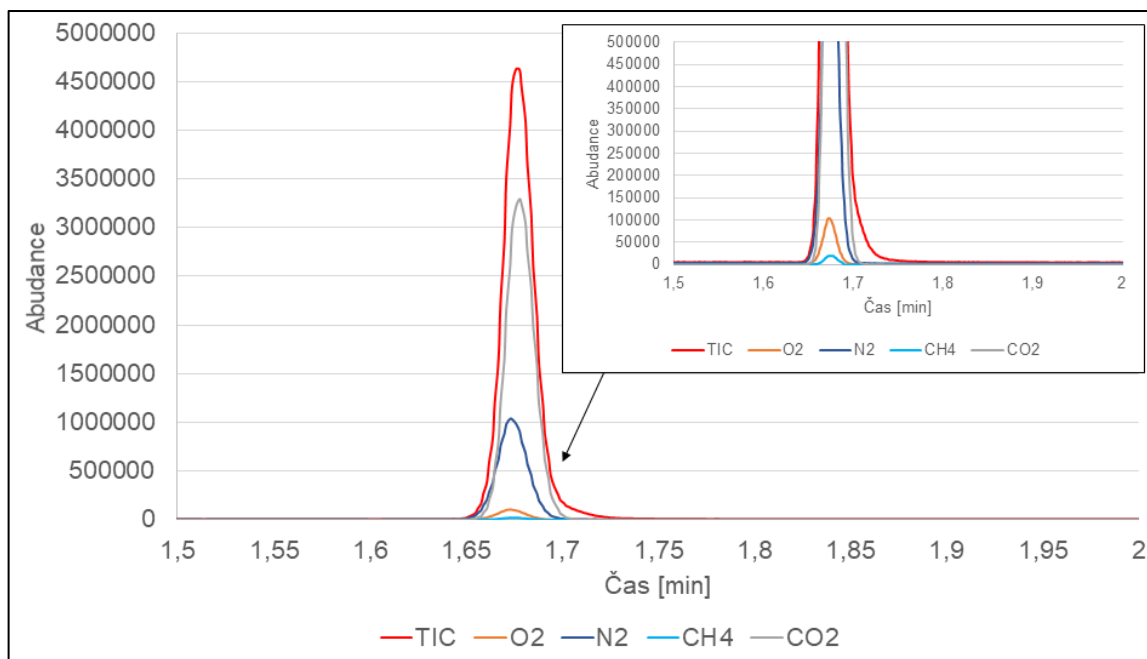
3.4.3. Analýza složení plyné fáze při hlavním fermentačním experimentu

Pro další studie bylo nutné zvětšit obsah a objem fermentační směsi, z důvodu odebírání kapalnou fáze, kdy při nízkém objemu kapalnou fáze by mohlo dojít k selhání anaerobní fermentace v důsledku příliš vysokého množství sušiny. V průběhu anaerobní fermentace 1 a 2, se sledovalo procentuální zastoupení hlavních plyných složek ve vnitřní atmosféře reaktoru (N₂, O₂, CO₂, Ar a CH₄). Ideální průběh anaerobní fermentace nám znázorňuje Obr. 12.



Obr. 12: Ideální průběh anaerobní fermentace [81].

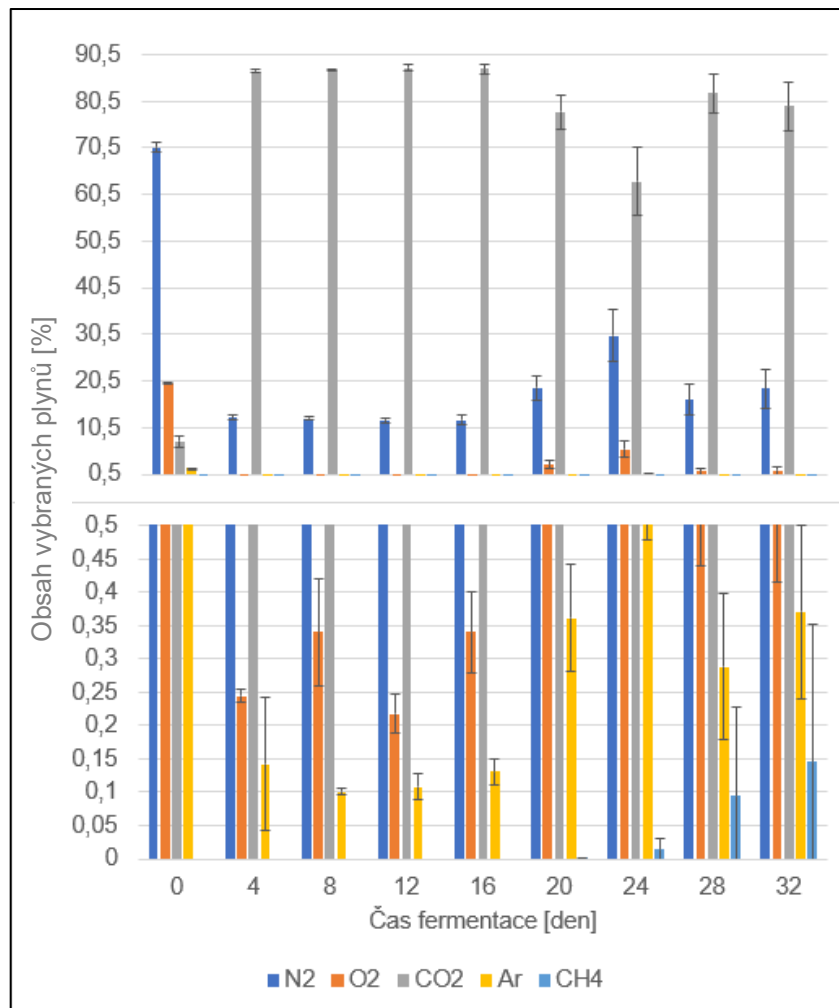
V průběhu anaerobní fermentace 1 vzorků 1A,1B a 1C (s poměrem kejdy a kávy 1:1) došlo k vývinu methanu ve stopovém množství (0,001 %) po 20 dnech digesce a to pouze u vzorku 1C. V následujícím odběru, 24. den, se methan již vyskytl ve všech vzorcích (0,014 ± 0,017 %) a v následujících dnech docházelo k mírnému nárůstu jeho obsahu, ale už opět pouze u vzorku 1C (ve dnech 28 a 32 bylo množství 0,264 % a 0,392 %). V následujícím měření pH odebrané kapalné fáze se ukázalo, že sice na počátku fermentace kejda zajistila alkalické pH 8, ale to v průběhu anaerobní fermentace a tvorby CO₂ kleslo na pH 6. V samotném závěru experimentu, 32. dnu, kleslo pH až na hodnotu 5, kdy se dostáváme na hranici pH, která je pro proces anaerobní fermentace nevhodná a dochází k výrazné inhibici methanogenních bakterií. Chromatogram znázorňující složení plynné fáze dne 32 vzorku 1C je znázorněno na Obr. 13. V Tab. IX a Obr. 14 můžeme sledovat poměry sledovaných plynů během anaerobní fermentace 1.



Obr. 13: Rekonstruované chromatogramy studovaných plynů (vzorek 1C – 32. den), TIC – hodnota celkového iontového proudu.

Tab. IX: Obsahy plynů při anaerobní fermentaci 1 směsi kejda:káva 1:1a pH kapalně fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	70,60 ± 1,08	20,03 ± 0,18	7,51 ± 1,28	1,86 ± 0,03	0	8
4	12,71 ± 0,37	0,24 ± 0,01	86,91 ± 0,38	0,14 ± 0,10	0	7
8	12,47 ± 0,24	0,34 ± 0,08	87,09 ± 0,23	0,1 ± 0,004	0	6
12	12,03 ± 0,58	0,22 ± 0,03	87,65 ± 0,57	0,11 ± 0,02	0	6
16	12,13 ± 1,09	0,34 ± 0,06	87,40 ± 1,14	0,13 ± 0,02	0	6
20	19,03 ± 2,64	2,48 ± 0,87	78,13 ± 3,58	0,36 ± 0,08	0,001 ± 0,001	6
24	30,16 ± 5,57	5,90 ± 1,65	63,28 ± 7,40	0,65 ± 0,17	0,014 ± 0,017	6
28	16,41 ± 3,27	1,08 ± 0,64	82,13 ± 4,12	0,29 ± 0,11	0,094 ± 0,133	6
32	18,88 ± 4,21	1,25 ± 0,83	79,36 ± 5,34	0,37 ± 0,13	0,146 ± 0,206	5



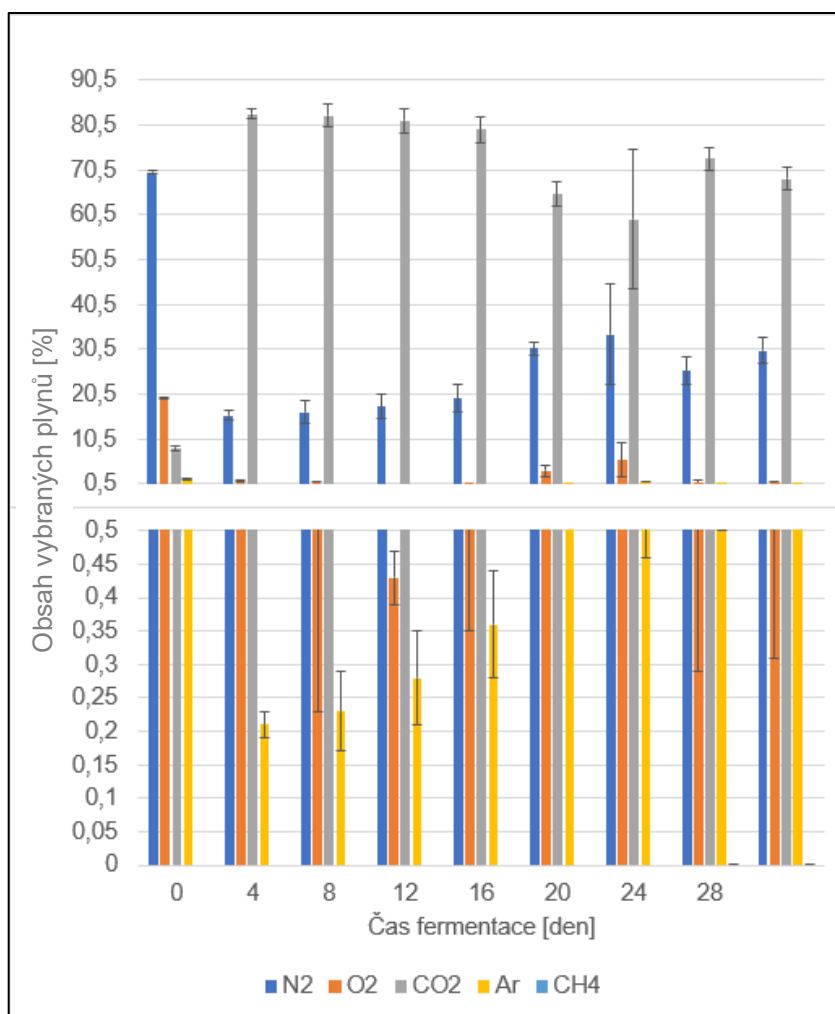
Obr. 14: Graf průběhu anaerobní fermentace 1 v sérii keжда:káva 1:1.

Je třeba poznamenat, že u vzorků s poměrem keжда:káva 1:9 dochází v závěru celého experimentu (28 a 32 den) ke vzniku stopového množství methanu (Tab. X, Obr. 15). Ve 20 dni došlo u vzorku 2C při odebrání plynné a kapalně fáze k výraznému podtlaku a do vzorku byla nasáta voda z bublátko. Do výsledků z tohoto dne jsou tedy zahrnuty pouze vzorky 2A a 2B, pro zamezení zkreslení a znehodnocení výsledků. Ve dvacátém dni experimentu došlo k nasátí malého množství uzavírací vody i do kontrolní série vzorků 3A, 3B a 3C. Tím došlo k nárůstu vlhkosti uvnitř systému. V těchto vzorcích jsme pozorovali výrazně větší množství oxidu uhličitého. Vliv vlhkosti na zvýšení koncentrace oxidu uhličitého v uzavřených systémech již popsali autoři Horáková a kol. [85]. Obsah méně zastoupených plynů (O₂, Ar a CH₄) nebylo možné z důvodu vysokého šumu v chromatogramu detekovat. Obsahy N₂ byly u 3A 21,64 %; 3B 15,89 %; a 3C 23,67 %. Obsahy CO₂ byly u vzorků: 3A 78,36 %; 3B 84,11 % a 3C 76,33 %. Z tohoto důvodu byl den 20 z grafu (Obr. 16) vyloučen a v Tab.XI je vyznačen šedě. Následující dny anaerobní fermentace však už probíhaly bez problémů. Methan se objevil ve 24. den (0,111 ± 0,007 %)

a to ve všech případech (3A, 3B, 3C). Množství methanu postupně stoupalo a před ukončením experimentu po 32 dnech byl obsah methanu $2,839 \pm 0,400$ %. Hodnoty pH se po celou dobu držely v rozmezí 8-9.

Tab. X: Obsahy plynů při anaerobní fermentaci 1 směs keřda:káva 1:9 a pH kapalné fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

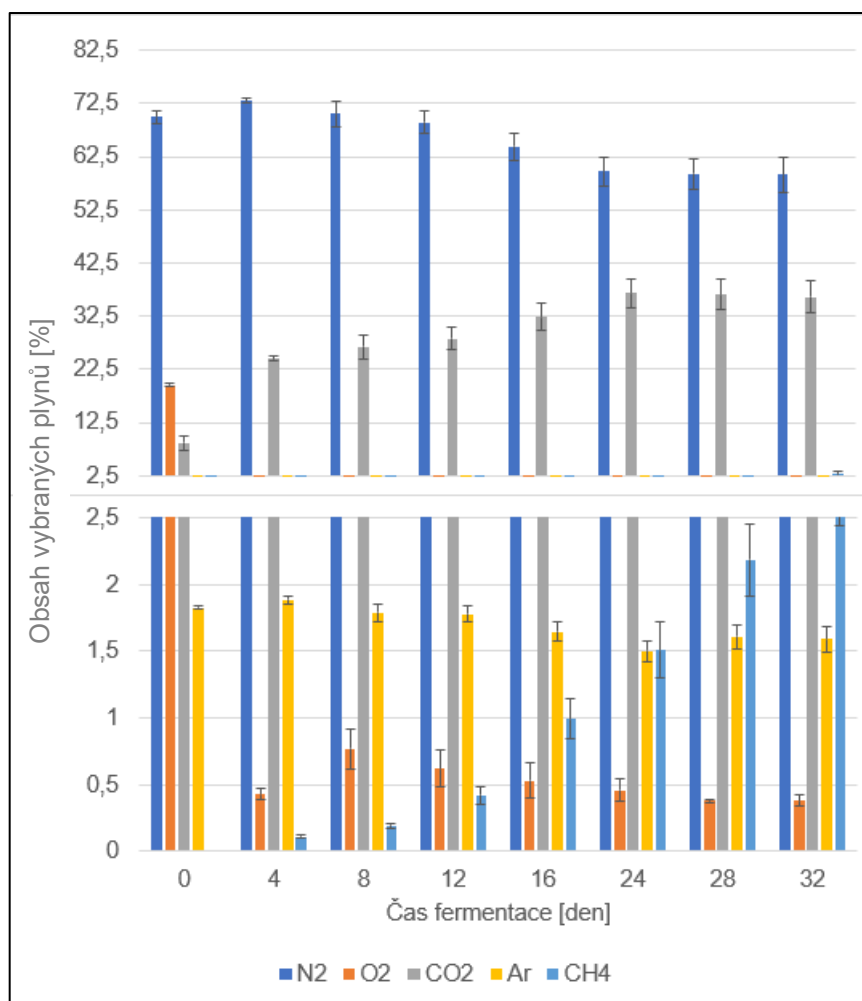
DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	70,02 ± 0,28	19,75 ± 0,10	8,40 ± 0,37	1,83 ± 0,01	0	6
4	15,76 ± 1,04	1,07 ± 0,20	82,96 ± 1,11	0,21 ± 0,02	0	6
8	16,53 ± 2,39	0,58 ± 0,35	82,66 ± 2,54	0,23 ± 0,06	0	6
12	17,75 ± 2,70	0,43 ± 0,04	81,54 ± 2,74	0,28 ± 0,07	0	6
16	19,59 ± 3,04	0,56 ± 0,21	79,49 ± 2,96	0,36 ± 0,08	0	6
20	30,78 ± 1,47	3,39 ± 1,34	65,12 ± 2,79	0,71 ± 0,04	0	6
24	33,88 ± 11,28	5,80 ± 3,81	59,54 ± 15,40	0,78 ± 0,32	0	6
					0,00017 ±	
28	25,69 ± 3,04	0,77 ± 0,48	72,96 ± 2,66	0,58 ± 0,08	± 0,00024	6
					0,00012 ±	
32	30,14 ± 2,85	0,70 ± 0,39	68,44 ± 2,54	0,72 ± 0,08	± 0,00017	6



Obr. 15: Graf průběhu anaerobní fermentace 1 ve směsi kejda:káva 1:9.

Tab. XI: Složení plynné fáze v průběhu anaerobní fermentace 1 směsi kejda bez přídavku kávy a pH kapalné fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	69,96 ± 1,17	19,55 ± 0,21	8,66 ± 1,36	1,83 ± 0,01	0	9
4	73,05 ± 0,48	0,43 ± 0,04	24,52 ± 0,50	1,89 ± 0,03	0,111 ± 0,007	9
8	70,55 ± 2,39	0,77 ± 0,15	26,69 ± 2,37	1,79 ± 0,07	0,190 ± 0,024	8
12	68,97 ± 2,10	0,62 ± 0,14	28,20 ± 2,09	1,78 ± 0,06	0,425 ± 0,069	8
16	64,45 ± 2,58	0,53 ± 0,13	32,38 ± 2,69	1,65 ± 0,07	0,994 ± 0,145	8
20	20,40 ± 9,53	0	79,60 ± 36,71	0	0	8
24	59,76 ± 2,75	0,46 ± 0,08	36,77 ± 2,67	1,50 ± 0,08	1,510 ± 0,207	9
28	59,25 ± 2,93	0,38 ± 0,01	36,58 ± 2,78	1,61 ± 0,09	2,185 ± 0,269	8
32	59,08 ± 3,27	0,38 ± 0,04	36,11 ± 3,05	1,59 ± 0,10	2,839 ± 0,400	9



Obr. 16: Graf průběhu anaerobní fermentace 1 ve vzorku samotné kejdy bez přídavku kávy.

Na základě naměřených dat je možné usoudit, že škálování z malých na střední laboratorní rozměry (tj. z množství 10 g materiálu na 40 g materiálu) nese spoustu proměnných. V tomto případě u středního laboratorního rozměru v poměru kejda:káva 1:1 jsme se po 32 dnech dostali s výtěžnosti methanu na hodnotu $0,146 \pm 0,206$ % a to pouze u jednoho vzorku (1C). Oproti tomu v malém měřítku (systém kejda:káva 1:1) bylo množství methanu po třech týdnech 1,98 %. U samotné kejdy jsou však výsledky srovnatelné. Ve větším systému bylo po 32 dnech stanoveno 2,839 % methanu. V malém rozměru jsme po třech týdnech dosáhli 3 % methanu.

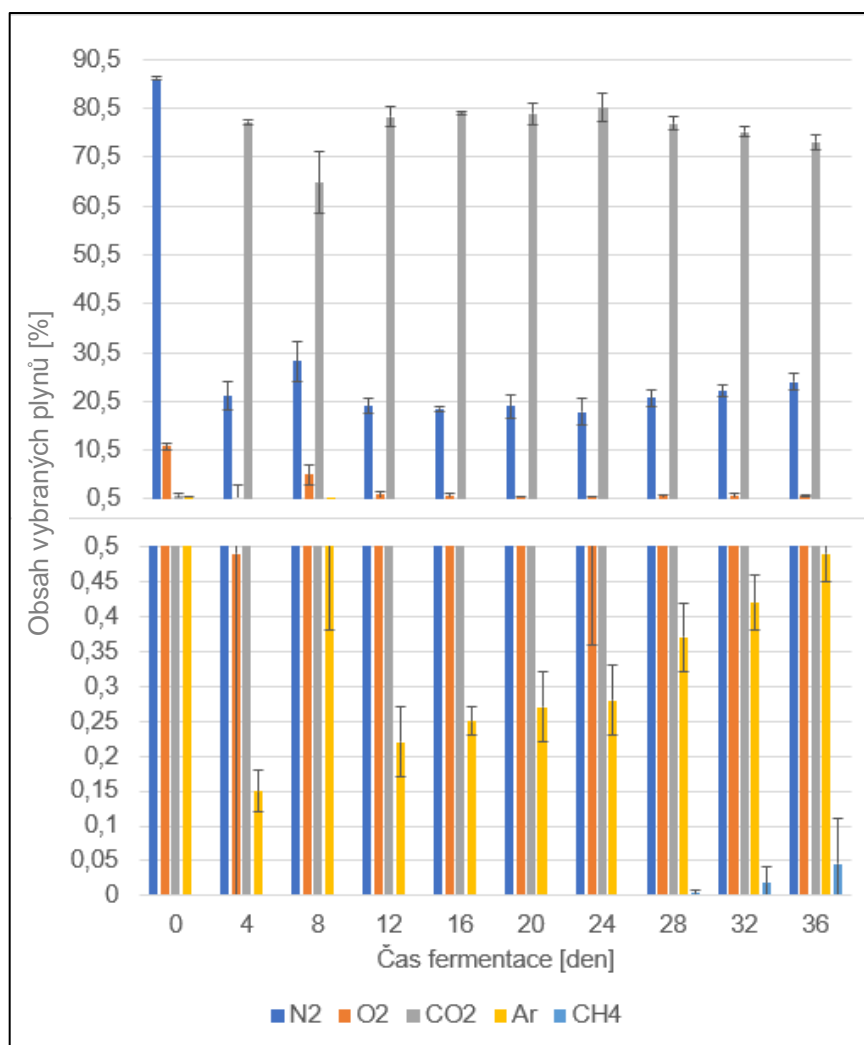
Jedním ze zásadních problémů zjištěných v průběhu anaerobní fermentace 1 byl pokles pH, proto bylo toto pH u anaerobní fermentace 2 upraveno, jak bylo popsáno výše, a pro rychlejší ustálení anaerobních podmínek byly reakční láhve vyfoukány N_2 .

Během anaerobní fermentace 2, ve směsích kejda:káva 1:1 (1A, 1B a 1C), se methan podobně, jako u experimentu s anaerobní fermentací 1, objevil až ve 20 dnu, ale pouze u vzorků 1A a 1C ($0,00013 \pm 0,0001$ %). 24. den byl methan přítomen pouze ve

vzorku 1 C ($0,00028 \pm 0,0004$ %), 28. den ve vzorcích 1A a 1C ($0,00362 \pm 0,0050$ %) a 32. den ve všech vzorcích této série ($0,01777 \pm 0,0242$ %). V 36. den, kdy se experiment ukončil byl methan přítomen ve všech vzorcích, a to v množství $0,04594 \pm 0,0644$ %. I když se methan produkoval ve všech vzorcích 1A, 1B a 1C, tak výrazným nedostatkem je velmi nízká produkce methanu. U anaerobní fermentace 1 byla 32. den byl obsah methanu $0,146 \pm 0,206$ % (Tab XII, Obr. 17).

Tab. XII: Obsahy plynů při anaerobní fermentaci 2 směsi kejda:káva 1:1 a pH kapalné fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	86,65 ± 0,23	11,38 ± 0,68	1,24 ± 0,55	1,02 ± 0,06	0	9
4	21,58 ± 2,92	0,49 ± 3,00	77,79 ± 0,49	0,15 ± 0,03	0	8
8	28,67 ± 4,14	5,47 ± 1,97	65,29 ± 6,29	0,56 ± 0,18	0	7
12	19,58 ± 1,62	1,36 ± 0,57	78,83 ± 2,00	0,22 ± 0,05	0	7
16	19,04 ± 0,57	1,16 ± 0,53	79,54 ± 0,42	0,25 ± 0,02	0	7
					0,00013 ±	
20	19,49 ± 2,36	0,79 ± 0,25	79,45 ± 2,16	0,27 ± 0,05	± 0,0001	7
					0,00028 ±	
24	18,35 ± 2,80	0,71 ± 0,35	80,67 ± 2,84	0,28 ± 0,05	± 0,0004	6
					0,00362 ±	
28	21,16 ± 1,67	1,06 ± 0,37	77,41 ± 1,35	0,37 ± 0,05	± 0,0050	6
					0,01777 ±	
32	22,67 ± 1,33	1,15 ± 0,44	75,73 ± 0,96	0,42 ± 0,04	± 0,0242	6
					0,04594 ±	
36	24,55 ± 1,56	1,28 ± 0,10	73,63 ± 1,58	0,49 ± 0,04	± 0,0644	6

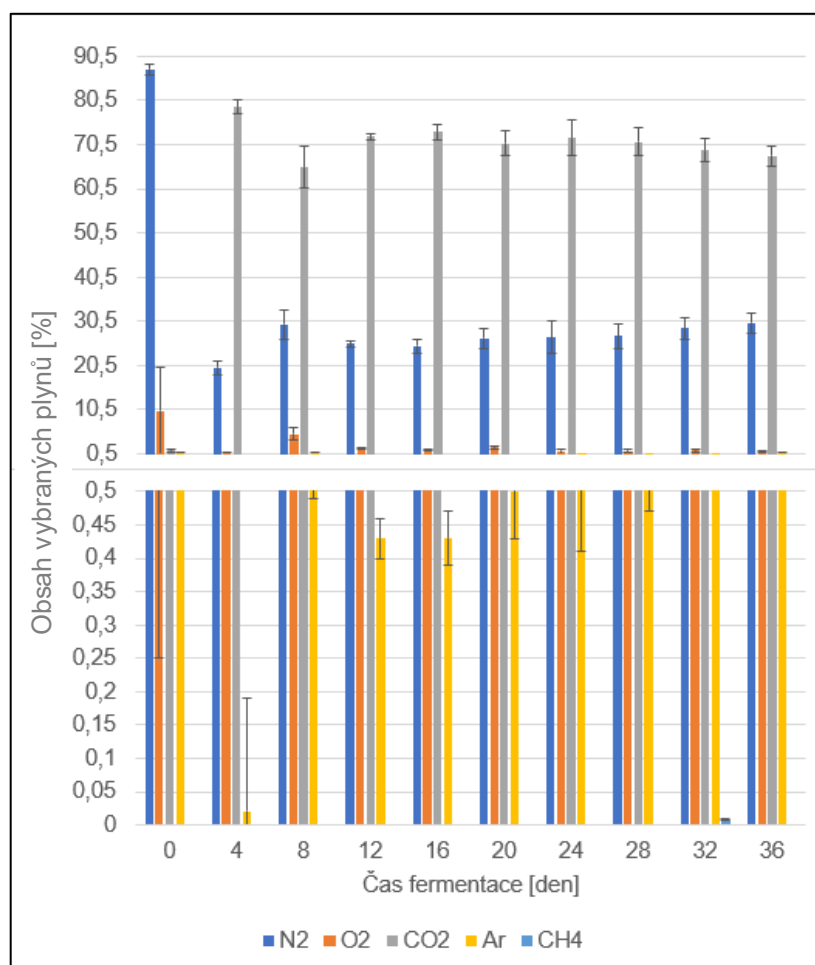


Obr. 17: Graf průběhu anaerobní fermentace 2 v sérii keřda:káva 1:1.

Ve směsi keřda:káva 1:9 (2A, 2B, 2C) při anaerobní fermentaci 2 se methan u vzorku 2B vyskytl až 28 den ($0,00009 \pm 0,00013$ %). 32. a 36. den byl methan přítomen již ve všech vzorcích této série ($0,00093 \pm 0,00026$ %, $0,00060 \pm 0,00015$ %) (Tab. XIII, Obr. 18). Jasně se tedy ukázalo, že v obou sledovaných procesech anaerobní fermentace (1 a 2) dochází i při velmi vysokém obsahu kávy ve směsi (poměr keřda:káva 1:9) v malém rozsahu k methanogenezi a tedy nelze tento proces sledovat jako systém, kde k methanogenezi nedochází.

Tab. XIII: Obsahy plynů při anaerobní fermentaci 2 směsi kejda:káva 1:9 a pH kapalné fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	87,52 ± 1,17	10,26 ± 10,01	1,31 ± 0,33	0,92 ± 0,09	0	7
4	19,99 ± 1,62	0,79 ± 0,03	79,05 ± 1,65	0,02 ± 0,17	0	7
8	29,80 ± 3,26	4,99 ± 1,36	65,29 ± 4,74	0,61 ± 0,12	0	6
12	25,40 ± 0,70	1,77 ± 0,12	72,39 ± 0,73	0,43 ± 0,03	0	6
16	24,86 ± 1,57	1,33 ± 0,23	73,38 ± 1,77	0,43 ± 0,04	0	6
20	26,70 ± 2,23	1,95 ± 0,41	70,85 ± 2,68	0,50 ± 0,07	0	6
24	26,28 ± 3,58	1,16 ± 0,53	72,06 ± 4,06	0,51 ± 0,10	0	6
28	27,24 ± 2,83	1,13 ± 0,31	71,08 ± 3,16	0,55 ± 0,08	0,00009 ± ± 0,00013	6
32	28,88 ± 2,44	1,31 ± 0,31	69,20 ± 2,59	0,61 ± 0,07	0,00093 ± ± 0,00026	6
36	30,18 ± 2,24	1,21 ± 0,08	67,96 ± 2,36	0,66 ± 0,06	0,00060 ± ± 0,00015	6

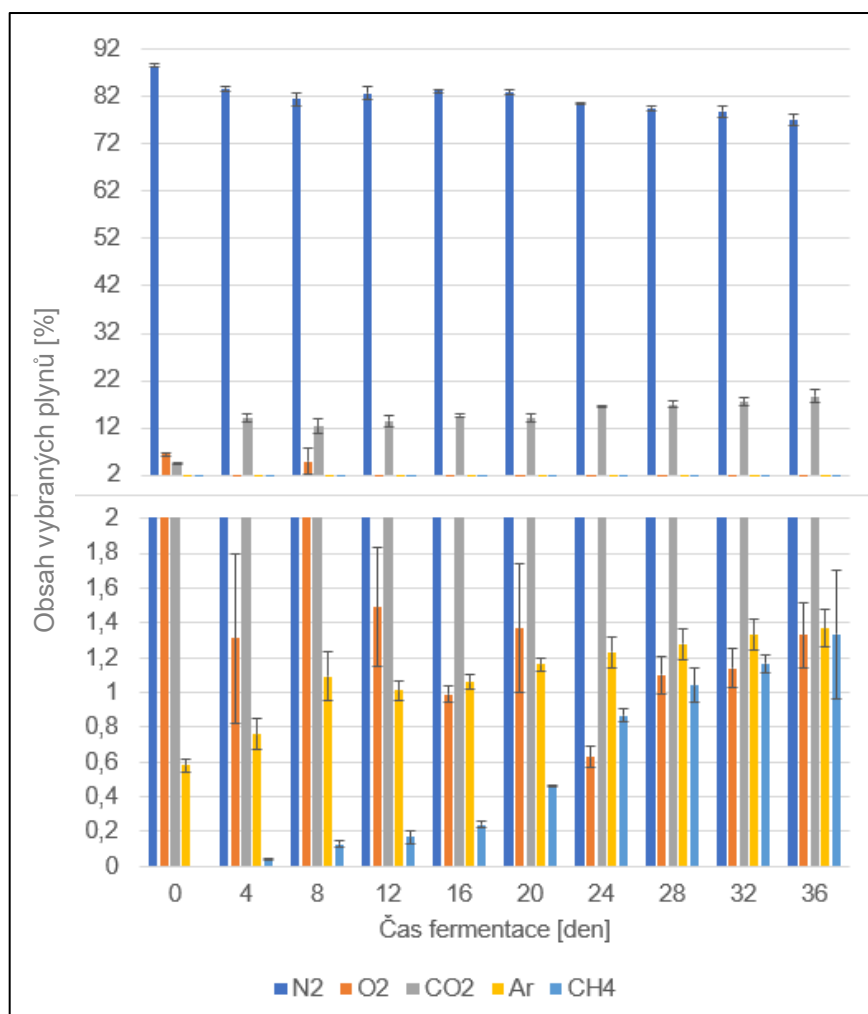


Obr. 18: Graf průběhu anaerobní fermentace 2 ve směsi kejda:káva 1:9.

Ve směsích kejda (3A, 3B, 3C) se methan vyskytl již ve 4. den experimentu ($0,039 \pm 0,005$ %) ve všech vzorcích a jeho obsah postupně stoupal až do 36. dne ($1,334 \pm 0,369$ %), kdy byl experiment ukončen (Tab. XIV, Obr. 19). I v tomto případě můžeme pozorovat trend popsany u vzorků série 1A,1B a 1C anaerobní fermentace 1 a anaerobní fermentace 2, tedy, že kejda poskytla nižší obsah methanu v anaerobní fermentaci 2 než v anaerobní fermentaci 1.

Tab. XIV: Obsahy plynů při anaerobní fermentaci 2 směsi kejda bez přídavku kávy a pH kapalně fáze (obsahy plynů jsou vyjádřeny v relativních procentech)

DEN	N ₂	O ₂	CO ₂	Ar	CH ₄	pH
0	88,64 ± 0,47	6,41 ± 0,37	4,37 ± 0,10	0,58 ± 0,04	0	10
4	83,71 ± 0,60	1,31 ± 0,49	14,18 ± 0,87	0,76 ± 0,09	0,04 ± 0,01	10
8	81,57 ± 1,40	4,94 ± 2,75	12,27 ± 1,55	1,09 ± 0,14	0,13 ± 0,02	9
12	82,73 ± 1,43	1,49 ± 0,34	13,50 ± 1,27	1,01 ± 0,06	0,17 ± 0,04	9
16	83,198 ± 0,25	0,99 ± 0,05	14,51 ± 0,29	1,06 ± 0,04	0,24 ± 0,02	9
20	82,94 ± 0,47	1,37 ± 0,37	14,08 ± 0,77	1,16 ± 0,04	0,46 ± 0,01	9
24	80,62 ± 0,23	0,63 ± 0,06	16,65 ± 0,20	1,23 ± 0,09	0,87 ± 0,04	9
28	79,56 ± 0,63	1,10 ± 0,11	17,02 ± 0,57	1,28 ± 0,09	1,04 ± 0,10	9
32	78,87 ± 1,08	1,14 ± 0,11	17,50 ± 0,98	1,33 ± 0,09	1,17 ± 0,05	9
36	77,27 ± 1,22	1,33 ± 0,19	18,70 ± 1,28	1,37 ± 0,11	1,33 ± 0,37	9



Obr. 19: Graf průběhu anaerobní fermentace 2 ve vzorku samotné kejdy bez přídavku kávy.

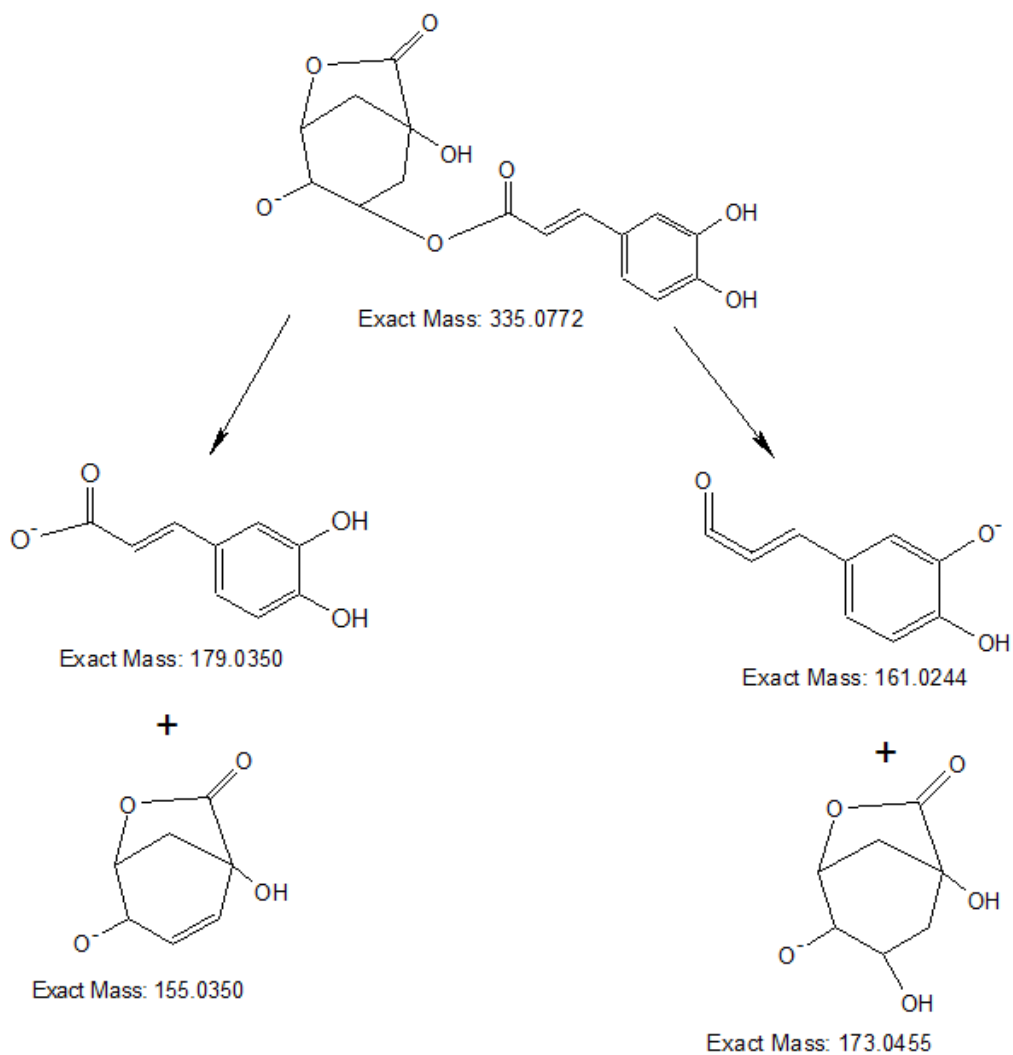
Navzdory úpravě pH systému a nastolení anaerobních podmínek, tj. obsah kyslíku pod 10 % [86], poskytla anaerobní fermentace 2 z pohledu výtěžnosti methanu horší výsledky. Právě z důvodu pomalé produkce methanu se anaerobní fermentace prodloužila o čtyři dny a nárůst methanu byl nepatrný. Fakt, že nastolení inertní atmosféry nepomáhá v tomto experimentálním uspořádání methanogenezi, nebyl na základě dostupných informací uspokojivě vysvětlen.

3.4.5. Analýza složení digestátu a změn profilu chlorogenových kyselin

Tato práce se zaměřuje na studium změn chlorogenových kyselin (CGA) a odpovídajících laktonů (CGL), ke kterým může během anaerobní fermentace docházet. V odebraných vzorcích digestátu bylo nalezeno 18 látek odpovídajících CGA a jejich laktonům. Identifikace těchto látek probíhala na základě měření přesné a správné hodnoty m/z , kolizních spekter, elučního pořadí a srovnání s již publikovanými výsledky [81, 87, 88].

Identita CGA je podpořena jejich fragmentačním modelem. Nejprve se mateřský ion rozštěpí na kyselinu chinovou (m/z 191,0556) a odpovídající hydroxyskořicovou

kyselinu (kyselina kávová m/z 179,0344; ferulová m/z 193,0501 nebo p-kumarová m/z 163,0395), která následně ztrácí molekulu oxidu uhličitého (odpovídající fragment kyseliny kávové m/z 135,0446; ferulové m/z 149,0591 a p-kumarové m/z 119,0497). Analogické fragmenty byly pozorovány ve fragmentačních spektrech dikaffeoyl- a kaffeoyl-feruloylchinové kyseliny, ze kterých v prvním kroku vzniká příslušná CGA, tj. CQA (m/z 353,0873) či FQA (m/z 367,1029). Laktony kyseliny chlorogenové fragmentují stejným postupem jako CGA. Nicméně, ve fragmentačním spektru pozorujeme dominantní signál laktonu kyseliny chinové (m/z 173,0455) a dehydratované kyseliny kávové (m/z 161,0244), ferulové (m/z 175,0359) či p-kumarové (m/z 145,0290) [81, 87, 88]. Ve spektrech je dále možné nalézt signály volné hydroxyskořicové kyseliny a dehydratované kyseliny chinové (m/z 155,0350), avšak s výrazně nižší intenzitou. Zjednodušené fragmentační schéma pro lakton chlorogenové kyseliny je uvedeno na Obr. 20.



Obr. 20: Fragmentace laktonu kyseliny chlorogenové.

Naměřené hodnoty m/z všech identifikovaných CGA a CGL jsou v dobré shodě s teoretickými. Na základě nízké odchylky od teoretické hodnoty m/z, a nalezených fragmentů nacházejících se v MS skenu s vyšší kolizní energií, byly tyto látky identifikovány jako kaffeoylchinové kyseliny (CQA), které mají následující hodnoty RT_m/z: 3,31_353,0872; 7,65_353,0872 a 8,74_353,0872. Nízká odchylka byla pouze -0,1 mDa. Fragmenty pro 3,31_353,0872 jsou m/z: 191,0570; 179,0336 a 135,0450. Pro 7,65_353,0872 a 8,74_353,0872 to jsou m/z: 191,0510; 179,0336 a 135,0399 (Obr. 21).

Další významnou skupinou jsou p-kumaroylchinové kyseliny (pCoQA) poskytující signály s RT_m/z: 5,58_337,0887 (fragmenty m/z: 191,0510; 163,0390; 119,0488); 10,18_337,0887 (fragmenty m/z: 191,0570; 163,0390; 119,0535) a 10,61_337,0887 (fragmenty m/z: 191,0570; 163,0310; 119,0535); jejichž odchylka činila -3,6 mDa.

V chromatogramu byly také nalezeny signály látek, které byly identifikovány jako feruloylchinové kyseliny (FQA). Jedná se o látky s hodnotami RT_m/z: 7,72_367,1013; 11,32_367,1013 a 11,68_367,1013 (u všech odchylka -1,6 mDa) s významnými fragmenty m/z pro 7,72_367,1013 a 11,32_367,1013: 193,0483; 149,0591 a 134,0319. A pro 11,68_367,1013 fragmenty m/z: 193,0483; 149,0591 a 134,0369.

Nejpočetnější skupinou jsou signály laktonů izomerů kyseliny kaffeoylchinové (CQL), tedy signály s hodnotami RT_m/z 8,03_335,0710 (s odchylkou -5,7 mDa) a 10,85_335,0790; 11,06_335,0790; 11,22_335,0790; 11,41_335,0790 a 11,90_335,0790 (s odchylkou 2,3 mDa). Ve všech MS spektrech 10,85_335,0790; 11,06_335,0790; 11,22_335,0790; 11,41_335,0790 a 11,90_335,0790 s vyšší kolizní energií byly nalezeny fragmenty s hodnotou m/z: 179, 0336; 173,0478; 161,0265; 155,0367 a 135,0450. Pro 8,03_335,0710 to jsou fragmenty m/z: 179, 0336; 173,0420; 161,0209; 155,0312 a 135,0450.

Signály s hodnotami RT_m/z 15,4_515,1207 a 17,18_515,1207 byly identifikovány jako izomery dikaffeoylchinové kyseliny (diCQA) (odchylka u obou izomerů 1,7 mDa) a ve spektrech byly nalezeny shodné fragmenty m/z 353,0872; 335,0790; 191,0570; 179,0336; 173,0478; 161,0209 a 135,0450. Přítomnost fragmentu s m/z 353,0872 rovněž svědčí o přítomnosti kaffeoylchinové kyseliny v molekule (Obr. 22).

Ve fragmentačním spektru látky s RT_m/z 17,02_529,1321 byly v porovnání s látkami 15,4_515,1207 a 17,18_515,1207 navíc nalezeny fragmenty s hodnotou m/z 367,1010 a 193,0486. Na základě těchto informací můžeme konstatovat, že v molekule je navíc přítomná kyselina ferulová. Molekula byla tedy identifikována jako kaffeoyl-feruloylchinová kyselina (odchylka -2,5 mDa) (Obr. 23).

Přiřazení signálu s hodnotami RT_m/z 3,31_353,0872 ke 5-kaffeoylchinové kyseliny (5-CQA), 7,65_353,0872 ke 3-kaffeoylchinové kyseliny (3-CQA) bylo provedeno

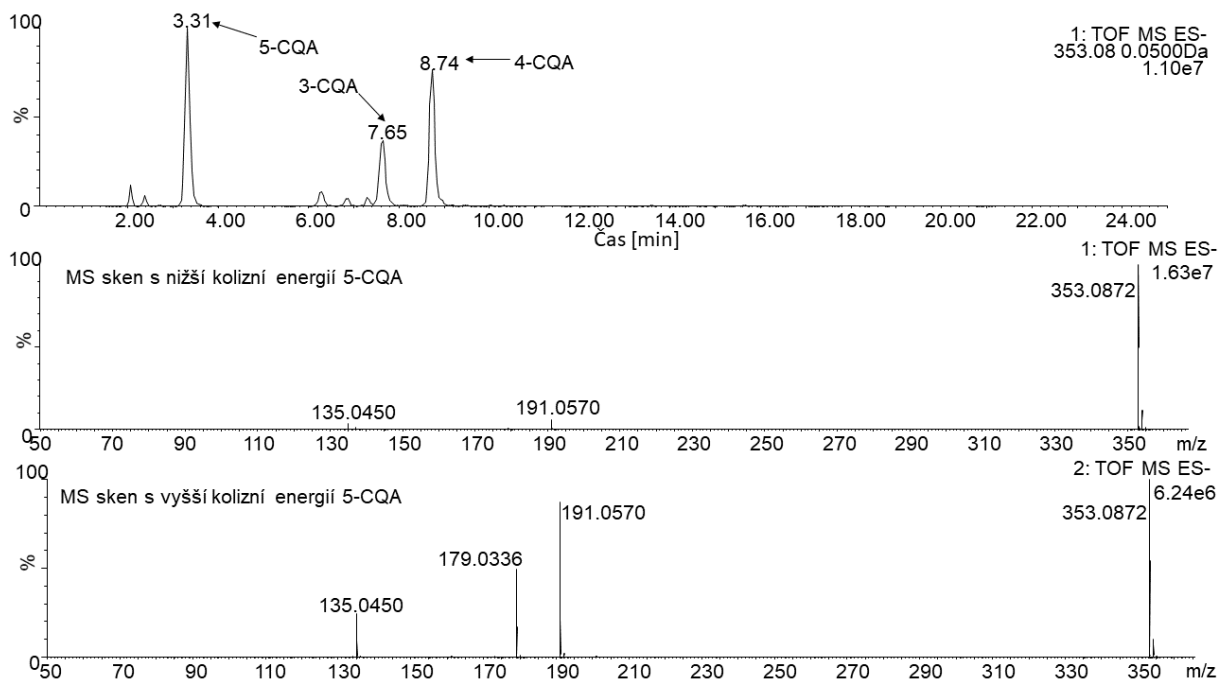
na základě elučního pořadí těchto látek v článku Kučery a kol. [81]. Všechny identifikované a dále sledované látky jsou uvedeny v Tab. XIIV.

Tab. XIIV: Sledované chlorogenové kyseliny a jejich laktony (RT_{m/z} – retenční čas [min]_{m/z} hodnota deprotonované molekuly [M-H]⁻), dtm [mDa] – odchylka od teoretické hodnoty m/z)

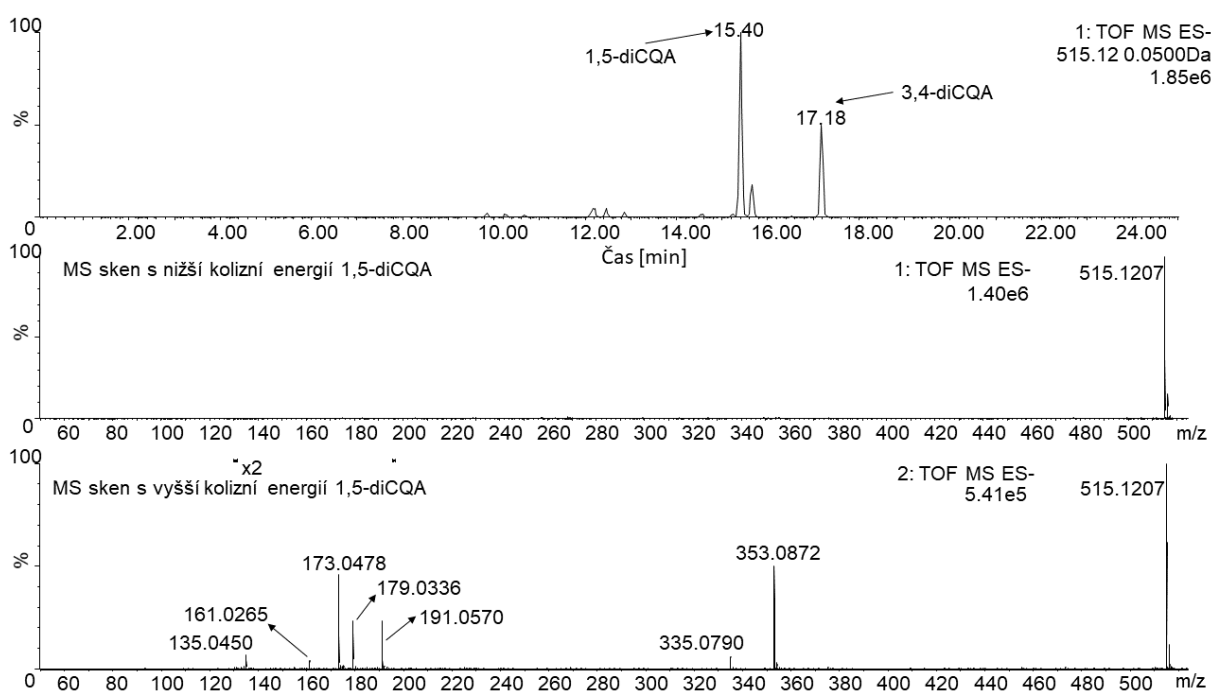
RT _{m/z}	dtm [mDa]	Fragmenty	Identifikovaná látka	Zkratka
3,31_353,0872	-0,1	191,0570 179,0336 135,0450	5-kaffeoylchinová kyselina	5-CQA
7,65_353,0872	-0,1	191,0510 179,0336 135,0339	3-kaffeoylchinová kyselina	3-CQA
8,74_353,0872	-0,1	191,0510 179,0336 135,0399	4-kaffeoylchinová kyselina	4-CQA
5,58_337,0887	-3,6	191,0510 163,0390 119,0488	p-kumaroylchinová kyselina_1	pCoQA_1
10,18_337,0887	-3,6	191,0570 163,0390 119,0535	p-kumaroylchinová kyselina_2	pCoQA_2
10,61_337,0887	-3,6	191,0570 163,0310 119,0488	p-kumaroylchinová kyselina_3	pCoQA_3
7,72_367,1013	-1,6	193,0483 149,0591 134,0319	3-feruloylchinová kyselina	3-FQA
11,32_367,1013	-1,6	193,0483 149,0591 134,0319	5-feruloylchinová kyselina	5-FQA
11,68_367,1013	-1,6	193,0483 149,0591 134,0369	4-feruloylchinová kyselina	4-FQA
8,03_335,0710	-5,7	179,0336 173,0420 161,0209 155,0312 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_1	CQL_1
10,85_335,0790	2,3	179,0336 173,0478 161,0256 155,0367 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_2	CQL_2

11,06_335,0790	2,3	179,0336 173,0478 161,0265 155,0367 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_3	CQL_3
11,22_335,0790	2,3	179,0336 173,0478 161,0265 155,0367 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_4	CQL_4
11,41_335,0790	2,3	179,0336 173,0478 161,0265 155,0367 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_5	CQL_5
11,90_335,0790	2,3	179,0336 173,0478 161,0265 155,0367 135,0450	lakton kaffeoylchinové kyseliny_6	CQL_6
15,40_515,1207	1,7	353,0872 335,0790 191,0570 179,0336 173,0478 161,0265 135,0450	1,5-dikaffeoylchinová kyselina	1,5-diCQA
17,18_515,1207	1,7	353,0872 335,0790 191,0570 179,0336 173,0478 161,0265 135,0450	3,4-dikaffeoylchinová kyselina	3,4-diCQA
17,02_529,1321	-2,5	367,1010 353,0872 335,0790 193,0483 191,0570 179,0336 173,0478 161,0265 135,0450	kaffeoyl-feruloylchinová kyselina	CFQA

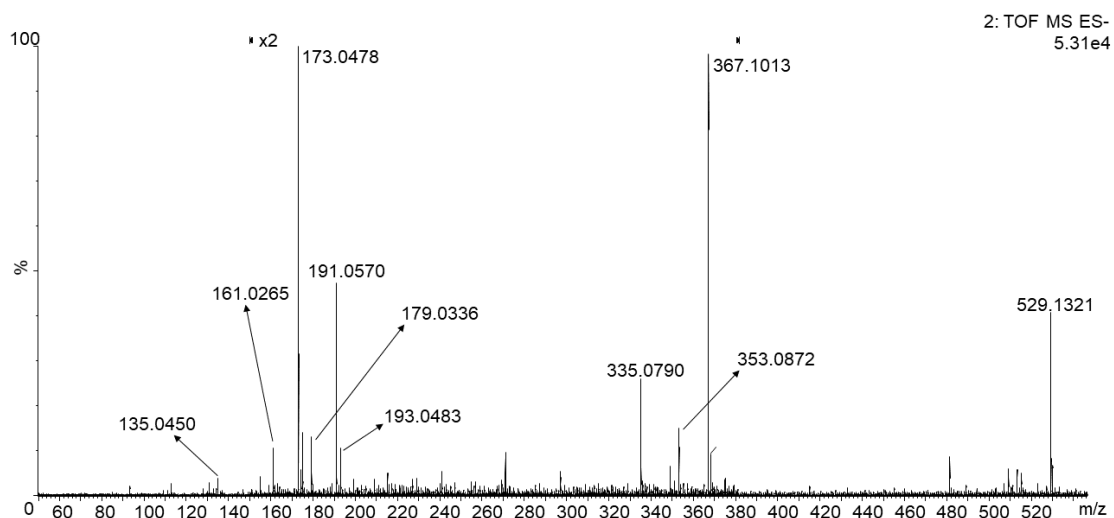
Pozn. Uvedené hodnoty m/z a příslušné fragmenty jsou exportovány z chromatografického záznamu v čase 0 anaerobní fermentace 2. Polohy substituentů u jednotlivých izomerů, které nebyly určeny, jsou označeny číslem za názvem kyseliny ve formátu: název_číslo.



Obr. 21: Chromatogram extrahované hodnoty m/z 353,08 a MS skeny s nižší a vyšší kolizní energií 5-CQA.



Obr. 22: Chromatogram extrahované hodnoty m/z 515,12 a MS skeny s nižší a vyšší kolizní energií 5-CQA.

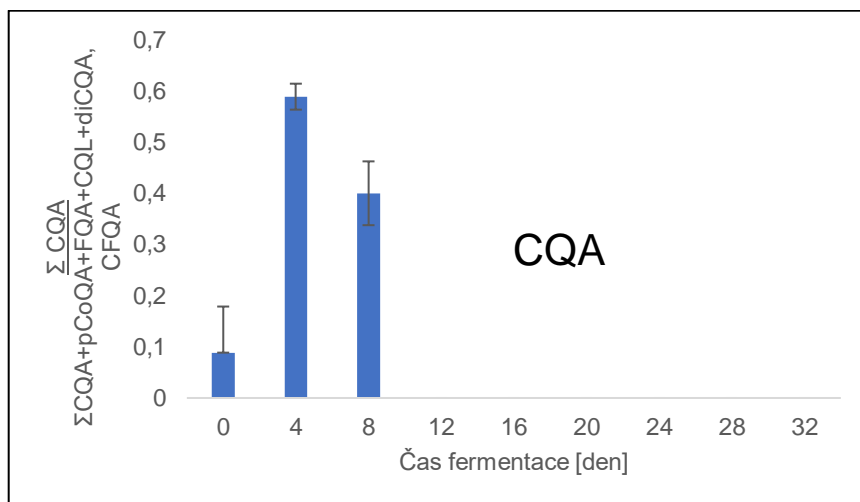


Obr. 23: MS sken s vyšší kolizní energií CFQA.

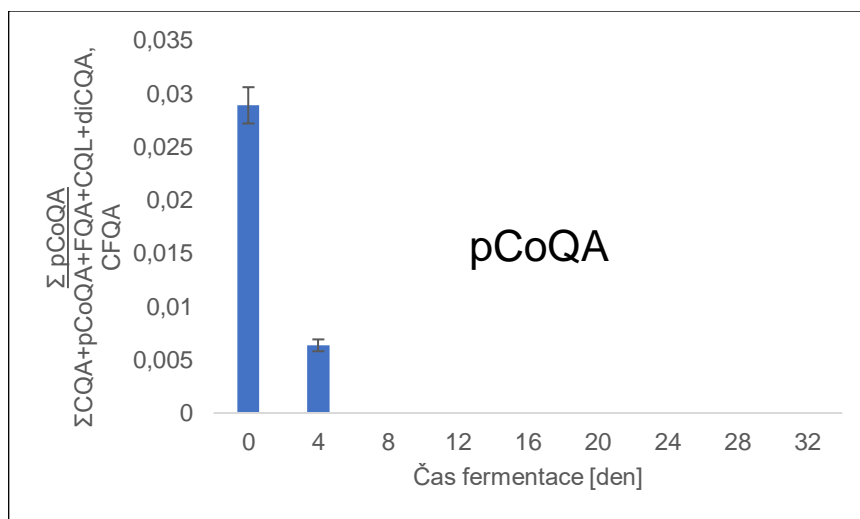
Anaerobní fermentace 1 probíhala v reaktoru v jejímž vnitřním prostoru byla na počátku experimentu plynná fáze odpovídající okolní atmosféře. Jelikož výsledky GC analýzy poukázaly na vyšší produkci methanu než v anaerobní fermentaci 2 (s inertní atmosférou), byly na HPLC/MS měřeny všechny odebrané vzorky digestátu anaerobní fermentace 1 ze dnů 0-32. Protože série kejsa:káva 1:9 (2A, 2B a 2C) měla sloužit k poukázání na profil CGA, kde methanogenze neprobíhá, a v této sérii se slabě methan vyskytl, nebyl digestát této série měřen.

Z Obr. 24 můžeme pozorovat, že množství CQA (vyjádřené jako poměr sumy ploch všech nalezených izomerů k sumě ploch všech identifikovaných chlorogenových kyselin) se 4. den zvýšila, avšak od 12. dne fermentace už nebyla CQA pozorována. Mezi dny 0 a 4 můžeme pozorovat nárůst obsahu CQA o 85,0 %, avšak mezi dny 4 a 8 dochází k poklesu o 32,1 % (Obr. 25). Na základě T-testu jsou rozdíly mezi naměřenými daty ze dne 0 a 4 statisticky vysoce významné ($p=0,0016$), a mezi 4. a 8. dnem jsou statisticky významné ($p=0,0166$). Množství pCoQA bylo nejvyšší ve dni 0, ve 4. dni bylo už pozorováno snížení obsahu o 78,0 % a ve dni 8 se pCoQA v chromatogramu již nevyskytovaly (Obr. 26). Rozdíly mezi dnem 0 a dnem 4 jsou statisticky vysoce významné ($p=6,22 \cdot 10^{-5}$). Množství FQA ve 4. dni zaznamenalo snížení v porovnání se začátkem experimentu ($p=0,0022$) o 83,6 %, a i přes nárůst ve dni 8 ($p=0,0075$) o 45,1 %, nebyly FQA 12. den již pozorovány (Obr. 27). Rozdíly v signálech mezi jednotlivými dny byly statisticky vysoce významné. Obsah CQL se postupně mezi 0-8 dnem zvyšoval, avšak jako u ostatních látek ve 12. dni již nebyl pozorován (Obr. 28). Statistické rozdíly u CQL mezi dny 0 a 4 byly statisticky významné ($p=0,0194$) a mezi dny 4 a 8 byly staticky nevýznamné ($p=0,0850$). Zvýšení

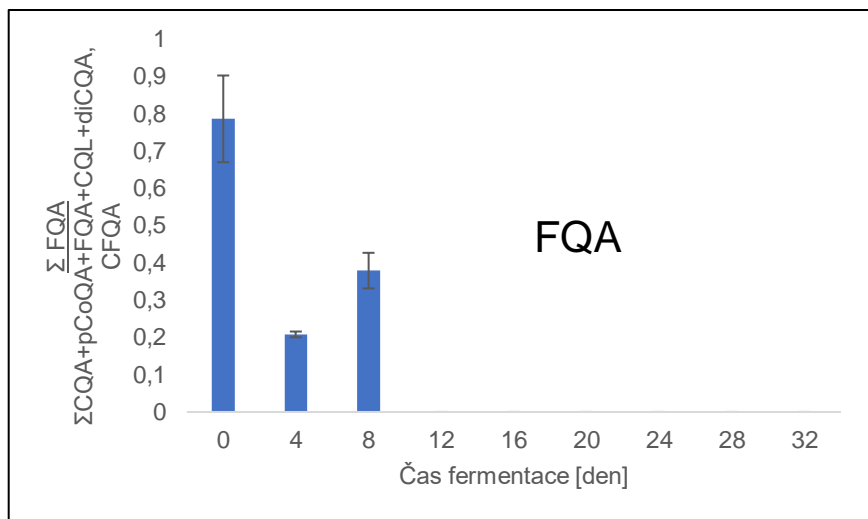
obsahu CQL mezi dny 0 a 8 bylo o 76,0 %. Množství diCQA a CFQA zaznamenaly ve 4. dni nárůst o 64,5 %, a tento rozdíl je na základě T-testu rovněž statisticky významný ($p=0,02462$), avšak v 8. už nebyly diCQA detekovány (Obr.28). Závěrem lze konstatovat, že obsah CQL, CQA a diCQA+CFQA mezi dnem 0 a 4 rostl, zatímco množství FQA a pCoQA se snižovalo.



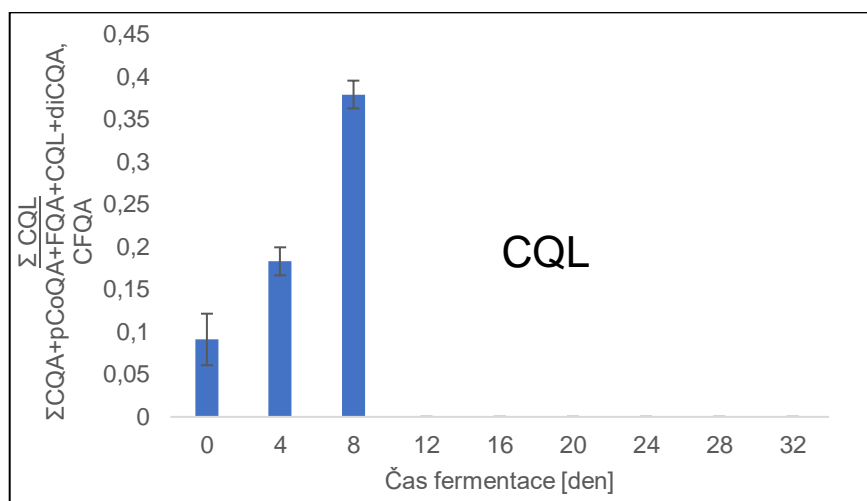
Obr. 24: Změna profilu CQA (anaerobní fermentace 1).



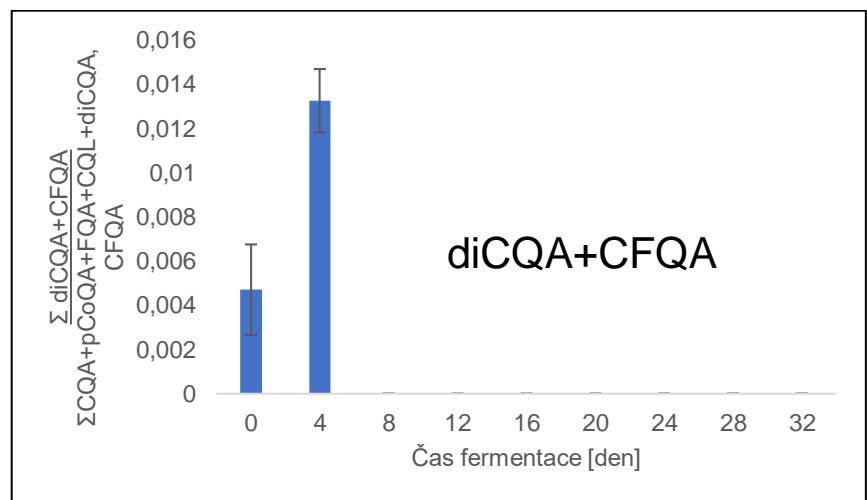
Obr. 25: Změna profilu pCoQA (anaerobní fermentace 1).



Obr. 26: Změna profilu FQA (anaerobní fermentace 1).



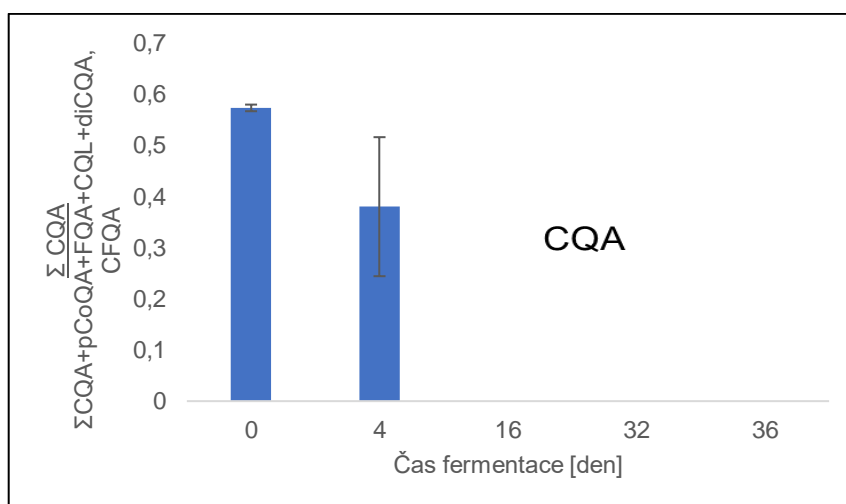
Obr. 27: Změna profilu CQL (anaerobní fermentace 1).



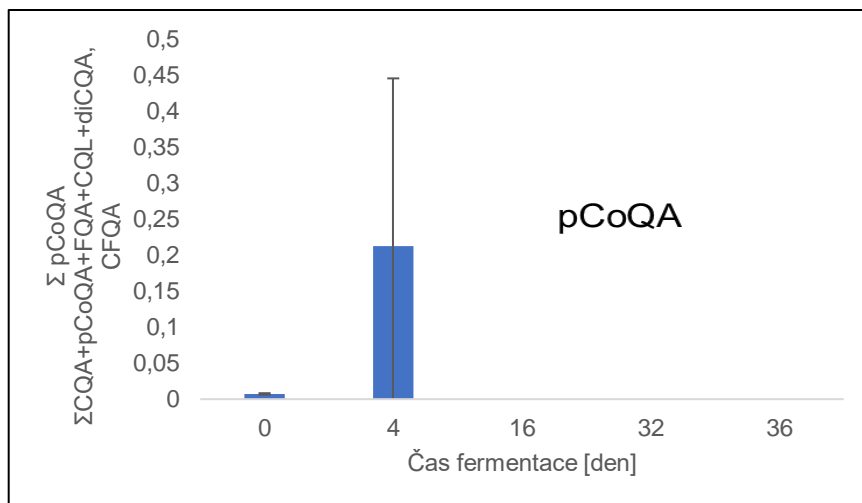
Obr. 28: Změna profilu diCQA+CFQA (anaerobní fermentace 1).

U anaerobní fermentace 2, která probíhala v inertní atmosféře, byly zvoleny k měření pouze dny 0, 4, 16, 32 a 36. Bylo to z důvodu nižší a pomalejší produkce methanu. Den 0 byl zvolen jako referenční stav, den 4 pro sledování počátku anaerobní fermentace, kdy ještě neprobíhá methanogeneze, den 16 jakožto počátek procesu methanogeneze a den 32 a 36, kde byl methan pomocí GC/MS analýzy spolehlivě detekován (viz. Obr. 17)

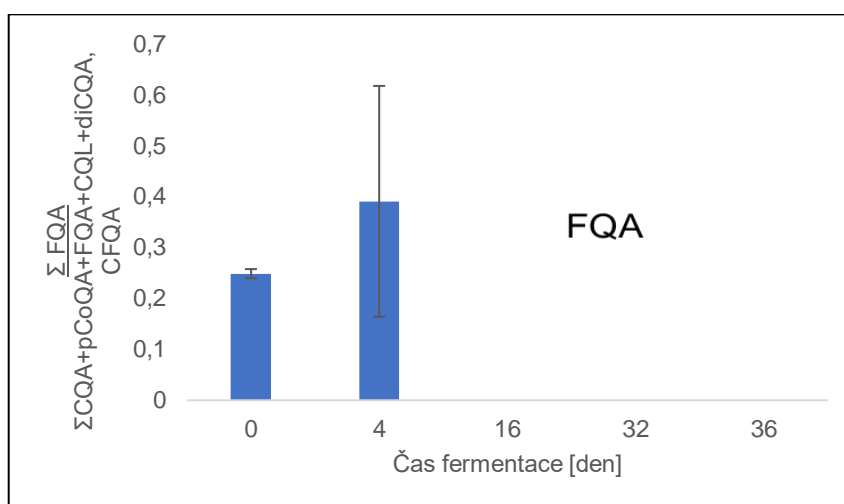
V digestátu anaerobní fermentace 2 můžeme pozorovat opačný průběh, než tomu bylo u anaerobní fermentace 1. Množství CQA od počátku anaerobní fermentace kleslo o 33,7 % z původního obsahu, avšak rozdíly jsou statisticky nevýznamné ($p=0,1151$) (Obr. 29). Oproti tomu obsah pCoQA se ve dnu 4 zvýšil o 96,6 % a rozdíly jsou statisticky vysoce významné ($p=0,0014$) (Obr. 30). Obdobný průběh můžeme pozorovat i u FQA, kde došlo k mírnějšímu nárustu o 36,4 % a tento rozdíl je statisticky nevýznamný ($p=0,4257$) (Obr. 31). U CQL (Obr. 32) dochází k poklesu o 89,12 %, avšak rozdíly jsou statisticky nevýznamné ($p=0,2814$). Podobně je tomu se signály diCQA+CFQA (Obr. 33), jejichž změna v signálu mezi dnem 0 a 4 je o 97,1 % a, tyto rozdíly jsou statisticky vysoce významné ($p=0,0010$).



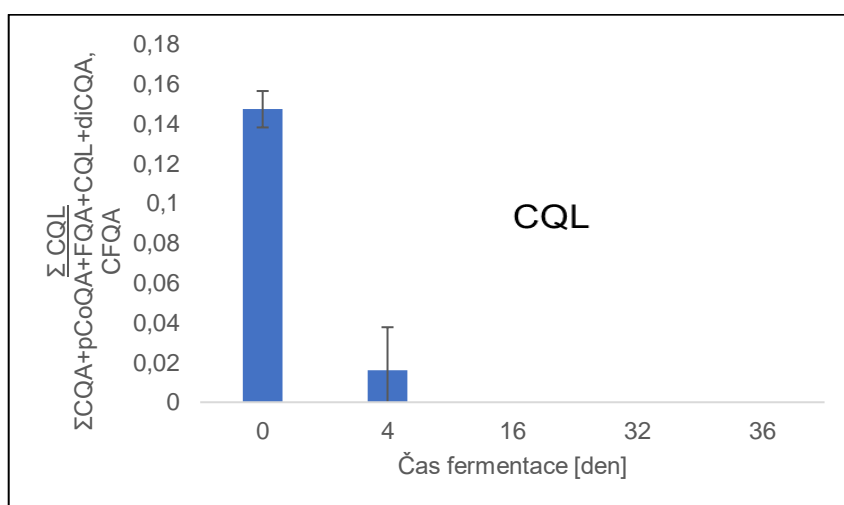
Obr.29: Změna profilu CQA (anaerobní fermentace 2).



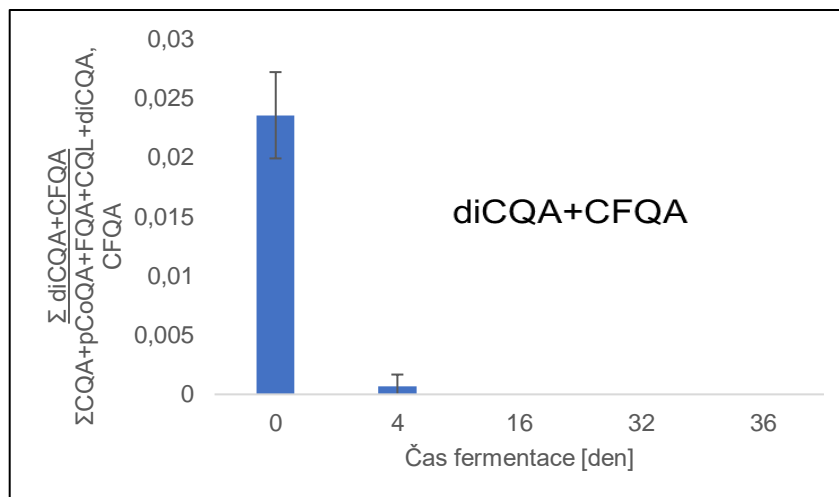
Obr. 30: Změna profilu pCoQA (anaerobní fermentace 2).



Obr. 31: Změna profilu FQA (anaerobní fermentace 2).



Obr. 32: Změna profilu CQL (anaerobní fermentace 2).



Obr. 33: Změna profilu diCQA+CFQA (anaerobní fermentace 2).

U CGA a jejich příslušných CGL můžeme sledovat rozdílný profil během anaerobní fermentace 1 a anaerobní fermentace 2. U anaerobní fermentace 1 s okolní atmosférou v reaktoru se obsah CQA, CQL a diCQA+CFQA mezi dny 0 a 4 zvyšuje. Naproti tomu u obsahu pCoQA a FQA došlo ke snížení. Opačný trend můžeme pozorovat u anaerobní fermentace 2 s inertní atmosférou. Významným zjištěným faktem je, že u obou experimentů (anaerobní fermentace 1 a 2) dochází k razantnímu snížení signálů všech sledovaných chlorogenových kyselin pod limity detekce od 12. dne (resp. 16 dne) experimentu. Tento výrazný úbytek lze vysvětlit efektivním mikrobiálním rozkladem, který probíhá i přesto, že chlorogenové kyseliny mají, jako většina polyfenolických látek, antimikrobiální účinky.

4. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat anaerobní fermentaci kávového odpadu v mikroměřítku, laboratorních podmínkách a diskontinuálním uspořádání, a sledovat změny ve složení plynné složky a v profilu chlorogenových kyselin v kapalné složce fermentované směsi (v digestátu). První experiment anaerobní fermentace kávy s podporou bakterií a thioglykolátového roztoku ukázaly, že káva je schopná anaerobní fermentace bez těchto podpůrných látek. Následně byl optimalizován vhodný poměr vepřové kejdy a kávy, kdy vepřová kejda měla sloužit jako další organický substrát k efektivní ko-digesci. Jako nejvhodnější se ukázal poměr kejdy a kávy 1:1. Směs s tímto vysokým obsahem kavárenského odpadu produkovala poměrně rychle a efektivně methan (0,913 %). Tento experiment potvrzuje, že kavárenský odpad je možno za přijatelných podmínek zplyňovat, minimálně v mikroměřítku. Je však otázkou a případně námětem na další studie, zda je možno převést tento typ zplyňovacího procesu do provozního měřítka využitelného v bioplynových stanicích. Byl prostudován vliv pH (a přídavek hydroxidu amonného), množství zplyňovaného materiálu a složení atmosféry ve fermentoru na proces anaerobního zplyňování a získané informace jsou obecně využitelné pro výzkum anaerobních procesů v širším smyslu.

Byl podrobně prostudován vliv zplyňování na obsah chlorogenových kyselin, které jsou významnou a charakteristickou skupinou polyfenolů přítomných v kávě. Výsledky ukazují, že po 12-16 dnech diskontinuálního zplyňovacího procesu dochází k drastickému poklesu všech identifikovaných chlorogenových kyselin. Pravděpodobným vysvětlením je metabolický rozklad těchto látek mikroorganismy přítomnými ve fermentovaných směsích. Tento proces je zajímavý vzhledem k antimikrobiálním vlastnostem polyfenolických látek, mezi které se chlorogenové kyseliny řadí.

5. Literatura

1. http://www.bioplyn.cz/at_popis.htm, staženo 12. srpna 2018.
2. L. Babička, I. Poustková, Významný přínos výroby bioplynu, *Listy cukrovarnické a řepařské*. 125 (2009) 277-280.
3. L. Appels, J. Lauwers, J. Degreve, L. Helsen, B. Lievens, K. Williems, J. Van Impe, R. Dewil, Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15 (2011) 4925-4301.
4. L. Kučera, P. Bednář, Biogas system and possibilities of control and use of digestate in Czech Republic: A Review, *Waste Forum*. (2014) 123-136.
5. P. Mikčák, M. Bobák. Membránová separace bioplynu v reálných podmínkách bioplynové stanice. *Lednice* 2015.
6. J. Kíra, O. Mužík, D. Paganelli, Návrh malotonážního zařízení pro úpravu bioplynu na kvalitu zemního plynu, *AgritechScience*. 5 (2011) 1-7.
7. F. Straka. *BIOPLYN II. rozšířené a doplněné vydání*, GAS, Praha 2006.
8. C. Zhang, H. Su, J. Baeyens, T. Tan, Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 38 (2014) 383-392.
9. J. Řezáč, Anaerobní fermentace kalů z výroby buničiny a krmného droždí, diplomová práce, Vysoké učení technické, Fakulta strojního inženýrství, Ústav procesního a ekologického inženýrství, Brno 2010.
10. H. Bouallagui, Y. Touhami, R. Ben Cheikh, M. Hamdi, Bioreactor performance in anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes, *Process Biochemistry*. 40 (2005) 989-995.
11. P. Kaparaju, I. Angelidaki, Effect of temperature and active biogas process on passive separation of digested manure, *Bioresource Technology*. 99 (2008) 1345-1352.
12. Y. Li, S.Y. Park, J. Zhu, Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15 (2011) 821-826.
13. Y. Chen, J.J. Cheng, K.S. Creamer, Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 4044-4064.
14. J. Horiuchi, T. Shimizu, T. Kanno, M. Kobayashi, Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemostat culture. *Biotechnology Techniques*. 13 (1999) 155-157.
15. A. Khalid, M. Arsagad, M. Anjum, T. Mahmood, L. Dawson, The anaerobic digestion of solid organic waste, *Waste Management*. 31 (2011) 1737-1744.
16. O. Yenigün, B. Demirel, Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review, *Process Biochemistry*. 48 (2013) 901-911.
17. C. Zhang, H. Su, J. Baeyens, T. Tan, unsheng, H. Su, The anaerobic co-digestion of food waste and cattle manure, *Bioresource Technology*. 129 (2013) 170-176.
18. G.O. Adams, P.T. Fufeyin, S.E. Okoro, I. Ehinomen, Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review, *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*. 3 (2015) 28-39.

19. M. Madsen, J.B. Holm-Nielsen, K. H. Esbense, Monitoring of anaerobic digestion processes: A review perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 15 (2011) 3141-3155.
20. E.A. Baldwin, J. Bai, A. Plotto, S. Dea, Electronic Noses and Tongues: Applications for the Food and Pharmaceutical Industries, *Sensors*. 11 (2011) 4744-4766.
21. X. Gómez, M.J. Cuetos, A.I. Garcia, A. Morán, An evaluation of stability by thermogravimetric analysis of digestate obtained from different biowastes, *Journal of Hazardous Materials*. 149 (2007) 97-105.
22. A. Finzi, R. Oberti, A.S. Niegri, F. Perazzolo, G. Cocolo, F. Tambone, G. Cabassi, G. Provolo, Effects of measurement technique and sample preparation on NIR spectroscopy analysis of livestock slurry and digestates, *Biosystems Engineerin*. 134 (2015) 42-54.
23. A. Widyasari-Mehta, S. Hartung, R. Kreuzing, From the application of antibiotics to antibiotic residues in liquid manures and digestates: A screening study in one European center of conventional pig husbandry, *Journal of Environmental Management*. 177 (2016) 129-137.
24. T. Rehl, J. Müller, Life cycle assessment of biogas digestate processing technologies. *Resources, Conservation and Recycling*. 56 (2011) 92-104.
25. D. Prášek, Sušení čistírenských kalů solární energií, diplomová práce, Vysoké učení technické, Fakulta strojního inženýrství, Ústav procesního a ekologického inženýrství, Brno 2011.
26. F. Tambone, P. Genevini, G. D'Imporzano, F. Adani, Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW, *Bioresource Technology*. 100 (2009) 3140-3142.
27. D. Nguyen, V. Gadhamshetty, S. Nitayavardhana, S. K. Khanal, Automatic process control in anaerobic digestion technology: A critical review, *Bioresource Technology*. 193 (2015) 513-522.
28. V. Rozíková, Plynová chromatografie esterů mastných kyselin ve vybraných druzích potravin, diplomová práce, diplomová práce, Mendelova Univerzita, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, Brno 2011.
29. P.F. Pind, I. Angelidaki, B.K. Ahring, A new VFA sensor technique for anaerobic reactor systems, *Biotechnology and Bioengineering*, 82 (2003) 54-61.
30. V. Diamantis, P. Melidis, A. Aivasidis, Continuous determination of volatile products in anaerobic fermenters by on-line capillary gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*. 573-574 (2006) 189-194.
31. K. Boe, D.J. Batsone, I. Angelidaki, An innovative online VFA monitoring system for the anerobic process, based on headspace gas chromatography, *Biotechnology and Bioengineering*. 96 (2007) 712-721.
32. J. Schiffels, M.E.M. Baumann, T. Selmer, Facile analysis of short-chain fatty acids as 4-nitrophenyl esters in complex anaerobic fermentation samples by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 5848-5851.

33. A. Spielmeyer, J. Ahlborn, G. Hamscher, Simultaneous determination of 14 sulfonamides and tetracyclines in biogas plants by liquid-liquid-extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406 (2014) 2513-2524.
34. A. Spielmeyer, B. Breier, K. Großmeier, G. Hamscher, Elimination patterns of worldwide used sulfonamides and tetracyclines during anaerobic fermentation, *Bioresource Technology*. 193 (2015) 307-314.
35. D. Rosen, *Rádce milovníka kávy: průvodce pro pravého znalce o tom, jak kupovat, připravovat a vychutnávat kávu*, Pragma, Praha 1999.
36. P. Veselá, *Kniha o kávě: průvodce světem kávy s recepty na její přípravu*, Smart Press, Praha 2010.
37. <http://banua.sk/svet-kavy/zaujímavosti-o-kave/salka-kavy---to-je-70-kavovych-zrn>, staženo 26. července 2018.
38. <https://botany.cz/cs/cofea-arabica/>, staženo 25. července 2018.
39. G. Vinícius de Melo Pereira, V.T. Soccol, S.K. Brar, E. Neto, C.R. Soccol, Microbial ecology and starter culture technology in coffee processing, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (2015) 2775-2788.
40. L.F. Ballesteros, J.A. Teixeira, S.I. Mussatto, Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin, *Food and Bioprocess Technology*. 7 (2014) 3493-3503.
41. <http://banua.sk/svet-kavy/zaujímavosti-o-kave/salka-kavy---to-je-70-kavovych-zrn>, staženo 26. července 2018.
42. R.G. Hollingsworth, J.W. Armstrong, E. Campbell, Caffeine as a novel toxicant for slugs and snails, *Annals of Applied Biology*. 142 (2003) 91-97.
43. <http://www.atc.eu/ceresne.xhtml>, staženo 26. července 2018.
44. E.K. Bekedam, H.A. Schols, M.A.J.S. Van Boekel, G. Smit, Incorporation of Chlorogenic Acids in Coffee Brew Melanoidins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (2008) 2055-2063.
45. N. Caporaso, M.B. Whitworth, Ch. Cui, I.D. Fisk, Variability of single bean coffee volatile compounds of Arabica and robusta roasted coffees analysed by SPME-GC-MS, *Food Research International*. 108 (2018) 628-640.
46. <https://www.kavovnik.cz/clanky/instantni-kava-a-jeji-vyroba/>, staženo 14. března 2019.
47. <https://www.atlasobscura.com/articles/decap-coffee-nazi-party>, staženo 31. března 2019.
48. <https://www.kavovnik.cz/clanky/jak-se-vyrabi-kava-bez-kofeinu-a-co-to-znamená/>, staženo 12. března 2019.
49. <https://www.vybornakava.cz/2014/vse-co-jste-chteli-vedel-o-kave-bez-kofeinu/>, staženo 12. března 2019.
50. A.S. Franca, J.C.F. Mendoca, S.D. Oliveira, Composition of green and roasted coffees of different cup qualities, *LWT - Food Science and Technology*. 38 (2005) 709-715.
51. J. Velíšek, J. Hajšlová, *Chemie potravin II*, OSSIS, Tábor 2009.
52. G. Mrázková, *Obsah polyfenolických látek v kávě*, diplomová práce, Mendelova Univerzita, Agronomická fakulta, Ústav technologie potravin, Brno 2011.

53. E. Thom, The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People, *Journal of International Medical Research*. 35 (2016) 900-908.
54. D. Perrone, C.M. Donangelo, A. Farah, Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry*. 110 (2008) 1030-1035.
55. A. Stennert, H.G. Maier, Trigonelline in coffee .2. content of green, roasted and instant coffee, *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*. 199 (1994) 198-200.
56. Y. Sapozhnikova, Development of liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of polyphenolic compounds in liquid samples of grape juice, green tea and coffee, *Food Chemistry*, 150 (2014) 87-93.
57. L. Kučera, R. Papoušek, O. Kurka, P. Barták, P. Bednář, Study of composition of espresso coffee prepared from various roast degrees of *Coffea arabica* L. coffee beans, *Food Chemistry*. (199) 2016 727-735.
58. O. Frank, S. Blumeberg, C. Kunert, G. Zehentbauer, T. Hofmann, Structure Determination and Sensory Analysis of Bitter-Tasting 4-Vinylcatechol Oligomers and Their Identification in Roasted Coffee by Means of LC-MS/MS, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (2007) 1945-1954.
59. A. Farah, M. Monteiro, C.M. Donangelo, S. Lafay, Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans, *The Journal of Nutrition*. 138 (2008) 2309-2315.
60. S.I. Mussatto, L.M. Carneiro, J.P.A. Silva, I.C. Roberto, J.A. Teixeira, A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds, *Carbohydrate Polymers*. 83 (2011) 368-374.
61. A.B. Uryupin, A. S. Peregudov, Application of NMR techniques to the determination of the composition of tobacco, coffee, and tea products, *Journal of Analytical Chemistry*. 68 (2013) 1021-1032.
62. M.F. Marcone, S. Wang, W. Albabish, S. Nie, D. Somnarain, A. Hill, Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology, *Food Research International*. 51 (2013) 729-747.
63. S.A. Bhawani, S.S. Fong, M.N. Mohamad Ibrahim, Spectrophotometric Analysis of Caffeine, *International Journal of Analytical Chemistry*. 2015 (2015) 1-7.
64. L. Wang, D. Sun, H. Pu, J. Cheng, Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57 (2016) 1524-1538.
65. D. Ryan, R. Shellie, P. Tranchida, A. Casilli, L. Mondello, P. Marriot, Analysis of roasted coffee bean volatiles by using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1054 (2004) 57-65.
66. M. A. Rostango, N. Manchon, M. d'Arrigo, E. Guillmon, A. Villares, A. Garcia-Lafuente, A. Ramos, J. A. Martinez, Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and

- caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column, *Analytica Chimica Acta*. 685 (2011) 204-211.
67. N. Liang, D. Kitts, Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions, *Nutrients*. 8 (2016) 16-.
 68. D. Kremr, T. Bajer, P. Bajerová, S. Surmová, K. Ventura, Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: A review, *Química Nova*, 39 (2016) 530-533.
 69. J. Santana-Galvez, L. Cisneros-Zevallos, D. Jacobo-Velaquez, Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome, *Molecules*. 22 (2017), 358-.
 70. R. Garrett, C.M. Rezende, D.R. Demian, R. Ifa, Revealing the spatial distribution of chlorogenic acids and sucrose across coffee bean endosperm by desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging, *LWT - Food Science and Technology*, 65 (2016) 711-717.
 71. S. Meng, J. Cao, Q. Feng, J. Peng, Y. Hu, Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013 (2013) 1-11.
 72. H.M. Rawel, S.E. Kulling, Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2 (2007) 399-406.
 73. M.N. Clifford, J. Kirkpatrick, N. Kunhert, H. Roozendaal, P.R. Saldago, LC-MSn analysis of the cis isomers of chlorogenic acids, *Food Chemistry*. 106 (2008) 379-385.
 74. Y. Matusi, S. Nakamura, N. Kondou, Y. Takasu, R. Ochiai, Y. Masukawa, Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of chlorogenic acids and their metabolites in human plasma, *Journal of Chromatography B*. 858 (2007) 96-105.
 75. J.L. Willems, M.M. Khamis, W.M. Saeid, R.W. Purves, G. Katselis, N.H. Low, A. El-Aneed Analysis of a series of chlorogenic acid isomers using differential ion mobility and tandem mass spektrometry, *Analytica Chimica Acta*. 933 (2016) 167-174.
 76. I. Urakova, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov, V.M. Kosman, V.G. Makarov Comparison of high performance TLC and HPLC for separation and quantification of chlorogenic acid in green coffee bean extracts, *Journal of Separation Science*. 31 (2008) 237-241.
 77. S.C. Gouveia, P.C. Castilho, Validation of a HPLC-DAD-ESI/MSn method for caffeoylquinic acids separation, quantification and identification in medicinal *Helichrysum* species from Macaronesia, *Food Research International*. 45 (2012) 362-368.
 78. J. Davídek, *Laboratorní příručka analýzy potravin*, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1981.
 79. P. Javorský, *Chemické rozborý v zemědělských laboratořích*, Ministerstvo zemědělství a výživy ČSR, Praha 1976.
 80. G. Janíček, K. Šandera, B. Hampl, *Rukověť potravinářské analytiky*, SNTL, Praha 1962

81. L. Kučera, O. Kurka, P. Barták, P. Bednář, Liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry – Tool for the study of polyphenol profile changes during micro-scale biogas digestion of grape marcs, *Chemosphere*. 166 (2017) 463-472.
82. http://web2.mendelu.cz/af_222_multitext/cvicebnice/krmivo.php?krmivo=1, staženo 16. dubna 2019.
83. V. Petráková, Možnosti využití digestátu z bioplynové stanice ve Žďáře nad Sázavou, diplomová práce, Mendelova Univerzita v Brně, Agronomická fakulta, Brno 2012.
84. O. Budín, Nakládání s odpady z bioplynových stanic, bakalářská práce, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, Ústav procesního a ekologického inženýrství, Brno 2015.
85. N. Horáková, Koncentrace CO₂ ve vnitřních prostorech, bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, Ústav obecné hygieny, Praha 2016.
86. A. Ward, J. Alastair, P. J. Hobbs, P. J. Holliman, D. J. Jones, Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources, *Bioresource Technology*, 99 (2008) 7928-7940.
87. R. C. Alves, A. S. G. Costa, M. Jerez, S. Casal, J. Sineiro, M. j. Núñez, B. Oliveira, Antiradical Activity, Phenolics Profile, and Hydroxymethylfurfural in Espresso Coffee: Influence of Technological Factors, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 12221-12229.
88. N. P. Rodrigues, N. Bragagnolo, Identification and quantification of bioactive compounds in coffee brews by HPLC–DAD–MSn, *Journal of Food Composition and Analysis*, 32 (2013) 105-115.