

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Analýza vybraných složek octa

Bakalářská práce

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Matyáš Češík**  
Osobní číslo: **C20076**  
Studijní program: **B0531A130024 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Analýza vybraných složek octa**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši zabývající se octovou fermentací, vhodnými mikroorganismy a významem tohoto typu fermentace v potravinářství.
2. Popište základní způsoby výroby octa včetně možných surovin a také hlavní ukazatele pro hodnocení kvality octa.
3. V praktické části provedte analýzy vybraných ukazatelů kvality octa a porovnejte dosažené výsledky pro octy domácí výroby a octy zakoupené v běžné obchodní síti.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Martin Adam, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **7. února 2023**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

# PROHLÁŠENÍ

Práci s názvem „Analýza vybraných složek octa“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 29. 6. 2023

.....  
Matyáš Češík

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych rád poděkoval paní Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D., pánům Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. a doc. Ing. Liboru Červenkovi, Ph.D. za jejich čas, vstřícnost a pomoc při vypracovávání příslušných experimentů této bakalářské práce. Především pak děkuji svému vedoucímu bakalářské práce, panu doc. Ing. Martinu Adamovi, Ph.D. za neochvějnou trpělivost, profesionální vedení, lidský přístup a rovněž za pomoc při výkonu příslušných měření a stanovení. Na závěr bych chtěl vyjádřit dík své rodině, která mi byla podporou po celou dosavadní dobu studia.*

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá charakteristikou a porovnáním vybraných složek jablečných octů běžně dostupných v obchodních řetězcích vs. jablečných octů amatérsky připravených. Teoretická část je věnována historii, výchozím surovinám, technologii výroby, mikroorganismům a kvalitě octů. V experimentální části byla zkoumána barva a zákal vybraných vzorků octa pomocí kolorimetrie a nefelometrie. Dále byl u vzorků zjištěn celkový počet mikroorganismů (CPM) a byla ověřena vitalita bakterií octového kvašení. V neposlední řadě byla u octů změřena kyselost jako pH a bylo stanoveno množství kyseliny octové. Nakonec byly vzorky podrobeny square-wave voltametrii v anodické oblasti (SWASV) za účelem zjištění množství  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

ocet, jablečný ocet, technologie výroby, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, voltametrie, zákal, kolorimetrie, kyselost

## **TITLE**

Analysis of Selected Vinegar Components

## **ANNOTATION**

This bachelor thesis deals with the characterization and comparison of selected components of commercially available apple cider vinegars vs. apple vinegars prepared by amateur DIY method. The theoretical part is dedicated to the history, raw materials, production technology, microorganisms and quality of vinegars. In the experimental part, the color and turbidity of selected vinegar samples were examined using colorimetry and nephelometry. Furthermore, the total cell count (TCC) was determined in the samples and the vitality of the acetic fermentation bacteria was verified. Last but not least, the acidity of the vinegars was measured as pH and the amount of acetic acid was determined. Finally, the samples were subjected to square-wave voltammetry (SWASV) to determine the amount of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions.

## **KEYWORDS**

vinegar, apple cider vinegar, production technology, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, voltammetry, turbidity, colorimetry, acidity



# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....	11
ÚVOD .....	13
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	14
1.1 Stručná historie octa .....	14
1.2 Výchozí suroviny pro výrobu octa .....	15
1.2.1 Výchozí surovina 1 – roztok obsahující ethanol .....	16
1.2.2 Výchozí surovina 2 – voda .....	16
1.2.3 Výchozí surovina 3 – živiny .....	16
1.3 Hlavní biochemické pochody výroby octa .....	17
1.4 Mikroorganismy jablečného octa .....	19
1.4.1 Mikroorganismy anaerobní fáze .....	19
1.4.2 Mikroorganismy aerobní fáze .....	19
1.5 Vlastní technologická řešení výroby octa .....	20
1.5.1 Povrchový způsob výroby octa .....	20
1.5.2 Metoda rychlého octařství .....	21
1.5.3 Submerzní metoda výroby octa .....	22
1.6 Kvalita octa .....	23
1.6.1 Vady octa .....	23
1.6.2 Legislativní požadavky na jablečný ocet .....	24
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	27
2.1 Přístroje a zařízení .....	27
2.2 Chemikálie a vzorky .....	28

2.2.1	Chemikálie .....	28
2.2.2	Vzorky .....	28
2.2.2.1	Konvenční octy.....	28
2.2.2.2	Domácí octy.....	29
2.3	Pracovní postup .....	30
2.3.1	Příprava vzorků domácího jablečného octa .....	30
2.3.2	Postup měření barevnosti a zákalu pomocí spektrofotometru UltraScan VIS....	31
2.3.3	Postup nefelometrického stanovení zákalu.....	32
2.3.4	Postup mikroskopického stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)..	33
2.3.5	Postup kultivačního stanovení životaschopnosti bakterií octového kvašení .....	34
2.3.6	Postup stanovení pH a titrační kyselosti jablečného octa potenciometricky .....	34
2.3.7	Postup stanovení $Fe^{3+}$ , $Cu^{2+}$ a $Zn^{2+}$ iontů metodou anodické rozpouštěcí voltametrie čtvercových vln (SWASV).....	35
3	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	38
3.1	Barevnost a zákal octa.....	38
3.2	Mikrobiologický profil octa .....	42
3.3	Kyselost octa .....	47
3.4	Stanovení $Fe^{3+}$ , $Cu^{2+}$ a $Zn^{2+}$ iontů ve vzorcích jablečného octa.....	49
4	ZÁVĚR.....	52
	POUŽITÁ LITERATURA .....	54
	PŘÍLOHY .....	58

# SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

## Obrázky:

Obrázek 1: Alchymistický symbol pro ocet a pro kyselinu octovou .....	14
Obrázek 2: Schematická ilustrace sudu na ocet připravovaný Orleánským způsobem.....	20
Obrázek 3: Řadové uspořádání dřevěných sudů pro fermentaci balzamikového octa .....	21
Obrázek 4: Schéma acetogenerátoru.....	22
Obrázek 5: Schéma submerzního acetátoru.....	23
Obrázek 6: Hád'átko octové, octomilka obecná a octový roztoč .....	24
Obrázek 7: Vzorky jablečných octů.....	29
Obrázek 8: Koláž fotografií z přípravy vzorků domácího octa .....	31
Obrázek 9: UltraScan VIS .....	32
Obrázek 10: Zákaloměr NEPHLA.....	33
Obrázek 11: Pohled na Bürkerovu komůrku shora a v průřezu a detailní záběr na mřížku čtverců .....	33
Obrázek 12: Kompletní sestava pro alkalimetrickou potenciometrickou mikrotitraci.....	35
Obrázek 13: Potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT101 s voltametrickou nádobkou a elektrodami .....	37
Obrázek 14: Zobrazení barvového prostoru $L^*a^*b^*$ z perspektivy a v průřezu.....	38
Obrázek 15: Závislost podílu reflektance/transmitance $R/T$ na vlnové délce $\lambda$ .....	41
Obrázek 16: Koláž zorných polí vzorků octa .....	44
Obrázek 17: Vzorek 6 na GYC médiu, ředění $10^{-1}$ .....	46

Obrázek 18: Domácí vzorky octů na plotnách s GYC médiem, ředění $10^{-3}$ .....	46
Obrázek 19: Neřaděný vzorek 4 a vzorek 5 na GYC médiu .....	46
Obrázek 20: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 6 .....	47
Obrázek 21: Druhá derivace titrační křivky stanovení kyselosti vzorku jablečného octa 6 .....	48
Obrázek 22: Kalibrační křivky standardů $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ a $\text{Cu}^{2+}$ .....	49
Obrázek 23: SWASV voltamogram kalibrace BDDE standardními roztoky $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ a $\text{Cu}^{2+}$ iontů .....	50
Obrázek 24: SWASV voltamogram stanovení $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ a $\text{Cu}^{2+}$ iontů v režimu depozice v neupraveném vzorku 5 a v upraveném vzorku 5 .....	51

## **Tabulky:**

Tabulka 1: Očekávané min. hodnoty °Bx různých ovocných šťáv .....	18
Tabulka 2: Nutriční složení jablečného octa na 100 g dle USDA .....	26
Tabulka 3: Získané kolorimetrické parametry $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $C^*$ , $h^\circ$ a $\Delta E$ včetně směrodatných odchylek .....	40
Tabulka 4: Naměřené hodnoty zákalu jednotlivých vzorků naředěného jablečného octa .....	42
Tabulka 5: Počty buněk ve vzorcích jablečných octů v počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky a CPM v jednotlivých vzorcích jablečného octa .....	43
Tabulka 6: Průměrné hodnoty % hm. kyseliny octové ve vzorcích octa a naměřené hodnoty aktivních kyselostí vzorků octa před a po odstředění .....	48
Tabulka 7: Hodnoty koncentrací chelatované formy $\text{Fe}^{3+}$ iontů s kyselinou gallovou .....	51

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AcB – Acetátový pufr (Acetate Buffer)

BDDE – Borem dopovaná diamantová elektroda (Boron-doped diamond electrode)

BE – Bod ekvivalence

°Bx – Stupně Brix

CIE – Mezinárodní komise pro osvětlení (Commission internationale de l'éclairage)

CPM (anglicky TCC) – Celkový počet mikroorganismů (Total Cell Count)

DIY – Udělej si sám (Do It Yourself)

FNU – Formazinová nefelometrická jednotka (Formazine Nephelometric Unit)

GYC – Glukóza-Kvasničný extrakt-CaCO<sub>3</sub> agar (Glucose-Yeast-CaCO<sub>3</sub> agar)

Hm. % – Hmotnostní procenta

CHOP – Chráněné označení původu

KTJ – Kolonie tvořící jednotku

Obj. % – Objemová procenta

p.a. – Pro analýzu

PB – Počet buněk

RGB – Červená, zelená, modrá (Red, Green, Blue)

Subsp. – Poddruh (z latinského „*subspecies*“)

SWASV – Anodická rozpouštěcí voltametrie čtvercových vln (Square Wave Anodic Stripping Voltametry)

USDA – Ministerstvo zemědělství Spojených států (United States Department of Agriculture)

## ÚVOD

Ocet je již po mnohá tisíciletí neodmyslitelnou součástí mnoha kultur. Hraje významnou roli v gastronomii, ale rovněž nachází uplatnění v medicíně nebo jako praktický pomocník při úklidu v domácnostech. Je pravdou, že v současné době stále převládají na českém trhu lihové octy, nicméně je možné zaznamenat zvyšující se poptávku po alternativách lihového octa. Velmi vhodnou alternativou je právě ocet jablečný, ať už kvůli dostupnosti základní suroviny – jablek, nebo kvůli jeho nezaměnitelným organoleptickým vlastnostem. Tento ocet lze již dnes běžně zakoupit v obchodních řetězcích, nicméně stále existují nadšenci, kteří si raději připraví jablečný ocet vlastními silami. Bude to právě duel mezi jablečnými octy konvenčně dostupnými a octy připravenými amatérskou metodou výroby, který je náplní této bakalářské práce.

Nejvýznamnější vliv na sensorické vnímání octa má kyselina octová. Ta v octu vzniká z alkoholu díky bakteriím octového kvašení. Alkohol vzniká metabolickou přeměnou cukrů kvasinkami. Jsou to tedy mikroorganismy, které sehrávají v kvalitě a sensorických vlastnostech octa prim. Kromě produkce kyseliny octové mají mikroorganismy společně s komplexy některých kovů a zbytky dužiny vliv na zákal a barvu octa.

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané složky jablečných octů domácího i konvenčního původu. Bylo porovnáváno množství kyseliny octové. Dále byla porovnávána barevnost a zákal vzorků společně s koncentracemi  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů kovů ve vzorcích obsažených. V neposlední řadě byl stanoven celkový počet mikroorganismů a životaschopnost bakterií octového kvašení.

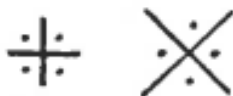
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Stručná historie octa

Samotný původ anglického ekvivalentu slova ocet „vinegar“ pochází z francouzského „vinaigre“, což doslovně znamená „kyselé víno“. To samotné je nápovědou, že k výrobě octa je zapotřebí vína nebo jiného alkoholického roztoku. Tato tekutina kyselé chuti a štiplavé vůně má velmi dlouhou tradici napříč národy [1, 2].

První zmínky o výrobě octa se objevují už v době 10 000 let př. n. l. Již staří Babyloňané<sup>1</sup> používali mízu datlovníku společně s různými druhy ovoce k výrobě alkoholických nápojů. Babyloňané brzo přišli na to, že když nechají alkoholický nápoj vystavený vzduchu, po čase se stane kyselým. Tento kyselý roztok potom nejen oni používali jako lák ke konzervaci některých potravin, dochucovadlo do pokrmů, čistící prostředek, nebo jako lék a dezinfekční prostředek [3, 4].

Ve starověku a středověku se ocet běžně vyráběl v domácnostech, a to právě samovolným „zkysnutím“ piva nebo vína na vzduchu. I při této primitivní metodě si předkové dokázali vyrobit ochucené varianty octa přidáváním různých bylin, jak tomu nasvědčují i některé přívlastky octů (růžový, chrpový, fialkový, rozmarýnový apod.). Právě v období středověku si ocet našel cestu k alchymistům, kteří ho hojně využívali, např. k přípravě oloveného cukru, resp. octanu olovnatého  $Pb(C_2H_3O_2)_2$ , který sloužil až do 19. století k doslazování moštů. Bohužel octan olovnatý je toxický a měl na svědomí smrt nemála konzumentů moštu. Ocet alchymisté značili kabalistickým symbolem kříže (obr. 1) [1, 2, 4, 5].



Obrázek 1: Alchymistický symbol pro ocet (vlevo) a pro kyselinu octovou (vpravo) [5]

Během novověku se již ocet vyráběl kontinuálně, a to Orleánskou metodou (o metodě je pojednáno v podkapitole 1.3.3.1). Ke konci novověku se váže s octem legenda o čtyřech zlodějích, kteří předešli moru pravidelným pitím česnekového octa. Okolo roku 1721 zuřila ve Francii morová epidemie. Oběti černé smrti musel někdo pohřbívat – tato práce častokrát

---

<sup>1</sup> Přibližně oblast Arabského poloostrova a Malé Asie.

případla na kriminálníky a vězně, kteří se zanedlouho poté sami stali oběťmi moru, vyjma oněch čtyřech zlodějů. Pověst má přesah i do současnosti, kdy je možné si podobný ocet zakoupit [1].

V moderních dějinách se už začalo přicházet na to, jak ocet vzniká. Poprvé na původce octovatení upozornil v roce 1837 Kützing. Jeho názor později potvrdil Louis Pasteur. První octové bakterie pak izoloval Hansen (1894). Allgeier R. J. a kolektiv [4] uvádí, že přibližně v této době této době vznikl rovněž koncept metody rychlého octárství. Ve 20. století pak dle těchto autorů byla vyvinuta submerzní metoda výroby octa (o metodách je pojednáno v kapitole 1.3.3).

Výroba octa se ve světě vyvíjela různě a byla ovlivněna dostupností surovin. Tam, kde je dostatek vína, vyrábí se vinný ocet. Ve Spojeném království jsou oblíbeny octy sladové a v USA a Švýcarsku jsou oblíbeny octy z prokvašených ovocných moštů, mezi které patří i ocet jablečný. Dnes většina evropských států, včetně ČR, zavedla ve velkém výrobu octa z lihu [4, 5].

## 1.2 Výchozí suroviny pro výrobu octa

Správné médium pro produkci kyseliny octové octovými bakteriemi musí vždy obsahovat tuto „svatou trojici“: ethanol (hlavní zdroj uhlíku), pitnou vodu (prostředí) a živiny (většinou součástí použité suroviny, nicméně u lihových octů je často přidávána glukóza, soli  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  a  $NH_4^+$  jako fosfáty, sulfáty nebo chloridy) [5].

Většina octů má rostlinný původ, nicméně existují dvě výjimky, kterými jsou syrovátkový ocet a medový ocet.

Syrovátka, která je vedlejším produktem procesu výroby sýra, bývá velmi bohatá na laktózu (potažmo galaktózu a glukózu), která v případě syrovátkového octa tvoří hlavní substrát pro výrobu ethanolu ušlechtilými kulturami kvasinek *Kluyveromyces marxianus* nebo *Kluyveromyces fragilis*. Vzniklý ethanol je poté fermentován bakteriemi octového kvašení. Bohužel zakysaná syrovátka je silně kontaminována bakteriemi mléčného kvašení a před alkoholovou a octovou fermentací je třeba ji pasterizovat [2, 6].

Med je velmi bohatý na cukry (70–80 % m/m), především sacharózu (potažmo fruktózu a glukózu). Přesný poměr jednotlivých sacharidů je ovlivněn rostlinou, ze které je nektar včelami sbírán. Buďto lze ocet vyrábět přímo z medové řediny nebo lze med přidávat jako aditivum. Med jako přídatná látka zvyšuje množství cukru v ovocném moštu, ze kterého je ocet



vyráběn. Podle studie Michel da Silva Fonesca a kolektivu [7] zároveň přidání medu do ovocného moštu (ve studii byl použit mošt z borůvky *Vaccinium ashei* L. do kterého byl přidán med namísto cukru) zvyšuje antioxidační vlastnosti výsledného produktu [2, 7].

### 1.2.1 Výchozí surovina 1 – roztok obsahující ethanol

Jak už bylo uvedeno, ethanol je hlavním zdrojem uhlíku pro výrobu octa. Buď lze využít hotové alkoholické produkty (víno z hroznů, ovocné víno, pivo apod.) nebo lze roztok obsahující ethanol vyrobit alkoholovou fermentací cukernatých roztoků připravených z různých druhů ovoce, rýže nebo cukrové třtiny. Rovněž lze jednoduše vodou naředit líh rafinovaný nebo denaturovaný (rafinovaný líh + denaturační činidlo) a připravit tak ředinu [5].

Je třeba brát na vědomí, že ať už je roztok připraven z čehokoliv, výchozí koncentrace ethanolu pro následnou fermentaci octovými bakteriemi by měla být v intervalu od 6 do 13 % obj. [8].

### 1.2.2 Výchozí surovina 2 – voda

Voda používaná k výrobě octa musí odpovídat normě pro pitnou vodu (bezbarvá, bez zákalu a sedimentu, bez zápachu, nesmí obsahovat chlor, ozon a jiné chemické dezinfekční prostředky), tj. má být po stránce chemické a mikrobiologické nezávadná. Z hlediska tvrdosti vody má jít o měkkou vodu, tedy o vodu s obsahem  $Mg^{2+}$  a  $Ca^{2+}$  iontů v rozmezí 0,7–1,25 mmol/dm<sup>3</sup>.

### 1.2.3 Výchozí surovina 3 – živiny

Většina přírodních zdrojů použitých jako suroviny nepotřebuje přídavek živin. Ovšem cider<sup>2</sup>, z něhož je jablečný ocet vyráběn (na tento ocet je bakalářská práce primárně zaměřená), však trpí nedostatkem dusíkatých látek. Proto je doporučován přídavek fosforečnanu amonného. Totéž platí pro některá hroznová vína.

Při výrobě octa z lihových roztoků však jednoznačně platí, že živiny je nutné dodávat. Ke zlepšení biosyntézy je doporučováno do řediny přidat malé množství glukózy a solí  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  a  $NH_4^+$  jako fosfáty, sulfáty nebo chloridy. Kromě toho vyžadují bakterie stopové množství železa, manganu, kobaltu, mědi, molybdenu, vanadu a zinku. Obchodní preparáty živných solí obsahují ještě další přídavky, jako např. kvasničný extrakt, výtažek ze sladových

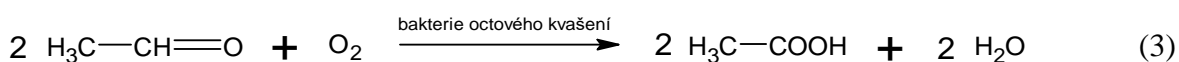
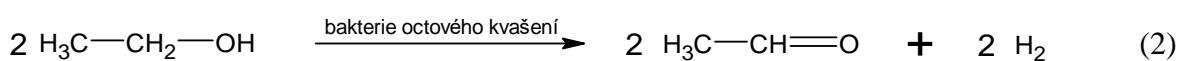
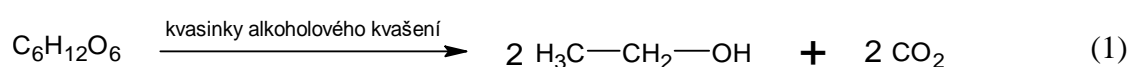
---

<sup>2</sup> Alkoholický nápoj připravený alkoholovou fermentací jablek.

klíčků nebo sladinu. Všechna tato aditiva přispívají k rychlému nastartování oxidace ethanolu a měly by být šetrně dávkovány i během kultivace bakterií [5, 9].

### 1.3 Hlavní biochemické pochody výroby octa

Výroba octa je dvoufázový proces a neobejde se bez vzájemného synergismu dvou mikroorganismů [10]. Jsou jimi kvasinky rodu *Saccharomyces*, které přeměňují za anaerobních podmínek zkvasitelné cukry na ethanol dle rovnice (1), a bakterie rodu *Acetobacter*, které následně tento alkohol oxidují (2) přes acetaldehyd až na kyselinu octovou (oxidace probíhá za aerobních podmínek) a další produkty oxidace podle rovnice (3).



To, kolik ethanolu je zkvašením moštu vyrobeno (uváděno v % obj.), záleží na mnoha faktorech: teplota fermentace, doba fermentace, pH, tolerance kvasinek k vysokému obsahu ethanolu, složení a způsob dezintegrace zakvašeného substrátu (substrátem může být jablko, slady, rýže, víno apod.).

Se složením substrátu velmi úzce souvisí množství cukru. Je důležité udržet vhodnou koncentraci cukru v moštu, neboť příliš nízká i příliš vysoká koncentrace (pokud je koncentrace cukru v roztoku vyšší jak 50 %, osmotický tlak začíná buňky utlačovat) mají negativní vliv na tvorbu ethanolu. Množství cukru v cukerných roztocích lze určit jako stupně Brix (viz tabulka 1) [2, 5, 11].

Stupně Brix (zkratka °Bx) udávají procento ve vodě rozpustných tuhých látek, které jsou obsaženy v ovocné šťávě. Stupně Brix v takové šťávě mohou být ovlivněny řadou faktorů včetně odrůdy použitého ovoce, regionu růstu nebo zralosti ovoce. Měří se nejsnadněji refraktometrem – ten měří schopnost roztoků lámat jimi procházející světelný paprsek, přičemž tato „lámavost“ je úměrná koncentraci rozpuštěných látek v roztoku. U roztoku obsahujícího pouze vodu a ve vodě rozpustný cukr lze tedy tvrdit, že 100 g roztoku s hodnotou 35 °Bx obsahuje (při teplotě 20 °C) 35 g cukru. Jinými slovy, ve 100 g cukerného roztoku je 35 g cukru a 65 g vody [12].

Tabulka 1: Očekávané minimální hodnoty °Bx různých ovocných šťáv [11]

<b>Běžný název</b>	<b>Botanický název</b>	<b>°Bx</b>
Jablko	<i>Malus domestica</i> L. Borkh.	11,2
Meruňka	<i>Prunus armeniaca</i> L.	11,2
Banán	<i>Musa x paradisiaca</i> L.	21,0
Rybíz černý	<i>Ribes nigrum</i> L.	11,0
Hroznové víno	<i>Vitis vinifera</i> L.	15,9
Grapefruit	<i>Citrus x paradisi</i> L.	10,0
Guava	<i>Psidium guajava</i> L.	8,5
Citron	<i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f.	8,0
Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	13,5
Pomeranč	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	11,2
Maracuja	<i>Passiflora edulis</i> L.	12,0
Broskev	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	10,0
Hruška	<i>Pyrus communis</i> L.	11,9
Ananas	<i>Ananas comosus</i> L. Merr.	12,8
Malina	<i>Rubus idaeus</i> L.	7,0
Třešeň	<i>Prunus cerasus</i> L.	13,5
Jahoda	<i>Fragaria x ananassa</i> Duch.	7,0
Rajče	<i>Lycopersicon esculentum</i> L.	5,0
Mandarinka	<i>Citrus reticulata</i> L.	11,2

Pozn.: Botanické názvy v tabulce jsou názvy vyšších rostlin, ze kterých ovoce uvedené v běžném názvu pochází.

## 1.4 Mikroorganismy jablečného octa

Z předešlé podkapitoly vyplývá, že výroba octa je dvoufázový proces, přičemž první fázi (fáze alkoholového kvašení) dominují kvasinky a je požadováno anaerobní prostředí pro vznik ethanolu, zatímco ve fázi druhé je zapotřebí aerobního prostředí pro aktivitu bakterií octového kvašení.

L. Solieri a P. Giudici ve své knize [2] uvádí, že mikroflóra jablek se podobně jako u hroznů skládá z divokých kvasinek (*Kloeckera apiculata*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida* subsp. a *Pichia* subsp.), bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Oenococcus* subsp.) a bakterií kvašení octového (*Acetobacter*, *Gluconobacter* a *Gluconacetobacter*).

### 1.4.1 Mikroorganismy anaerobní fáze

U tradičně připravovaného octa jsou to právě divoké kvasinky, které započnou alkoholové kvašení. V průběhu fermentace však dochází ke změnám mikrobiálního složení octa. Do popředí se dostávají rychleji množící se kmeny, které jsou navíc rezistentnější vůči vyšším koncentracím ethanolu i vůči vyššímu osmotickému tlaku. Typickými zástupci jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces uvarum* [2, 13].

### 1.4.2 Mikroorganismy aerobní fáze

Bakterie octového kvašení zapadají do čeledi *Acetobacteraceae* a patří mezi ně tyto zástupci: *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter oboediens*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconacetobacter hansenii*, *Gluconacetobacter europaeus* a *Gluconacetobacter xylinus*. Tyto bakterie se v přírodě hojně vyskytují všude tam, kde je dostatek rostlinného materiálu bohatého na cukr, tedy i v jablecích.

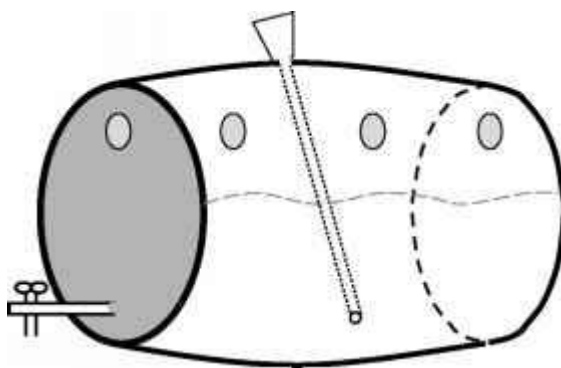
Ačkoliv všechny tři rody *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* a *Gluconobacter* zapadají do stejné čeledi a jsou schopné vydržet v relativně kyselém prostředí, jejich metabolické dráhy nejsou stejné. Některé druhy rodů *Acetobacter* a *Gluconacetobacter* jsou schopné ocet přeoxidovat (o tomto jevu je pojednáno v kapitole 1.6.1).

Zatímco některé octárny upřednostňují pro svoji výrobu jeden konkrétní druh bakterií (např. *Gluconacetobacter europaeus* je oblíben ve velkoctárenském průmyslu Střední Evropy pro výrobu octa submerzním způsobem), jiné octárny spoléhají na mix bakteriálních kultur [2].

## 1.5 Vlastní technologická řešení výroby octa

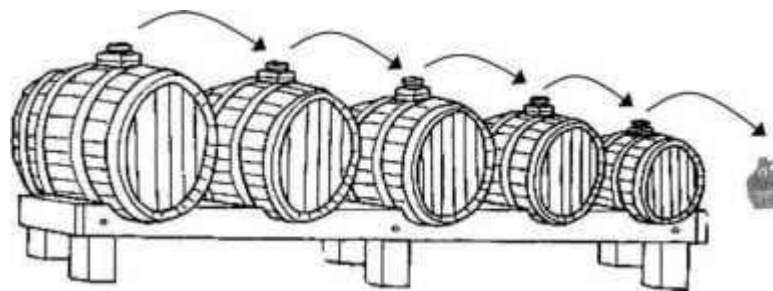
### 1.5.1 Povrchový způsob výroby octa

Povrchový způsob výroby octa (tj. Orleánský způsob) je tradiční způsob průmyslové výroby octa. Víno bylo do soudku o objemu cca 200 litrů (viz obrázek 2) naplněno do jedné poloviny a bylo ponecháno až 3 měsíce samovolnému octovatění, přičemž byl zajištěn přístup vzduchu k vínu (soudky byly otevřené a k fermentaci docházelo především na povrchu kapaliny – proto je způsob nazýván jako povrchový). Na konci celého procesu se výchozí objem tekutiny zmenšil (odpařování z povrchu kapaliny). Výsledný ocet měl cca 6 % (m/m) kyseliny octové a reziduum ethanolu okolo půl procenta. Kvůli časové náročnosti celého procesu se tento způsob také někdy nazývá „metoda pomalého octařství“ a dnes už se ve velkém téměř neprovádí.



Obrázek 2: Schematická ilustrace sudu na ocet připravovaný Orleánským způsobem [14]

Výjimkou je tradiční ocet balzamikový, který je opatřen známkou „chráněného označení původu (CHOP)“ jehož příprava může trvat roky, což se samozřejmě projeví v ceně této komodity. Výsledná chuť balzamikového octa je pak silně ovlivněna druhem dřeva, ze kterého jsou sudy vyrobeny (např. dub, kaštan, morušovník, třešeň apod.). Jedna výrobní šarže balzamikového octa může během fermentace vystřídat hned několik sudů (viz obrázek 3). Díky tomu je chuť každé výrobní šarže balzamikového octa unikátní a prakticky ji nelze dosáhnout metodami umělého staření. Mezi lokality, kde je tento ocet vyráběn, patří města Modena (Itálie), Jerez (Španělsko) a Orléans (Francie) [5, 11, 13, 15–18].



Obrázek 3: Řadové uspořádání dřevěných sudů pro fermentaci balzamikového octa [14]

### 1.5.2 Metoda rychlého octařství

Jelikož povrchové způsoby výroby octa jsou velmi zdlouhavé, byl Schützenbachem v první polovině 19. století vyvinut mnohem rychlejší způsob, který je charakteristický výrobou octa ve vysokých nádržích (acetogenerátorech) [5].

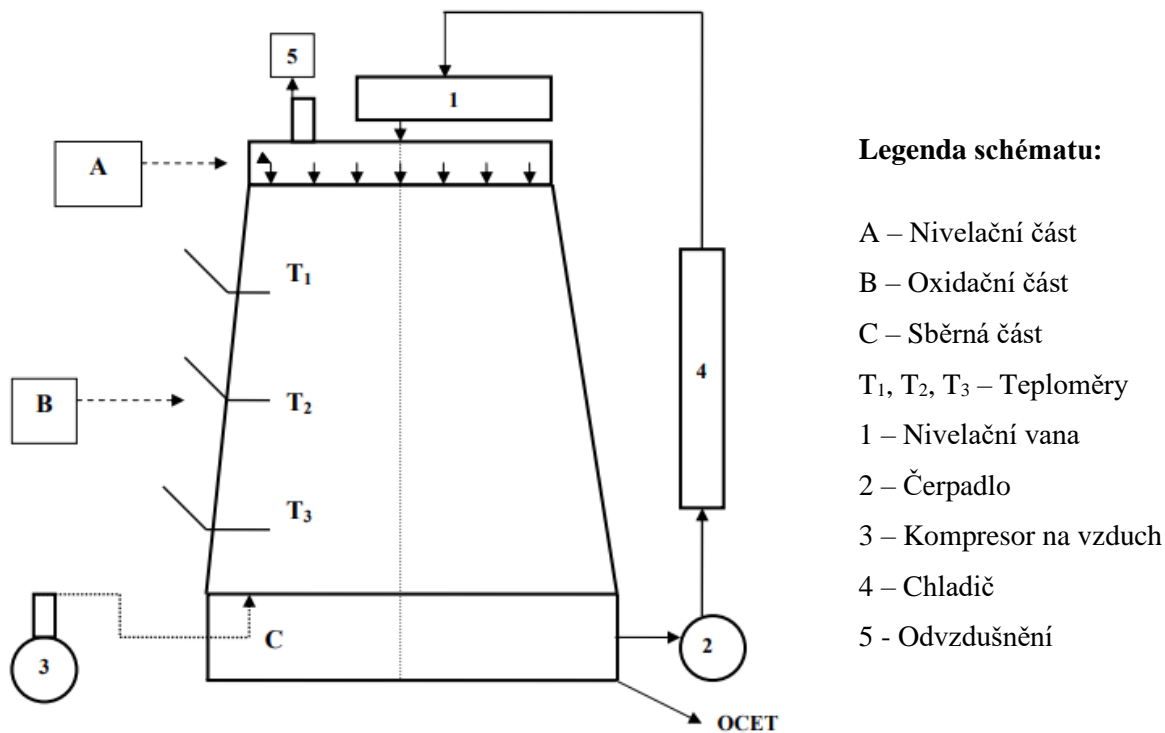
Moderní acetogenerátory (nejběžnější jsou Fringsovy velkoocetnice) bývají plně automatické a sestávají ze 3 částí (viz obrázek 4), které dohromady mohou mít v některých případech objem až 100 metrů krychlových.

Ve vrchní (nivelační) části reaktoru je rozstříkovací zařízení, které dávkuje podle potřeby ještě neprokvašenou ředinu s dostatkem ethanolu. Ředina stéká dolů, avšak za jedno protečení generátorem se nestihne všechny ethanol oxidovat na kys. octovou. Proto je acetogenerátor opatřen čerpadlem, které neprokvašenou ředinu ze spodní části vede do rozstříkovacího zařízení ve vrchní části reaktoru.

Prostřední (oxidační) část je naplněna bukovými hoblinami, na kterých jsou imobilizovány bakterie octového kvašení. Během stékání kapaliny z vrchní části zde dochází k vlastní oxidaci ethanolu a vzniká tak kyselina octová.

Dolní (sběrná) část sestává z čerpadla, kompresoru a nádrže, ve které je shromažďována prokvašená ředina. Dokud do spodní části přitéká ředina s obsahem ethanolu nad 0,3 obj. %, přečerpává čerpadlo tuto ředinu zpět do vrchní části, aby se cyklus mohl opakovat. Kompresor pak slouží k provzdušňování acetogenerátoru vzduchem, který je pro správný průběh oxidace nezbytný.

Acetogenerátor dále obsahuje chladič a 2 až 3 teploměry. Toto vybavení acetogenerátoru je nezbytné, neboť oxidace ethanolu je exotermická reakce, při které je uvolňováno relativně dost tepla, jež by bez jakékoliv regulace ovlivnilo výtěžek celého procesu. Teplota na spodním teploměru by měla být 34 °C a na horním 29 °C [5, 12, 16].



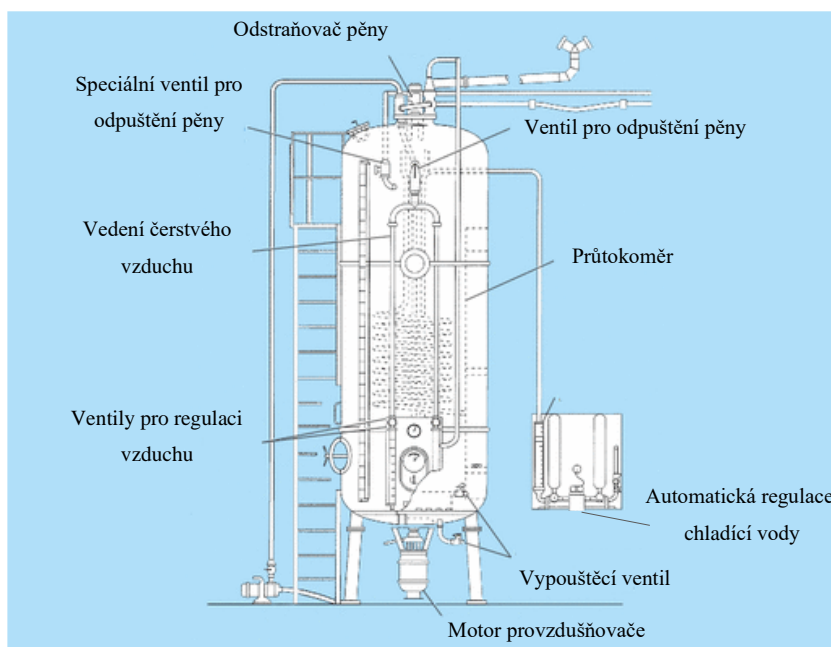
Obrázek 4: Schéma acetogenerátoru [5]

### 1.5.3 Submerzní metoda výroby octa

Kvůli své výkonnosti je submerzní metoda dnes nejpoužívanější (až 3× vyšší výkonnost ve srovnání s předešlou metodou). Největší výhodou této metody je rychlost – u acetogenerátoru činí denní výtěžek kyseliny cca 1,1 %, zatímco u submerzní metody to jsou 3 až 4 %. Navíc uvedení do chodu je oproti generátorové metodě mnohem jednodušší. V octárnách je počítáno, že z 1 litru ethanolu vznikne 1,029 kg kyseliny octové (praktická výtěžnost však bývá o 10–20 % nižší). Ztráty jsou způsobeny především odpařováním octa, špatnou volbou bakteriálních kultur, příliš velkým množstvím mázdry (vrstva vznikající na hladině octa) a přeoxidací kyseliny octové.

Narozdíl od acetogenerátoru nejsou bakterie octového kvašení u submerzní metody imobilizovány na bukových hoblinách, nýbrž jsou volně rozptýleny v celém objemu prokvašeného roztoku. To s sebou nese povinnosti intenzivnějšího provzdušňování (řešeno samonasávacími míchadly, které nasávají vzduch hřídely a dispergují ho do vznikajícího octa), filtrace, čiření a případně i pasterace.

Submerzní způsob je nejčastěji realizován vsádkově, ale lze realizovat i kontinuálně. Nálev pro vsádkovou výrobu lihového octa většinou obsahuje 11–12 % ethanolu a kolem 0,2 % živin. Doba jednoho cyklu je pak v průměru 48–72 hodin. Konec vsádkového procesu je indikován poklesem koncentrace ethanolu pod 0,3 % obj. a nárůstem množství kyseliny octové na 11–12 %. Schéma submerzního acetátoru je vyobrazeno na obrázku 5 [5, 12, 16].



Obrázek 5: Schéma submerzního acetátoru [19]

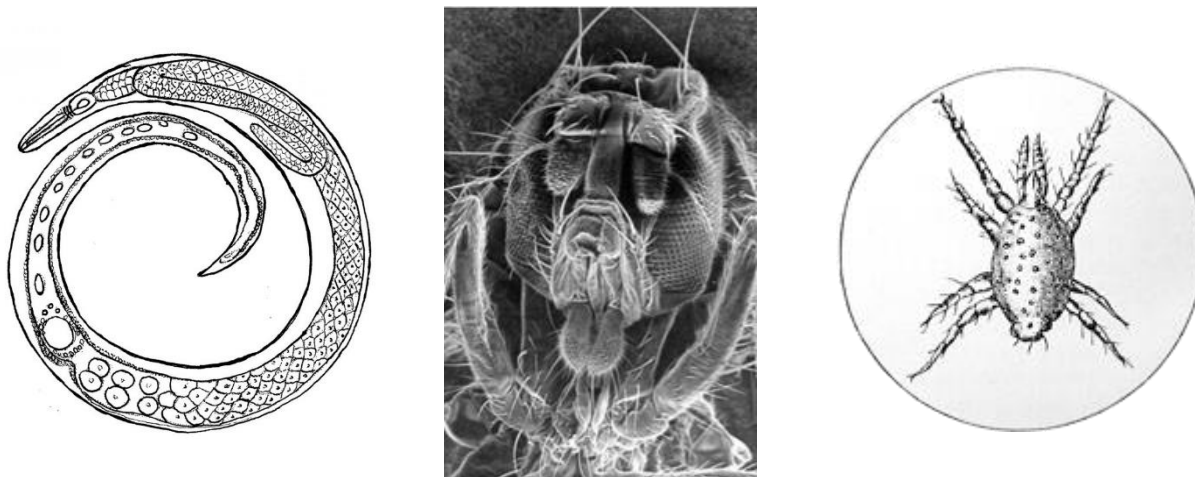
## 1.6 Kvalita octa

### 1.6.1 Vady octa

Kvalita octa může být signifikantně ovlivněna některými ionty kovů, např. železa, mědi, cínu a zinku (zatímco zinek tvoří toxický octan zinečnatý, železo, měď a cín způsobují tmavnutí a zákaly octa). Ve všech případech mají vysoké koncentrace těchto iontů negativní dopad na chuť octa [5].

Další vady octa mohou vznikat i působením škůdců, mezi které patří hád'átka octové, octový roztoč a octová muška (viz obrázek 6). Hád'átka se živí především bakteriemi, ale také dalšími látkami obsaženými v octě (zbytky dužiny výchozí suroviny). Octová muška a roztoč se navíc živí hád'átky. Tito škůdci živočišné říše přímo výrobě octa nevadí, ale snižují jeho výtěžky a ocet zakalují [5, 20].





Obrázek 6: Hád'átko octové (vlevo) [21], octomilka obecná (uprostřed) [22] a octový roztoč (vpravo) [22]

Nejvíce kvalitu octa ovlivňují mikroorganismy. Výrobci konvenčních octů se obávají zejména fágových infekcí, které mohou napadnout určitý kmen octových bakterií a naprosto zastavit fermentaci. Fágové infekce představují riziko především pro ty výrobce, kteří k fermentaci octa používají úzký výběr kmenů octových bakterií (např. jeden nebo dva kmeny). Výrobci, kteří ocet fermentují pomocí směsné kultury octových bakterií tento problém nemívají. Fágovým infekcím lze předcházet pasterizací výchozích surovin a filtrací vzduchu, který přijde do kontaktu s prostorem, kde je ocet vyráběn (problém především u povrchového způsobu výroby octa) a v neposlední řadě oddělením jednotlivých bioreaktorů od sebe. Mezi další mikrobiální vady octa lze zařadit přeoxidaci octa, kterou způsobují některé druhy rodů bakterií *Acetobacter* a *Gluconacetobacter*, které jsou schopné kyselinu octovou dále oxidovat na  $\text{CO}_2$  a vodu (např. *Acetobacter peroxidans*). Tento mechanismus slouží výše uvedeným bakteriím jako ochrana proti příliš kyselému pH a poskytuje jim tak evoluční výhodu oproti jiným bakteriím, nicméně výrobci tuto „výhodu“ považují za velký problém. Pokud není přeoxidace odhalena včas, dojde ke zhoršení kvality octa vlivem snížení jeho kyselosti způsobené úbytkem kyseliny octové [23–25].

### 1.6.2 Legislativní požadavky na jablečný ocet

Legislativní požadavky, které definují ocet jsou různé napříč státy. Požadavky na ocet bývají uvedeny v normách.

V České republice ocet definuje česká technická norma ČSN EN 13188 (Kvasný ocet – Produkt vyrobený z tekutin zemědělského původu – Definice, požadavky, značení). Tato norma je harmonizovanou verzí evropské normy EN 13188:2000. Norma definuje jablečný ocet jako výrobek získaný výhradně biologickým procesem dvojí fermentace (alkoholové

a octové) jablečného vína. Norma zakazuje do octa přidávat kyseliny všech typů s výjimkou těch přirozeně se vyskytujících v použitých surovinách, látky extrahované ze všech druhů matolin, zbytky po destilaci (výpalky) a kvašení a syntetická ochucovadla dle směrnice 88/388/EEC. Celkový obsah kyselin v octu nesmí být nižší než 50 g na 1000 ml, vyjádřený jako bezvodá kyselina octová (na etiketě je obsah kyselin vyjádřen v % hm.). Zbytkový podíl alkoholu nesmí překročit 0,5 % obj. pro kvasné octy jiné než vinné [26].

Podle Ministerstva zemědělství Spojených států amerických (USDA) má jablečný ocet obsahovat 94 % vody, 5 % kyseliny octové a 1 % sacharidů. Neobsahuje vlákninu, tuky ani bílkoviny. V referenčním množství na 100 gramů (ml) poskytuje 22 kalorií se zanedbatelným obsahem mikroživin. Nutriční složení jablečného octa dle USDA je uvedeno v tabulce 2 [27].

Ačkoliv v normách není přímo specifikováno, zda ocet má být čirý nebo zakalený, je pro výrobce octů zákal a barva velmi důležitým parametrem. Může totiž ovlivnit výsledné rozhodnutí spotřebitele, zda si výrobek koupí. U jablečných octů může být barva a zákal ovlivněna mnoha proměnnými, mezi které patří suroviny použité k výrobě octa (jablka, voda a aditiva), zvolená technologie výroby, úpravy hotového výrobku (filtrace, centrifugace apod.) a stáří octa [25, 28].

Tabulka 2: Nutriční složení jablečného octa na 100 g dle USDA [27]

<b>Složka</b>	<b>Množství</b>	<b>Jednotka</b>
Voda	93,8	g
Energie	21	kcal
Vláknina	0	g
Bílkoviny	0	g
Tuky	0	g
Sacharidy	0,93	g
z toho cukry	0,4	g
Sacharóza	0	g
Glukóza	0,1	g
Fruktóza	0,3	g
Laktóza	0	g
Maltóza	0	g
Galaktóza	0	g
Popeloviny	0,17	g
Vápník, Ca	7	mg
Železo, Fe	0,2	mg
Hořčík, Mg	5	mg
Fosfor, P	8	mg
Draslík, K	73	mg
Sodík, Na	5	mg
Zinek, Zn	0,04	mg
Měď, Cu	0,008	mg
Mangan, Mn	0,249	mg
Selen, Se	0,1	μg

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Přístroje a zařízení

- Světelný mikroskop Olympus BX41 (Olympus, Tokyo, Japonsko)
- Bürkerova komůrka (Bürker, Marienfeld, Německo)
- Kamera pro mikroskop Nikon DS-Fi1 (Nikon, Tokyo, Japonsko)
- Termostat ST 3 COMF/S (POL-EKO, Wodzislaw Slaski, Polsko)
- Autokláv PS 20 A (BMT, Brno, Česká republika)
- Mikropipety automatické (BioHit Proline, Helsinky, Finsko)
- Kahan Bunsen (Thermo Fischer Scientific, Chelmsford, MA, USA)
- Vortex MS 1 (IKA Works, Staufen im Breisgau, Německo)
- Předvážky laboratorní ES1001 (Bel Engineering, Monza, Itálie)
- Chladnička Gorenje RK6201BW (Gorenje, Velenje, Slovinsko)
- pH-metr Orion 420 A+ (Thermo Fischer Scientific, Chelmsford, MA, USA)
- Pístová byreta TITRONIC® (Xylem Analytics, Weilheim, Německo)
- Zákaloměr NEPHLA (Dr. Bruno Lange, Berlín, Německo)
- Spektrofotometr UltraScan VIS (HunterLab, Reston, VA, USA)
- Odstředivka Sorvall ST4 Plus (Thermo Fischer Scientific, Chelmsford, MA, USA)
- Potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT101 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Chloridostříbrná referentní elektroda ( $c_{\text{KCl}} = 3 \text{ mol/dm}^3$ ) (Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Pomocná platinová elektroda (Elektrochemické detektory, Turnov, Česká republika)
- Pracovní planární borem dopovaná diamantová elektroda (BDDE) s průměrem aktivní plochy 3 mm (Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- pH-měrná kombinovaná skleněná elektroda (Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Magnetické míchadlo „lab disc“ (IKA Works, Staufen im Breisgau, Německo)
- Ultrazvuková vana K18 (Kraintek Czech, Hradec Králové, Česká republika)
- Běžné laboratorní kovové, skleněné a plastové pomůcky
- Software NOVA 1. 11 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko)
- Software Statistica 14 (TIBCO Software s.r.o., Praha, Česká republika)
- Software EasyMatch QC (HunterLab, Reston, VA, USA)

## 2.2 Chemikálie a vzorky

### 2.2.1 Chemikálie

- D-glukóza monohydrát (PENTA, Praha, Česká republika)
- Kvasnicový extrakt (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Uhličitan vápenatý srážený, p.a. (PENTA, Praha, Česká republika)
- Bakteriologický agar (Erba Lachema, Brno, Česká republika)
- Hydroxid sodný, p.a. (J. T. Baker, Deventer, Nizozemsko)
- Kyselina šťavelová dihydrát, p.a. (PENTA, Praha, Česká republika)
- Kyselina octová, ledová (Merck, Darmstadt, Německo)
- Octan sodný bezvodý, p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- Zinek prášek, p.a. (Merck, Darmstadt, Německo)
- Kyselina chlorovodíková, 35% roztok (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Kyselina dusičná, 65% roztok (PENTA, Praha, Česká republika)
- Dusičnan železitý nonahydrát, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Dusičnan měďnatý trihydrát, p.a. (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Destilovaná voda (Univerzita Pardubice, Pardubice, Česká republika)

### 2.2.2 Vzorky

Celkem bylo analyzováno šest vzorků jablečného octa. Tři vzorky představovaly jablečné octy fermentované v domácích podmínkách (vzorky 1–3) a zbylé vzorky 4–6 byly zástupci jablečných octů běžně dostupných v obchodních řetězcích.

#### 2.2.2.1 Konvenční octy

Všechny vzorky konvenčních octů byly zakoupeny prostřednictvím e-shopu [www.lekarna.cz](http://www.lekarna.cz). Octy byly skladovány při pokojové teplotě a do začátku experimentu nebyly otevřeny. Na obrázku 7 jsou vzorky vyobrazeny.

Vzorek jablečného octa 4 byl v době experimentu zakoupen za 30 Kč (1000 ml). Výrobce KÁVOVINY, a.s. (Pardubice, Česká republika) na obale uvádí, že ocet byl dobarven aditivem E150c (amoniakový karamel) a obsah kyseliny octové je 8 %. Datum minimální trvanlivosti je uveden do 4. listopadu 2025.

Vzorek jablečného octa 5 byl v době experimentu zakoupen za 119 Kč (700 ml). Výrobce Allnature, s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika) uvádí, že ocet je bez konzervantů a barviv,

je BIO kvality a obsah kyseliny octové je 5 %. Datum minimální trvanlivosti je uveden do 24. května 2024.

Vzorek jablečného octa 6 byl v době experimentu zakoupen za 79 Kč (500 ml). Výrobce Moštárna Hostětín, s.r.o. (Hostětín, Česká republika) uvádí, že ocet byl vyroben bez přidání kvasinek a bakterií octového kvašení, nebyl tepelně upraven, je BIO kvality, obsahuje zákal a obsah kyseliny octové je 5 %. Na obale nejsou uvedena žádná aditiva. Na výrobku není uveden datum minimální trvanlivosti ani datum výroby, nicméně potraviny spadající do kategorie kvasné octy nemusí mít tuto informaci dle vyhlášky č. 113/2005 sbírky, o způsobu označování potravin a tabákových výrobků, uvedenou na obalu. Ocet byl zakoupen 14. března 2023.

#### 2.2.2.2 Domácí octy

Každý ze vzorků domácích jablečných octů (vzorky octů 1, 2 a 3) byl připraven z jiné, blíže nespecifikované domácí odrůdy jablek (původ jabloní je v Hlinsku v Čechách), nicméně metoda výroby všech 3 amatérských octů byla stejná (viz podkapitola 2.3.1). Skladování těchto octů probíhalo za stejných podmínek, jako u octů konvenčních.



Obrázek 7: Vzorky jablečných octů (autorské foto)

## 2.3 Pracovní postup

### 2.3.1 Příprava vzorků domácího jablečného octa

Následující postup přípravy je postupem amatérským a byl převzat z ústního sdělení prarodičů autora této bakalářské práce.

Při výrobě domácího octa bylo přibližně 500 g čerstvých jablek na struhadle nastrouháno do zavařovací sklenice o objemu 1,5 litru. K nastrouhaným jablkům bylo přidáno 150 g cukru (cukr krystal – sacharóza) a celý obsah sklenice byl zalit litrem vody z vodovodního řádu. Obsah sklenice byl důkladně promícháván až do rozpuštění veškerého přidaného cukru.

Na takto připravenou sklenici bylo zlehka našroubováno původní víčko a sklenice byla vložena do přiměřeně velké kuchyňské misky, která sloužila k zachycení stékající kapaliny, která vlivem bouřlivého kvašení vytékala ven ze zavařovací sklenice. Sklenice byla následně umístěna na 10 dní do světlého prostoru, kde se teploty pohybovaly v rozmezí 20–30 °C (teplota byla monitorována digitálním teploměrem umístěným v místnosti). Obsah sklenice byl denně promícháván.

Po uplynutí 10 dnů byl obsah sklenice přefiltrován přes bavlněné plátno a veškerý tuhý obsah (nastrouhaná jablka) byl manuálně vylisován, aby se minimalizovaly ztráty vznikajícího octa. Filtrát byl smíchán s vylisovanou kapalinou a byl umístěn do nové skleněné zavařovací sklenice o objemu 1,5 litru. Tato sklenice byla umístěna na stejné místo jako v předchozí fázi, jen s tím rozdílem, že víčko bylo ze sklenice odstraněno (namísto víčka byla sklenice překryta prodyšným bavlněným plátnem). Byl tak zajištěn přístup vzdušného kyslíku ke vznikajícímu octu. Obsah sklenice byl v této fázi ponechán 4 týdny za pravidelného denního promíchávání. Na konci této fáze byl ocet přelit do plastové průhledné zásobní lahve (viz obrázek 7), která byla uzavřena. Ocet byl v této lahvi uchován až do prvního měření.

Proces výroby byl totožný pro všechny 3 vzorky domácích octů. Proces probíhal v domácnosti během zimních měsíců.

U vzorku 3 se v průběhu druhé fáze začala na povrchu vytvářet plíseň.

Obrázek 8 zobrazuje fotografie pořízené během celého procesu výroby domácích vzorků jablečného octa.



Obrázek 8: Koláž fotografií z přípravy domácího octa (autorské foto)

### 2.3.2 Postup měření barevnosti a zákalu pomocí spektrofotometru UltraScan VIS

Zákal a barevnost jednotlivých vzorků octa byla měřena pomocí reflexního spektrofotometru UltraScan VIS firmy HunterLab (obrázek 9). Po uvedení přístroje do provozuschopného stavu byla nejprve provedena standardizace pomocí absolutně černého a bílého tělesa (k přístroji dodávány černé i bílé karty sloužící k tomuto účelu) dle pokynů v manuálu UltraScan® VIS Supplemental Manual for EasyMatch® QC [29].

Následně byly postupně proměřeny vzorky octů (každý vzorek proměřen třikrát). Před nalitím vzorku do kyvety s optickou dráhou 50 mm byl vzorek vždy promíchán. Potom byla kyveta umístěna do transmittančního prostoru, který byl následně uzavřen. Po proměření a získání dat byl obsah kyvety vylit a totéž měření bylo u stejného vzorku provedeno ještě dvakrát. Postup byl zopakován u každého vzorku.

Vzorky octů 1, 2, 3 a 6 (všechny tyto vzorky vykazovaly výraznější zákal) byly po proměření odstředěny na odstředivce při 3000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut a jako odstředěné byly proměřeny ještě jednou.

U všech vzorků byla po dokončení měření softwarem EasyMatch QC vyhodnocena barevnost ze získaných kolorimetrických parametrů  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ,  $\Delta E$ . Dále byl softwarem vyhodnocen zákal vzorků jako podíl reflektance/transmittance  $R/T$ .



Veškerá měření byla provedena za použití dvoustupňového pozorovatele a světelného zdroje D65.



Obrázek 9: UltraScan VIS [29]

### 2.3.3 Postup nefelometrického stanovení zákalu

Pro účel stanovení byl použit fotometrický zákaloměr NEPHLA výrobce Dr. Bruno Lange vyobrazený na obrázku 10. Zákaloměr je výrobcem předem kalibrován na standardní látku formazin [30]. Před měřením ho nebylo nutné kalibrovat. Pro měření všech šesti vzorků jablečného octa byl zvolen nefelometrický režim.

Zákaloměr měří pouze v intervalu 0,01–1000 FNU, proto bylo třeba vzorky octů naředit. Vzorky byly naředěny v poměru 1:1 destilovanou vodou a poté proměřeny.

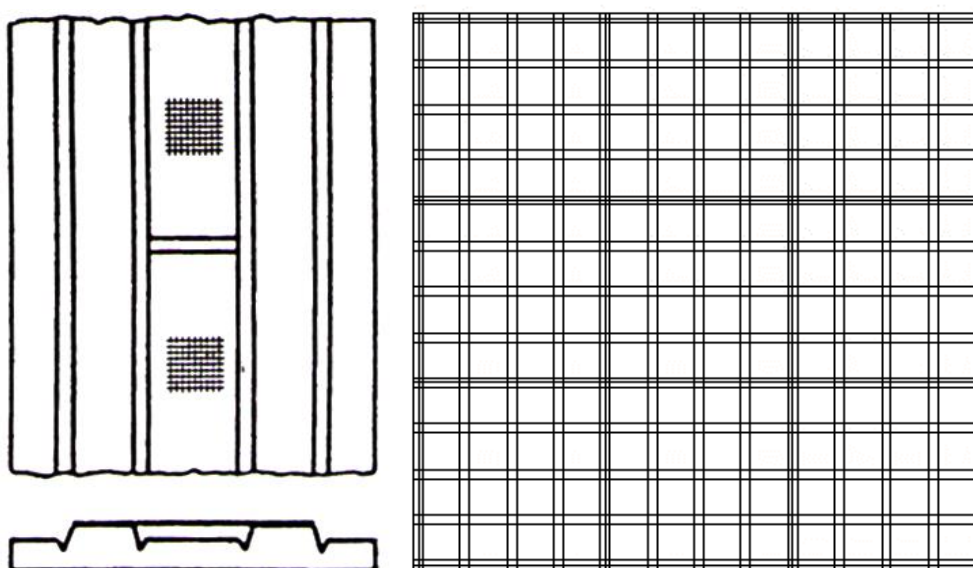
Před měřením byl každý vzorek důkladně promíchán. Následně byl přelit do kyvety, která byla ihned umístěna do otvoru s detekční jednotkou. Po krátké chvilce bylo možné odečíst hodnotu z displeje zákaloměru. Vzorek byl poté z kyvety vylit a měření bylo opakováno (každý vzorek byl měřen 5×). Před měřením dalšího vzorku byla kyveta důkladně vypláchnuta destilovanou vodou i vzorkem samotným. Stejný postup byl dodržen u všech měřených vzorků.



Obrázek 10: Zákaloměr NEPHLA (autorské foto)

### 2.3.4 Postup mikroskopického stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM)

Veškeré vzorky byly mikroskopovány pod imersním objektivem (zvětšení 1000×). Žádný ze vzorků jablečných octů nebyl ředěný. Po nanesení kapky vzorku přímo na vybroušenou mřížku Bürkerovy komůrky (komůrka je ilustrována na obrázku 11) a po přiklopení krycím sklíčkem byly pod mikroskopem pozorovány buňky mikroorganismů v polích čtverců mřížky. Z buněk, které ležely na stranách čtverců, byly počítány vždy jen ty, které ležely na dvou zvolených stranách (levá a spodní strana). Pro každý vzorek bylo počítáno 6 malých čtverců.



Obrázek 11: Pohled na Bürkerovu komůrku shora a v průřezu (vlevo) a detailní záběr na mřížku čtverců (vpravo) [31]

### **2.3.5 Postup kultivačního stanovení životaschopnosti bakterií octového kvašení**

Nejprve bylo připraveno živné médium GYC (Glukóza-Kvasničný extrakt-CaCO<sub>3</sub> agar) dle receptury Ústavu experimentální biologie Masarykovy Univerzity [32]. Do každé ze dvou litrových Erlenmeyerových baněk bylo nejprve nalito 400 ml destilované vody. Následně byly nadávkovány do každé baňky sypké ingredience, tedy 40 g glukózy, 10 g agaru, 8 g CaCO<sub>3</sub> p.a. a 4 g kvasničného extraktu. Obsah obou baněk byl důkladně promíchán. Následně bylo hrdlo baněk překryto hliníkovou folií a baňky byly vloženy do autoklávu. Na autoklávu byl nastaven režim sterilizace, teplota 121 °C a doba 21 minut. Po dokončení sterilizace a vychladnutí živného média v baňkách na teplotu přibližně 45 °C byly veškeré připravené Petriho misky pūdou zality a ponechány k samovolnému ztuhnutí při pokojové teplotě.

Pro každý vzorek jablečného octa bylo připraveno 8 ploten s GYC agarem (dvě pro nezředěný vzorek, dvě pro zředění 10<sup>-1</sup>, dvě pro zředění 10<sup>-2</sup> a dvě pro zředění 10<sup>-3</sup>). Na povrch agaru každé z ploten bylo inokulováno vždy 100 μl daných vzorků příslušného zředění a inokulum bylo pomocí sterilní L-hokejky rozetřeno po celé ploše agarového média. Zaočkované plotny byly inkubovány v termostatu při 27 °C po dobu 72 hodin.

Po inkubaci byly pozorovány a makroskopicky hodnoceny kolonie tvořící jednotku (KTJ) na povrchu jednotlivých ploten.

### **2.3.6 Postup stanovení pH a titrační kyselosti jablečného octa potenciometricky**

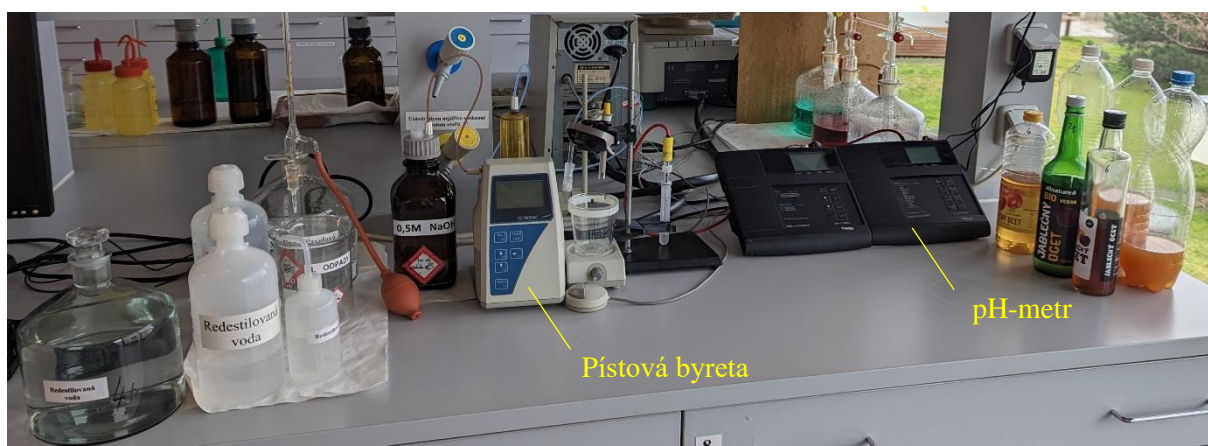
K měření byl použit pH-metr ORION 420 A+ v kombinaci se skleněnou pH-měrnou elektrodou a pomocnou platinovou elektrodou a pístová byreta TITRONIC® universal (sestava je vyobrazena na obrázku 12).

Před vlastním měřením byla ověřena kalibrace pH metru ponořením skleněné pH-měrné elektrody do roztoků 3 pufrů o různém pH (4,01, 7,00 a 10,00 pH). Přístroj nebylo třeba znovu kalibrovat, neboť naměřené hodnoty pH odpovídaly hodnotám kalibračních roztoků.

Analogickým způsobem (ponoření pH měrné elektrody do roztoků octů a vyčkání na signál přístroje) byla proměřena aktivní kyselost všech šesti vzorků. Z důvodu obavy, že by zákal (pevné částičky by mohly ulpět na membráně elektrody) mohl způsobit zkreslení naměřených hodnot, byly kalné vzorky odstředěny na odstředivce při 3000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut a znovu u nich byla proměřena aktivní kyselost.

Dále bylo třeba ověřit koncentraci (tj. provést standardizaci)  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  odměrného roztoku NaOH. K tomuto účelu byl použit roztok základní látky kyseliny šťavelové o přesné koncentraci  $0,2010 \text{ mol/dm}^3$ . Standardizace byla provedena třikrát a výsledky koncentrací byly zprůměrovány.

Po standardizaci byly postupně titrovány vzorky octů. Vzorky domácích octů nebylo třeba ředit. Vzorky konvenčních octů byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:10. Přidávky titračního činidla byly přizpůsobovány změnám pH titrovaného roztoku tak, aby vykreslovaná závislost měla typický esovitý průběh a v okolí bodu ekvivalence (BE) dostatek bodů.



Obrázek 12: Kompletní sestava pro alkalimetrickou potenciometrickou mikrotitraci (autorské foto)

### 2.3.7 Postup stanovení $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Zn}^{2+}$ iontů metodou anodické rozpouštěcí voltametrie čtvercových vln (SWASV)

K měření byl použit potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT101 v kombinaci s referenční chloridostříbrnou elektrodou s koncentrací vnitřního elektrolytu  $c_{\text{KCl}} = 3 \text{ mol/dm}^3$ , pracovní BDD elektrodou s průměrem aktivní plochy 3 mm a pomocnou platinovou elektrodou (sestava je vyobrazena na obrázku 13). Povrch pracovní elektrody byl obnovován leštěním.

Všechna měření byla prováděna v prostředí  $0,1 \text{ mol/dm}^3$  acetátového pufru (AcB) o pH 4,5, který byl připraven smícháním  $0,2 \text{ mol/dm}^3$  roztoku octanu sodného s  $0,2 \text{ mol/dm}^3$  roztokem kyseliny octové.

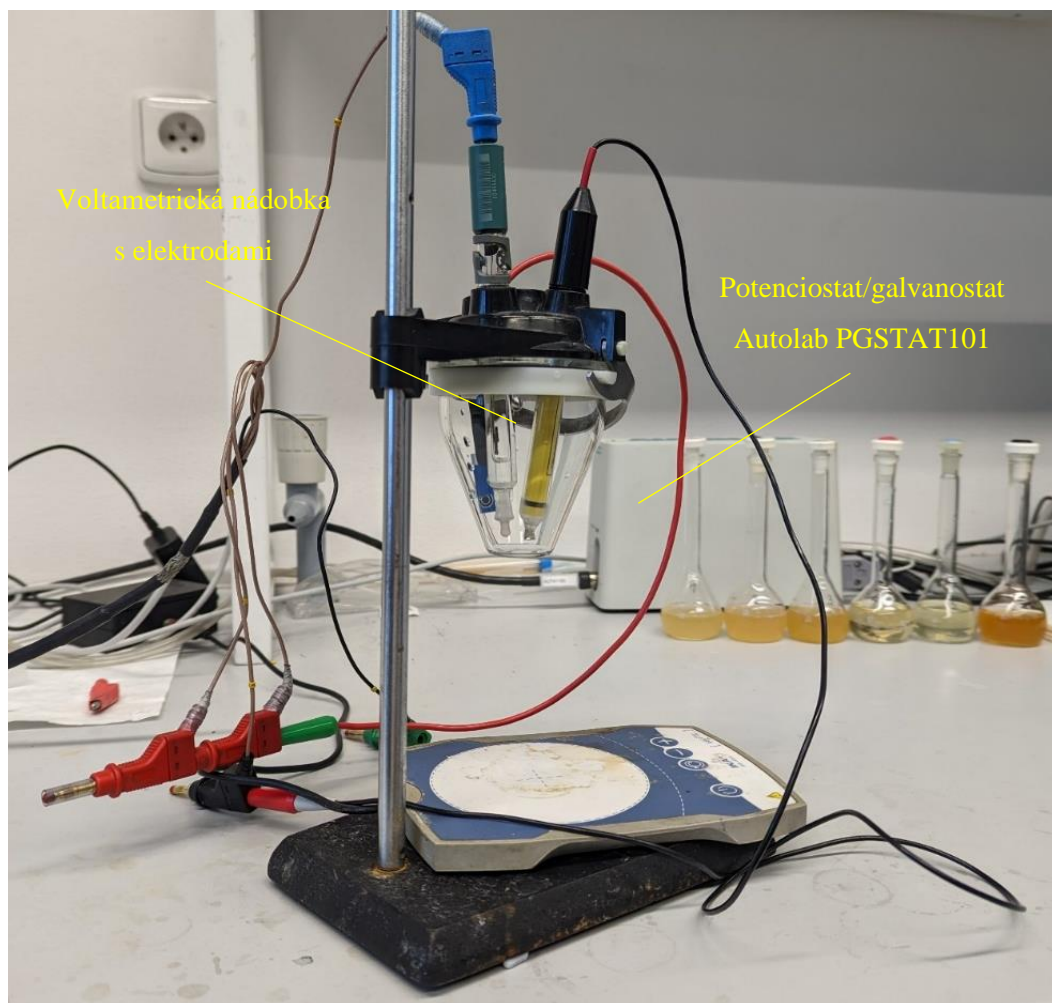
Na základě literatury [33] byly připraveny  $0,01 \text{ mol/dm}^3$  standardní roztoky iontů  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  pro následné určení kalibračních křivek. Roztok  $\text{Fe}^{3+}$  iontů byl připraven navážením 0,4040 g nonahydrátu dusičnanu železitého do odměrné baňky o objemu 100 ml a rozpuštěním v malém množství 65% kyseliny dusičné. Baňka byla následně doplněna destilovanou vodou po rysku. Standard  $\text{Cu}^{2+}$  iontů byl připraven rozpuštěním 0,2416 g trihydrátu dusičnanu

měďnatého v malém množství 65% kyseliny dusičné ve 100ml odměrné baňce a doplněním destilovanou vodou po rysku. Standardní roztok  $Zn^{2+}$  iontů byl připraven rozpuštěním 0,0636 g zinku v dostatečném množství 35% kyseliny chlorovodíkové a doplněním 100ml odměrné baňky destilovanou vodou po rysku.

Reálné vzorky octů bylo třeba před stanovením upravit na hodnotu pH 4,5. Do kádinky bylo odměřeno 40 ml daného reálného vzorku octa. Z důvodu kyselé povahy octů (viz předchozí kapitola) bylo potřeba vzorky alkalizovat. K tomuto účelu byly použity pelety hydroxidu sodného. Roztok reálného vzorku byl během alkalizace promícháván magnetickým míchadlem. Pomocí pH-měrné elektrody byla po celou dobu alkalizace kontrolována hodnota pH. Jakmile hodnota pH stoupla na 4,5, bylo možné roztok vzorku kvantitativně převést do odměrné baňky o objemu 100 ml. Takto byly připraveny všechny reálné vzorky octů.

Pro všechna měření byla využita metoda square-wave voltametrie. Nejprve bylo každé měření prováděno bez depozice. Následně bylo každé měření zopakováno s depozicí. Přístrojové podmínky byly optimalizovány dle literatury [34].

- Potenciálový rozsah (bez depozice) zvolen od 0 V do 0,6 V
- Potenciálový rozsah (s depozicí) zvolen od -1,2 V do 0,6 V
- Potenciál kondicionace 1,2 V vs. Ag/AgCl
- Doba depozice 120 s
- Doba klidu 10 s
- Potenciálový krok 5 mV
- Amplituda pulzu 100 mV
- Frekvence 20 Hz



Obrázek 13: Potenciostat/galvanostat Autolab PGSTAT101 s voltamtrickou nádobkou a elektrodami

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

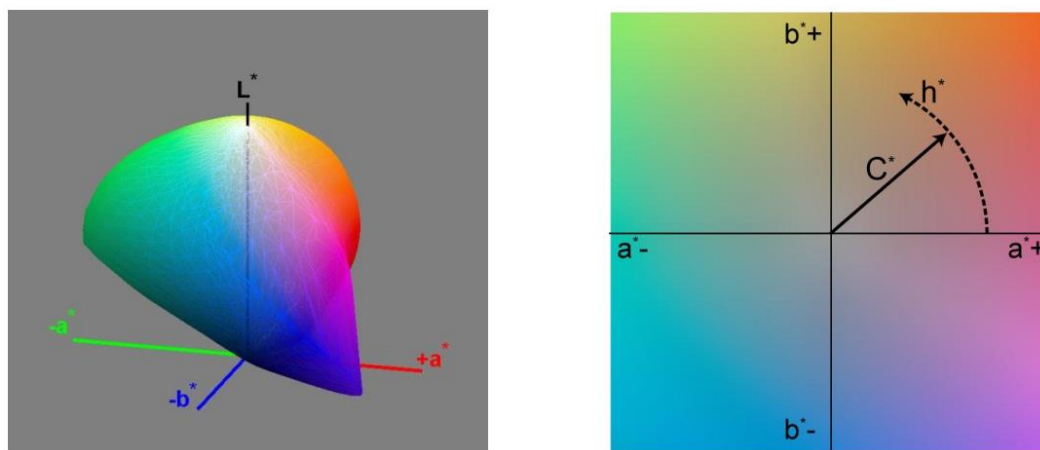
#### 3.1 Barevnost a zákal octa

Softwarovým výstupem měření pro každý vzorek jsou polohy v souřadnicích  $L^*a^*b^*$  (tento souřadný systém definovala CIE, tj. Mezinárodní komise pro osvětlení) a programem vypočtená chroma  $C^*$  a odstín  $h^\circ$ . Parametr  $L^*$  udává světlost vzorku (tedy zda jde o barvu tmavou nebo světlou), na ose  $a^*$  se nachází barvy od zelené po červenou a na ose  $b^*$  jsou barvy od žluté po modrou. Na obrázku 14 je prostor  $L^*a^*b^*$  znázorněn. Všem barvám, které lze pozorovat, je možné přiřadit konkrétní souřadnice v tomto prostoru. Chroma  $C^*$  vyjadřuje pestrost barvy a zvětšuje se současně se vzdáleností od osy  $L^*$ . Odstín  $h^\circ$  je určený úhlem. Na obrázku 14 (vpravo) jsou barvy znázorněné přerušovanou čárou barvami s konstantní chromou a měnícím se odstínem a barvy znázorněné plnou čárou jsou barvy se stejným odstínem, ale různou chromou.

Pro porovnání barevnosti vzorků octů mezi sebou byla vypočítána celková změna barevnosti  $\Delta E$  podle rovnice (4). Tento parametr udává rozdíl vzdáleností naměřených hodnot v souřadnicích  $L^*a^*b^*$  mezi dvěma vzorky. Jako referenční (standard) byl zvolen vzorek octa 4, neboť tento ocet byl v době experimentu v řetězcích cenově nejdostupnější. Čím vyšší je hodnota  $\Delta E$ , tím je barevnost porovnávaných vzorků odlišnější.

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (4)$$

Dále program pro každý měřený vzorek vygeneroval závislost podílu reflektance/transmitance  $R/T$  na vlnové délce  $\lambda$ , která dává představu o zákalu vzorků (obrázek 15). Čím je  $R/T$  za dané vlnové délky  $\lambda$  vyšší, tím je vzorek méně zakalený a naopak.



Obrázek 14: Zobrazení barvového prostoru  $L^*a^*b^*$  z perspektivy (vlevo) a v průřezu (vpravo) [35]

Získané kolorimetrické parametry  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ,  $\Delta E$  byly zprůměrovány a pro každou trojici měření ( $n = 3$ ) byla spočítána směrodatná odchylka  $\sigma$ . V následující tabulce (tabulka 3) jsou všechny tyto parametry uvedeny. Řádky tabulky jednotlivých vzorků octů byly podbarveny barvou odpovídající získaným hodnotám  $L^*a^*b^*$  pro daný ocet, a to pomocí převodníku CIE souřadnic na RGB souřadnice. Převodník je dostupný na webových stránkách *colorizer.org*.

Pro zprůměrované hodnoty  $L^*a^*b^*$  všech vzorků byl pomocí statistického programu Statistica 14 proveden Duncanův test. Bylo zjištěno, že všechny průměry jsou statisticky rozdílné (platí i pro odstředěné vzorky). Hladina významnosti byla  $p = 0,05$ . Pokud by vedle sebe stály odstředěné vzorky kalných jablečných octů a tyto byly porovnány se vzorky před odstředěním pouhým okem, bylo by možné si všimnout výrazného rozdílu v barvě i zákalu. Odstředěné vzorky se svými kolorimetrickými parametry podobají zvolenému standardu (jablečný ocet 4), jsou znatelně světlejší a transparentnější. Tato skutečnost by tak mohla mít vliv na rozhodnutí koncového spotřebitele, zda si výrobek koupí.

Z grafu (obrázek 15) je patrné, že odstředěné vzorky domácích octů jsou méně zakalené než před odstředěním, nicméně jsou pořád více kalné než vzorky konvenčních octů 4 a 5.



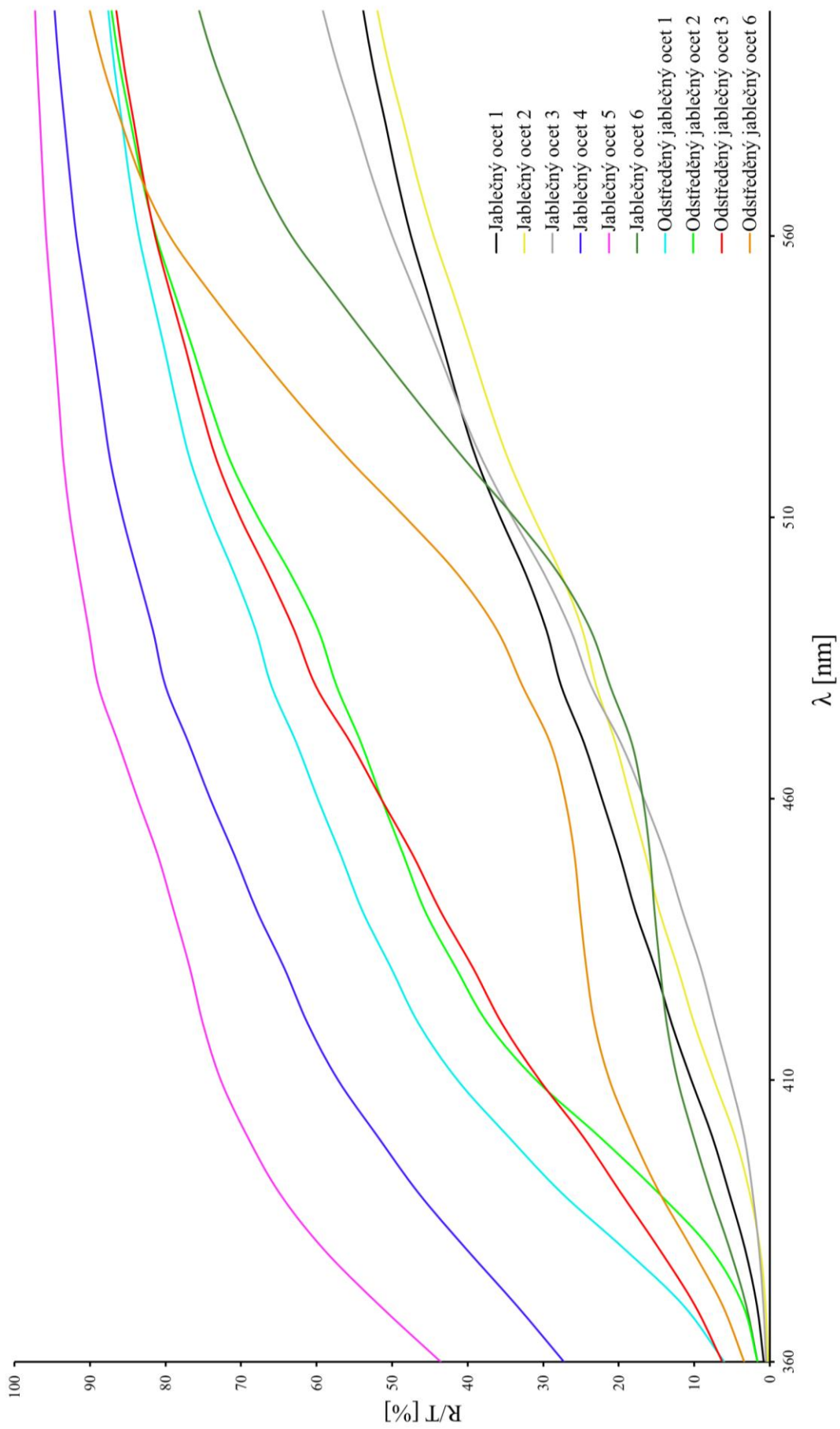
Tabulka 3: Získané kolorimetrické parametry  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$  a  $\Delta E$  včetně směrodatných odchylek ( $n = 3$ )

	Název vzorku	$L^*$	$\sigma(L^*)$	$a^*$	$\sigma(a^*)$	$b^*$	$\sigma(b^*)$	$C^*$	$\sigma(C^*)$	$h^\circ$	$\sigma(h^\circ)$	$\Delta E^*$
<i>domácí jablečné octy</i>	Jablečný ocet 1	72,35	0,09	4,01	0,02	34,15	0,26	34,38	0,26	83,31	0,02	31,23
	Jablečný ocet 2	70,16	0,05	6,26	0,00	37,76	0,03	38,28	0,02	80,59	0,01	35,60
	Jablečný ocet 3	73,39	0,09	6,50	0,00	47,34	0,01	47,78	0,01	82,19	0,00	40,75
<i>konvenční jablečné octy</i>	Jablečný ocet 4 (standard)	95,82	0,02	-0,82	0,00	14,12	0,00	14,14	0,01	93,32	0,01	0,00
	Jablečný ocet 5	97,82	0,02	-1,34	0,01	9,13	0,00	9,23	0,00	98,34	0,07	5,39
<i>kalné octy po odsředění</i>	Jablečný ocet 6	79,03	0,14	13,10	0,02	52,82	0,03	54,42	0,02	76,07	0,02	44,42
	Odstředěný jablečný ocet 1	91,80	0,36	0,04	0,06	19,85	0,46	19,85	0,46	89,88	0,17	7,06
	Odstředěný jablečný ocet 2	90,25	0,13	1,69	0,04	25,84	0,16	25,90	0,16	86,25	0,06	13,22
	Odstředěný jablečný ocet 3	90,54	0,09	-0,25	0,03	26,73	0,22	26,73	0,22	90,53	0,07	13,69
	Odstředěný jablečný ocet 6	86,87	0,05	9,42	0,02	47,31	0,06	48,24	0,06	78,75	0,02	35,87

Pozn.: Barva řádků odpovídá skutečné barvě vzorků, resp. experimentálně zjištěným hodnotám souřadnic prostoru barev  $L^*a^*b^*$ .

Červeně jsou vyznačeny hodnoty ležící v kladné oblasti souřadnice  $a^*$ , zatímco zeleně jsou vyznačeny hodnoty v oblasti záporné. Žlutě jsou vyznačeny hodnoty ležící v kladné oblasti souřadnice  $b^*$ , zatímco modře jsou vyznačeny hodnoty v oblasti záporné (žádná z naměřených hodnot neleží v záporné oblasti). Sloupce  $\Delta E^*$  a  $L^*$  jsou označeny šedě. Velikosti všech vyznačení jsou dány velikostí naměřené hodnoty.

Legenda:  $L^*a^*b^*$  – barvové souřadnice CIE,  $C^*$  – chroma,  $h^\circ$  – odstín,  $\Delta E^*$  – celková změna barevnosti,  $\sigma(x)$  – směrodatná odchylka z hodnoty  $x$



Obrázek 15: Závislost podílu reflektance/transmittance  $R/T$  na vlnové délce  $\lambda$

Zákal neodstředěných vzorků octa byl rovněž stanoven nefelometricky. Při průchodu světla roztokem obsahujícím nerozpuštěné částice (vzorky octů) dochází k jeho rozptylu do všech směrů. Platí, že čím je v roztoku více těchto částic, tím výrazněji klesá intenzita procházejícího světla a tím vyšší je naměřená hodnota FNU (formazinová nefelometrická jednotka). Naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky byly zaznamenány do tabulky 4.

Tabulka 4: Naměřené hodnoty zákalu jednotlivých vzorků naředěného jablečného octa ( $n = 5$ )

	$\Phi$ [FNU]	$\sigma(\Phi)$ [FNU]
Ředěný jablečný ocet 1	520	20,93
Ředěný jablečný ocet 2	576	31,95
Ředěný jablečný ocet 3	348	5,93
Ředěný jablečný ocet 4	8,1	0,44
Ředěný jablečný ocet 5	9,8	0,34
Ředěný jablečný ocet 6	129	2,50

Pozn.: Veškeré vzorky octů byly naředěny destilovanou vodou v poměru 1:1. Legenda:  $\Phi$  – intenzita procházejícího světla,  $\sigma(\Phi)$  – směrodatná odchylka z hodnoty  $\Phi$

Z naměřených hodnot je patrné, že zakalenější jsou vzorky domácích jablečných octů, zatímco všechny vzorky octů konvenčních jsou méně kalné. Nejvíce zakalený konvenční vzorek octa byl vzorek 6 (výrobce o zákalu informuje na obale výrobku). Toto zjištění koreluje s hodnotami zákalu zjištěnými pomocí spektrofotometru UltraScan VIS.

Výrazný zákal vzorků domácího jablečného octa může být způsoben mnoha činiteli. Mezi nejpatrnější lze zařadit mikroskopické zbytky jablečné slupky a dužiny, buňky mikroorganismů (viz následující kapitola) a některé komplexy kovů.

### 3.2 Mikrobiologický profil octa

Celková suma napočítaných buněk ve čtvercích komůrky (tabulka 5) byla dělena počtem počítaných čtverců, čímž byl získán průměrný počet buněk na čtverec. Pro získání množství buněk v  $1 \text{ cm}^3$  vzorku  $P$  byl průměrný počet buněk v jednom čtverci  $p$  dělen objemem čtverce  $V$  (objem je dán plochou a hloubkou čtverce). Nakonec bylo číslo vynásobeno použitým ředícím faktorem  $z$  podle rovnice (5). Hodnoty CPM v  $1 \text{ cm}^3$  každého vzorku byly zaneseny rovněž do tabulky 5.

$$P = \frac{p}{V} \cdot z \quad (5)$$

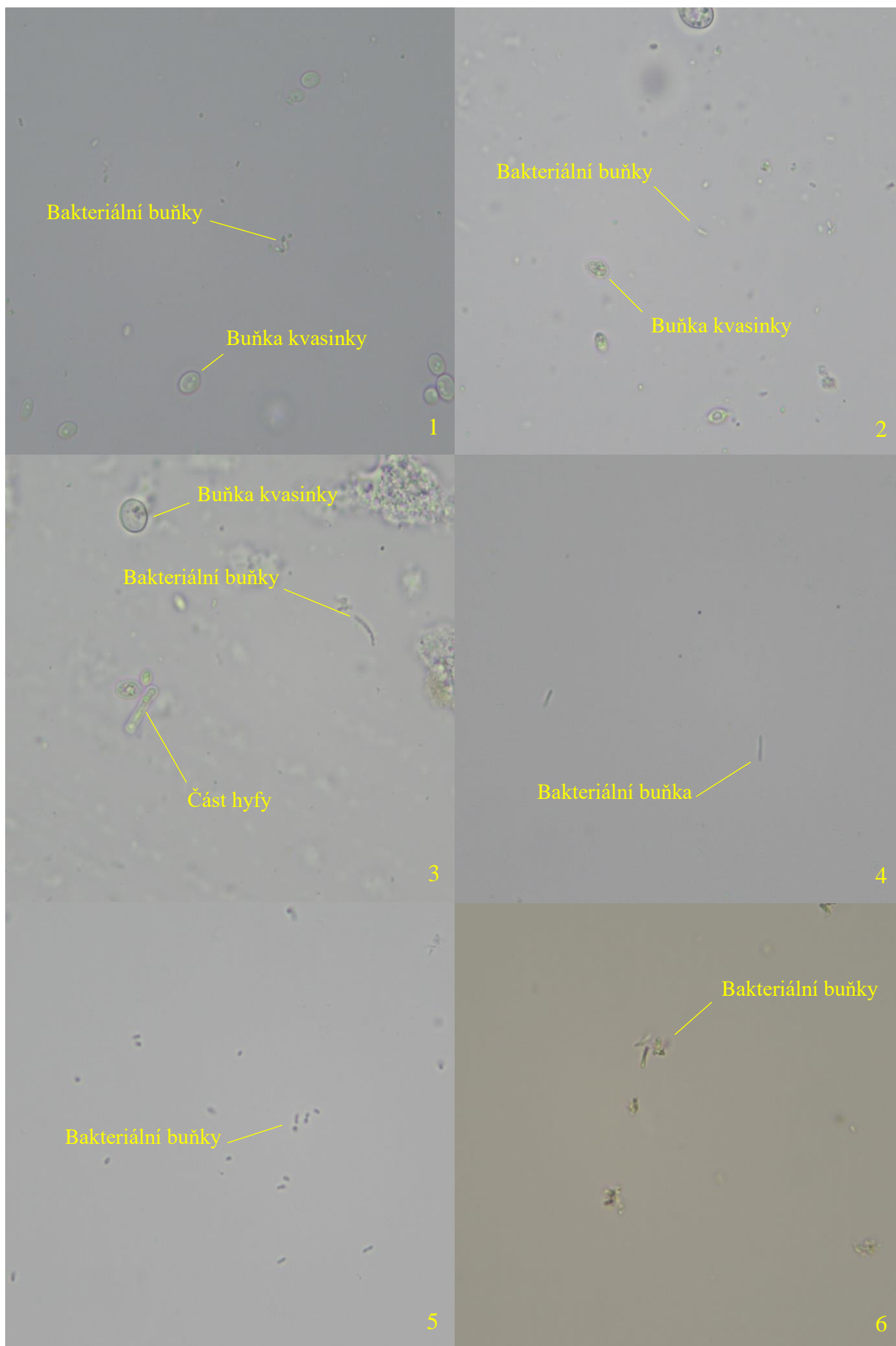
Tabulka 5: Počty buněk ve vzorcích jablečných octů v počítaných čtvercích Bürkerovy komůrky ( $n = 6$ ) a CPM v jednotlivých vzorcích jablečného octa

	$p$ [PB]	$\sigma(p)$ [PB]	CPM v 1 cm <sup>3</sup> [KTJ]
<b>Jablečný ocet 1</b>	117	15	29 250 000
<b>Jablečný ocet 2</b>	180	17	45 000 000
<b>Jablečný ocet 3</b>	198	24	49 500 000
<b>Jablečný ocet 4</b>	20	7	5 000 000
<b>Jablečný ocet 5</b>	113	13	28 250 000
<b>Jablečný ocet 6</b>	102	7	25 500 000

Pozn.: Jednotka PB vyjadřuje „Počet buněk“. Legenda:  $p$  – průměrný počet buněk v jednom čtverci,  $\sigma(p)$  – směrodatná odchylka z hodnoty  $p$

Z naměřených hodnot je patrné, že vyšší koncentrace mikroorganismů byla prokázána u octů domácí výroby než u octů konvenčních, což koreluje s výsledky měření zákalu octa. Konkrétně vzorek 3 obsahoval ze všech vzorků největší počet buněk na 1 cm<sup>3</sup>. Naopak vzorek konvenčního jablečného octa 4 obsahoval řádově menší počty mikroorganismů než kterýkoliv jiný vzorek.

Co se kvalitativního složení jednotlivých vzorků octa týče, lze konstatovat následující. Vzorky domácích octů obsahovaly ve všech pozorovaných zorných polích více kvasinek než bakterií. Ve vzorku 3 byla pozorována hyfa neidentifikované mikroskopické vláknité houby. Všechny vzorky konvenčních octů obsahovaly výhradně buňky bakterií, tj. u těchto vzorků nebyla pozorována žádná buňka kvasinky nebo jiného mikroorganismu. Pro lepší čtenářovu představu bylo vybráno 6 zorných polí (nativní preparát, zvětšení 1000×), každé pro jeden vzorek octa, které byly zasazeny do koláže na obrázku 16.



Obrázek 16: Koláž zorných polí vzorků octa (nativní preparát, zvětšení 1000×, autorské foto)

Nedílnou součástí octa jsou bakterie octového kvašení, jejichž životaschopnost byla u všech vzorků ověřena kultivační metodou. K tomuto účelu bylo zvoleno živné médium GYC (Glukóza-Kvasničný extrakt-CaCO<sub>3</sub> agar), jehož příprava je podrobně popsána v kapitole 2.3.5. Toto médium detekuje přítomnost mikroorganismů schopných produkovat organické kyseliny vytvořením průhledné zóny v okolí kolonií v důsledku neutralizace uhličitanu vápenatého, který médium obsahuje (halo efekt). GYC je považováno za standardní růstové médium pro bakterie octového kvašení, nicméně není selektivní. Pro zvýšení selektivity je doporučován přídavek cykloheximidu. Cykloheximid disponuje silnými antifungálními účinky a zamezuje tak růstu kvasinek a mikroskopických vláknitých hub. V experimentu však nebylo použito žádného antifungálního činidla [36–38].

Po inkubaci byly veškeré plotny makroskopicky vyhodnoceny. Přítomnost živých octových bakterií byla potvrzena pouze u jablečného octa 6. V blízkosti některých kolonií na plotnách tohoto vzorku došlo ke vzniku halo efektu (viz obrázek 17). U všech vzorků domácích octů dominovaly na plotnách kolonie kvasinek, patrně z důvodu absence cykloheximidu v živném médiu, tudíž u těchto vzorků nešlo objektivně posoudit životaschopnost bakterií octového kvašení (viz obrázek 18). U vzorků konvenčních octů 4 a 5 došlo na plotnách zaočkovaných neředěným vzorkem pouze k minimálnímu nárůstu kolonií, které nevykazovaly halo efekt (u vzorku 5 nebyla patrná jediná kolonie), což poukazuje na nízkou životaschopnost bakterií octového kvašení v těchto vzorcích (viz obrázek 19).



Obrázek 17: Vzorek 6 na GYC médiu, ředění  $10^{-1}$  (autorské foto)



Obrázek 18: Domácí vzorky octů (vzorek 1 vlevo, vzorek 2 uprostřed a vzorek 3 vpravo) na plotnách s GYC médiem, ředění  $10^{-3}$  (autorské foto)



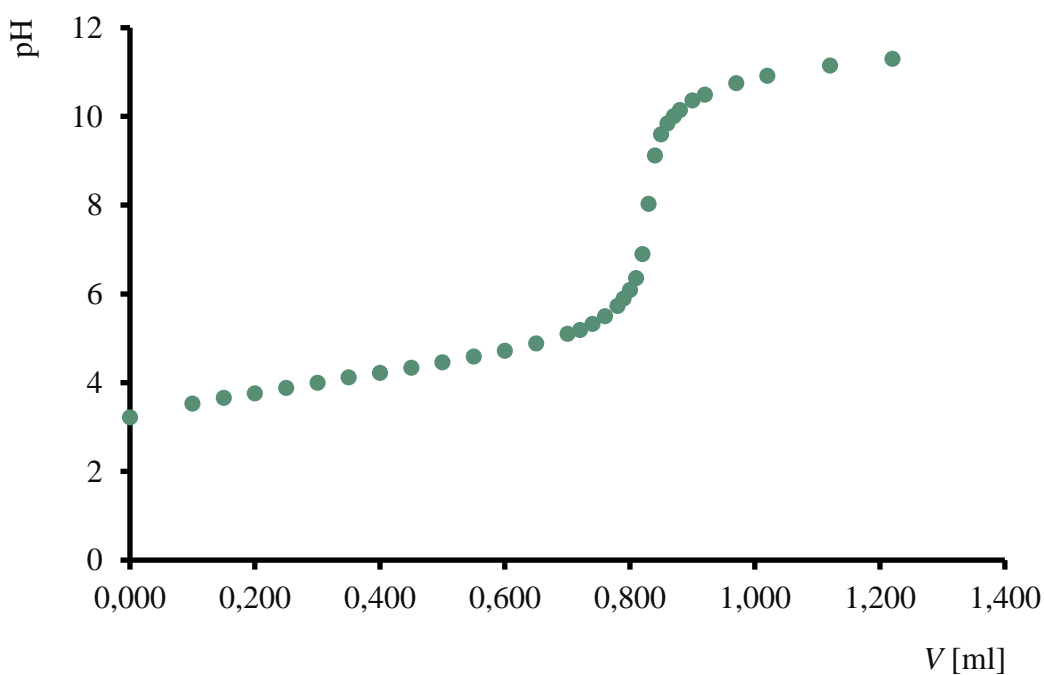
Obrázek 19: Neředěný vzorek 4 (vlevo) a vzorek 5 (vpravo) na GYC médiu (autorské foto)

### 3.3 Kyselost octa

V rámci stanovení kyselosti octa byla u všech vzorků určována jak aktivní kyselost (tj. pH), tak kyselost titrační.

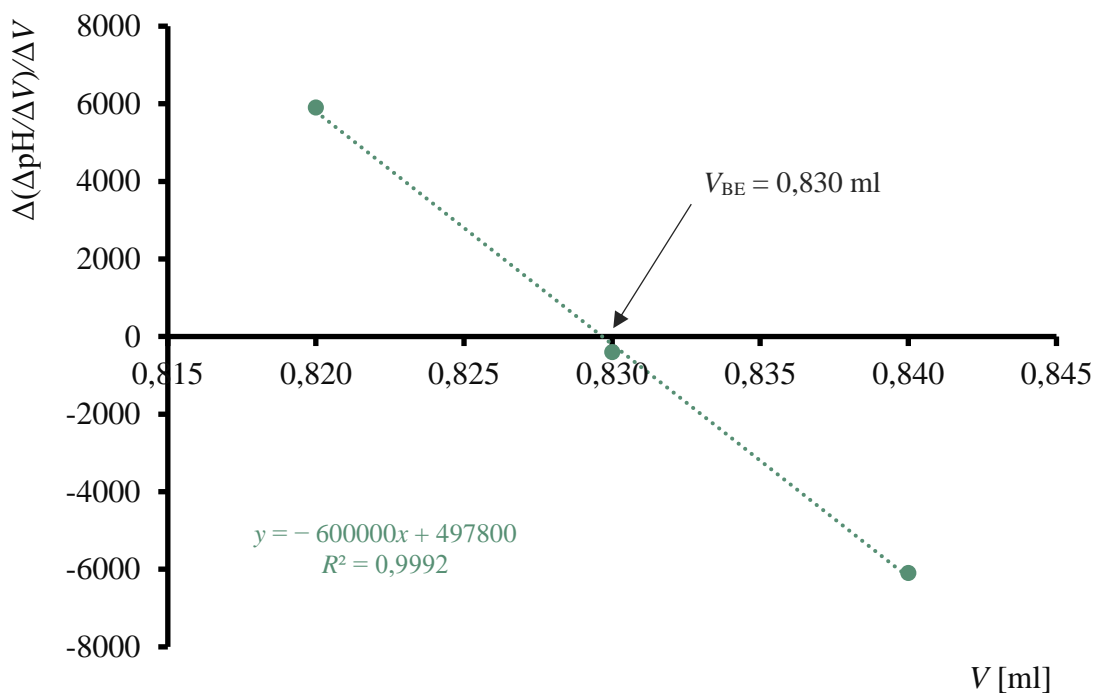
Hodnoty aktivní kyselosti odstředěných a neodstředěných vzorků octa zjištěné pH-měrnou elektrodou byly zaneseny do tabulky 6.

Cílem stanovení titrační kyselosti bylo zjistit spotřebu titračního činidla nutnou k neutralizaci titrovaných vzorků octa, tj. spotřebu v BE. Při potenciometrických titracích je měřena změna napětí článku  $\Delta E$ , která závisí na charakteru a spotřebě  $V$  přidávaného titračního činidla. Největší změnu v napětí článku lze pozorovat v okolí bodu ekvivalence, tedy když je změna koncentrace iontů  $H^+$  v roztoku největší. Pro zjištění bodu ekvivalence byla u každého vzorku vynesena závislost změny napětí článku  $\Delta E$  na spotřebě  $0,5 \text{ mol/dm}^3$  odměrného roztoku hydroxidu sodného  $V$ . Výsledkem této závislosti byla typická titrační křivka připomínající tvar písmene S (viz obrázek 20). Přesná spotřeba titračního činidla v BE byla zjištěna metodou druhé derivace titrační křivky, kdy hodnota této spotřeby je dána průsečíkem křivky druhé derivace s osou objemu (viz obrázek 21). Pomocí těchto spotřeb byly vypočítány % hm. kyseliny octové v jednotlivých vzorcích a byly zaznamenány do tabulky 6.



Obrázek 20: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 6





Obrázek 21: Druhá derivace titrační křivky stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 6

Grafy závislosti  $\Delta E$  na spotřebě odměrného roztoku hydroxidu sodného  $V$  pro všechny ostatní vzorky a standardizace lze nalézt v příloze I této bakalářské práce.

Tabulka 6: Průměrné hodnoty % hm. kyseliny octové ve vzorcích octa a naměřené hodnoty aktivních kyselostí vzorků octa před a po odstředění ( $n = 3$ )

	pH před odstředěním	pH po odstředění	% hm. $\text{CH}_3\text{COOH}$
<b>Jablečný ocet 1</b>	2,82	2,82	0,32
<b>Jablečný ocet 2</b>	3,03	3,02	0,28
<b>Jablečný ocet 3</b>	3,09	3,09	0,37
<b>Jablečný ocet 4</b>	2,25	2,27	8,10
<b>Jablečný ocet 5</b>	2,06	2,07	9,48
<b>Jablečný ocet 6</b>	2,89	2,90	4,89

Z hodnot v tabulce plyne, že odstředění nemělo prakticky žádný vliv na aktivní kyselost vzorků octa. Z hlediska aktivní kyselosti se jako nejkyselejší ukázal být vzorek 5 (konvenční ocet). Naopak nejméně kyselý byl vzorek 3 (domácí ocet). Na rozdíl od vzorků konvenčních octů 4 a 5 byl vzorek konvenčního octa 6 méně kyselý než vzorek domácího octa 1. Vzorek 1 byl nejkyselejším octem z řady vzorků domácích octů.

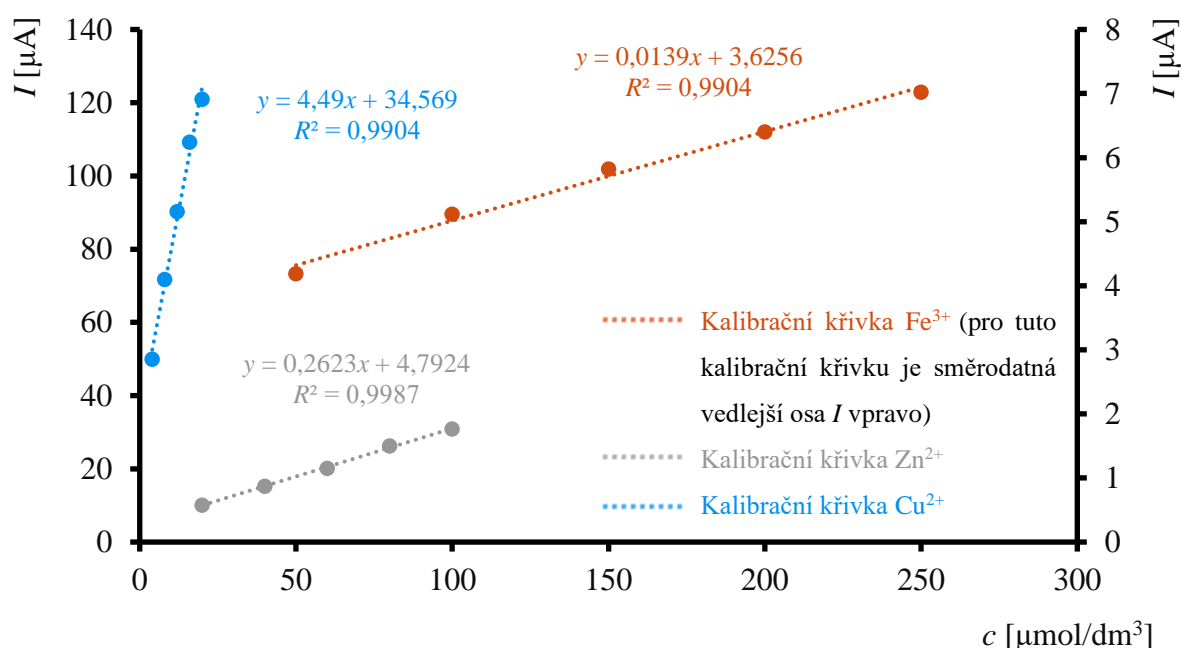
Co se množství kyseliny octové týče, řádově vyšší množství této kyseliny bylo stanoveno u všech vzorků konvenčních octů. Důvodů, proč je obsah kyseliny octové ve vzorcích domácích

octů tak nízký může být několik. Vzhledem k výsledkům mikrobiologického profilu těchto octů (podkapitola 3.2) nedošlo k úplnému prokvašení jablečného moštu bakteriemi octového kvašení (vzorky domácího octa obsahovaly stále velké množství kvasinek a jen malé množství bakterií). Tuto skutečnost patrně způsobila nekonstantní teplota v průběhu fermentace, která byla dána umístěním vzorků (o přípravě domácích vzorků octa je pojednáno v podkapitole 2.3.1). U konvenčního octa 4 výrobce deklaroval 8 % hm. kyseliny octové. Analýza tohoto vzorku deklaraci potvrdila, ve vzorku bylo nalezeno 8,10 % hm. kyseliny octové. Ocet 5 měl dle výrobce obsahovat 5 % hm. kyseliny octové, nicméně obsahoval množství vyšší, konkrétně 9,48 % hm. Ocet 6 naopak obsahoval o 0,11 % hm. octové kyseliny méně, než výrobce uvádí na obalu. Tento vzorek obsahoval 4,89 % (m/m) kyseliny octové.

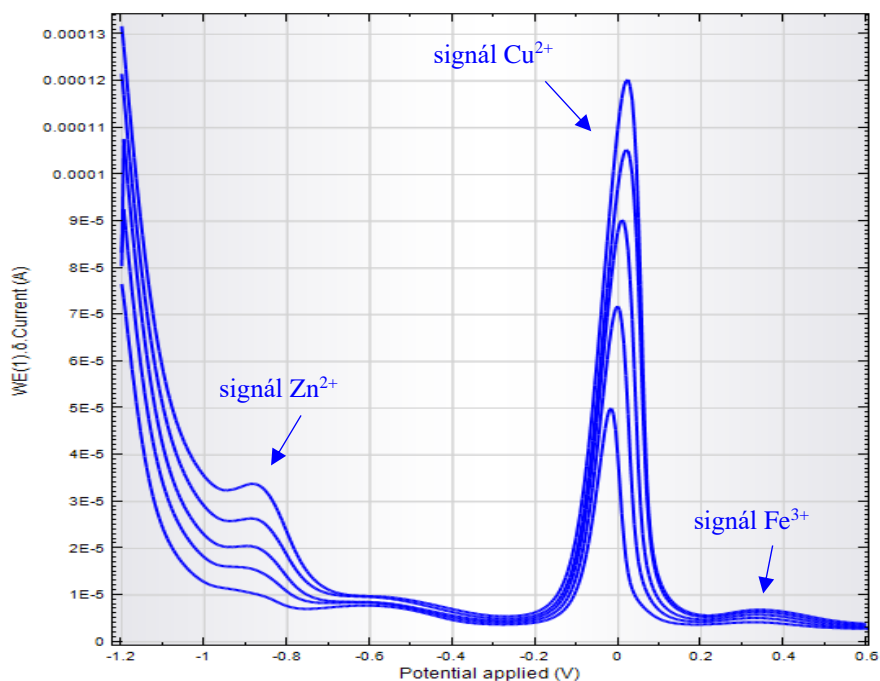
### 3.4 Stanovení $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ a $\text{Zn}^{2+}$ iontů ve vzorcích jablečného octa

Cílem experimentu bylo stanovit množství  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů ve vzorcích jablečného octa a porovnat výsledky mezi sebou. Podmínky, optimalizace, cíle práce a vůbec celá metodika byla přizpůsobena literatuře [34].

Před samotným stanovením  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů v reálných vzorcích bylo potřeba pro každý z nich sestavit kalibrační křivku pomocí příslušných standardních roztoků (o přípravě standardů bylo pojednáno v kapitole 2.3.7). Jednotlivé křivky kalibračních závislostí proudu na koncentraci byly zaneseny do grafu na obrázku 22. Voltamogram kalibrace je na obrázku 23.



Obrázek 22: Kalibrační křivky standardů  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$



Obrázek 23: SWASV voltamogram kalibrace BDDE standardními roztoky  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů

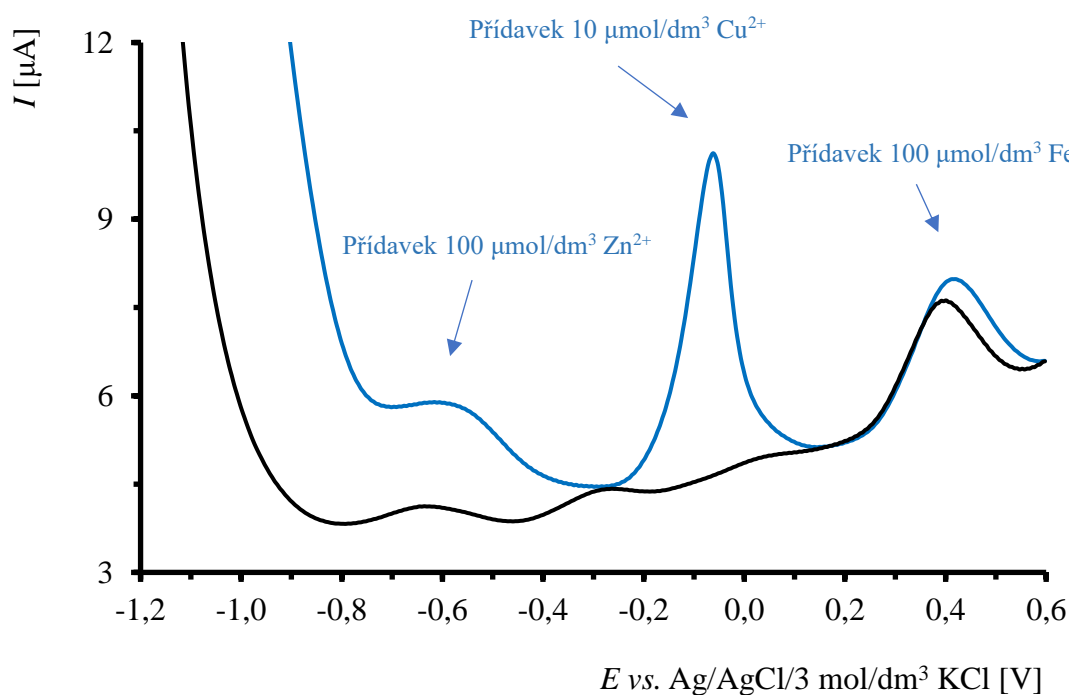
Předpokladem bylo, že pro každý sledovaný iont bude po měření sledován příslušný pík. Dle literatury [34] tvoří  $\text{Fe}^{3+}$  ionty pík při potenciálu 0,5 V, ionty  $\text{Zn}^{2+}$  při -1,1 V a ionty  $\text{Cu}^{2+}$  při 0 V. U voltamogramů však toto není patrné. Všechny vzorky octa měly dobře vyvinutý pouze pík při hodnotě potenciálu 0,4 V (ostatní píky nebyly vyvinuty vůbec nebo jen málo). Na tuto skutečnost nemělo vliv ani proměření vzorků v s depozicí (viz příloha II). Z tohoto důvodu byl kvantitativně vyhodnocen pouze tento jeden signál (tabulka 7). Důvodem je zřejmě povaha octové matrice, kdy jednotlivé ionty mohly být chelátovány do komplexů s fenolickými kyselinami, pravděpodobně s kyselinou gallovou. Dle S. A. KAZMI a kolektivu [39] je kyselina gallová schopna tvořit s  $\text{Fe}^{3+}$  ionty stabilní komplexy v intervalu pH 4–6, což by nahrávalo této možnosti. Kyselina gallová také tvoří pík při hodnotě potenciálu 0,4 V, viz literatura [40]. Pro ověření této možnosti bylo do voltametrické nádoby se vzorkem octa 5 přidáno  $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{3+}$ ,  $100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Zn}^{2+}$  a  $10 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Cu}^{2+}$  z příslušných standardních roztoků. Takto upravený vzorek byl znovu proměřen s depozicí (viz obrázek 24). Z grafu je patrné, že přidavek  $\text{Fe}^{3+}$  iontů způsobil navýšení píku při hodnotě potenciálu 0,4 V. To nasvědčuje variantě, že veškeré přidané  $\text{Fe}^{3+}$  ionty, které by ve své ionické formě tvořily pík při 0,5 V, byly při kontaktu s matricí komplexovány. Přidavek  $\text{Cu}^{2+}$  způsobil vznik nového píku při hodnotě potenciálu 0 V, což poukazuje na skutečnost, že měď se v upraveném vzorku vyskytovala v ionické formě. Přidavek  $\text{Zn}^{2+}$  pak způsobil navýšení málo vyvinutého píku při hodnotě potenciálu -0,6 V, což by mohlo být způsobeno opět tvorbou komplexu s matricí.

Tabulka 7: Průměrné hodnoty koncentrací chelatované formy  $\text{Fe}^{3+}$  iontů s kyselinou gallovou ( $n = 3$ )

	$c$ [mg/dm <sup>3</sup> ]	$\sigma(c)$ [mg/dm <sup>3</sup> ]
Jablečný ocet 1	60,82	0,16
Jablečný ocet 2	77,35	0,09
Jablečný ocet 3	53,06	0,13
Jablečný ocet 4	25,60	0,19
Jablečný ocet 5	28,15	0,18
Jablečný ocet 6	104,83	0,23

Legenda:  $c$  – koncentrace chelatované formy  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\sigma(c)$  – směrodatná odchylka z hodnoty  $c$

Z naměřených dat je zřejmé, že vyšší koncentrace chelatované formy  $\text{Fe}^{3+}$  iontů s kyselinou gallovou dosahovaly tmavší a zakalenější vzorky octů. Nejvyšší koncentrace dosahoval vzorek konvenčního octa 6 následovaný vzorky domácích octů. Nejnižší koncentrace pak vykazovaly nejsvětlejší a nejméně zakalené vzorky konvenčních octů 4 a 5.



Obrázek 24: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v režimu depozice v neupraveném vzorku 5 (černá křivka) a v upraveném vzorku 5 (modrá křivka)

## 4 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo porovnat vybrané složky vzorků konvenčních jablečných octů se vzorky domácích jablečných octů.

V první kapitole teoretické části byly stručně popsány dějiny octů a octárenství. Další kapitola byla věnována správné volbě a popisu výchozích surovin k výrobě octa. Následující kapitola byla zaměřena na mikroorganismy, bez kterých by se výroba octa neobešla, a na jejich metabolické dráhy. V další kapitole bylo pojednáno o dosud používaných technologických řešeních výroby octa včetně jejich výhod i nevýhod. Poslední kapitola teoretické části byla zasvěcena vadám octa a legislativním požadavkům na jablečný ocet.

V experimentální části byla mezi vzorky domácích a konvenčních octů porovnána barevnost, zákal, CPM, životaschopnost bakterií octového kvašení, aktivní kyselost, množství kyseliny octové a množství  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů.

Výsledky z měření zákalu a barevnosti jasně ukázaly, že vzorky domácích octů jsou kalnější a barvou tmavší než všechny vzorky octů konvenčních. Odstředění vzorků domácích octů výrazně snížilo zákal a zesvětlilo barvu těchto vzorků.

S výsledky měření zákalu úzce korelovaly výsledky stanovení CPM. Všechny vzorky domácích octů obsahovaly více mikroorganismů na  $1 \text{ cm}^3$  než vzorky octů konvenčních. Z hlediska druhového zastoupení mikroorganismů obsahovaly domácí vzorky octů více kvasinek než bakterií. V jednom ze vzorků (vzorek 3) byla pozorována i část mikroskopické vláknité houby. Naproti tomu vzorky konvenčních octů obsahovaly pouze bakteriální buňky.

Verdikt stanovení životaschopnosti bakterií octového kvašení byl určen jako následující. Jediný vzorek, u kterého byly objektivně dokázány živé buňky bakterií octového kvašení, byl vzorek konvenčního octa 6 společnosti Moštárna Hostětín, s.r.o.

Výsledky stanovení kyselosti a obsahu kyseliny octové ukázaly, že kyselější jsou vzorky konvenčních octů. Obsah kyseliny octové u vzorků domácích jablečných octů byl velmi nízký (žádný ze vzorků nepřekročil ani 0,4 % hm.). V případě konvenčních octů byly deklarace obsahu kyseliny octové splněny u vzorků 4 a 6 ( $\pm 0,11$  %), zatímco vzorek 5 deklarovanou hodnotu překročil o 4,48 %, což je skoro dvojnásobek hodnoty uvedené na obalu.

Pomocí SWASV sice nebylo z důvodu povahy octové matrice přímo stanoveno množství  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$ , nicméně stanovení ukázalo na schopnost fenolických kyselin ve vzorcích obsažených vázat tyto ionty do komplexů, které mohou mít podíl na barvě a zákalu octa. V rámci stanovení byl určen obsah chelatované formy  $\text{Fe}^{3+}$  ve všech vzorcích octa.

Verdiktem porovnání obou skupin octů je skutečnost, že octy vyrobené zmíněnou domácí metodou nelze dle české technické normy [26] ani nazývat octy, a to z důvodu velmi nízkého množství kyseliny octové v těchto vzorcích. Tyto vzorky jsou tedy spíše jakýmsi nedostatečně prokvašeným moštem. Na druhé straně vzorky konvenčních octů lze nazývat octy, nicméně ne vždy spotřebitel dostane od výrobku přesně to, co očekával.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] BOURGEOIS, J. F. a F. BARJA. The history of vinegar and of its acetification systems. *Archives des Sciences*. 2009, 62 (2), 147–160.
- [2] SOLIERI, L. a P. GIUDICI. *Vinegars of the World*. Milán (Itálie): Springer-Verlag, 2009. ISBN 978-0-470-0865-6.
- [3] BUDAK, N. H., AYKIN, E., SEYDIM, A. C., GREENE, A. K. a Z. B. GUZEL-SEYDIM. Functional Properties of Vinegar. *Journal of Food Science*. 2014, 79 (5), R757–R764.
- [4] ALLGEIER, R. J., NICKOL, G. B. a H. A. CONNER. Vinegar: history and development. *Research Dept. U. S. Industrial Chemicals Co.* 1974, 8 (5), 69–71.
- [5] RYCHTERA, M. Výroba octa. V knize: KADLEC, P., MELZOCH, K. a M. VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [6] PARRONDO, J., HERRERO, M., GARCÍA, L. A., DÍAZ, M. A note—production of vinegar from whey. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, 109 (4), 356–358.
- [7] FONSECA, M. D. S., SANTOS, V. A. Q., CALEGARI, G. C., DEKKER, R. F. H., BARBOSA-DEKKER, A. D. M., a M. A. A. D. CUNHA. Blueberry and honey vinegar: successive batch production, antioxidant potential and antimicrobial ability. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2018, 21, 1–10.
- [8] MALLE, B. a H. SCHMICKL. *The Artisanal Vinegar Maker's Handbook*. Topeka (Kansas): Spikehorn Press, 2015. ISBN 978-1-943015-02-3.
- [9] JOHNSON, G., DONNELLY, B. J. a D. K. JOHNSON. The chemical nature and precursors of clarified apple juice sediment. *Journal of Food science*. 1968, 33 (3), 254–257.
- [10] HAILU, S., ADMASSU, S. a K. JHA. Vinegar Production Technology – An Overview. *Beverage & Food World*. 2012, 2, 29–32.
- [11] LUZON-QUINTANA, L. M., CASTRO, R. a E. DURAN-GUERRERO. Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods*. 2021, 10 (5), 8–17.

- [12] TÜRKMEN, İ. a A. EKŞİ. Brix degree and sorbitol/xylitol level of authentic pomegranate (*Punica granatum*) juice. *Food chemistry*. 2011, 127 (3), 1404–1407.
- [13] LI, S., LI, P., FENG, F. a L. LUO. Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015, 99, 4997–5024.
- [14] KIEFER, D. Open vat process. *Brewiki.org* [online]. Německo: Brewiki e.V., 2022 [cit. 2023-03-06]. Dostupné z: <https://www.brewiki.org/fermented-foods-2/open-vat-process.html>.
- [15] GIUDICI, P., GULLO, M., SOLIERI, L., a P. M. FALCONE. Technological and microbiological aspects of traditional balsamic vinegar and their influence on quality and sensorial properties. *Advances in food and nutrition research*. 2009, 58, 137–182.
- [16] BHAT, S. V., AKHTAR, R. a T. AMIN. An overview on the biological production of vinegar. *International journal of fermented foods*. 2014, 3 (2), 139–155.
- [17] CIRLINI, M., CALIGIANI, A., PALLA, L., a G. PALLA. HS-SPME/GC–MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing. *Food chemistry*. 2011, 124 (4), 1678–1683.
- [18] TEFAYE, W., MORALES, M. L., GARCIA-PARRILLA, M. C., a A. M. TRONCOSO. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in food science & technology*. 2002, 13 (1), 12–21.
- [19] How was Vinegar created. In: *Aceticacidvinegar.weebly.com* [online]. [cit. 2023-06-21]. Dostupné z: <https://aceticacidvinegar.weebly.com/manufacturing-process.html>.
- [20] WEBB, A. D. Vinegar. V knize: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 3. New York: Wiley, 1983. ISBN 9780471484943.
- [21] Hádě octové. In: *BioLib.cz* [online]. Praha: Český Podnikatelský Servis, 2015 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id259719/>.
- [22] Vinegar Zoo. In: *Vinegarman.com* [online]. Roslyn (Jižní Dakota): Lawrence Diggs, © 2011 [cit. 2023-05-04]. Dostupné z: <http://www.vinegarman.com/page0/page69/index.html>.



- [23] OUSAAID, D., MECHCHATE, H., LAAROUSSI, H., HANO, C., BAKOUR, M., EL GHOUZI, A., CONTE, R., LYOUSSI, B., EL ARABI, I. Fruits vinegar: Quality characteristics, phytochemistry, and functionality. *Molecules*. 2022, 27 (1), 222.
- [24] GIUDICI, P., L., DE VERO a M. GULLO. Vinegars. V knize SENGUL, I. J. (Ed.): *Acetic Acid Bacteria Fundamentals and Food Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2017, 261–287. ISBN 978-1498763691.
- [25] JANG, S-Y., K-A., SIN a Y-J. JEONG. Quality characteristics of apple vinegar by agitated and static cultures. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2010, 39 (2), 308–312.
- [26] ČSN EN 13188. *Kvasný ocet – Produkt vyrobený z tekutin zemědělského původu – Definice, požadavky, značení*. Praha: Český normalizační institut, 2002, 12.
- [27] Vinegar, cider (FDC ID 173469): nutrient contents per 100 ml. *Usda.gov* [online]. Washington D. C.: United States Department of Agriculture, 2019 [cit. 2023-06-03]. Dostupné z: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/173469/nutrients>.
- [28] XU, Q., TAO, W. a Z. AO. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food Chemistry*. 2007, 102 (3), 841–849.
- [29] UltraScan® VIS Supplemental Manual for EasyMatch® QC. In: *Hunterlab.com* [online]. Reston (Virginia): Hunter Associates Laboratory [cit. 2023-06-05]. Dostupné z: [https://www.hunterlab.com/media/documents/Supplemental\\_Manual\\_for\\_EZMQC\\_UltraScan\\_VIS.pdf](https://www.hunterlab.com/media/documents/Supplemental_Manual_for_EZMQC_UltraScan_VIS.pdf).
- [30] *Návod k laboratorní úloze č. 7: Nefelometrie*. Pardubice: Univerzita Pardubice. 8. Studijní materiál určený pro studenty předmětu instrumentální metody analytické Univerzity Pardubice.
- [31] VYTRÁSOVÁ, J. a Z. BÍLKOVÁ. *Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie*. 3. vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2014. ISBN 978-80-7395-747-6.
- [32] Medium 4: *Acetobacter – Gluconobacter* medium. *Česká sbírka mikroorganismů a Ústav experimentální biologie Masarykovy Univerzity* [online]. Masarykova Univerzita: WebCentrum, © 2023 [cit. 2023-06-20]. Dostupné z: [https://ccm.sci.muni.cz/katalog-kultur/bakterie-a-archaea/bakterie/html\\_med/M4](https://ccm.sci.muni.cz/katalog-kultur/bakterie-a-archaea/bakterie/html_med/M4).

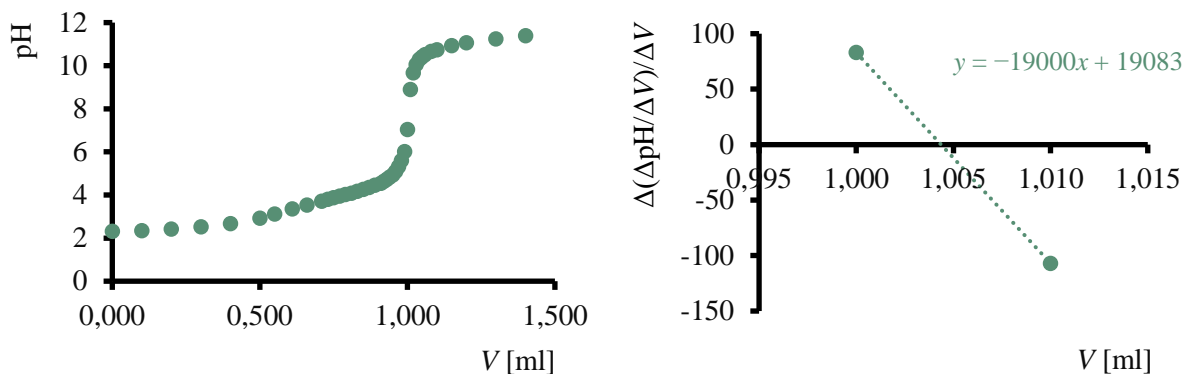
- [33] ZAKARIA, F. a S. I. MOKHTAR. Comparisons of the proximate values, mineral elements and heavy metals contents in three local fruits vinegars with the apple cider vinegar. In MOKHTAR, S. I. (Ed.): *International Conference on Food Innovation*. Penang (Malajsie): INNOVA FOOD. 2014.
- [34] FERREIRA, R., CHAAR, J., BALDAN, M., a N. BRAGA. Simultaneous voltammetric detection of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  in fuel ethanol using anodic stripping voltammetry and boron-doped diamond electrodes. *Fuel*. 2021, 291, 120104.
- [35] PANÁK, O. *Měření barevnosti*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2015. 6. Studijní materiál určený pro studenty katedry polygrafie a fotofyziky Univerzity Pardubice.
- [36] MADIGAN, M. T. *Brock Biology of Microorganisms*. 11. Upper Saddle River (New Jersey): Prentice Hall, 2005. ISBN 0-13-144329-1.
- [37] SHARAFI, S. M., RASOOLI, I. a K. BEHESHTI-MAAL. Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*. 2010, 2 (1), 38–45.
- [38] KIM, D. H., CHON, J. W., KIM, H., a K. H. SEO. Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid Bacteria from various foods. *Food Control*, 2019, 106, 106717.
- [39] KAZMI, S. A., QURESHI, M. S. a Z. MAQSOOD. Reactivity of an iron (III) complex of gallic acid. *Inorganica Chimica Acta*. 1987, 137 (3), 151–154.
- [40] HERNANZ-VILA, D., JARA-PALACIOS, M. J., ESCUDERO-GILETE, M. L. a F. J. HEREDIA. Applications of voltammetric analysis to wine products. V knize STOYTCHIEVA, M. a R. ZLATEV (Eds.): *Applications of the Voltammetry*. Londýn: InTech, 2017, 109–

## **PŘÍLOHY**

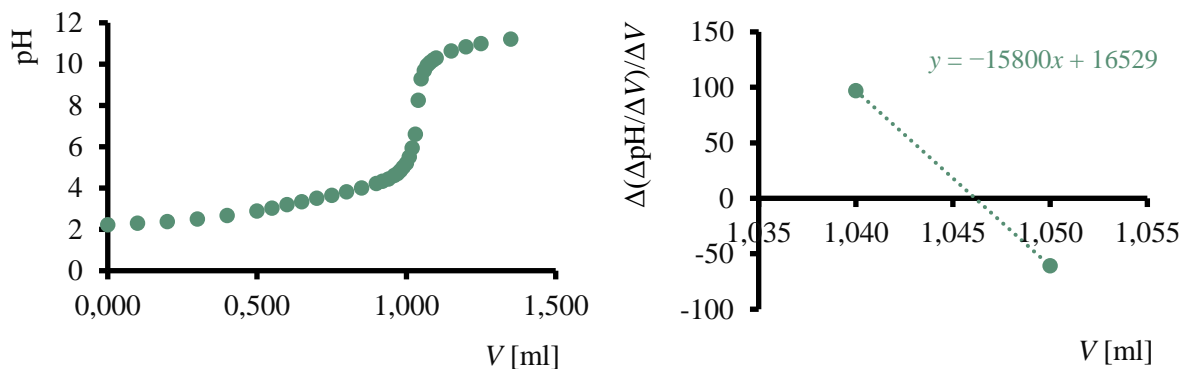
**Příloha I:** Titrační křivky standardizací a jednotlivých stanovení titrační kyselosti vzorků octa a jejich druhé derivace

**Příloha II:** Voltamogramy SWASV vygenerované programem Nova 1. 11 během stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů ve vzorcích jablečného octa

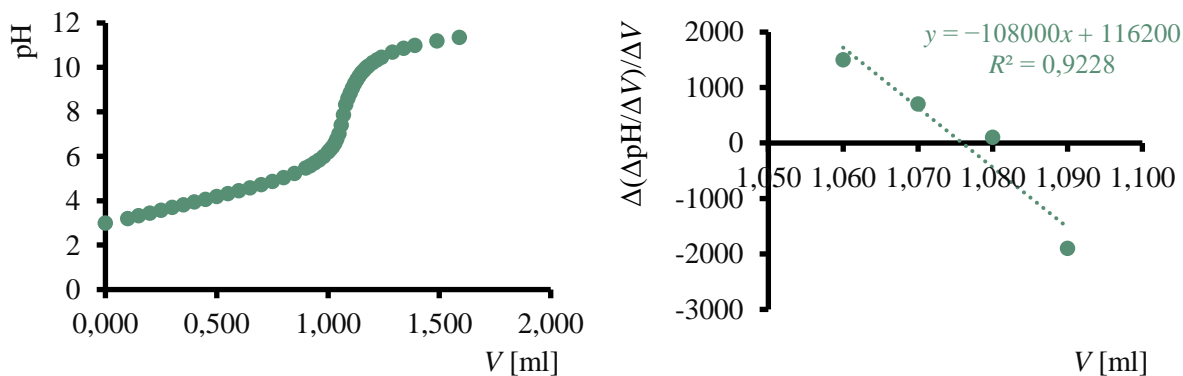
**Příloha I: Titrační křivky standardizací a jednotlivých stanovení titrační kyselosti vzorků octa a jejich druhé derivace**



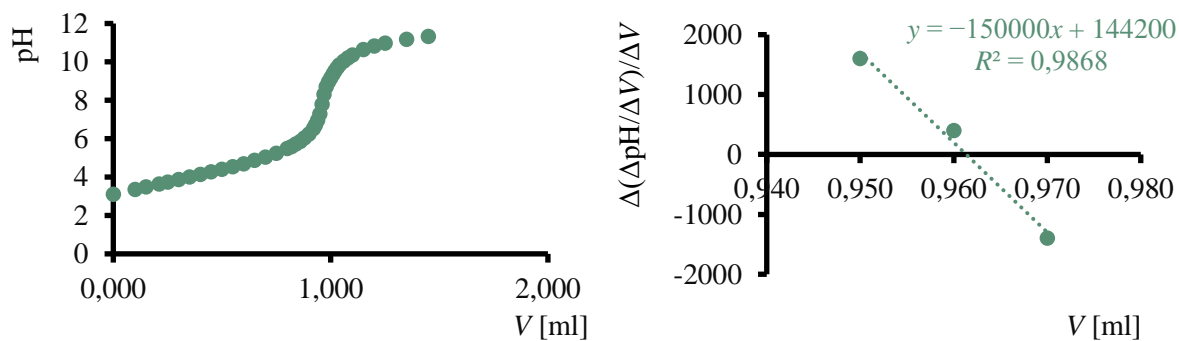
Obrázek I/1: Titrační křivka první standardizace 0,5 mol/dm<sup>3</sup> roztoku NaOH (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)



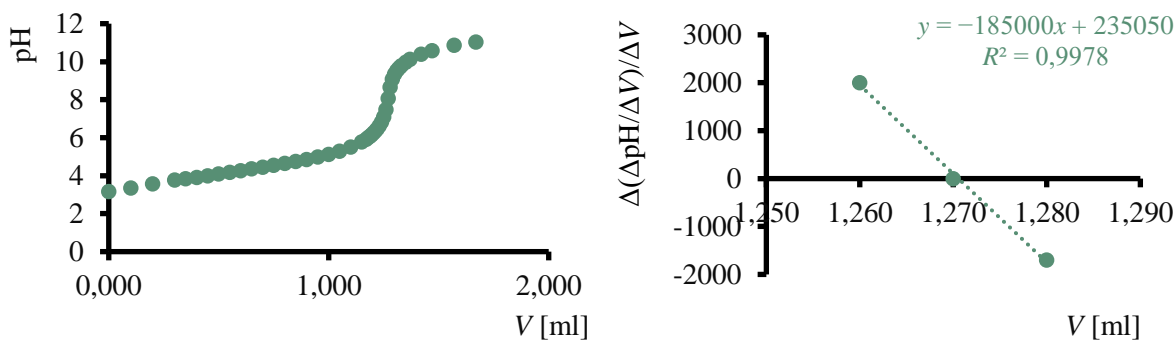
Obrázek I/2: Titrační křivka druhé standardizace 0,5 mol/dm<sup>3</sup> roztoku NaOH (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)



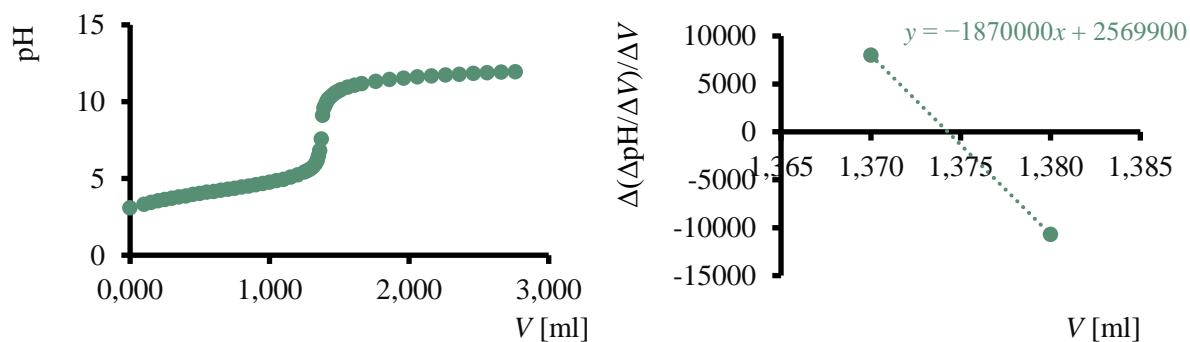
Obrázek I/3: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablčného octa 1 (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)



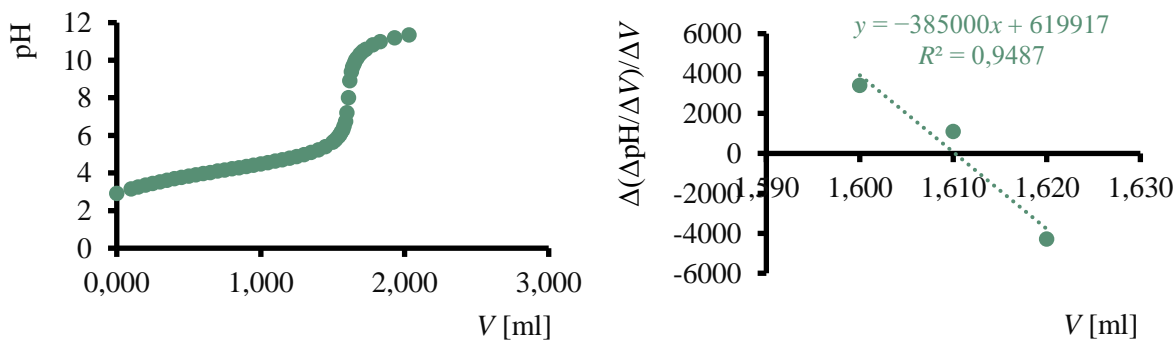
Obrázek I/4: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 2 (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)



Obrázek I/5: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 3 (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)

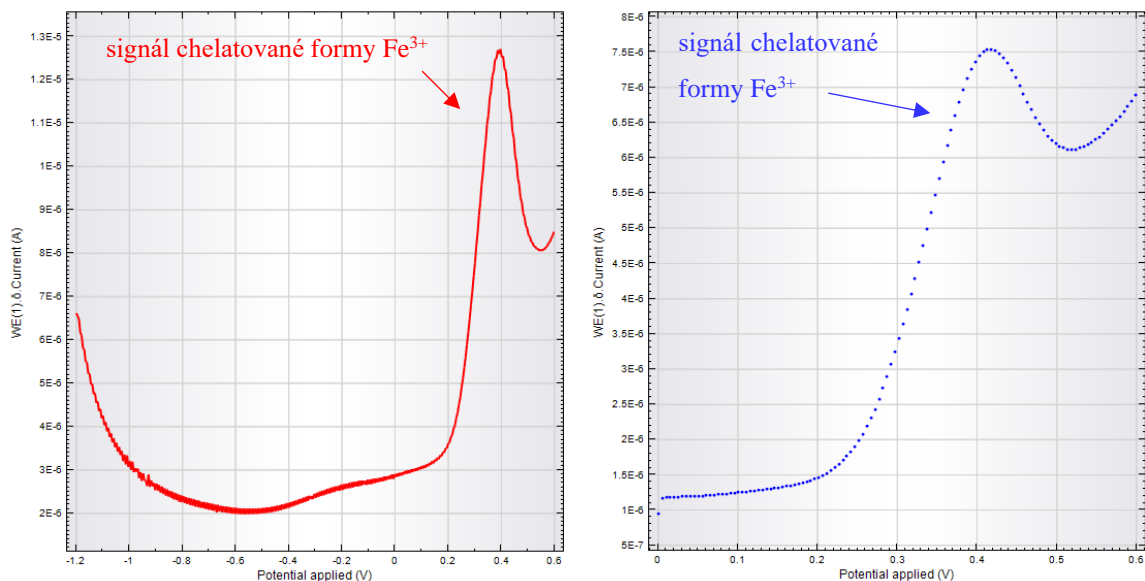


Obrázek I/6: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 4 (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)

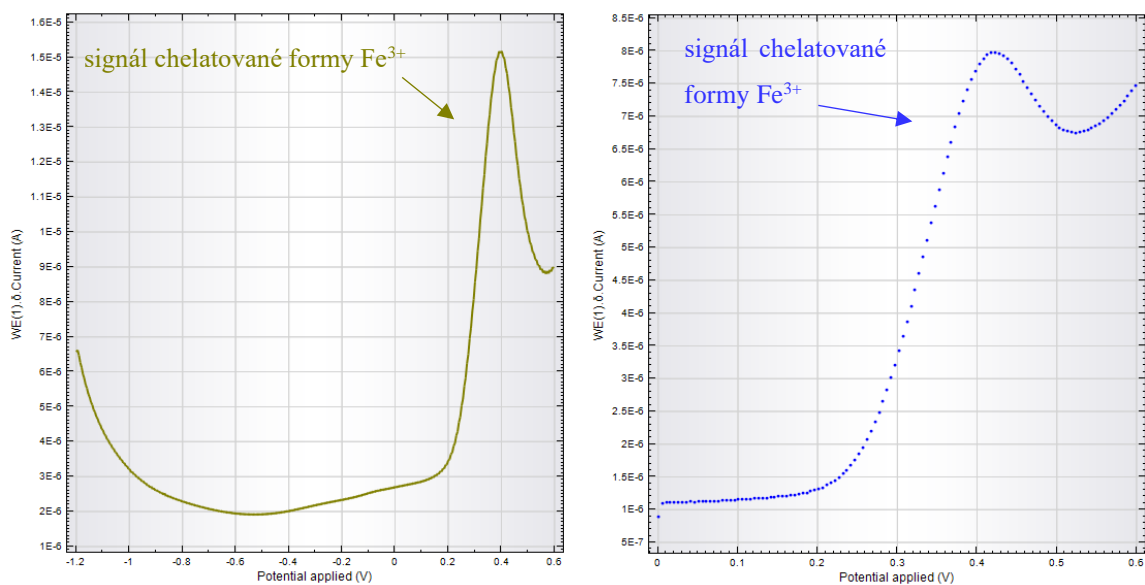


Obrázek I/7: Titrační křivka stanovení titrační kyselosti vzorku jablečného octa 4 (vlevo) a křivka její druhé derivace (vpravo)

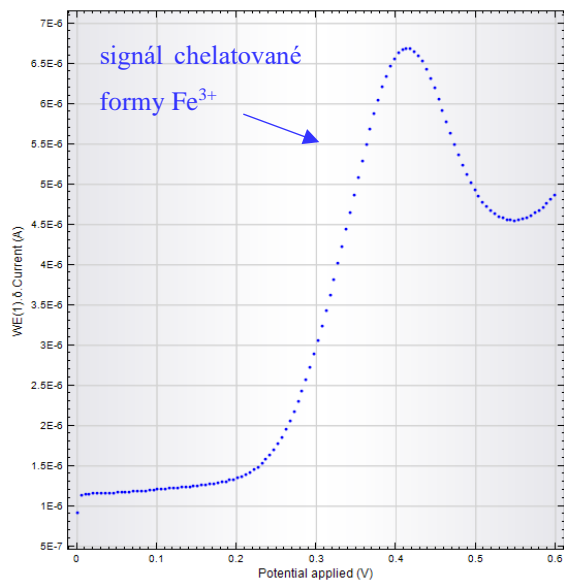
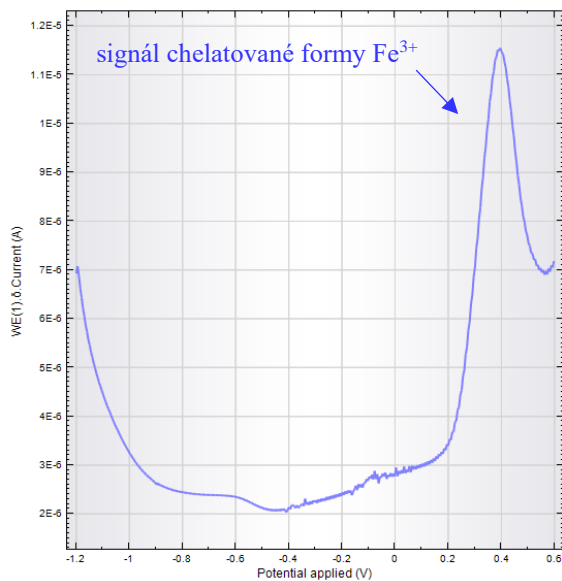
**Příloha II: Voltamogramy SWASV vygenerované programem Nova 1. 11 během stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  iontů ve vzorcích jablečného octa**



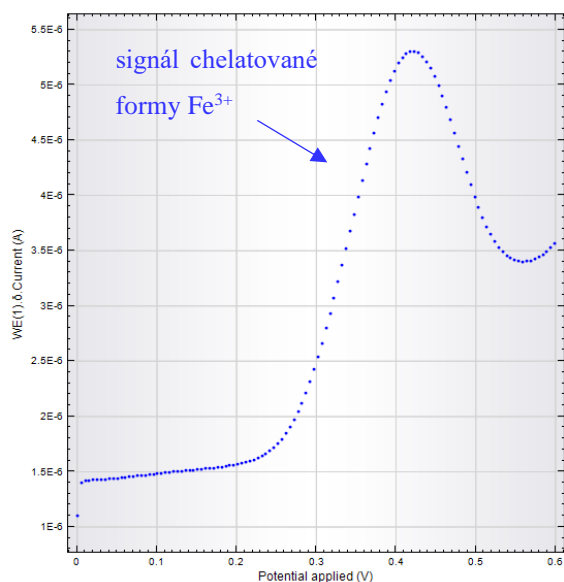
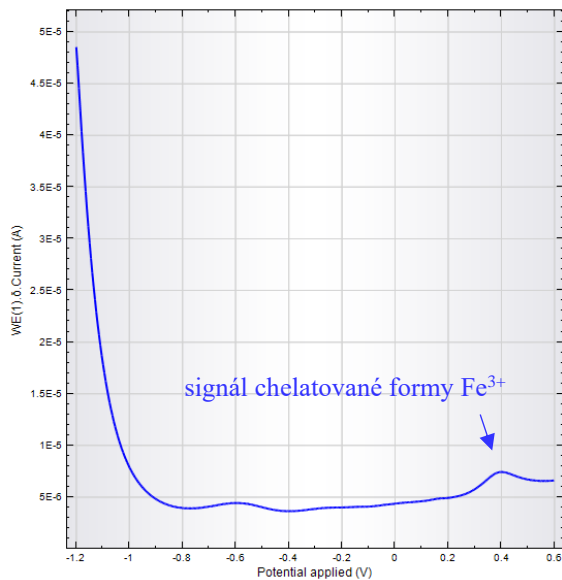
Obrázek II/1: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 1 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)



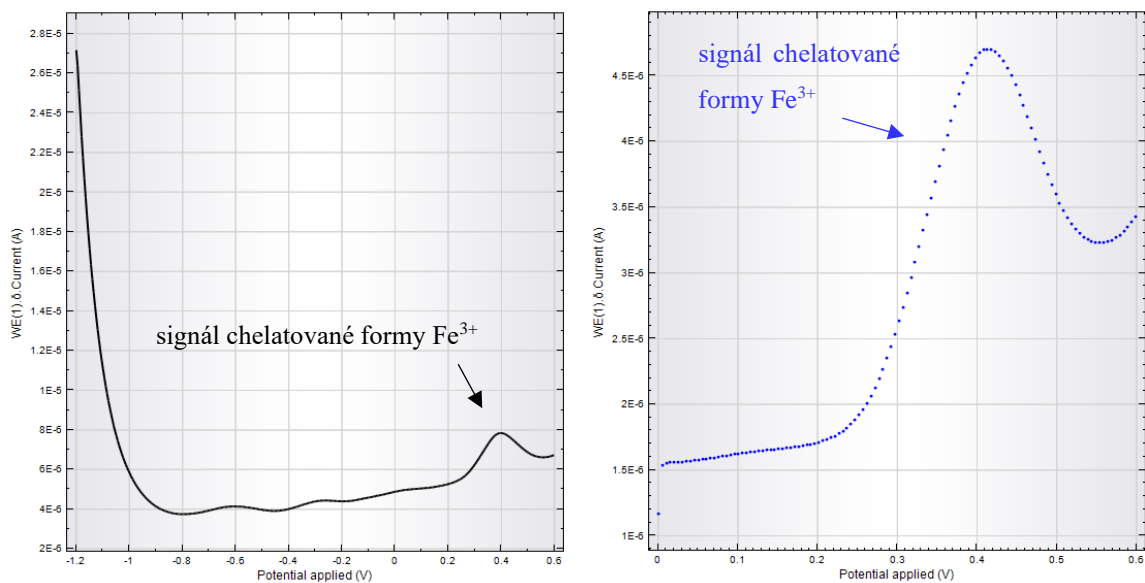
Obrázek II/2: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 2 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)



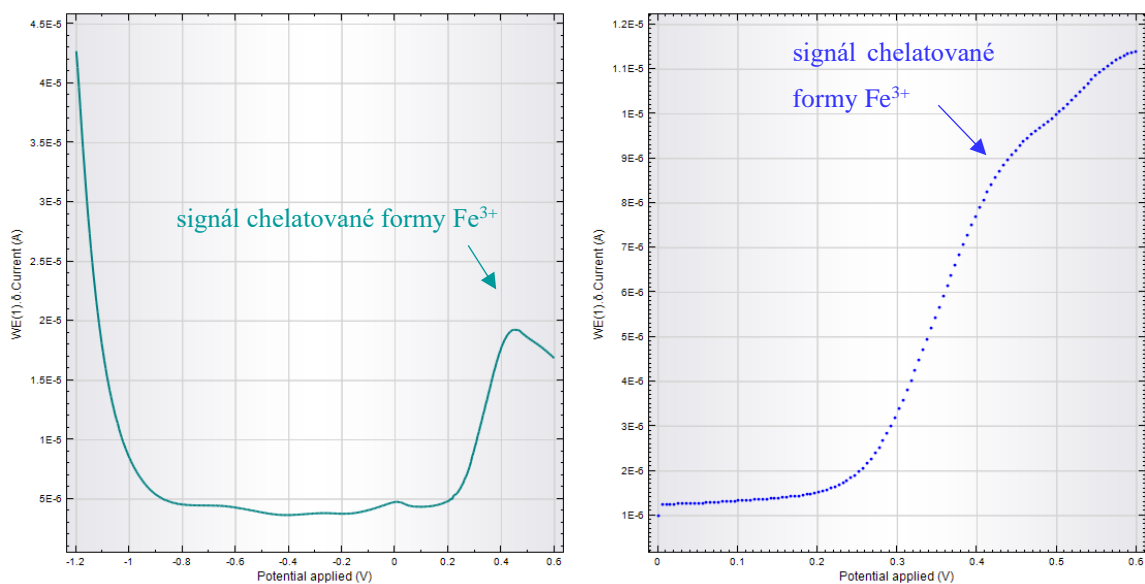
Obrázek II/3: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 3 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)



Obrázek II/4: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 4 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)



Obrázek II/5: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 5 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)



Obrázek II/6: SWASV voltamogram stanovení  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{2+}$  iontů ve vzorku 6 (bez depozice vlevo, s depozicí vpravo)