

Ing. Veronika Friebrová

**VÝVOJ TECHNOLOGIÍ ZPRACOVÁNÍ BIOMASY JAKO  
ZDROJ HODNOTNÝCH BÍLKOVIN A JEJICH  
HYDROLYZÁTŮ**

**THE DEVELOPMENT OF PROCESSING TECHNOLOGIES FOR  
BIOMASS AS A SOURCE OF VALUABLE PROTEINS AND THEIR  
HYDROLYSATES**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Program: P2808 Chemie a technologie materiálů  
Obor: 2808V006 Technologie makromolekulárních látek  
Školitel: prof. Ing. Karel Kolomazník DrSc.

Zlín, březen 2012

*Motto:*

„Jestliže nebudete mít každý den určitý cíl, zůstanete jen u snění.“

Zig Ziglar

*Poděkování:*

Ráda bych touto cestou poděkovala školiteli disertační práce prof. Ing. Karlovi Kolomazníkovi DrSc. za jeho odborné vedení, cenné rady, podporu a čas, který mi věnoval během celého doktorského studia.

Dále chci poděkovat konzultantovi disertační práce doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D za vytvoření dobrých pracovních podmínek, praktické rady a korigování mé práce.

Jmenovitě bych ráda poděkovala všem svým kolegům, kteří se podíleli na některých analýzách, poskytli mi důležité rady a připomínky při zpracování disertační práce, Ing. Jiří Pecha, Ing. Věra Halabalová Ph.D, Mgr. Michaela Bařinová, Ing. Lubomír Šánek, Věra Kymlová, Karel Klein.

Mé díky patří i mé rodině a mým blízkým za jejich pochopení, povzbuzení a především za důvěru.

## **ABSTRAKT**

Disertační práce se zabývá vývojem technologií zpracování vedlejších produktů potravinářského a kožedělného průmyslu, zejména bílkovinné povahy, jejichž hydrolyzáty se uplatňují jak v běžné výživě člověka, tak také v zemědělství jako např. biostimulátory (induktory rezistence). Cíle práce spočívají v optimální kombinaci přímého a nepřímého modelování, tj. využití teorie transportních procesů a chemické reakční kinetiky ve spojení s experimenty. Časové závislosti byly statisticky zpracovány za účelem stanovení parametrů matematicko-fyzikálních modelů. Výsledné vztahy a experimentální data byly aplikovány k verifikaci navržených kvantitativních modelů. Ověřené modely sloužily pro stanovení optimální reakční doby a návrh algoritmu řízení reálných hydrolyzačních reaktorů.

**Klíčová slova:** bílkovinné hydrolyzáty, kolagen, pivovarské kvasnice, chemická reakční kinetika, efektivní difusní koeficient

## **ABSTRACT**

This dissertation deals with the development of processing technologies of by-products generated by the food processing and tanning industries. These by-products - especially those of protein nature, can be converted into hydrolysates that can be applied in human nutrition as well as in agriculture (e.g. in the form of bio-stimulators - resistance inductors). The objective of the dissertation is to optimally combine direct and indirect modeling methods, i.e. to effectively combine the Transport Phenomena Theory and Reaction Kinetics with experiments. The time dependencies were statistically evaluated in order to determine the parameters of the mathematical-physical model. The resulting equations and experimental data were used to verify the proposed quantitative models. The verified models served for the determination of the optimal reaction time and the design of the Real Hydrolysing reactor Control Algorithm.

**Keywords:** protein hydrolysates, collagen, brewer's yeast, chemical reaction kinetics, effective diffusion coefficient

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>13</b>
1.1 Zhodnocení literární rešerše.....	30
<b>2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>32</b>
<b>3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ .....</b>	<b>33</b>
<b>4. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>34</b>
4.1 Kinetika hydrolyzy kvasničné biomasy .....	34
4.2 Stanovení optimální reakční doby .....	35
4.3 Modelové výpočty .....	41
4.4 Stanovení efektivního difusního koeficientu .....	44
4.4.1 Crankova metoda.....	44
4.4.2 Kvazistacionární metoda .....	45
4.5 Difuse biostimulátoru rostlinným tělem .....	46
4.5.1 Matematický model v polních podmínkách .....	46
4.5.2 Matematický model v skleníkových podmínkách.....	49
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – ANALYTICKÉ METODY .....</b>	<b>51</b>
5.1 Stanovení dusíku TKN (Total Kjehdal Nitrogen).....	51
5.2 Stanovení dusíku Biuretovou reakcí .....	51
5.3 Bicinchoninová metoda (BCA metoda).....	52
5.4 Stanovení obsahu popele .....	53
5.5 Gelová permeační chromatografie .....	54
5.6 Iontově výměnná chromatografie .....	56
<b>6. EXPERIMENTÁLNÍ MĚŘENÍ .....</b>	<b>58</b>
6.1 Hydrolyza pivovarské biomasy I.(„předpokusy“) .....	58
6.2 Hydrolyza pivovarské biomasy II. - Analýza aminokyselin.....	72
6.3 Hydrolyza kolagenových střívek .....	92
6.4 Stanovení efektivního difusního koeficientu .....	95
<b>7. APLIKACE NAVRŽENÉHO MATEMATICKÉHO MODELU .....</b>	<b>100</b>
<b>8. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE .....</b>	<b>105</b>
<b>9. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....</b>	<b>107</b>
<b>10. ZÁVĚR.....</b>	<b>108</b>

<b>11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>110</b>
<b>12. SEZNAM PUBLIKACÍ .....</b>	<b>117</b>
<b>13. CURRICULUM VITAE .....</b>	<b>118</b>
<b>14. SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>120</b>

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1.1:	Thiamin – vitamín B <sub>1</sub> .....	18
Obr. 1.2:	Riboflavin – vitamín B <sub>2</sub> .....	19
Obr. 1.3:	Kyselina pantothenová – vitamín B <sub>5</sub> .....	20
Obr. 1.4:	Pyridoxin – vitamín B <sub>6</sub> .....	20
Obr. 1.5:	Biotin – vitamín B <sub>7</sub> .....	21
Obr. 4.1:	Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu v okolí optimální koncentrace.....	39
Obr. 4.2:	Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu v okolí optimální koncentrace.....	40
Obr. 4.3:	Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu pro různé hodnoty rychlostních konstant.....	41
Obr. 4.4:	Závislost optimální koncentrace na hodnotách rychlostních konstant.....	42
Obr. 4.5:	Závislost optimálního času na odpovídajících hodnotách rychlostních konstant.....	43
Obr. 4.6:	Geometrie matematického modelu difuze biostimulátoru.....	48
Obr. 5.1:	Kalibrační křivka obsahu dusíku ve vodném roztoku hydrolyzátu.....	52
Obr. 5.2:	Kalibrační křivka obsahu dusíku ve vodném roztoku hydrolyzátu.....	53
Obr. 5.3:	Gelový permeační chromatograf, výrobce Polymer Laboratories.....	54
Obr. 6.1:	Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO I. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.....	61
Obr. 6.2:	Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO. P.H. III. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.....	62
Obr. 6.3:	Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO U. B. 3. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.....	62
Obr. 6.4:	Signál viskozitního detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-19 minut, s rostoucím časem hydrolyzy	

	dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	64
Obr. 6.5:	Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 2 1:5 4h. .....	64
Obr. 6.6:	Signál viskozitního detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	65
Obr. 6.7:	Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 4 1:10 8.5h. .....	66
Obr. 6.8:	Signály viskozitního a refraktometrického detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-19 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	67
Obr. 6.9:	Signály viskozitního a refraktometrického detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	68
Obr. 6.10:	Signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	69
Obr. 6.11:	Signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.....	70
Obr. 6.12:	Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro kyselinu asparagovou.....	76
Obr. 6.13:	Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro threonin.....	77
Obr. 6.14:	Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro serin.....	78
Obr. 6.15:	Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro kyselinu glutamovou.....	79

Obr. 6.16: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro prolin .....	80
Obr. 6.17: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro glycin.....	81
Obr. 6.18: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro alanin .....	82
Obr. 6.19: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro valin.....	83
Obr. 6.20: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro izoleucin.....	84
Obr. 6.21: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro leucin.....	85
Obr. 6.22: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro tyrozin.....	86
Obr. 6.23: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro fenylalanin.....	87
Obr. 6.24: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro histidin.....	88
Obr. 6.25: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro lysin .....	88
Obr. 6.26: Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro arginin.....	90
Obr. 6.27: Hydrolyzační křivka kolagenního materiálu - závislost koncentrace dusíku na čase.....	93
Obr. 6.28: Závislost přirozeného logaritmu bezrozměrné koncentrace na čase .....	94
Obr. 6.29: Difusní cela.....	95
Obr. 6.30: Závislost koncentrace biostimulátoru na čase přes přepážku kaštanový list.....	97
Obr. 6.31: Závislost koncentrace biostimulátoru na čase přes přepážku filtrační papír.....	97
Obr. 6.32: Závislost koncentrace biostimulátoru na druhé odmocnině času .....	98
Obr. 7.1: Simulace I. Vývoj koncentračního pole biostimulátoru uvnitř listu .....	101



Obr. 7.2:	Simulace II. Vývoj koncentračního pole biostimulátoru uvnitř listu .....	102
Obr. 7.3:	Rozdíl mezi integrální koncentrací biostimulátoru uvnitř listu zahrnující pokožku tak i bez pokožky. ....	103

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Vstupní parametry pro odhad hlavních provozních nákladů .....	39
Tab. 2:	Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 10% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka) .....	59
Tab. 3:	Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 5% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka) .....	59
Tab. 4:	Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 2,5% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka) .....	60
Tab. 5:	Vzorky hydrolyzátů v pevné fázi .....	60
Tab. 6:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a kyselinu mléčnou v poměru 1:5 (doba hydrolýzy 2, 4, 6, 8.5, 12 a 24 hodin) .....	63
Tab. 7:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a kyselinu mléčnou v poměru 1:10 (doba hydrolýzy opět 2, 4, 6, 8.5, 12 a 24 hodin) .....	65
Tab. 8:	vzorky obsahující kvasniční biomasu a 5% kyselinu mléčnou.....	66
Tab. 9:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 2,5% kyselinu mléčnou.....	67
Tab. 10:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 5% kyselinu mléčnou.....	68
Tab. 11:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 10% kyselinu mléčnou.....	69
Tab. 12:	Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 10% kyselinu mléčnou.....	70
Tab. 13:	Hodnoty odhadnutých parametrů $A_0$ (zjištěný obsah aminokyselin v biomase, $h$ (rychlost uvolňování aminokyselin) a $l$ (míra ztráty aminokyselin) získaných nelineární regreseí.....	73
Tab. 14:	Korelační faktory pro obsah aminokyselin (podíl hodnoty $A_0$ z nelineární regrese a výtěžku chemické analýzy za 24h.) .....	74
Tab. 15:	Obsah uvolněných aminokyselin vypočtený z regresního modelu pro 21., 48. a 144. hodinu hydrolýzy pomocí HCl a srovnání s hodnotami skutečně naměřenými* .....	75
Tab. 16:	Obsah kyseliny asparagové v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy.....	76

Tab. 17:	Obsah threoninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy.....	77
Tab. 18:	Obsah serinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	78
Tab. 19:	Obsah kyseliny glutamové v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	79
Tab. 20:	Obsah prolinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	80
Tab. 21:	Obsah glycinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	81
Tab. 22:	Obsah alaninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	82
Tab. 23:	Obsah valinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	83
Tab. 24:	Obsah isoleucinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy.....	84
Tab. 25:	Obsah leucinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	85
Tab. 26:	Obsah tyrozinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy.....	86
Tab. 27:	Obsah fenylalaninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	87
Tab. 28:	Obsah histidinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	88
Tab. 29:	Obsah lysinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy .....	89
Tab. 30:	Obsah argininu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy.....	90
Tab. 31:	Časový průběh hydrolýzy kolagenního materiálu při teplotě 65°C .....	93
Tab. 32:	Odhadnuté difusní koeficienty.....	96
Tab. 33:	Vstupní parametry pro simulaci příjmu biostimulátoru do těla rostliny .....	100
Tab. 34:	Integrální koncentrace biostimulátoru pod pokožkou pro všechny čtyři simulace.....	10104

## POUŽITÉ SYMBOLY A ZKRATKY

AMK	aminokyseliny
b	tloušťka listu, m
c	koncentrace biostimulátoru uvnitř listu, $\text{kg}\cdot\text{m}^3$
$c_0$	koncentrace biostimulátoru na povrchu roztoku, $\text{kg}\cdot\text{m}^3$
$c_p$	počáteční koncentrace biostimulátoru ve vodě, $\text{kg}\cdot\text{m}^3$
$c_{0p}$	počáteční koncentrace biostimulátoru na povrchu roztoku, $\text{kg}\cdot\text{m}^3$
$c_n$	koncentrace nasycené vodní páry, $\text{kg}\cdot\text{m}^3$
D	efektivní difuzní koeficient, $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$
dF <sub>0</sub>	bezrozměrný čas diskretizace, 1
dX	bezrozměrná plocha diskretizace, 1
$\delta$	tloušťka pokožky listu, m
Ev	bezrozměrný parametr vypařování, 1
$\varepsilon$	poróznost listu, 1
F <sub>0</sub>	bezrozměrný čas, 1
HCl	kyselina chlorovodíková
$\varphi$	relativní vlhkost, 1
k	hmotnostní součinitel prostupu vody, $\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$
Na	námokové číslo, 1
$p_s$	tlak nasycené vodní páry, Pa
$\rho$	hustota vody,
S	plocha listu, $\text{m}^2$
$\tau$	čas, s
T	teplota, K
U	rychlost větru, $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
x	proměnná plocha, m
X	bezrozměrná proměnná plocha, 1

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jako podklad pro přehled současného stavu jsem vypracovala literární studii pojednávající o možnostech využití vedlejších produktů potravinářského průmyslu, které pak mohou sloužit jako velmi cenná surovina pro výrobu dalších tovarů využitelných jako potravinářské doplňky, dále v kosmetickém průmyslu nebo ve farmacii jako podpůrná léčiva.

Mikrobiální biomasa, případně jiné produkty potravinářského (masného), kožedělného nebo zemědělského průmyslu představují hodnotný zdroj bílkovin [1].

Proteiny jsou nezbytnou složkou potravy, protože jako hlavní zdroj dusíku v potravě, kterého v průměru obsahují 16% hmotnosti, přinášejí do organismu hmotu nutnou k výstavbě a obnově tkání, jsou však i zdrojem energie. Po chemické stránce jsou proteiny polymery aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Nejjednodušší informaci o proteinech podává aminokyselinové složení. Určí se tak, že se proteiny hydrolyzují.

V současné době se věnuje mnoho úsilí využití netradičních zdrojů proteinů např. sojový extrakční šrot, odpadní syrovátka, rybí moučka. Finálním výrobkem jsou pak různé směsi bohaté na bílkoviny, často ještě obohacované minerálními látkami a vitamíny, které se zejména uplatňují v lidské výživě [2].

Historický vývoj bílkovinných hydrolyzátů je zaznamenán již od počátku 19. století, kdy francouzský chemik Proust [3] jako první rozštěpil bílkovinnou molekulu. Jeho práce uveřejněná v roce 1819 je zajímavá tím, že jsou v ní popsány smyslové vlastnosti reakčních zplodin. Postupně byly objevovány aminokyseliny a dále se rozšiřovaly poznatky o bílkovinách a jejich štěpných zplodinách. Základním poznatkem v chemii bílkovin je zjištění peptidické vazby v bílkovinách Danilewskim [4] v roce 1886. V oblasti potravinářských bílkovinných hydrolyzátů má beze sporu objevitelské postavení švýcarský mlynář Julius Maggi. Z počátku byla jeho snaha vyrábět rychle připravená jídla, ale později obrátil svou pozornost na bílkovinné hydrolyzáty, ve kterých zjistil zajímavé ochucovací vlastnosti a které jako „polévkové koření“ nebyly až do roku 1890 vůbec známým pojmem. Podstatným pokrokem ve znalostech o bílkovinných hydrolyzátech je práce japonského chemika R. Ikedy [5], který jako nejúčinnější složku čínských a japonských ochucovacích prostředků označil kyselý glutaman amonný a tím se pozornost obrátila ke kyselině glutamové, která svými výraznými chuťovými vlastnostmi daleko předčí ostatní aminokyseliny.

Hydrolytický proces je přirozeným mechanismem trávení v živém organismu. Organismus není schopen využít proteiny v jejich původní formě a musí je

procesem trávení rozložit na základní jednotky aminokyseliny. Vlastní trávení je enzymová hydrolýza (proteolýza) katalyzovaná proteolytickými enzymy (proteasami). Proteasy katalyzují buď hydrolýzu peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce za vzniků peptidů různé velikosti, nebo odštěpují jen koncové aminokyseliny. Hydrolýza proteinů probíhá v několika stupních. Nejprve vznikají polypeptidy, z nich oligopeptidy a konečnými produkty jsou aminokyseliny. Každý stupeň hydrolýzy katalyzuje jiný enzym. Vznikající aminokyseliny jsou následně v tenkém střevě vstřebávány a transportovány lymfatickým oběhem do tkání nebo krevním oběhem do jater, kde jsou dále metabolizovány[1].

Cílem hydrolýzy bílkovin je zjistit a přesně identifikovat všechny aminokyseliny zastoupené v hydrolyzátu bílkoviny a dále výroba bílkovinných hydrolyzáků určitého složení a určitých vlastností.

Pro hydrolýzu bílkovin v zásadě používáme tři druhy štěpení. Především je to štěpení silnými kyselinami, které bylo pravděpodobně poprvé použito Braconnotem v roce 1820, když vařil želatinu s kyselinou sírovou a získal „želatinový cukr“ [6]. Pro kyselou hydrolýzu již byla vyzkoušena celá řada kyselin např.: kyselina chlorovodíková (HCl), metansulfonová kyselina, p-toluensulfonová kyselina, a sulfonová kyselina. Nejběžnějším postupem pro uvolnění jednotlivých aminokyselin je hydrolýza pomocí kyseliny chlorovodíkové ( $c = 6 \text{ mol/l}$ ), která se používá již několik desetiletí. Vzorek je vystaven teplotě  $110 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 20-24 hodin bez přítomnosti vzduchu. Při kyselé hydrolýze probíhají procesy uvolňování a destrukce některých aminokyselin současně. Sírné aminokyseliny (cystein, metionin) jsou kyselou hydrolýzou částečně nebo kompletně destruovány. Tryptofan je destruován kompletně. Asparagin a glutamin jsou kyselou hydrolýzou HCl konvertovány na kyselinu asparagovou a glutamovou. Hlavní přednost hydrolýzy pomocí HCl je, že ji můžeme použít v obou fázích – plynné i kapalně. Další výhodou je poměrně velká reakční rychlost a vysoký stupeň dosaženého štěpení [7].

Novější články se ve velké míře zabývají hydrolýzou kyselinou sulfonovou. Simson *et.al* [8] použily kyselinu metansulfonovou (MSA) a prováděli hydrolýzu v přítomnosti nízkých koncentrací tryptaminu ((3 - (2-aminoethyl)indol). Hlavní výhodou kyseliny metansulfonové s porovnáním kyseliny chlorovodíkové je stanovení tryptofanu a sulfoxidu methioninu. Sulfoxid metioninu je nejběžnější a snadno vyrobený produkt oxidací metioninu, který nelze určit po hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou.

Chiou a Wang [9] použili hydrolýzu s 4 M kyselinou methansulfonovou při teplotě  $160^\circ\text{C}$  po dobu 45 min. Kyslík byl odstraněn z hydrolyzační směsi proplachováním dusíkem místo odpařování. Množství získaných aminokyselin

pomocí hydrolýzy s kyselinou methansulfonovou bylo podobné obsahu aminokyselin získaných při hydrolýze kyselinou chlorovodíkovou při teplotě 110°C po dobu 24hodin.

Dalším způsobem štěpení bílkovinné molekuly je štěpení alkalické, při kterém dochází k racemizaci aminokyselin. Je právě tak rychlé jako štěpení kyselinami. Některé aminokyseliny jsou v alkalickém prostředí stálejší (tryptofan), jiné podléhají ještě rychleji destrukci (cystin), některé se přímo rozkládají (arginin). Pro alkalickou hydrolýzu se využívá nejčastěji hydroxid sodný (NaOH), hydroxid draselný (KOH), hydroxid lithný (LiOH) nebo hydroxid barnatý (Ba(OH)<sub>2</sub>). V případě 5 N-hydroxidu sodného se hydrolýza provádí v baňce se zpětným chladičem nebo v autoklávu pod tlakem. Reakční doba činí 6-34hodin za silného odštěpování amoniaku. Lepších výsledků lze dosáhnout pomocí 14%-ního hydroxidu barnatého, kdy dochází k menší destrukci AMK, hlavně tryptofanu. Hydrolýza s hydroxidem barnatým je hlubší a rychlejší [10].

Enzymatická hydrolýza má velkou výhodu v tom, že nenastává racemizace AMK. Enzymatická hydrolýza představuje mnohem mírnější podmínky než kyselá i alkalická hydrolýza, obvykle při teplotě 40-60°C a pH 6-8 [11]. Rozkladný proces závisí na činnosti trávícího enzymu, nevyžaduje vysoké náklady a proces je snadno ovladatelný. Důležitým faktorem je výběr enzymu, protože enzymy mají různou specifčnost a poskytují produkty s různými chemickými a funkčními vlastnostmi. Nejčastěji používaným enzymem v mnoha studiích je enzym *Alcalase*, produkovaný z *Bacillus Licheniformis*. Celkové aminokyselinové složení enzymových hydrolyzátů je podobné jako u výchozího materiálu. Kromě toho, hydrolyzáty vykazují určité technologické výhody jako je zlepšená rozpustnost, relativně vysoká odolnost vůči vysrážení či tepelná stabilita [12].

Průběh hydrolýzy, zejména její kinetika, výsledné vlastnosti a složení produktu se odvíjí od primární a sekundární struktury výchozí bílkoviny. Pod pojmem primární struktura bílkovin rozumíme údaje o kovalentní struktuře molekuly tj. počet a pořadí aminokyselin v peptidovém řetězci, charakter základních peptidových vazeb, počet, charakter a poloha vedlejších kovalentních vazeb. Sekundární strukturou rozumíme geometrické uspořádání polypeptidického řetězce. Může mít formu skládaného listu nebo pravotočivé šroubovice ( $\alpha$ -helix). Třetí úroveň struktury proteinů je terciální struktura, která určuje celkovou konformaci polypeptidového řetězce. Na spojení jednotlivých úseků a celkovou fixaci terciální struktury se podílejí různé typy kovalentních vazeb, např. disulfidové můstky a nevazebné interakce, funkční skupiny AMK.

Řada proteinových molekul není tvořena jedním, ale několika polypeptidovými řetězci, které vytvářejí definovanou komplexní molekulu. Uspořádání řetězců v této makromolekule označujeme jako kvartérní strukturu proteinů. Takovou strukturu mají některé enzymy, hemoglobin a další bílkoviny [1,2].

Hlavním úkolem hydrolýzy je ztekucení vstupní suroviny. Z tohoto důvodu je značná pozornost věnována také vlastnostem těchto roztoků. V roztocích proteiny disociují podobně jako aminokyseliny nebo peptidy za vzniku makromolekulárních polyiontů, jsou tedy polyamfolyty. Rozpustnost proteinů závisí na povaze rozpouštědla, hodnotě pH roztoku, koncentraci elektrolytu a na terciální struktuře proteinu. Protože makromolekuly proteinů obsahují řadu volných karboxylových i aminových skupin, nesou ve vodných roztocích kladně i záporně nabitě ionty. Oblast pH, kde je počet kladných i záporných iontů stejný se nazývá tzv. isoelektrický bod a v tomto bodě má protein minimální rozpustnost a jeho roztok má minimální viskozitu a bobtnavost [1,2].

K nejdůležitějším změnám fyzikálních vlastností proteinů patří změny jejich konformace. Soubor konformačních změn se pak nazývá denaturace proteinů. Denurací se struktura proteinu mění v méně uspořádanou. Důsledkem těchto změn je ztráta biologické aktivity a původní funkce proteinu. Vyvolávají ji fyzikální faktory (změny teploty, tlaku, působením ultrazvuku aj.) nebo nastává chemickými činidly např. v přítomnosti solí, kyselin, zásad, resp. změnami pH roztoků nebo v přítomnosti povrchově aktivních látek. Tento případ je prakticky využit při výrobě želatiny a klišu z vedlejších produktů koželužského průmyslu [13]. Z nutričního hlediska je denaturace zpravidla žádoucí, protože denaturované proteiny bývají přístupnější digestivním enzymům trávicího traktu. Denurací se proto zvýší využitelnost proteinů [2].

Předmětem řady prací se stalo sledování rychlosti přechodu dusíku bílkoviny do roztoku a sledování růstu dusíku primárních aminoskupin v roztoku. Přechod dusíku do roztoku lze sledovat jen za velmi mírných podmínek. Mareček [14] sledoval štěpení kaseinu a keratinu při 70 a 90°C za různých podmínek koncentrace a přebytku HCl a zjistil, že přechod veškerého dusíku do roztoku je reakcí II. řádu. S tímto zjištěním souhlasili i Nasset a Greenberg [15]. Naproti tomu, Dunn [16] hydrolyzoval kasein kyselinami a usoudil, že se jedná o reakci I. řádu.

Při hydrolýze bílkovin (i zcela čistých) se tvoří látky, které se vylučují postupně jako tmavé sloučeniny a které Mulder [17] nazval huminy nebo ulminy. Z hydrolyzátů jednotlivých bílkovin se dají izolovat v množství od 1,1 – 10%. Někdy obsahují síru, ale i jiné prvky. Podle Samuelyho [18] je k jejich tvorbě nutný kyslík. Maillard [19] zjistil, že humusové látky se tvoří reakcí mezi AMK a cukry (Maillardova reakce-hnědnutí). V celku lze



konstatovat, že za obvyklých podmínek hydrolýzy, vznikají huminy ze všech AMK. Platí pravidlo, čím méně je kyseliny v roztoku a více nebiřkoviných látek v surovině, tím více vzniká huminů (při 20% koncentraci HCl a při teplotách 105 – 125 °C). U sušených kvasnic s 8,1% N je výtěžnost 15-33g huminových zbytků se 4 - 6,5% dusíku.

Podle reakčních podmínek se mění množství, složení i struktura huminových zbytků. Struktura zbytků je mazlavá až suchá, zrnitá, barva hnědá až černá a také bývá rozdílná rozpustnost v mírně kyselých roztocích nebo ve vodě. Mareček podává celkem podrobný přehled hydrolýz u různých surovin. Pro příklad uvádím průběh hydrolýz u sušených kvasnic, které jsou pak náplní experimentální části dizertační práce. Při hydrolýze sušených kvasnic s 8,1 g N a reakčních podmínkách - 110 °C, 20% přebytek, 20% koncentrace HCl, 4 hod je množství zbytků 27 g, struktura suchá a obsah N v huminech 1,4 g. V případě hydrolýzy sušených kvasnic za reakčních podmínek 110 °C, 50% přebytek, 20% koncentrace HCl, 12 hod je množství zbytků 15 g, struktura suchá a obsah N v huminech 0,5g [6].

Mareček [6] provedl několik technických hydrolýz, kde se mimo jiné soustředil na vliv teploty a koncentraci HCl. U sušených kvasnic bylo dosaženo následujících výsledků:

- *vliv teploty*: sušené kvasnice 8,1% N, 20% přebytek a 20% koncentrace HCl, 95 °C, 100 g suroviny, hydrolyzát byl zředěný do 300 ml.

Štěpení kvasnic je za mírných podmínek rychlejší než štěpení lepku. Hodnoty zbytků jsou dosti vysoké a celkem mnoho se nemění. Hodnoty veškerého dusíku jsou více méně stejné. Naproti tomu hodnoty dusíku primárních aminoskupin jsou za tvrdších podmínek podstatně vyšší. S tvrdšími podmínkami a s delší reakční dobou se stává barva hydrolyzátu světlejší a chuť výraznější. Nejlepší výsledky byly získány při tlakových hydrolýzách a to s kratší reakční dobou.

- *vliv koncentrace*: sušené kvasnice - 20% přebytek kyseliny a 15%, 20% a 25% koncentrace nasadové kyseliny.

Sušené kvasnice neukazovaly podstatné rozdíly v rychlosti a v hloubce štěpení s rostoucí koncentrací. Obsah veškerého N v roztoku nebyl koncentrací ovlivněn. U smyslových vlastností došlo ke značným rozdílům. Při 15% koncentraci byla chuť zneutralizovaného hydrolyzátu prázdná, bezvýrazná, kvasnicová, při 20% koncentraci byla plná, výrazná, bez plného kvasnicového charakteru a při 25% koncentraci se stala chuť svíravou, příliš výraznou. Barva hydrolyzátů se zvýšenou koncentrací světlala.

Jak již bylo uvedeno v literární rešerši, část dizertační práce se bude týkat hydrolýzy kvasničné biomasy, konkrétně pivovarských kvasnic. Jedná se o

biomasy mikroorganismů kvasinek - *Saccharomyces cerevisiae* var. *Carsbergensis*, které jsou využívány ke zkvašování sladového extraktu při výrobě piva. Kvasnice se získávají během kvašení, když se cukr mění na alkohol. Ty se pak v nádržích velmi rychle množí a postupně klesají ke dnu. Dochází k takzvanému „odstřelu“, a v tomhle okamžiku se usazené kvasnice odpouštějí [20].

Kvasničná biomasa je významným přírodním zdrojem celého spektra biologicky aktivních látek. Vedle velkého množství bílkovin obsahují pivovarské kvasnice také nezanedbatelné množství vitamínů skupiny B. MUDr. Stuchlík ve studii [21] uvedl mimo jiné i vitamíny B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>5</sub> (kyselina pantotenová) a B<sub>7</sub> (biotin).

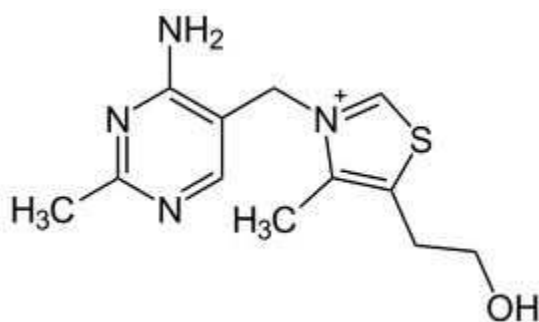
- **Vitamín B<sub>1</sub>** – thiamin

Jeho chemická struktura je charakterizována pyrimidinovým a imidazolovým okruhem. Thiamin pyrofosfát je zásadním koenzymem pro několik velmi významných enzymů.

Hraje podstatnou roli při odbourávání cukrů, podílí se rovněž na konečném odbourávání metabolických produktů tuků a bílkovin.

Akutní nedostatek v potravě vede k chorobě nazývané beri-beri, která se ještě dodnes vyskytuje v jihovýchodní Asii. Toto onemocnění vede k poruchám nervového, kardiovaskulárního systému a atrofii svalů.

Nalezneme ho například v masě (masné výrobky a maso vepřové), vnitřnostech (játra, srdce, ledviny), pivovarských kvasnicích či tmavé mouce [22].



**Obr. 1.1:** Thiamin – vitamín B<sub>1</sub>

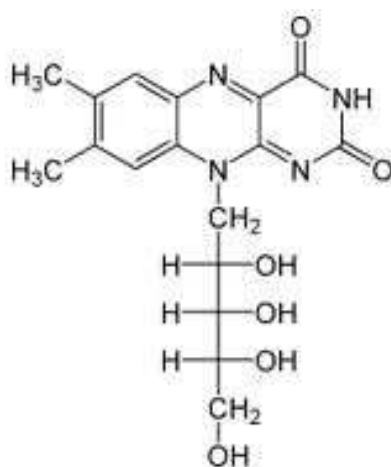
- **Vitamín B<sub>2</sub>** – riboflavin

Jeho struktura je postavena na isoalloxazinovém jádru s navázaným cukerným alkoholem ribitolem. Riboflavin se vyskytuje v biochemických systémech ve formě koenzymů oxidoredukčních enzymů. Nejběžnějšími jsou flavinmononukleotid (FMN) a flavinadeninukleotid (FAD). Jednou z nejvýznamnějších chemických vlastností je možnost účastnit se oxidačně redukčních vlastností.

Procesu vidění se riboflavin účastní tím, že převádí krátkovlnné modré paprsky na žlutozelené a tím umožňuje vidění za šera.

Avitaminóza se projevuje zánětlivými změnami sliznic a kůže, eventuálně i nervovými poruchami.

K nejbohatším zdrojům riboflavinu patří játra, vejce, sýr a maso [2].



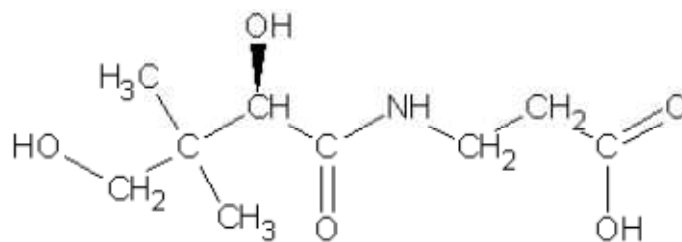
**Obr. 1.2:** Riboflavin – vitamín B<sub>2</sub>

- **Vitamín B<sub>5</sub>** – kyselina pantothenová

Chemicky vytvořena spojením kyseliny pantotenové a aminokyseliny beta-alaninu. Podílí se na tvorbě koenzymu A s ATP a cysteinem. Kyselina pantotenová zasahuje prostřednictvím koenzymu A do významných metabolických cyklů, jako je  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a citrátový cyklus.

Nedostatek kyseliny pantothenové se projevuje degenerativními změnami na sliznicích, především dýchacího a trávicího systému.

Dobrymi zdroji kyseliny pantotenové jsou kromě kvasnic (až 200  $\mu\text{g/g}$ ) především vnitřnosti, jako játra, ledviny apod., z ostatních potravin pak vejce. Poměrně chudým zdrojem pantotenové kyseliny je mléko (3 $\mu\text{g/g}$ ) [2].



*Obr. 1.3: Kyselina pantothenová – vitamín B<sub>5</sub>*

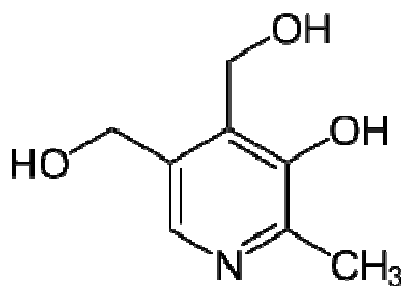
- **Vitamín B<sub>6</sub>** – pyridoxin

Tímto pojmem se označují všechny tři fyziologicky účinné vitamíny B<sub>6</sub>, tzv. pyridoxinová triáda, tvořená pyridoxolem, pyridoxalem a pyridoxaminem.

V biochemických systémech vystupuje pyridoxin ve formě fosfátových derivátů pyridoxalfosfátu a pyridoxaminfosfátu. Pyridoxalfosfát se jako kofaktor dekarboxylas zúčastňuje reakcí v metabolismu aminokyselin. Z reakcí se jedná hlavně o transaminaci, při níž je pyridoxalfosfát koenzymem aminotransferas, o dekarboxylaci aminokyselin a jejich racemizace.

Stuchlík [21] uvedl, že pyridoxin se užívá při anémiích, křečových stavech, po těžkých operacích, při ledvinových kamenech, při diabetické a alkoholové neuropatii. Hypovitaminóza se projevuje zvýšenou nervosvalovou dráždivostí, zapomnětlivostí, nespavostí, předrážděností, křečemi dolních končetin, strnulostí a mravenčením rukou a nohou. Ovšem nedostatek vitamínu B<sub>6</sub> je vzácný.

Vitamín B<sub>6</sub> je široce rozšířen v rostlinných i živočišných potravinách. Ve vyšších koncentracích se vyskytuje v droždí, ve zvířecích vnitřnostech, ve vepřovém, drůbežím a rybím mase. Z rostlinných potravin je nejhojněji obsažen v pšeničných klíčcích, cereáliích, celozrnných produktech a v sójových bobech. Rovněž brambory, zelí, kukuřice, mrkev, banány, zelené fazole a hrách jsou dobrými zdroji tohoto vitamínu.



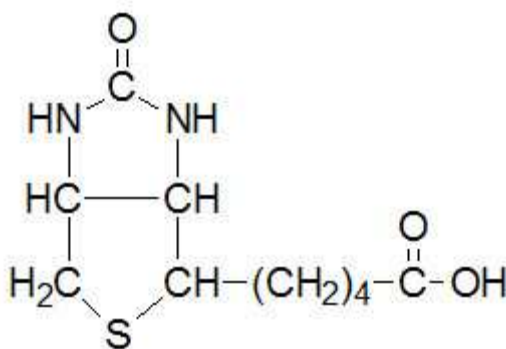
*Obr. 1.4: Pyridoxin – vitamín B<sub>6</sub>*

- **Vitamín B<sub>7</sub>** – biotin

Obsahuje v molekule imidazolový a tetrahydrothiofenový kruh. Biotin je součástí některých ligas, které katalyzují inkorporaci nebo přenos oxidu uhličitého. Je také koenzymem karboxylas acetylkoenzymu A a uplatňuje se při biosyntéze mastných kyselin.

Nedostatek biotinu se projevuje padáním vlasů, zarudnutím obličeje dále se mohou objevit deprese, halucinace a necitlivost v končetinách.

Zdroje biotinu v potravě jsou různorodé: nejbohatším zdrojem jsou jedlé kaštiny, dále játra, žloutek a sója. Biotin je přítomen dále v ovesných vločkách, ořechách, rýži, mléce, kvasnicích, ječmenu, luštěninách, kvěťáku, houbách, ananasu, malinách, rajčatech [22].



*Obr. 1.5: Biotin – vitamín B<sub>7</sub>*

Pivovarské kvasnice lze zpracovávat různými postupy. Lze je podávat ve formě vitálních nativních kvasnic, lisovat, zahušťovat, použít pro výrobu sušených kvasnic nebo pro výrobu hydrolyzátů, kyseliny glutamové a kvasničného extraktu.

Nativní pivovarské kvasnice jsou dodávány o sušině 8 – 10%, které jsou vhodné pro použití v zemědělské živočišné výrobě.

Kvasničná sušina se pohybuje v rozmezí 92 – 94%. Biologická hodnota sušených pivovarských kvasnic je vyjádřena zvláště obsahem životně důležitých aminokyselin, které živý organismus sám neumí syntetizovat jako je např. lysin, methionin, cystein, leucin, valin a izoleucin. Tato vysoká biologická hodnota je také dána nejen velmi příznivým obsahem vitamínů skupiny B, ale i obsahem minerálních látek a stopových prvků - zejména fosforu, draslíku, železa, mědi,

zinku. Právě vitamíny skupiny B ( B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> a B<sub>6</sub>) významně ovlivňují veškeré funkce živého organismu, podílí se na látkové výměně proteinů, tuků a uhlohydrátů, jsou vhodné pro rekonvalescenci, při nadměrné zátěži nebo jako antistresový doplněk [23].

V našich podmínkách jsou k dispozici především výrobky typu PANGAMIN, PARGAVIT. V současné době se distribuje ve formě tablet a to buď klasických, nebo obalených chuťově neutrální vrstvou, která zakryje pro někoho nepříjemnou kvasničnou chuť. Některé z těchto výrobků se dodávají v obohacené formě se zelenými řasami jako ALGIMIN nebo s kulturami mléčného kvašení jako BIFIPANGAMIN.

Pivovarským kvasnicím je přisuzováno mnoho blahodárných účinků. Podle některých studií mohou mít kladný vliv na zlepšení zdravotního stavu pacientů trpících infekční žloutenkou a cirhózou jater. Mají vliv na růst a vývoj testovaných živočichů a chrání je proti infekcím. Působí preventivně proti zácpě a během těžké fyzické práce potlačují únavu, depresi, nedostatečnou výkonnost, nechutenství a podrážděnost. Protože nedostatek vitaminů B-komplexu zhoršuje metabolický proces v trávicím traktu a v nervovém systému, pivovarské kvasnice jsou důležité pro zachování chuti k jídlu, zlepšení trávení, vstřebávání a vylučování potravy a jako prevence nespavosti, depresí, nervozity a pocitů únavy. Díky svému obsahu železa a mědi, pivovarské kvasnice působí proti chudokrevnosti a jejím příznakům. Dle některých názorů je vhodné přidávat kvasnice i do kojenecké stravy a do výživy lidí, kteří přijímají převážně mléčnou stravu, protože ta je chudá na železo [24].

Z mikrobiální biomasy lze vyrábět také velké množství cenných produktů jako je např. ribonukleová kyselina (RNA), bílkoviny, lipidy, fosfolipidy, polysacharidy, vitaminy, enzymy aj. Při tom je však třeba většinou šetrně narušit buněčnou stěnu mikroorganismů. Pro potravinářský průmysl se vyrábí např. z pekařského droždí autolyzát, extrakt nebo hydrolyzát obsahující lyzovanou, či jinak narušenou buňku. Stravitelnost tohoto materiálu je větší; používá se např. jako přírůstek do polévkového koření [20].

Slibná je také výroba potravinářského kvasničného extraktu z pivovarských kvasnic, především k získání aromatických potravin. Aromatické stimulatory, sodná sůl kyseliny glutamové (MSG) a nukleotidy jako např. 5'-guanosin monofosfát (5'-GMP) a 5'-inosin monofosfát (5'-IMP) jsou dobře známé v potravinářství. Kvasničný extrakt ze sušených pivovarských kvasnic může být použit k enzymové úpravě celé řady potravin (vytváření příchutí, ochucovadla apod.). Další použití je u masných výrobků, omáček, polévek, také chipsy a sušenky [25].

Další zajímavou oblastí je využití kvasničné biomasy u prebiotik, které blahodárně ovlivňují hostitele tím, že selektivně ovlivňují růst nebo aktivují metabolismus zdraví podporujících bakterií v zažívacím traktu (v současné době nový pojem v akvakultuře).  $\beta$ -glukan získaný z pivovarských kvasnic může být použit v potravinářských výrobcích jako zahušťovadlo, pojivo nebo emulgační stabilizátor. Účinky homogenizace na chemické složení, reologické a funkční vlastnosti  $\beta$ -glukanů byly zkoumány. Po autolýze kvasnic, byly buněčné stěny homogenizovány a pak extrahovány nejprve hydroxidy, poté kyselinami a sušeny na sprejové sušárně. Homogenizované buněčné stěny vykazovaly vyšší obsah  $\beta$ -glukanu [26].

Limitujícím faktorem ve využití kvasničné biomasy jako zdroj bílkovin pro lidskou spotřebu, je jeho vysoký obsah nukleových kyselin, především ribonukleová kyselina (RNA), která může odpovídat třetině z celkového počtu buněčných proteinů. Některá činidla a metody jsou používány pro izolaci kvasinek bílkovin s nízkou RNA.

Pivovarské kvasnice (biologicky aktivní extrakt) jsou také významným zdrojem trojmocného chromu, který byl značně studován pro jeho léčivé vlastnosti. Bylo zjištěno, že zesiluje činnost inzulínu. Nedávné studie prokázaly, že chrom nemá zásadní vliv na metabolismus glukózy a lipidů u zdravých lidí (bez diabetu). Avšak po suplementaci chromu do potravin, výrazně zlepšily glykémii u lidí nemocných diabetem [27].

Další aplikace je v bioremediaci (působením organismů nebo enzymů dochází k přeměně toxických látek na netoxické). Kvasinky se používají k izolaci těžkých kovů z průmyslových odpadních vod. Imobilizované buňky kvasinek se používají jako biosenzory pro sledování hladiny některých znečišťujících látek ve vodě.

Kvasnicové přípravky byly používány také k léčbě bakteriálních infekcí a hojení ran. V poslední době jsou kvasinky podávány jako probiotika ke zničení škodlivých střevních bakterií. Používání geneticky upravených kvasinek v moderních biotechnologiích pro produkci nových léčiv je na vzestupu. Kvasinky mají zřetelné výhody oproti bakteriím k expresi cizích genů. Skutečnost, že kvasnice jsou eukaryotické buňky znamená, že mají buněčné uspořádání podobné savčí buňce tzn. mohou se syntetizovat a zpracovávat farmakologicky užitečné bílkoviny pro léčbu a prevenci nemocí u člověka. Několik cizích genů již bylo úspěšně vyjádřeno v kvasinkách např. virové vakcíny (prevence proti hepatitidě B), hormony (inzulín pro diabetiky), krevní bílkoviny (albumin lidského séra – použití při transfuzi), růstové faktory (epidermální růstový faktor pro hojení ran) a interferony ( $\beta$ -interferon pro léčbu roztroušené sklerózy) [28].

V současnosti se do popředí zájmu dostávají kvasinky *Sacharomyces cerevisiae*, které hrají významnou roli při léčbě celé řady onemocnění jak u lidí, tak i u zvířat. Stejně tak lze kvasnice, či jejich hydrolyzáty využít v období rekonvalescence, po úrazech, pro léčbu alergií či zvýšení imunity. Jejich hlavní výhodou je poměrně snadné zpracování a nízká cena konečného produktu.

Ghoneum [38] se již více než dvě desetiletí zabývá výzkumem rakoviny s využitím kvasinkových buněk. Ve svých experimentech zjistil, že nádorové buňky propadají řízené sebedestrukci (tzv. apoptóze), pokud jsou vystaveny byť i malému množství kvasinek. Nádorové buňky mají snahu kvasinky pohlcovat a poté nádorová buňka umírá. Proto se kvasinky stávají slibným a přirozeným způsobem léčby rakoviny.

S léčbou rakoviny souvisí i následující studie [39], kde pacientům byly podávány selenem obohacené kvasinky, a byla prokázána 50% -ní redukce projevů rakoviny. Při zkoumání různých způsobů vpravení selenu do kvasinek bylo zjištěno, že čím větší množství seleničitanu přidáváme, tím se zvýší koncentrace selenu v buňkách, ale jejich růst je inhibován. Nalezením sloučenin, které jsou kvasinkou během růstu vytvářeny, by velmi pomohlo při pochopení asimilačního mechanismu a tím i příznivých a antikarcinogenních vlastností kvasinek.

Ve studii [40] zkoumali možnosti využití kvasinek *S.cerevisiae* v rámci rekombinantní vakcíny k úpravě funkce myostatínu u myší. Myši byly očkovány tzv. orálním krměním a podkožními injekcemi. Dle výsledků bylo zjištěno, že orální krmění mělo téměř stejnou imunitní reakci jako u injekcí. Všechna zvířata byla v celém průběhu experimentu zdravá, což naznačuje, že vakcína je netoxická a bezpečná. V souhrnu bylo zjištěno, že orálně podávaná vakcína zvyšuje tělesnou hmotnost a svalové složení u myší, což může do budoucna vést k vývoji vakcíny proti svalové atrofii u lidí.

Důležitou součástí buněčné stěny v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* jsou mannoproteiny, které mají výrazné emulgační vlastnosti. Tyto vlastnosti byly prezentovány v [41]. Cílem bylo vytvořit tři druhy extraktů obsahující mannoproteiny kvasinek; alkalický extrakt (ASMP), extrakt horkou vodou (WSMP) a denaturovaný extrakt (DWSMP). Na základě analytických metod a testů in vitro, byl extrakt WSMP navržen jako účinný přírodní doplněk pro zvýšení imunity v průběhu nádorového onemocnění.

Účinky kvasnicových hydrolyzátnů byly zkoumány ve spojení s mechanismem regulace chuti k jídlu v centrálním nervovém systému [42]. Výsledky ukázaly, že kvasnicové hydrolyzáty o molekulové velikosti < 10kDa mají blahodárné účinky jako doplněk stravy s účinkem proti obezitě.



Cílem další práce [43] bylo získat údaje o bezpečnosti při užívání kvasnicových hydrolyzátů o molekulové hmotnosti 10-30 kDa jako doplněk stravy. Hematologické a biochemické analýzy testovaných potkanů neodhalily žádné toxické účinky hydrolyzátů *Saccharomyces cerevisiae*.

V následující studii [44] se snažili vytvořit materiál, který obsahuje vysoký obsah CHP (Cyclo-His-Pro) za použití kvasinek pro aplikaci tohoto cyklického dipeptidu v léčbě metabolických poruch. Hydrolyzáty s vysokým obsahem CHP ukázaly vysokou úroveň aktivních radikálů a glukózovou toleranční činnost. Proto je možné využít kvasnicové hydrolyzáty s vysokým obsahem CHP jako antioxidační nebo antidiabetický materiál pro přípravu funkčních potravin.

*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* byly zkoumány pro posouzení vlivu stravy na růst, výkonnost, správnost biochemických parametrů v séru a střevní mikroflóry mladých jeseterů rodu Beluga. Výsledky této studie [45] naznačují, že doplněk stravy obsahující 2% kvasinek zlepšili konečnou hmotnost, přibývání na váze. Dále upravují růst a střevní mikroflóru, aniž by negativně ovlivnily základní hematologické parametry.

V následující práci [46] byl výzkum zaměřen na získání mědi obohacených buněk *Saccharomyces cerevisiae*, vyvinout účinný kovový systém pro lidskou výživu a léčebné procedury. K výrobě glutathionu (GSH-konjugát mědi) byly využity vzorky kvasinek *S.cerevisiae* pro biotransformační studie s octanem mědnatým. V první části výzkumu se zjišťovaly možnosti zvýšení obsahu intracelulárního GSH a ve druhém kroku se kvasinky pěstovaly v přítomnosti mědi a následně se podrobily procesu biotransformace. S ohledem na 2008/100/ES směrnice týkající se doporučené denní dávky (RDA) potravinových doplňků, můžeme měď na intracelulární úrovni považovat za velmi důležitou pro formulaci výživových doplňků z kvasničné biomasy. Tento postup můžeme považovat za velmi zajímavou příležitost k dalšímu použití kultur kvasinek k nutričnímu použití.

V následující publikaci [47] byly použity kultury mikroorganismů bacheru ke studiu vlivu kvasnicových hydrolyzátů ze *Saccharomyces cerevisiae* na fermentaci tropických trav (*Pennisetum purpureum*, *P.clandestinum* a *Cliricidia sepium*) in vitro. Pokud by byly tyto výsledky potvrzeny testováním in vivo, mohly by se kvasnicové hydrolyzáty použít jako doplňkové látky ke krmení přežvýkavců z důvodu zlepšení trávení těchto tropických trav.

Celá řada publikací se věnuje výrobě etanolu z různých substrátů s využitím kvasinkových buněk.

V následující práci [48] byly hodnoceny vlastnosti kvasinek při fermentaci lignocelulóзовé biomasy. Při hydrolýze se tvoří a uvolňují inhibiční látky (furany, slabé kyseliny a fenoly). Snižují výnosy etanolu a ovlivňují produktivitu a výkonnost mikroorganismů během fermentace. *Saccharomyces cerevisiae* se jeví jako nejméně citlivý mikroorganismus. Za účelem překonání účinků inhibitorů byly vyvinuty metody, které zahrnují zlepšení přirozené tolerance mikroorganismů.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* byly také využity k produkci etanolu z kukuřice Stover. K odstranění těkavých inhibitorů během fermentace z hemicelulóзовého hydrolyzátu bylo docíleno neutralizací vápnem. Veškerý obsah furfuralu a kyseliny octové se snížil více než o 50%. Pomocí kvasinek a alginátu vápenatého se výrazně zlepšila zkvasitelnost dekontaminovaných hydrolyzáatů. Tyto výsledky potvrzují životaschopnost a význam produkce etanolu z hemicelulóзовého hydrolyzátu z kukuřice [49].

Pro produkci etanolu byla prezentována práce [50], která využívá nového kmene kvasinek (*Spathaspora arborariae*) a rýžových slupek jako substrát a to buď samostatně anebo společně s kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*.

V práci [51] byly hydrolyzáty z pekařských a pivovarských kvasnic, dále melasa zkoumány jako zdroje dusíku pro produkci kyseliny jantarové v průběhu kvašení. Hydrolyzáat z pekařského droždí vykazoval nejvyšší výnosy kyseliny jantarové. Lze ho použít jako alternativní zdroj dusíku a můžeme jím nahradit komerční kvasničný extrakt.

Kvasničná biomasa se také stala předmětem řady zajímavých publikací.

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* byla přijata jako cenný modelový systém pro studium vlivu kosmických letů na základní eukaryotické buněčné procesy, jako jsou úpravy DNA a buněčného cyklu. *S. cerevisiae* získané z Apolla 16 byly schopné lépe přežít v tzv. intradermální lézi (podkožní rána, puchýř) v uměle infikovaných myších ve srovnání s testy na zemi. Tyto výsledky naznačují, že stavy bez tíže či kosmické lety by mohly podpořit přežití buněk *S.cerevisiae* prostřednictvím regulace metabolismu sacharidů a průběhu buněčného cyklu [52].

Velmi zajímavá se jeví nová metoda pro imobilizaci kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Biokeramický materiál (hydroxylapatit tzv. HAp) byl poprvé testován jako nový nosič a ukázalo se, že za typických podmínek kvasinky nemají žádnou afinitu k HAp keramice. Experimenty s kvasinkovými buňkami imobilizovaných na HAp keramice prokázaly účinnost použití těchto přípravků v biotechnologiích spojené s čištěním odpadních vod od těžkých kovů [53].

Buňky kvasinek *S.cerevisiae* byly úspěšně využity k selektivní separaci křemene a vápence prostřednictvím indukované flotace a flokulace. Kvasinky vykazovaly vyšší afinitu k povrchu vápence. Tato studie se snažila pochopit změny v chemii povrchu kvasinek a minerálů po vzájemné interakci [54].

V druhé části literární rešerše poukazují na využití odpadů z jatečné výroby z živočišných tkání, které představují určitou ekologickou zátěž na životní prostředí, z důvodu neustálého zvyšování produkce masa. Na druhou stranu mohou být potenciálním zdrojem velkého množství bílkovin, které lze získat ne příliš složitými postupy či technologiemi vedoucími k redukci odpadů a zvýšení efektivnosti výroby.

Živočišný odpad lze definovat jako jatečně upravená těla zvířat nebo jejich části, včetně produktů živočišného původu, které nejsou určeny k přímé lidské spotřebě [29]. Zpracováním odpadu z jatek přímo po výseku a bourání masa, se výsledný produkt, kolagen či kolagenní hydrolyzát, může využít v potravinářství, farmacii či jako biodegradabilní obaly pro potraviny.

Kolageny představují nejrozšířenější skupinu živočišných bílkovin (asi 25%). V současnosti bylo popsáno nejméně 27 rozdílných typů kolagenů. Jako strukturální bílkovina je hlavní organickou složkou podpůrného systému živočišného organismu, kostí, chrupavek, šlach, vaziva a kůže. Kromě toho je významnou složkou cévních stěn, bazálních membrán, rohovek a některých orgánů těla. Typickým rysem kolagenu jsou jeho tři polypeptidové řetězce stočené do pravotočivé trojitě šroubovice. Pro kolagen je charakteristický obsah glycinu (26-28%), prolinu (nad 15 %) a hydroxyprolinu (13-14 %). Složení kolagenu je závislé na živočišném druhu, typu orgánu a rase zvířete. Nejrozšířenější je kolagen typu I, který je přítomný v kůži, kostech, šlachách apod. Ostatní typy byly izolovány nedávno a kromě znalosti jejich aminokyselinového složení, nejsou o nich tak podrobné informace. Typ II je přítomný v chrupavkách a jeho hlavní charakteristikou je relativně vysoký obsah hydroxylysinu. Typ II a podobně i typ III a IV jsou složeny ze tří identických polypeptidických řetězců. Typ III se vyskytuje společně s typem I v kůži, kostech a hlavně ve svalech. Z hlediska chemického složení je pro něj typický vyšší obsah hydroxyprolinu a dále přítomnost cysteinu, který stabilizuje kolagenovou strukturu kovalentní disulfidickou vazbou (cystin). Typ IV je

přítomný v bazálních membránách a podobně jako typ III má vyšší obsah hydroxyprolinu; obsahuje též cystein a má vysoký obsah hydroxylysinu. Na druhé straně obsahuje tento typ kolagenu velmi málo argininu. Další typ kolagenu (typ V) se vyskytuje v bazálních membránách [30].

Od konce 70. let 20. století se kolagen stal středem pozornosti zejména v potravinářství, výživě, kosmetice, medicíně a farmacii. Kolagen využívaný v potravinářských aplikacích musí splňovat vysoké požadavky kladené na stupeň čistoty.

Důležitou oblastí využití kolagenu je výroba jedlých (biologicky rozložitelných) střívek, sloužících jako obaly pro masné výrobky. Hlavní funkcí obalů pro masné výrobky je zachování nebo zlepšení kvality výrobků, dále prodloužení trvanlivosti, omezení nežádoucích mikroorganismů, které snižují ztráty aromatických látek. V posledních letech v důsledku mnoha faktorů (zvýšená poptávka spotřebitelů po přírodních potravinových systémech, rostoucí informovanost o vlastnostech a bezpečnosti, které vyplývají z běžných systémů balení potravin) zesílil výzkum na stabilitu jedlých (biologicky rozložitelných) obalů pro potravinářské aplikace [31].

V posledních letech narostl zájem o nutriční využití kolagenu a to v souvislosti s redukčními dietami. Kolagenu chybí některé esenciální aminokyseliny (tryptofan, tyrosin, cystin), ale na druhou stranu má nadbytek glycinu a argininu, což může vést k nevyváženosti stravy a tím také k doprovodným jevům např. srdeční arytmie, dehydratace, svalová slabost. Lékařské studie doporučují kolagenem nahrazovat potřebné bílkoviny maximálně do 30%. Totéž platí pro léčení obezity, kde se větší množství kolagenu nedoporučuje. V podstatě vzniká snaha nalézt ideální kombinaci bílkovin [32].

Dalším možným využitím kolagenu je výroba želatiny. Jedná se o produkt získaný částečnou hydrolýzou kolagenu živočišného původu získaných z kůže, bílé pojivové tkáně a kostí. Potravinářský průmysl je pravděpodobně největším spotřebitelem želatiny na světě. Dnešní moderní výroba želatiny podstatně zjednodušila přípravu produktů na bázi želé a současně dala jistotu absolutní čistoty a zdravotní nezávadnosti želatiny.

V potravinářském průmyslu je želatina využívána u cukrovinek (zejména zachování textury, žvýkatelnosti, stabilizace pěny), u nízkotučných pomazánek (zajišťuje krémovitost, odbourávání tuků), mléka a mléčných výrobků (zajištění textury, stabilizace), pečiva (působí jako emulgační a želírující látka) a masných výrobků (vazba vody).

Ve farmaceutické a zdravotnické oblasti se želatina používá jako matrice pro implantáty, injekční podávání léků ve formě mikrokuliček a v intravenózních

infuzích. Uvádí se, že želatina je taktéž přidávána do živých oslabených virových vakcín pro očkování proti spalničkám, příušnicím, zarděnkám, japonské encefalitidě, vzteklině, záškrtu, tetanu a toxinu obsahující želatinu jako stabilizátor. Dále je ve farmaceutickém průmyslu želatina také široce používána pro výrobu tvrdých a měkkých tobolek, plasmaexpandery a ošetřování ran. Kromě toho se želatina také používá ke snížení hladiny sacharidů v potravinách, směřované pro diabetické pacienty [33].

Želatina se také používá jako pojivo jednotlivých vrstev u filmů nebo fotografických papírů. V metalurgii je želatina používána do elektrolytů, kde přidání želatiny umožňuje vyčištění zinku a kadmia, čímž umožňuje výrobu vysoce čištěných kovů.

Dále je želatina používána při výrobě plastů jako ochranný faktor a pro možnost regulovatelné velikosti částic. Při výrobě papíru je želatina přidávána jako pomocné pojivo, zvyšuje odolnost proti vlhkosti papíru. Želatinové hydrolyzáty jsou hojně využívány při výrobě kosmetických přípravků – krémů, šamponů a mýdel, kvůli vysokému obsahu kolagenů pro výživu pokožky a vlasů [34]

Atraktivita kolagenu jako biomateriálu spočívá do značné míry na názoru, že je to přírodní materiál s nízkou imunogenitou, proto ho tělo považuje za běžnou složku, a ne jako cizí materiál. Kolagen může být zpracován do několika forem, jako jsou trubice, pláty, prášky, rouna, vlákna, injekční roztoky a disperze, které našly využití v lékařské praxi. Lékařské aplikace kolagenů využívají přípravky obsahující určité typy kolagenu v poměru, který odpovídá složení tkáně, z níž byl kolagen izolován [34].

Zdravotnické prostředky na bázi kolagenu nabízí mnoho aplikací v oftalmologii jako štěpy pro náhradu rohovky, šicí materiál, využití kontaktní čočky jako bandáž po rohovkových zákrocích nebo jako vizkozní roztok používaný jako náhrada sklivce chránící během operace. Nejvíce studovanou aplikací kolagenových nosičů jsou vložky a štíty pro podávání léků na povrch rohovky nebo rohovky samotné.

Pro většinu lékařských funkcí je kolagen aplikován v pevné formě např. oční čočky, šicí materiál apod. Nicméně, jeden z nejvíce komerčně prosperujících použití kolagenu je tzv., podkožní injekce rozpustného kolagenu pro opravy dermatologických vad. Podobné kolagenové přípravky byly úspěšné i v jiných lékařských aplikacích jako je léčba nehybnosti hlasivek či močová inkontinence. Intenzivně je studována oblast tkáňového inženýrství, kde injekční kolagenové přípravky by mohly mít pozitivní vliv na regeneraci buněk a tkání [34].

Neocenitelné jsou i kolagenové houby při léčbě vážných popálenin. Našli také použití při ošetření jiných typů ran, jako jsou proleženiny, bércové vředy a

dekubity (rány vyvolané tlakem). Hlavní výhodou kolagenu je jeho schopnost absorbovat velké množství výpotku tkáně, hladké přilnutí k vlhké ráně a zachování vlhkého mikroklimatu, stejně tak slouží jako krycí materiál proti mechanickému poškození a tím se předchází bakteriální infekci. Vedle těchto fyzikálních efektů, kolagen podporuje buněčný růst a pohyblivost [34].

Japonské skupiny vědců intenzivně studovaly kolagenové minipeletky, malé tyčinky o průměru 1mm a délce 15 mm připravené tvarováním, sušením či řezáním kolagenového roztoku. Tyto válcové pelety lze podávat přes injekční jehlu. Ukázalo se, že jsou vhodné pro podání minocyklinu a lysozymu pro zlepšení klinických příznaků paradentózy [34].

Důležitou oblastí využití kolagenu je uplatňování kolagenových hydrolyzátů v průmyslové praxi. Široce diskutována je aplikace proteinových hydrolyzátů jako biostimulátorů v zemědělské technologii. Získané hydrolyzáty jsou schopny konkurovat v ceně se současnými typy zemědělských hnojiv [35].

Enzymovou hydrolýzou kolagenu je možné získat lepidla s průměrnou molekulovou hmotností v rozmezí 15 -50 KDa. Tyto hydrolyzáty jsou schopny podobně jako želatina či lepidla vytvářet termo-reverzibilní gely. Jejich kvalita však není příliš vysoká, pokud ji posuzujeme standardním postupem, možné použití je pro lepení etiket na skleněné láhve, které jsou odstranitelné vodou [35].

## **1.1 Zhodnocení literární rešerše**

Potravinářský a kožedělný průmysl produkuje značné množství vedlejších bílkovinných produktů, které se v nemalém podílu likvidují na skládkách nebo se spalují. Toto řešení je nejen neperspektivní, ale značně zatěžuje přírodní prostředí. Jsou to potenciálně velmi cenné produkty, které mohou při správném použití přinést nemalý zisk.

Kromě využití v kosmetice (kolagenové a keratinové krémy), farmacii (kapsuláty), v potravinářství (jako doplňky) a ekologická adheziva, je velmi nadějně jejich použití v zemědělství jako biostimulátory.

Jejich působení je dvojí. V prvním případě hydrolyzáty působí jako biostimulátor zvyšující imunitní systém kulturních rostlin. Druhý účinný mechanismus použití proteinových hydrolyzátů je schopnost absorbovat chemické ochranné prostředky a tím prodlužovat jejich životnost nebo snížit požadované účinné koncentrace [37].

V současnosti se provádí intenzivní výzkum použití mikrobiální biomasy ke zvýšení imunitního systému olejnatých rostlin, zejména řepky olejnaté, máku a lupiny (sója severu).

Další důležitá aplikace je použití proteinových hydrolyzátů zejména pak hydrolyzátů z kvasničné biomasy jako výživa těžce nemocných onkologických pacientů. Kombinace hydrolyzátů kvasničné biomasy s gama-nenasycenými kyselinami slouží také jako podpůrný lék onkologicky nemocných pacientů. Další použití je v období rekonvalescence, po úrazech, nemoci, při poruchách trávení apod. Stejně tak lze využít vyrobené hydrolyzáty pro léčbu alergií či zvýšení imunity.

Práce pojednávající o aplikaci kvasnicových hydrolyzátů lze rozdělit do dvou skupin. V první skupině je zahrnuta produkce komplexu B vitamínů, jako je např. pangamin. Ve druhé skupině je vlastní hydrolytický produkt určený převážně jako potravinový doplněk.

Nejnovější pokusy prokázaly, že kvasnice jsou plně použitelné jako náhrada tradičních bílkovin.

Přidaná kvasničná kultura za optimálních fyzikálně chemických podmínek vytváří biomasu bohatou na esenciální aminokyseliny a vitamíny.

Celá řada publikací dává celkem přehlednou orientaci o možnostech složení hydrolyzátů i jejich hydrolýzy. Obecně lze provádět hydrolýzu jak v kyselém tak zásaditém prostředí a v obou případech je možno použít katalytický účinek specifických enzymů. Celá řada publikovaných prací se zabývá kyselou hydrolýzou s použitím kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové a sulfonové. Alkalická a enzymová hydrolýza je používána v menším rozsahu. V tomto velkém množství publikací se však velmi zřídka objevují práce zabývající se popisem průběhu hydrolýzy na základě chemické reakční kinetiky. V pracích [55] a [56] je prezentováno modelování kinetiky pro výrobu kyseliny jantarové z glukózy pomocí kvasinek s následnou optimalizací procesu. V práci [57] je kinetika hydrolýzy rýžových slupek pomocí kyseliny sírové vyjádřena heterogenními i homogenními modely. Nicméně, optimalizace jednotlivých technologických postupů pomocí poznatků procesního inženýrství je řešena velmi zřídka, což bude úkolem disertační práce.

## 2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Předkládaná disertační práce se zabývá možnostmi aplikací nástrojů procesního inženýrství na vývoji vhodné technologie pro zpracování odpadní biomasy, jejíž součástí jsou naměřená data. Vyhodnocuje navržené matematické modely jejich verifikací s cílem najít optimální hydrolyzační čas, který bude odpovídat minimu hlavních provozních nákladů.

Na základě podrobné literární studie a zejména jejího zhodnocení vplynuly následující úkoly:

1. popis kinetiky hydrolýzy biomasy
2. naměření experimentálních dat hydrolýzy a její vyhodnocení na základě navržených matematických modelů a jejich verifikace
3. optimalizace hydrolyzačního reaktoru
4. stanovení efektivního difusního koeficientu biostimulátoru a jeho možností sorpce rostlinným materiálem
5. aplikace hydrolyzátů jako biostimulátorů v zemědělství



### 3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Zvolené metody zpracování spočívají v optimální kombinaci přímého a nepřímého modelování. Nepřímé modelování spočívá v navržení matematicko – fyzikálních modelů na základě předpokládaného děje tj. hydrolýzy bílkovinné suroviny a popis transportních procesů při praktické aplikaci biostimulátoru v zemědělství. Přímé modelování spočívá v experimentálním naměření příslušných časových závislostí a transportních procesů.

Kombinací obou metod jsou experimentálně naměřená data matematicko-statisticky zpracována pomocí lineární a nelineární regrese analýzy podle navržených kvantitativních modelů za účelem stanovení kinetických parametrů. Verifikace navržených matematických modelů je provedena reálnými zkouškami v polních případně skleníkových podmínkách. K řešení je použito teorie matematické analýzy a numerických metod.

Ke stanovení jednotlivých složek směsí používám speciálních analytických metod.

## 4. TEORETICKÁ ČÁST

### 4.1 Kinetika hydrolýzy kvasničné biomasy

Při hydrolýze kvasničné biomasy s hydrolyzačním činidlem dochází ke vzniku heterogenní směsi obsahující vodný roztok proteinového hydrolyzátu a směs kvasnic. Jelikož do reakce vstupují jen malé molekuly, můžeme brzdící vliv vnitřní difuze zanedbat.

Za tohoto předpokladu můžeme kinetiku hydrolýzy kvasničné biomasy popsat rovnicí prvního řádu

$$v = -\frac{dc}{d\tau} = k \cdot c \quad (4.1)$$

Integrací rovnice (4.1) obdržíme vztah

$$c = c_o \cdot e^{-k\tau} \quad (4.2)$$

Zavedením stupně konverze

$$x = \frac{c_o - c}{c_o} \quad (4.2a)$$

Upravíme integrál rovnice (4.1)

$$x = 1 - e^{-k\tau} \quad (4.2b)$$

Vynesením přirozeného logaritmu  $(1 - x)$  nezreagovaného podílu oproti času získáme přímku, z jejíž směrnice zjistíme rychlostní konstantu hydrolýzy biomasy.

## 4.2 Stanovení optimální reakční doby

Optimální čas pro přípravu ztekuceného hydrolyzátu z kvasničné biomasy závisí na hlavních provozních nákladech ( $N_S$ ), které jsou rovny součtu nákladů na spotřebu elektrické energie nutnou k pohonu míchadla ( $N_E$ ) a nákladů na požadovanou koncentraci konečného produktu ( $N_O$ ).

Platí tedy

$$N_S = N_E + N_O \quad (4.3)$$

Náklady na spotřebu elektrické energie, jsou rovny součinu příkonu elektromotoru v čase ( $P, \tau$ ) a jednotkovou cenu elektrické energie  $K_E$

$$N_E = K_E \cdot P \cdot \tau \quad (4.4)$$

Náklady na koncentraci jsou dány součinem hmotností vypařené vody, výparného tepla a jednotkovou cenou tepelné energie

$$N_O = K_P \cdot (\Delta H)_{\text{výp}} \cdot m_{H_2O} \quad (4.5)$$

Kombinací rovnic (4.4) a (4.5) dostaneme

$$N_S = K_E \cdot P \cdot \tau + K_P \cdot (\Delta H)_{\text{výp}} \cdot m_{H_2O} \quad (4.6)$$

kde

$P$ .....příkon elektromotoru [kW]

$\tau$ .....čas [h]

$K_E$ .....jednotková cena elektrické energie [Kč/kWh]

$m_{H_2O}$ .....množství vypařené vody [kg]

$(\Delta H)_{\text{výp}}$ .....výparné teplo vody [J/kg]

$K_P$ .....jednotková cena páry odparky [Kč/J]

Pro stanovení optimální reakční doby budu vycházet z reakce kinetiky hydrolýzy v reaktoru, která je popsána následující diferenciální rovnicí

$$\frac{dc_o}{d\tau} = k \cdot (c_{ro} - c) \quad (4.7)$$

Rovnovážnou koncentraci  $c_{ro}$  zjistíme z bilance bílkoviny v ustáleném stavu

$$c_p \cdot V = c_{ro} \cdot V_0 \quad (4.7a)$$

odtud

$$c_{ro} = \frac{c_p}{1 + Na} \quad (4.7b)$$

kde  $Na$  udává poměr objemu kapalné k objemu pevné fáze ( $V_o/V$ ).

Dosazením vztahu 4.7b do rovnice 4.7 a integrací dostaneme 4.9

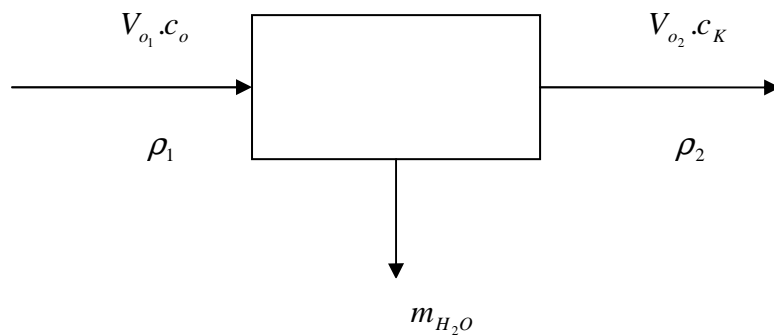
$$\int \frac{dc_o}{c_{ro} - c_o} = \int k \cdot d\tau \quad (4.8)$$

$$c_o = c_{ro} \cdot (1 - e^{-k\tau}) \quad (4.9)$$

Z rovnice (4.9) si vypočteme čas, který potřebujeme pro dosažení do rovnice (4.6)

$$\tau = -\frac{1}{k} \cdot \ln\left(1 - \frac{c_o}{c_{ro}}\right) \quad (4.10)$$

Ke stanovení nákladů na požadovanou koncentraci produktu ( $N_o$ ), je třeba znát odpovídající hmotnost odpařené vody. Toto zjistíme bilancí odparky



Celková bilance:

$$V_{o_1} \cdot \rho_1 = m_{H_2O} + V_{o_2} \cdot \rho_2 \quad (4.11)$$

Bilance hydrolyzátu:

$$V_{o_1} \cdot c_o = V_{o_2} \cdot c_K \Rightarrow V_{o_2} = V_{o_1} \cdot \frac{c_o}{c_K} \quad (4.12)$$

Kombinací rovnic (4.11) a (4.12) vypočítáme množství vypařené vody  $m_{H_2O}$ .

$$V_{o_1} \cdot \rho_1 = m_{H_2O} + V_{o_1} \cdot \frac{c_o}{c_K} \cdot \rho_2 \quad (4.13)$$

$$m_{H_2O} = V_{o_1} \cdot \left( \rho_1 - \frac{c_o}{c_K} \right) \cdot \rho_2 \quad (4.14)$$

Za předpokladu, že vstupní  $\rho_1$  a výstupní  $\rho_2$  roztoku se rovnají (tento předpoklad je oprávněný,  $\rho$  hydrolyzátu je roven  $\rho$  vody), pak pro hmotnost odpařené vody platí

$$m_{H_2O} = V_{o_1} \cdot \left( 1 - \frac{c_o}{c_K} \right) \cdot \rho \quad (4.15)$$

kde platí:  $V_{o_1} = Na \cdot V$

Dosazením vztahu (4.15) do rovnice (4.6) dostáváme konečný tvar závislosti hlavních provozních nákladů

$$N_S = -\frac{K_E \cdot P}{k} \cdot \ln\left(1 - \frac{c_o}{c_{ro}}\right) + K_p \cdot (\Delta H)_{výp} \cdot Na \cdot V \cdot \left(1 - \frac{c_o}{c_K}\right) \cdot \rho \quad (4.16)$$

Předpokládané optimum (minimum) dostaneme derivací rovnice (4.16) a položením výsledků rovných nule

$$N_S = -A \cdot \ln\left(1 - \frac{c_o}{c_{ro}}\right) + B - \frac{B \cdot c_o}{c_{ro}} \quad (4.17)$$

$$\frac{dN_S}{dc_o} = \frac{A}{1 - \frac{c_o}{c_{ro}}} \cdot \frac{1}{c_{ro}} - \frac{B}{c_K} = 0 \quad (4.18)$$

$$\text{kde: } A = \frac{K_E \cdot P}{K} \quad (4.18a)$$

$$B = K_p \cdot (\Delta H)_{výp} \cdot Na \cdot V \cdot \rho \quad (4.18b)$$

Řešením rovnice (4.18) dostaneme optimální koncentraci odpovídající reakční době vyjadřující rovnice (4.10), kde za  $c_o$  dosadíme  $c_{opt}$

$$c_{opt} = c_{ro} - \frac{A}{B} \cdot c_K \quad (4.19)$$

Pro vyčíslení závislosti hlavních provozních nákladů na koncentraci bílkovinné biomasy jsme použili následující vstupní data (Tab. 1):

**Tab. 1:** Vstupní parametry pro odhad hlavních provozních nákladů

$K_E$	2	[Kč·kWh <sup>-1</sup> ]	$\rho$	1000	[kg·m <sup>-3</sup> ]
$K_p$	0,4	[Kč·MJ <sup>-1</sup> ]	$k$	0,0143	[min <sup>-1</sup> ]
$V$	1	[m <sup>3</sup> ]	$Na$	5	[1]
$P$	5	[KW]	$c_k$	950	[kg·m <sup>-3</sup> ]
$(\Delta H)_{výp}$	2,3	[MJ·kg <sup>-1</sup> ]	$c_p$	900	[kg·m <sup>-3</sup> ]
$c_{ro}$	150	[kg·m <sup>3</sup> ]			

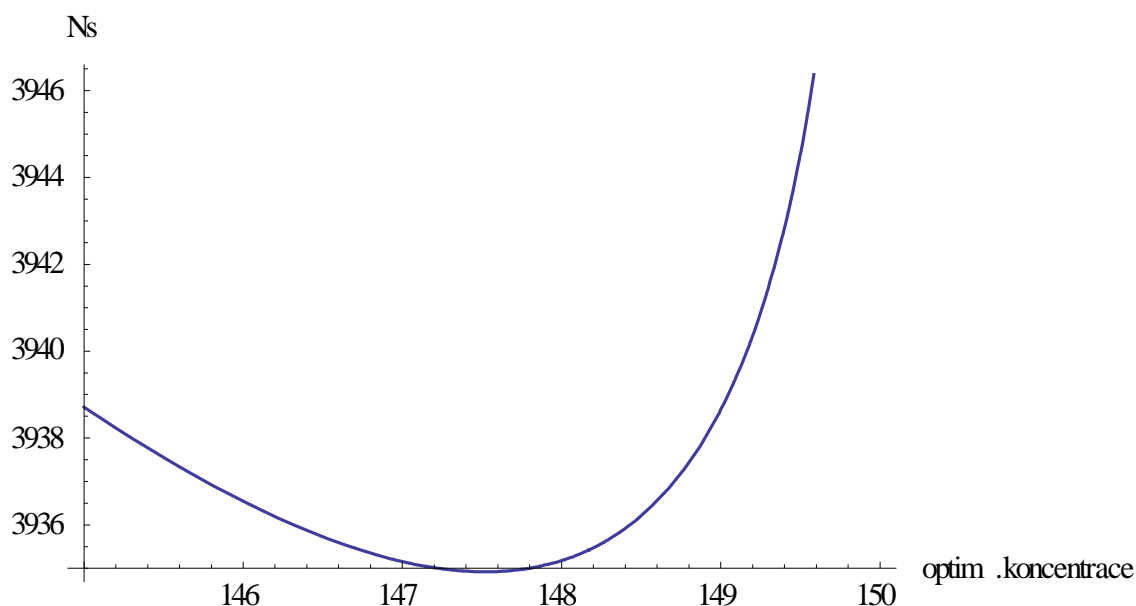
Dosazením do rovnic (4.18a,b) jsem vypočítala hodnoty konstant A a B:

$$A = \frac{K_E \cdot P}{k} = \frac{2 \cdot 5}{0,0143 \cdot 60} \cong \underline{12Kč}$$

$$B = K_p \cdot (\Delta H)_{výp} \cdot Na \cdot V \cdot \rho$$

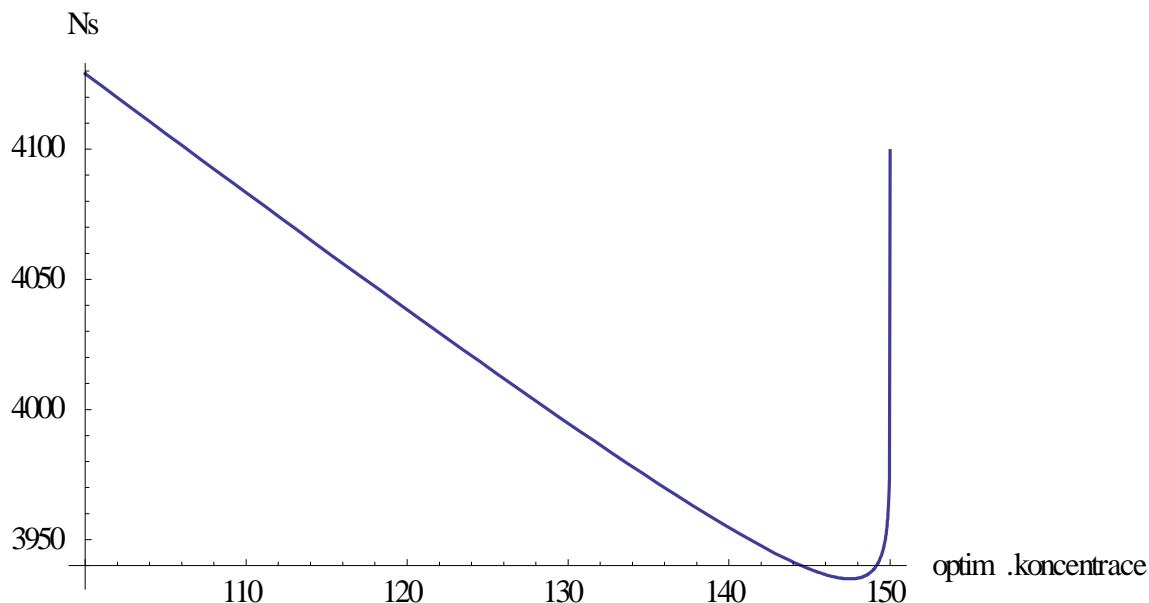
$$B = (0,4 \cdot 10^{-6}) \cdot (2,3 \cdot 10^6) \cdot 5 \cdot 1 \cdot 1000 = \underline{4600Kč}$$

Dosazením shora uvedených hodnot A, B do rovnice 4.16 získáme závislost hlavních provozních nákladů pro konkrétní vstupní data uvedené v tabulce 1 a jejich grafické zobrazení je uvedeno na obrázku 4.1 tj. závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu.



**Obr. 4.1:** Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu v okolí optimální koncentrace.<sup>1</sup>

Zatímco obrázek 4.2 představuje širší rozmezí koncentrace.



**Obr. 4.2:** Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu v okolí optimální koncentrace.<sup>1</sup>

Pro hodnotu rychlostní konstanty  $0,0143 \text{ min}^{-1}$  ( $0,86\text{h}^{-1}$ ) jsem použila výsledky z experimentálního měření kinetiky hydrolyzy odpadních kolagenových střívek.

Dosazením do rovnice (4.21) jsem získala hodnotu optimální koncentrace

$$c_{opt} = c_{ro} - \frac{A}{B} \cdot c_K = 150 - \left( \frac{12}{4600} \cdot 950 \right) = \underline{147,5 \text{ kg} / \text{m}^3}$$

Odpovídající reakční čas jsem získala dosazením do rovnice (4.10)

$$\tau = -\frac{1}{k} \cdot \ln\left(1 - \frac{c_{opt}}{c_{ro}}\right) = -\frac{1}{0,0143 \cdot 60} \cdot \ln\left(1 - \frac{147}{150}\right) = \underline{4,6 \text{ hodin}}$$

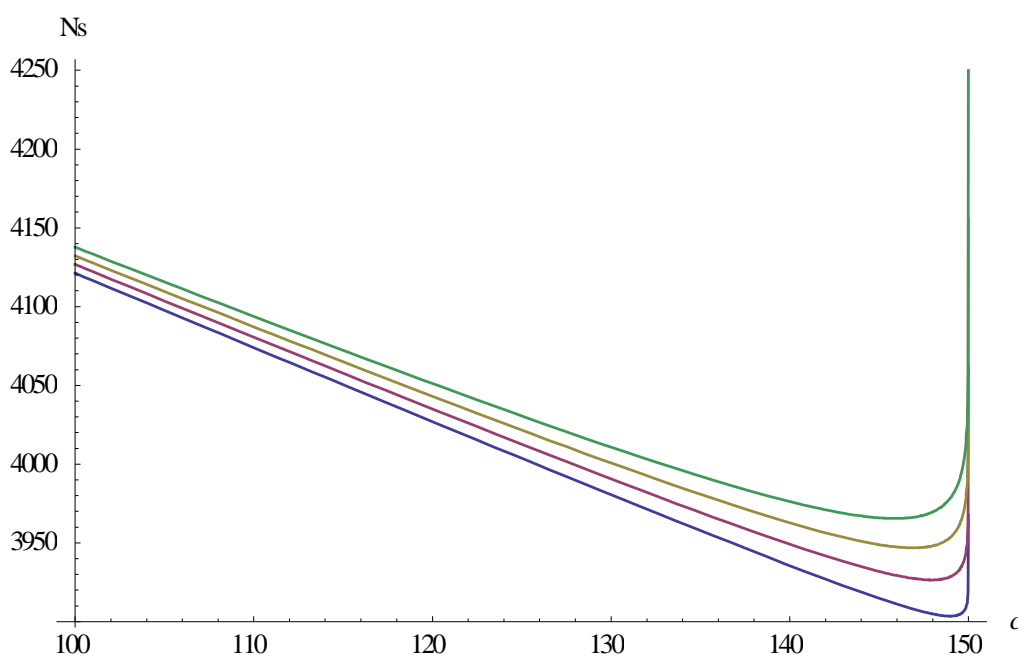


### 4.3 Modelové výpočty

Následující simulační výpočty se budou odvíjet z rovnice 4.16, která se skládá ze členů A a B.

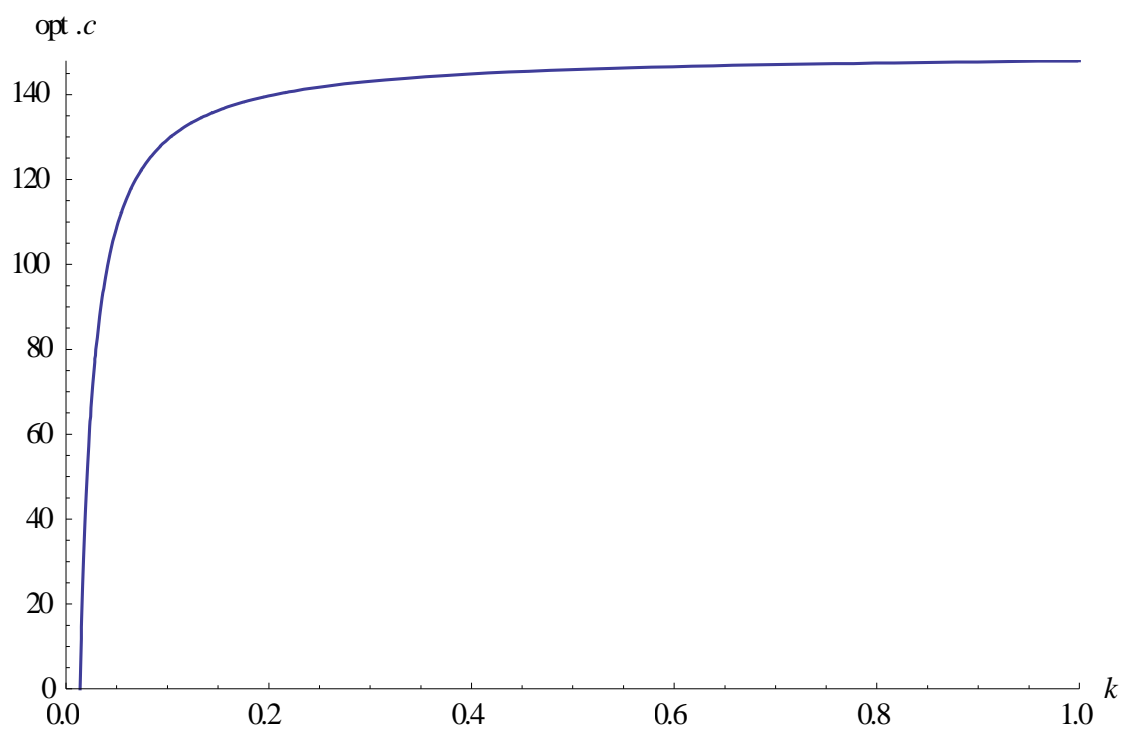
Člen B obsahuje parametry: jednotková cena páry, výparné teplo vody, množství vypařené vody, objem, hustota a parametr  $N_a$  - značí podíl objemu hydrolyzačního činidla k objemu vlhké kvasničné biomasy. Parametr  $N_a$  je roven hodnotě 5, který je získán z poznatku při praktickém provádění hydrolyzy bílkovin (E.Diefendorf – ústní sdělení). Dále objem představuje náplň hydrolyzačního reaktoru, který vzhledem k jeho rozměrům bývá konstantní. Cena páry se nebude v delším časovém intervalu podstatně měnit, výparné teplo a hustota jsou pak konstanty.

Člen A obsahuje parametry: jednotková cena energie, kde se opět předpokládá, že se nebude v delším časovém intervalu podstatně měnit, příkon elektromotoru míchadla je konstanta. Tedy nejdůležitější pro průběh nákladové funkce (rovnice 4.16) bude kinetika hydrolyzační reakce tj. hodnota rychlostní konstanty. Z tohoto důvodu následující modelové výpočty budou pro měnící se hydrolyzační konstantu  $k$ . Obrázek 4.3 znázorňuje průběh hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu pro různé hodnoty rychlostních konstant, od  $2 - 0,5 \text{ hod}^{-1}$ .



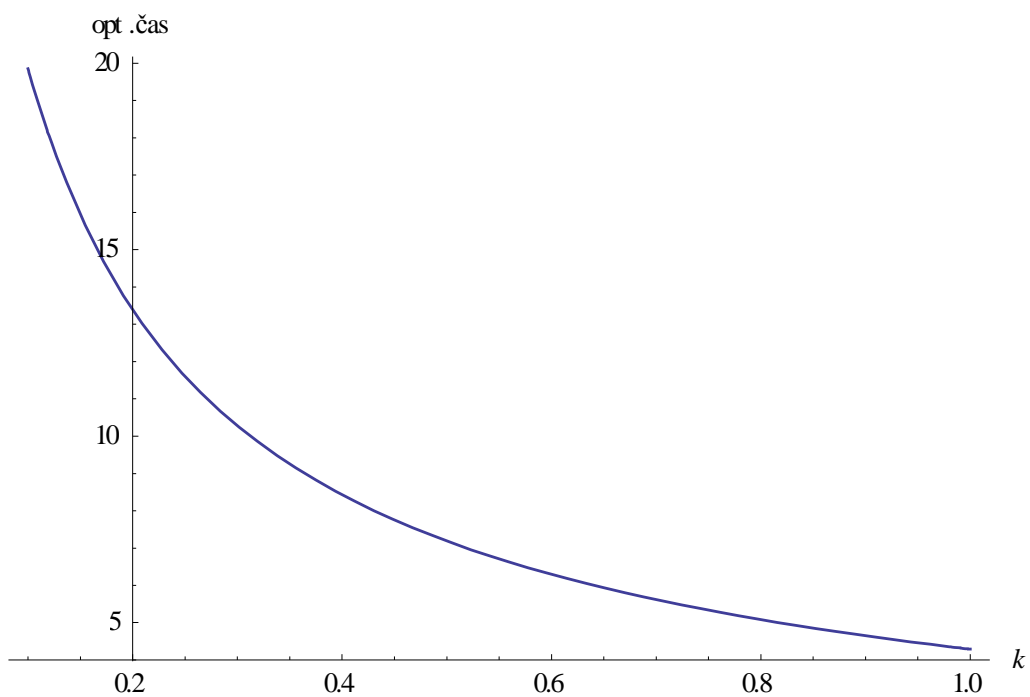
**Obr. 4.3:** Závislost hlavních provozních nákladů na koncentraci hydrolyzátu pro různé hodnoty rychlostních konstant.<sup>1</sup>

Následující obrázek 4.4 představuje závislost optimální koncentrace na hodnotách rychlostních konstant. Hlavní pozornost pro praxi bude věnována při pomalé hydrolýze.



**Obr. 4.4:** *Závislost optimální koncentrace na hodnotách rychlostních konstant.<sup>1</sup>*

Obrázek 4.5 představuje závislost odpovídajícího optimálního času na odpovídajících hodnotách rychlostních konstant.



**Obr. 4.5:** Závislost optimálního času na odpovídajících hodnotách rychlostních konstant.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> grafy byly vytvořeny pomocí programu Wolfram Mathematica 8.0

## 4.4 Stanovení efektivního difusního koeficientu

Efektivní difusní koeficient je nejdůležitějším experimentálním parametrem při difuzi biostimulátoru do těla rostliny. Pro výpočet efektivního difusního koeficientu bylo použito dvou metod.

### 4.4.1 Crankova metoda

Efektivní difusní koeficient lze odhadnout ze sorpčního měření, při kterém se měří pokles koncentrace v důsledku penetrace biostimulátoru do těla rostliny. Pokles koncentrace je lineárně závislý na druhé odmocnině času. Crank navrhl rovnici popisující metodu sorpčního měření, kterou lze popsat následujícím vztahem:

$$C_0(\tau) = \frac{c_{0p} - c_0(\tau)}{c_{0p} - c_0(\infty)} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{1 + Na}{Na} \sqrt{\frac{D\tau}{b^2}} \quad (4.20)$$

kde nekonečný čas je použit pro rovnováhu stavu systému. Rovnovážnou koncentraci lze v tomto okamžiku (tj.  $c_0(\infty)$ ) vypočítat z následující hmotnostní bilance sorpčního systému v měřící cele:

$$c_{0p}V_0 = c_0(\infty)V_0 + \varepsilon c_0(\infty)V \quad (4.21)$$

Pro rovnovážnou koncentraci v systému proto můžeme odhadnout

$$c_0(\infty) = \frac{c_{0p}Na}{Na + \varepsilon} \quad (4.22)$$

Kromě toho můžeme předpokládat jednosložkovou difuzi, protože velmi nízké koncentrace biostimulátoru ve vodném roztoku (méně než 1% w/w) se obvykle používají jako biostimulátory pro aplikaci v zemědělství [60].

#### 4.4.2 Kvazistacionární metoda

Je popsána následující diferenciální rovnicí

$$\frac{D \cdot (c_p - c) \cdot S}{b} = \frac{dc}{d\tau} \cdot V_0 \quad (4.23)$$

kde

$c_p$ ..... počáteční koncentrace biostimulátoru ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

$c$ ..... hmotnost biostimulátoru ve vodě ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

$S$ ..... povrch listu ( $\text{m}^2$ )

$b$ ..... tloušťka listu (m)

$\tau$ ..... čas (s)

$V_0$ ..... objem vody ( $\text{m}^3$ )

Integrací rovnice (4.23) získáme vztah

$$\int_0^{\tau} \frac{D}{b} \cdot \frac{S}{V_0} \cdot d\tau = \int_0^c \frac{dc}{c_p - c} \quad (4.24)$$

Úpravou rovnice (4.24) získáme vztahy (4.25) a (4.26)

$$\frac{D \cdot S}{b \cdot V_0} = k \quad (4.25)$$

$$D = \frac{k \cdot b \cdot V_0}{S} \quad (4.26)$$

Objem zjistíme z rovnice (4.27)

$$V_0 = b \cdot S \quad (4.27)$$

Dosazením vztahu  $\frac{m}{\rho}$  do rovnice (4.27) za  $V_0$  obdržíme rovnici pro výpočet tloušťky listu

$$b = \frac{m}{\rho \cdot S} \quad (4.28)$$

## 4.5 Difuse biostimulátoru rostlinným tělem

### 4.5.1 Matematický model v polních podmínkách

Bílkovinné biostimulátory zvyšují imunitní systém kulturních rostlin a tím snižují nutnou potřebu chemické ochrany rostlin. Vedlejším účinkem bílkovinných biostimulátorů je jejich působení jako listové hnojivo. Hlavními požadavky na biostimulátory jsou jejich dobrá vodo-rozpustnost a rychlá penetrace aktivní složky do jemné struktury rostlin. Oba požadavky se realizují hydrolýzou kolagenního těsta, kterou lze provádět jak v alkalickém tak v kyselém prostředí za možnosti použití proteolytických enzymů v případě alkalické hydrolýzy.

Po chemické stránce je kolagenové těsto polyelektrolyt složený ze 17 základních aminokyselin. Při hydrolýze se štěpí peptidická vazba CO-NH a vznikají nízkomolekulární vodo-rozpustné oligomery.

K tomu, aby se projevil příznivý účinek biostimulátoru, je třeba, aby optimální část biostimulátoru difundovala do vnitřního objemu ošetřované rostliny ve formě zředěného vodného postřiku. Absorpce optimálního množství rostlinným tělem však potřebuje určitý čas, který je závislý na koncentračním gradientu biostimulátoru, na povrchu a hodnotě jeho efektivního difusního koeficientu. Po tuto dobu musí být povrchový film biostimulátoru v kapalně fázi, neboť při rychlém odpaření vody do okolí se transport biostimulátoru zastaví v důsledku prakticky nulové hodnoty difusního koeficientu v tuhé fázi. Dále v případě deště dojde ke smytí povrchového filmu biostimulátoru a tím i k zastavení jeho průniku do rostliny. Rychlost vypařování závisí na klimatických a hydrodynamických podmínkách (teplota, relativní vlhkost vzduch a rychlost větru), které doprovázejí polní podmínky testování. Uvedené skutečnosti mohou vysvětlit diametrální rozdíly při testování vlivu biostimulátorů v polních a skleníkových podmínkách, kde je téměř 100% vlhkost a zanedbatelné proudění vzduchu a tím se potřebný čas pro absorpci biostimulátoru mnohem lépe dodrží než je tomu v polních podmínkách.

K vypracování odhadu doporučených podmínek pro testování v polních podmínkách byl sestaven zjednodušený matematický model zahrnující simultánní difusi biostimulátoru do vnitřního objemu rostliny a jeho odpařování do okolního prostředí (vzduchu).

Předpokládejme tedy povrch listu, který je z obou stran pokrytý souvislou a rovnoměrnou vrstvou kapaliny (postřiku), ve které je rozpuštěn biostimulátor. Omezíme se na jednorozměrný model, kde prostorová proměnná ( $x$ ) bude představovat tloušťku listu. Dále předpokládejme izotropní vlastnosti listu vzhledem k vnitřnímu transportu hmoty, který nám umožňuje aplikovat osově

symetrickou okrajovou podmínku. V důsledku odpařování povrchové vody bude koncentrace biostimulátoru stoupat čímž bude klesat hodnota efektivního difusního koeficientu. Tento pokles však bude eliminován vzrůstajícím koncentračním gradientem na povrchu ošetřované rostliny a z tohoto důvodu budeme považovat hodnotu efektivního difusního koeficientu za konstantní po dobu existence kapalně fáze na povrchu rostliny.

$$\frac{\partial c}{\partial \tau}(x, \tau) = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, \tau), \quad 0 < x < b \quad 0 < \tau < \tau_k \quad (4.29)$$

$$\frac{\partial c}{\partial x}(0, \tau) = 0 \quad (4.30)$$

$$c(b, \tau) = \varepsilon c_0 \quad (4.31)$$

$$c(x, 0) = 0 \quad (4.32)$$

$$c_0(0) = c_{0p} \quad (4.33)$$

$$V_0(\tau) \frac{\partial c_0}{\partial \tau}(\tau) = -SD \frac{\partial c}{\partial x}(b, \tau) \quad (4.34)$$

$$V_0(\tau) = V_0(0) - \frac{kc_n(1-\varphi)\tau S}{\rho} \quad (4.35)$$

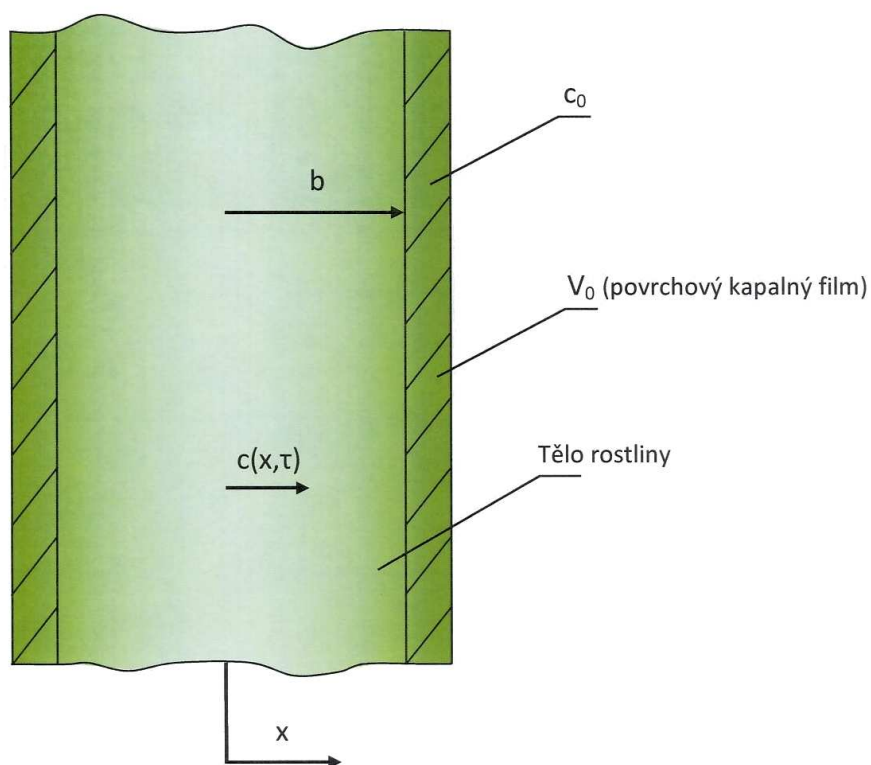
$$c_n = \frac{p_n M}{RT} \quad (4.36)$$

$$V_{0p} c_{0p} = V_0(\tau) c_0(\tau) + \tau DS \frac{\partial c}{\partial x}(b, \tau) \quad (4.37)$$

Rovnice (4.29) popisuje nestacionární koncentrační pole biostimulátoru v těle ošetřené rostliny. Časově omezená platnost  $0 < \tau < \tau_k$  je dána kritickým časem, kdy dojde k odpaření veškeré povrchové vody a koncentrace biostimulátoru ve filmu je rovna jeho hustotě. V tomto případě, jak bylo řečeno, je hodnota efektivního difusního koeficientu nulová. Rovnice (4.30) je osově symetrický problém, který reprezentuje izotropní vlastnosti vzhledem k vnitřní difuzi biostimulátoru. Rovnice (4.31) je předpoklad dokonalého transportu biostimulátoru do vnitřního objemu rostliny,  $\varepsilon$  značí poréznost rostliny a  $b$  je polovina tloušťky části rostliny. Je třeba konstatovat, že hodnota pórovitosti se

může lišit s ohledem na okolní podmínky (např. vlhkost, světlo, polarita biostimulátoru)[65,66]. Vztahy (4.32) a (4.33) jsou počáteční podmínky, koncentrace biostimulátoru uvnitř rostlinné tkáně se rovná nule a koncentrace biostimulátoru v kapalně vrstvě se rovná počáteční koncentraci připraveného roztoku biostimulátoru  $c_{0p}$ . Vztah (4.34) reprezentuje hmotovou bilanci tj. rychlost akumulace biostimulátoru v těle rostliny je rovna difusnímu toku na povrchu,  $S$  udává plochu,  $V_0(\tau)$  představuje čas v závislosti na objemu povrchového filmu – tato závislost je popsána rovnicí (4.35), kde  $\phi$  je relativní vlhkost vzduchu a  $\rho$  je hustota vody,  $k$  je hmotnostní součinitel prostupu vody (voda se odpařuje během sušení jen v kapalně vrstvě). Termín  $c_n$  znamená koncentraci nasycené vodní páry, která závisí na parciálním tlaku vodní páry, což je dáno rovnicí (4.36), kde  $p_n$  je parciální tlak vodní páry v bodu nasycení,  $M$  značí molární hmotnost vody,  $R$  je univerzální plynová konstanta a  $T$  je absolutní teplota vzduchu, která je ekvivalentní teplotě nasycení.

Geometrie matematického modelu je shrnuta na obrázku 4.6:



**Obr. 4.6:** Geometrie matematického modelu difuze biostimulátoru



### 4.5.2 Matematický model v skleníkových podmínkách

V případě, že je vzduch nasycen vodní parou, druhý člen na pravé straně rovnice (4.35) se rovná nule a pak je objem povrchového filmu konstantní. Vzhledem k tomu, že koncentrace biostimulátoru v roztoku je velmi nízká (0,5% w/w), pokles objemu biostimulátoru na povrchu způsobené difúzí do rostliny můžeme zanedbat. To představuje idealizovanou situaci penetrace biostimulátoru. V důsledku toho se stává model lineární. Zde je výhodné zavést bezrozměrné proměnné v následujících tvarech:

$$Fo = \frac{D\tau}{b^2} \quad (4.38)$$

$$X = \frac{x}{b} \quad (4.39)$$

$$C(X, Fo) = \frac{c}{\varepsilon c_{0p}} \quad (4.40)$$

$$C_0(Fo) = \frac{c_0}{c_{0p}} \quad (4.41)$$

$$Na = \frac{V_0(0)}{Sb} \quad (4.42)$$

Proto jsme získali bezrozměrné formulace matematického modelu (4.29) – (4.34) ve formě následující parciální diferenciální rovnice:

$$\frac{\partial C}{\partial Fo}(X, Fo) = D \frac{\partial^2 C}{\partial X^2}(X, Fo) \quad 0 < X < 1 \quad 0 < Fo < Fo_k \quad (4.43)$$

$$\frac{\partial C}{\partial X}(0, Fo) = 0 \quad (4.44)$$

$$C(1, Fo) = C_0 \quad (4.45)$$

$$C(X, 0) = 0 \quad (4.46)$$

$$C_0(0) = 1 \quad (4.47)$$

$$\frac{Na}{\varepsilon} \frac{\partial C_0}{\partial Fo}(Fo) = -\frac{\partial C}{\partial X}(1, Fo) \quad (4.48)$$

Řešení modelu v bezrozměrně proměnných se pak vyjadřuje:

$$C(X, Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} + 2Na \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(X \cdot g_n) \cdot \exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon \cos(g_n) - \frac{\varepsilon \sin(g_n)}{g_n} - g_n Na \sin(g_n)} \quad (4.49)$$

Rovnice (4.49) popisuje nestacionární koncentrační pole v těle ošetřované rostliny. Koncentrace v povrchové vrstvě se mění s časem v důsledku difuze a je dána následující rovnicí:

$$C_0(Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} + 2Na \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon + Na + \frac{Na^2 g_n^2}{\varepsilon}} \quad (4.50)$$

Z praktického hlediska má význam integrálně střední koncentrace biostimulátoru ve vnitřním objemu ošetřované rostliny. Ta je dána následující rovnicí (4.51) v závislosti na bezrozměrném čase s parametrem Na, což je poměr objemu povrchové kapalně vrstvy k objemu rostliny  $g_n$  v rovnicích (4.49), (4.50), (4.51) jsou  $n$ -tý kořen rovnice (4.52).

$$\bar{C}(Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} - 2Na^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon^2 + Na\varepsilon + Na^2 g_n^2} \quad (4.51)$$

$$\tan(g_n) = -\frac{Na \cdot g_n}{\varepsilon} \quad (g_n > 0) \quad (4.52)$$

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – ANALYTICKÉ METODY

### 5.1 Stanovení dusíku TKN (Total Kjehdal Nitrogen)

Pro stanovení celkového obsahu dusíkatých látek byla použita automatická destilační jednotka Pro-Nitro 1430 (O. K. SERVIS BioPro, s.r.o., příkon 2000W, rozsah měření 0,1 – 200 mg dusíku).

Metoda stanovení dusíku podle Kjehdala se stala celosvětovým oficiálně uznávaným standardem pro stanovení dusíku ve všech typech vzorků potravin. Princip spočívá v rozkladu zkušebního podílu koncentrovanou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátorů, při kterém se organický dusík přeměňuje na síran amonný. Do vychladlého rozloženého produktu se přidá přebytek hydroxidu sodného, čímž se uvolní amoniak. Uvolněný amoniak je destilován do přebytku kyseliny borité a poté titrován standardním roztokem kyseliny sírové nebo chlorovodíkové. Obsah dusíku je vypočítán z množství uvolněného amoniaku [61].

Analyzátor provádí titraci s kolorimetrickou detekcí v průběhu destilace.

Výsledkem je údaj obsahu dusíku v mg (P2), který byl následně přepočítán na celkový obsah dusíkatých látek.

*% celkového obsahu dusíkatých látek byly vypočteny podle vzorce:*

$$\% \text{ celkového obsahu dusíkatých látek} = (P2/n) \times F \times 100$$

kde P2 ..... obsah dusíku (mg)

n ..... navážka vzorku, která byla zmineralizována (mg)

F ..... přepočítávací faktor (6,25)

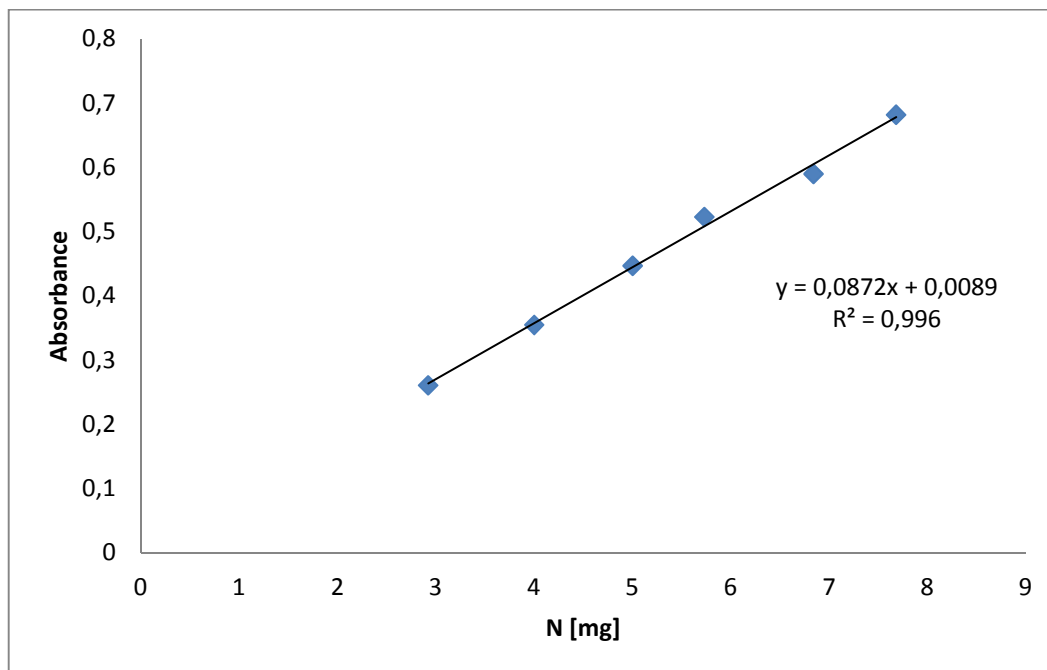
### 5.2 Stanovení dusíku Biuretovou reakcí

Stanovení bílkovin Biuretovou reakcí je metoda jednoduchá, s přesností stanovení 0 – 1 mg, nezávislá na aminokyselinovém složení. V alkalickém prostředí dávají bílkoviny a peptidy s měďnatými ionty červenofialový komplex. Intenzita zbarvení je úměrná počtu peptidových vazeb a pro její určení se používá absorpční spektrofotometrie [62].

Závislost absorbance na koncentraci dusíku v pipetovaném objemu vzorku byla vyhodnocena lineární regresní analýzou, jejímž výsledkem je následující rovnice:

$$y = 0,0872x + 0,0089$$

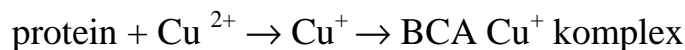
$$R^2 = 0,996$$



*Obr. 5.1: Kalibrační křivka obsahu dusíku ve vodném roztoku hydrolyzátu*

### 5.3 Bicinchoninová metoda (BCA metoda)

Metoda využívá kyseliny bicinchoninové (BCA) ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů; je založena na alkalické redukci mědnatého iontu na mědný protein a následné chelataci mědného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku červeného zbarvení. Bicinchoninová metoda je velmi citlivá na podmínky provedení: na době a teplotě inkubace, na charakteru proteinu použitého k standardizaci atd.



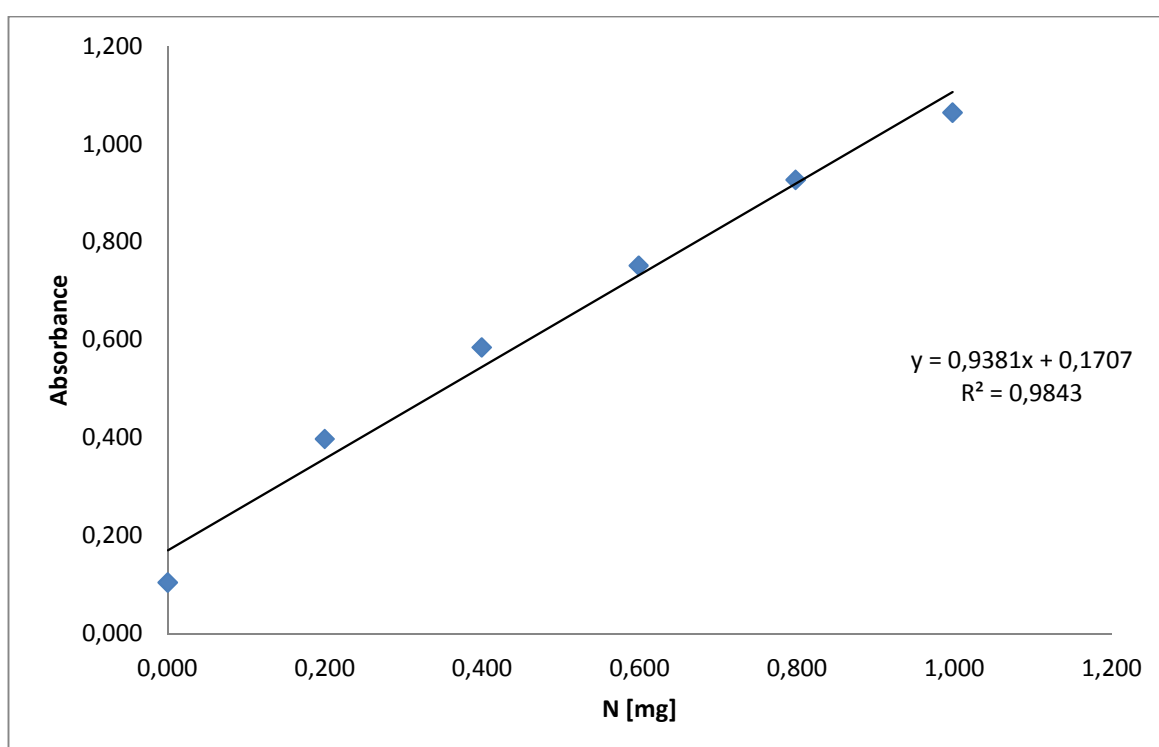
BCA metoda je mnohem citlivější a přesnější než Biuretova metoda. Dalšími výhodami jsou: barva vzniklého komplexu je stabilní, menší citlivost k pracím prostředkům, je použitelná pro široké spektrum bílkovin.

K 100  $\mu\text{l}$  analyzovaného kapalného vzorku se přidá 2000  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku (směs bicinchoninové kyseliny a 4%-ního síranu měďnatého). Po důkladném promíchání se zkumavky vloží do vodní lázně a inkubují se při 60°C po dobu 30 minut. Po ochlazení vzorků, se obsah zkumavky přelije do kyvety a měří se absorbance zbarveného roztoku vzorku na fotometru při vlnové délce 562 nm [63].

Závislost absorbance na hmotnosti koncentraci v pipetovaném objemu vzorku byla vyhodnocena lineární regresní analýzou, jejímž výsledkem je následující rovnice:

$$y = 0,9381x + 0,1707$$

$$R^2 = 0,9843$$



*Obr. 5.2: Kalibrační křivka obsahu dusíku ve vodném roztoku hydrolyzátu*

## 5.4 Stanovení obsahu popele

Popel byl stanoven gravimetricky po spalování při 650°C. Každé stanovení bylo provedeno nejméně čtyřikrát [67].

## 5.5 Gelová permeační chromatografie

Molární hmotnost a distribuce molárních hmotností byly stanoveny metodou gelové permeační chromatografie (GPC). Separací princip této metody je založen na hydrodynamickém objemu molekul. Vzorky jsou aplikovány do gelové kolony, která je naplněna např. polyakrylamidem, dextransy nebo polysacharidy a částice jsou separovány na schopnosti proniknout do pórů gelu, zatímco jsou vymývány mobilní fází [58].

K naměření dat byl použit přístroj PLGPC-50 (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*) vybavený refraktometrickým a viskozitním detektorem.



**Obr. 5.3:** Gelový permeační chromatograf, výrobce *Polymer Laboratories*

Byly použity kolony TSK GMPWXL (*Tosoh Bioscience, Stuttgart, Německo*) a Ultrahydrogel 250 (*Waters, Milfort MA*) spojené do série a měření bylo provedeno při 30 °C. Průtok mobilní fáze byl nastaven 0,8 ml/min a celková doba analýzy byla 30 minut. Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok 0,1M- $\text{NaNO}_3$ , 0,2 %  $\text{NaN}_3$  a 15% acetonitrilu. Kolona byla kalibrována pomocí polysacharidových pullulanových standardů (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*) s molárními hmotnostmi v rozsahu 667 - 788 000 g/mol.

Vzorky hydrolyzátů v pevné fázi byly zváženy a rozpuštěny za pokojové teploty v mobilní fázi, přičemž rozsah koncentrací byl 2,2 – 4,8 mg/ml. Aby byla zajištěna naprostá čistota, byly vzorky přefiltrovány přes filtr Chromafil PET – 45/15 MS o velikosti pórů 45  $\mu\text{m}$  (výrobce Marchrey –Nagel GmbH &

Co. KG). V případě vzorků, které byly již ve formě roztoku, stačilo pouze přefiltrovat přes filtr Chromafil a podrobit analýze.

Objem nástřikové smyčky byl vždy 100 µl a všechna měření byla provedena dvakrát z důvodu potvrzení reprodukovatelnosti. Naměřená data byla zpracována pomocí programu Cirrus GPC Multi Detector Software (výrobce Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie). Všechny středy molárních hmotností byly určeny pomocí univerzální kalibrace.

Jednotlivé zkratky lze vyjádřit rovnicemi:

- $M_n$  - číselný průměr molární hmotnosti

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_1^{\infty} M_i \cdot N_i}{\sum_1^{\infty} N_i} = \frac{w}{\sum_1^{\infty} N_i}$$

- $M_w$  - hmotnostní průměr molárních hmotností

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_1^{\infty} N_i \cdot M_i^2}{\sum_1^{\infty} N_i \cdot M_i} = \sum_1^{\infty} w_i \cdot M_i$$

kde

$M_i$ .....molární hmotnost i-tého řetězce

$N_i$  .....počet molů tohoto řetězce

- PD – stupeň polydisperzity

$$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} = PD$$

## 5.6 Iontově výměnná chromatografie

Pomocí iontově-výměnné chromatografie byla provedena detekce a kvantifikace vzorků. Ionexová chromatografie je technika, při níž se složky vzorku reverzibilně adsorbují na opačně nabitě skupiny imobilizované na částicích nosiče. K postupné desorpci jednotlivých složek, a tím jejich vzájemnému oddělení, dochází skokovou nebo průběžnou změnou podmínek, většinou pH, iontové síly a teploty.

Analyzátory aminokyselin používají pro náplň svých kolon silně kyselý katex, tvořený porézními a do jisté míry stlačitelnými kuličkami síťovaného a dodatečně sulfonovaného polystyrenu. Právě interakce mezi záporně nabitými sulfoskupinami a kladně nabitými aminoskupinami aminokyselin je zásadním prvkem při jejich dělení na koloně.

Množství 100  $\mu$ l hydrolyzátu v dávkovacím pufru bylo nastříknuto do analyzátoru aminokyselin AAA400 opatřeného kolonou (370 $\times$ 3,7mm, naplněná ionexem Ostion LG ANG-Ignos, Praha). Vzorky byly podrobeny post-kolonové derivatizaci s ninhydrinem a vyhodnoceny spektrofotometrickým detektorem (440 nm pro prolin a 570 nm pro ostatní aminokyseliny). Aminokyseliny z kolony vycházely podle programu: 0-5min. pufr A; 5-32 min. pufr B; 32-44 min. pufr C; 44-73 min. pufr D. Teplota kolony byla nastavena na 60  $^{\circ}$ C po dobu 0-60 min. a 90-102min. na 74  $^{\circ}$ C v době 60-90 min.

Závislost obsahu uvolněných aminokyselin (B) na době hydrolýzy (t) v kvasničné biomase lze vyjádřit následující rovnicí:

$$B(t) = \frac{A_0 h}{h-l} (e^{-lt} - e^{-ht}) + \varepsilon$$

kde:

- B(t)..... značí obsah uvolněných aminokyselin (g/kg) v čase t (h);  
A<sub>0</sub>..... je původní hodnota aminokyselin v proteinu před hydrolýzou (g/kg), v čase t=0;  
h..... je míra uvolňování vázané aminokyseliny do volné, stanovitelné formy  
l ..... je míra degradace aminokyseliny  
 $\varepsilon$ ..... je nahodilá zbytková chyba způsobená různými faktory při měření



Regresní analýza byla provedena pro modelaci hydrolyzační křivky pro HCl. Parametry  $A_0$ ,  $h$  a  $l$  pro konkrétní protein byly odvozeny použitím nelineární regrese za podmínek, že  $A_0 > 0$ ,  $h > 0$  a  $l \geq 0$  z hodnot naměřených pro různé hydrolyzační časy. Byla použita Marquardt-Levenburg metoda aplikovaná ve statistickém softwaru Unistat 5.5. Hodnoty obsahu sledovaných aminokyselin pro hydrolyzační časy 21, 48 a 144 hodin byly vypočítány na základě odhadnutých parametrů ( $A_0$ ,  $h$  a  $l$ ) a srovnány se skutečně naměřenými hodnotami [59].

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ MĚŘENÍ

### 6.1 Hydrolýza pivovarské biomasy I.(„předpokusy“)

Před samotným začátkem hydrolyzačních pokusů hledajících optimální hydrolyzační dobu a vhodnou koncentraci kyseliny, byly zkoušeny různé poměry biomasy a hydrolyzačního činidla, a to 1:100, 1:50, 1:35, 1:25, 1:15, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1. Hydrolýza probíhala při 120 °C po dobu 5 hodin. Hodnocena byla vizuálně proveditelnost takovéto hydrolýzy, nebezpečí tvorby nápeků, možnost jednoduchého odstranění směsi z hydrolyzační tuby, relativní „tekutost“ vzorku po hydrolýze. Cílem těchto „předpokusů“ bylo vybrat nejvyšší akceptovatelný poměr biomasy a hydrolyzačního činidla, se kterým byly následně prováděny všechny další experimenty.

Výsledky ukázaly, že poměr biomasy a hydrolyzačního činidla 1:5 je nejvyšším akceptovatelným poměrem. Vyšší testované poměry (1:2 a 1:1) již po hydrolýze neposkytovaly směsi, které by byly přijatelně tekuté a odstranitelné z testovací tuby; u těchto poměrů rovněž došlo k tvorbě nápeků.

Následovaly experimenty s různými koncentracemi hydrolyzačního činidla (kyselina mléčná) a různou dobou hydrolýzy. Vzorky suché biomasy pivovarských kvasnic byly podrobeny sérii hydrolýz. K vlastní hydrolýze (120±1°C) byla využita kyselina mléčná v různých koncentracích (10 %, 5 %, 2,5 % v/v) působící po různé časy (2, 4, 6, 8, 24 a 48 h). Hydrolýza probíhala v 20ml testovacích skleněných uzavíratelných tubách po vytěsnění kyslíku argonem v termobloku s nastavitelnou teplotou. Vzniklý hydrolyzát byl ochlazen a neutralizován oxidem hořečnatým. Celé postupy byly u každého typu hydrolyzátu zopakovány nejméně třikrát. Směs byla centrifugována za laboratorní teploty při 5000×g 1h. Supernatant byl lyofilizován a lyofilizované vzorky byly následně podrobeny analýzám – gelové permeační chromatografii, analýze dusíkatých látek a analýze obsahu popelovin.

V tabulkách 2 – 4 jsou uvedeny obsahy dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných hydrolyzátech pivovarské biomasy (po hydrolýze 10%, 5% a 2,5% kyselinou mléčnou; lyofilizován byl supernatant po odstředění).

**Tab. 2:** Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 10% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka)

<b>Doba hydrolýzy (h)</b>	<b>Obsah dusíkatých látek (hm%)</b>	<b>Obsah popelovin (hm%)</b>
2	16,04 ± 0,96	15,93 ± 0,69
4	17,74 ± 0,23	15,32 ± 0,27
6	19,33 ± 0,66	15,79 ± 0,73
8	20,92 ± 0,78	15,14 ± 0,48
24	21,04 ± 0,41	15,34 ± 0,41
48	21,17 ± 0,46	15,81 ± 0,53

**Tab. 3:** Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 5% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka)

<b>Doba hydrolýzy (h)</b>	<b>Obsah dusíkatých látek (hm%)</b>	<b>Obsah popelovin (hm%)</b>
2	23,31 ± 0,35	14,76 ± 0,84
4	25,74 ± 0,47	14,09 ± 0,79
6	24,28 ± 0,90	12,92 ± 0,75
8	24,09 ± 0,43	12,38 ± 0,42
24	24,48 ± 0,81	12,36 ± 0,71
48	24,61 ± 0,86	13,32 ± 0,95

**Tab. 4:** Obsah dusíkatých látek a popelovin v lyofilizovaných vzorcích supernatantu po hydrolýze 2,5% kyselinou mléčnou (po uvedené době) a centrifugaci (vyjádřeno jako průměr ± směrodatná odchylka)

<b>Doba hydrolýzy (h)</b>	<b>Obsah dusíkatých látek (hm%)</b>	<b>Obsah popelovin (hm%)</b>
2	27,52 ± 0,23	13,67 ± 0,43
4	28,72 ± 0,51	12,50 ± 0,67
6	29,49 ± 0,54	12,42 ± 0,41
8	30,15 ± 0,29	11,44 ± 0,48
24	30,27 ± 0,27	10,76 ± 0,39
48	30,19 ± 0,35	11,45 ± 0,57

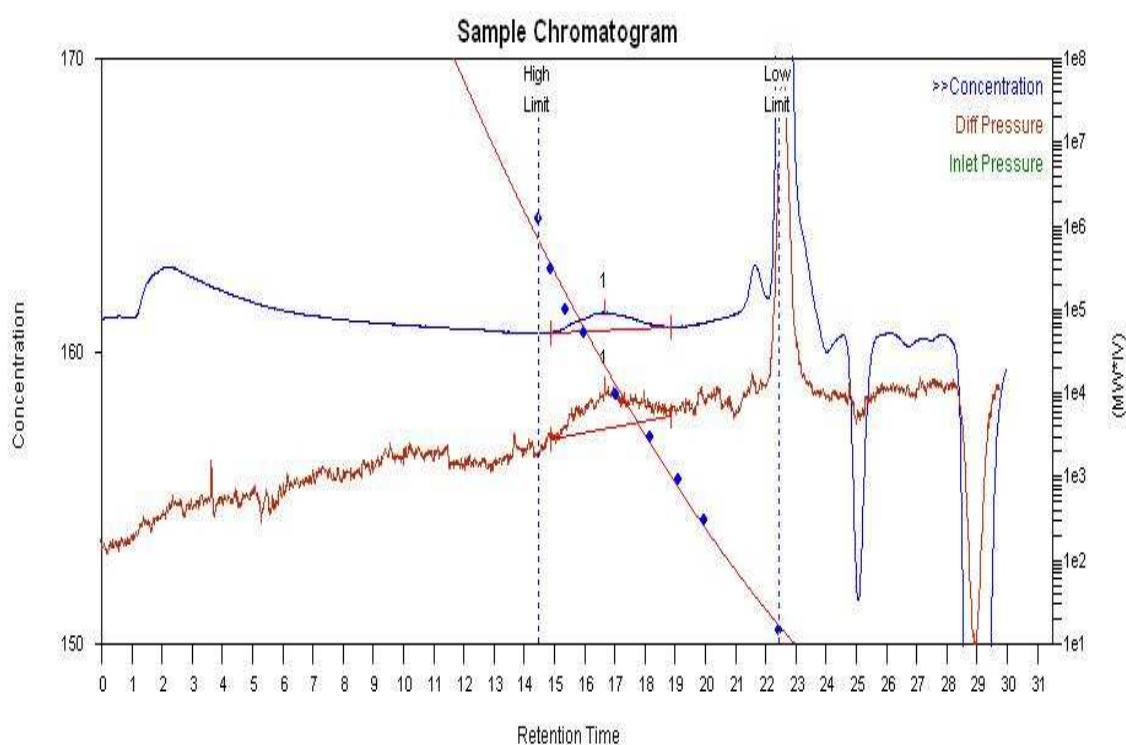
V tabulce 5 jsou uvedeny vzorky hydrolyzátů v pevné fázi, dále zjištěné parametry číselných a hmotnostních středů molárních hmotností, stupeň polydisperzity. Na obrázcích 6.1, 6.2, a 6.3 jsou vyobrazena grafická znázornění signálů viskozitního a koncentračního detektoru spolu s kalibračními křivkami.

**Tab. 5:** Vzorky hydrolyzátů v pevné fázi

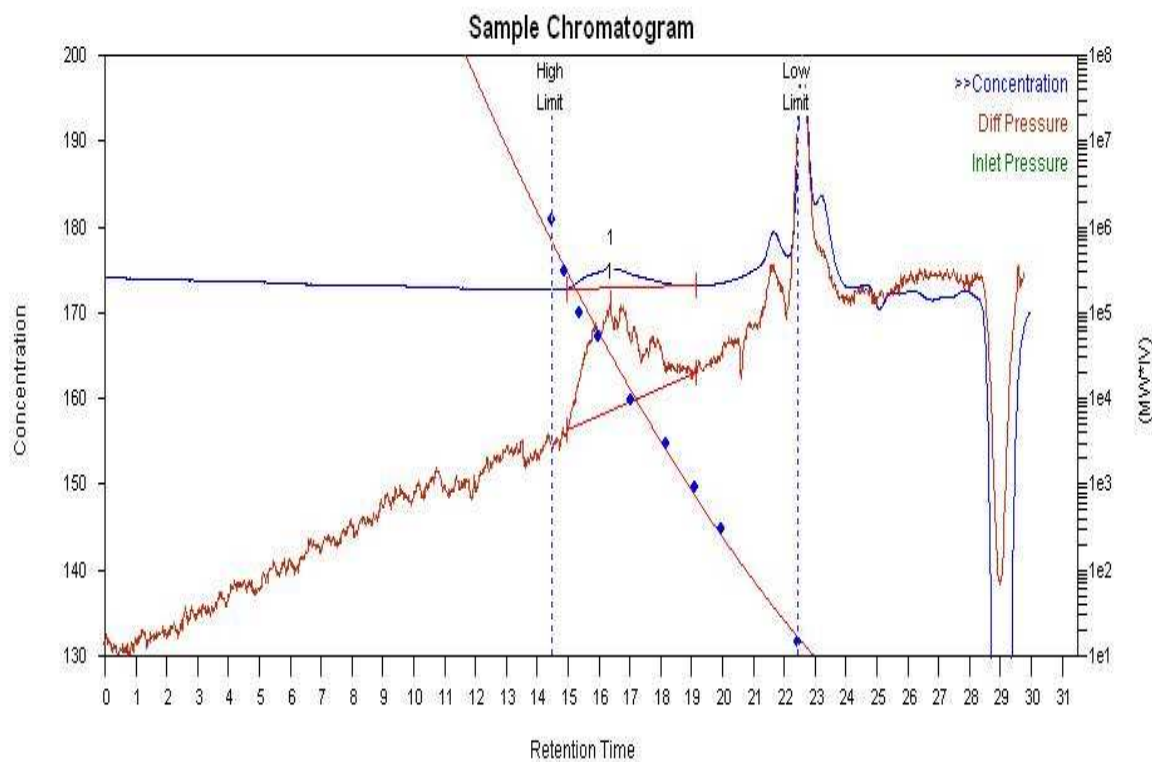
<b>Vzorek</b>	<b>M<sub>n</sub> [kg/mol]</b>	<b>M<sub>w</sub> [kg/mol]</b>	<b>PD</b>
BIO I.	750	2570	3,4
BIO II.	625	990	1,6
BIO III.	415	500	1,2
BIO V.	-	-	- *
BIO VI.	-	-	- *
BIO VII.	-	-	- *

BIO P.H.III.	245	905	3,7
BIO P.H.O	405	1130	2,8
BIO U.B. 3	345	1050	3,0

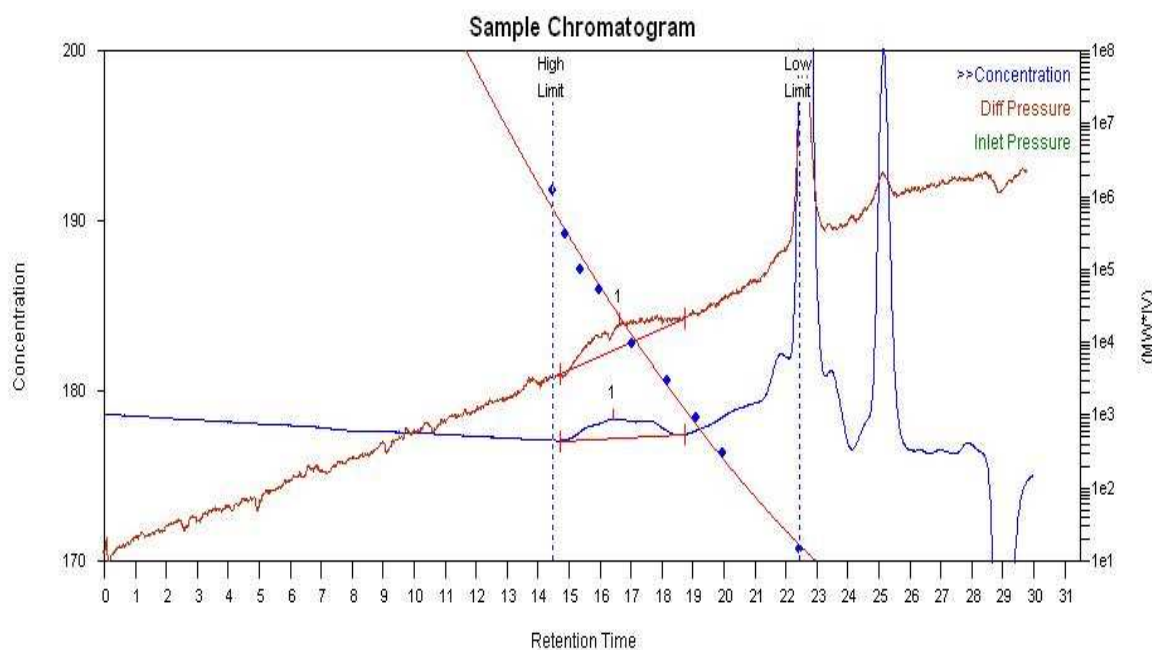
\* pík odpovídající proteinům se nepodařilo odseparovat od nízkomolekulárního píku



**Obr. 6.1:** Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO I. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.



**Obr 6.2:** Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO. P.H. III. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.



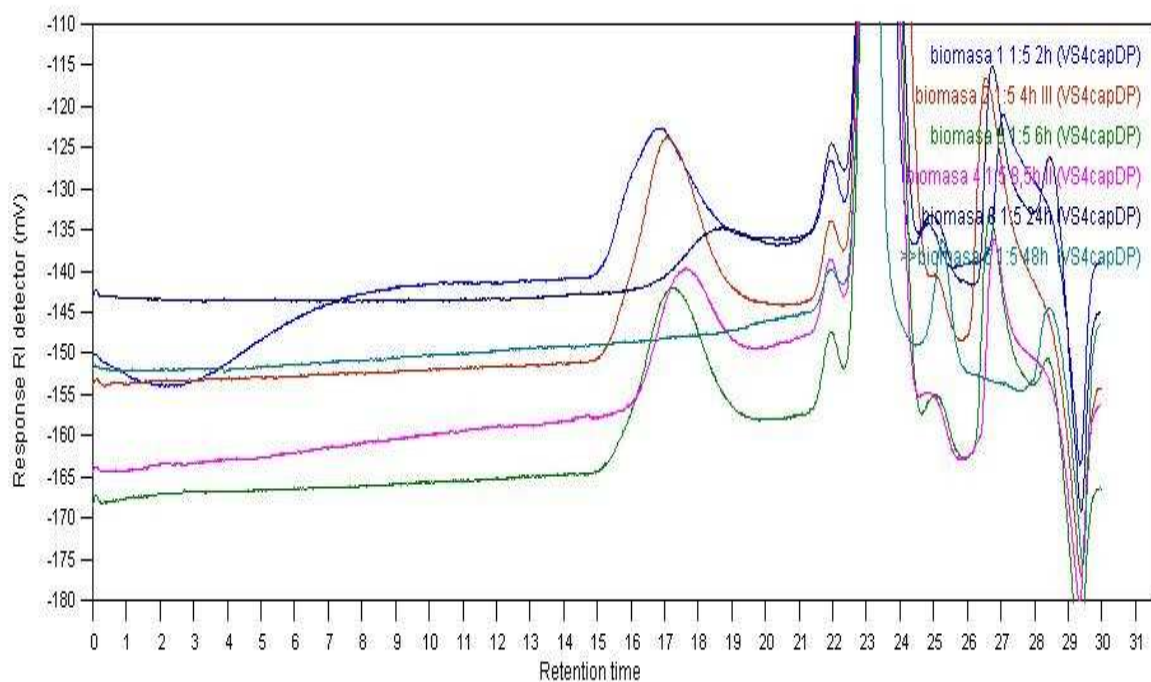
**Obr 6.3:** Signál viskozitního a koncentračního detektoru s označenými píky odpovídající proteinům pro vzorek BIO U. B. 3. Zároveň je uvedena kalibrační křivka.

V tabulkách 6-12 jsou uvedeny vzorky analyzované v roztoku, dále zjištěné parametry číselných a hmotnostních středů molárních hmotností, stupeň polydisperzity. Analyzované vzorky obsahují kvasničnou biomasu a kyselinu mléčnou v různých poměrech a v různých koncentracích. Uvedené středy molárních hmotností není vhodné srovnávat s analogickými údaji pro vzorky hydrolyzátů dodaných v pevné fázi. Níže uvedené středy molárních hmotností získané pomocí univerzální kalibrace jsou orientační a jejich význam je relativní. K tabulkám jsou přiřazena grafická znázornění signálů viskozitního a refraktometrického detektoru obr. 6.4, 6.6, 6.8, 6.9, 6.10, 6.11. Na obrázcích 6.7 a 6.5 jsou znázorněny diferenciální a integrální distribuční křivky.

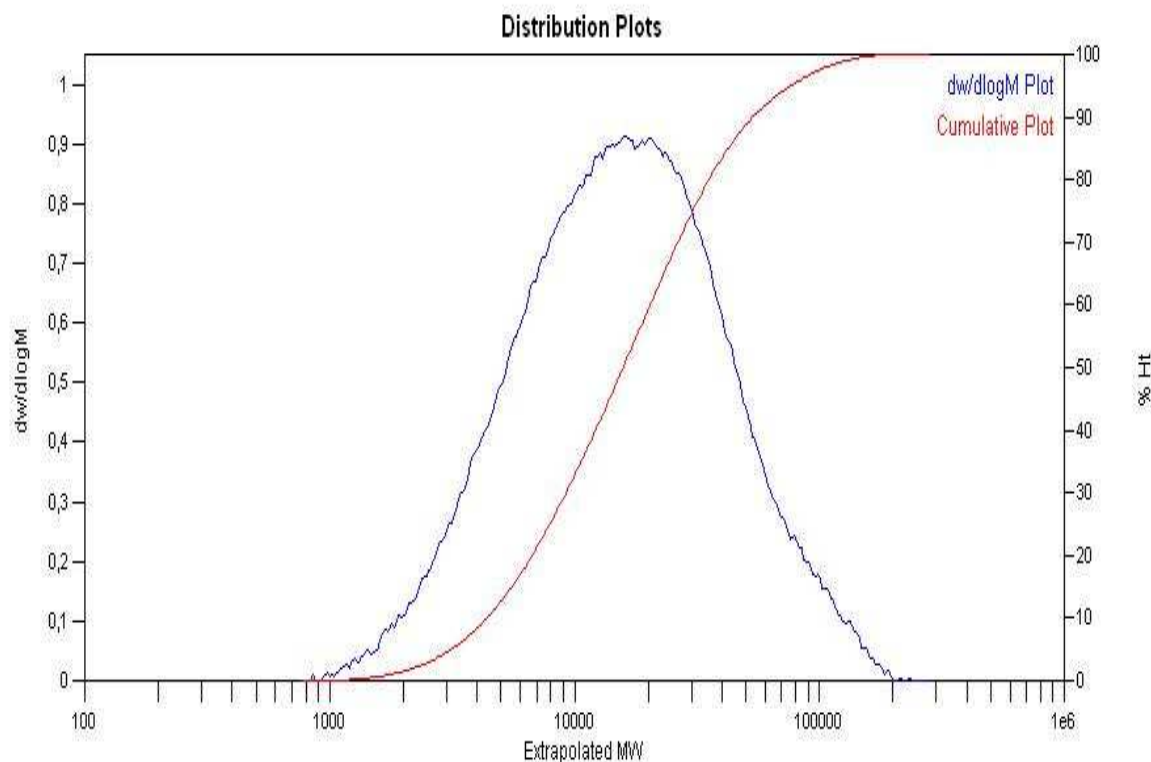
**Tab. 6:** Vzorky obsahující kvasničnou biomasu a kyselinu mléčnou v poměru 1:5 (doba hydrolyzy 2, 4, 6, 8.5, 12 a 24 hodin)

Vzorek	$M_n$ [kg/mol]	$M_w$ [kg/mol]	PD
1 (1:5) 2h	20	60	3
2 (1:5) 4h	10	24	2,4
3 (1:5) 6h	9	17	1,9
4 (1:5) 8.5h	9	17	1,1
5 (1:5) 24h	12	13	1,1
6 (1:5) 48h	-	-	- *

\* velikost píku pod možností detekce



**Obr. 6.4:** Signál viskozitního detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-19 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.

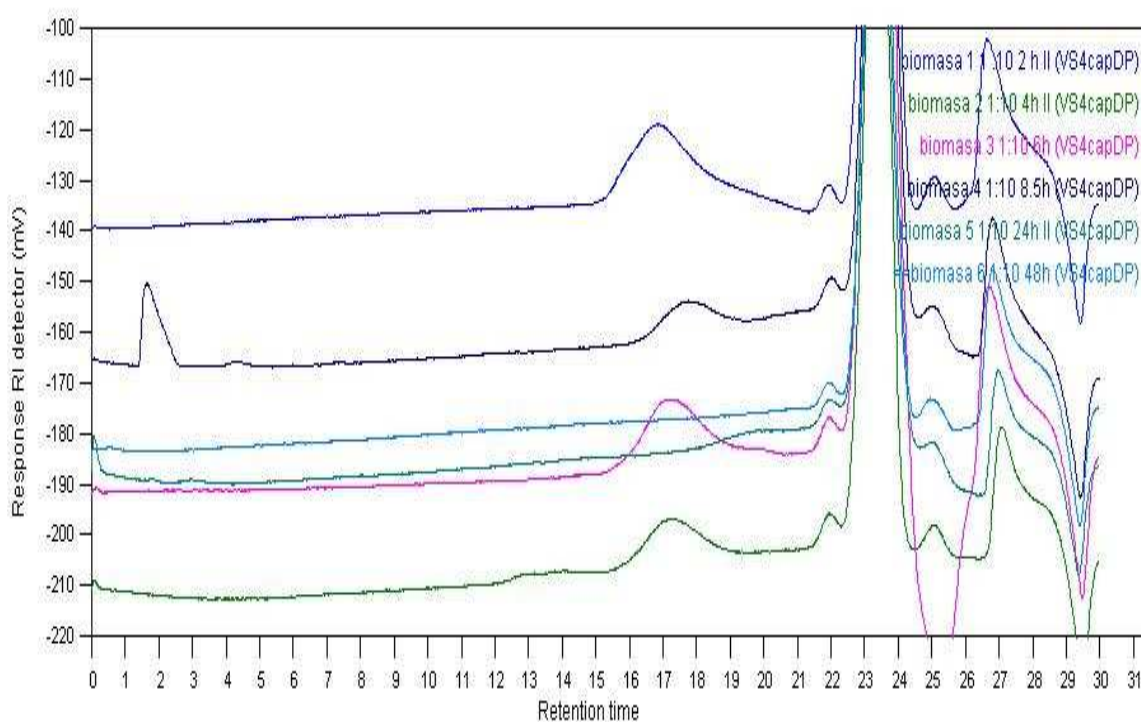


**Obr. 6.5:** Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 2 1:5 4h.

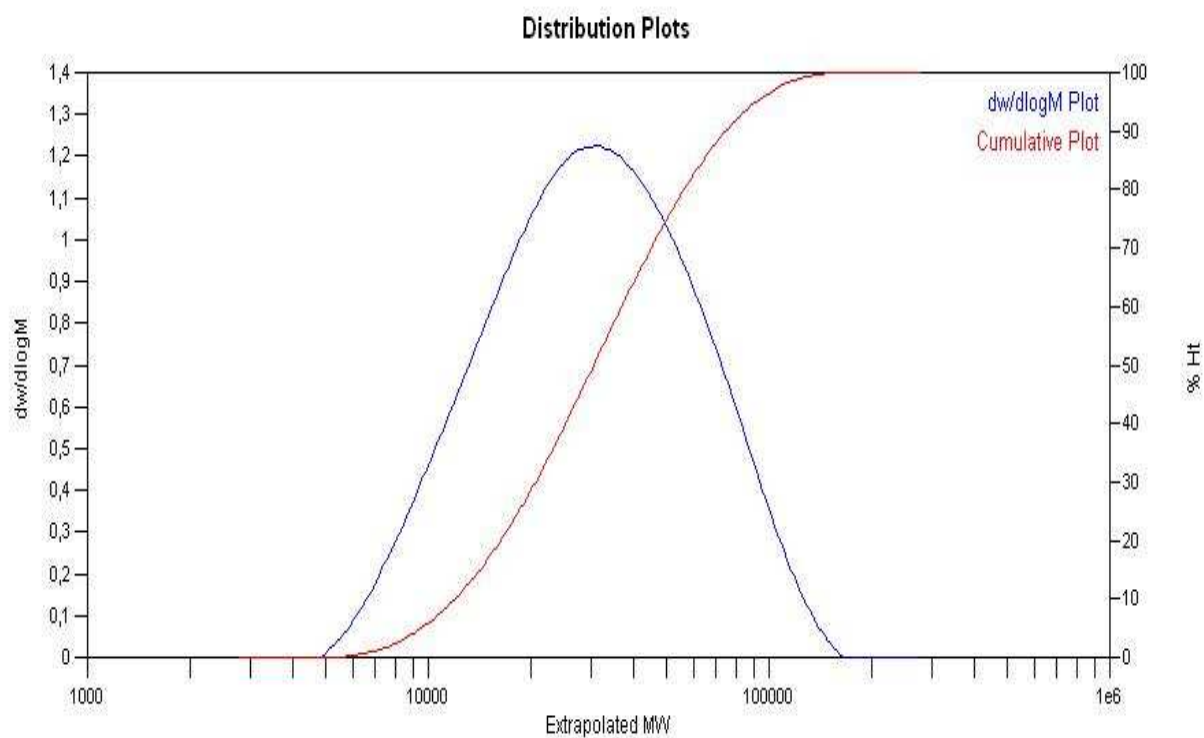


**Tab. 7:** Vzorky obsahující kvasniční biomasu a kyselinu mléčnou v poměru 1:10 (doba hydrolýzy opět 2, 4, 6, 8.5, 12 a 24 hodin)

Vzorek	$M_n$ [kg/mol]	$M_w$ [kg/mol]	PD
1 (1:10) 2h	26	99	3,8
2 (1:10) 4h	29	54	1,8
3 (1:10) 6h	14	32	2,2
4 (1:10) 8.5h	24	37	1,6
5 (1:10) 24h	12	14	1,1
6 (1:10) 48h	-	-	- *



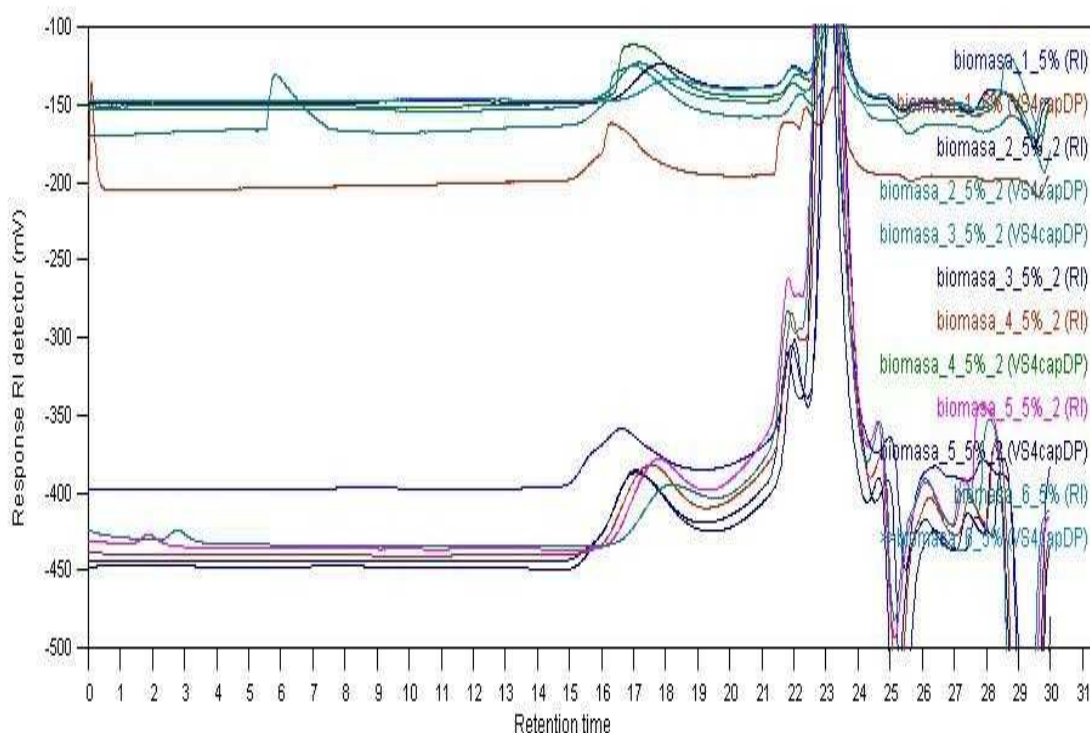
**Obr. 6.6:** Signál viskozitního detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolýzy dochází k posunům píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.



*Obr. 6.7: Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 4 1:10 8.5h.*

**Tab. 8:** Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 5% kyselinu mléčnou

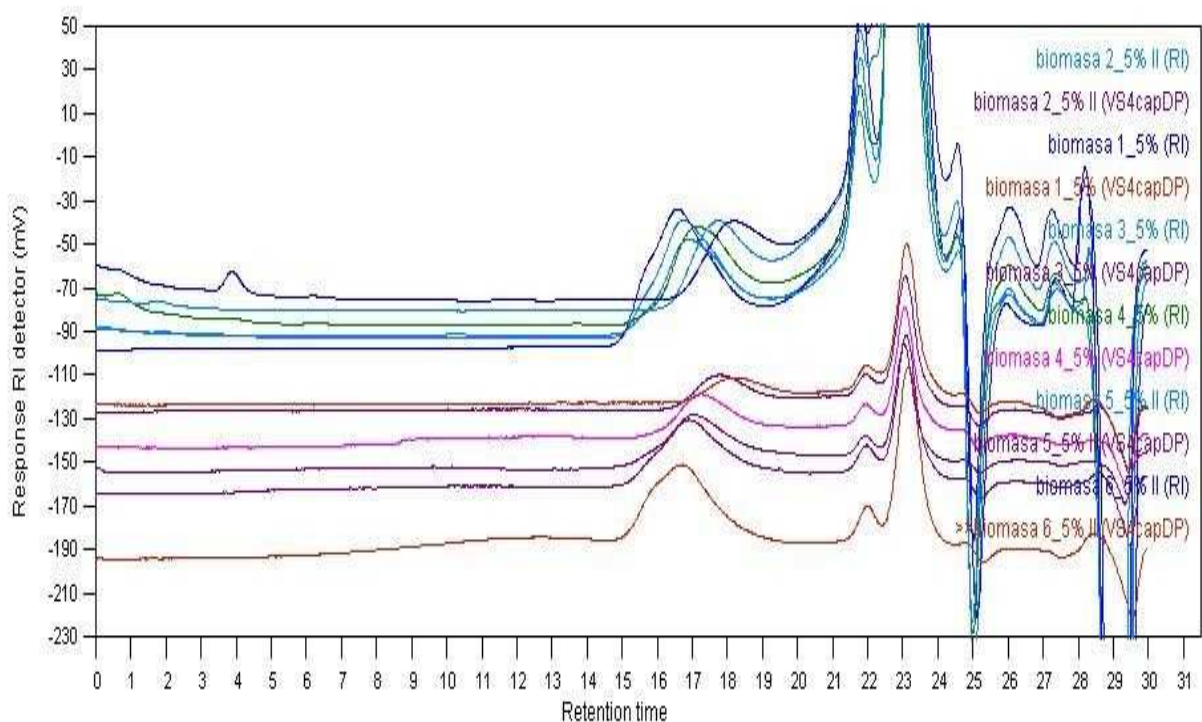
<b>Vzorek</b>	<b><math>M_n</math> [kg/mol]</b>	<b><math>M_w</math> [kg/mol]</b>	<b>PD</b>
biomasa_1_5%	16	46	2,8
biomasa_2_5%	7	20	2,8
biomasa_3_5%	10	21	2,2
biomasa_4_5%	10	18	1,8
biomasa_5_5%	8	14	1,8
biomasa_6_5%	7	12	1,8



**Obr. 6.8:** Signály viskozitního a refraktometrického detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-19 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.

**Tab. 9:** Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 2,5% kyselinu mléčnou

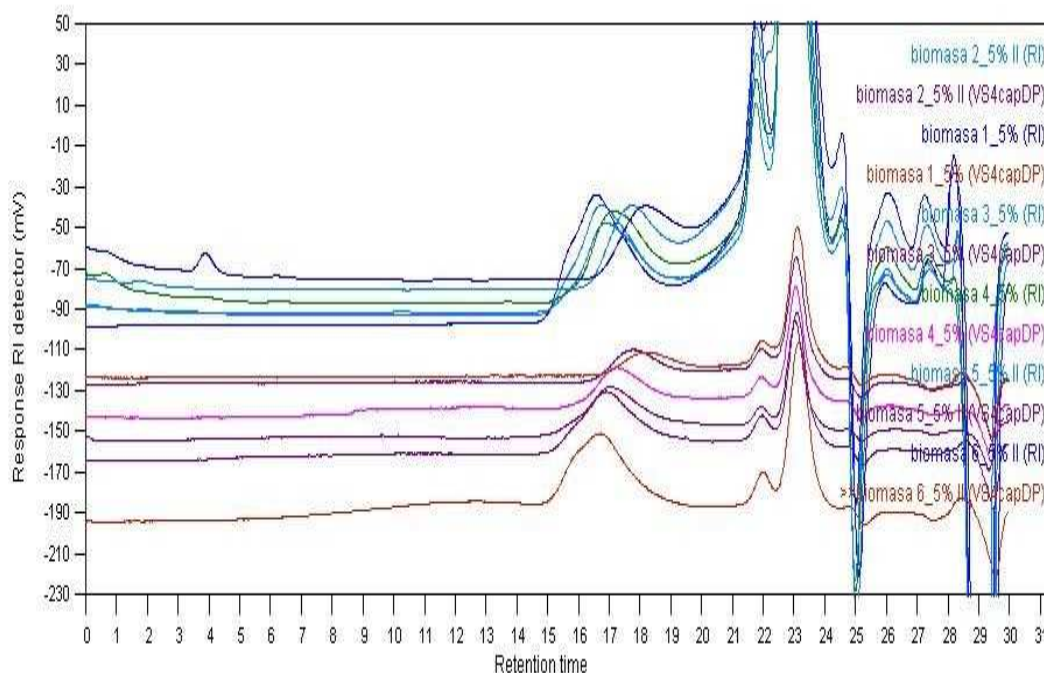
Vzorek	$M_n$ [kg/mol]	$M_w$ [kg/mol]	PD
biomasa_1_2,5%	16	43	2,8
biomasa_2_2,5%	11	33	3,1
biomasa_3_2,5%	11	26	2,2
biomasa_4_2,5%	10	19	1,9
biomasa_5_2,5%	10	17	1,6
biomasa_6_2,5%	9	14	1,6



**Obr. 6.9:** Signály viskozitního a refraktometrického detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti

**Tab. 10:** Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 5% kyselinu mléčnou

Vzorek	$M_n$ [kg/mol]	$M_w$ [kg/mol]	PD
biomasa_1_5%	12	34	2,9
biomasa_2_5%	10	31	3,1
biomasa_3_5%	10	22	2,2
biomasa_4_5%	11	22	1,9
biomasa_5_5%	12	18	1,6
biomasa_6_5%	8	12	1,6



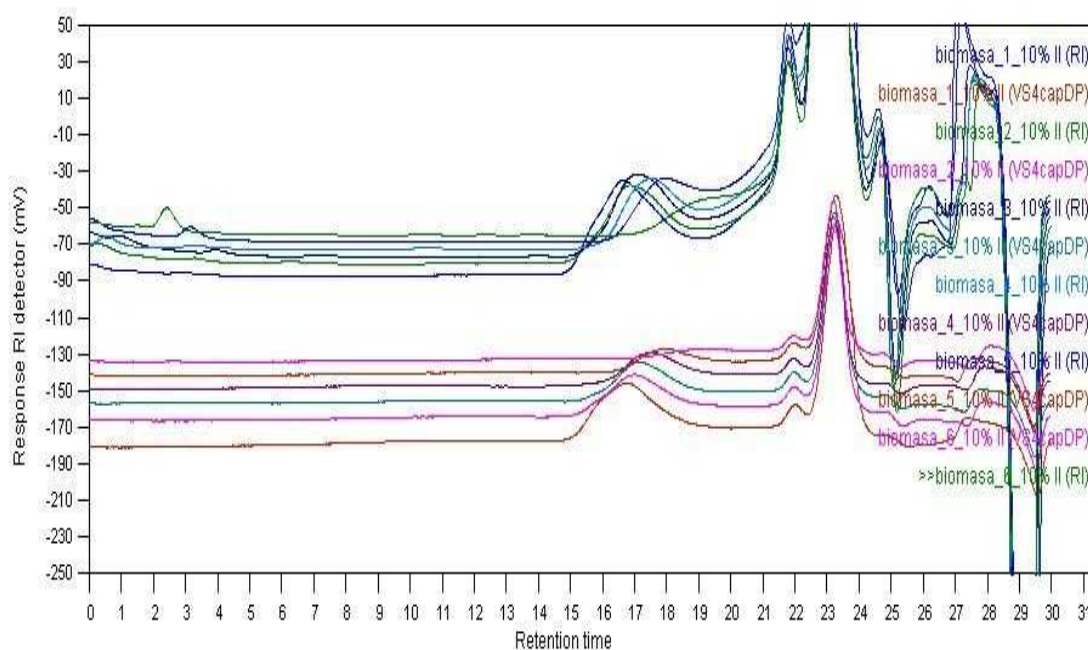
**Obr. 6.10:** Signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti

**Tab. 11:** Vzorky obsahující kvasniční biomasu a 10% kyselinu mléčnou

Vzorek	Mn [kg/mol]	Mw [kg/mol]	PD
biomasa_1_10%	19	34	2,9
biomasa_2_10%	20	31	3,1
biomasa_3_10%	17	22	2,2
biomasa_4_10%	11	22	1,9
biomasa_5_10%	11	18	1,6
biomasa_6_10%	12	12	1,6

**Tab. 12:** Vzorčky obsahující kvasniční biomasu a 10% kyselinu mléčnou

Vzorek	$M_n$ [kg/mol]	$M_w$ [kg/mol]	PD
biomasa_1_10%	19	46	2,4
biomasa_2_10%	20	42	2,1
biomasa_3_10%	17	31	1,9
biomasa_4_10%	11	22	2,0
biomasa_5_10%	11	20	1,9
biomasa_6_10%	12	15	1,2



**Obr. 6.11:** Signály viskozitního (DP) a refraktometrického (RI) detektoru: píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15-20 minut, s rostoucím časem hydrolýzy dochází k posunutím píků v vyššímu retenčnímu času, tedy k menší molární hmotnosti.

Z výsledků uvedených v tabulkách 2 – 4 vyplývá, že nejvhodnější testovanou koncentrací hydrolyzačního činidla v případě kyseliny mléčné je 2,5 % v/v, u které byly zjišťovány (v rámci testovaných podmínek) maximální výtěžky dusíkatých látek (až 30 % w/w) a minimální obsahy popelovin (méně jak 14 % w/w). Z hlediska hydrolyzačního času se jeví jako optimální (za daných podmínek) 6 – 8hodinnová hydrolýza. Další zvyšování neposkytuje signifikantní nárůst obsahu dusíkatých látek ve směsi po centrifugaci, a to ani zvýšíme-li dobu hydrolýzy čtyř- či osminásobně.

## 6.2 Hydrolýza pivovarské biomasy II. - Analýza aminokyselin

Následující hydrolýzy byly zaměřeny na stanovení obsahu aminokyselin v závislosti na době hydrolýzy. Kyselina mléčná v koncentracích 80%, 40%, 20% (w/w) byla použita jako hydrolyzační činidlo spolu s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou.

Z naměřených závislostí byly pomocí nelineární regrese sestrojeny hydrolyzační křivky, z kterých byly vypočítány příslušné korelační faktory.

K analýze byl použit vzorek vysušené kvasničné biomasy, který byl poskytnut pivovarem Zubr. Analýza probíhala identicky v 20ml testovacích skleněných tubách, kde bylo naváženo přesné množství vzorku a zalito 15 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol/l, dále kyselinou mléčnou v koncentracích 80%, 40% a 20%. Pro odstranění kyslíku ze skleněné vialky byl vzduch vytěsněn probubláváním argonem po dobu 1 minuty. Uzavřené a dobře protřepané tuby byly umístěny do termobloku, kde byly vystaveny teplotě 110°C po dobu 1, 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24, 48, 72, 96, 120 a 144 hodin. Pro kontrolu a přesnější měření byl tento postup pro jednotlivé vzorky opakován až devětkrát. Po skončení hydrolýzy byl vzorek v tubě ochlazen a kvantitativně převeden do odpařovací baňky. Po odpaření vzorku byl obsah rozředěn dávkovacím pufrem 2,2 do 25ml odměrných baněk. Směs byla přefiltrována přes mikrofiltr (0,45 $\mu$ m) a následně vložena v ampulkách do analyzátoru aminokyselin a podrobena analýze.

V tabulce 13 jsou znázorněny odhadnuté hodnoty regresních parametrů pro hydrolýzu HCl pro stanovené aminokyseliny v pivovarské biomase. K největšímu uvolňování aminokyselin docházelo mezi 10 a 20 hodinou hydrolýzy. Z tabulky 13 je patrné, že o uvolňování po 20 hodině hydrolýzy svědčí nízké hodnoty rychlosti uvolňování ( $h$ ) pro valin, leucin a izoleucin. Vyšší míra ztráty ( $l$ ) při kyselé hydrolýze byly zjištěny u nestabilních aminokyselin threonin, serin a tyrozin. Netypický průběh hydrolyzační křivky v porovnání s ostatními kyselinami vykazuje histidin.



**Tab. 13:** Hodnoty odhadnutých parametrů  $A_0$  (zjištěný obsah aminokyselin v biomase,  $h$  (rychlost uvolňování aminokyselin) a  $l$  (míra ztráty aminokyselin) získaných nelineární regresí.

<b>Aminokyseliny</b>	<b><math>A_0</math></b>	<b><math>h</math></b>	<b><math>l</math></b>
<b>Asparagová kyselina</b>	32,2605	1,1116	0,0008
<b>Threonin</b>	17,0823	0,6914	0,0030
<b>Serin</b>	17,7486	1,34141	0,0065
<b>Glutamová kyselina</b>	39,4021	1,3435	0,0005
<b>Prolin</b>	13,1671	0,9249	0,0001
<b>Glycin</b>	16,1650	1,0968	0,0001
<b>Alanin</b>	20,4272	1,7105	0,0001
<b>Valin</b>	19,9185	0,3620	0,0001
<b>Isoleucin</b>	15,5865	0,3081	0,0001
<b>Leucin</b>	15,5865	0,3081	0,0001
<b>Tyrosin</b>	12,3257	15,6873	0,0056
<b>Fenylalanin</b>	13,3738	0,8111	0,0001
<b>Histidin</b>	7,8903	85,0602	0,0011
<b>Lysin</b>	24,5250	0,6023	0,0002
<b>Arginin</b>	17,8825	0,6439	0,0009

V následující tabulce 13 jsou vypočítány korelační faktory pro jednotlivé AMK po hydrolýze HCl a 20%, 40%, 80% kyselinou mléčnou.

**Tab. 14:** Korelační faktory pro obsah aminokyselin (podíl hodnoty  $A_0$  z nelineární regrese a výtěžku chemické analýzy za 24h.)

Aminokyseliny	Korelační faktory			
	$r_{HCl}$	$r_{20\%kys.mléčná}$	$r_{40\%kys.mléčná}$	$r_{80\%kys.mléčná}$
<b>Asparagová kyselina</b>	0,9237	1,7445	2,0629	5,7230
<b>Threonin</b>	0,9631	18,9088	15,4439	23,6195
<b>Serin</b>	1,0420	12,0771	12,9490	42,5125
<b>Glutamová kyselina</b>	0,9031	27,8692	23,8369	37,9108
<b>Prolin</b>	0,9667	12,3150	10,0403	13,3163
<b>Glycin</b>	0,9009	6,5646	6,4023	5,7833
<b>Alanin</b>	0,8838	2,4606	3,6753	3,3154
<b>Valin</b>	0,9010	13,7423	13,7272	19,3520
<b>Isoleucin</b>	0,8574	13,1312	10,3857	9,3410
<b>Leucin</b>	0,8574	8,5911	9,2742	9,2973
<b>Tyrosin</b>	1,0257	3,6941	10,1801	11,4545
<b>Fenylalanin</b>	0,9223	1,3233	1,7082	2,4180
<b>Histidin</b>	0,9943	24,5884	2,9876	3,2106
<b>Lysin</b>	0,8825	16,4423	12,4347	15,9090
<b>Arginin</b>	1,0487	15,2438	16,0020	28,0521

Pro hydrolýzu pivovarské biomasy kyselinou chlorovodíkovou se korelační faktory pohybovaly kolem intervalu 1,00. Nejnižší faktory vykazovaly aminokyseliny leucin a isoleucin – 0,85. Naopak nejvyšší korelační faktory byly pozorovány u serinu a argininu – 1,04.

Pro hydrolýzu pivovarské biomasy kyselinou mléčnou v koncentracích 20%, 40% a 80% byly zjištěny poměrně vysoké hodnoty korelačních faktorů ve všech koncentracích. Ze tří použitých koncentrací kyseliny mléčné vykazovala nejvyšší účinnost uvolňování aminokyselin 20% kyselina mléčná, nicméně nedocházelo k dosažení srovnatelného výtěžku jako u hydrolýzy s použitím HCl. Vypočtené vysoké hodnoty korelačních faktorů nelze prakticky použít pro analytické účely.

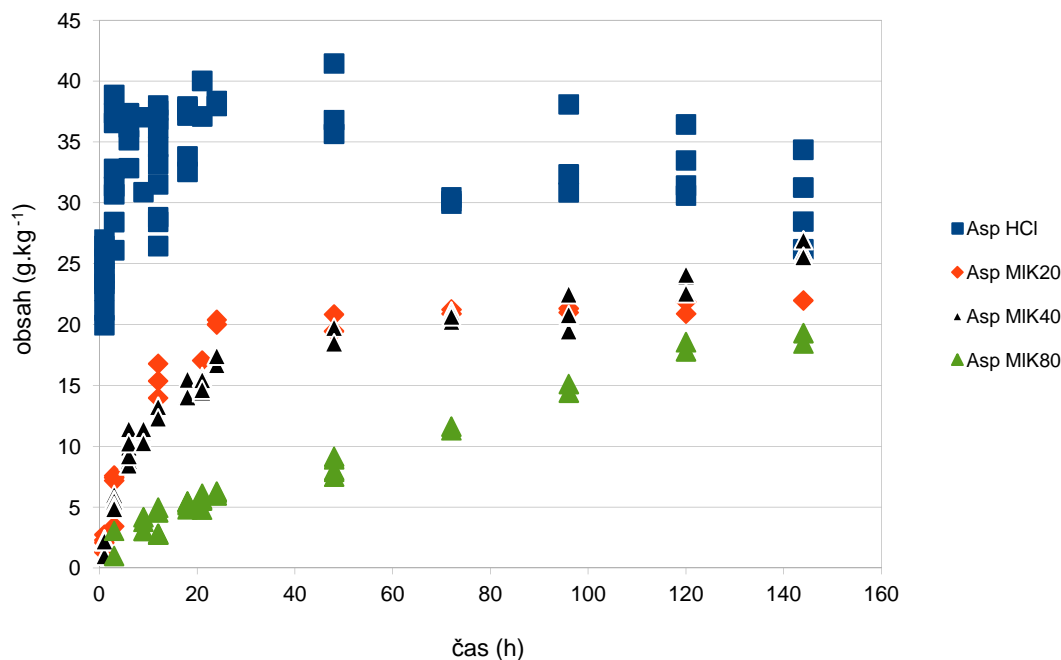
Kontrola správnosti regresního modelu pro HCl byla provedena srovnáním koncentrace aminokyselin z odhadnutých křivek s koncentrací chromatograficky stanovenou. Srovnáním hodnot obsahu aminokyselin vypočtených z odhadnutých hydrolyzačních křivek pro 21. hodinu s koncentrací chromatograficky stanovenou, byl u všech aminokyselin (kromě leucinu) zjištěna akceptovatelná odchylka 90-110% (vyjádřená jako poměr z hydrolyzační křivky odhadnuté a skutečně naměřené hodnoty obsahu aminokyseliny). Pro 48. hodinu nebylo dosaženo požadované přesnosti pro většinu aminokyselin. Pro 144. hodinu byla zjištěna srovnatelná odchylka jako pro 21. hodinu, kromě leucinu a tyrosinu.

V tabulce 14 je vyjádřen stanovený obsah aminokyselin a jejich odchylka od skutečné hodnoty.

**Tab. 15:** Obsah uvolněných aminokyselin vypočtený z regresního modelu pro 21., 48. a 144. hodinu hydrolyzy pomocí HCl a srovnání s hodnotami skutečně naměřenými\*

Aminokyseliny	Doba hydrolyzy a srovnání se skutečně naměřenými hodnotami					
	21h		48h		144h	
Asparagová kyselina	38,6 ± 1,46	90%*	38,0 ± 2,50	89,50%	30,1 ± 3,06	104,9%
Threonin	16,5 ± 1,54	97,3%	17,1 ± 1,26	87,00%	10,3 ± 1,08	108,9%
Serin	16,2 ± 1,86	97,3%	15,0 ± 1,14	87,00%	6,1 ± 0,66	115,0%
Glutamová kyselina	38,9 ± 3,33	100,3%	44,4 ± 3,01	86,80%	34,4 ± 3,37	107,2%
Prolin	13,4 ± 0,94	98,1%	13,4 ± 0,57	97,80%	12,8 ± 0,43	101,4%
Glycin	15,7 ± 1,02	102,7%	19,1 ± 1,35	84,20%	15,7 ± 1,43	101,5%
Alanin	21,0 ± 1,81	97,1%	22,5 ± 0,43	90,40%	18,7 ± 1,94	107,6%
Valin	19,3 ± 1,10	103,0%	22,1 ± 0,45	89,70%	18,8 ± 1,98	104,5%
Isoleucin	14,8 ± 0,92	105,0%	18,1 ± 0,12	85,70%	14,7 ± 1,76	104,5%
Leucin	23,1 ± 0,92	67,2%	25,4 ± 0,12	61,10%	21,0 ± 1,76	73,1%
Tyrosin	11,4 ± 1,41	96,1%	11,0 ± 0,90	85,60%	4,8 ± 1,01	115,0%
Fenylalanin	13,4 ± 0,72	99,6%	14,5 ± 0,40	91,80%	13,1 ± 1,25	100,6%
Histidin	7,4 ± 0,62	104,2%	8,3 ± 0,27	90,10%	6,5 ± 0,50	103,5%
Lysin	25,0 ± 2,00	97,8%	27,1 ± 0,56	89,70%	22,5 ± 2,30	106,2%
Arginin	18,9 ± 1,93	92,9%	19,4 ± 2,31	88,40%	14,7 ± 1,34	106,9%

Průběh závislosti obsahu jednotlivých aminokyselin na době hydrolyzy znázorňují obr. 6.12 - 6.26, pro hydrolyzační činidla HCl, 20%, 40% a 80% kyseliny mléčné.

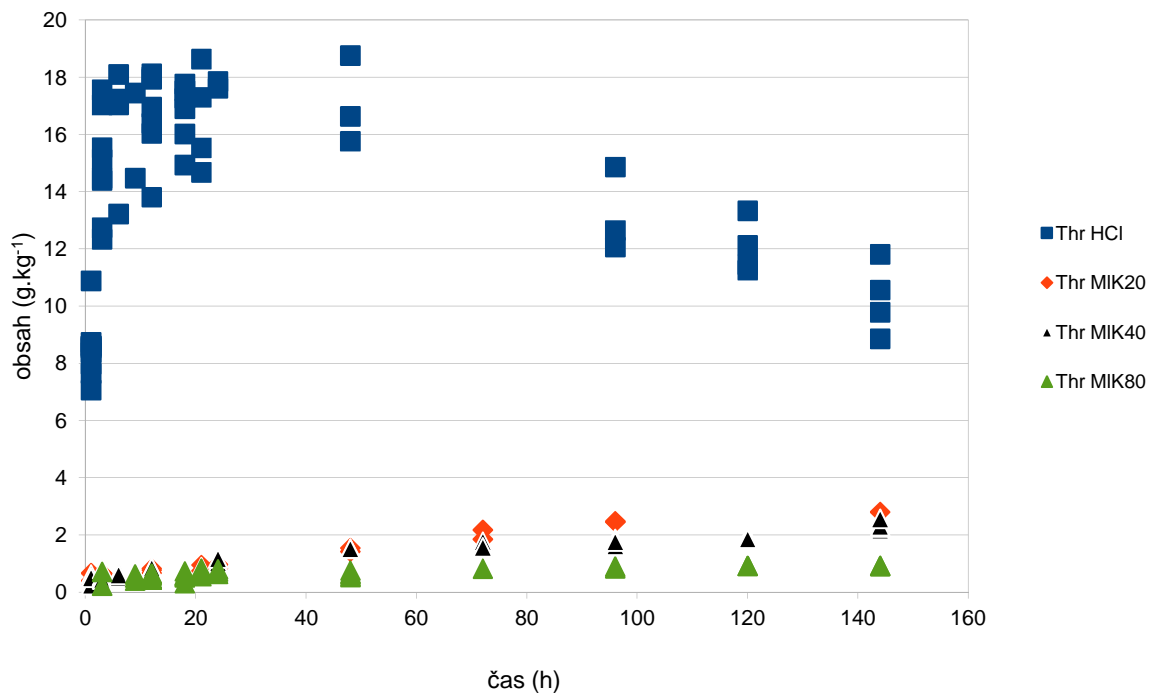


**Obr. 6.12:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro kyselinu asparagovou.

K největšímu uvolňování kyseliny asparagové pro všechny použité kyseliny docházelo v rozmezí 10 až 20 hodin. V případě kyseliny chlorovodíkové nastal klesající trend po 21 hodině, naopak u kyseliny mléčné pro všechny koncentrace došlo k rostoucímu trendu.

**Tab. 16:** Obsah kyseliny asparagové v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20%	40%	80%
		kyselina mléčná	kyselina mléčná	kyselina mléčná
21	100,00%	44,23%	39,10%	14,37%
48	100,00%	53,06%	50,36%	21,90%
144	100,00%	76,10%	86,81%	62,79%

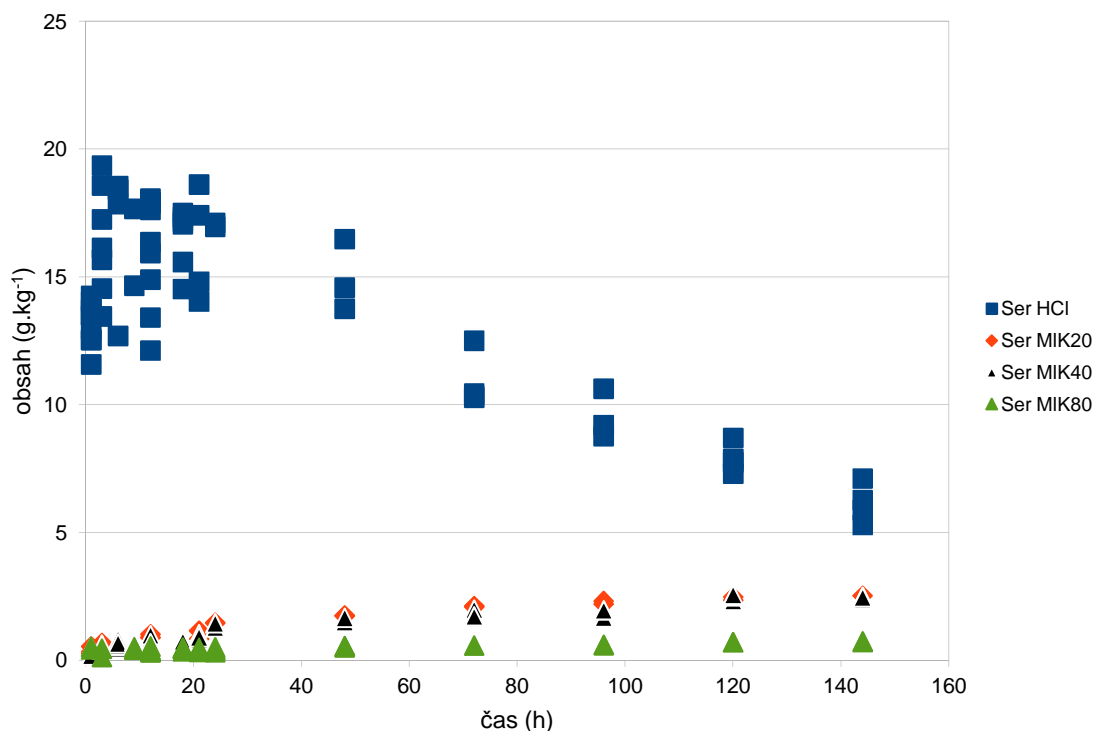


**Obr. 6.13:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro threonin.

Při hydrolyze HCl docházelo k největšímu uvolňování threoninu v intervalu 10 až 20 hodin, po 20. hodině hydrolyzy měla křivka značně klesající trend. Při aplikaci kyseliny mléčné docházelo k pozvolnému uvolňování threoninu, po 20. hodině hydrolyzy měla mírně rostoucí trend.

**Tab. 17:** Obsah threoninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	5,15%	4,99%	4,04%
48	100,00%	8,71%	8,95%	3,67%
144	100,00%	25,79%	22,67%	8,96%

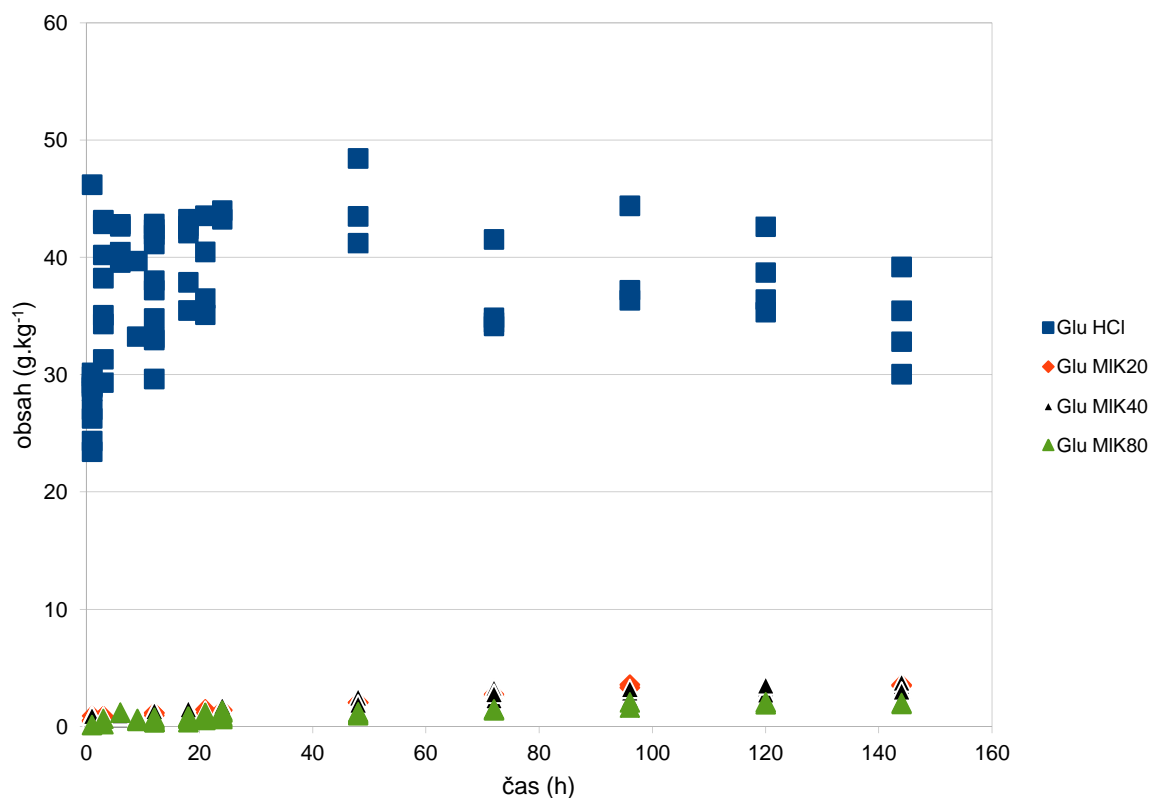


**Obr. 6.14:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolýzy) pro serin.

Z grafu 6.14 je patrný rozdíl mezi použitím HCl a kyseliny mléčné. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování serinu mezi 10 a 20 hodinou, poté má křivka výrazně klesající trend. Při použití různě koncentrované kys.mléčné doházelo k postupnému a pozvolnému uvolňování serinu.

**Tab. 18:** Obsah serinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy

Čas (h)	HCl	20%	40%	80%
		kyselina mléčná	kyselina mléčná	kyselina mléčná
21	100,00%	6,18%	5,71%	2,46%
48	100,00%	11,71%	10,63%	3,61%
144	100,00%	41,17%	39,90%	11,93%

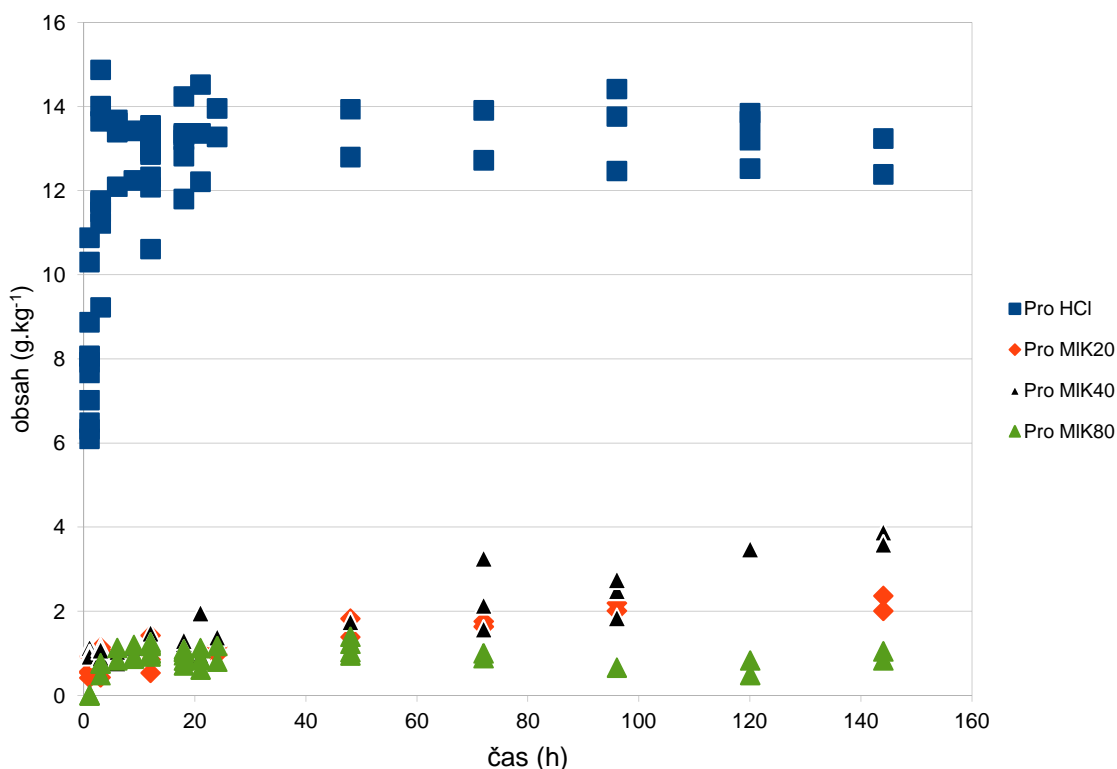


**Obr. 6.15:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro kyselinu glutamovou.

V tomto případě docházelo k největšímu uvolňování kyseliny glutamové mezi 10 a 20 hodinou v případě HCl, po 40 hodině hydrolyzy má křivka mírně klesající trend. Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování AMK.

**Tab. 19:** Obsah kyseliny glutamové v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	3,35%	3,33%	2,21%
48	100,00%	4,66%	4,97%	2,50%
144	100,00%	10,27%	10,00%	5,79%



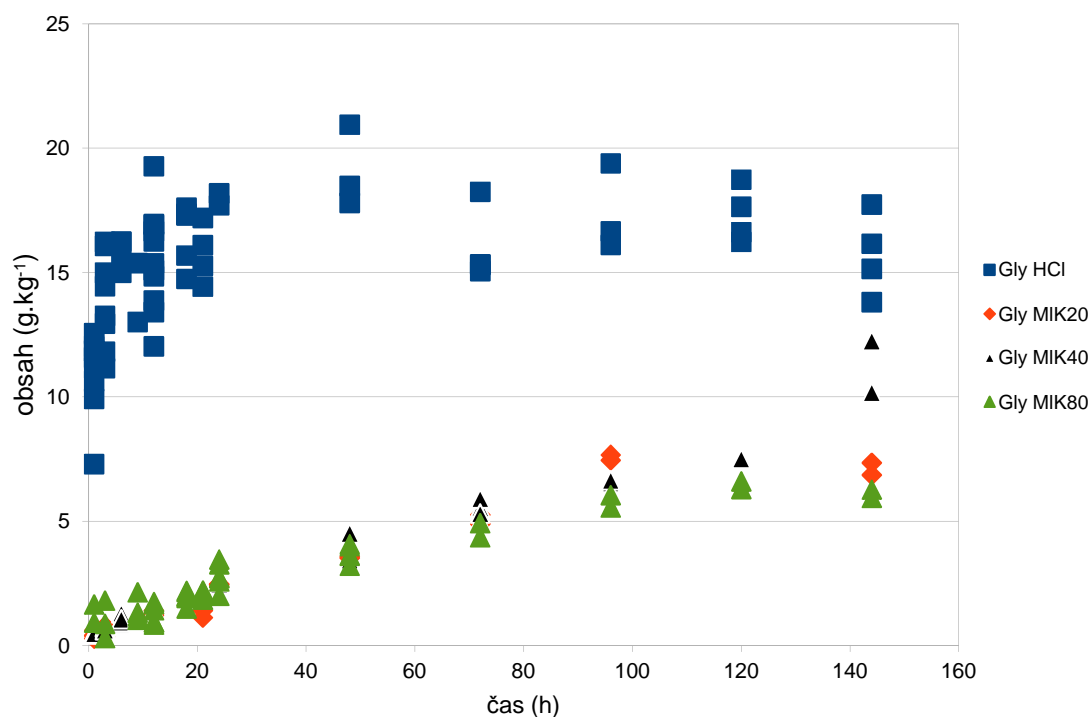
**Obr. 6.16:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro prolin.

Při hydrolyze HCl docházelo k největšímu uvolňování prolinu mezi 10 a 20 hodinou. Po tomto intervalu křivka získává velmi mírný průběh. Při hydrolyze všemi koncentracemi kyselinou mléčnou se hodnoty uvolněného prolinu pohybovaly pod 10% hodnoty získané hydrolyzou HCl.

**Tab. 20:** Obsah prolinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	6,86%	9,57%	6,41%
48	100,00%	12,03%	13,12%	8,61%
144	100,00%	17,06%	29,20%	7,34%



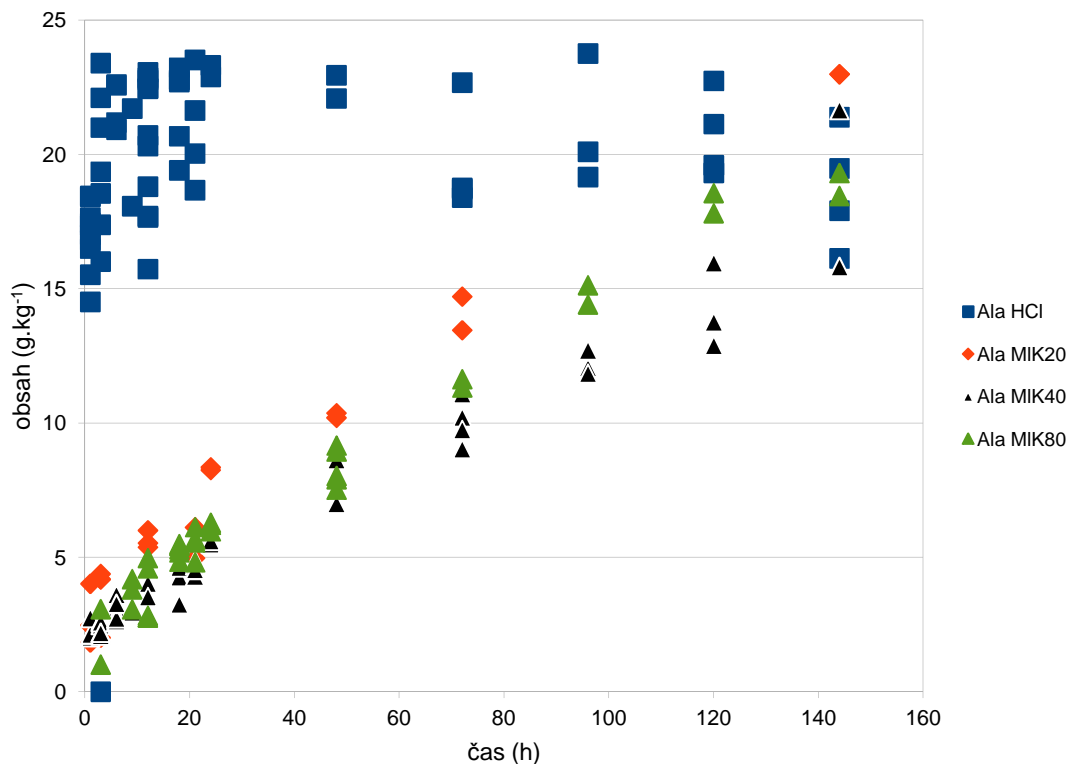


**Obr. 6.17:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro glycin.

K největšímu uvolňování glycinu pro HCl docházelo v intervalu 10 až 20 hodin. Od dosažení 48. hodiny byl zaznamenán mírně klesající trend u hydrolyzační křivky. Při aplikaci kyseliny mléčné pro všechny použité koncentrace bylo uvolňování glycinu od počátku hydrolyzy pozvolné.

**Tab. 21:** Obsah glycinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	8,07%	14,39%	13,17%
48	100,00%	18,60%	20,86%	19,45%
144	100,00%	45,22%	71,35%	38,88%

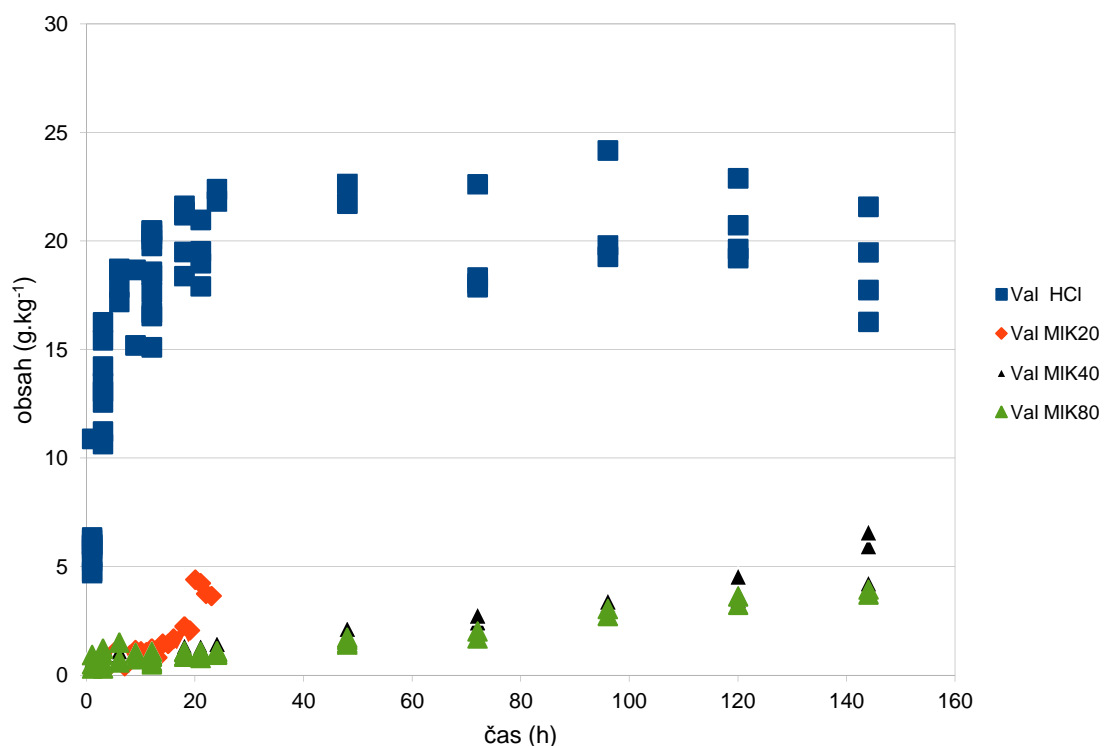


**Obr. 6.18:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro alanin.

V tomto případě docházelo k největšímu uvolňování alaninu v intervalu mezi 10 a 20 hodinou hydrolyzy pro HCl. Pro všechny koncentrace kyseliny mléčné byla rychlost uvolňování alaninu přímo úměrná době hydrolyzy a po celou dobu měla hydrolyzační křivka prudce rostoucí trend. Ve srovnání s ostatními AMK je z grafu patrný rozdíl v účinnosti použité kyseliny mléčné.

**Tab. 22:** Obsah alaninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20%	40%	80%
		kyselina mléčná	kyselina mléčná	kyselina mléčná
21	100,00%	26,45%	21,97%	26,44%
48	100,00%	45,68%	34,72%	36,93%
144	100,00%	122,76%	100,05%	100,84%

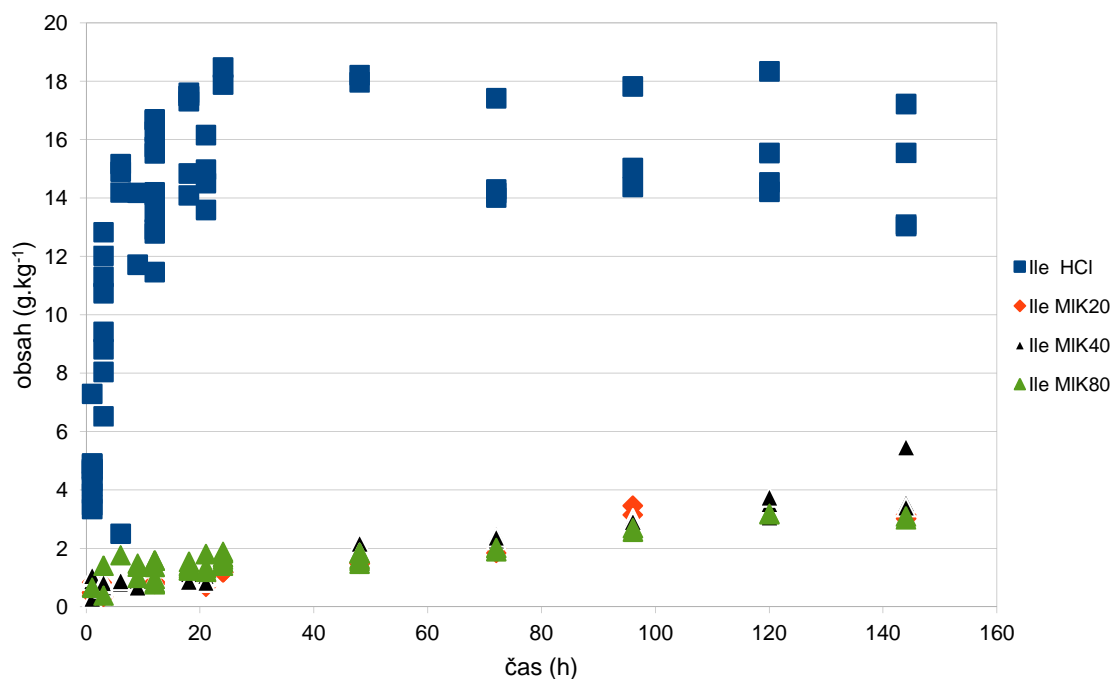


**Obr. 6.19:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro valin.

Při aplikaci kyseliny mléčné docházelo k pozvolnému uvolňování valinu. Po 20. hodině měla hydrolyzační křivka rostoucí trend. V případě HCl docházelo k největšímu uvolňování valinu po 20. hodině. Hydrolyzační křivka měla po dosažení 48. hodiny hydrolyzy stagnující, po 120. hodině mírně klesající charakter.

**Tab. 23:** Obsah valinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	5,30%	5,86%	5,12%
48	100,00%	7,40%	8,58%	7,08%
144	100,00%	19,73%	29,81%	20,44%

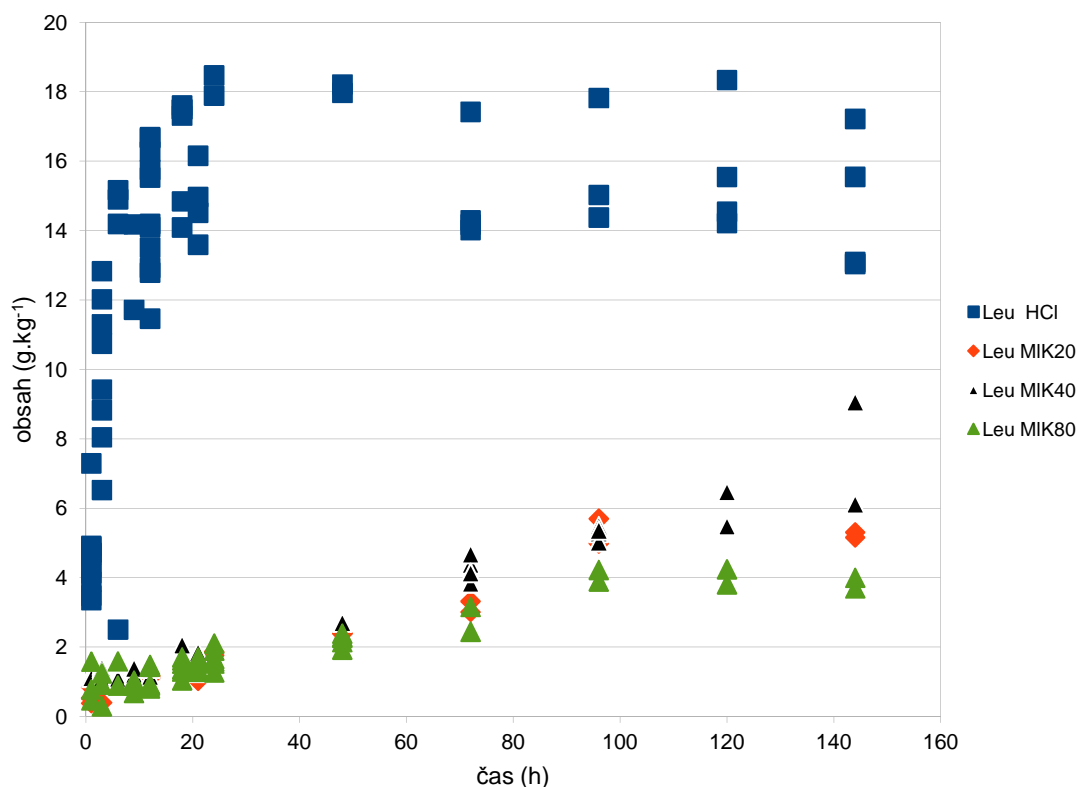


**Obr. 6.20:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro isoleucin.

Aplikace kyseliny mléčné přináší pozvolné uvolňování isoleucinu. Při použití HCl docházelo k největšímu uvolňování AMK kolem 20. hodiny hydrolyzy, po 40. hodině hydrolyzy měla křivka stagnující charakter a po 120. hodině mírně klesající charakter.

**Tab. 24:** Obsah isoleucinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	5,32%	7,07%	9,39%
48	100,00%	8,25%	11,15%	9,28%
144	100,00%	20,99%	28,20%	20,71%

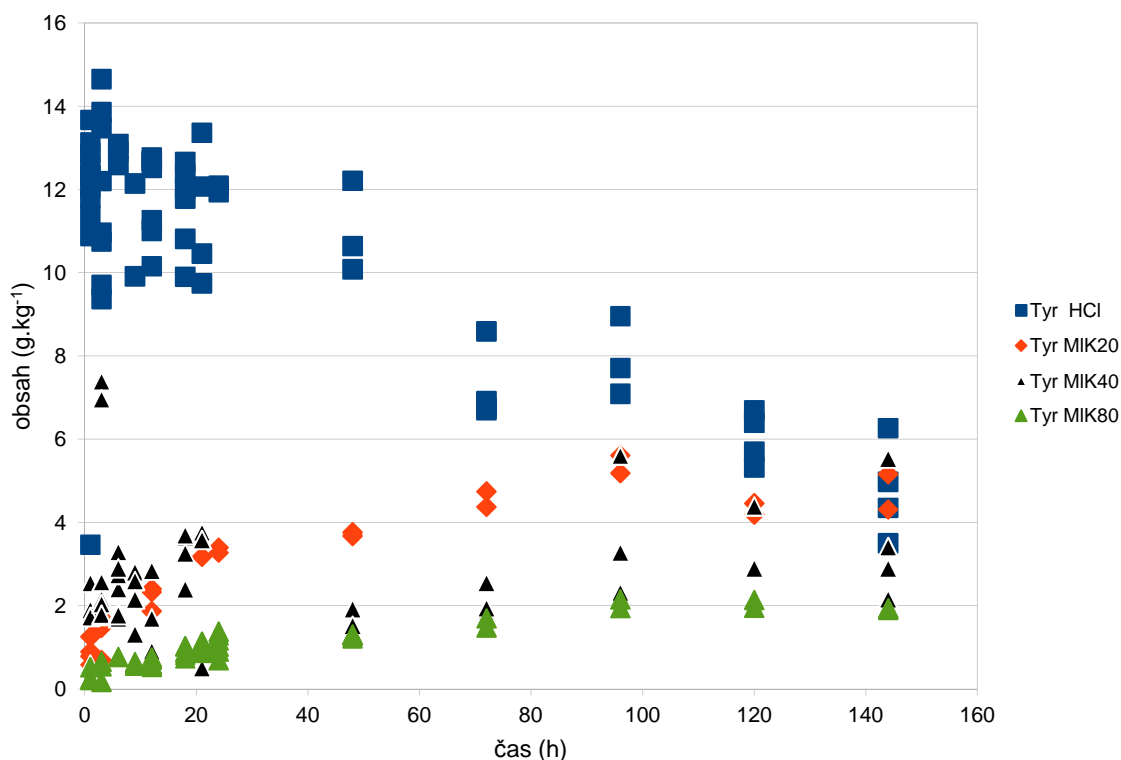


**Obr. 6.21:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro leucin.

Při použití HCl docházelo největšímu uvolňování AMK kolem 20. hodiny hydrolyzy. Po 20. hodině hydrolyzy měla hydrolyzační křivka stagnující charakter. Při použití kyseliny mléčné vykazovaly hydrolyzační křivky rostoucí trend již od počátku hydrolyzy.

**Tab. 25:** Obsah leucinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	8,23%	10,92%	10,07%
48	100,00%	13,24%	13,60%	12,19%
144	100,00%	35,55%	51,53%	26,12%

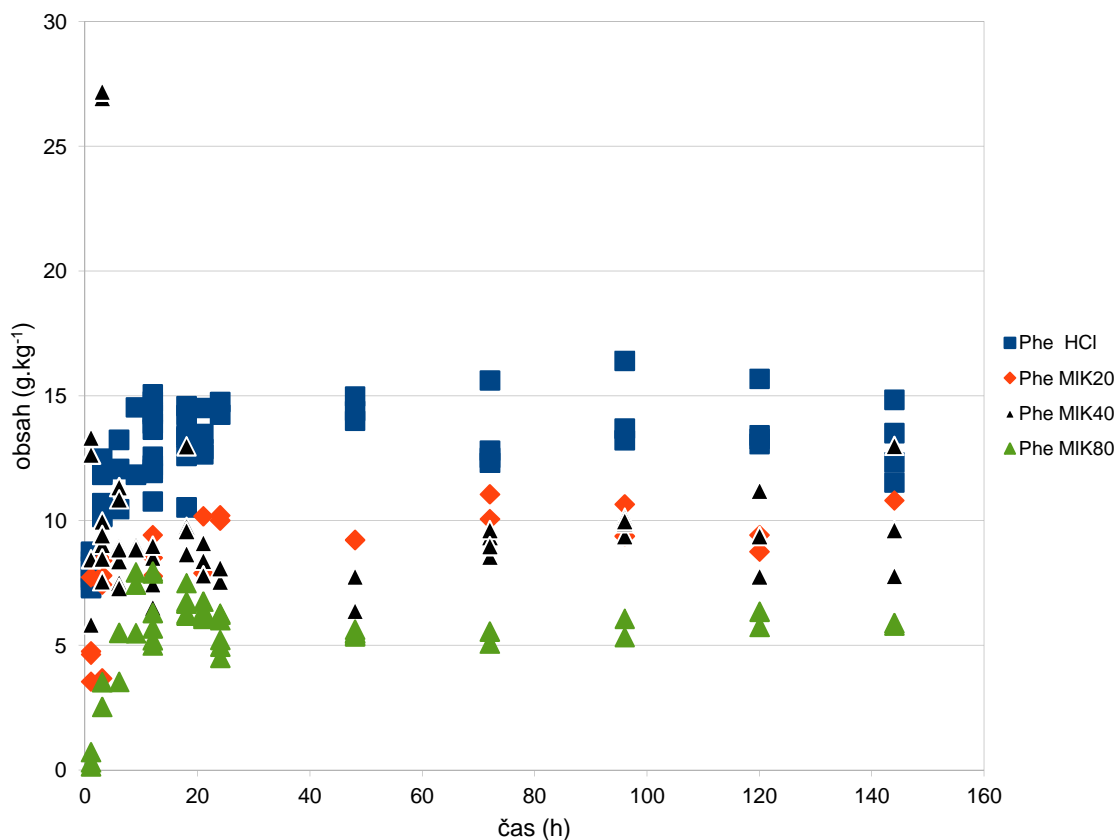


**Obr. 6.22:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro tyrosin.

Aplikace kyseliny mléčné přináší pozvolné uvolňování tyrosinu, s rostoucím trendem. K největšímu uvolňování tyrosinu docházelo při hydrolyze pomocí HCl atypicky již v prvních hodinách hydrolyzy. Po dosažení 20. hodiny hydrolyzy má hydrolyzační křivka výrazně klesající trend.

**Tab. 26:** Obsah tyrosinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	27,84%	19,75%	8,59%
48	100,00%	33,90%	15,69%	11,68%
144	100,00%	99,23%	73,37%	41,59%

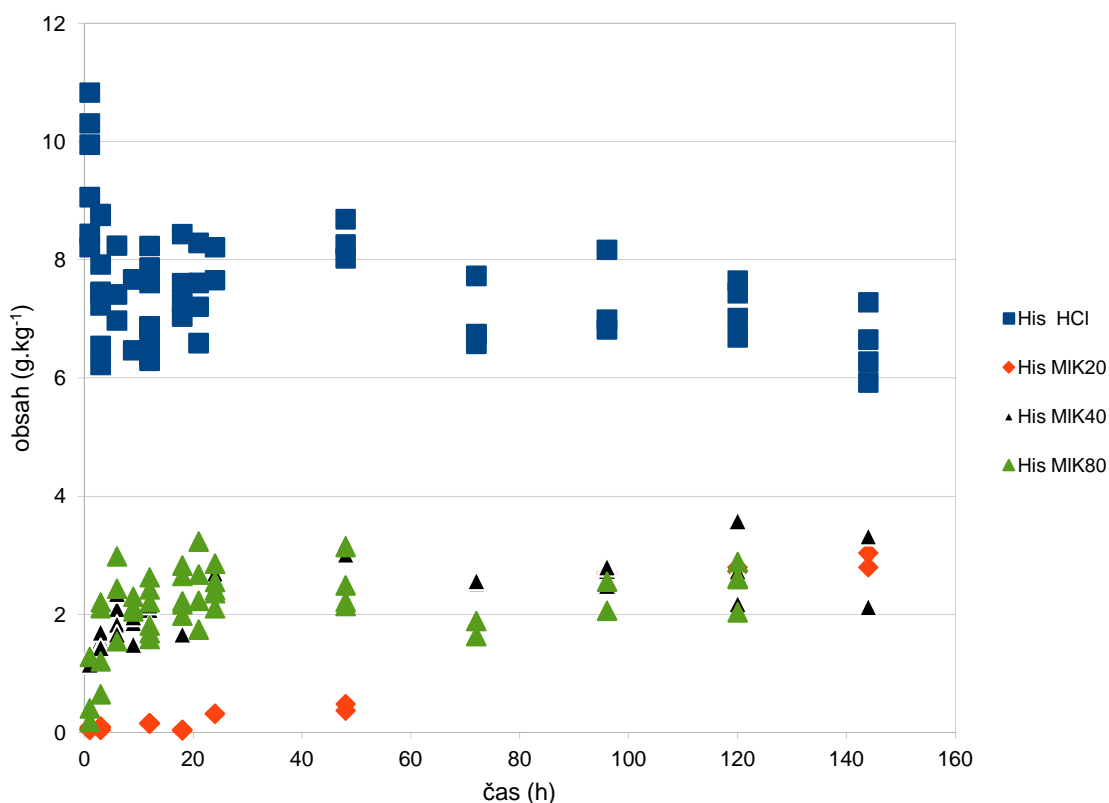


**Obr. 6.23:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro fenylalanin.

Z grafu jasně vyplývá, že aplikace kyseliny mléčné je poměrně účinná při uvolňování fenylalaninu. K největšímu uvolňování fenylalaninu dochází pro všechny použité koncentrace do 20. hodiny hydrolyzy.

**Tab. 27:** Obsah fenylalaninu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	67,54%	64,34%	47,37%
48	100,00%	63,80%	48,95%	37,89%
144	100,00%	82,80%	82,80%	44.81%



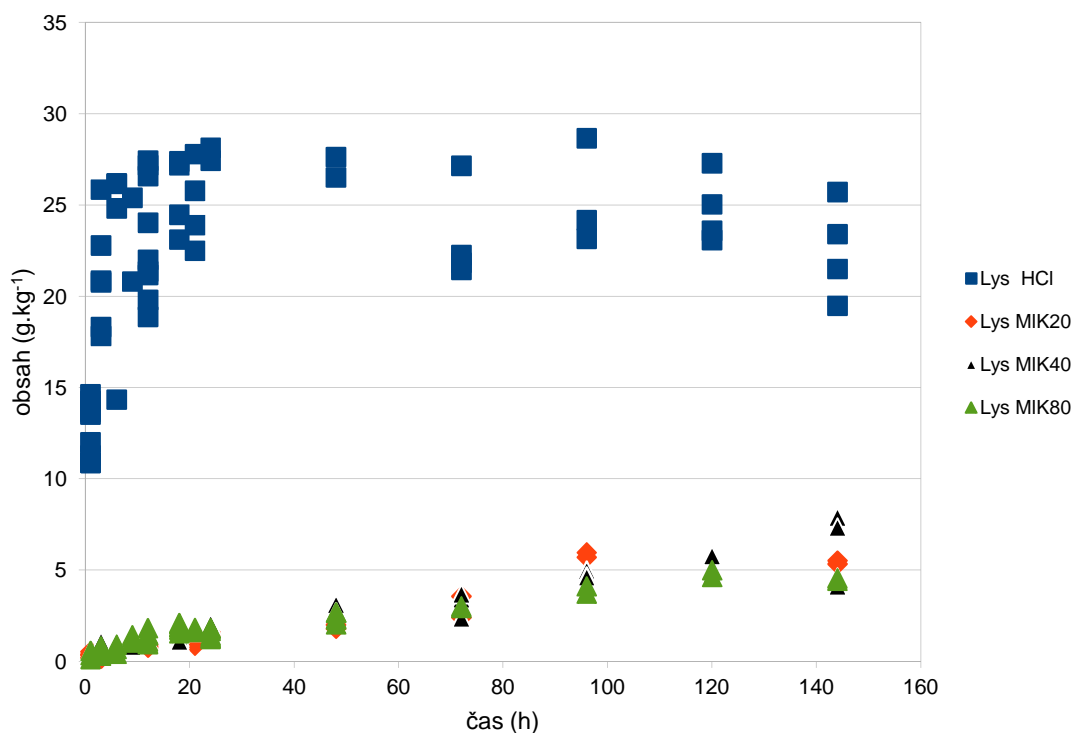
**Obr. 6.24:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro histidin.

Z grafu je patrný rozdíl, plynoucí z použití HCl a kyseliny mléčné. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování histidinu v intervalu hydrolyzy 10 až 20 hodin. Při hydrolyze 80%-ní kyselinou mléčnou po 144 hodině obsah histidinu nebyl zjištěn.

**Tab. 28:** Obsah histidinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20%	40%	80%
		kyselina mléčná	kyselina mléčná	kyselina mléčná
21	100,00%	4,32%	29,88%	33,31%
48	100,00%	5,17%	37,45%	30,01%
144	100,00%	44,69%	41,78%	0,00%



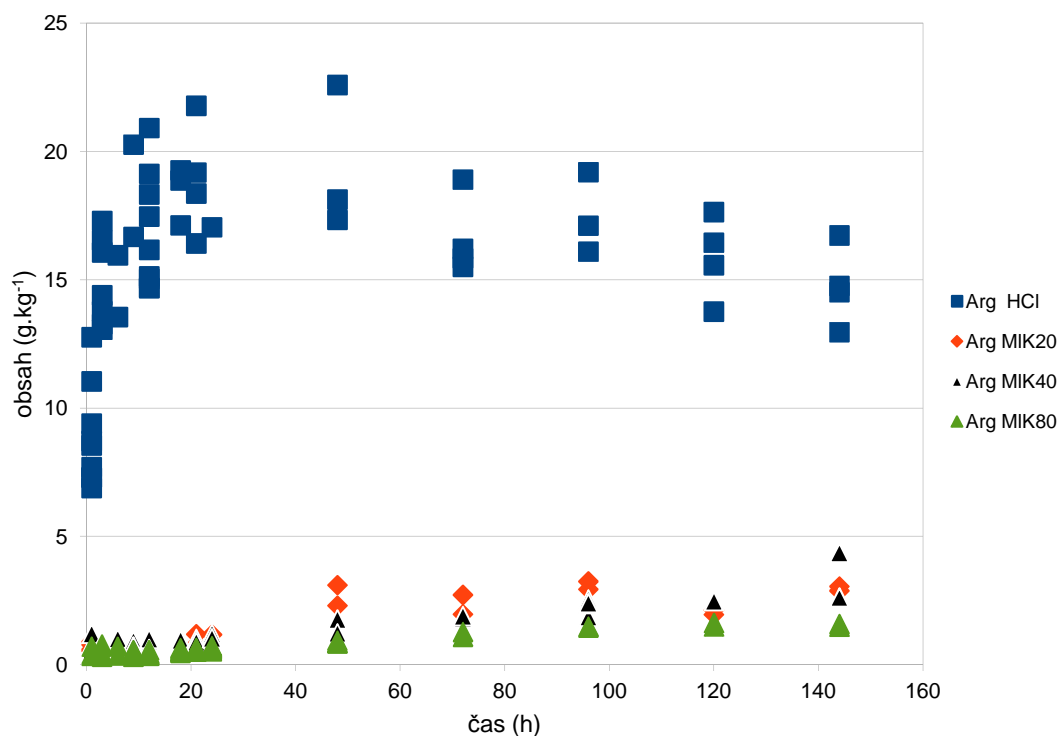


**Obr. 6.25:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolýzy) pro lysin.

K největšímu uvolňování lysinu v případě hydrolýzy HCl docházelo v intervalu 10 až 20 hodin, od 40. hodiny hydrolýzy má křivka mírně klesající trend. V případě kyseliny mléčné docházelo k postupnému uvolňování AMK a hydrolyzační křivka má mírně rostoucí trend.

**Tab. 29:** Obsah lysinu v 21., 48 a 144 hodině hydrolýzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	4,06%	6,58%	6,92%
48	100,00%	7,01%	10,76%	8,89%
144	100,00%	24,12%	26,59%	19,92%



**Obr. 6.26:** Hydrolyzační křivka (závislost obsahu aminokyseliny na době hydrolyzy) pro arginin.

Aplikace kyseliny mléčné přináší velice malé a pozvolné uvolňování argininu. Při aplikaci HCl docházelo k největšímu uvolňování argininu v intervalu 10 až 20 hodin. Od 40. hodiny hydrolyzy má hydrolyzační křivka pro HCl mírně klesající trend.

**Tab. 30:** Obsah argininu v 21., 48 a 144 hodině hydrolyzy

Čas (h)	HCl	20% kyselina mléčná	40% kyselina mléčná	80% kyselina mléčná
21	100,00%	5,22%	5,00%	3,13%
48	100,00%	13,96%	7,73%	4,49%
144	100,00%	20,13%	23,70%	10,42%

Závěrem lze říci, že u sledovaných 15 aminokyselin (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin, tyrosin, histidin, lyzin a arginin) docházelo při hydrolýze HCl k největšímu uvolňování v intervalu mezi 10-20 hodinou. Vysoké hodnoty uvolňování  $h$  byly zjištěny u tyrosinu a histidinu, naopak nízké hodnoty uvolňování byly zjištěny u valinu, leucinu a isoleucinu. Míru degradace AMK a její ztráty vyjadřuje parametr  $l$ . Poměrně vysoké hodnoty byly pozorovány u threoninu, serinu a tyrosinu.

Srovnáním koncentrace aminokyselin z odhadnutých křivek s koncentrací chromatograficky stanovenou byla provedena kontrola správnosti regresního modelu pro HCl. U všech AMK byla zjištěna akceptovatelná odchylka 90-100% pro 21 hodinu, pro 48 hodinu nebylo dosaženo požadovatelné přesnosti a pro 144 hodinu (kromě tyrosinu a leucinu) byla zjištěna akceptovatelná odchylka 90-100%.

Tabulka 14 představuje přehled korelačních faktorů pro HCl a pro kyselinu mléčnou v koncentracích 80%, 40%, 20%. Pro HCl byl stanoven nejvyšší korelační faktor u serinu, tyrosinu a argininu. Naopak nejmenší korelační faktory vykazovaly leucin a isoleucin. Kyselina mléčná ve všech koncentracích vykazovala velmi vysoké korelační faktory, které jsou dány povahou kyseliny a její poměrně nízkou disociační konstantou. Z toho plyne její nízký účinek při uvolňování AMK z proteinů a nelze použít její korelační faktory pro objektivní zhodnocení výsledku.

### 6.3 Hydrolýza kolagenových střívek

Po navážení 25g kolagenových střívek, se střívka nastříhala na malé kousky a vložila do izotermního reaktoru. Ke střívkům se přidalo 250 ml destilované vody a pH bylo upraveno přidavkem 35 ml N-butylaminu na požadovanou hodnotu pH 8-9. Reaktor se nastavil na požadovanou teplotu a obsah se začal promíchávat hřídelovým míchadlem. Otáčky hřídelového míchadla byly nastaveny na 600 otáček za minutu. Okamžitě po dosažení požadované teploty se do připravené směsi přidal enzym *Alcalase*. Po určitých časových intervalech se z reaktoru vždy odebíralo 30 ml hydrolyzátu, který byl následně zfiltrován. Určitý podíl kapalně fáze byl použit pro Biuretovu reakci, z které byl získán čirý roztok pro stanovení obsahu dusíku, tzn., že byl roztok podroben fotometrickému měření pro zjištění absorbance a poté byl stanoven obsah dusíku dle kalibrační křivky. Celkem byly proměřeny tři vzorky proti slepému pokusu a z naměřených absorbancí byl vypočítán aritmetický průměr.

Pro stanovení kalibrační křivky byl použit suchý hydrolyzát komerční produkt HYKOL E, kde byl stanoven obsah dusíku dle Biuretovy metody.

Při vyhodnocení naměřených dat jsem vycházela z rovnice kinetiky prvního řádu, tj. ze závislosti rychlosti reakce na koncentraci nezreagované bílkoviny. Tuto závislost popisuje následující diferenciální rovnice

$$\frac{\partial c}{\partial \tau} = k \cdot (c_n - c) \quad (6.1)$$

Separací proměnných a integrací (v mezích  $c(0)=0$  a  $c(\tau)=a$ ) získáme rovnici

$$\int_0^a \frac{\partial c}{c_n - c} = -\ln(c_n - c)_0^c = k \cdot \tau \quad (6.2)$$

Pro vyhodnocení rychlostní konstanty můžeme rovnici zjednodušit

$$\ln \frac{c_n}{c_n - c} = k \cdot \tau \quad (6.3)$$

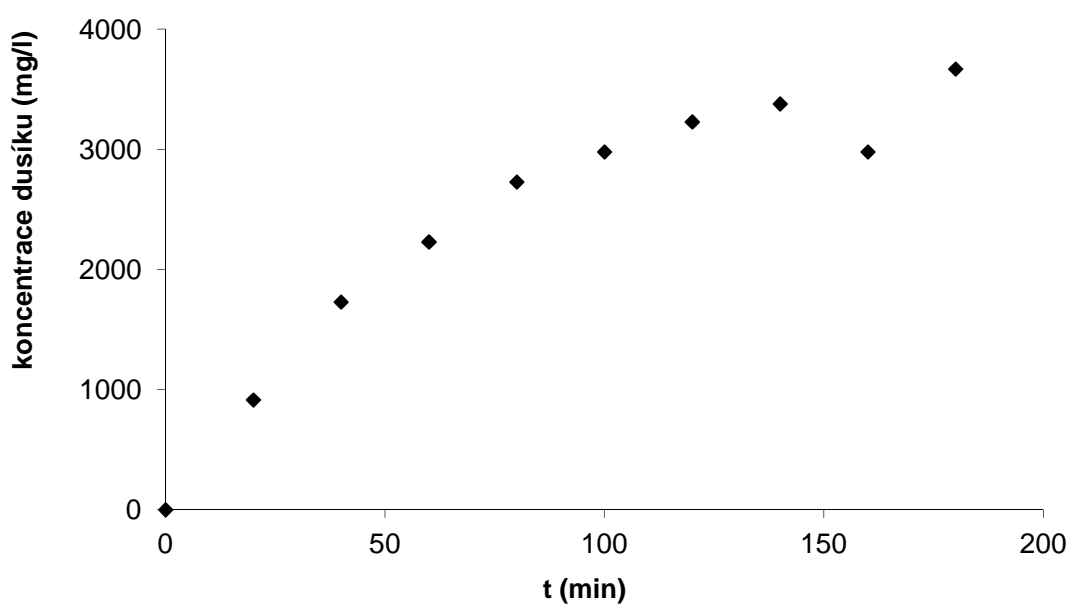
kde prakticky přisuzujeme  $c_n$  hodnotu naměřenou při nejdelsí době trvání hydrolýzy,  $c$  je koncentrace v čase  $\tau$ .

Časový průběh je ukázán v tabulce 31 a obrázek 6.27 představuje závislost koncentrace dusíku na čase.

**Tab. 31:** Časový průběh hydrolyzy kolagenního materiálu při teplotě 65°C

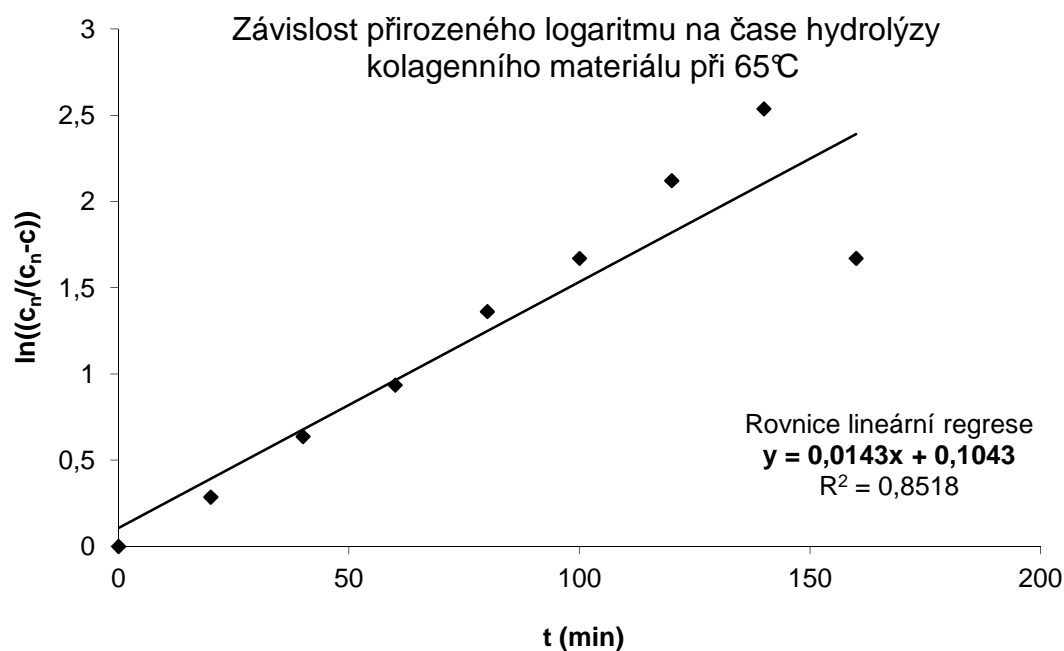
a	$\tau$ [min]	$\frac{c_n}{c_n - c}$	$\ln \frac{c_n}{c_n - c}$
0	0	0	0
915	20	1,3321	0,2868
1730	40	1,8918	0,6375
2230	60	2,5486	0,9355
2730	80	3,9042	1,3621
2980	100	5,3188	1,6713
3230	120	8,3409	2,1212
3380	140	12,6552	2,5381
2980	160	5,3188	1,6713
3670	180	-	-

Časový průběh hydrolyzy kolagenního materiálu při 65°C



**Obr. 6.27:** Hydrolyzační křivka kolagenního materiálu - závislost koncentrace dusíku na čase

Následující obrázek vyhodnocuje závislost přirozeného logaritmu bezrozměrné koncentrace na čase a slouží ke stanovení rychlostní konstanty hydrolýzy kolagenního materiálu.



*Obr. 6.28: Závislost přirozeného logaritmu bezrozměrné koncentrace na čase*

Lineární regresní analýzou byla zjištěna rychlostní konstanta  $k = 0,0143 \text{ min}^{-1}$ .

## 6.4 Stanovení efektivního difusního koeficientu

Pro naměření experimentálních dat byl použit komerční hydrolyzát, vyrobený enzymatickou hydrolyzou dechromací postružin poskytnutý společností STOSPOL Valašské Meziříčí. Připravený hydrolyzát, který dále sloužil, jako model biostimulátoru byl analyzován pro obsah aminokyselin a průměrnou molekulovou hmotnost. Tyto údaje jsou nezbytné pro odhad kvality biostimulátoru a jeho transportních vlastností.

Stanovení jednotlivých parametrů jsou popsány v analytických metodách.

Průměrná molekulová hmotnost byla zjištěna 18 200g/ml a index polydisperzity byl roven 12,1.

Navzdory tomu, že molekulová hmotnost biostimulátoru je poměrně vysoká, index polydisperzity ukazuje, že připravený biostimulátor obsahuje široké spektrum makromolekul, které se významně liší délkou řetězce (tj. distribuce molárních hmotností není jednotná). Proteinové biostimulátory obvykle obsahují velké zlomky makromolekul a oligomerů, stejně jako volné aminokyseliny, avšak stále není jasné, která část nese požadované vlastnosti biostimulátoru. Z tohoto důvodu je připravený hydrolyzát vhodný pro zkoumání transportních parametrů biostimulátoru.

Část experimentů byla realizována pomocí navržené difusní cely (obr 6.29).



*Obr 6.29: Difusní cely*

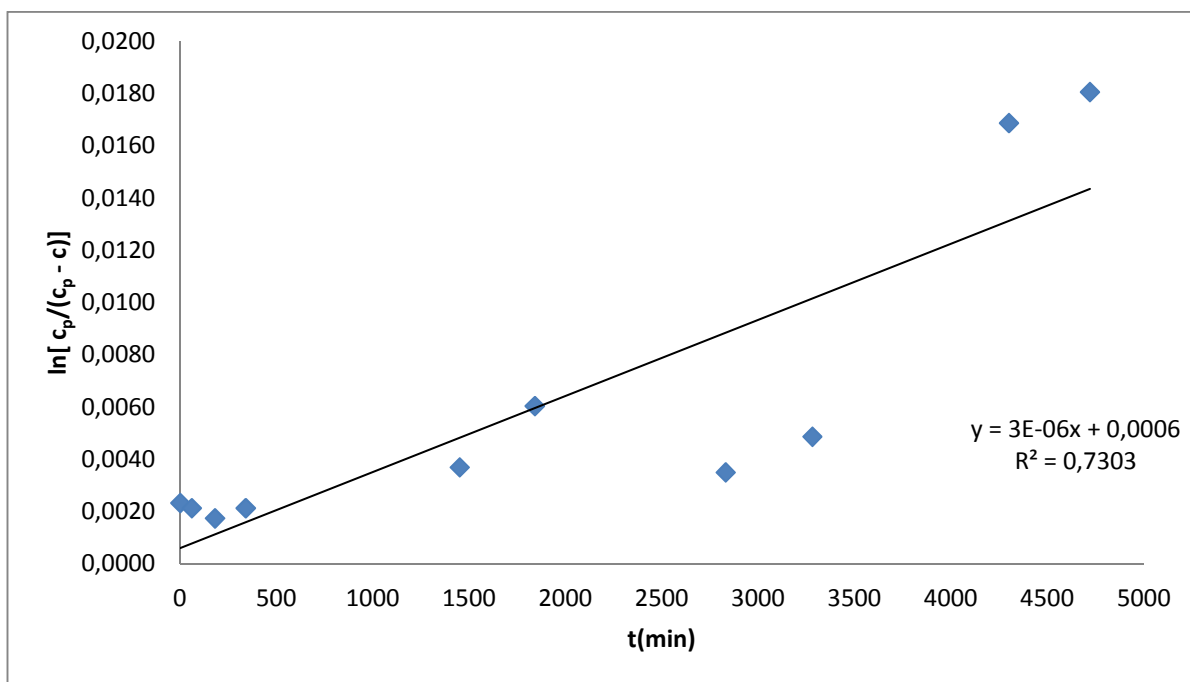
Po upevnění přepážky v difusní cele byl do jedné komory nalit biostimulátor a do druhé komory destilovaná voda. Oba roztoky byly nality ve stejném čase a

od tohoto okamžiku se měřil čas difuze biostimulátoru. Koncentrace biostimulátoru byla měřena Biuretovou a Bicinchoninovou metodou, odebráním přesného množství vzorku z komory naplněné vodou. Vynesením  $\ln[c_p/(c_p - c)]$  oproti času jsem získala přímku, z jejíž směrnice jsem zjistila rychlostní konstantu, která je nezbytná pro stanovení difusního koeficientu pomocí kvazistacionární metody. Parametry jednotlivých pokusů a odhadnuté difusní koeficienty jsou popsány v tabulce 32.

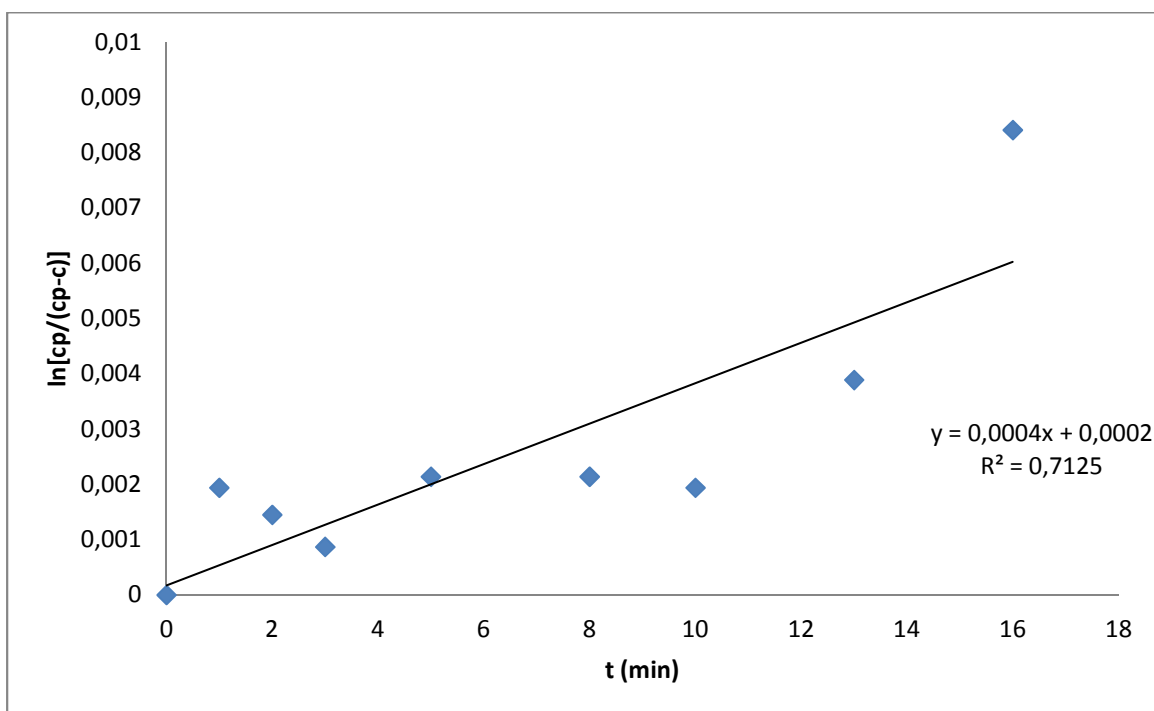
**Tab. 32:** Odhadnuté difusní koeficienty

<b>Přepážka</b>	<b>V[m<sup>3</sup>]</b>	<b>S [m<sup>2</sup>]</b>	<b>b [m]</b>	<b>k[hod<sup>-1</sup>]</b>	<b>Metoda stanovení koncentrace biostimulátoru</b>	<b>D[m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>]</b>
<b>Filtrační papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup>	0,0151	Biuretova metoda	1,17.10 <sup>-9</sup>
<b>Filtrační papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup>	0,0004	Biuretova metoda	3,10.10 <sup>-11</sup>
<b>Filtrační papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup>	0,0002	Biuretova metoda	1,56.10 <sup>-11</sup>
<b>Filtrační papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup>	0,0012	BCA metoda	9,33.10 <sup>-11</sup>
<b>Filtrační papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	1,4.10 <sup>-4</sup>	0,002	BCA metoda	1,56.10 <sup>-10</sup>
<b>Tvrký papír</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	4,5.10 <sup>-4</sup>	2.10 <sup>-7</sup>	Biuretova metoda	5.10 <sup>-14</sup>
<b>Kaštanový list</b>	10 <sup>-4</sup>	30.10 <sup>-4</sup>	0,13.10 <sup>-3</sup>	3.10 <sup>-6</sup>	Biuretova metoda	2,22.10 <sup>-13</sup>





**Obr. 6.30:** Závislost koncentrace biostimulátoru na čase přes přepážku kaštanový list



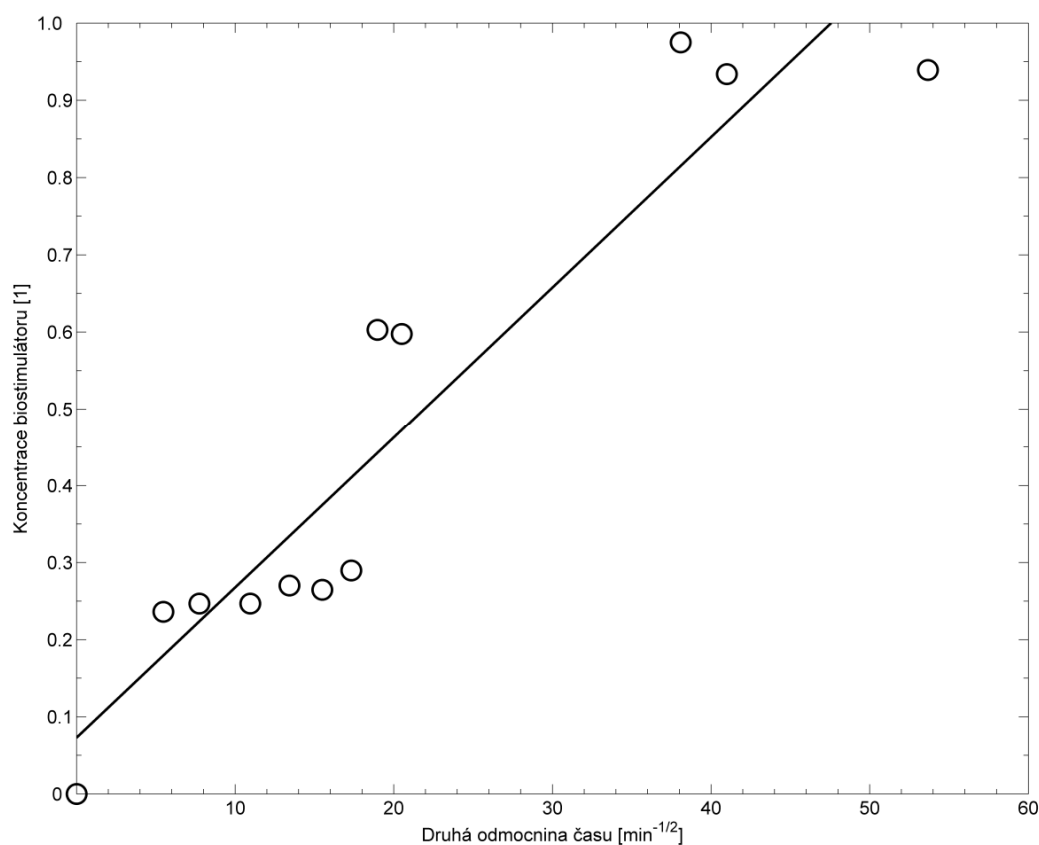
**Obr. 6.31:** Závislost koncentrace biostimulátoru na čase přes přepážku filtrační papír

Následovaly experimenty ponořením řepkových listů (*Brassica napus var.napus*) do biostimulátoru v erlenmayerově baňce.

Čerstvě uřezané listy byly ponořeny do roztoku biostimulátoru o koncentraci 7,7% (w/w), přičemž námokové číslo bylo rovno 1,5. Průměrná tloušťka listů byla měřena posuvným měřidlem, její hodnota byla 0,45mm. V předepsaných časových intervalech bylo odebíráno přesné množství vzorku, koncentrace biostimulátoru byla zjišťována Biuretovou metodou. Naměřené koncentrace byly vyneseny oproti druhé odmocnině času a vyhodnoceny lineární regresí. Celková absorpce biostimulátoru se pak rovná poklesu hmotnosti biostimulátoru v roztoku a efektivní difusní koeficient lze odhadnout z Crankovi rovnice (4.22).

$$C_0(\tau) = \frac{c_{0p} - c_0(\tau)}{c_{0p} - c_0(\infty)} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{1 + Na}{Na} \sqrt{\frac{D\tau}{b^2}},$$

kde  $c_0(\infty)$  vyjadřuje rovnovážnou koncentraci roztoku biostimulátoru.



**Obr. 6.32:** Závislost koncentrace biostimulátoru na druhé odmocnině času.<sup>2</sup>

Pomocí Crankovi rovnice byl odhadnut efektivní difusní koeficient  $9,1 \cdot 10^{-14}$  m<sup>2</sup>/s. Tato hodnota efektivního difusního koeficientu odpovídá údajům zveřejněných v [64], nicméně hodnota naměřeného koeficientu je velmi nízká a odpovídá hodnotě kutikulárního difusního koeficientu (který je nejnižší v prostředí listu). Toto potvrzuje předpoklad v [65], že míra penetrace závisí na velikosti pronikající molekuly. Je třeba poznamenat, že vybraná analytická metoda nerozlišuje mezi různými délkami molekul, vypočtená hodnota je pak průměrný koeficient mezi všemi peptidy ve sledované směsi.

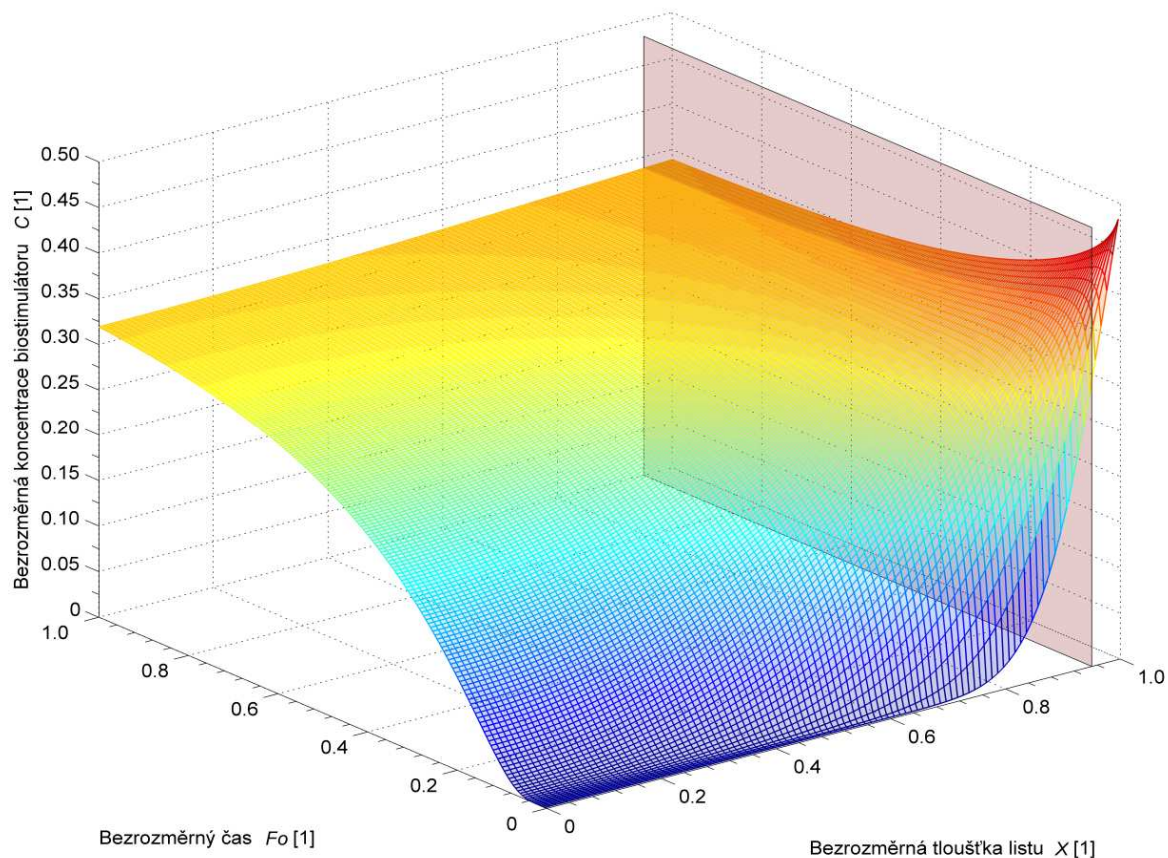
## 7. APLIKACE NAVRŽENÉHO MATEMATICKÉHO MODELU

Efektivní difusní koeficient je základním prvkem navrženého modelu, protože určuje množství biostimulátoru schopného zasáhnout aktivní místa listu již před dosažením požadovaného času. To umožňuje zvolit optimální podmínky pro aplikaci biostimulátoru (tj. optimální teplota, vlhkost, rychlost větru). Navrhovaný model bere v úvahu rozpouštědla (např. voda), odpařování z roztoku biostimulátoru a jeho simultánní difusi do listu. Model ukazuje, že klimatické podmínky mají vliv na fyzikální podstatu transportu procesem změny koncentračního gradientu řízením příjmu biostimulátoru do těla rostliny. Ke zkoumání tohoto jevu byly porovnány čtyři různé simulace, jejichž parametry jsou uvedeny v tabulce 33:

**Tab. 33:** Vstupní parametry pro simulaci příjmu biostimulátoru do těla rostliny

Parametry	Jednotka	I.	II.	III.	IV.
Na	[1]	1	1	1	1
D	[m <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> ]	9,1.10 <sup>-14</sup>	9,1.10 <sup>-14</sup>	9,1.10 <sup>-14</sup>	9,1.10 <sup>-14</sup>
φ	[%]	100	30	91	91
T	[°C]	25	30	12	12
U	[m.s <sup>-1</sup> ]	0,0	7,5	0,2	13,5
ε	[1]	0,5	0,5	0,5	0,5
b	[m]	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>
c <sub>op</sub>	[kg.m <sup>-3</sup> ]	10	10	10	10
δ	[m]	5.10 <sup>-6</sup>	5.10 <sup>-6</sup>	5.10 <sup>-6</sup>	5.10 <sup>-6</sup>
Ev	[1]	532	980	66	536

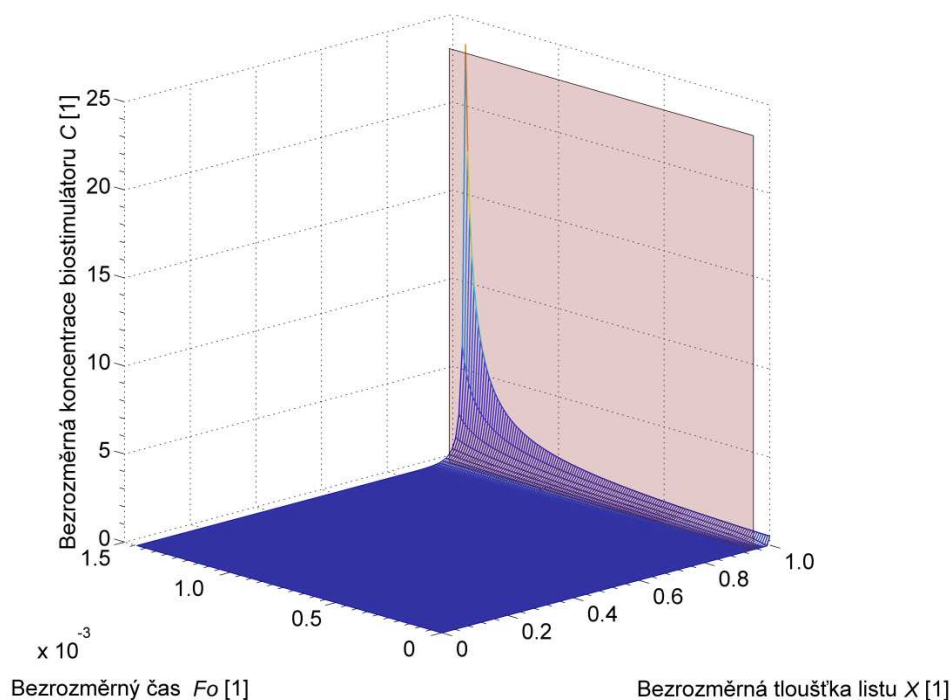
První situace (označená I.) popisuje ideální podmínky skleníku. Relativní vlhkost je 100%, takže nedochází k žádnému odpařování a difusní proces má dostatek času k dosažení rovnováhy. Vývoj simulovaného pole na koncentraci biostimulátoru uvnitř listu je znázorněn na obrázku 7.1.



*Obr. 7.1: Simulace I. Vývoj koncentračního pole biostimulátoru uvnitř listu.<sup>2</sup>*

Průhledná rovina zobrazená na obrázku (umístěna pod povrchovou vrstvou kde  $X=1$ ) představuje vnitřní okraj pokožky listu. Z obrázku je patrné, že koncentrace v povrchové vrstvě listu klesá v čase a prakticky konstantní koncentrace biostimulátoru je dosaženo v rámci celého listu, když bezrozměrný čas dosáhne jednotky ( $F_0=1$ ).

Zcela jiná situace je znázorněna v druhém případě (označena II.). Podmínky jsou vybrány tak, aby odpovídaly horkému letnímu dni. Teplota je vysoká, nízká vlhkost vzduchu a vítr je dostatečně silný (k pohybu malých větviček, odpovídá Beaufortovu číslu - 4). Následující obrázek 7.2 ukazuje, že absorpční proces je ukončen velmi rychle (hodnota  $F_0$  je nižší než 0,0014) a prakticky žádný biostimulátor nedosáhne vnitřního objemu listů.



**Obr. 7.2:** Simulace II. Vývoj koncentračního pole biostimulátoru uvnitř listu.<sup>2</sup>

Nicméně koncentrace biostimulátoru se zvyšuje v povrchové vrstvě, zejména, kdy dochází k ukončení doby, kdy jeho hodnota stoupá velmi rychle. Tento jev je způsoben odpařováním, které v tomto případě postupuje mnohem rychleji než difuze biostimulátoru. Výsledkem je zvyšování koncentrace biostimulátoru v povrchové vrstvě, urychlí se příjem, protože rozdíl v koncentracích přes hranici listu je hnací silou tohoto procesu.

Model jasně nadhodnocuje difusní rychlosti koncentrovaného biostimulátoru krátce před ukončením doby, protože využívá průměrných hodnot difusních koeficientů. K ukončení procesu dochází, když se všechna voda odpaří.

V tomto okamžiku nastává otázka, zda biostimulátor nacházející pod pokožkou by mohl ovlivnit rostlinu. Domnívám se, že je to nepravděpodobné, protože biostimulátor uvnitř pokožky je schopný proniknout daleko hlouběji, pokud se všechna rozpouštědla na povrchu odpaří. Kromě toho je propustnost pokožky závislá na vlhkosti vzduchu, který dále snižuje hodnotu efektivního difusního koeficientu.

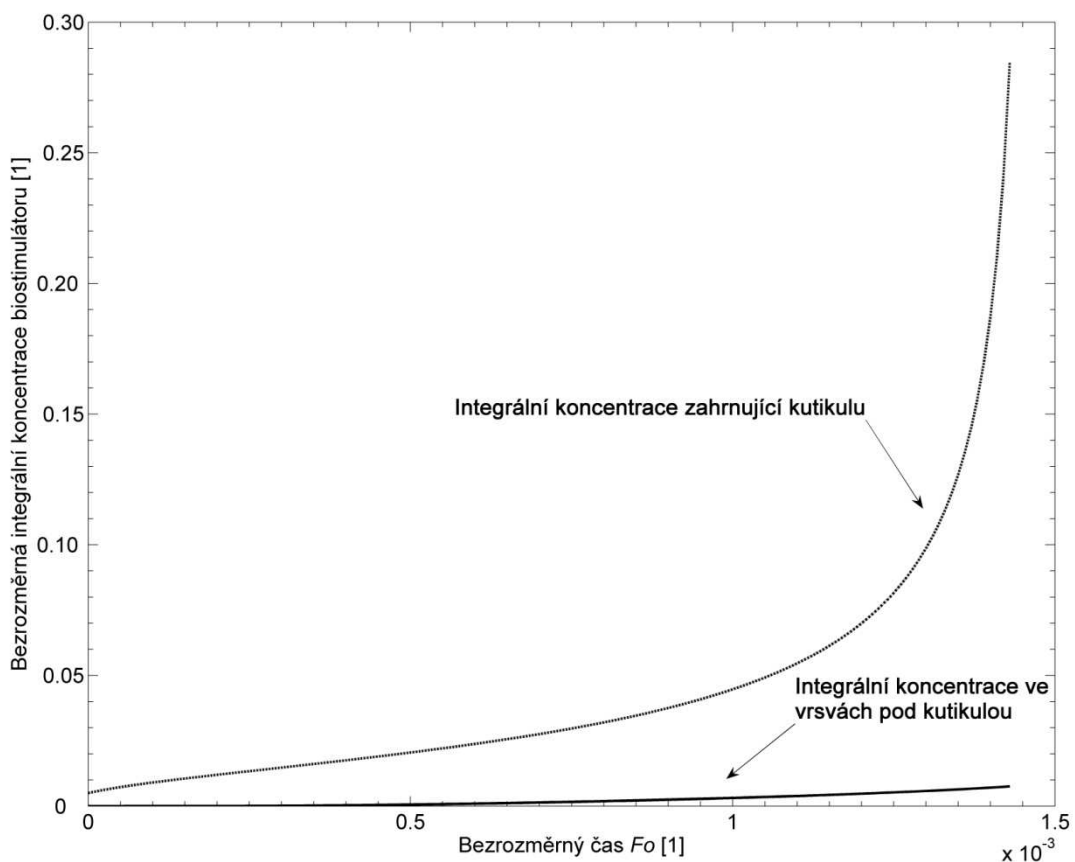
Tyto úvahy vedou k zavedení průměrné integrální koncentrace biostimulátoru pod pokožkou, které je definováno

$$\bar{c}(\tau) = \int_{x=0}^{b-\delta} c(\tau, x) dx$$

kde  $\delta$  je tloušťka pokožky. Zde je podstatný rozdíl mezi integrální koncentrací vypočtenou jen pod pokožkou ( $\bar{c}(\tau)$ ) a celkovou integrální koncentrací definovanou

$$\bar{c}_{tot}(\tau) = \int_{x=0}^b c(\tau, x) dx$$

Na následujícím obrázku 7.3 je porovnán vývoj obou těchto integrálních průměrů.



**Obr. 7.3:** Rozdíl mezi integrální koncentrací biostimulátoru uvnitř listu zahrnující pokožku, tak i bez pokožky.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> grafy byly vytvořeny pomocí programu MatLab R2007b.

Graf ukazuje, že v rámci druhé situace (označené II.) je pouze zanedbatelné množství biostimulátoru schopné proniknout pod pokožku. Z tohoto důvodu ( $\bar{c}(\tau)$ ), množství bude použito pro posouzení celkové účinné koncentrace biostimulátoru uvnitř listu. Proto v druhé situaci (označené II), celkové množství biostimulátoru schopné zasáhnout aktivní místy rostliny, je poměrně menší.

Další situace (označená III.) souvisí s předchozí situací. Letní den je v druhé situaci (označená II.) horký, avšak v noci teplota klesá a ta způsobí, že se relativní vlhkost výrazně zvýší. Neexistuje prakticky žádný vítr, a proto odpařování parametru  $E_v$  je nízké. Parametr  $E_v$  je definován následujícím vztahem:

$$E_v = \frac{k(u)p_s b}{\rho D}$$

Pokud začne foukat silný vítr (Beaufortovo číslo-6), hodnota parametru  $E_v$  se změní. Situace je simulována ve čtvrtém případě (označeném IV.). Všechny čtyři simulace jsou shrnuty v tabulce (34).

**Tab. 34:** Integrální koncentrace biostimulátoru pod pokožkou pro všechny čtyři simulace

Simulace	Integrální koncentrace [1]
I	0,309
II	0,008
II	0,614
IV	0,190

Celková úroveň penetrace biostimulátoru může být velmi nízká, pokud nejsou vhodné klimatické podmínky, jak jsem popsala v druhé simulaci (označené II.). Lze vypočítat, že aplikace biostimulátoru by měla být opakována přibližně 39krát k dosažení stejné penetrace jako v případě skleníku (simulace I.). Nicméně pokud dochází k pomalému odpařování, koncentrace biostimulátoru v roztoku se neustále zvyšuje, což podporuje jeho rozšiřování do listu. Konečná integrální koncentrace v takovém případě (simulace III.) může dokonce překonat úroveň v případě skleníku. Na druhou stranu, při vhodné vlhkosti může být odpařování urychleno například větrem (uvedeno v simulaci IV) tak, že celková úroveň penetrace je snížena (cca 2/3) v porovnání se simulací ve skleníku.



## 8. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

Za hlavní výsledky své práce považují, že se podařilo vyrobit hydrolyzáty, které jsou uplatnitelné především jako doplňky stravy nebo jako podpůrný lék onkologicky nemocných pacientů. Bílkovinné hydrolyzáty lze také využít v období rekonvalescence, po úrazech, pro léčbu alergií či zvýšení imunity, při poruchách trávení apod. Vyrobené hydrolyzáty mají také specifické využití v zemědělství při ochraně kulturních rostlin jako induktory rezistence.

Při výrobě hydrolyzátů byla otestována kyselina mléčná jako hydrolyzační činidlo, která není běžně používaným hydrolyzačním činidlem. Podařilo se stanovit vhodnou koncentraci, která poskytovala při hydrolyzách nejvyšší výtěžky dusíkatých látek (až 30%hm.) a minimální obsahy popelovin (méně jak 14%hm.). Z hlediska hydrolyzačního času se ukázala jako optimální 6-8 hodinová hydrolyza. Tento stanovený hydrolyzační čas odpovídá minimu hlavních provozních nákladů, přičemž ty jsou definovány jako součet nákladů na elektrickou energii pohonu míchadla hydrolyzačního reaktoru a náklady na spotřebu topné páry pro koncentraci zředěných hydrolyzátů na požadovanou koncentraci.

Byly porovnány hydrolyzační křivky pro jednotlivé aminokyseliny pro kyselinou mléčnou a chlorovodíkovou. Výsledky ukázaly, že hydrolyza kyselinou mléčnou vykazuje po 144. hodině hydrolyzy účinnost kolem 20% ve srovnání s kyselinou chlorovodíkovou. Byla provedena kontrola správnosti regresního modelu pro HCl. Pro 21. hodinu hydrolyzy byla zjištěna akceptovatelná odchylka pro všechny aminokyseliny a to 90-110%. V 48. hodině hydrolyzy nebylo dosaženo požadované přesnosti pro většinu aminokyselin. Pro 144. hodinu hydrolyzy byla akceptovatelná odchylka zjištěna téměř u všech aminokyselin kromě leucinu a tyrosinu.

Na základě hydrolyzačních křivek byly vypočteny korelační faktory pro 21. hodinu hydrolyzy a byly sledovány ztráty vzniklé během kyselé hydrolyzy. Pro hydrolyzu HCl se korelační faktory pohybovaly v okolí intervalu 1,00. Nejnižší faktory vykazovaly aminokyseliny leucin a isoleucin – 0,85. Naopak nejvyšší korelační faktory byly pozorovány u serinu a argininu – 1,04. Pro hydrolyzu kyselinou mléčnou v koncentracích 20%, 40% a 80% byly zjištěny poměrně vysoké hodnoty korelačních faktorů ve všech koncentracích, které jsou dány povahou kyseliny a její poměrně nízkou disociační konstantou. Z toho plyne její nízký účinek při uvolňování AMK z proteinů a nelze použít její korelační faktory pro objektivní zhodnocení výsledku.

U sledovaných 15 aminokyselin (asparagová kyselina, threonin, serin, glutamová kyselina, prolin, glycin, alanin, valin, isoleucin, leucin, fenylalanin,

tyrosin, histidin, lyzin a arginin) docházelo při hydrolyze HCl k největšímu uvolňování v intervalu mezi 10-20 hodinou. Vysoké hodnoty uvolňování  $h$  byly zjištěny u tyrosinu a histidinu, naopak nízké hodnoty uvolňování byly zjištěny u valinu, leucinu a isoleucinu. Míru degradace AMK a její ztráty vyjadřuje parametr  $l$ . Poměrně vysoké hodnoty byly pozorovány u threoninu, serinu a tyrozinu.

Hodnoty vypočtených efektivních difusních koeficientů jsou velmi nízké, avšak se tyto výsledky předpokládaly, protože bílkoviny biostimulátoru se skládají z dlouhých makromolekul, které difundují velmi pomalu.

Navržený matematický model je založen na mechanismu difuze a v případě praktické aplikace při ošetřování kulturních rostlin bere v úvahu odpařování vody v závislosti na klimatických podmínkách.

Navrhovaný model může vysvětlit rozdíly mezi laboratorními zkouškami a polními zkouškami. Na základě provedených simulačních výpočtů v případě aplikace biostimulátoru navrhuji následující doporučení:

- Biostimulátor je vhodné použít, kdy vlhkost vzduchu je blízko bodu nasycení, například po dešti, brzy ráno či večer, zejména když padá rosa.
- Nejlepších výsledků je dosaženo při bezvětří.
- Zvyšování tloušťky vrstvy a počáteční koncentrace biostimulátoru vede k urychlení difuze biostimulátoru do vnitřní struktury rostlinného těla.
- Vysoká pórovitost listů podporuje difuzi vzhledem k vyšší hodnotě efektivního difusního koeficientu.

## 9. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Disertační práce ukázala, že vhodná kombinace přímého a nepřímého modelování má velký význam i v oborech, kde matematický popis specifických procesů není příliš tradiční. Konkrétně se jednalo o úspěšný popis hydrolyzy bílkovinné masy kinetikou prvního řádu vzhledem ke koncentraci zbylého podílu v reakční směsi.

Matematicko-statistické zpracování experimentálních dat bylo použito pro stanovení parametrů kinetické rovnice hydrolyzy. Byla navržena originální aparatura pro měření difusních koeficientů hydrolyzovaných složek do vnitřní struktury rostlinného těla.

Na základě ověřených modelů experimentálními daty, se vypracoval model pro řízení hydrolyzačního reaktoru, kdy cílová funkce zahrnuje jak parametry technologické (násada reaktoru, příkon elektromotoru, teplosměnná výměnná plocha), tak i kinetické (rychlostní konstanta, počáteční koncentrace biomasy) a ekonomické (cena elektrické energie a tepelné energie).

Zvláštní případ matematického modelování byl uplatněn pro stanovení optimálních podmínek při ošetření kulturních rostlin vodným roztokem hydrolyzátu. Matematický model zahrnuje nejen mechanismus difuze, ale svými okrajovými podmínkami bere v úvahu klimatické podmínky.

Podrobný popis uvedeného matematického modelu je uveden v publikaci Protein Biostimulant Foliar Uptake Modeling: The Impact of Climatic Conditions, který byl přijat do mezinárodního impaktovaného časopisu American Institute of Chemical Engineers (AIChE), jehož jsem spoluautorem a je uveden v příloze. Dále je matematické modelování podáno pro publikaci Biostimulator diffusion into plant tissue pro časopis Heat and Mass Transfer.

## 10. ZÁVĚR

Úvodní teoretická část disertační práce zpracovává literární studii zaměřenou na zpracování vedlejších produktů potravinářského průmyslu, které mohou být významným zdrojem bílkovin. Výsledné hydrolyzáty se uplatňují nejen ve výživě člověka, ale také v zemědělství jako biostimulátory. Rešerše byla směřována především na štěpení bílkovinné molekuly a sledování vlastností vzniklých produktů. Byl popsán postup hydrolyz a analýza experimentálními dat.

Pro stanovení optimální reakční doby hydrolyzy jsem vycházela z popisu kinetiky hydrolyzy biomasy prvního řádu, která byla zahrnuta do cílové optimalizační funkce.

Ke stanovení odhadu efektivního difusního koeficientu byl použit vztah uvedený v Crankově monografii *Mathematics of diffusion* [60] a zároveň jsem použila kvazistacionární model. Vzhledem k velmi nízkým hodnotám efektivních difusních koeficientů, byly obě metody kompatibilní. Byl navržen speciální matematický model a jeho aplikace byla provedena reálnými zkouškami ošetření rostlin v polních i skleníkových podmínkách.

Ke stanovení jednotlivých složek v reakčních směsích jsem použila následujících speciálních metod:

- Molární hmotnost a distribuce molárních hmotností byly stanoveny metodou gelové permeační chromatografie.
- Iontově výměnnou chromatografií byl v automatickém analyzátoru AAA stanoven obsah aminokyselin.
- BCA metoda, která využívá kyseliny bicinchoninové, byla použita pro spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů.

V experimentální části disertační práce byly zkoušeny hydrolyzy kvasničné biomasy s vybranými hydrolyzačními činidly. Byl nalezen optimální čas hydrolyzy a vhodná koncentrace hydrolyzačního činidla, u kterých byly zjišťovány maximální výtěžky dusíkatých látek a minimální obsahy popelovin.

Na základě hydrolyz dvěma různými kyselinami byly sestaveny kinetické hydrolyzační křivky pro vznik jednotlivých aminokyselin a určen vliv použité kyseliny na uvolňování aminokyselin z bílkovinné matrice. Z naměřených hydrolyzačních křivek byly vypočteny korelační faktory pro sledované aminokyseliny a použité kyseliny.

Pro zkoumání transportních jevů a odhad efektivního difusního koeficientu bylo použito speciálně navržené difusní cely. Difuse byla zkoušena přes vybrané přepážky a koncentrace biostimulátoru byla zjišťována Biuretovou a Bicinchoninovou metodou.

Výsledky mé práce jsou také součástí grantových úkolů Ministerstva průmyslu a obchodu (FI-IM5/195) a Ministerstva zemědělství (QH72117). Závěrečné zprávy byly úspěšně oponovány a hodnoceny jako excelentní. V obou případech jsem spoluautorka.

## 11. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1* 2. vyd. Tábor: Osis, 1999 ISBN 80-902391-3-7
- [2] DAVÍDEK, J., et al. *Chemie potravin*. 1st ed. Praha: SNTL, 1983. 632
- [3] PROUST, M. *Ann. Chim. Phys. (Paris)*, 1819, no. 10, p. 29–40.
- [4] DANILEWSKI, A. *Organoplastičeskoje sily organisma*. 1886.
- [5] IKEDA, R. *Cit. Meyer M. G. Food Man*. 1950. ISBN U.S.P. 320.589.
- [6] MAREČEK, V. *Bílkovinné hydrolysáty potravinářské* 1. vyd. Praha: MPP, 1955
- [7] BUŇKA, F., KRÍŽ, O., VELIČKOVÁ, A., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, vol. 22, no. 3, p. 224–232.
- [8] FOUNTOULAKIS, M., LAHM, H. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 826, no. 2, p. 109–134.
- [9] WEIS, M., MANNEBERG, M., JURANVILLE, J., LAHM, M., FOUNTOULAKIS, M. Effect of the hydrolysis method on the determination of the amino acid composition of proteins. *Journal of Chromatography A*, 1998, vol. 795, no. 2, p. 263–275.
- [10] VICKERY, H., B. *J. Biol. Chem.* 53, 495, 1922
- [11] RAVINDRAN, G., BRYDEN, W. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography. *Food Chemistry*, 2005, vol. 89, no. 2, p. 309–314.
- [12] ŠLIŽYTĚ, R., RUSTAD, T., STORRØ, I. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 2005, vol. 40, no. 12, p. 3680–3692.
- [13] BLAŽEJ, A., kol. *Technologie kůže a kožešin* Praha: SNTL/Alfa, 1984

- [14] MAREČEK, VL. *Chem. Obzor*, 20, 189, 1945
- [15] NASSET, F., S., GREENBERG, D., M. *J. am. Chem. Soc.* 51, 836, 1929
- [16] DUNN, M., S. *J. am. Chem. Soc.* 47, 2564, 1925
- [17] KOSSEL, A. F., WEISS, *Zeitschr.physiol. Chem.* 42, 453, 1904
- [18] SAMUELY, *Hoffmeisters Ber.* 2, 355, 1902
- [19] MAILARD, *Ctbit*, 1912, I. 717, 13, II. 16, II. 329
- [20] RYCHTERA, M. *Potravinářské technologie a biotechnologie: Fermentační technologie* 2008. <http://www.vscht.cz/kch/download/sylaby/potravtech.pdf> (accessed June 14, 2011).
- [21] STUHLÍK, P. *Možnosti využití proteinových hydrolyzátů v humánní medicíně* Zlín, 2009
- [22] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II.* 1.vyd. Zlín: UTB, 2006. 102 s. ISBN 80-7318-395-1
- [23] *Pivovarské kvasnice*. <http://www.kvasnice.eu/cz/o-produktu.html> (accessed June 14, 2011).
- [24] STAREC, M. *Pivovarské kvasnice a lidský organismus*, 2008. <http://www.pivovary.info/view.php?cislocclanku=2008030007> (accessed June 14, 2011).
- [25] CHAE, H., JOO, H., IN, M. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: Effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. *Bioresource Technology*, 2001, vol. 76, no. 3, p. 253–258.
- [26] THAMMAKITI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; PHAESUWAN, T.; VERDUYN, C. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. *International Journal of Food Science and Technology*, 2004, vol. 39, p. 21–29.
- [27] FERREIRA, I., PINHO, O., VIEIRA, E., TAVARELA, J. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2010, vol. 21, p. 77–84.
- [28] JACK W. FELL, HERMAN J. PHAFF, GRAEME M. WALKER, "Yeast," in *AccessScience*, ©McGraw-Hill Companies, 2008, <http://www.accessscience.com> (accessed June 14, 2011).

- [29] *COMMUNICATION FROM THE COMMISSION. Biomass action plan. COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES: Brussels, 7. 12. 2005. COM (2005) 628 final.*
- [30] DIOGUARDI, F. Nutrition and skin. Collagen integrity: a dominant role for amino acids. *Clinics Dermatology*, 2008, vol. 26, p. 636–640.
- [31] LIU, L., KERRY, J. Application and assessment of extruded edible casings manufactured from pectin and gelatin/sodium alginate blends for use with breakfast pork sausage. *Meat science*, 2007, vol. 75, p. 196–202.
- [32] MOKREJŠ, P., LANGMAIER, F. *Aplikace přírodních polymerů*. 1st ed. Zlín: UTB Zlín, 2008. ISBN 978-80-7318-674-6
- [33] KARIM, A., BHAT, R. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 2009, vol. 23, p. 563–576.
- [34] FRIESS, W. Collagen – biomaterial for drug delivery 1. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998, vol. 45, p. 113–136.
- [35] LANGMAIER, F., MOKREJŠ, P., KARNAS, R., MLÁDEK, M., KOLOMAZNÍK, K. Modification of chrome-tanned leather waste hydrolysate with epichlorhydrin. *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 2005, vol. 90, p. 29–34.
- [36] KRAUS, M., SCHNEIDER, P., BERÁNEK, L. *Chemická kinetika pro inženýry*. 1st ed. Praha 1: SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1978. 392 p. ISBN 04-621-78.
- [37] KOLOMAZNÍK, K., PECHA, J., FRIEBROVÁ, V., JANÁČOVÁ, D., VAŠEK, V. Biostimulator diffusion into plant tissue. *Heat and Mass Transfer*, 2011 (v tisku)
- [38] PATRICK, L. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature.. *Journal of Clinical Therapeutic*, 2004, vol. 9/3, no. 239, p. 239–58.
- [39] PONCE DE LEÓN, C., BAYÓN, M., PAQUIN, C., CARUSO, J. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods.. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, vol. 92/4, p. 602–610.
- [40] ZHANG, T., YANG, H., WANG, R., XU, K., REN, G., ZHOU, G., ZHANG, C., WANG, L., ZHANG, Z. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine



increases body weight and muscle composition in mice. *Vaccine*, 2011 (article in press).

- [41] LIU, H., WANG, Q., HE, Y. Immunoactivities and antineoplastic activities of *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 83, p. 1690–1695.
- [42] JUNG, E., SUH, H., KIM, S., HONG, Y., CHANG, U. Appetite Suppressive Effects of Yeast Hydrolysate on Nitric Oxide Synthase (NOS) Expression and Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) Immunoreactivity in Hypothalamus. *Phytother. Res.*, 2008, vol. 22, p. 1417–1422.
- [43] JUNG, E., LEE, H., CHANG, U., BAE, S., KWON, K., SUH, H. Acute and subacute toxicity of yeast hydrolysate from *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem. Toxicol.*, 2010, vol. 48, p. 1677–1681.
- [44] JUNG, E., LEE, H., CHOI, J., RA, K., KIM, M., SUH, H. Glucose Tolerance and Antioxidant Activity of Spent Brewer's Yeast Hydrolysate with a High Content of Cyclo-His-Pro (CHP). *Journal of Food Science*, 2011, vol. 76, p. 272–278.
- [45] HOSEINIFAR, S., MIRVAGHEFI, A., MERRIFIELD, D. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 2011, vol. 318, p. 90–94.
- [46] ROLLINI, M., MUSATTI, A., ERBA, D., BENEDETTI, A., GIRARDO, F., MANZONI, M. Process for obtaining copper-enriched cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 2011, vol. 46, p. 1417–1422.
- [47] *Effect of a yeast hydrolysate on in vitro ruminal fermentation of three tropical forages: XIV. Jordanas sobre Producción Animal, Espana, 17 y 18 de Mayo de 2011.* Edited by Diáz, C., Carro, M., Mateos, I., Tejido, M., Ranilla, M. 2011. ISBN 978-84-615-0062-8.
- [48] ALMEIDA, J., MODIG, T., PETERSSON, A., HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M. Increased tolerance and

conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2007, vol. 89, p. 340–349.

- [49] ZHAO, J., XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, vol. 49, p. 28–32.
- [50] CUNHA-PEREIRA, F., RAQUEL HICKERT., L., TEIXEIRA SEHNEM, N., et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, p. 4218–4225.
- [51] ZHONG-MIN, L., KE-QUAN, Ch., JIAN, L., PENG, Z., DAN, L., MIN, J. Utilization of Yeast Hydrolyzates in Succinic Acid Fermentation. *Food Science*, 2009, vol. 19
- [52] YI, Z., LI, X., WANG, J., SUN, Y., ZHUANG, F. The postmitotic *Saccharomyces cerevisiae* after spaceflight showed higher viability. *Advances in Space Research*, 2011, vol. 47, p. 2049–2057.
- [53] RAPPAPORT, A., BOROVIKOVA, D., KOKINA, A., PATMALNIEKS, A., POLYAK, N., PAVLOVSKA, I., MEZINSKIS, G., DEKHTYAR, Y. Immobilisation of yeast cells on the surface of hydroxyapatite ceramics. *Process Biochemistry*, 2011, vol. 46, p. 665–670.
- [54] PADUKONE, S., NATARAJAN, K. Microbially induced separation of quartz from calcite using *Saccharomyces cerevisiae*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011 (article in press).
- [55] SONG, H., JANG, S., PARK, J., LEE, S. Modeling of batch fermentation kinetics for succinic acid production by *Mannheimia succiniciproducens*. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 40, p. 107–115.
- [56] LIN, S., DU, Ch., KOUTINAS, A., WANG, R., WEBB, C. Substrate and product inhibition kinetics in succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, vol. 41, p. 128–135.

- [57] MEGAWATI, SEDIAWAN, W., SULISTYO, H., HIDAYAT, M. Kinetics of sequential catalyst concentration. *Bioresource Technology*, 2011, vol. 102, p. 2062–2067.
- [58] *Dictionary of Food Science and Technology*. International Food Information Service (IFIS Publishing), 2005. 413 s. ISBN 978-1-4051-2505-5.
- [59] Automatický analyzátor aminokyselin AAA400, příručka uživatele, 2007
- [60] CRANK, J. *The mathematics of diffusion*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1975.
- [61] ČSN ISO 1871. *Potraviny a krmiva - Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla*. Praha: Český normalizační institut, 2010. 10 p.
- [62] Laboratorní návod na stanovení Biuretovy reakce, Laboratoř ÚAŘT, UTB ve Zlíně
- [63] WALKER, J. *The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation*. 2nd ed. 2002. ISBN 10.1385/1-59259-169-8.
- [64] BRAZEE, R., BUKOVAC, M., ZHU, H. Diffusion model for plant cuticular penetration by spray-applied weak organic acid bioregulator in presence or absence of ammonium nitrate.. *Trans. ASAE*, 2004, no. 47, p. 629–635.
- [65] FERNÁNDEZ, V., EICHERT, T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization.. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 2009, vol. 28, p. 36–68.
- [66] LIU, Z., GASKIN, R. Visualisation of the uptake of two model xenobiotics into bean leaves by confocal laser scanning microscopy: diffusion pathways and implication in phloem translocation. *Pest Manag Sci*, 2004, vol. 60, no. 5, p. 434–439.

[67] ČSN 56 0130-4 (560130). *Metody zkoušení cukrářských výrobků. Část 4: Stanovení popela a jeho podílu nerozpustného v kyselině*. Praha: Český normalizační institut, 1995. 8 p.

## 12. SEZNAM PUBLIKACÍ

### **Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem**

KOLOMAZNÍK, K., PECHA, J., FRIEBROVÁ, V., JANÁČOVÁ, D., VAŠEK, V. Biostimulator diffusion into plant tissue. *Heat and Mass Transfer*, 2011.

PECHA, J., FURST, T., KOLOMAZNÍK, K., FRIEBROVÁ, V., SVOBODA, P. Protein Biostimulant Foliar Uptake Modeling: The Impact of Climatic Conditions. *AIChE J.*, 2011.

### **Příspěvky ve sbornících z konferencí ve světovém jazyce**

*Technology of fleshings pre-treatment for high quality biodiesel production: II International Leather Engineering Congress 2011, 12-13 May 2011, Izmir, Turkey.* Edited by KOLOMAZNÍK, K., PECHA, J., ŠÁNEK, L., FRIEBROVÁ, V., FÜRST, T.

### **Příspěvky ve sbornících z konferencí v jiném než světovém jazyce**

*Využití kolagenových odpadů pro výrobu induktorů rezistence kulturních rostlin: Odpadové fórum 13. - 15. dubna 2011, Kouty nad Desnou.* Edited by FRIEBROVÁ, V., KOLOMAZNÍK, K., PECHA, J. 2011.

## 13. CURRICULUM VITAE

### OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení, titul: Veronika Friebrová, Ing.  
Datum narození: 27. 3. 1984  
Stav: Svobodná  
Adresa: Na Honech III / 4926, Zlín, 760 05  
E-mail: [friebrova@ft.utb.cz](mailto:friebrova@ft.utb.cz)  
Tel: +420 605 977 906

### VZDĚLÁNÍ

2008 až současnost Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická  
*Doktorské studium, obor: Technologie*  
makromolekulárních látek

Disertační práce na téma: Vývoj technologií zpracování biomasy jako zdroj hodnotných bílkovin a jejich hydrolyzátů.

2006 - 2008 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická  
*Magisterské studium, obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin*

Diplomová práce na téma: Stanovení kinetiky hydrolýzy vytvrzených proteinových kolagenových materiál.  
Práce obhájena dne: 2. 6. 2008

udělen titul: *Ing.*

2003 - 2006 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta Technologická  
*Bakalářské studium, obor: Chemie a technologie potravin*

Bakalářská práce na téma: Biologicky aktivní látky v rostlinách Žen - šen  
Práce obhájena dne: 20. 6. 2006

udělen titul: *Bc.*

1999 - 2003                      Střední průmyslová škola mlékárenská, Štěchovice 1358,  
Kroměříž  
*Studijní obor: Analýza potravin*

1990 – 1999                      16. Základní škola Zlín, Okružní 4685

### **PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI**

2009 - 2010                      Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Pozice: Odborný pracovník pro řešení výzkumného  
záměru

2011 - 2012                      Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Pozice: Výzkumný pracovník v Regionálním výzkumném  
centru Cebia-tech

### **OSTATNÍ ZNALOSTI**

Cizí jazyky:                      Angličtina: aktivně (úroveň středně pokročilý)  
Němčina: pasivně (úroveň základní)

Práce s počítačem:              Microsoft Word, Microsoft Excel, Powerpoint,  
OpenOffice, práce s internetem

Řidičský průkaz:                skupina B (aktivní řidič)

### **ZÁJMY**

Cestování, sport – squash, kalanetika, brusle, plavání, zvířata, divadlo, četba.

## **14. SEZNAM PŘÍLOH**

**PŘÍLOHA A** – Článek publikovaný ve vědeckém časopise

**PŘÍLOHA B** – Článek publikovaný ve vědeckém časopise



## Protein Biostimulant Foliar Uptake Modeling: The Impact of Climatic Conditions

Jiří Pecha

Dept. of Automation and Control Engineering, Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic

Tomáš Fůrst

Dept. of Math. Analysis and Applications of Mathematics, Faculty of Science, Palacký University, Tomkova 40, 779 00 Olomouc-Hejčín, Czech Republic

Karel Kolomazník and Veronika Friebová

Dept. of Automation and Control Engineering, Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic

Petr Svoboda

Dept. of Polymer Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech Republic

DOI 10.1002/aic.12739

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

*Biostimulants are substances which promote plant metabolism and are able to increase yields of various crops. However, their efficiency at field can be affected by climatic conditions. A novel mathematical model based on diffusion transport mechanism is proposed to predict the biostimulant uptake at different climatic conditions. The main input model parameter is experimentally measured effective diffusion coefficient of the biostimulant. The model is applied to a biostimulant prepared from leather waste by enzymatic hydrolysis. Simulations show that climatic conditions have significant impact on biostimulant penetration and should not be neglected in biostimulant application and further research. The suggested model is able to explain observed differences between laboratory and field biostimulant investigations, as well as draw recommendations for protein biostimulant application. The model also shows that the theoretical tools of chemical engineering can be used for optimization of biostimulant performance. © 2011 American Institute of Chemical Engineers AICHE J, 00: 000–000, 2011*

*Keywords: biostimulant, diffusion, protein hydrolysate, foliar uptake, mathematical modeling*

### Introduction

The term “biostimulant” or “biostimulator” usually refers to a substance which is able to promote growth of plants or to enhance their metabolism.<sup>1,2</sup> Even though biostimulants are commonly applied in small quantities, they are able to increase plant tolerance to abiotic stresses,<sup>2</sup> improve nitrogen use efficiency,<sup>2</sup> induce defense responses,<sup>3</sup> and also raise yields of various crops.<sup>4</sup> As a result, biostimulants can lower the amount of necessary mineral fertilizers through more efficient nutrient utilization and, consequently, also decrease costs of the production and environmental pollution caused by extensive fertilizer application.<sup>2,5</sup> Their recent investigation was, therefore, motivated by the effort to develop an environmentally friendly system which is able to produce quality crops with competitive yields and ensure plant health even in stress conditions.<sup>1,2</sup>

Biostimulants are generally divided into three groups: humic substances, seaweed extracts and amino acid-containing products.<sup>5</sup> The last group includes protein hydrolysates which are prepared by hydrolysis of a suitable protein substrate, and consequently these hydrolysates can be considered “natural biostimulants”.<sup>4</sup> Obviously, the efficiency of different hydrolysates is influenced by the choice of the protein substrate and by the specific conditions of the hydrolysis procedure and must be, thus, assessed individually. Several articles on this topic appeared recently. Erani et al.<sup>5</sup> and Schtavyon et al.<sup>2</sup> found that protein hydrolysates were able to improve conventional fertilizer efficiency. Apone et al.<sup>3</sup> concluded that a mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls induced defense mechanisms to stresses not only in plants, but also in cultured skin cells, which makes it interesting as a potential cosmeceutical. Positive effects on plant metabolic system were reported by Kaufmann et al.<sup>1</sup> and overall improvement of plant health and crop yields were reviewed in the article by Maini.<sup>4</sup> In addition, protein hydrolysates can also be prepared from byproducts of leather and food industry, which makes their

Correspondence concerning this article should be addressed to J. Pecha at [pecha@fai.zlu.cz](mailto:pecha@fai.zlu.cz).

production interesting also from the economical and waste management points of view.<sup>6</sup>

However, while results obtained in a highly controlled and repeatable laboratory environment are promising, performance of biostimulants in the field conditions may be inconclusive.<sup>7</sup> Unfortunately, field and laboratory conditions as well as the entire experimental design differ in many aspects which may contribute to this phenomenon. Nevertheless, according to the available biostimulant investigations, one can conclude that biostimulants are systemic agents. As such, they must penetrate into the plant body and reach active sites to affect the plant. Hence, their successful penetration into the plant tissue is necessary condition for a reliable biostimulant efficiency evaluation. Moreover, if the uptake of the biostimulant can be assessed and the crucial factors of this process evaluated, it is possible to optimize its penetration and, thus, enhance the biostimulant efficiency and, consequently, lower the overall costs. The importance of this task is well recognized namely in the area of pesticide science in which the xenobiotics uptake has been studied for the past decades.<sup>7</sup> Since biostimulants are usually foliarly applied, we will deal with this route of uptake. Foliar uptake is essentially a diffusion process.<sup>8</sup> A substance which is to penetrate the leaf tissue to reach an active site in the plant body must diffuse through the leaf prime barrier—the cuticle.<sup>9</sup> The cuticle of higher plants is composed of lipophilic substances—cuticular waxes and the polymers cutin and cutane.<sup>7,10</sup> Diffusion across this hydrophobic barrier is considered to be the transport-limiting step during the whole transport process of a substance applied onto the leaf surface.<sup>8,11</sup> That is the reason why many studies of foliar uptake are focused mainly on investigation and modeling of cuticular penetration.

Various mathematical models of foliar uptake were proposed in the literature (e.g., see <sup>10,12–15</sup>), and for most of them results of their validation were also presented. The majority of suggested models are based either on the modification of the Fick's laws of diffusion<sup>10,13</sup> or employ empirical and semiempirical expressions.<sup>12,14</sup> Even though predictions of empirically based models are usually well correlated with the experimental data (e.g., see<sup>12</sup>), their use is limited to the specific measurement conditions. In addition, the published models were mostly designed for penetration of lipophilic compounds, which makes their application for the modeling of protein hydrolysate foliar uptake problematic because these protein compounds are mainly mixtures of polar and ionic molecules of various lengths. (The biostimulant consists of small molecules of free amino acids as well as larger molecules—mainly oligopeptides and a small fraction of long proteins.) To be more specific, the questionable feature of the aforementioned cited models lies mainly in their assumption that small and mainly lipophilic molecules may penetrate across the plant cuticle also after the solvent (which carries the active ingredient) has evaporated. Of course, this assumption should be valid since the cuticle consists of hydrophobic materials where lipophilic substances can be solubilized. However, using the same approach for hydrophilic and high-molecular protein biostimulants uptake modeling does not seem appropriate. More precisely, zero penetration of the active ingredient should be assumed after the solvent complete evaporation. This approach is strongly supported by the work of Schönher et al.<sup>16,17</sup> who observed that penetration of potassium<sup>16</sup> and calcium<sup>17</sup> salts across

the pear leaf cuticles practically stopped when the outer humidity decreased under the point of deliquescence of these salts.

For the sake of completeness, we report that also very complex models were published, which assume different routes of uptake (not only foliar).<sup>18</sup> However, such models usually need many input parameters and, moreover, some of them are also difficult to measure. The results predicted by such models with some of the precise input data unavailable may differ by several orders of magnitude from the experimentally measured uptake.<sup>19</sup>

The objective of our study is to develop a mathematical model suitable for comparison of protein biostimulant uptake at miscellaneous types of climatic conditions (especially at various levels of air humidity, temperature, and wind velocity). The model is based on the chemical engineering approach, mass transfer of the biostimulant into the plant tissue is modeled according to the known mechanisms of the physical processes involved (Fick's law and evaporation modeling).

This work shows that the theoretical tools of chemical engineering are of value not only in the area of biostimulant production itself (i.e., in the engineering and process design of the hydrolysis reaction), but also in the application of the final product at field conditions. Our aim is to obtain qualitative results (based on sound physical principles), which help us to understand how the weather may influence the complex process of biostimulant penetration into the plant tissue. The model enables us to define the optimal climatic conditions to maximize the biostimulant uptake and, consequently, maximize its positive effect and minimize costs of the application. Moreover, the model can explain why the performance of various biostimulants at field conditions may fluctuate without any apparent cause.

#### Uptake mathematical model

Biostimulant is supposed to enter the inner volume of the plant mainly through the leaves, let us, therefore, concentrate on the modeling of this route. Consider the surface of a leaf covered (from both sides) by a water solution of the biostimulant. The thickness of the leaf is considered uniform, much smaller than the other two dimensions. This allows us to come to one-dimensional (1-D) setting where the space variable denotes the thickness of the leaf. Even though the solution of an active ingredient is in practice often applied in the form of droplets on the leaf surface, the assumption of a film formation is justified by several facts: A similar approach was used for modeling of cuticular penetration by an ionic compound,<sup>10</sup> and the model was satisfactorily able to quantitatively predict experimentally measured uptake from droplets, i.e., from the finite-dose diffusion system. Moreover, the applied solution usually contains surfactants which enhance droplet spread area and, therefore, it is possible to obtain also thin surface film.<sup>19</sup> In addition, certain microorganisms which were observed after repeated foliar application of nutrients can contribute to increased wettability of the leaf surface,<sup>20</sup> which can also result in a formation of a surface film. We further assume that the leaf is isotropic so that axisymmetry can be exploited. Both sides of the leaf (upper and lower) are assumed to absorb the biostimulant in the same way. All these assumptions neglect some details of the complex process of biostimulant uptake; nevertheless, they allow us to capture the possible discrepancy between

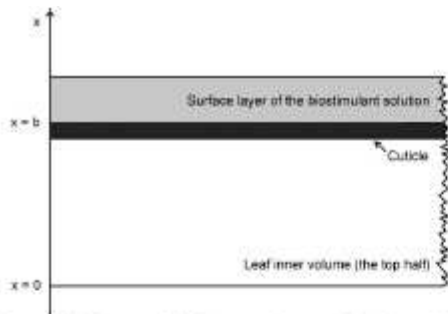


Figure 1. Scheme of leaf geometry used in the uptake model.

laboratory and field conditions, and also to estimate the impact of weather on the process, without interfering with other factors.

Let us denote  $2b$  by the thickness of the leaf, the independent space variable  $x$  stands for the distance from the center of the leaf (thus  $x = 0$  is at the center,  $x = b$  on the upper surface, and  $x = -b$  on the lower surface, see Figure 1). The time variable is denoted by  $\tau$ .

Concentration of the biostimulant inside the leaf  $c(\tau, x)$  is then a function of space and time. On the surface of the leaf, there is a layer of the biostimulant solution of the volume  $V_0$ . Let us denote by  $c_0(\tau)$  the concentration of the biostimulant in this layer and let us suppose that the solution is homogeneous, thus,  $C_0$  is a function of time only. Furthermore, it is necessary to account for the possible evaporation of water from the solution, which decreases the volume  $V_0$ , and, thereby possibly increasing the concentration  $c_0$ .

Let us first model the concentration of the biostimulant in the solution layer. Two processes act one against the other. First, the concentration decreases due to the infiltration of the biostimulant into the inner space of the leaf. Second, the concentration increases due to the evaporation of the water from the solution. By balancing the mass  $m_0(\tau)$  of the biostimulant in the layer during an infinitesimal time  $d\tau$  we obtain

$$m_0(\tau + d\tau) = m_0(\tau) - SD\partial_x c(b, \tau)d\tau \quad (1)$$

The last term in the equation stands for the decrease of the mass due to penetration into the leaf. Here,  $S$  denotes the surface of the leaf, and  $D$  the effective diffusion coefficient. In Eq. 1, evaporation is not present, since it is only water which evaporates. Writing Eq. 1 in terms of concentration, we get

$$V_0(\tau + d\tau)c_0(\tau + d\tau) = V_0(\tau)c_0(\tau) - SD\partial_x c(b, \tau)d\tau$$

which, after taking the limit  $d\tau \rightarrow 0$  results in the balance equation

$$\partial_\tau [V_0(\tau)c_0(\tau)] = -SD\partial_x c(b, \tau) \quad (2)$$

The initial concentration of the biostimulant  $c_0(0)$  is equal to a known concentration of prepared biostimulant solution  $c_{0p}$ .

The volume of the surface layer decreases due to evaporation. The evaporated amount of water can be estimated by physically-based relationship (Dalton's equation) in which the

transferred amount is directly proportional to the difference between actual water-vapor pressure in the air and saturated water vapor pressure  $p_s$  with the proportionality constant  $k$  (i.e., mass-transfer coefficient). Saturated water-vapor pressure of pure water is used (at the temperature of air), the effect of biostimulant on water-vapor pressure  $p_s$  is, thus, omitted. If an air relative humidity is employed instead of water-vapor pressure, the whole surface-layer volume function can be expressed as

$$V_0(\tau) = V_0(0) - \frac{k(U) \cdot p_s(T) \cdot (1 - \phi) S \tau}{\rho} \quad (3)$$

where  $\rho$  is the density of the water, and  $\phi$  relative humidity of the air. Since the partial pressure of saturated water vapor  $p_s$  is a function of temperature, we shall use the empirical relation published by Tetens,<sup>21</sup> which offers very good interpolation of real experimental data in temperature range convenient for our simulation

$$p_s = 611 \exp\left(\frac{17.27 T - 273.2}{T - 36}\right) \quad (4)$$

We further presume that mass-transfer coefficient  $k$  is a function of wind speed only. Although the evaporation is influenced also by radiation and, more specifically, it is a process of simultaneous heat and mass transfer, models limited to mass-transfer only are able to calculate the evaporated amount adequately.<sup>22,23</sup> Moreover, the experimental evaporation rates may significantly fluctuate even in the highly controlled laboratory experiments,<sup>24</sup> and, thus, more complicated mass-transfer coefficient function does not necessarily increase the accuracy of the model. As a result, we employ formula (5) presented by Rohwer<sup>23</sup> which is based on large experimental data obtained at different measuring sites. Note that we do not include the expression which corrects the influence of altitude on the process

$$k(U) = \rho(g + hU) \quad (5)$$

where  $g$  and  $h$  are coefficients of linear wind function, and  $U$  is the wind speed. Equation 3 makes sense for  $\tau < \tau_k$  where  $\tau_k$  stands for the "terminal time" when all the water evaporates. At the terminal time, the process of uptake into the leaf terminates. In modeling of the decrease of the surface layer volume (Eq. 3), only the decreasing volume of the solvent (water) is taken into account (i.e., the decrease of the volume of the biostimulant itself is neglected). This simplification is justified by the low-initial biostimulant concentration (usually in the order of  $10^{-3}$  w/w), and the fact that the dependence of diffusion coefficient on concentration is neglected.

Inside the leaf, the concentration obeys the molecular diffusion equation

$$\partial_\tau c(x, \tau) = D\partial_x^2 c(x, \tau) \quad (6)$$

for  $0 < x < b$  and  $0 < \tau < \tau_k$  with the symmetry boundary condition

$$\partial_x c(0, \tau) = 0 \quad (7)$$

The boundary condition on the surface of the leaf is expressed by

$$c(b, \tau) = c_0(\tau) \quad (8)$$

### Bioestimulant quantification

Biuret method was employed for estimation of bioestimulant concentration. At first, Biuret reagent was prepared by dissolving of 9 g of sodium potassium tartrate tetrahydrate, 3 g of copper sulfate pentahydrate and 5 g of potassium iodide in 400 mL of 0.2 M sodium hydroxide solution. Finally, the solution was diluted to the volume of 1 liter with the 0.2 M sodium hydroxide solution. A bioestimulant sample of volume 0.85 mL was precipitated with 3 M trichloroacetic acid and centrifuged at 5,000 rpm, for 10 min. The supernatant was discarded and 5 mL of biuret reagent was added to the precipitate. Obtained solution was left in dark for 30 min, and was then diluted with demineralized water to the final volume of 10 mL. The solution absorbance against the blank sample was measured at 546 nm with Helios alpha UV-vis spectrometer (ThermoFisher Scientific, Waltham MA, USA). The quantification of samples was done according to the calibration curve measured with prepared bioestimulant solutions of known concentrations.

### Effective diffusion coefficient estimation

Freshly cut off leaves of rapeseed (*Brassica napus var. napus*) were immersed in 7.7% (w/w) bioestimulant solution. The soaking number was equal to 1.5, and the average thickness measured with a calliper was 0.45 mm. Samples of the solution were taken at prescribed time intervals, and the bioestimulant content was quantified by the biuret method described earlier. The measured concentrations were plotted against square root of time and fitted with linear regression. The total bioestimulant uptake is equal to the decrease of bioestimulant amount in the solution and the effective diffusion coefficient can be then estimated from the linear function slope of the following expression based on "Sorption method" by Crank<sup>10</sup>

$$\frac{c_{ip} - c_0(\tau)}{c_{ip} - c_0(\infty)} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{1 + Na}{Na} \cdot \frac{\sqrt{D\tau}}{\sqrt{h^2}} \quad (15)$$

where  $c_0(\infty)$  denotes equilibrium concentration of bioestimulant solution.

### Model solution

The proposed mathematical model is a particular case of a rather a wider class of models considered (see, e.g.,<sup>31</sup>) where the authors prove the existence and uniqueness of a solution. Here, we restrict ourselves to a numerical solution of the model. We use a simple finite difference method, where the second derivative with respect to the space variable is approximated by the second-order central difference and the time derivative is approximated by a forward difference. The resulting numerical scheme is an explicit one, which makes it very easy to implement. The discretization has to meet the well-known requirement of  $dF_0 \leq 1/2dX^2$  in order to be stable. Here  $dF_0$  denotes the dimensionless time discretization step, and denotes  $dX$  the dimensionless space discretization step.

The computation proceeds as follows: First, the boundary conditions (10) and (11) are set. Next, one time step of the diffusion process is performed updating the values of the bioestimulant concentration field. Then the flux of the bioestimulant across the leaf surface is used to update the concentration of the bioestimulant in the surface layer. These three steps are repeated in a time loop until the terminal time is

Table 1. Prepared Bioestimulant Amino Acid Composition

Amino acid	Content (% w/w $\pm$ S.D.)
Asp	6.72 $\pm$ 0.14
Thr	1.74 $\pm$ 0.06
Ser	3.01 $\pm$ 0.12
Glu	8.41 $\pm$ 0.07
Pro	16.47 $\pm$ 0.22
Gly	26.38 $\pm$ 0.84
Ala	10.05 $\pm$ 0.50
Val	2.43 $\pm$ 0.03
Ile	1.60 $\pm$ 0.05
Leu	3.14 $\pm$ 0.01
Tyr	0.47 $\pm$ 0.02
Phe	2.06 $\pm$ 0.07
His	1.67 $\pm$ 0.07
Lys	3.85 $\pm$ 0.11
Arg	10.39 $\pm$ 0.16
Cys	0.23 $\pm$ 0.01
Met	1.37 $\pm$ 0.03

reached (thus  $\tau = \tau_k$ ). See the Appendix for a pseudo-code of the algorithm.

From the mathematical point of view, system of Eqs. 9–14 represents a nonstandard model, because it consists of a (standard) partial differential equation whose boundary condition is governed by an ordinary differential equation. Standard software packages for numerical solution of PDEs are not adapted to solving such systems, we, therefore, developed a simple routine in the MatLab<sup>®</sup> environment to solve the problem.

### Results and Discussion

Prepared model bioestimulant was characterized by its amino acid composition and average molecular weight. These data are necessary for the estimation of bioestimulant quality<sup>2</sup> and its transport properties. Amino acid composition is presented in Table 1, the measured weight-average molecular weight was 18 200 g/mol, and the polydispersity index was equal to 12.1. Despite the molecular weight is quite high, the polydispersity index shows that the prepared model bioestimulant consists of wide range of macromolecules with significantly different chain lengths, i.e., the bioestimulant molecular weight distribution is not uniform. Since protein bioestimulants usually contain fractions of large macromolecules and oligomers as well as free amino acids, and it is still not clear which fraction carries the desired bioestimulant properties, the prepared hydrolysate is suitable for investigation of average bioestimulant transport parameters.

The effective diffusion coefficient was estimated from the total hydrolysate uptake and computed from the expression (15) to be  $9.1 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ . Figure 2 shows the measured experimental data used for the diffusion coefficient estimation according to Eq.15. The calculated value corresponds to data published elsewhere<sup>10</sup>; however, the measured coefficient is low and corresponds to the reported value of the effective cuticular diffusion coefficient (which is the lowest one in the leaf environment). This finding confirms our initial assumption since the rate of penetration is dependent on the size of the penetrating molecule,<sup>28</sup> and, thus, large bioestimulant molecules should diffuse slowly. It should be noted that the selected analytical method does not distinguish between different lengths of molecules, the calculated value is, therefore, an average coefficient among all peptides in the investigated mixture. This is convenient for our purpose of uptake

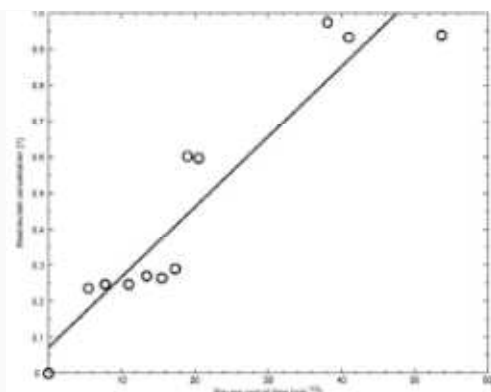


Figure 2. Measured biostimulant uptake used for effective diffusion coefficient estimation.

Biostimulant concentration was calculated according the expression (15).

simulation because virtually all the protein compounds of the biostimulant are taken into account. The effective diffusion coefficient is a cornerstone of the model, since it determines the amount of biostimulant capable of reaching the active sites of the leaf before the terminal time is reached. This, in turn, enables us to select optimal conditions for the biostimulant application (i.e., optimal temperature, humidity, wind speed).

The proposed uptake model takes into account solvent (i.e., water) evaporation from biostimulant solution and its simultaneous diffusion into the leaf. Most experimental studies concentrate on the effect of climatic conditions on the plant biological response (i.e., stomata opening or closing, cuticle permeability, etc.). The model presented here shows that climatic conditions also affect the physical nature of the mass-transport process by changing the concentration gradients driving the uptake of the biostimulant into the plant body. We have compared four different scenarios in order to investigate this physical effect. The input parameters used for the simulations are summarized in Table 2.

The first situation—marked I—describes conditions of an ideal greenhouse. The relative humidity is 100% so that no evaporation occurs, the diffusion process has enough time to reach an equilibrium. The evolution of the simulated biostimulant concentration field inside the leaf is captured in Figure 3. The transparent plane shown in the image (placed

Table 2. Input Parameters of Biostimulant Uptake Simulation

Parameter	Unit	I	II	III	IV
$N_0$	[1]	1	1	1	1
$D$	$[m^2 s^{-1}]$	$9.1 \cdot 10^{-14}$	$9.1 \cdot 10^{-14}$	$9.1 \cdot 10^{-14}$	$9.1 \cdot 10^{-14}$
$\phi$	[%]	100	30	91	91
$T$	[°C]	25	30	12	12
$U$	$[m s^{-1}]$	0.0	7.5	0.2	13.5
$z$	[1]	0.5	0.5	0.5	0.5
$b$	[m]	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$	$10^{-4}$
$c_{D_0}$	$[kg m^{-3}]$	10	10	10	10
$\delta$	[m]	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$
$E_V$	[1]	532	980	66	536

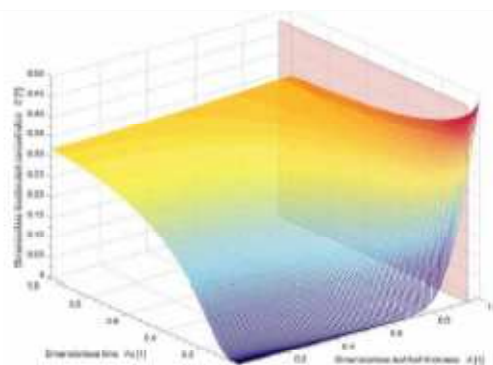


Figure 3. Scenario I: Evolution of the biostimulant concentration field inside the leaf.

The vertical plane represents the bottom of the leaf cuticle. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

beneath the surface layer where  $X = 1$ ) represents the inner boundary of the cuticle. As can be seen, the concentration in the surface layer of the leaf decreases in time and practically constant biostimulant concentration is reached inside the whole leaf when the dimensionless time reaches the unity ( $F_0 = 1$ ).

A completely different situation was simulated in scenario II. The temperature is high, air humidity low, and the wind is strong enough to move small branches (corresponds to Beaufort number 4)—the conditions are selected to match a hot summer day. The calculated concentration field is shown in Figure 4. The figure shows that the uptake process is terminated very quickly (the value of  $F_0$  is as low as 0.0014), and practically no biostimulant reaches the inner volume of the leaf (beneath the cuticle). However, the concentration of biostimulant in the cuticle surface layer becomes very high, especially close to the termination time where its value rockets up. This phenomenon is caused by evaporation which, in

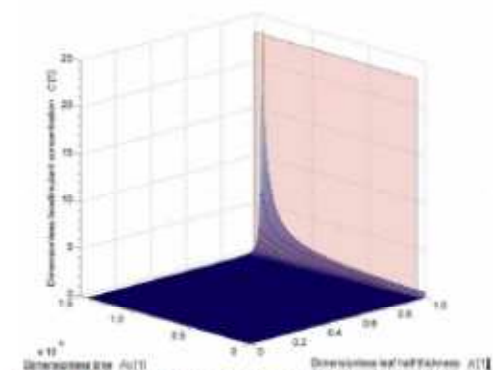
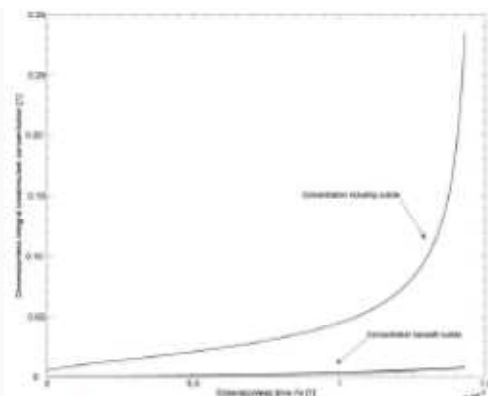


Figure 4. Scenario II: Evolution of the biostimulant concentration field inside the leaf.

The vertical plane represents the bottom of the leaf cuticle. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Figure 5.** Difference between the integral biostimulant concentration inside the leaf including and excluding the cuticle.

this case, proceeds much faster than the biostimulant diffusion. As a result, the biostimulant concentration in the surface film increases which speeds up the uptake because the difference in concentrations across the leaf boundary is the driving force of the uptake process. Nevertheless, the biostimulant present on the leaf surface at the termination time takes the form of a solid residue which cannot further diffuse. The model clearly overestimates the diffusion rate of highly concentrated biostimulant shortly before the termination time, because it uses an average value of effective diffusion coefficient and terminates when all the water has evaporated. Therefore, we conjecture that only biostimulant present beneath the cuticle should be considered capable of affecting the plant, it is improbable that biostimulant trapped within the cuticle is able to penetrate further below when all the solvent on the leaf surface has evaporated. In addition, cuticle permeability itself is also dependent on air humidity,<sup>22</sup> which further decreases the diffusion coefficient. It is common to measure penetration of substances into leaves by methods that quantify only those molecules that penetrate below the cuticle (e.g., see<sup>16,16,17</sup>). These considerations led us to use the average integral biostimulant concentration beneath the cuticle as a convenient measure of biostimulant amount capable of reaching active sites of a plant. This quantity is defined by

$$\bar{c}(t) = \int_{x=0}^{h-\delta} c(t, x) dx \quad (16)$$

where  $\delta$  is the thickness of the cuticle. There is a substantial difference between integral concentration calculated under the cuticle only ( $\bar{c}(t)$ ), and the total integral concentration defined by

$$\tilde{c}_{\text{tot}}(t) = \int_{x=0}^h c(t, x) dx \quad (17)$$

Figure 5 compares the evolution of both these integral averages. The figure reveals that in scope of Scenario II, only a negligible amount of biostimulant is able to penetrate

below the cuticle (cf. Figure 4). Therefore  $\bar{c}(t)$ , the quantity will be used for assessing the total effective concentration of the biostimulant inside the leaf. Thus, in Scenario II, the total amount of biostimulant capable of reaching the active sites of a plant is substantially smaller than in Scenario I.

The next Scenario III, is related to the previous one. The summer day in scenario II is hot but in the night, the temperature falls down which causes the relative humidity to increase significantly (as calculated accurately by means of expression (4)). There is practically no wind and, consequently, the evaporation parameter  $Ev$  is low. However, if wind starts to blow vigorously (Beaufort number 6), the parameter  $Ev$  is changed substantially—such situation is simulated in scenario IV. All four simulations are summarized in Table 3, the results are expressed in terms of the final integral biostimulant concentrations beneath the cuticle. The overall level of penetration of the biostimulant into the plant can be very low if the climatic conditions are not suitable, as presented by Scenario II. It can be calculated that the biostimulant application would have to be repeated approximately 39 times to reach the same level of penetration as in the greenhouse case (Scenario I). However, when slow evaporation occurs, the biostimulant concentration in the solution steadily increases which promotes its diffusion into the leaf. The final integral concentration in such a case (Scenario III) can even surpass the greenhouse case level. On the other hand, even at a suitable humidity level, evaporation can be accelerated, e.g., by wind (Scenario IV) so that the overall level of penetration is reduced (ca. 2/5) compared to the greenhouse scenario.

The simulations performed by means of the suggested model show a considerable impact of climatic conditions on the process of protein biostimulant uptake. This is in agreement with published results.<sup>26</sup> These results advocate for a study of the parameter sensitivity of the model in order to assess the influence of the respective parameters on the biostimulant diffusion more deeply, especially from the point of view of the physical processes involved. The dimensionless formulation of the aforementioned model introduced is particularly suitable for this analysis because it restricts the quantity of parameters to the smallest possible number in a physically reasonable way. The basic input data used for the parameter sensitivity study are summarized in Table 4, only one parameter at a time was varied in the simulations in the following description.

Let us first concentrate on the effect of the relative air humidity. The relative air humidity (precisely the ratio of the actual to the saturated water vapor pressure in the air) is one of the driving forces of water evaporation from the biostimulant solution. Its influence on the uptake process is shown in Figure 6. As discussed earlier, lower relative humidity promotes the hydrolysate uptake due to the increase of its concentration in the surface solution. However, the positive effect of this phenomenon has its

**Table 3.** Calculated Final Integral Biostimulant Concentration beneath the Cuticle

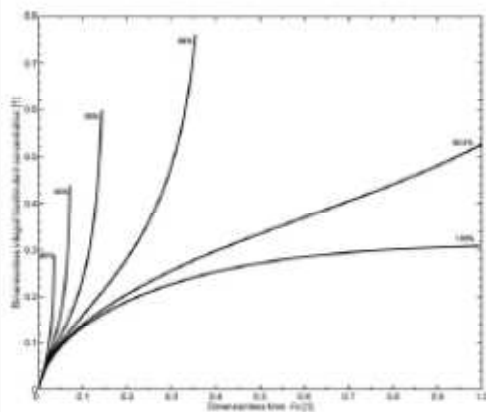
Scenario	Integral concentration [1]
I	0.309
II	0.008
III	0.614
IV	0.190

**Table 4. Basic Input Parameters of Biostimulant Uptake Simulation used for Parameter Sensitivity Study**

Parameter	Unit	Value
$Na$	[1]	1
$D$	$[m^2 s^{-1}]$	$9.1 \cdot 10^{-14}$
$\phi$	[%]	80
$T$	$[^{\circ}C]$	18
$U$	$[m s^{-1}]$	1.0
$z$	[1]	0.5
$b$	[m]	$10^{-4}$
$c_{op}$	$[kg m^{-3}]$	10
$\delta$	[m]	$5 \cdot 10^{-6}$
$Ev$	[1]	139

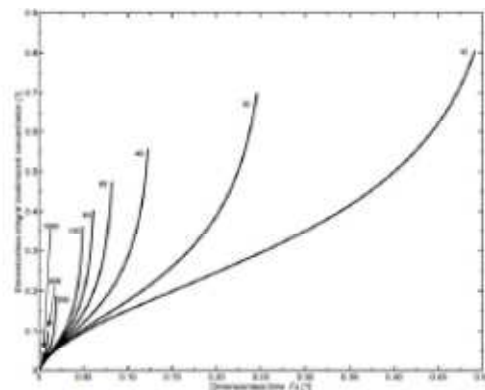
maximum near the 100% humidity level and decreases rapidly with falling levels of relative humidity, because lower levels of humidity cause the termination time  $\tau_1$  (of the solvent complete evaporation) to become shorter so that less biostimulant has the chance to penetrate into the leaf. For example, the surrounding relative humidity of 80% ensures a similar effect as an application at ideal greenhouse conditions. It can, therefore, be recommended that the relative humidity is kept as high as possible during the biostimulant application. Furthermore, high-relative humidity also improves the permeability of leaves to penetrating substances.<sup>25</sup>

Let us now deal with the model sensitivity to the dimensionless parameter  $Ev$  which entangles (among other parameters) the mass-transfer coefficient (dependent on wind speed) and the ratio of the relative diffusion coefficient to the leaf thickness. In practice, the value of  $Ev$  may vary over several orders of magnitude, especially due to the diffusion coefficient and mass-transfer coefficient. Figure 7 shows that the value of  $Ev$  should be kept below the order of 100 to ensure comparable effect to the greenhouse 100% humidity case. The so-called soaking number  $Na$  has a similar effect to  $Ev$ . It determines the thickness of the biostimulant layer relative to the volume of the leaf. It is obvious that thicker layer (with correspondingly higher  $Na$ ) contains a higher amount of biostimulant and provides longer time for the diffusion process which results in an increased final integral concen-



**Figure 6. Influence of the air relative humidity on the biostimulant uptake.**

The integral biostimulant concentration beneath the cuticle is shown.

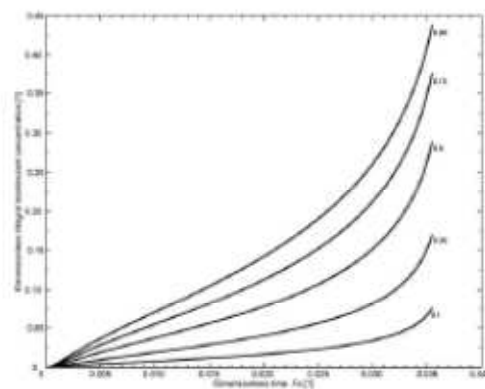


**Figure 7. Influence of the parameter  $Ev$  on the biostimulant uptake.**

The integral biostimulant concentration beneath the cuticle is shown.

tration under the cuticle. However, the thickness of the surface solution layer is largely determined by other application parameters (e.g. coarseness of the spray, solution surface tension) and can, thus, be influenced to a limited extent only.

Leaf porosity is the last parameter discussed. This parameter determines the surface fraction which is accessible for the biostimulant molecules, and also the volume fraction of the leaf where biostimulant diffusion may take place. Figure 8 presents the role of this parameter. It is, thus, advantageous to increase the leaf porosity to maximize the biostimulant uptake. The surface porosity itself is influenced by stomatal opening, which can considerably affect the uptake process<sup>26</sup> (by changing the  $z$  value) as already discussed in the Uptake mathematical model section. However, stomatal penetration can also be enhanced by the application of a suitable surfactant.<sup>26</sup> On the other hand, the use of surfactants simultaneously decreases the physically achievable maximal thickness of the biostimulant solution layer,<sup>33</sup> thus, decreasing the



**Figure 8. Influence of the leaf porosity on the biostimulant uptake.**

The integral biostimulant concentration beneath the cuticle is shown.

value of  $Na$ . If it is possible to assess the change in  $\epsilon$  and  $Na$  caused by a surfactant, the presented model can be used to decide whether the effect of the surfactant is positive or not.

## Conclusions

The proposed uptake model is based on diffusion mechanism and takes into account water evaporation according to known physical relations. The model and its assumptions are appropriate for foliar uptake simulation of hydrophilic and higher molar mass substances, such as protein hydrolysates. The effective diffusion coefficient is the major experimental input parameter, which determines the rate of substance penetration into the leaf. The model is suitable for total uptake estimation for broad range of initial conditions and it is also able to assess the influence of climatic conditions. The results are in good qualitative agreement with published uptake experimental investigations (e.g., see <sup>1,2,16,17,23</sup>), they confirm the decisive role of weather on the uptake of the liquid biostimulant, and they confirm that the uptake proceeds in the order of days. In the literature, <sup>1,2,16,17</sup> the authors usually study the effect of climatic conditions on plant biological responses (stomata opening or closing, cuticle permeability, etc.). However, our model shows that it is necessary to take into account also the impact of climatic conditions on abiotic physical processes involved during the uptake (evaporation rate). From our point of view, this presents an interesting contribution to understanding the process of biostimulant foliar uptake.

The model simulations highlighted that climatic conditions have significant impact on biostimulant penetration which should not be overlooked in their application and research. For example, the overall uptake can be approximately 40 times lower at unsuitable climatic conditions compared to the recommendable ones. The suggested model, thus, may explain the observed discrepancy between laboratory and field biostimulant investigations. It can also draw recommendations for protein biostimulant application in order to maximize its penetration and consequently its positive effect:

1. High-humidity levels largely increase the total uptake, while very low-humidity leads to termination of the whole process and limits the total achievable uptake. It is, therefore, advantageous to apply the biostimulant when the air humidity is near the point of saturation—e.g., after rain, early in the morning, and in the evening (especially when dew falls). High humidity is, thus, inevitable for notable biostimulant effect.

2. Wind impedes the uptake, best results are achieved near zero wind velocities (Beaufort number 0).

3. An increase in biostimulant layer thickness and initial biostimulant concentration lead to higher total uptake.

4. High-leaf porosity values (e.g., caused by stomata opening) promote the diffusion. On the other hand, the action to increase the porosity should not significantly affect the biostimulant layer thickness.

This article shows that the theoretical tools of chemical engineering are of value not only in the area of biostimulant production itself, but also in the application of the final product at field conditions. This approach attempts to describe and understand the mechanisms underlying the biostimulant uptake process.

## Acknowledgments

The project was financed by the the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant no. 7088552102 and 619 895 9214,

by Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant no. QH72117 and internal grant of Tomas Bata University IGA/22/PT/10/D.

## Notation

$b$	leaf half thickness, m
$c$	concentration of the biostimulant inside the leaf, $\text{kg m}^{-3}$
$C$	dimensionless concentration of the biostimulant inside leaf, 1
$c_0$	concentration of the biostimulant in the surface solution, $\text{kg m}^{-3}$
$C_0$	dimensionless concentration of the biostimulant in the surface solution, 1
$c_{0i}$	initial biostimulant concentration in the surface solution, $\text{kg m}^{-3}$
$D$	effective diffusion coefficient, $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$dFo$	dimensionless time discretization step, 1
$dX$	dimensionless space discretization step, 1
$\delta$	thickness of leaf cuticle, m
$Ev$	dimensionless evaporation parameter, 1
$\epsilon$	leaf porosity, 1
$F_0$	dimensionless time, 1
$f$	linear wind function coefficient, $\text{m s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$
$h$	linear wind function coefficient, $\text{Pa}^{-1}$
$\varphi$	air relative humidity, 1
$k$	water mass-transfer coefficient, $\text{kg m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$
$m_0$	biostimulant mass in the surface solution, kg
$Na$	soaking number, 1
$p_s$	saturated water vapor pressure, Pa
$\rho$	water density, $\text{kg m}^{-3}$
$S$	surface of the leaf, $\text{m}^2$
$t$	time, s
$t_k$	terminal time of calculation, s
$T$	temperature, K
$U$	wind speed, $\text{m s}^{-1}$
$V_0$	biostimulant surface solution volume, $\text{m}^3$
$x$	space variable, m
$X$	dimensionless space variable, 1

## Literature Cited

1. Kaufmann III GL, Kneivel DP, Watzhke TL. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Sci.* 2007;47:261–267.
2. Schiavon M, Irtani A, Nardi S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. *J Agric Food Chem.* 2008;56:11800–11808.
3. Apone F, Tito A, Carola A, Arzuffo S, Tontora A, Filippini L, Monoli I, Cucchiara M, Gibetoni S, Chrusceels MJ, Colucci G. A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *J Biotechnol.* 2010;145:367–376.
4. Maini P. The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilizer Agronom.* 2006;1:29–43.
5. Irtani A, Cavani L, Pirzaghelli D, Brandelino E, Altissimo A, Ciavatta C, Nardi S. Biostimulant activity of two protein hydrolysates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J Plant Nutr Soil Sci.* 2009;172:237–244.
6. Kasparkova V, Kolomaznik K, Brtkova L, Sasek V, Simek L. Characterization of low-molecular weight collagen hydrolysates prepared by combination of enzymatic and acid hydrolysis. *JALCA.* 2009;104:46–51.
7. Schreiber L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. *Annals Botany.* 2005;95:1069–1073.
8. Kanderer M, Müller C. *Biology of the Plant Cuticle.* Annual Plant Rev. 1st ed. Vol. 23. Oxford, UK: Blackwell Publishing, Ltd; 2006.
9. Bukovac MJ, Petracsek PD. Characterizing pesticide and surfactant penetration with isolated plant cuticles. *Pesticide Sci.* 1993; 37:179–194.
10. Buzzeo RD, Bukovac MJ, Zhu H. Diffusion model for plant cuticular penetration by spray-applied weak organic acid bioregulator in presence or absence of ammonium nitrate. *Trans ASAE.* 2004;47: 629–635.
11. Schönherr J. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across amonotous cuticular membranes. *Pest Manage Sci.* 2002;58:343–351.



12. Forster WA, Zabkiewicz JA, Riederer M. Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: Evaluation of a logistic-kinetic penetration model. *J Agric Food Chem*. 2006;54:3025–3032.
13. Meiner GN. A simple diffusion model of the effect of droplet size and spread area on foliar uptake of hydrophilic compounds. *Pestic Biochem Physiol*. 2007;88:128–133.
14. Sanchivi NM, Stoller EW, Wan LM, Brislin DP. A nonlinear dynamic simulation model for xenobiotic transport and whole plant allocation following foliar application I. Conceptual foundation for model development. *Pestic Biochem Physiol*. 2000;68:67–84.
15. Schönher J, Baur P. Modelling penetration of plant cuticles by crop protection agents and effects of adjuvants on their rates of penetration. *Pestic Sci*. 1994;42:185–208.
16. Schönher J, Luber M. Cuticular penetration of potassium salts: Effects of humidity, anions, and temperature. *Plant Soil*. 2001; 236:117–122.
17. Schönher J. Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. *J Plant Nutr Soil Sci*. 2001;164: 225–231.
18. Fryer MJ, Collins CD. Model intercomparison for the uptake of organic chemicals by plants. *Environ Sci Technol*. 2000;37:1617–1624.
19. Mengel K, Kirkby A, Kosegatan H, Appel T. *Principles of Plant Nutrition*. 5th ed. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2001.
20. Pesuke AD, Jeschke WD, Dietz KJ, Schreiber L, Hartung W. Foliar application of nitrate or ammonium as sole nitrogen supply in *Ricinus communis* L. Carbon and nitrogen uptake and inflow. *New Phytol*. 1998;138:675–687.
21. Tenen O. Über einige meteorologische Begriffe. *Z Geophys*. 1930;6:297–309.
22. Singh VP, Xu CY. Evaluation and generalization of 13 mass-transfer equation for determining free water evaporation. *Hydrol Process*. 1997;11:311–323.
23. Rohwer C. Evaporation from free water surfaces. *USDA Technical Bulletin*. 1931;271:1–96.
24. Chu CR, Li MH, Chen YY, Kuo YH. A wind tunnel experiment on the evaporation rate of Class A evaporation pan. *J Hydrol*. 2010; 381:221–224.
25. Liu Z, Gaskin RE. Visualization of the uptake of two model xenobiotics into bean leaves by confocal laser scanning microscopy: diffusion pathways and implication in phloem translocation. *Pest Manag Sci*. 2004;60:434–439.
26. Fernández V, Riebet T. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. *Critical Rev Plant Sci*. 2009;28:36–68.
27. Greene DW, Bukovac MJ. Foliar penetration of naphthaleneacetic acid: Enhancement by light and role of stomata. *Amer J Bot*. 1977;64:96–101.
28. Kolomamík K, Mikšák M, Langmayer F, Jančíková D. Experience in industrial practice of enzymatic dedrination of chrome shavings. *JALCA*. 1999;94:55–63.
29. Buřka P, Keř O, Veličková A, Buřková L, Kráľmar S. Effect of acid hydrolysis time on amino acids determination in casein and processed chesnes with different fat content. *J Food Compos Anal*. 2009;22:224–232.
30. Crank J. *The mathematics of diffusion*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, Inc.; 1975.
31. Pánt T, Vodák R. Diffusion with nonlinear adsorption. *Acta Appl Math*. 2009;105:303–321.
32. Schreiber L, Sembs M, Hartmann KD, Diamantopoulos P, Simanova H, Sattmann J. Effect of humidity on cuticular water permeability of isolated cuticular membranes and leaf disks. *Planta*. 2001;214: 274–282.
33. Forster WA, Zabkiewicz JA, Riederer M. Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. *Pest Manag Sci*. 2004;60: 1105–1113.

## Appendix

The pseudo-code of the algorithm of the model. The algorithm was implemented in MatLab R2007b.

```

1. Set parameter values
2. Calculate the terminal time
3. Set discretization parameters dF and dX
4. Set initial values of the concentration field inside the leaf (variable 'con')
5. Set initial value of the concentration in the surface layer (variable 'surcon')
for time = 0:dF:terminal time
  set the boundary values:
  con(1) = con(2); (boundary condition at the center of the leaf)
  con(N) = surcon; (boundary condition at the surface of the leaf)
  perform one step of the diffusion process:
  right = [con(1) con]; right (N + 1) = []; (shift the concentration field to the right)
  left = [con con(N)]; left (1) = []; (shift the concentration field to the left)
  con_new = con + C * (right + left - 2 * con);
  compute the concentration in the surface layer:
  surcon_new = surcon + A * surcon + B * (con(N-1) - con(N));
  update the variables:
  con = con_new;
  surcon = surcon_new;
end

```

Note: A, B and C are constants entangling dF, dX and the input parameters.

Manuscript received Mar 7, 2011, revision received May 25, 2011, and final revision received July 20, 2011.

# PŘÍLOHA B - Článek publikovaný ve vědeckém časopise

Heat and Mass Transfer



## Biostimulator diffusion into plant tissue

Journal:	<i>Heat and Mass Transfer</i>
Manuscript ID:	HMT-11-0204
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	27-May-2011
Complete List of Authors:	Kolomaznik, Karel; Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Applied Informatics Pecha, Jiri; Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Applied Informatics Friebrova, Veronika; Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Applied Informatics Janacova, Dagmar; Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Applied Informatics Vasek, Vladimir; Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Applied Informatics
Keywords:	mass transfer, diffusion, mathematical modeling of transport processes, simulation

SCHOLARONE™  
Manuscripts

ew

University of Hannover, Institut of Thermodynamics, Callinstr. 36, 30167 Hannover, Germany

## Biostimulator diffusion into plant tissue

Karel Kolomazník

*Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlin, nám.  
T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech republic*

Jiří Pecha\*

*Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlin, nám.  
T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech republic*

00420-57-603-5228

[pecha@fai.utb.cz](mailto:pecha@fai.utb.cz)

Veronika Friebrová,

*Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlin, nám.  
T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech republic*

Dagmar Janáčová

*Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlin, nám.  
T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech republic*

Vladimír Vašek

*Faculty of Applied Informatics, Tomas Bata University in Zlin, nám.  
T.G.Masaryka 5555, 760 01 Zlín, Czech republic*

\*Corresponding author

**Abstract** Tanning and food industry generate significant amount of protein waste which can be utilized in agriculture. Very perspective application of these by-products in agriculture is their chemical transformation into "biostimulators" which are substances able to enhance the immune system of cultivated crops and promote plant metabolism. These substances must penetrate into the plant tissue to take any action. However, the time of penetration is limited since the biostimulator must remain in the liquid state. The mathematical model based on diffusion mechanism is presented. With the use of the effective diffusion coefficient of the prepared specific protein hydrolysate, this model helps us to estimate the time necessary for the uptake of the minimal active amount of the biostimulator.

*Keywords: mass transfer, diffusion, mathematical modeling of transport processes, simulation*

## Introduction

Tanning and food industry produce significant amount of waste protein material. In the food industry, protein waste is generated during a large number of processes. In the tanning industry, most of this material comes from the process in which raw hide is transformed into leather [1]. Fortunately, this waste can be treated as valuable raw material in various industries from which agriculture belongs to the most perspective ones [2]. Nowadays, a promising raw stock is collagen protein waste generated by food industry during production of sausage casings, so called collagen paste. It is obtained by alkaline processing of beef calcimine (limed collagen splits) with lime wash. After deliming, pure collagen paste is extracted into an "infinite" cylinder. The batch that does not meet the preliminary mechanical tests is the desired raw stock – waste collagen paste designated for further processing into high quality products. Its value lies in the fact that it consists of practically pure collagen with minimum ash content (less than 0.5% on the free moisture base).

Very perspective application of collagen paste and similar protein wastes in agriculture is their chemical transformation into "biostimulators" (or "biostimulants"). Protein biostimulators enhance the immune system of cultivated crops and thus reduce the need of chemical plant protection agents; they also promote plant metabolic processes [3] and proved to increase the yields of

agriculture crops [4]. A favourable side effect of protein biostimulators is their action as leaf fertilizers.

From the biostimulator research done so far seems to be evident that a biostimulator must penetrate into the plant tissue to take any action [3]. From this knowledge follow the main requirements for biostimulators: good solubility in water (or other selected solvent in general) and fast penetration of the active component into the plant fine inner structure. Both requirements are fulfilled via collagen paste hydrolysis, which can be carried out in both acid and alkaline conditions with the use of proteolytic enzymes in the latter case.

To achieve the maximal positive effect of a biostimulator it is necessary that an optimal amount of the biostimulator penetrates into the treated plant inner volume from the diluted aqueous spray applied on the plant surface. Absorption of the optimal amount by the plant body, however, requires some time, which depends on the biostimulator's concentration gradient on the surface and the value of its effective diffusion coefficient. This idea of biostimulator uptake mechanism was confirmed e.g. by Forster et al [5] who experimentally observed that xenobiotics (in general) uptake by plants is a diffusion process driven by the compound concentration on the plant surface; the uptake then can be regulated by this way. Other important empiric evidence is that as long as the penetration is in progress, the surface film of the biostimulator must be in the liquid state, because if there is quick water evaporation, the transport of the biostimulator ceases due to practically zero value of the effective diffusion coefficient in the solid state. The speed of evaporation depends on climatic and hydrodynamic conditions such as temperature, relative air humidity and wind speed. Other climatic factor necessary to be taken into account is rain - if rain occurs, the surface biostimulator film is washed away and its positive effect will be completely eliminated.

To estimate suitable conditions for spraying in the field, we have worked out a mathematical model which includes simultaneous diffusion of a biostimulator into the plant inner volume and mass transport into the surroundings (air). Since high humidity supports the biostimulator uptake [6], the model is solved for the conditions ideal for penetration, i.e. at 100% relative humidity. The influence of

application parameters on the biostimulator uptake is studied at these ideal conditions and general conclusions are drawn.

## Biostimulator Diffusion Model

Let us assume a plant surface covered on both sides with a continuous and even layer of liquid containing a dissolved biostimulator. We limit ourselves to a one-dimension model where the spatial variable ( $x$ ) will represent the thickness of the respective plant part. Further, let us assume isotropic properties of the treated plant in relation to the inner mass transport, which enables us to apply an axially symmetric boundary condition for our proposed model. Due to the surface water evaporation, the concentration of the biostimulator  $c_0$  will rise and consequently, the value of the effective diffusion coefficient  $D$  at the boundary (i.e. plant surface) will decrease. This decrease however will be eliminated by the increasing concentration gradient on the treated plant surface and therefore we will consider the value of the effective diffusion coefficient constant during the existence of the liquid phase on the plant surface. In other words, this assumption is valid solely for the mass transport from the surface (the boundary of the model) into the plant tissue, the effective diffusion coefficient in the plant tissue is therefore kept constant in all cases with no regard to the state of the biostimulator surface layer.

$$\frac{\partial c}{\partial \tau}(x, \tau) = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}(x, \tau) \quad 0 < x < b \quad 0 < \tau < \tau_k \quad (1)$$

$$\frac{\partial c}{\partial x}(0, \tau) = 0 \quad (2)$$

$$c(b, \tau) = \varepsilon c_0 \quad (3)$$

$$c(x, 0) = 0 \quad (4)$$

$$c_0(0) = c_{0p} \quad (5)$$

$$V_0(\tau) \frac{\partial c_0}{\partial \tau}(\tau) = -SD \frac{\partial c}{\partial x}(b, \tau) \quad (6)$$

$$V_0(\tau) = V_0(0) - \frac{k c_n (1 - \varphi) \tau S}{\rho} \quad (7)$$

$$c_n = \frac{p_n M}{RT} \quad (8)$$

Equation (1) describes a non-stationary concentration field of the biostimulator in the treated plant body. The time validity of the model is limited to the moment when time  $\tau$  reaches the critical time  $\tau_k$  when all surface water has evaporated and the biostimulator concentration equals its density. In this case, as said before, the value of the effective diffusion coefficient is zero. Equation (2) is condition of an axial symmetry which represents isotropic properties of the plant tissue in relation to the biostimulator inner diffusion. Equation (3) expresses the assumption of a perfect transport of the biostimulator into the plant inner volume,  $\varepsilon$  stands for the plant porosity and  $b$  is the half thickness of the plant part where the diffusion proceeds. However, we should note that the porosity value may vary in relation to the surrounding conditions (e.g. humidity, light, biostimulator polarity) [7], [8]. Equations (4) and (5) are the initial conditions, the concentration of the biostimulator inside the plant tissue  $c$  is equal to zero and the biostimulator concentration in the liquid layer is equal to the initial concentration of the prepared biostimulator solution  $c_{0p}$ . Equation (6) represents mass balance, i.e. the speed of the biostimulator accumulation in the plant body is equal to the diffusion flow on the surface,  $S$  denotes the surface area.  $V_\phi(\tau)$  represents the time dependency of the surface film volume – this dependence is described by (7), where  $\phi$  is the relative air humidity and  $\rho$  is the density of water,  $k$  is the mass-transfer coefficient of water (only water evaporates during liquid layer drying). The term  $c_n$  stands for the concentration of saturated water vapor which depends on the partial pressure of water vapor; this is given by (8) where  $p_n$  is the partial pressure of water vapor at the point of saturation,  $M$  stands for the molar mass of water,  $R$  is the universal gas constant and  $T$  is the absolute air temperature which is equivalent to the saturation temperature. The geometry of the mathematical model is summarized in Fig. 1.

Fig.1

In the case when air is saturated with water vapor, the second term of the right side in equation (7) equals zero and then the surface film volume is constant. Since biostimulator concentration in the solution is very low (approx. 0.5 % w/w) the decrease of the biostimulant surface volume caused by the biostimulator

diffusion into the plant can be neglected. This represents an idealized situation of the biostimulator penetration. As a result, the model becomes linear. Here it is advantageous to introduce dimensionless variables for the solution of the model.

The following dimensionless variables were used:

$$Fo = \frac{D\tau}{b^2}, \quad (9)$$

$$X = \frac{x}{b}, \quad (10)$$

$$C(X, Fo) = \frac{c}{\varepsilon c_{0p}}, \quad (11)$$

$$C_0(Fo) = \frac{c_0}{c_{0p}}, \quad (12)$$

$$Na = \frac{V_0(0)}{Sb}. \quad (13)$$

The dimensionless variables help us to obtain the dimensionless formulation of the mathematical model (1) – (6) in the form of the following partial differential equations:

$$\frac{\partial C}{\partial Fo}(X, Fo) = D \frac{\partial^2 C}{\partial X^2}(X, Fo) \quad 0 < X < 1 \quad 0 < Fo < Fo_k \quad (14)$$

$$\frac{\partial C}{\partial X}(0, Fo) = 0 \quad (15)$$

$$C(1, Fo) = C_0 \quad (16)$$

$$C(X, 0) = 0 \quad (17)$$

$$C_0(0) = 1 \quad (18)$$

$$\frac{Na}{\varepsilon} \frac{\partial C_0}{\partial Fo}(Fo) = -\frac{\partial C}{\partial X}(1, Fo) \quad (19)$$

The solution of the model expressed by dimensionless variables is then:



$$C(X, Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} + 2Na \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\cos(X \cdot g_n) \cdot \exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon \cos(g_n) - \frac{\varepsilon \sin(g_n)}{g_n} - g_n Na \sin(g_n)} \quad (20)$$

Equation (20) describes a non-stationary concentration field in the treated plant body. The concentration in the surface layer changes with time as a result of the diffusion process and is given by the following equation:

$$C_0(Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} + 2Na \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon + Na + \frac{Na^2 g_n^2}{\varepsilon}} \quad (21)$$

From the practical point of view it is important to work with the integral mean concentration of the biostimulator in the treated plant inner volume. The integral mean concentration and its dependence on the dimensionless time  $Fo$  is given by equation (22) with parameter  $Na$ , which stands for the ratio of the surface liquid layer volume to the volume of the plant (see (13)). This dimensionless parameter is sometimes called "soaking number". The term  $g_n$  in equations (20), (21) and (22) represents the  $n$ -th root of equation (23).

$$\bar{C}(Fo) = \frac{Na}{Na + \varepsilon} - 2Na^2 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\exp(-Fo \cdot g_n^2)}{\varepsilon^2 + Na\varepsilon + Na^2 g_n^2} \quad (22)$$

$$\tan(g_n) = -\frac{Na \cdot g_n}{\varepsilon} \quad (g_n > 0) \quad (23)$$

The most important experimental parameter in the biostimulator diffusion model described above is the value of the effective diffusion coefficient. It can be estimated from the sorption type of measurement, in which the decrease of concentration caused by biostimulator penetration into plant is measured. The decrease in concentration is linearly dependent on the square root of time. Crank [9] suggested the following description of the sorption method of measurement

$$C_0(\tau) = \frac{c_{0p} - c_0(\tau)}{c_{0p} - c_0(\infty)} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{1 + Na}{Na} \sqrt{\frac{D\tau}{b^2}}, \quad (24)$$

where the infinite time is used for the equilibrium (and thus time independent) state of the system. The equilibrium concentration at this time (i.e.  $c_0(\infty)$ ) can be calculated from the following mass balance of the sorption system measuring cell:

$$c_{0p}V_0 = c_0(\infty)V_0 + \varepsilon c_0(\infty)V. \quad (25)$$

7

We may therefore estimate the steady-state concentration in the system as

$$c_0(\infty) = \frac{c_{0p} Na}{Na + \varepsilon}. \quad (26)$$

Moreover, we may assume one-component diffusion, because very low biostimulator concentration in aqueous solutions (less than 1% w/w) is usually used for biostimulator application in the agriculture.

## Experimental

A commercial protein hydrolysate obtained from enzymatic hydrolysis of chrome tanned waste was provided by the STOSPOL company (Valašské Meziříčí, Czech Republic). This material was used as a model biostimulator. Its dry matter was determined by drying to constant weight at 103 °C and a set of solutions with different biostimulator concentrations was prepared. Common Biuret method was used for quantification of protein content in the solution. Then, fresh leaves with petioles with sealed ends were immersed into a biostimulator solution of known concentration. The actual concentration of the solution was measured periodically and the effective diffusion coefficient was estimated from the obtained data according to (24) – i.e. the concentrations were plotted against the square root of time and from the slope of linear regression the diffusion coefficient was calculated.

## Results and Discussion

The effective diffusion coefficient was estimated by the above described method. The measured dependency of biostimulator dimensionless concentration (according to (24)) on the square root of time is depicted in Fig. 2.

Fig.2

It should be emphasized that this measurement is a rough estimation of the actual diffusion coefficient value. The diffusivity of the biostimulator itself is influenced by the plant response to air humidity, light and many other factors [7]. However, a model that takes into account only the substance diffusivity is simple and can describe the uptake process both qualitatively and quantitatively [10]. In addition,

Fig. 2 also sufficiently confirms the assumption of diffusion linearity which is necessary for legitimate effective diffusion coefficient estimation according to (24); the linear regression correlation coefficient is 0.87. The computed value of the effective diffusion coefficient is  $1 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ . This value is quite low; nevertheless, such result was presumed since the protein biostimulator consists predominantly of long macromolecules which diffuse slowly; also the experiments done by Schönherr et al [11] showed that the rate of compound penetration into plant tissue is dependent on the compound molecular weight. The measured effective diffusion coefficient was used in further simulations.

Humidity in greenhouses is often near the point of saturation which ensures sufficient time for penetration of slow-diffusing long macromolecules of protein biostimulators. The dimensionless concentration field and its evolution in time are depicted in Fig. 3.

Fig. 3

The biostimulator concentration on the leaf surface ( $X = 1$ ) is controlled by the boundary condition (16). As can be expected, the concentration is high in the beginning of the process and decreases in time towards the lower equilibrium concentration. Fig. 3 reveals that nearly constant biostimulator concentration in the entire leaf is achieved beyond dimensionless time  $Fo$  value 1. If the thickness of the penetrated plant tissue is 0.5 mm (thus  $b = 0.25 \text{ mm}$ ) and the biostimulator's diffusion coefficient is of the above measured value, one can easily calculate that the surface biostimulator layer must remain in a liquid state nearly two months in order to obtain constant biostimulator concentration in the tissue. On the other hand, the hydrolysate contains also smaller molecules with lower diffusion coefficient which can diffuse at substantially higher rate. In case their diffusion coefficient is approximately  $1 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ , the time sufficient for the achievement of the constant concentration is "only" 174 hours. Let us note that the uptake of small organic molecules usually takes few days [10, 6]. In the light of these facts the presented results seem to be very reasonable. It should also be noted that the concentration profile is in reality influenced also by the biostimulator transport into other parts of the plant [8]. Nevertheless, estimation

of the time necessary for penetration of the minimal active amount of biostimulator is of major importance in praxis. The presented model calculates the rate of biostimulator penetration and with its help the above mentioned practical time can be estimated.

It is useful to express the overall amount of biostimulator which has penetrated through the plant surface in terms of integral mean concentration given by equation (22). The resultant integral mean concentration is dependent on the so-called soaking number (parameter  $Na$ ) and the leaf porosity  $\varepsilon$ . The dependency of integral mean concentration on the dimensionless time  $Fo$  at various levels of parameter  $Na$  is depicted in Fig. 4.

Fig.4

As can be seen, the uptake rate is higher at higher values of soaking number and the resultant equilibrium biostimulator concentration in the plant tissue shows similar behavior, i.e. it is higher at higher  $Na$  values. From the practical point of view, higher values of  $Na$  parameter ensure faster biostimulator penetration into the plant tissue and thus faster uptake of the minimal active amount of the biostimulator even at the same level of initial concentration. On the other hand, the maximum value of  $Na$  is controlled by the biostimulator solution surface tension and the angle of the plant part which both limit the achievable thickness of the liquid layer on the plant tissue surface.

Other parameter that significantly affects the uptake process is the plant porosity (including porosity of its surface). Fig. 5 illustrates the influence of porosity  $\varepsilon$  on the biostimulator penetration.

Fig.5

Since the biostimulator concentration in the plant tissue is expressed in a dimensionless way, we must be aware that in this case the actual concentration  $c$  is the product of  $\varepsilon$ , the initial concentration  $c_{0p}$  and the dimensionless concentration. As a result, higher dimensionless concentration achieved at lower

porosity means that the real concentration  $c$  is lower at lower plant porosity. In this sense, Fig. 5 confirms that higher value of  $\varepsilon$  enables the penetration of larger amount of biostimulator into the plant. However, any controlled change of the plant porosity is a difficult and complex task. The diameter of the plant surface pores ("stomata") is sensitive to light, humidity and other factors as was stated above. These factors can be partially controlled in greenhouses but not in the field. Nevertheless, the permeability of the pores can be influenced by reduction of the solution surface tension, e.g. by utilization of surfactants [12]. This action increases the  $\varepsilon$  parameter of the model but simultaneously decreases the maximum achievable  $Na$ , thus the optimal level of surfactant concentration must be found. This task can be solved with the help of the presented mathematical model of the uptake process.

The biostimulator concentration in the surface liquid layer decreases due to its penetration into the plant tissue. Fig. 6 shows the evolution of this process and its dependency on parameter  $Na$ .

Fig.6

As can be seen, the equilibrium concentration is higher at higher values of  $Na$  and consequently larger amount of biostimulator remains in the surface liquid layer in the equilibrium. The consumption of unused (inactive) biostimulator present in the surface layer therefore increases with increasing  $Na$  values; on the other hand the penetrated amount of the biostimulator is increased when thicker biostimulator solution is applied on the plant surface (see Fig. 4). The most rational way is thus to apply biostimulator solution at such  $Na$  values which ensure penetration of the minimal active amount. For example, in case the minimal active amount corresponds to the mean integral concentration 0.5, the  $Na$  0.6 is sufficient for achievement of this required concentration. In addition, if we need to increase the penetration rate, we can also apply thicker amount of biostimulator solution. In the same example as above, if we further increase  $Na$  to 0.8, the dimensionless time  $Fo$  necessary for the achievement of the required concentration is lower than 0.4 compared to time  $Fo$  larger than 0.5 at  $Na$  equal to 0.6. Converted to hours, in case of our biostimulator this difference makes approximately 170 h.

## Conclusions

A mathematical model based on the diffusion mechanism is presented. The model enables us to estimate the time necessary for penetration of a minimal effective amount of biostimulator into the plant body. To ensure that the diffusion process takes place, the biostimulator surface layer must be in the liquid phase. In reality, these conditions are fulfilled when the relative air humidity is close to saturated state – for example, this corresponds to biostimulator curing in greenhouses or immediately after rain in the field conditions. In lower air humidity values, it is inevitable to repeat biostimulator application in order to obtain the desired results.

The simulations showed that the use of a thicker biostimulator surface solution layer increases the rate of the uptake and thus shortens the time necessary for penetration of the minimal active amount. On the other hand, larger unused biostimulator residue remains in the surface layer, making the costs of such application higher.

## List of symbols

Symbol	Description	Unit
$c$	Biostimulator concentration in the plant tissue	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\tau$	Time	[s]
$x$	Coordinate	[m]
$D$	Effective diffusion coefficient in the plant body	[m <sup>2</sup> /s]
$b$	Half thickness of plant body	[m]
$\tau_k$	Critical time at which all water has evaporated	[s]
$c_0$	Concentration of biostimulator in the surface liquid layer	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_{0p}$	Initial concentration of prepared biostimulant solution	[kg/m <sup>3</sup> ]
$V_0$	Volume of the surface liquid layer	[m <sup>3</sup> ]
$S$	Plant body surface	[m <sup>2</sup> ]
$k$	Mass-transfer coefficient of water from the biostimulant solution to the air	[m/s]
$c_n$	Concentration of saturated water vapor in the air	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\rho$	Water density	[kg/m <sup>3</sup> ]
$p_n$	Partial pressure of saturated water vapor	[Pa]

$M$	Molar mass	[kg/kmol]
$R$	Universal gas constant	[J/(kmol.K)]
$T$	Temperature	[K]
$Fo$	Dimensionless time	[1]
$X$	Dimensionless coordinate	[1]
$C$	Dimensionless biostimulator concentration in the plant tissue	[1]
$C_0$	Dimensionless biostimulator concentration in the liquid surface layer	[1]
$\varepsilon$	Porosity	[1]
$Na$	Dimensionless "soaking number"	[1]
$g_n$	$n$ -th root of equation (17)	[1]
$\bar{C}$	Dimensionless mean integral concentration of biostimulator in the plant tissue	[1]

Other symbols are explained directly in the text.

## Acknowledgements

This work was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, grant No. 7088352102 and ERDF Project CEBIA Tech No. CZ.1.05/2.1.00/03.0089, by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, grant No. QH72117 and internal grant of Tomas Bata University in Zlin IGA/22/FT/10/D.

## References

- [1] Cabeza LF, Taylor MM, DiMaio GL, Brown EM, Marmer WN, Carrió R, Celma PJ, Cot J (1998) Processing of Leather Waste: Pilot Scale Studies on Chrome Shavings. Isolation of Potentially Valuable Protein Products and Chromium. *Waste Management* 18:211–218
- [2] Kasparkova V, Kolomaznik K, Burketova L, Sasek V, Simek L (2009) Characterization of low-molecular weight collagen hydrolysates prepared by combination of enzymatic and acid hydrolysis. *J Am Leather Chem Assoc*, vol. 104, pp. 46–51, 2009.
- [3] Ertani A, Cavani L, Pizzeghello D, Brandellero E, Altissimo A, Ciavatta C, Nardi S (2009) Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *J Plant Nutr Soil Sci* 172:237–244
- [4] Maini P (2006) The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum* 1:29–43
- [5] Forster WA, Zabkiewicz JA, Riederer M (2004) Mechanisms of cuticular uptake of xenobiotics into living plants: 1. Influence of xenobiotic dose on the uptake of three model

compounds applied in the absence and presence of surfactants into *Chenopodium album*, *Hedera helix* and *Stephanotis floribunda* leaves. Pest Manag Sci 60:1105–1113

- [6] Schönherr J. (2001) Cuticular penetration of calcium salts: effects of humidity, anions, and adjuvants. J Plant Nutr Soil Sci 164:225–231
- [7] Fernández V, Eichert T (2009) Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: Current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. Crit Rev Plant Sci 28:36–68
- [8] Liu Z, Gaskin RE (2004) Visualisation of the uptake of two model xenobiotics into bean leaves by confocal laser scanning microscopy: diffusion pathways and implication in phloem translocation. Pest Manag Sci 60:434–439
- [9] Crank J (1975) The mathematics of diffusion. Oxford University Press, New York
- [10] Brazee RD, Bukovac MJ, Zhu H (2004) Diffusion model for plant cuticular penetration by spray-applied weak organic acid bioregulator in presence or absence of ammonium nitrate. Trans ASAE 47:629–635
- [11] Schönherr J, Schreiber L (2004) Size selectivity of aqueous pores in stomatous cuticular membranes isolated from *Populus canescens* (Aiton) Sm. leaves. Planta 219:405–411
- [12] Gaskin RE, Murray RJ, Ray JW (1996) Interaction of organosilicone surfactant concentration and spray application factors in glyphosate efficacy. Proc 49<sup>th</sup> N. Z. Plant Prot Conf 49:183–187



**Fig. 1** Geometry of the biostimulator diffusion mathematical model

**Fig. 2** Diffusion coefficient measurement

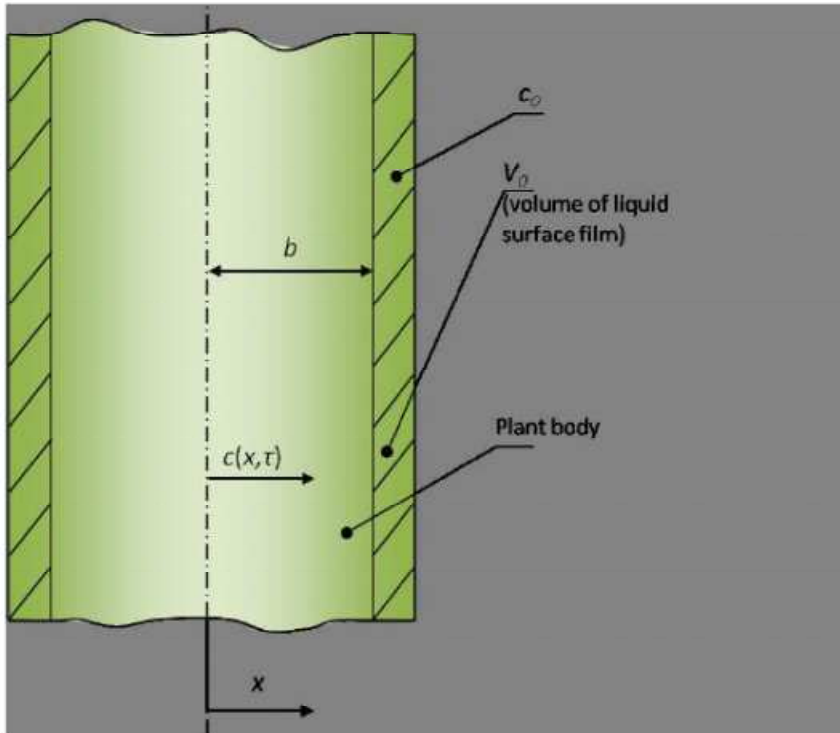
**Fig. 3** Evolution of biostimulator concentration field in the plant tissue

**Fig. 4** Dependency of integral mean biostimulator concentration in the plant on  $Na$

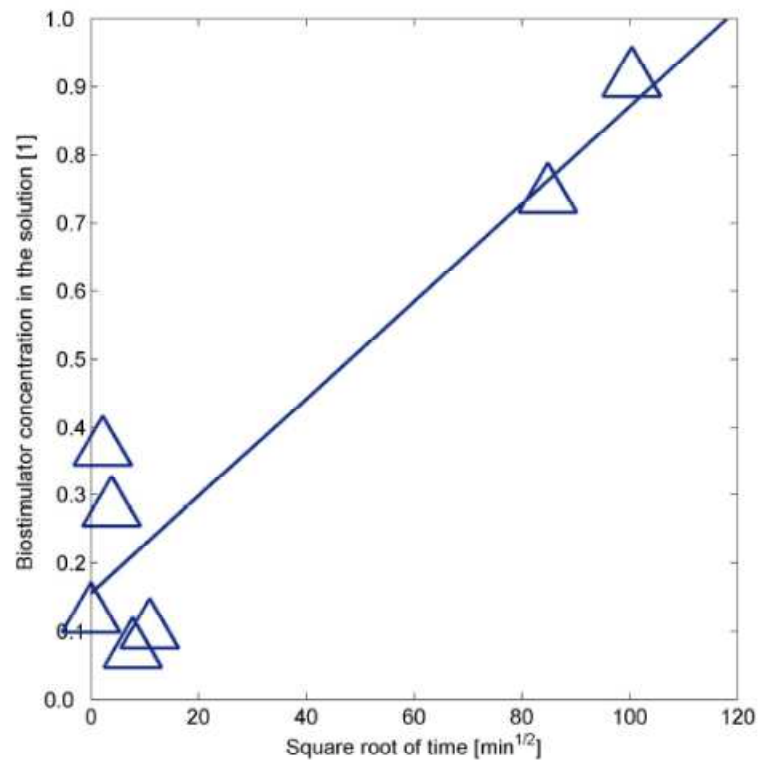
**Fig. 5** Dependency of integral mean biostimulator concentration in the plant on  $\varepsilon$

**Fig. 6** Dependency of biostimulator concentration in the surface liquid layer on  $Na$

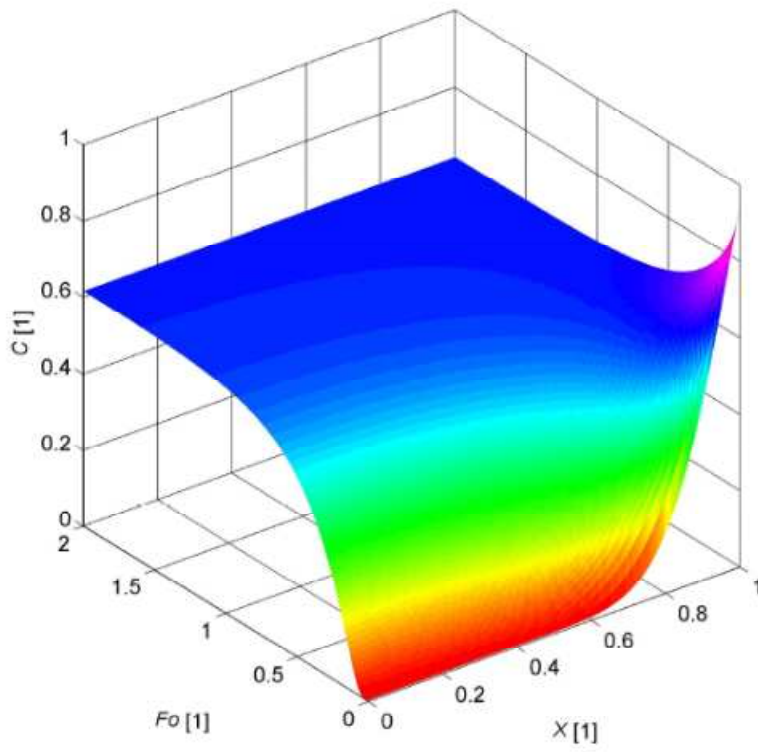
For Peer Review



Geometry of the biostimulator diffusion mathematical model

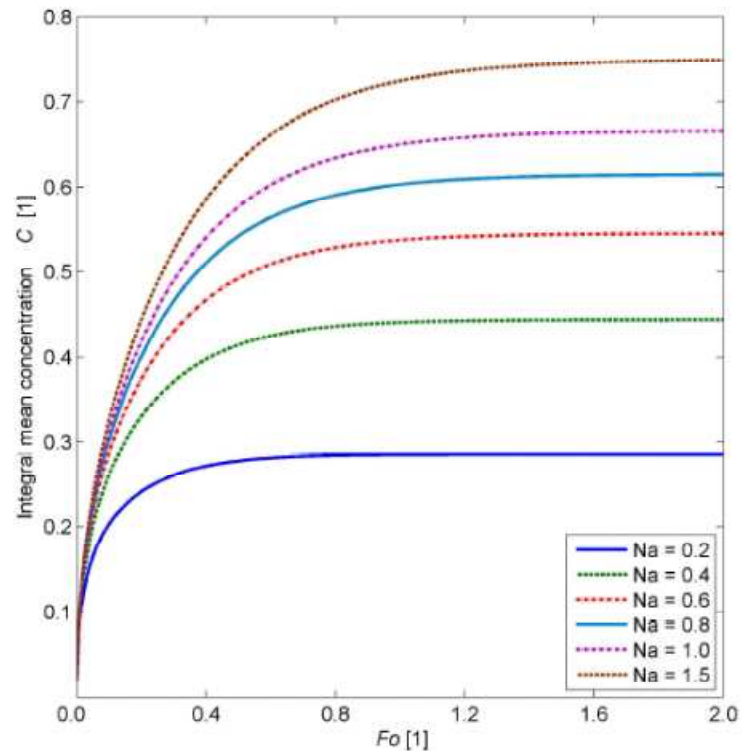


Diffusion coefficient measurement  
174×174mm (300 × 300 DPI)

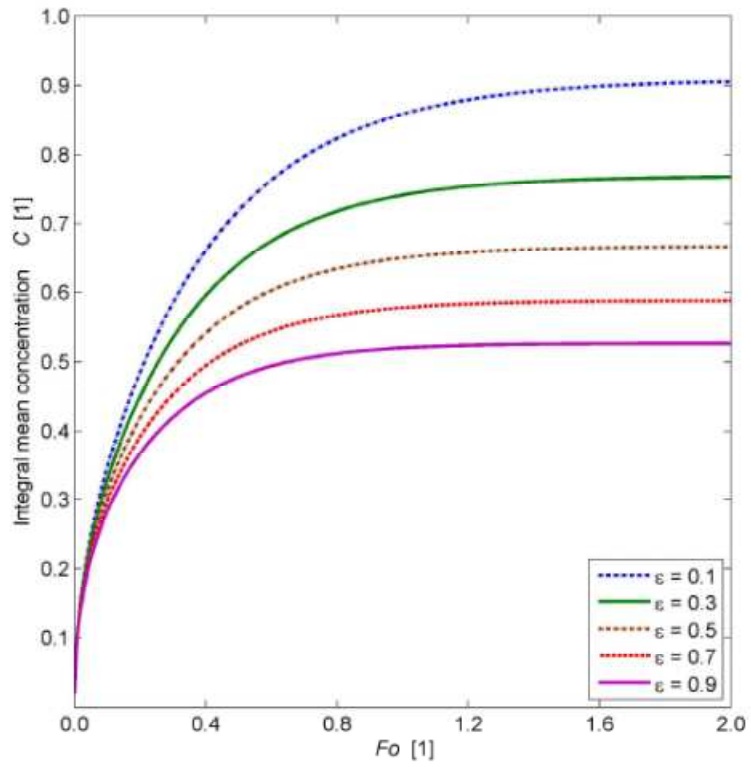


Evolution of biostimulator concentration field in the plant tissue  
174x174mm (300 x 300 DPI)

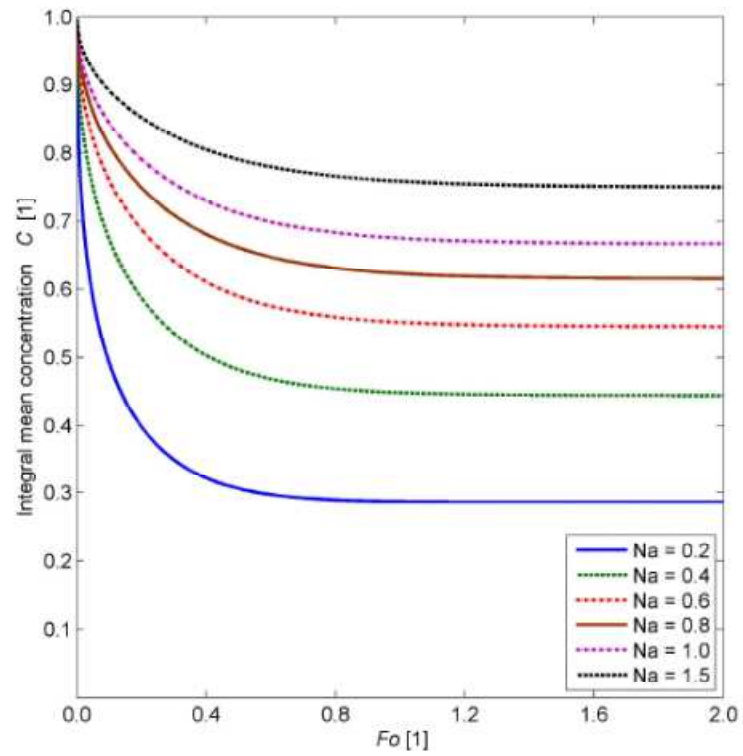




Dependency of integral mean biostimulator concentration in the plant on  $Na$   
174×174mm (300 × 300 DPI)



Dependency of integral mean biostimulator concentration in the plant on  $\epsilon$   
174x174mm (300 x 300 DPI)



Dependency of biostimulator concentration in the surface liquid layer on  $Na$   
174x174mm (300 x 300 DPI)