

Hydrolýza mikrobiální biomasy pro potravinářské doplňky - součást projektu MPO ČR FI390195020

Bc. Denisa Řezáčová

Diplomová práce
2010

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Denisa ŘEZÁČOVÁ**
Osobní číslo: **T080501**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Hydrolýza mikrobiální biomasy pro potravinářské doplňky Práce je součástí projektu MPO ČR č. FI 390 195 020**

Zásady pro vypracování:

Mikrobiální biomasa reprezentovaná kvasničnou surovinou je důležitým zdrojem vitamínů skupiny B-komplexů a zároveň je cennou bílkovinou. V extrémních případech jako jsou např. těžké pooperační stavy nebo při zatížení vrcholovým sportem je třeba dodat potřebnou energii a vitamíny v tekutém stavu, což se uskuteční hydrolýzou biomasy. Diplomová práce se bude zabývat vývojem technologií ztekucení biomasy.

I. Teoretická část

1. Provedte literární studii hydrolýzy bílkovin.

II. Praktická část

1. Naměřte časové závislosti koncentrace tekutých proteinů při různých laboratorních podmínkách (teplota, koncentrace kyselin).
2. Vyhodnoťte experimentální data na základě předpokladu I. řádu vzhledem k tekutému proteinu.
3. Pomocí metody gelové permeační chromatografie stanovte molární hmotnost a její distribuce pro vybrané vzorky.
4. Provedte zhodnocení a navrhněte další postup prací.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] KAŠTÁNEK, F. Bioinženýrství, 1. vydání, Academie, Praha 2001.

[2] SANDLER, S. I. Chemical, Biochemical, and Engineering Thermodynamics, John Wiley and Sons, Inc., 1999.

[3] MAREČEK, M. Ing. Dr. Bílkovinné hydrolyzáty potravinářské, 1. vydání, Ministerstvo potravinářského průmyslu, Praha, 1955.

[4] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. Chemie potravin, 1. vydání, Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, Brno 2006.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Karel Kolomazník, DrSc.
Ústav automatizace a řídicí techniky

Datum zadání diplomové práce:

4. ledna 2010

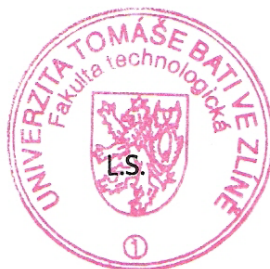
Termín odevzdání diplomové práce:

19. května 2010

Ve Zlíně dne 8. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŘEVAČOVA DENNA Obor: TECHNOLOGIE, HYGIENA A EKONOMIKA
HRŮBY PŘÍRAVIN

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18.5.2010

Řevačova

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Mikrobiální biomasa reprezentovaná kvasničnou biomasou je důležitým zdrojem vitamínů skupiny B a cennou bílkovinou. V extrémních případech, jako jsou např. těžké pooperační stavy nebo zatížení vrcholovým sportem, je třeba dodat potřebnou energii a vitamíny v tekutém stavu. Ztekucení biomasy je prováděno hydrolyzou. Diplomová práce se zabývá vývojem technologií ztekucení biomasy.

Klíčová slova: pivovarské kvasnice, mechanismus I. a II. řádu, hydrolyza, GPC

ABSTRACT

Microbial biomass represented by yeast biomass is an important source of B-complex vitamins and it is a valuable protein. Under the extreme conditions, such as severe post-operative conditions or high physical load conditions, the energy and vitamins should be supplied in liquid form. Liquefaction of biomass is made by hydrolysis. Diploma thesis is dealing with the development of biomass liquefaction technology.

Keywords: brewer's yeast, mechanism I. and II. order, hydrolysis, GPC

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu prof. Ing. Karlu Kolomazníkovi, DrSc., za jeho velmi ochotný přístup, trpělivost a podporu při vypracování diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 LITERÁRNÍ STUDIE - PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	12
1.1 ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ STUDIE	19
2 TEORETICKÁ ČÁST	20
2.1 KINETIKA HYDROLYZAČNÍ REAKCE.....	20
2.2 NÁVRH ŘÍZENÍ HYDROLYZAČNÍHO REAKTORU	24
2.2.1 Mechanismus I. řádu.....	26
2.2.2 Mechanismus II. řádu	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	31
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1 HYDROLÝZA PIVOVARSKÝCH KVASNIC	32
4.2 TLAKOVÁ HYDROLÝZA PIVOVARSKÝCH KVASNIC	36
4.3 GELOVÁ PERMEAČNÍ CHROMATOGRFIE – GPC	41
5 ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT	42
5.1 TITRAČNÍ SLEDOVÁNÍ PŘÍRŮSTKU KARBOXYLOVÝCH SKUPIN	42
5.2 SLEDOVÁNÍ ÚBYTKU MOLÁRNÍ HMOTNOSTI POMOCÍ GPC	43
ZÁVĚR A DISKUSE DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ	51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	54
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	56
SEZNAM TABULEK	58

ÚVOD

Mikrobiální biomasa představuje bílkovinné, případně jiné produkty potravinářského (masného), kožedělného a zemědělského průmyslu.

Po chemické stránce jsou bílkoviny vysokomolekulární kondenzáty α -aminokyselin s různou molární hmotností.

Pro potravinářské doplňky se používají vstupní bílkovinné suroviny, které jsou různým způsobem chemicky upravené. Mezi nejběžnější chemické úpravy patří hydrolyza, která probíhá v alkalickém nebo kyselém prostředí s možným použitím enzymového katalyzátoru. Hlavním účelem hydrolyzy je snižování molární hmotnosti vstupních surovin. Je to dáno aplikací těchto hydrolyzátů zejména v lékařství. Využívají se při výživě rekonvalescentů po náročných operacích, v důsledku nemoci nebo těžkého úrazu, kdy organismus je oslaben a nemá dostatek energie na trávení vysokomolekulárních bílkovinných produktů.

Druhý důvod je jejich použití při vysokém fyzickém zatížení u profesionálních sportovců, záchranářů, hasičů apod.

Specifické využití bílkovinných hydrolyzátů se nachází v zemědělství při ochraně kulturních rostlin. Jejich působení je dvojí. V první řadě snižují nutnou koncentraci ochranných chemických prostředků, případně zvyšují jejich životnost. Výsledkem je jejich snížená spotřeba a tím menší zatížení půdního fondu. Některé druhy hydrolyzátů příznivě ovlivňují imunitní systém rostlin, převážně odolnost vůči plísňovým a houbovým chorobám.

V současnosti se provádí intenzivní výzkum použití mikrobiální biomasy ke zvýšení imunitního systému olejnatých rostlin, zejména řepky olejnaté, máku a lupiny (sója severu). Toto má velký význam hlavně pro výrobu bionafty, neboť se zvyšuje nejen obsah nenasycených triglyceridů mastných kyselin, ale zároveň stoupá výtěžnost olejnatých semen.

V současné době je zvláštní pozornost věnována mikrobiální biomase, kterou reprezentují kvasnice. Vlastnosti této suroviny jsou dány zdrojem jejich původu – pivovarské, pekařské, vinné a pivní.

Vedle bílkovinné substance uvedená biomasa obsahuje vitamíny skupiny B - zejména B₁, B₂ a B₆. Jejich hlavními zdroji jsou kvasnice, maso, sýry, celozrnné obiloviny a luštěniny.

V některých případech se používají jako podpůrné léky v dermatologickém lékařství. Jsou doplňující substancí při léčbě *Diabetes mellitus* (cukrovky), kdy v některých případech snižují potřebné dávky insulinu.

Z výše uvedených případů se v diplomové práci zabývám problematikou hydrolyzy kvasnic vybraného původu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 LITERÁRNÍ STUDIE - PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jak bylo konstatováno v úvodu, moje diplomová práce se bude týkat hydrolyzy kvasničné biomasy. Po prostudování dostupné literatury se hydrolyza kvasničné biomasy provádí v kyselém, alkalickém, příp. v obou prostředích kombinovaná katalytickým působením enzymů [1].

Jednotlivé druhy hydrolyzátů původní suroviny se od sebe liší stupněm dosaženého odbourávání původní bílkoviny, způsobem provedení hydrolyzy, složením, obsahem nečistoty a smyslovými vlastnostmi.

Podle stupně degradace dostáváme následující konečné produkty [1]:

- směs aminokyselin, podle které zjišťujeme složení původní suroviny
- nízkomolekulární štěpné produkty pro lékařské účely.

Tento druh hydrolyzátů obsahuje minimální množství nečistot [1].

- směsné peptidy, které mohou obsahovat jiné organické a anorganické příměsi, které jsou vesměs určeny pro potravinářské účely [1].

Další druh hydrolyzátů, prakticky se stejnou molární hmotností, jsou určeny pro krmné a technické účely. Do této oblasti patří také, jak jsem se zmínila v úvodu, využití těchto bílkovinných hydrolyzátů jako stimulatorů k ochraně hospodářských rostlin.

Průběh hydrolyzy, zejména její kinetika, výsledné vlastnosti a složení produktu se odvíjí od primární a sekundární struktury výchozí bílkoviny. Pod pojmem primární struktury 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 [2,5]. Zatímco sekundární struktura charakterizuje prostorové uspořádání, které je dáno primární strukturou a fixováno nevazebnými interakcemi funkčních skupin aminokyselin. Vedle toho je známá terciární struktura což jsou celková konformace polypeptidového řetězce a prostorové uspořádání postranních řetězců. Konečně kvarterní struktura, která charakterizuje jen některé proteiny. Řeší uspořádání podjednotek v proteinových aglomerátech, tvořících jednu funkční bílkovinu [3,4].

Hlavním úkolem hydrolyzy je ztekucení vstupní suroviny, v našem případě kvasničné biomasy. Z tohoto důvodu je značná pozornost věnována také vlastnostem těchto roztoků.

Proteiny v roztocích disociují podobně jako aminokyseliny nebo peptidy za vzniku makromolekulárních polyiontů, jsou tedy polyamfolyty. V závislosti na pH prostředí se v jejich molekule nacházejí kladně nebo záporně nabitě ionty vznikající disociací funkčních skupin různých aminokyselin, zejména aminokyselin s bazickými a kyselými funkčními skupinami. Oblast pH, kde je volný náboj nulový se nazývá isoelektrickým bodem bílkoviny. Rozpustnost bílkovin závisí vedle struktury proteinu a relativní permitivity rozpouštědla na hodnotě pH roztoku, jeho iontové síle, teplotě [2].

Nativní konformace globulárních bílkovin a tím i jejich vlastnosti se mění již mírným účinkem různých fyzikálních faktorů a chemických činidel. Důsledkem těchto změn je ztráta biologické aktivity a původní funkce proteinu. Denaturací se struktura proteinu mění v méně uspořádanou. 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 [2]. Tento případ je prakticky využit při výrobě želatiny a klihu z vedlejších produktů koželužského průmyslu [8].

Pro další aplikace je důležité zkoumat vlastnosti uspořádání jednotlivých polymerních skupin. Toto uspořádání se projeví v určité krystalické formě [12], která také souvisí s čistotou bílkovin, která se projevuje jejich optickou aktivitou. Roztoky všech přirozených bílkovin otáčejí rovinu polarizovaného světla doleva, i když otáčivost jednotlivých aminokyselin je opačná [13].

Hydrolytický proces je přirozeným mechanismem trávení v živém organismu. V tomto případě je enzymová hydrolyza katalyzovaná proteolytickými enzymy. Proteasy katalyzují buď hydrolyzu peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce za vzniku peptidů různé velikosti, nebo odštěpují jen koncové aminokyseliny. Hydrolyzu N-koncové aminokyseliny katalyzují amidopeptidasy, hydrolyzu C-koncové aminokyseliny – karboxypeptidasy [2,7].

Hydrolyza proteinů probíhá v několika stupních. Nejprve vznikají polypeptidy, z nich oligopeptidy a konečnými produkty jsou aminokyseliny. Každý stupeň hydrolyzy 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 [2].

Jak bylo řečeno, hydrolyza může probíhat v kyselé, příp. alkalické oblasti. Značná pozornost v literatuře je věnována hydrolyze bílkovin pomocí kyseliny solné (vodného roztoku chlorovodíku) [1]. Za normální teploty je reakce mezi bílkovinou a HCl velmi pomalá. Zvyšováním teploty nastává první reakce mezi bílkovinou a kyselinou. Barva reakční směsi se mění, postupně přechází přes světle modrou, červenou až do hnědé a konečně černé. Čím je kyselina více zředěná, tím pomaleji probíhají barevné změny. Již při 30 °C znatelně štěpí koncentrovaná kyselina z 0,8% kasein. Podle [9] vzniká ze zředěné HCl a bílkoviny tzv. acidalbumin. Autoři prací [10] a [11] shledali, že 0,5% HCl působí rozkladně v tom smyslu, že vznikají za zvýšené teploty peptony, peptidy vedle toho nepatrné množství aminokyselin.

Důležitým faktorem při hydrolyze je poměr množství kyseliny k bílkovině. V případě odbourávání bílkoviny ve velké celky, ve vodě rozpustné, stačí malé množství kyseliny. Jestliže je cílem odštěpení maximálního množství aminokyselin, musí být v roztoku alespoň stechiometrický poměr – 1 N bílkoviny : 1 HCl (100%) [1].

Při kyselé hydrolyze probíhají tedy dva pochody současně. A to rozpad velké bílkovinné molekuly a současně odštěpování aminokyselin. Nejprve se štěpí glutamová a asparagová kyselina, ty následuje glycin, serin a alanin, poté valin a metionin, leucin a izoleucin a v posledním sledu bazické aminokyseliny. Podle [14] je důležité při sledování odštěpování aminokyselin získat jistotu, že v bílkovinné surovině nejsou přítomny volné aminokyseliny. Celá řada těchto surovin (kasein, kvasnice, šroty, aj.) již ve vodním výluhu obsahují několik aminokyselin, jejichž původ je nutné hledat při zpracování zmíněných surovin vlivem různých enzymů, chemických činidel, atd. [1].

Složení hydrolyzátu je tedy závislé na způsobu provedení hydrolyzy a u každé bílkoviny je s reakčními podmínkami jiné. Např. s koncentrací kyseliny se mění stupeň dosažené hydrolyzy. Jak u enzymatických reakcí, tak i u hydrolyz provedených pomocí kyselin je počáteční rychlost štěpení neporovnatelně menší než pozdější průběh. Průběh alkalické hydrolyzy sleduje stejný postup odštěpování aminokyselin jako kyselá hydrolyza. I zde přecházejí do roztoku jako první aminokyseliny glutamová a asparagová kyselina [15].

Řada prací se zabývá sledováním rychlosti přechodu dusíku bílkoviny do roztoku a růstem dusíku primárních aminoskupin. Přechod dusíku do roztoku je možné sledovat za velmi mírných podmínek. Mareček [16] sledoval štěpení kaseinu a keratinu při teplotách 70 °C a

90 °C při různé koncentraci a přebytku HCl a zjistil, že přechod veškerého dusíku do roztoku je reakcí II. řádu.

Dunn [17] hydrolyzoval kasein kyselinami a usoudil, že jde o reakci I. řádu. Naproti tomu Greenberg a Burk [18] při studiu hydrolyzy fibrinu, želatiny aj. bílkovin pomocí HCl zjistili, že při růstu dusíku primárních aminoskupin jde o reakci II. řádu. Se zjištěním Greenberga a Burka souhlasili i Nasset s Greenbergem [19].

V průběhu hydrolyzy tvoří surovina za optimálních podmínek určité minimální množství huminů. Minimální množství huminů bývá pravidelně za většího přebytku kyseliny, při 20% koncentraci HCl a teplotách 105-125 °C. U sušených kvasnic s 8,1% N je 15-33g huminových zbytků s 4,5-6,8% N [1].

Podle reakčních podmínek se mění množství, složení i struktura huminových zbytků, v širokých mezích. Struktura zbytků je mazlavá až suchá, zrnitá, barva hnědá až černá, současně je i rozdílná rozpustnost v mírně kyselých roztocích nebo ve vodě. Při hydrolyze 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 hydrolyzy 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 [1].

Mareček [1] provedl několik technických hydrolyz, 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 bylo za mírných podmínek rychlejší než štěpení lepku, podle výsledků leží mezi živočišnými surovinami a lepem. Hodnoty zbytků byly dost vysoké a ve většině případů se neměnily. Hodnoty veškerého dusíku byly ve všech pokusných řadách převážně stejné, naproti tomu hodnoty N na primární aminoskupině byly za tvrdších podmínek podstatně vyšší. S tvrdšími podmínkami a s delší reakční dobou byla barva hydrolyzátu světlejší a chuť výraznější [1].

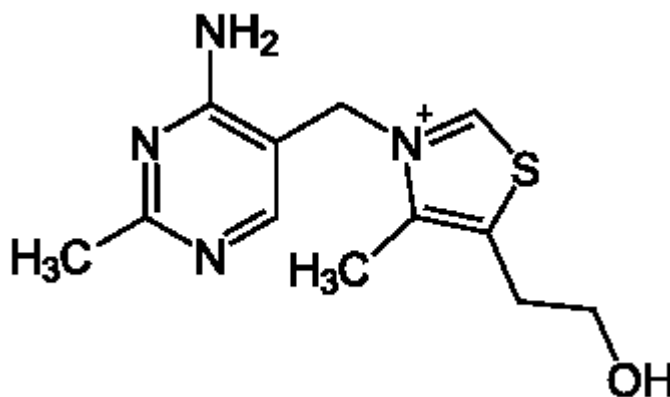
Vliv koncentrace – sušené kvasnice - 20% přebytek kyseliny a 15%, 20% a 25% koncentrace násadové kyseliny.

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 k velkým 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 [1].

Kvasničná biomasa obsahuje vedle velkého množství bílkovin také nezanedbatelné množství vitamínů skupiny B.

MUDr. Stuchlík ve studii [20] uvedl mimo jiné i vitamíny B₁, B₂, B₆, B₅ (kyselina pantothenová) a B₇ (biotin).

Vitamín B₁ – thiamin – jeho chemická struktura je charakterizována pyrimidinovým a imidazolovým okruhem. Thiamin pyrofosfát je zásadním koenzymem pro několik velmi významných enzymů [20]. Skripta [6] uvádí, že jako koenzym funguje v dekarboxylázách nutných k dekarboxylaci alfa-ketoglutarátu a pyruvátu. Podobně se podílí i na dekarboxylaci alfa-oxokyselin (valin, leucin, izoleucin).



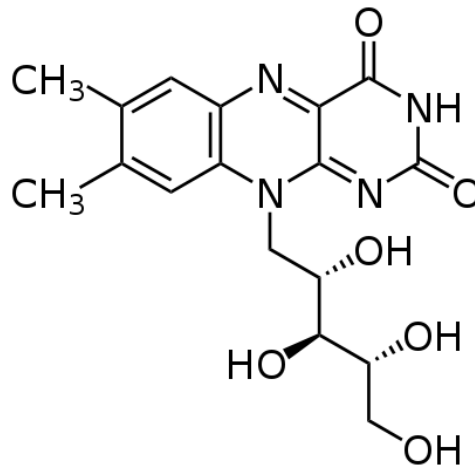
Obr. 1. Thiamin – vitamín B₁

Thiamin podporuje paměť, pomáhá proti slabosti, odstraňuje deprese, spolu s vitamínem B₆ působí preventivně proti revmatickým bolestem a proti zánětům nervů. Je nezbytný pro správnou funkci jater. Jeho užívání je vhodné i v pooperačním období [20].

Nemoc způsobená deficitem vitamínu B₁ je beri-beri. Což je porucha postihující především srdeční, nervový, trávicí a pohybový aparát [21].

Thiamin je obsažen převážně ve slupkách obilí, v celozrnném pečivu, vnitřnostech. Dalšími zdroji jsou pivovarské kvasnice, med, ořechy, luštěniny, neloupaná rýže [3].

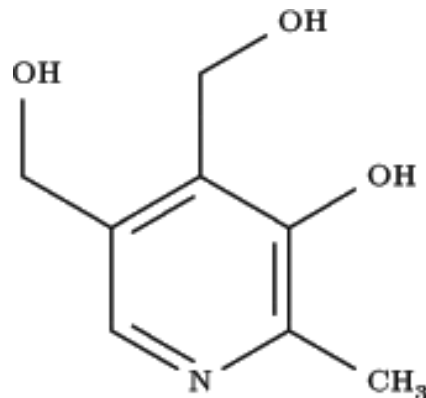
Vitamín B₂ - riboflavin – Vodrážka [3] uvádí, že vitamín B₂ je flavinový derivát a základ jeho molekuly tvoří isoalloxazin s ribitylovým substituentem a dvěma methylovými skupinami. Podle [6] jeho fyziologická role spočívá v usnadnění redoxních dějů, kdy jako koenzym podmiňuje funkci flavinmono-(FMN) a dinukleotidu (FAD), které jsou protonem H⁺ redukovány na FMNH₂ a zvláště FADH₂. Tělo tento proces využívá k získání energie.



Obr. 2. Riboflavin – vitamín B₂

Užíváním riboflavínu je podporováno vidění (ochrana rohovky, zábrana očním katarům), pomáhá při léčbě rozpraskaných koutků úst, při zánětlivých onemocněních [22,24]. Nedostatky vitamínu B₂ se projevují psychickými změnami v podobě deprese, náladovosti, hypochondrie, poruchy srdeční činnosti, anémie, slabost. Studie uvádí, že hlavním zdrojem riboflavínu jsou povrchové vrstvy obilovin, ryby, pekařské a pivovarské kvasnice, mléko, játra, hovězí a kuřecí maso[23].

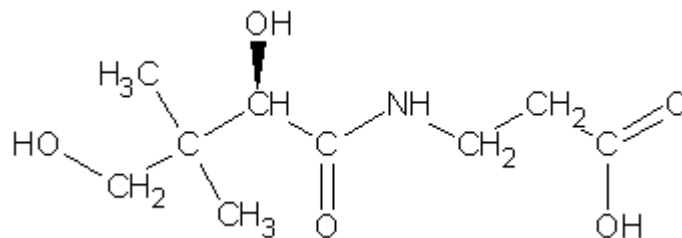
Vitamín B₆ – pyridoxin – je společné označení pro tzv. pyridoxinovou třídu – pyridoxol, pyridoxal a pyridoxamin. Podle Hozí, Kramářové a Budínského [6] je účinnou formou vitamínu pyridoxalfosfát. Je součástí řad enzymů, které se podílí na dekarboxylaci a transaminaci aminokyselin. Je důležitý pro metabolismus mozku. Podílí se na imunologické ochraně organismu. Podmiňuje konverzi aminokyseliny tryptofanu na niacin [23].



Obr. 3. Pyridoxin – vitamín B₆

Stuchlík [20] 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 B₆ je vzácný. Podle literatury [25] vitamín B₆ obsahují játra, vepřové maso, kuřata, tuňáci, mléko, vejce, droždí, banány, neloupaná rýže, zelí, špenát.

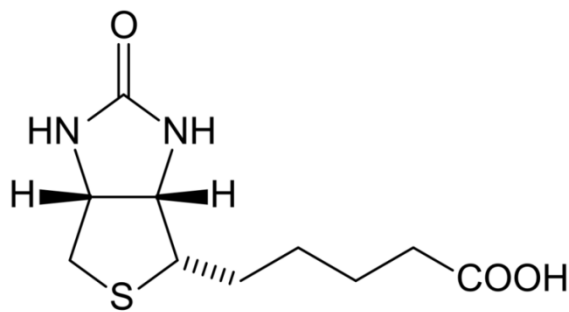
Vitamín B₅ – kyselina pantotenová – je chemicky tvořena spojením kyseliny pantotenové a aminokyseliny beta-alaninu. Podílí se na tvorbě koenzymu A s ATP a cysteinem [26].



Obr. 4. Kyselina pantotenová – vitamín B₅

Nedostatek pantothenátu je poměrně vzácný a projevuje se apatií, depresí, svalovou slabostí a degenerativními zánětlivými změnami na sliznicích [3]. Skripta [6] uvádí, že zdroji vitamínu B₅ jsou především maso a vnitřnosti, droždí, mléko, vejce, brokolice.

Vitamín B₇ – biotin – obsahuje v molekule imidazolový a tetrahydrothiofenový kruh. Je navázán na účinné místo koenzymu karboxyláz [3]. Biotin se účastní bionitylace histonů, což jsou bílkovinné komplexy navázané na DNA udržující strukturu dvojité šroubovice a plnící zde i projektivní funkci zvláště při replikaci DNA [27].



Obr. 5. Biotin – vitamín B₇

Biotin udržuje zdravou pleť, působí na kvalitu vlasů a nehtů, podporuje spánek, pomáhá při hubnutí a upravuje hladinu cukru v krvi. Nedostatek je velmi vzácný. Při nedostatku dochází k padání vlasů, zarudnutí obličeje, k depresím, letargii [20]. Hlavními zdroji jsou jedlé kaštiny, játra, žloutek, sója, kvasnice, rýže, mléko [6].

1.1 Zhodnocení literární studie

Práce pojednávající o řešené problematice, se týkají převážně praktické aplikace kvasnicových hydrolyzátů. Tuto aplikaci lze rozdělit do dvou skupin. V první skupině je zahrnuta produkce komplexu B vitamínů, jako např. pangamin, kyselina nikotinová apod. Ve druhé skupině je vlastní hydrolytický produkt určený převážně jako potravinový doplněk. Obecně lze provádět hydrolyzu jak v kyselém tak zásaditém prostředí a v obou případech je možno použít katalytický účinek specifických enzymů. Celkem málo prací je věnováno kvantitativnímu popisu průběhu hydrolyzy na základě chemické reakční kinetiky. Nicméně většina prací předpokládá mechanismus prvního řádu vzhledem ke koncentraci hydrolyzačního činidla. Druhá, menší část předpokládá mechanismus druhého řádu. Úkolem mé práce bude na základě experimentálních dat na konkrétním případě pivovarských kvasnic odhadnout, který řád blíže popisuje kinetické závislosti.

V teoretické části se pak budu zabývat využitím teorie reaktorového inženýrství ve spojení se stanovením účelové funkce. Hlavním důvodem je skutečnost, že z tohoto hlediska jsem nenašla ve studovaném časovém období prakticky žádnou publikaci. Účelovou funkci budu stanovovat na základě hlavních provozních nákladů stávajících se z dílčích nákladů na hydrolyzu a nákladů na koncentraci rozpustné reakční směsi na požadovanou hodnotu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

V teoretické části se zabývám kinetikou hydrolyzační reakce a optimalizací hydrolyzačního reaktoru ve spojitosti s návrhem algoritmu s jeho řízením.

2.1 Kinetika hydrolyzační reakce

Kinetikou rozumíme závislost změny rychlosti koncentrace na čase. Úkolem reakční kinetiky je měřit rychlost chemických reakcí a z jejich závislosti na koncentraci reagujících látek, na teplotě, popř. na jiných proměnných, vypočítat konstanty charakteristické pro studovanou reakci a objasnit její reakční mechanismus. Kinetika je dána časovou závislostí koncentrace vstupních surovin, tj. kvasnic a příslušného reakčního činidla (kyselina, zásada). Po matematické stránce je reakční rychlost derivace vstupních složek příp. výstupních složek podle času. Obecně si tedy můžeme hydrolyzační reakci popsat následovně:



Podle zákona působení hmot je reakce dána následující diferenciální rovnicí:

$$-\frac{dc_K}{d\tau} = kc_K^n \cdot c_A^m, \quad (2)$$

kde c_K – koncentrace vstupní složky bílkoviny

τ – čas

c_A – koncentrace hydrolyzačního činidla (kyselina)

k – rychlostní konstanta uvedené hydrolýzy.

Exponenty n a m definují řád reakce vzhledem ke koncentraci reagujících složek. Tedy n je vzhledem ke koncentraci kvasničné biomasy a m je vzhledem ke koncentraci hydrolyzačního činidla. Součet n a m pak definuje řád reakce.

Podle Dunna [17] je hydrolýza bílkovin reakcí I. řádu, kdy platí

$$-\frac{dc_K}{d\tau} = kc_K^0 \cdot c_A^1, \quad (3)$$

Vzhledem k exponenciálním činitelům je lepší sledovat klesající koncentraci c_A .

$$-\frac{dc_A}{d\tau} = k \cdot c_A, \quad (4)$$

Integrací uvedené diferenciální rovnice za počáteční podmínky $c_A(0) = c_{AP}$ dostaneme

$$c_A = c_{AP} \cdot e^{-k\tau}, \quad (5)$$

V praxi zavádíme pojem konverze, což je podíl zreagované vstupní složky k její počáteční hodnotě, tzn.

$$x = \frac{c_{AP} - c_A}{c_{AP}}, \quad (6)$$

Úpravou (5) s využitím (6) dostaneme

$$x = 1 - e^{-k\tau}, \quad (7)$$

Pro návrh hydrolyzačního reaktoru je nutné stanovit rychlostní konstantu k z experimentálně naměřených kinetických dat, tj. závislosti c_A na τ .

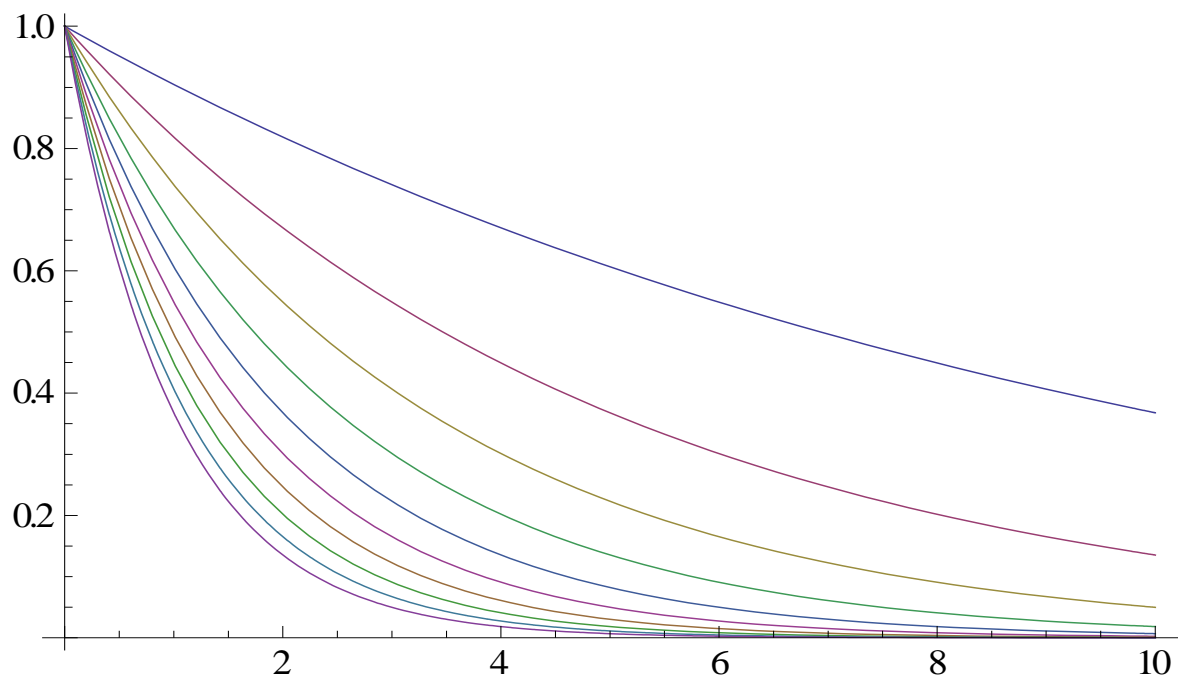
$$\frac{c_{AP} - c_A}{c_A} - 1 = -e^{-k\tau}, \quad (8)$$

Aplikací přirozeného logaritmu na rovnici (5) a po úpravě dostaneme:

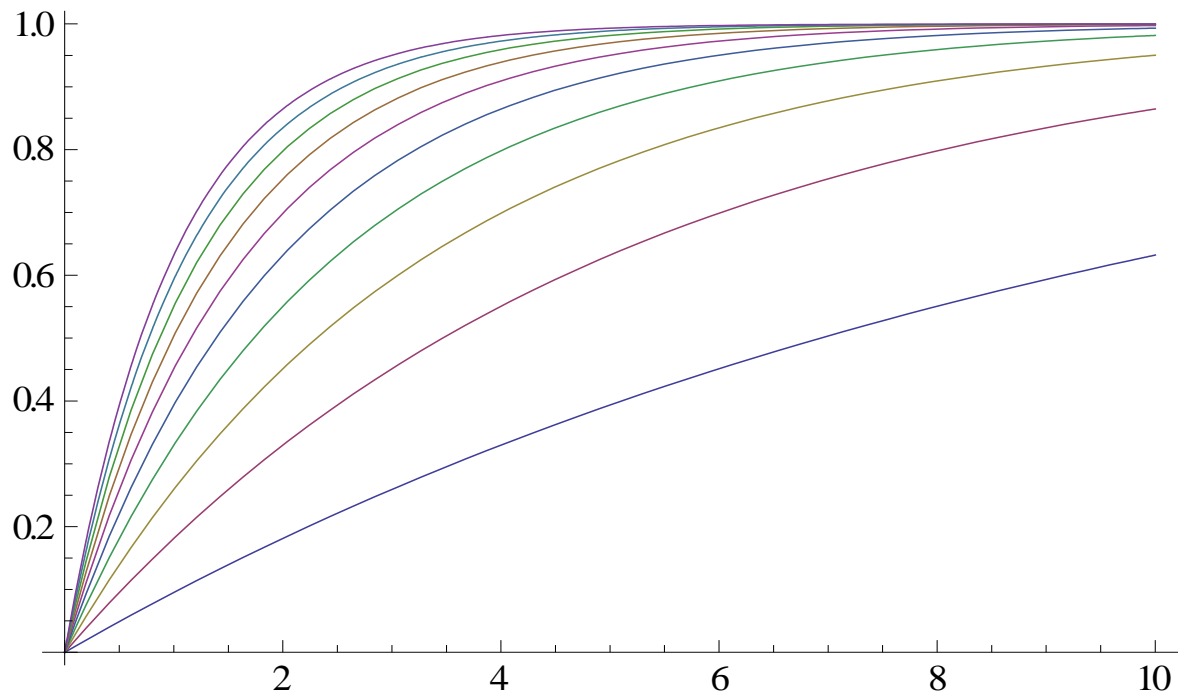
$$\ln \frac{c_A}{c_{AP}} = -k\tau, \quad (9)$$

Vynesením přirozeného logaritmu bezrozměrné koncentrace hydrolyzačního činidla $\left(\frac{c_A}{c_{AP}}\right)$ oproti času získáme přímkou, z jejíž směrnice určíme hodnotu rychlostní konstanty k . Rozměr rychlostní konstanty při reakci I. řádu je s^{-1} .

Jako příklad uvádím grafy pro reakci I. řádu, které vyjadřují závislost bezrozměrné koncentrace kyseliny na čase (graf 6) a stupně konverze (x) na čase (graf 7).



Obr. 6. Graf závislosti koncentrace kyseliny na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 1



Obr. 7. Graf závislosti stupně konverze (x) na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 1

Literatura [16,18,19] konstatuje, že hydrolyzační reakce je II. řádu. Tzn., že platí rovnice:

$$-\frac{dc_A}{d\tau} = k_1 c_A^2, \quad (10)$$

Integrací uvedené diferenciální rovnice za počáteční podmínky $c_A(0) = c_{AP}$ dostaneme

$$c_A = \frac{c_{AP}}{1+k_1\tau c_{AP}}, \quad (11)$$

Opět zavedením konverze dostáváme

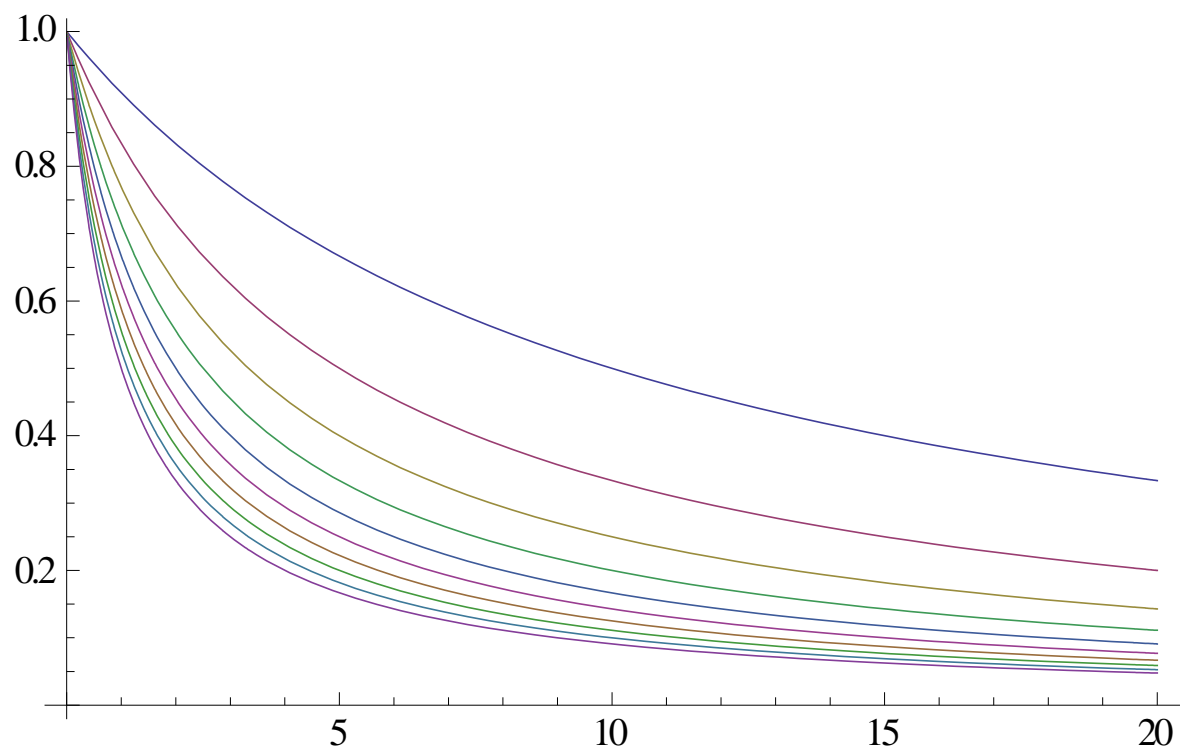
$$x = \frac{c_{AP} - c_A}{c_{AP}}, \quad (12)$$

Úpravou (11) a využitím (12) dostaneme

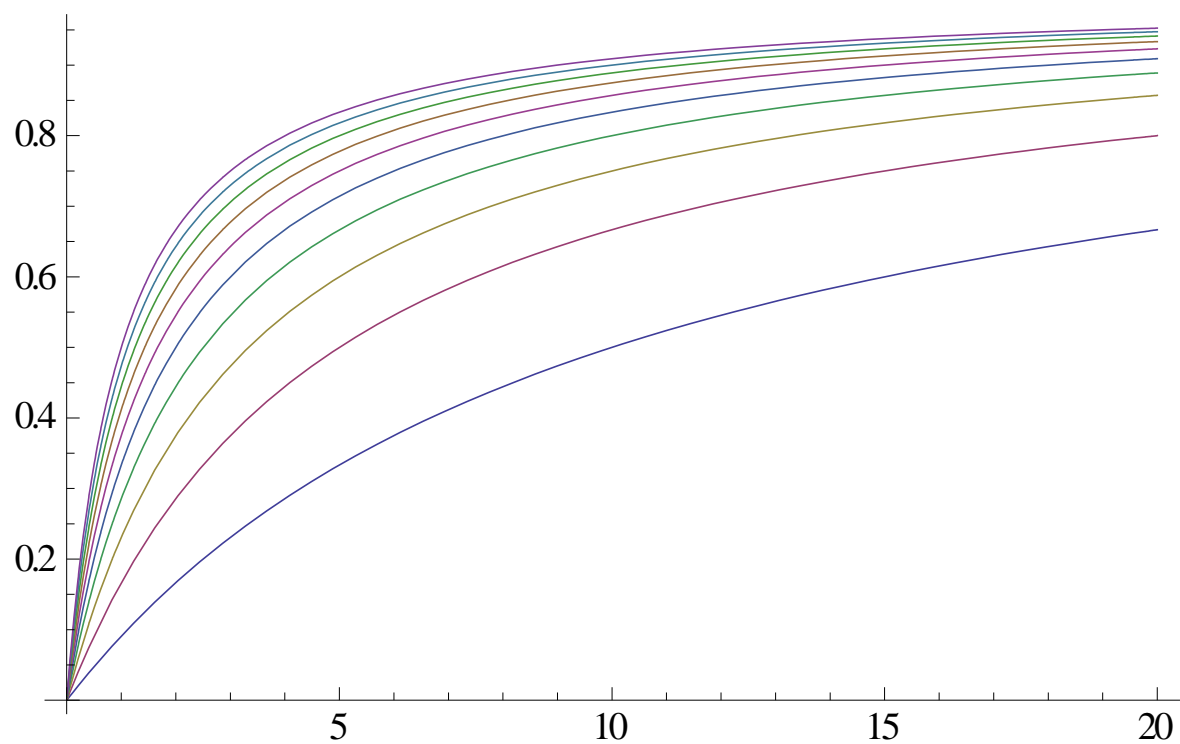
$$x = 1 - \frac{1}{1+k_1\tau c_{AP}}, \quad (13)$$

Rozměr rychlostní konstanty při reakci II. řádu je $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$.

Jako příklad uvádím grafy pro reakci II. řádu, které stejně jako u reakce I. řádu, vyjadřují závislost koncentrace kyseliny na čase a x na čase.



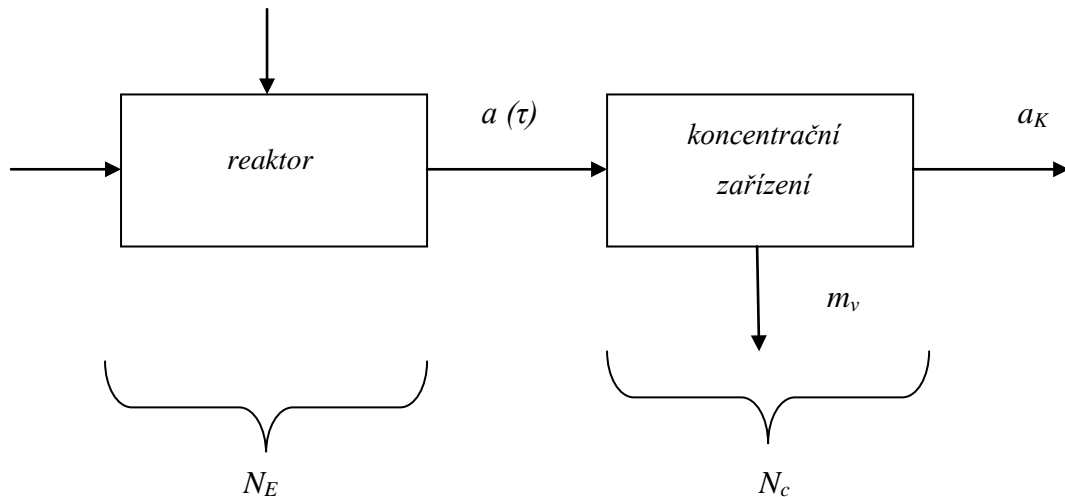
Obr. 8. Graf závislosti koncentrace kyseliny na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 1



Obr. 9. Graf závislosti stupně konverze (x) na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 1

2.2 Návrh řízení hydrolyzačního reaktoru

Předpokládáme diskontinuální izotermně míchaný hydrolyzační reaktor, ve kterém probíhá požadovaná reakce. Hlavní provozní náklady na výrobu ztekuceného hydrolyzátu o požadované koncentraci, jsou rovny součtu nákladů na spotřebu elektrické energie nutnou k pohonu míchadla a nákladů na požadovanou koncentraci konečného produktu. Následující obrázek 10 znázorňuje bilanční schéma reaktoru a koncentračního zařízení.



Obr. 10. Bilanční schéma reaktoru a koncentračního zařízení

Platí tedy,

$$N_{\Sigma} = N_E + N_c, \quad (14)$$

Náklady na spotřebu elektrické energie, jsou rovny součinu příkonu elektromotoru v čase a jednotkovou cenu elektrické energie,

$$N_E = P \cdot \tau \cdot K_E, \quad (15)$$

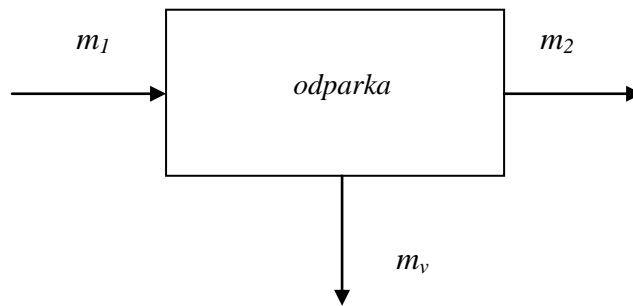
Náklady na koncentraci jsou dány součinem hmotností vypařovací vody, výparného tepla a jednotkovou cenou tepelné energie.

$$N_c = (\Delta H)_v \cdot m_v \cdot K_P, \quad (16)$$

Tedy kombinací (15) a (16) dostaneme

$$N = P \cdot \tau \cdot K_E + m_v \cdot (\Delta H)_v \cdot K_P \quad (17)$$

Množství vypařené vody vypočteme z následující bilance koncentračního zařízení



Obr. 11. Bilanční schéma odparky

kde	P	- příkon elektromotoru	[kW]
	τ	- čas	[s]
	K_E	- jednotková cena elektrické energie	[Kč/kWh]
	m_v	- hmotnost požadované odpařené vody	[kg]
	$(\Delta H)_v$	- výparné teplo vody	[J/kg]
	K_P	- jednotková cena páry odparky	[Kč/GJ]

Podle obrázku 11 je celková bilance následující

$$m_1 = m_2 + m_v, \quad (18)$$

Bilance sušiny

$$m_1 \cdot a(\tau) = m_2 \cdot a_K, \quad (19)$$

Odtud

$$m_1 = \frac{m_2 \cdot a_K}{a(\tau)}, \quad (20)$$

Dosazením (20) do (18) a po úpravě dostaneme požadované množství odpařené vody:

$$m_v = m_2 \cdot \left(\frac{a_K}{a(\tau)} - 1 \right), \quad (21)$$

Dosazením (21) do (17) dostaneme

$$n = N/m_2 = \frac{P \cdot \tau \cdot K_E}{m_2} + \left(\frac{a_K}{a(\tau)} - 1 \right) \cdot (\Delta H)_v \cdot K_P, \quad (22)$$

Nyní je třeba vyjádřit koncentraci hydrolyzátů $[x]$ na čase. Tato závislost je dána mechanismem hydrolyzační reakce. Jak jsem uvedla, uvažujeme mechanismus I. s II. řádu.

2.2.1 Mechanismus I. řádu

Podobně jako tomu bylo v kapitole 2. 1., je možné odvodit závislost koncentrace ztekuje-
ného hydrolyzátu na čase. Vzhledem k rovnici (22) tuto koncentraci vyjádříme ve formě
hmotového zlomku (a):

$$a(\tau) = a_N \cdot (1 - e^{-k\tau}), \quad (23)$$

Dosazením (23) do (22) dostáváme

$$n = N/m_2 = \frac{P \cdot \tau \cdot K_E}{m_2} + \left\{ \left[\frac{a_K}{a_N \cdot (1 - e^{-k\tau})} \right] - 1 \right\} \cdot (\Delta H)_v \cdot K_P, \quad (24)$$

Pro vyčíslení (24) zvolíme následující vstupní parametry pro matematickou simulaci:

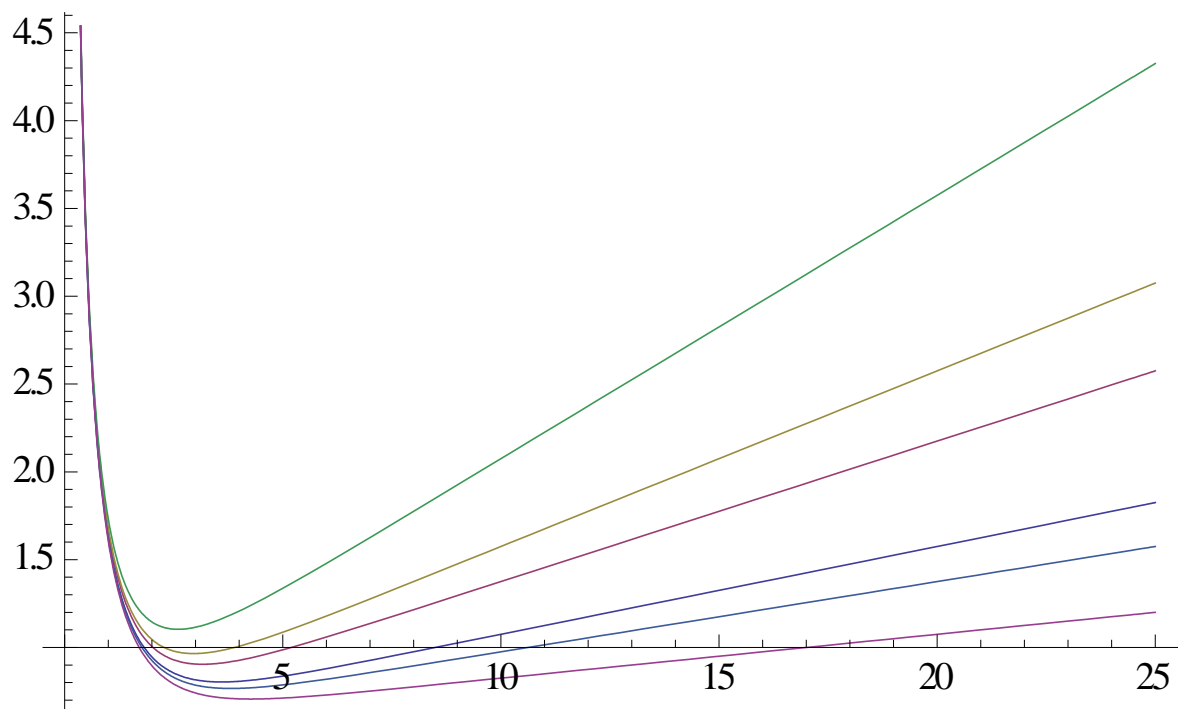
$$K_E = 5 \text{ Kč/kWh}; P = 10 \text{ kw}; m_2 = 1000 \text{ kg/h (hodinová produkce)};$$

$$(\Delta H)_v = 2,3 \text{ MeJ/kg}; K_P = 500 \text{ Kč/GJ}; a_K = 0,3; a_N = 0,2; k = 1$$

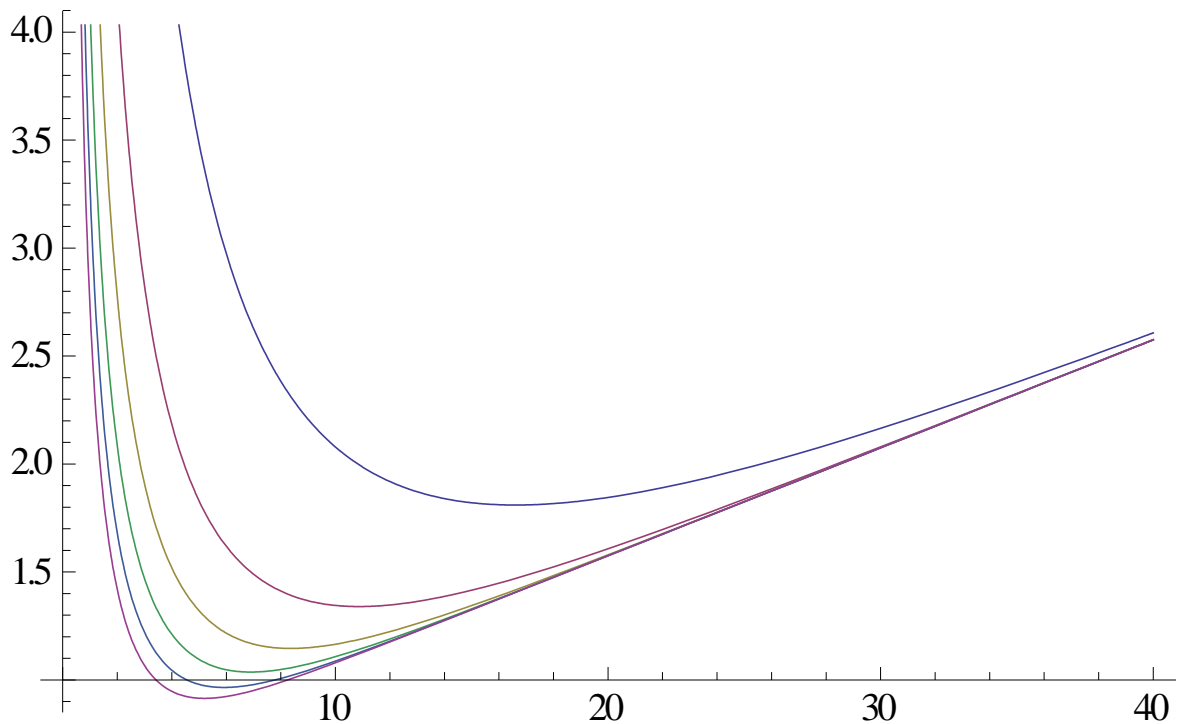
$$\frac{P \cdot K_E}{m_2} = \frac{10 \cdot 5}{1000} = \frac{0,05 \text{ Kč}}{\text{kg}}; \frac{a_K}{a_N} = \frac{0,3}{0,2} = 1,5; (\Delta H)_v \cdot K_P = 2,3 \cdot 0,5 = 1,15 \text{ Kč/kg}$$

Dosazením uvedených hodnot do (24) dostaneme

$$n = N/m_2 = 0,05 \cdot \tau + \left(\frac{0,5 + e^{-k\tau}}{1 - e^{-k\tau}} \right) \cdot 1,15 \quad (25)$$



Obr. 12. Závislost celkových nákladů na čase pro různou jednotkovou cenu el. energie – 5 Kč, 8 Kč, 10 Kč, 15 Kč, 4 Kč, 2,50 Kč



Obr. 13. Závislost celkových nákladů na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 0,6

2.2.2 Mechanismus II. řádu

Stejně jako jsem uvedla u mechanismu I. řádu je možné i u mechanismu II. řádu odvodit závislost koncentrace hydrolyzátu na čase.

Vycházíme z rovnice:



Podle zákona působení hmot je reakce dána následující diferenciální rovnicí:

$$\frac{dHA_2}{d\tau} = k(A_p - HA_2)^2, \quad (27)$$

Integrací uvedené diferenciální rovnice za počáteční podmínky dostaneme:

$$a = \frac{a_p^2 \cdot k\tau}{1 + k\tau \cdot a_p}, \quad (28)$$

Vzhledem k rovnici (22) tuto koncentraci vyjádříme ve formě hmotového zlomku (a):

$$a_\tau = \frac{a_p^2 \cdot k\tau}{1 + k\tau \cdot a_p} \quad (29)$$

Dosazením (29) do (22) dostaneme

$$n = N/m_2 = \frac{P \cdot \tau \cdot K_E}{m_2} + \left\{ \left[\frac{a_K \cdot (1 + k \tau \cdot a_p)}{a_p^2 \cdot k \tau} \right] - 1 \right\} \cdot K_P \cdot (\Delta H)_v, \quad (30)$$

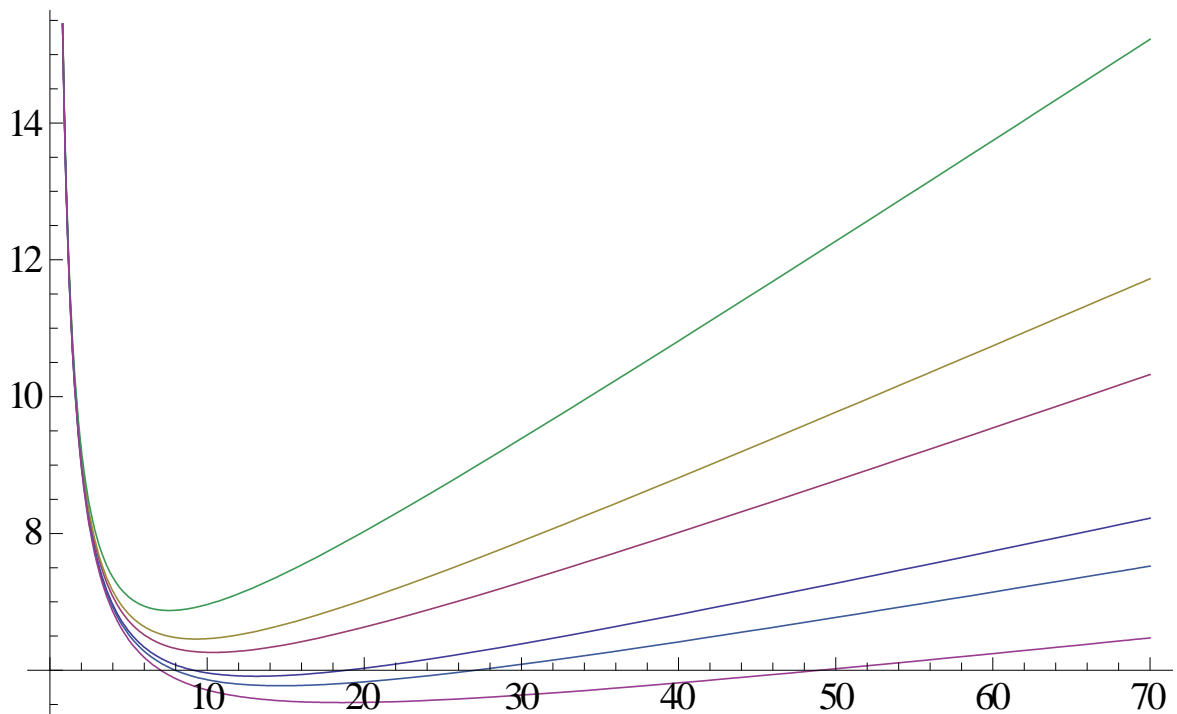
Pro vyčíslení (30) zvolíme následující vstupní parametry pro matematickou simulaci:

$$K_E = 5 \text{ Kč/kWh}; P = 10 \text{ kw}; m_2 = 1000 \text{ kg/h (hodinová produkce)};$$

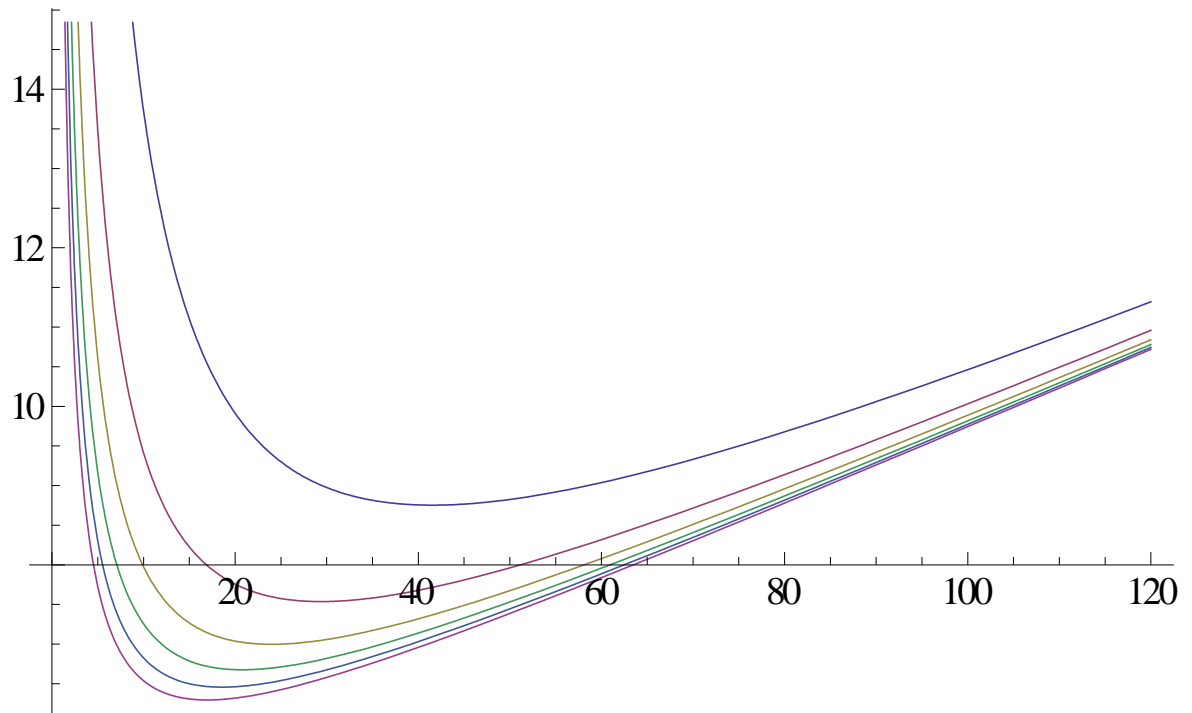
$$(\Delta H)_v = 2,3 \text{ MeJ/kg}; K_P = 500 \text{ Kč/GJ}; a_K = 0,3; a_p = 0,2; k = 1$$

Dosazením uvedených hodnot do (30) dostaneme

$$n = \frac{N}{m_2} = 0,05 \cdot \tau \left[\left(\frac{0,3 + 0,2 \cdot \tau}{0,04 \cdot \tau} \right) - 1 \right] \cdot 1,15 \quad (31)$$



Obr. 14. Závislost celkových nákladů na čase pro různou jednotkovou cenu el. energie - 5 Kč, 8 Kč, 10 Kč, 15 Kč, 4 Kč, 2,50 Kč



Obr. 15. Závislost celkových nákladů na čase pro rychlostní konstantu od 0,1 do 0,6

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Naměřte časové závislosti koncentrace tekutých proteinů při různých laboratorních podmínkách.
2. Vyhodnoťte experimentální data na základě předpokladu I. řádu vzhledem k tekutému proteinu.
3. Pomocí metody gelové permeační chromatografie stanovte molární hmotnost a její distribuce pro vybrané vzorky.
4. Proveďte zhodnocení a navrhněte další postup prací.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Hydrolýza pivovarských kvasnic

Sestavila jsem aparaturu pro hydrolýzu pivovarských kvasnic s kyselinou chlorovodíkovou. Navážila jsem 102,58 g pivovarských kvasnic a 200,38 g kyseliny chlorovodíkové. Směs jsem vařila ve varné baňce. Po dosažení varu, jsem do zkumavek odebrala bezprostředně za sebou dva vzorky a zkumavky zazátkovala. Vzorky jsem zvažila, převedla do titrační nádoby a doplnila 50 ml destilované vody. Připravené vzorky jsem titrovala na automatickém titrátoru. Vzorky jsem odebírala po 30 minutových intervalech.

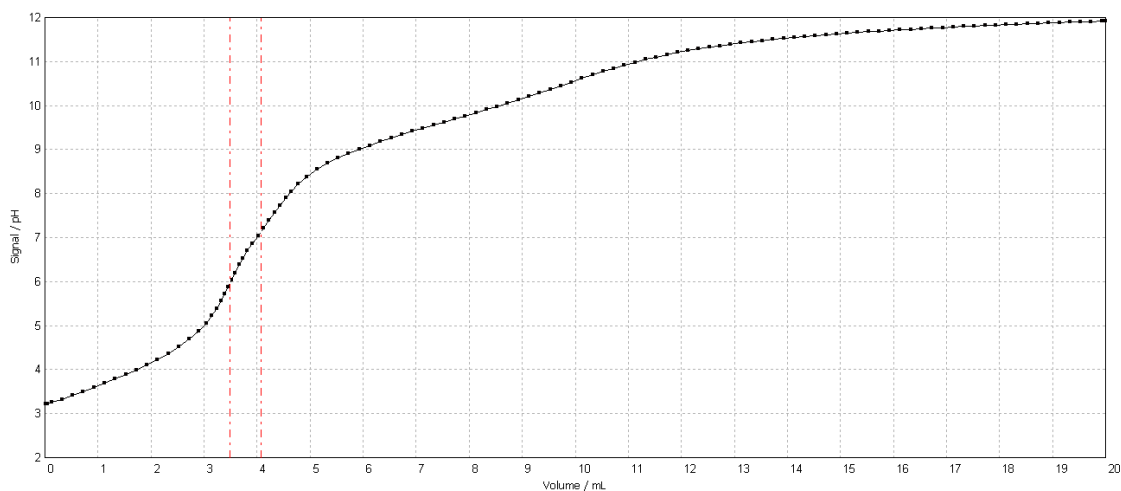
Použité chemikálie:

- pivovarské kvasnice – Zubr
- kyselina chlorovodíková
- 0,1 N hydroxid sodný o f 0,9967

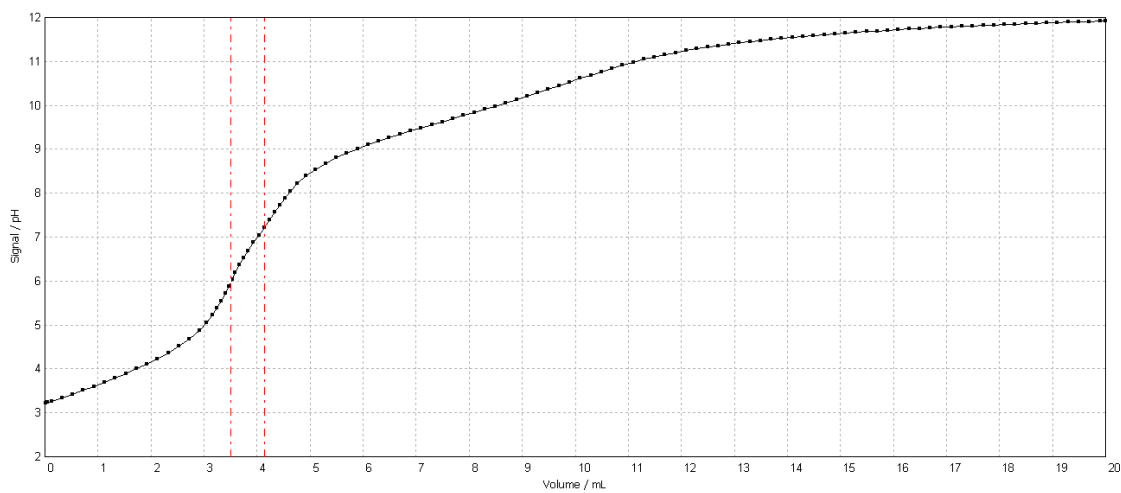
Následující tabulka zahrnuje naměřená a vypočtená data, koncentraci kyseliny chlorovodíkové jsem stanovovala automatickou potenciometrickou titrací. Výsledky jsou znázorněny na obrázcích 16 – 25.

Tab. 1. Experimentální data

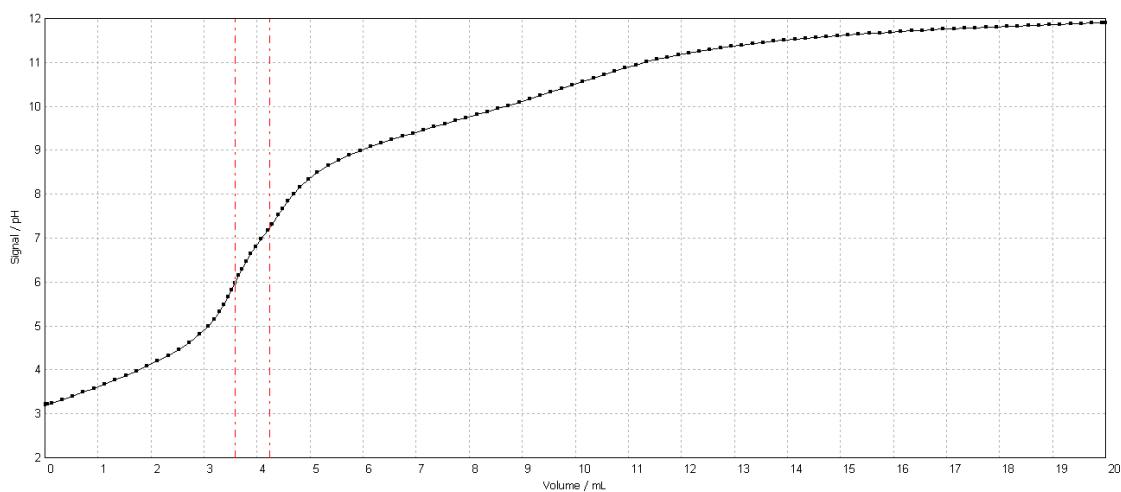
vzorek	čas [min]	navážka [g]	spotřeba [ml] R1	spotřeba [ml] R2	x_1 [$\mu\text{mol/g}$]	x_2 [$\mu\text{mol/g}$]
HK 0 – 1	0	3,7334	3,485	0,596	93,03850	15,9113
HK 0 – 2	0	3,7489	3,498	0,649	92,9994	17,2546
HK 1 – 1	30	3,9005	3,594	0,647	91,8379	16,5329
HK 1 – 2	30	3,8349	3,513	0,658	91,3037	17,1016
HK 2 – 1	60	3,7788	3,467	0,631	91,4459	16,6433
HK 2 – 2	60	3,8342	3,523	0,665	91,5804	17,2867
HK 6 – 1	180	3,8292	3,520	0,669	91,6219	17,4134
HK 6 – 2	180	3,8076	3,510	0,660	91,8789	17,2766
HK 9 – 1	360	3,8933	3,581	0,731	91,6751	18,7139
HK 9 – 2	360	3,9291	3,650	0,710	92,5900	18,01066



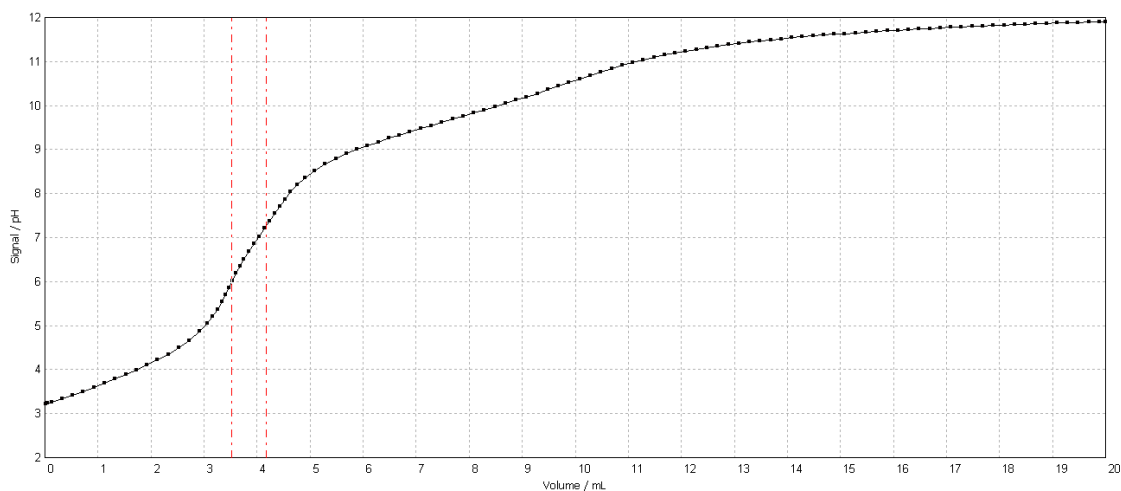
Obr. 16. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0/1 v čase 0 min



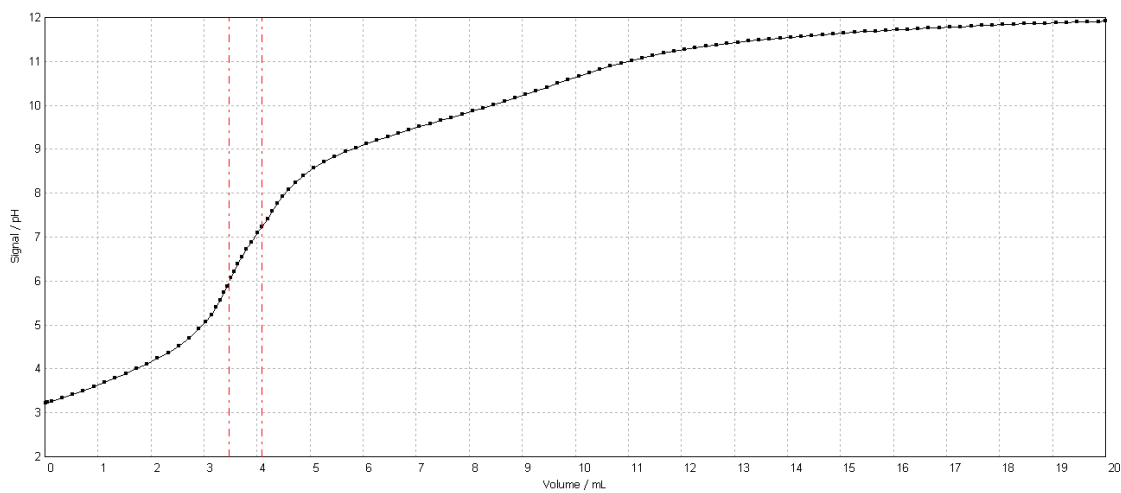
Obr. 17. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0/2 v čase 0 min



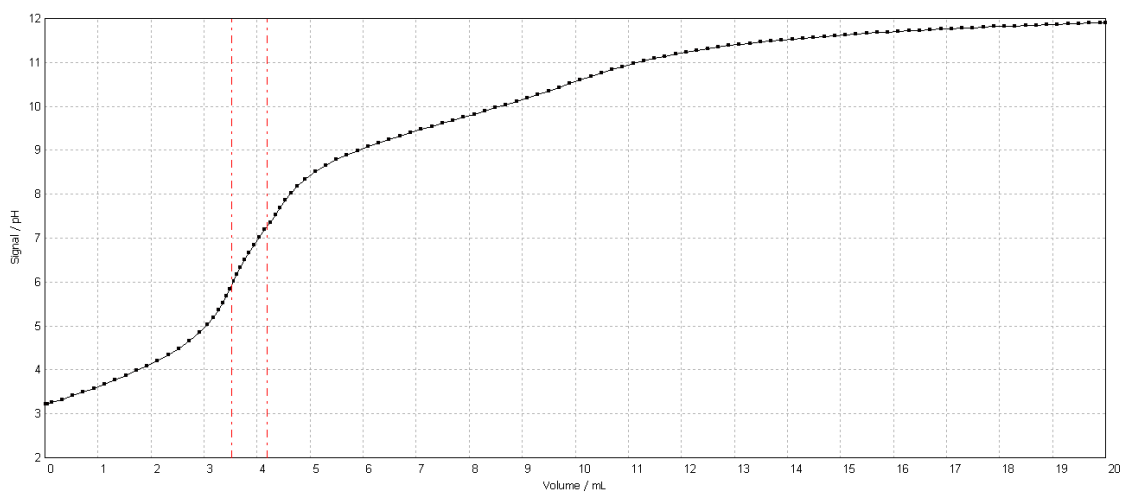
Obr. 18. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1/1 v čase 30 min



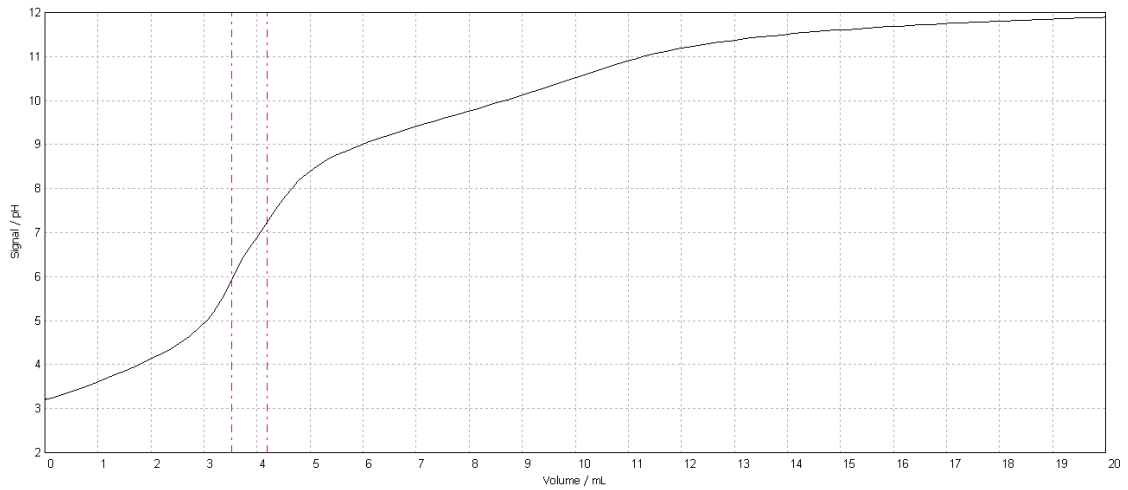
Obr. 19. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1/2 v čase 30 min



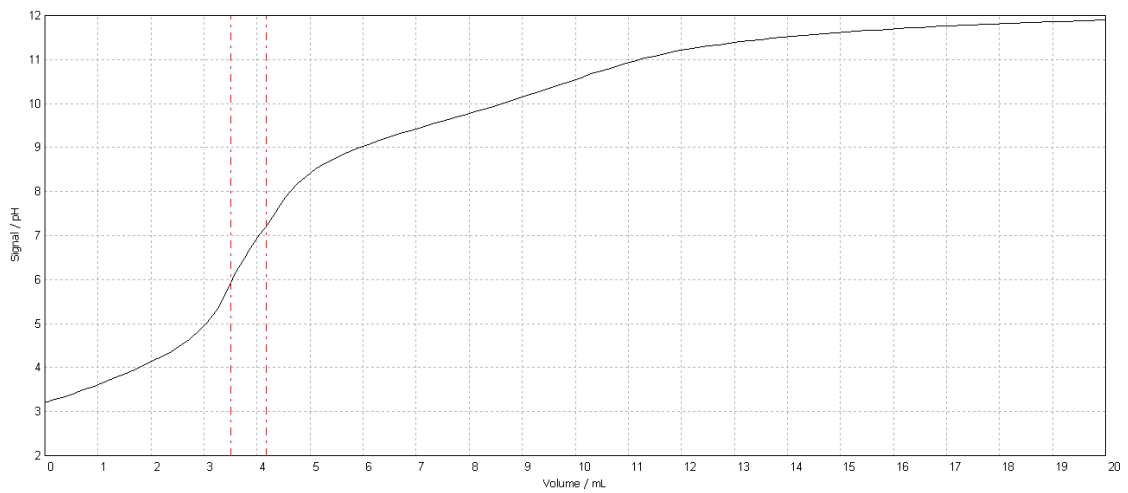
Obr. 20. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2/1 v čase 60 min



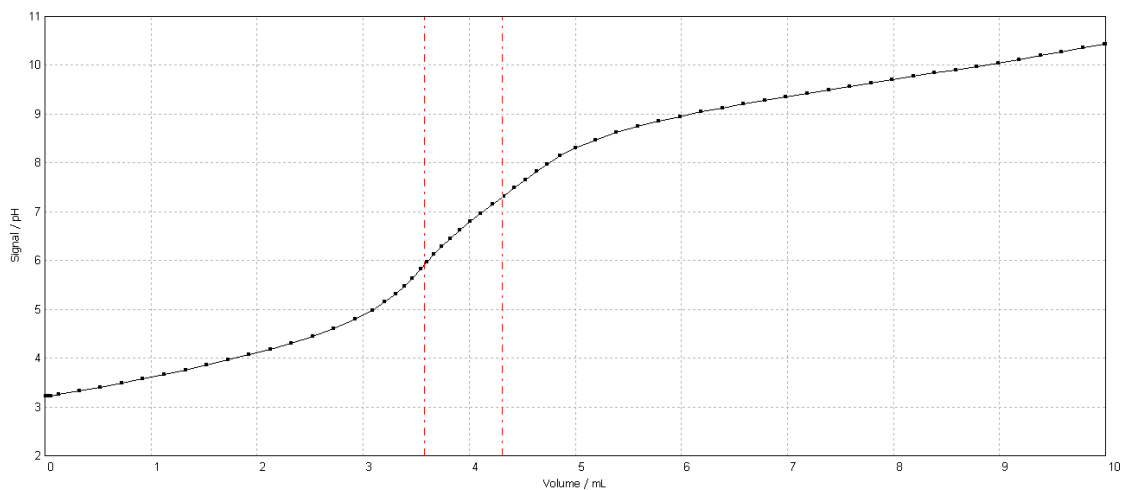
Obr. 21. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2/2 v čase 60 min



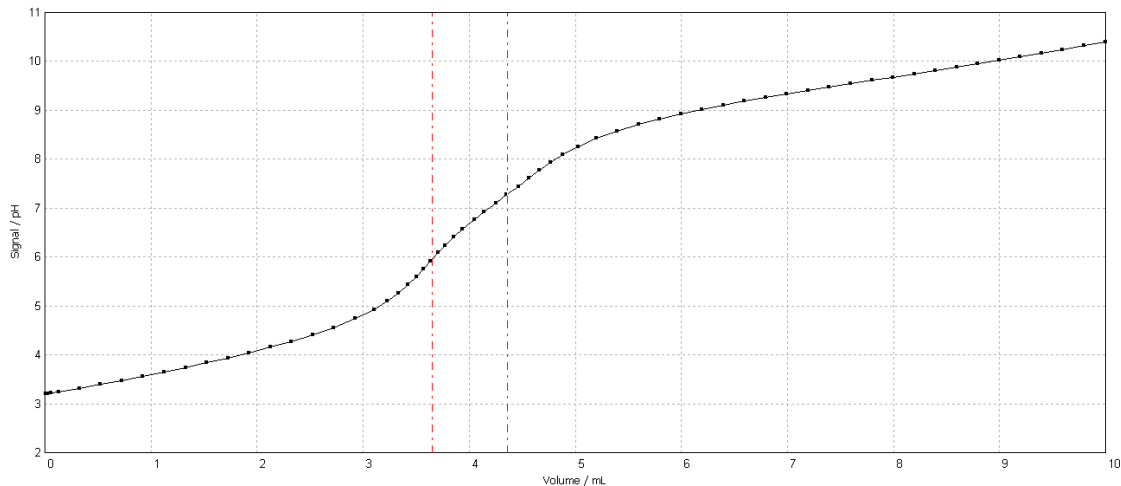
Obr. 22. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6/1 v čase 180 min



Obr. 23. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6/2 v čase 180 min



Obr. 24. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 9/1 v čase 360 min



Obr. 25. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 9/2 v čase 360 min

Z naměřených a vypočtených dat bylo patrné, že nedochází při hydrolyze k výrazným změnám. Z tohoto důvodu jsem provedla další pokus - hydrolyzu pivovarských kvasnic v tlakovém Papinově hrnci.

4.2 Tlaková hydrolyza pivovarských kvasnic

Připravila jsem si 2 litry 2% kyseliny mléčné. Následně jsem navážila 400,24 g pivovarských kvasnic. Obě složky jsem převedla do tlakového hrnce a odebrala první vzorek. Tlakový - Papinův hrnec se směsí jsem dala vařit. V momentě kdy začal přetlakový ventil odpouštět páry reakční směsi, odebrala jsem další vzorek. Vzorek jsem převedla do zkušavky, zazátkovala a zvažila. Po zvažení jsem vzorek smíchala s 50 ml destilované vody a převedla do titrační nádoby. Vzorky jsem titrovala na automatickém titrátoru. Titrace probíhala s 0,1N NaOH o faktoru 0,9655. Vzorky jsem odebírala po 30 minutových intervalech.

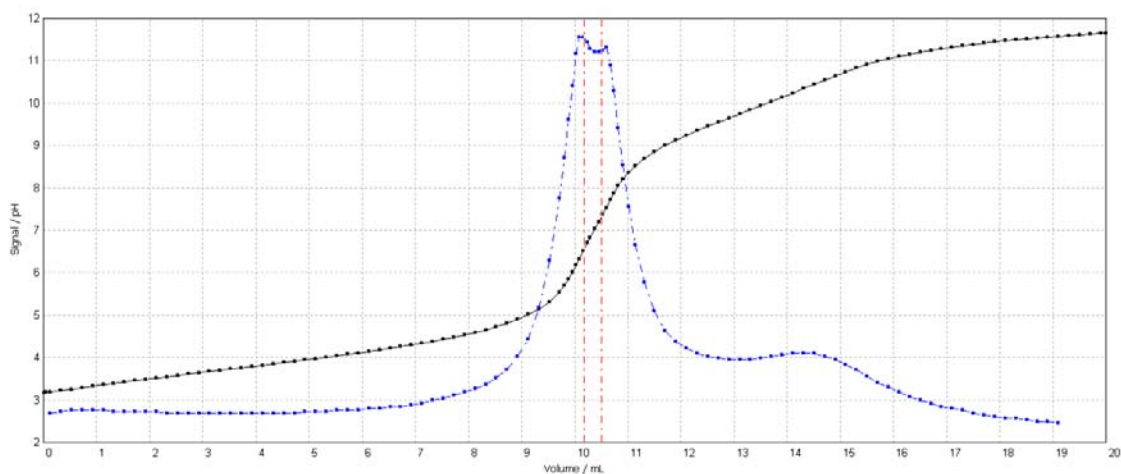
Použité chemikálie:

- pivovarské kvasnice – Zubr
- 2% kyselina mléčná
- 0,1 N hydroxid sodný o f 0,9655

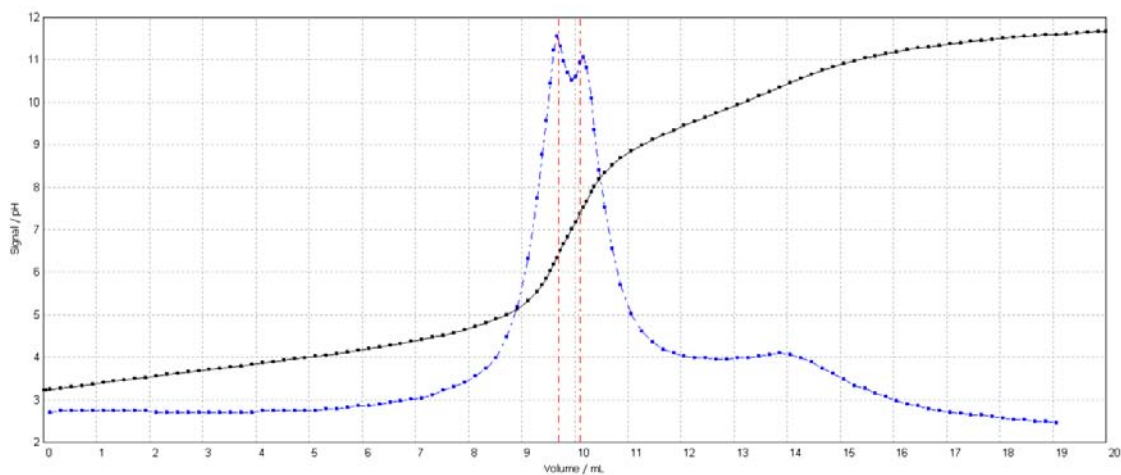
Následující tabulka a obrázky reprezentují výsledky experimentálního měření.

Tab. 2. Experimentální data

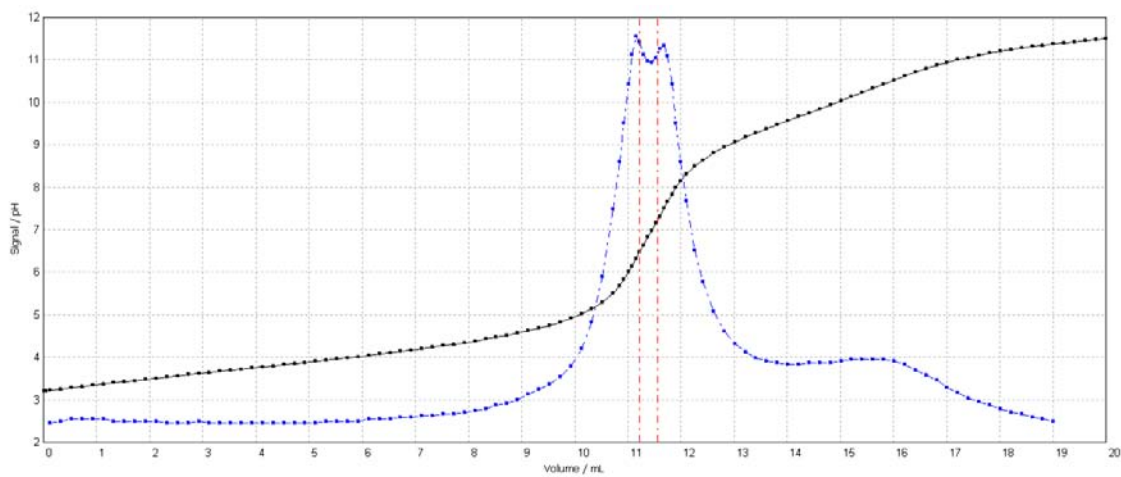
vzorek	čas [min]	navážka [g]	spotřeba [ml] R1	spotřeba [ml] R2	x ₁ [μmol/g]	x ₂ [μmol/g]
HK – PH A	-	5,2858	10,180	0,329	185,9471	6,009488
HK – PH 0	0	4,9191	9,703	0,403	190,4464	7,9099
HK – PH 1	30	4,9078	11,211	0,350	220,5514	6,8855
HK – PH 2	60	4,9983	12,836	0,457	247,9475	8,8277
HK – PH 3	90	4,9832	14,550	0,472	281,9077	9,1451
HK – PH 4	120	5,0339	16,621	0,565	318,7901	10,8367
HK – PH 5	150	4,9804	18,770		363,8751	
HK – PH 6	180	2,5321	10,940	0,386	417,1466	14,7183
HK – PH 7	210	2,4661	13,109	0,478	513,2290	19,06648
HK – PH 8	240	2,5243	16,721	0,632	639,5486	24,1729



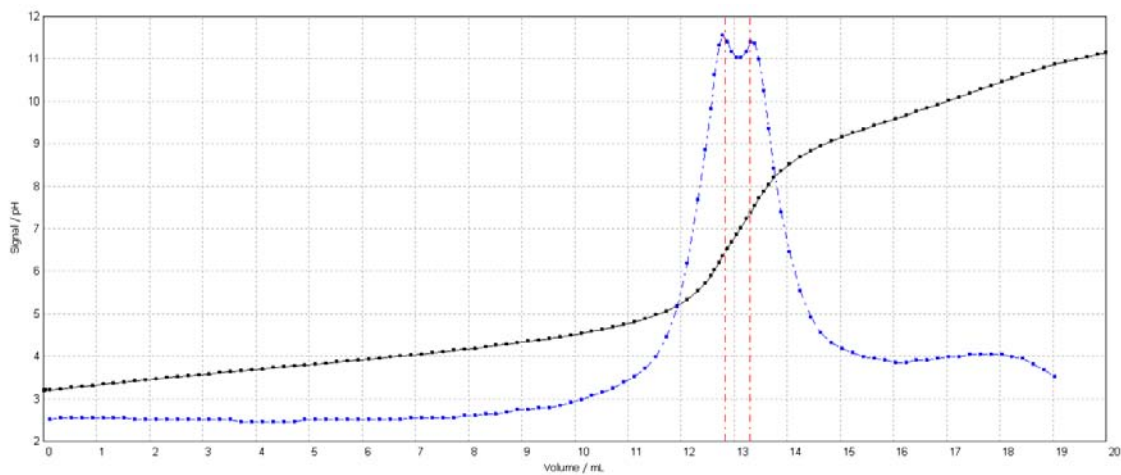
Obr. 26. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek A bezprostředně po smíchání



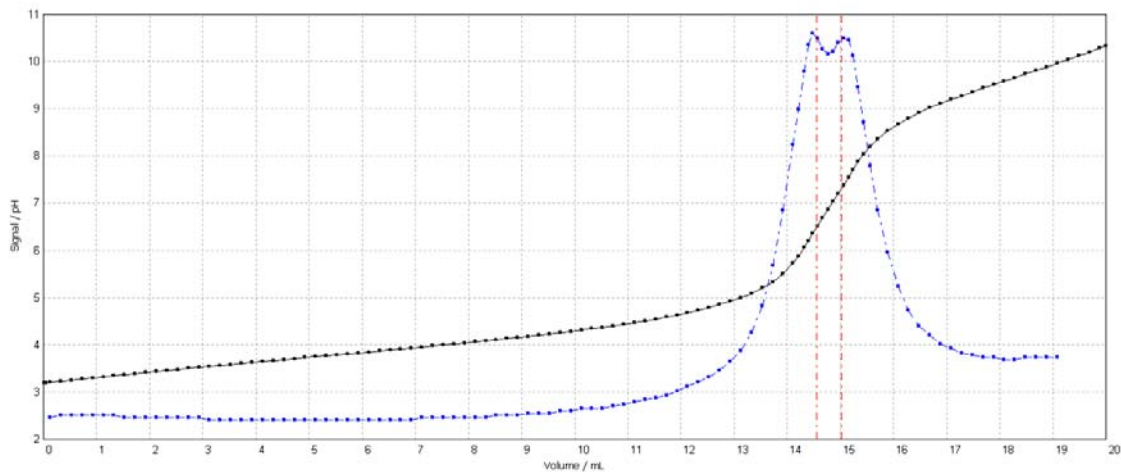
Obr. 27. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0 v čase 0 min



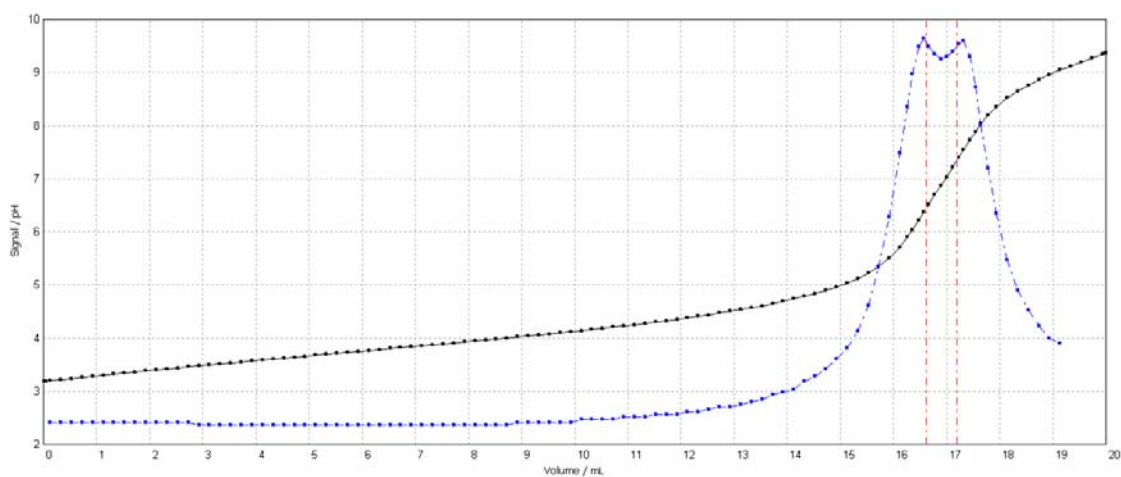
Obr. 28. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1 v čase 30 min



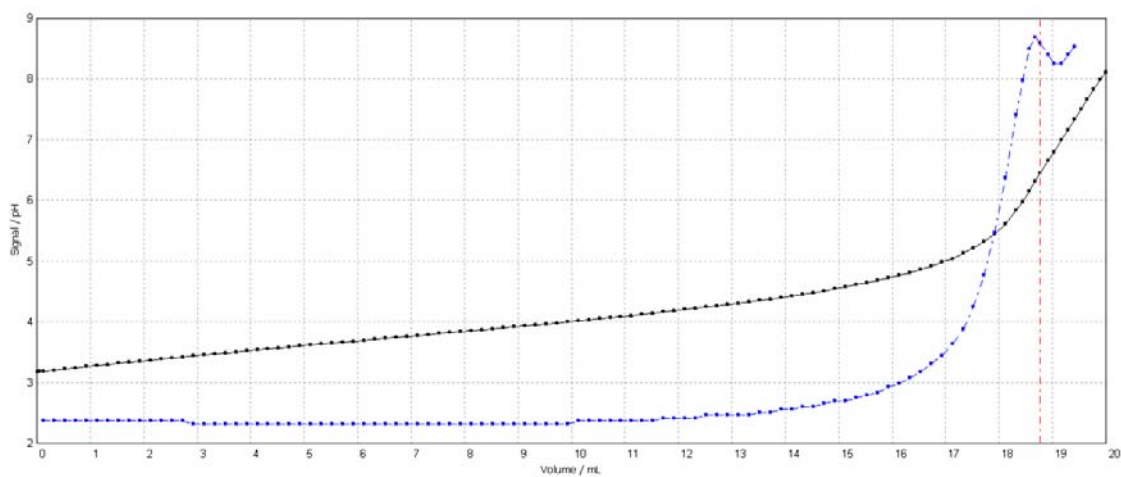
Obr. 29. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2 v čase 60 min



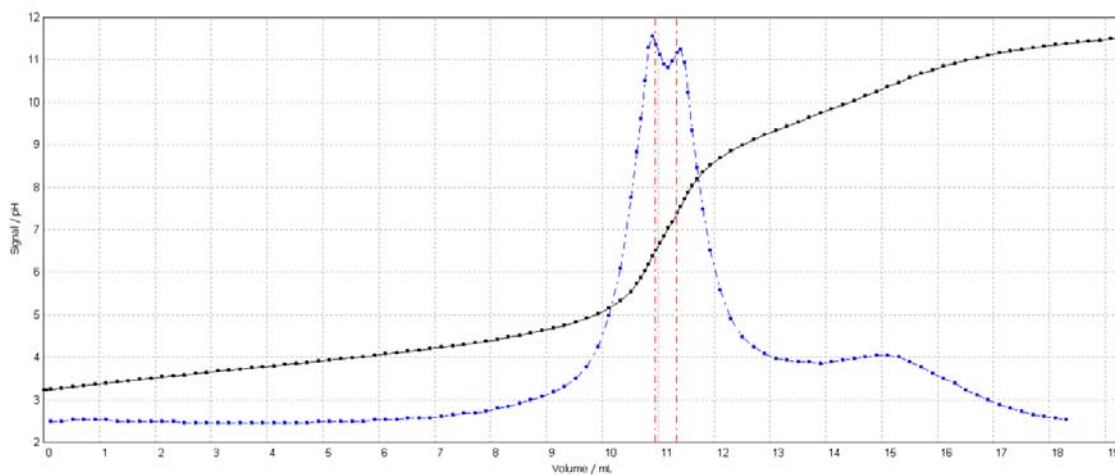
Obr. 30. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 3 v čase 90 min



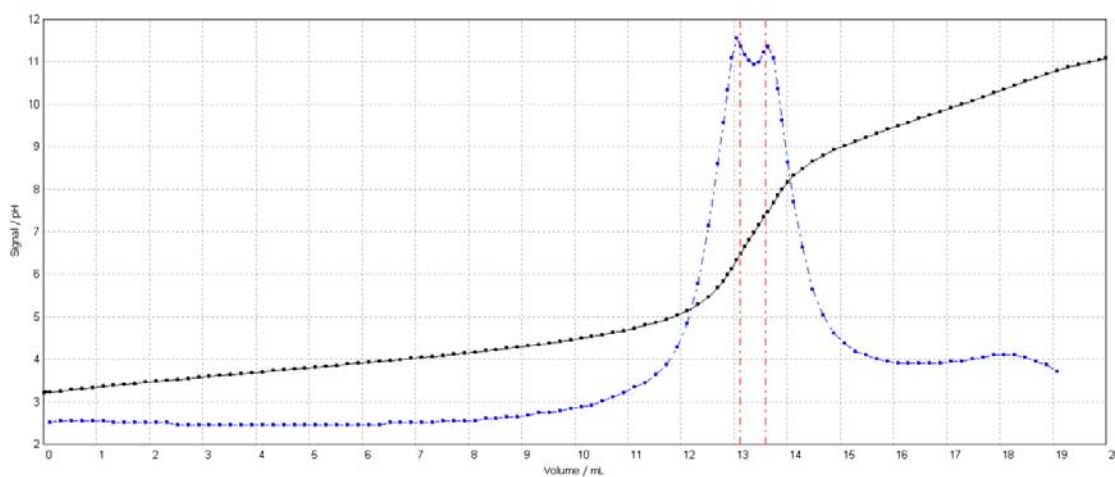
Obr. 31. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 4 v čase 120 min



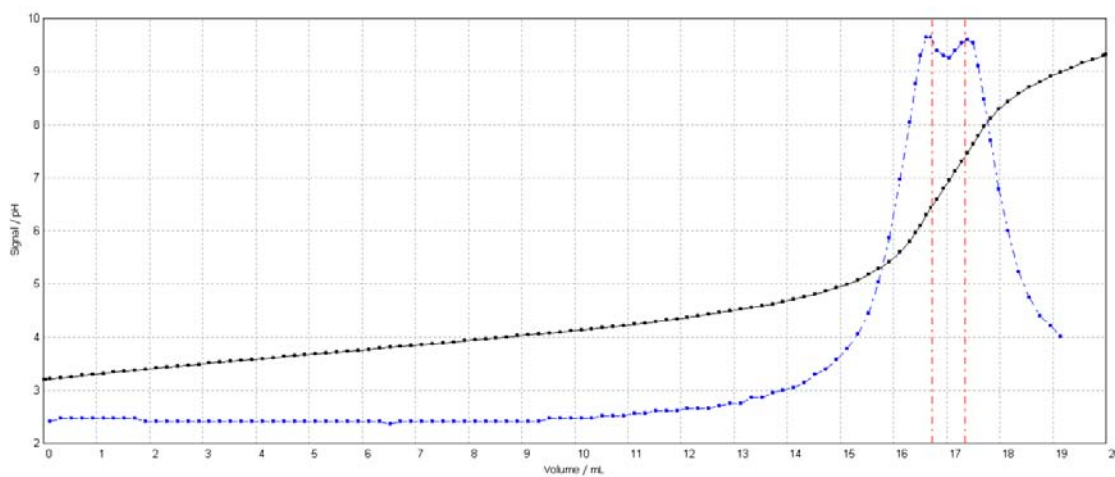
Obr. 32. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 5 v čase 150 min



Obr. 33. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6 v čase 180 min



Obr. 34. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 7 v čase 210 min



Obr. 35. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 8 v čase 240 min

4.3 Gelová permeační chromatografie – GPC

Molární hmotnost a distribuce molárních hmotností byly stanoveny metodou GPC na přístroji PL GPC-50 (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*) vybaveném refraktometrickým a viskozitním detektorem. Byly použity kolony TSK GMPWXL (*Tosoh Bioscience, Stuttgart, Německo*) a Ultrahydrogel 250 (*Waters, Milfort MA*) spojené do série. Měření bylo provedeno za 30 °C při průtokové rychlosti 0,8 ml/min. Jako mobilní fáze byl použitý vodný roztok 0,1M-NaNO₃, 0,2% NaN₃ 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. Objem nástřikové smyčky byl vždy 100 µl.

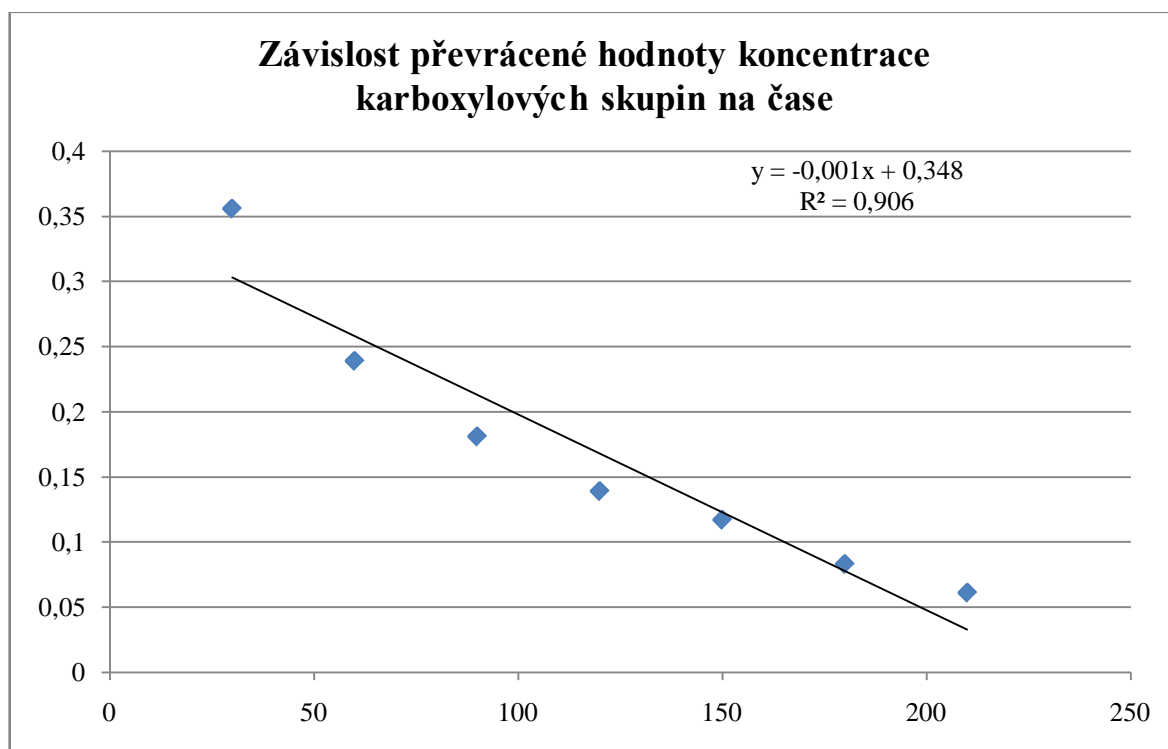
5 ZPRACOVÁNÍ EXPERIMENTÁLNÍCH DAT

5.1 Titrační sledování přírůstku karboxylových skupin

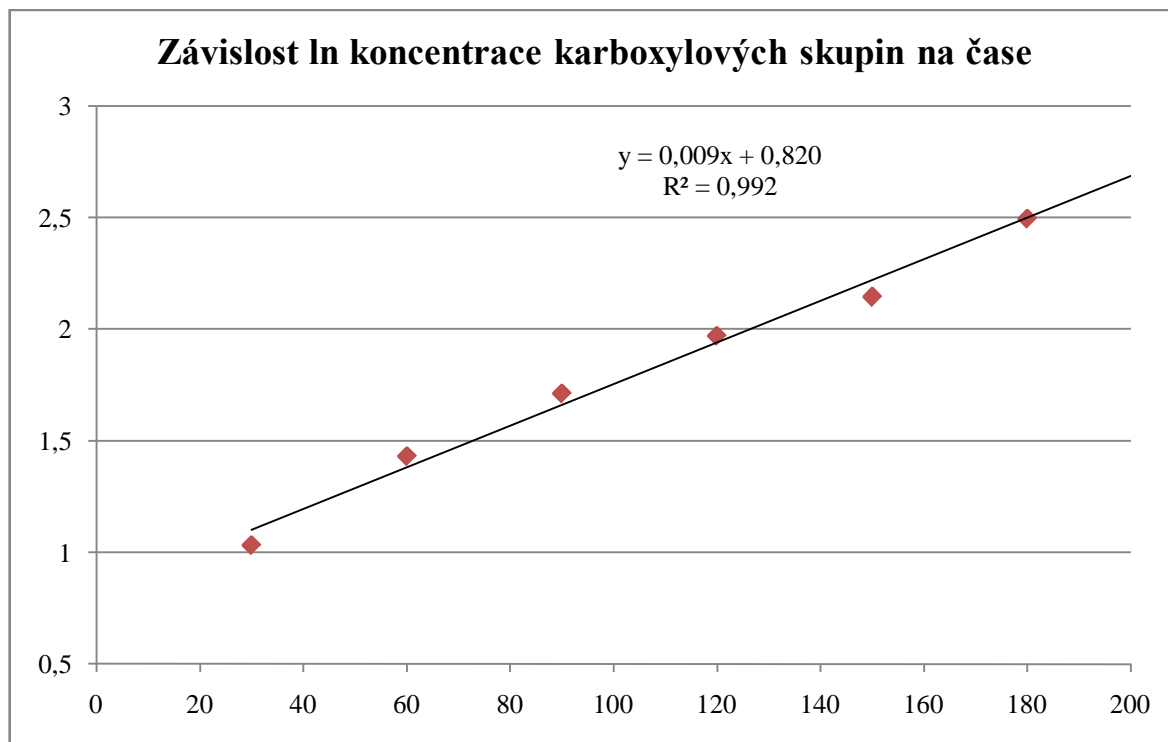
Při výpočtu byla provedena lineární úprava na odpar kyseliny mléčné.

Tab. 3. Experimentální data

čas [min]	spotřeba [ml]	spotřeba ⁻¹	ln spotřeby
30	11,211	0,356	1,033
60	12,836	0,239	1,430
90	14,550	0,181	1,712
120	16,621	0,139	1,970
150	18,770	0,117	2,144
180	10,940	0,083	2,495
210	13,109	0,061	2,790



Obr. 36. Graf závislosti převrácené hodnoty koncentrace karboxylových skupin na čase



Obr. 37. Graf závislosti přirozeného logaritmu karboxylových skupin na čase

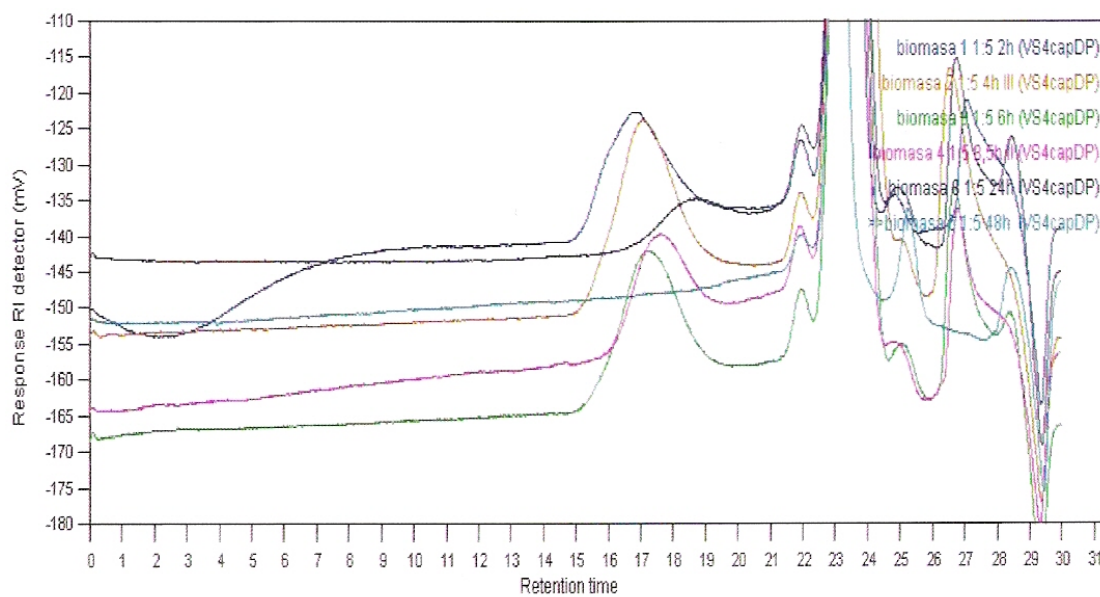
Z uvedených grafů vyplývá, že hydrolyzu pivovarských kvasnic lépe vystihuje reakce I. řádu.

5.2 Sledování úbytku molární hmotnosti pomocí GPC

Ke zpracování naměřených dat byl použit Cirrus GPC, Multi Detector Software (*Polymer Laboratories*). Všechny středy molárních hmotností byly určeny pomocí univerzální kalibrace.

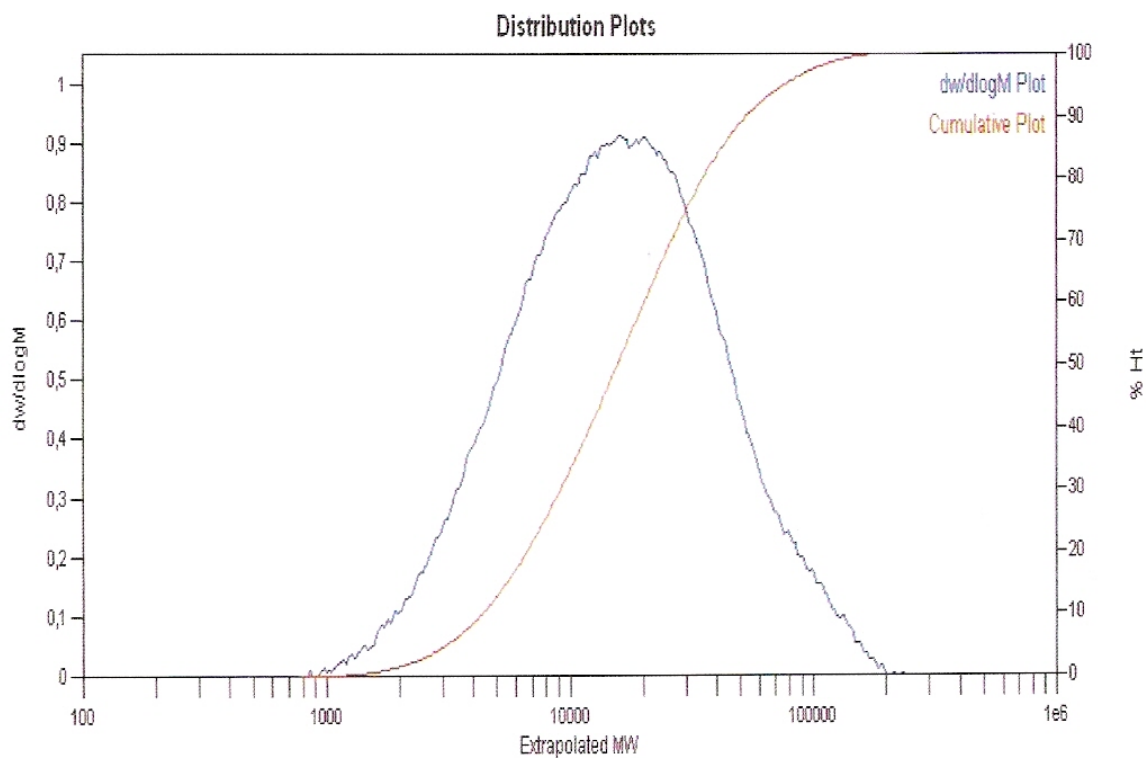
Tab. 4. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a kyselin mléčnou v poměru 1:5

vzorek	čas [hod]	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
1	2	20	60	3,0
2	4	10	24	2,4
3	6	9	17	1,9
4	8,5	9	17	1,9
5	24	12	13	1,1
6	48	-	-	-



Obr. 38. Signál viskozitního detektoru

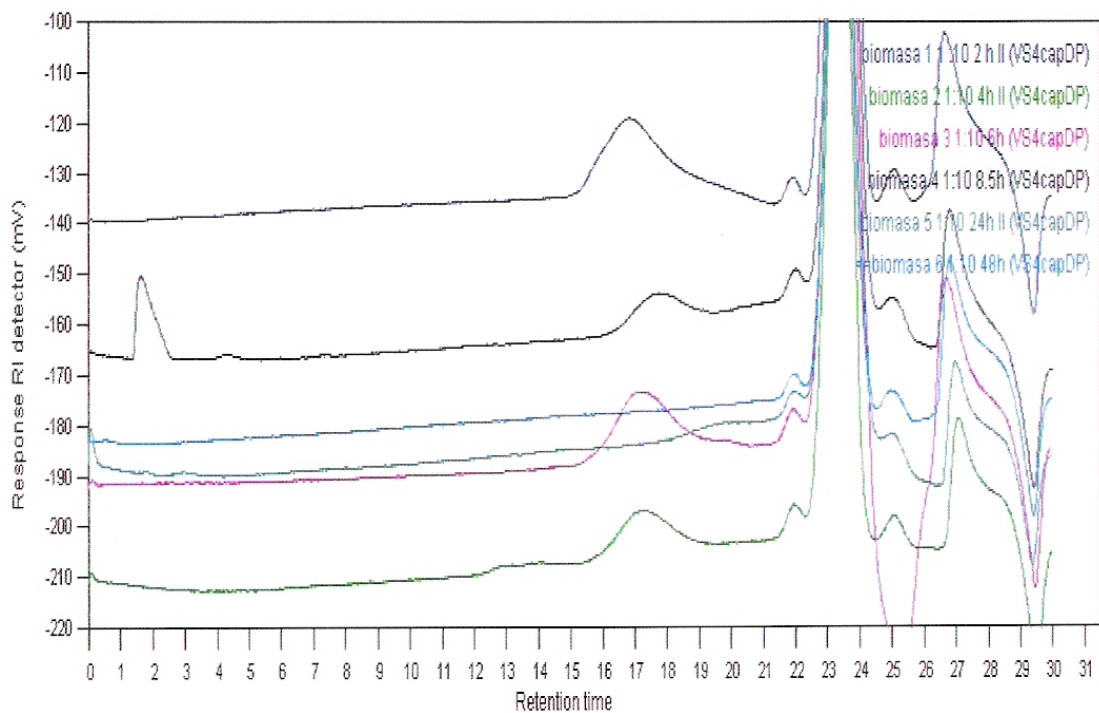
Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 19 min. S rostoucím časem hydrolýzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.



Obr. 39. Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 2

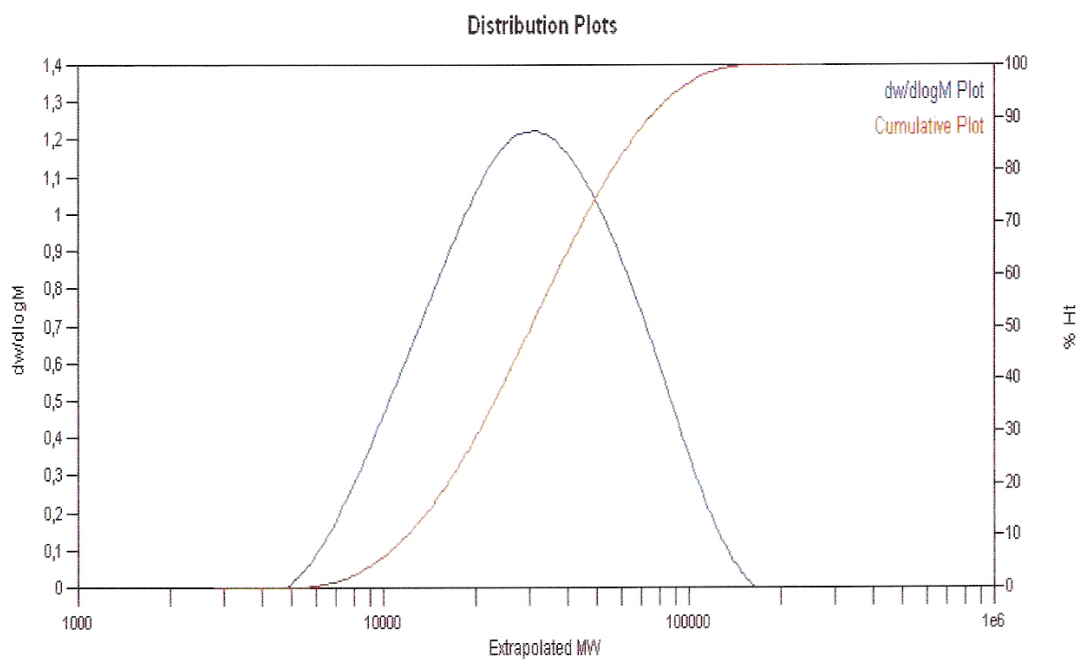
Tab. 5. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a kyselinu mléčnou v poměru 1:10

vzorek	čas [hod]	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
1	2	26	99	3,8
2	4	29	54	1,8
3	6	14	32	2,2
4	8,5	24	37	1,6
5	24	12	14	1,1
6	48	-	-	-



Obr. 40. Signál viskozitního detektoru

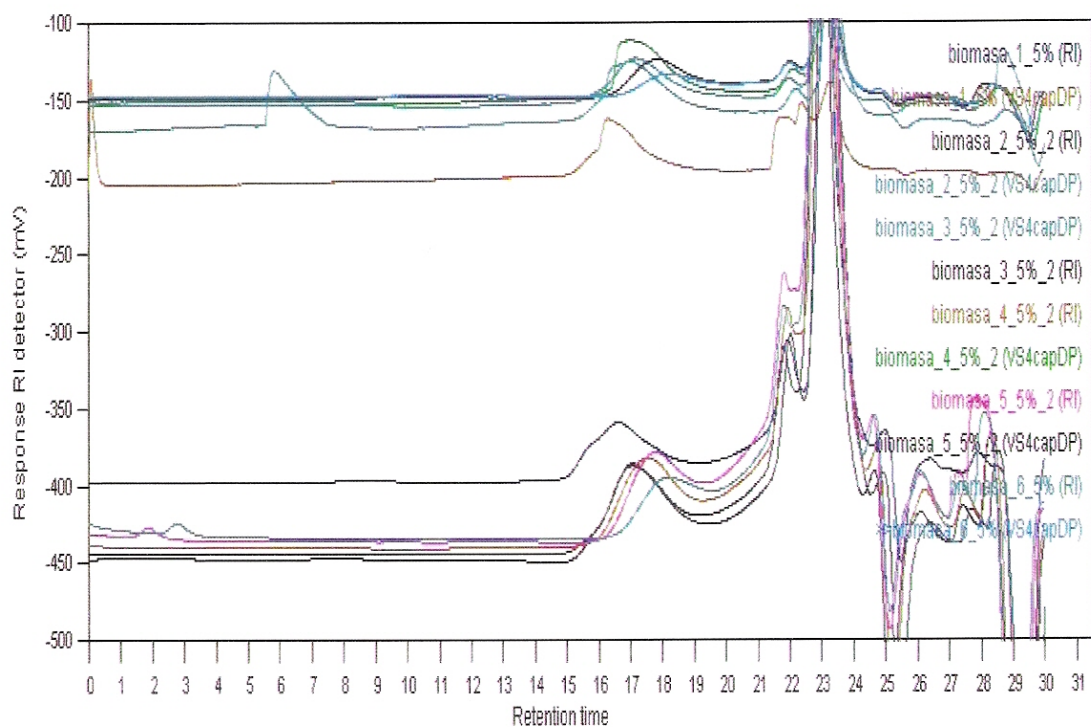
Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 20 min. S rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.



Obr. 41. Diferenciální a integrální křivka pro vzorek 4

Tab. 6. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 5% kyseliny mléčné

vzorek	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
kvasnice 1	16	46	2,8
kvasnice 2	7	20	2,8
kvasnice 3	10	21	2,2
kvasnice 4	10	18	1,8
kvasnice 5	8	14	1,8
kvasnice 6	7	12	1,8

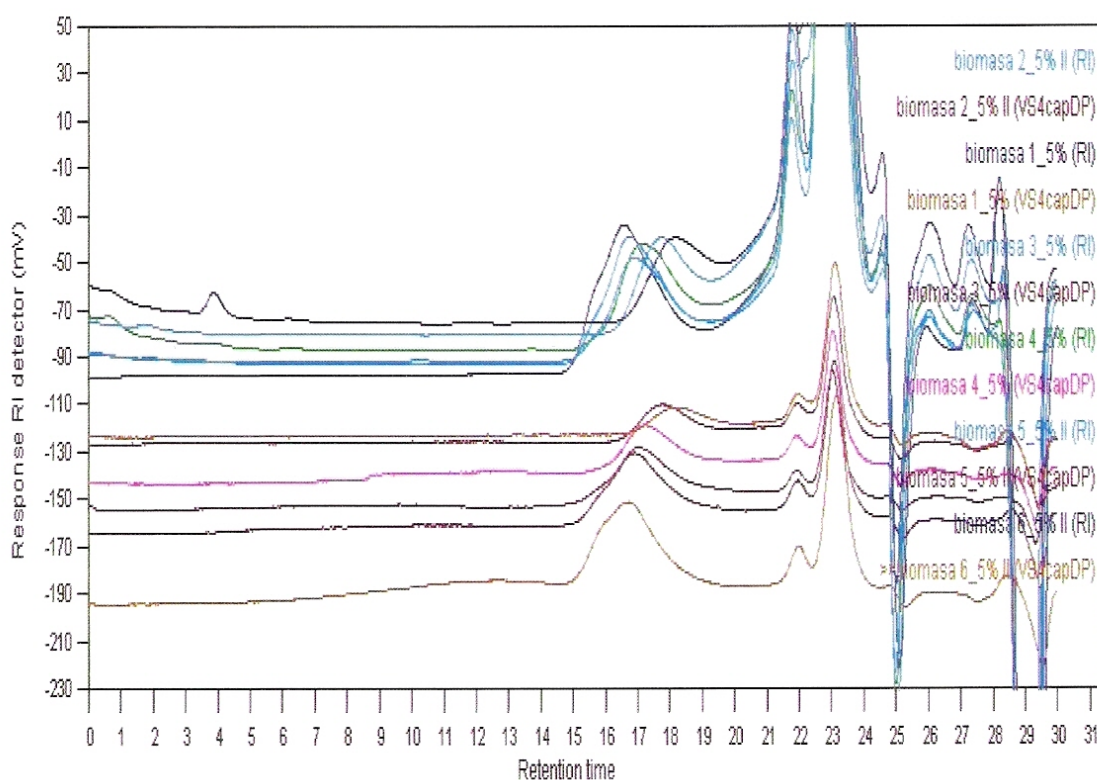


Obr. 42. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.

Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 19 min. S rostoucím časem hydrolýzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.

Tab. 7. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 2,5% kyselinu mléčnou

vzorek	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
kvasnice 1	16	43	2,8
kvasnice 2	11	33	3,1
kvasnice 3	11	26	2,3
kvasnice 4	10	19	1,8
kvasnice 5	10	17	1,7
kvasnice 6	9	14	1,5

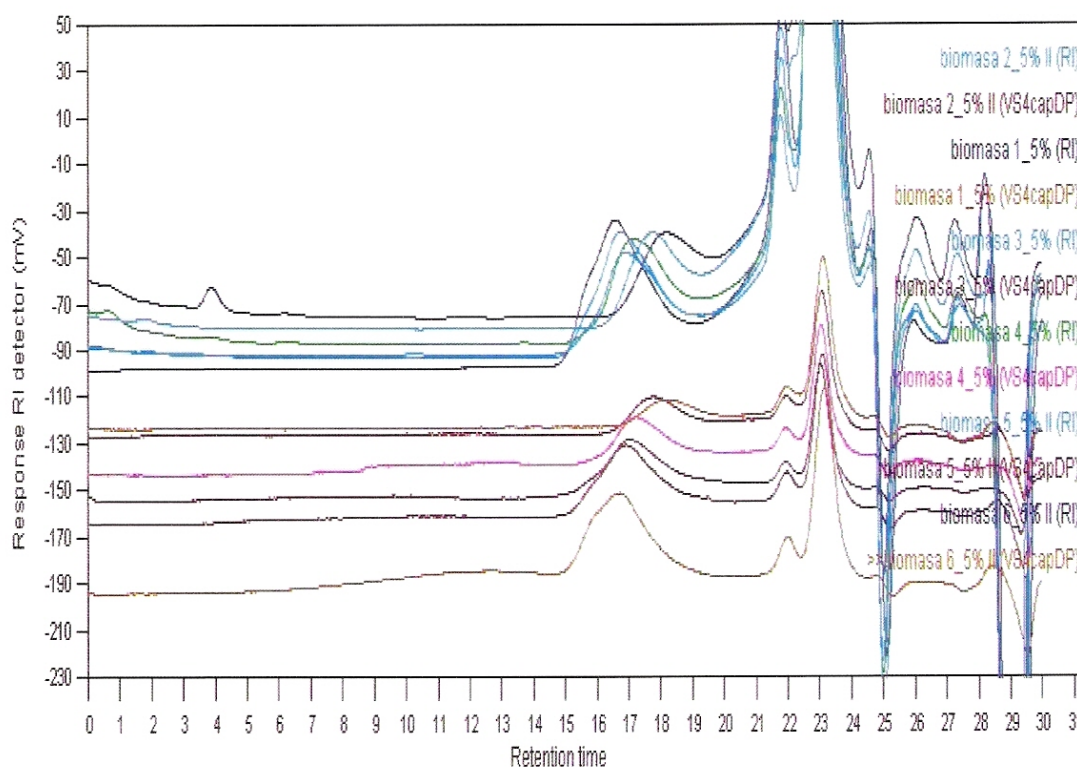


Obr. 43. Signál viskozitního a refraktometrického detektoru

Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 20 min. S rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.

Tab. 8. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 5% kyseliny mléčnou

vzorek	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
kvasnice 1	12	34	2,9
kvasnice 2	10	31	3,1
kvasnice 3	10	22	2,2
kvasnice 4	11	22	1,9
kvasnice 5	12	18	1,6
kvasnice 6	8	12	1,6

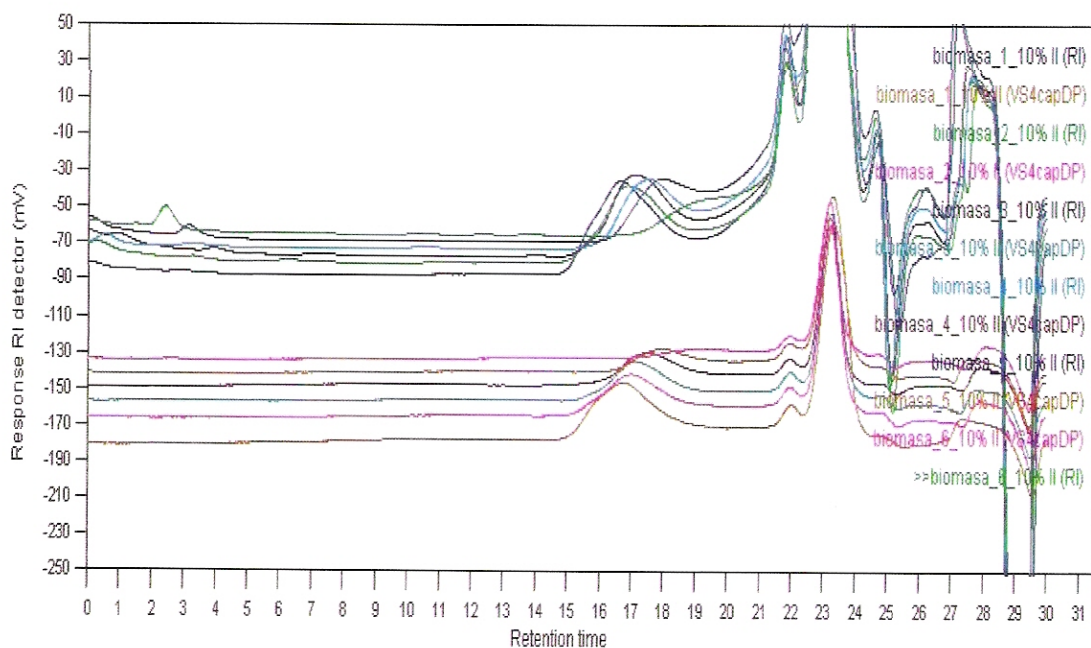


Obr. 44. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru

Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 20 min. S rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.

Tab. 9. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 2,5% kyseliny mléčné

vzorek	M_n [kg/mol]	M_v [kg/mol]	PD
kvasnice 1	19	46	2,4
kvasnice 2	20	42	2,1
kvasnice 3	17	31	1,9
kvasnice 4	11	22	2,0
kvasnice 5	11	20	1,9
kvasnice 6	12	15	1,2



Obr. 44. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru

Píky odpovídající proteinům jsou v oblasti retenčního času 15 – 20 min. S rostoucím časem hydrolyzy dochází k posunům píků ve vyšším retenčním čase, tedy k menší molární hmotnosti.

Experimentální data ukazují, že s rostoucí dobou hydrolyzy klesá molární hmotnost a současně dochází k zúžení distribuce molární hmotnosti proteinů.

ZÁVĚR A DISKUSE DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ

Na základě dostupné literatury byla vypracována literární studie, z níž vyplývá, že se autoři převážné většiny prací věnují hlavně chemismu hydrolýzy a aplikaci jejích produktů – vitamíny, kapalné proteiny. Málo prací je věnováno kvantitativnímu popisu chemické kinetiky. Neřeší se návrh a řízení hydrolyzačních reaktorů.

V teoretické části byly s využitím reakční kinetiky I. a II. řádu, vypočteny kinetické křivky závislosti reakčních složek, produktu a stupně konverze na čase. Byly vypočteny účelové funkce stávající se ze závislosti hlavních provozních nákladů na ekonomických, technologických a kinetických parametrech.

Minimum těchto funkcí, tj. minimum hlavních provozních nákladů je pak základ pro stanovení algoritmu řízení hydrolyzačních reaktorů.

V experimentální části se sledoval úbytek molární hmotnosti dle gelové permeační chromatografie na přístroji PL GPC-50 (*Polymer Laboratories, Church Stretton, Velká Británie*) vybaveném refraktometrickým a viskozitním detektorem. Ze získaných experimentálních dat se zjistilo, že s rostoucí dobou hydrolýzy klesá molární hmotnost a současně dochází k zúžení distribuce molární hmotnosti proteinů. Dále se titračně sledovala stoupající koncentrace karboxylových skupin. Provedly se dvě hydrolýzy. Při prvním pokusu se pivovarské kvasnice hydrolyzovaly kyselinou chlorovodíkovou a následně se titrovaly na automatickém titrátoru. Z naměřených a vypočtených výsledku bylo zřejmé, že nedocházelo k výrazným změnám. Následně se provedl druhý pokus, kdy se pivovarské kvasnice hydrolyzovaly kyselinou mléčnou za tlaku v Papinově hrnci a poté se titrovaly na automatickém titrátoru. Na základě zpracování kinetických měření bylo konstatováno, že navrhovaný mechanismus I. řádu je pravděpodobnější než mechanismus druhého řádu, proto se přiklání k Dunnovi [17], který také určil mechanismus I. řádu.

Navrhuji, aby se postup dalších prací soustředil na:

- pokračování ve studiu kinetiky hydrolýzy vstupní biomasy,
- sledování molární hmotnosti a její distribuci na podmínkách hydrolýzy,
- rozšíření vstupní biomasy na další možné suroviny (pekařské kvasnice, zbytky po fermentaci přírodních sacharidů atd.),
- řešení přípravy konečných hydrolyzátnů s nízkým obsahem neutralizačních solí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MAREČEK, V. *Bílkovinné hydrolyzáty potravinářské* 1. vyd. Praha: MPP, 1955
- [2] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I* 2. vyd. Tábor: Osis, 1999 ISBN 80-902391-3-7
- [3] VODRÁŽKA, Z. *Biochemie* 2. opravené vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-0438-6
- [4] ODSTRČIL, J., ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin* 1. vyd. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2006. ISBN
- [5] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D. *Potravinářská biochemie I.* 1. vyd. Zlín: UTB, 2005. ISBN 80-7318-259-5
- [6] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie II.* 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. ISBN 80-7318-395-1
- [7] HOZA, I., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie III.* 1. vyd. Zlín: UTB, 2006. ISBN 80-7318-396-x
- [8] BLAŽEJ, A., kol. *Technologie kůže a kožešin* Praha: SNTL/Alfa, 1984
- [9] GOLDSCHMIDT *Dissertation* Strassburg, 1898
- [10] LAWROW, D., *Z. physiol. Chem.* 31, 1900
- [11] SWIRLOWSKI, E.Z. *physiol. Chem.* 48, 1906
- [12] SVEDBERG, TH., NICHOLAS, J., F. *Zeitschr. physikal. chem.* 121, 65, 1926
- [13] HEWITT, L., F. *Biochem. Journ.* 21. 1927
- [14] BLACKBURN, S., ZEE, G., R. *Biochem. J.* 58, 227, 1954
- [15] VÚOT *Zprávy*, 1952
- [16] MAREČEK, VL. *Chem, Obzor*, 20, 189, 1945
- [17] DUNN, M., S. *J. am. Chem. Soc.* 47, 2564, 1925
- [18] GREENBERG, D., M., BURK, N., F. *J. am. Chem. Soc.* 49, 275
- [19] NASSET, F., S., GREENBERG, D., M. *J. am. Chem. Soc.* 51, 836, 1929
- [20] STUHLÍK, P. *Možnosti využití proteinových hydrolyzátů v humánní medicíně* Zlín, 2009
- [21] WILCOX CS *Do diuretics cause thiamine deficiency?* J Lab Clin Med, 1999
- [22] LESKE, MC., Wu SY, Hyman L, et al. *Biochemical factors in the lens opacities.* Case-control study. Arch Ophthalmol, 1995

-
- [23] McCORMICK, DB., Riboflavin. In: Shils M, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds *Modern Nutrition Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999
- [24] CUMMING, RG., MITCHELL, P., SMITH, W. *Diet and cataract: the Blue Mountains Eye Study*. Ophthalmology, 2000
- [25] VISHWANATH, M.S. *Introduction to Clinical Nutrition* 2.vyd., USA, 2003 ISBN 0-8247-4093-9
- [26] BRODY, T. *Nutritional Biochemistry* 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1999
- [27] KOTHAPALLI, N., CAMPOREALE, G., KUEH, A., et al. *Biological functions of biotinylated histones* J. Nutrt Biochem, 2005

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

HCl	Kyselina chlorovodíková.
N	Dusík.
K	Kvasnice.
A	Kyselina.
HK	Hydrolyzát kvasnic.
V	Voda.
x	Stupeň konverze.
NaOH	Hydroxid sodný.
GPC	Gelová permeační chromatografie.
M_n	Číselný střed molárních hmotností.
M_v	Hmotnostní střed molárních hmotností.
PD	Polydisperzita (M_n/M_v).
FMN	Flavinmononukleotid.
FAD	Flavinadenindinukleotid.
$FMNH_2$	Redukovaná forma Flavinmononukleotid.
$FADH_2$	Redukovaná forma Flavinadendinukleotid.
ATP	Adenosintrifosfát.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
c_K	Koncentrace kvasnic.
τ	Čas.
c_A	Koncentrace kyseliny.
k	Rychlostní konstanta.
e	exponenciální funkce
\ln	přirozený logaritmus
N_Σ	náklady celkem

N_E	Náklady na elektrickou energii.
N_c	Náklady na koncentraci.
P	Příkon.
K_E	Jednotková cena elektrické energie.
m_v	Hmotnost požadované odpařené vody.
$(\Delta H)_v$	Výparné teplo vody.
K_P	Jednotková cena páry.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Thiamin – vitamín B ₁	14
Obr. 2. Riboflavin – vitamín B ₂	15
Obr. 3. Pyridoxin – vitamín B ₆	16
Obr. 4. Kyselina pantotenová – vitamin B ₅	16
Obr. 5. Biotin – vitamín B ₇	17
Obr. 6. Graf závislosti koncentrace kyseliny na čase pro různou rychlostní konstantu.....	19
Obr. 7. Graf závislosti stupně konverze (x) na čase pro různou rychlostní konstantu.....	20
Obr. 8. Graf závislosti koncentrace kyseliny na čase pro různou rychlostní konstantu.....	21
Obr. 9. Graf závislosti stupně konverze (x) na čase pro různou rychlostní konstantu.....	21
Obr. 10. Bilanční schéma reaktoru a koncentračního zařízení.....	22
Obr. 11. Bilanční schéma odparky.....	23
Obr. 12. Závislost celkových nákladů na čase pro různou jednotkovou cenu el. energie..	24
Obr. 13. Závislost celkových nákladů na čase pro různou rychlostní konstantu.....	25
Obr. 14. Závislost celkových nákladů na čase pro různou jednotkovou cenu el. energie..	26
Obr. 15. Závislost celkových nákladů na čase pro různou rychlostní konstantu.....	27
Obr. 16. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0/1 v čase 0 min.....	31
Obr. 17. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0/2 v čase 0 min.....	31
Obr. 18. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1/1 v čase 30 min.....	31
Obr. 19. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1/2 v čase 30 min.....	32
Obr. 20. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2/1 v čase 60 min.....	32
Obr. 21. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2/2 v čase 60 min.....	32
Obr. 22. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6/1 v čase 180 min.....	33
Obr. 23. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6/2 v čase 180 min.....	33
Obr. 24. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 9/1 v čase 360 min.....	33
Obr. 25. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 9/2 v čase 360 min.....	34

Obr. 26. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek A bezprostředně po smíchání.	35
Obr. 29. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 2 v čase 60 min.....	36
Obr. 28. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 1 v čase 30 min.....	36
Obr. 27. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 0 v čase 0 min.....	36
Obr. 30. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 3 v čase 90 min.....	37
Obr. 31. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 4 v čase 120 min.....	37
Obr. 32. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 5 v čase 150 min.....	37
Obr. 33. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 6 v čase 180 min.....	38
Obr. 34. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 7 v čase 210 min.....	38
Obr. 35. Graf závislosti pH na spotřebě NaOH pro vzorek 8 v čase 240 min.....	38
Obr. 36. Graf závislosti převrácené hodnoty na čase	40
Obr. 37. Graf závislosti přirozeného logaritmu na čase.....	41
Obr. 38. Signál viskozitního detektoru.....	42
Obr. 39. Diferenciální a integrální distribuční křivka pro vzorek 2.....	43
Obr. 40. Signál viskozitního detektoru.....	44
Obr. 41. Diferenciální a integrální křivka pro vzorek 4.....	44
Obr. 42. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.....	45
Obr. 43. Signál viskozitního a refraktometrického detektoru.....	46
Obr. 44. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.....	47
Obr. 44. Signály viskozitního a refraktometrického detektoru.....	48

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Experimentální data.....	30
Tab. 2. Experimentální data.....	35
Tab. 3. Experimentální data.....	40
Tab. 4. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a kyselin mléčnou v poměru 1:5.....	42
Tab. 5. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a kyselinu mléčnou v poměru 1:10.....	43
Tab. 6. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 5% kyselinu mléčnou.....	45
Tab. 7. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 2,5% kyselinu mléčnou.....	46
Tab. 8. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 5% kyselinu mléčnou.....	47
Tab. 9. Vzorky obsahující pivovarské kvasnice a 2,5% kyselinu mléčnou.....	48