

Anaerobní rozklad bílkovinného hydrolyzátu síťovaného vysokomolekulárními bis-epoxydy

Bc. Jiří Olšák

Diplomová práce
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

ABSTRAKT

Tato práce obsahuje souhrn poznatků o biologickém rozkladu připravených vzorků síťovaných vybranými bis-epoxidy za anaerobních podmínek. Kromě biologického rozkladu byla věnována pozornost stanovení stupně zesíťování (fixační indexy) a rozpustnosti. Z práce vyplývá, že s rostoucím zesíťováním Hycolu klesá rozložitelnost modifikovaných bílkovin.

Klíčová slova: anaerobní, rozklad, bílkoviny, hydrolýza, síťování, bis-epoxidy

ABSTRACT

This thesis contains survey of know-how about biodegradation of prepared samples crossed-link with chosen bis-epoxides under anaerobic conditions. Part of the work was focused on level of cross-linking and solubility. It is clear that cross-linking of Hycol is dropping down the possibility microorganisms to biodegradation of modified protein.

Keywords: anaerobic, biodegradation, proteins, hydrolysis, cross-linking, bis-epoxides

Chtěl bych poděkovat vedoucímu své diplomové práce Prof. Ing. Janu Kupcovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky, které mi poskytl v průběhu diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat i všem ostatním pracovníkům Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za jejich ochotu a vstřícnost při práci na této diplomové práci, zejména Ing. Jiřímu Pšejovi a Ing. Josefu Hrnčířkovi, CSc. za jejich všestrannou pomoc.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího diplomové práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uveden jako spoluautor.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval.

Ve Zlíně dne 26. května 2006

.....

podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD.....	8
I TEORETICKÁ ČÁST	9
1 BIOLOGICKÝ ROZKLAD	10
2 ANAEROBNÍ ROZKLAD A JEHO SLEDOVÁNÍ	11
3 CHARAKTERISTIKA NĚKTERÝCH BÍLKOVIN A JEJICH BIOLOGICKÝ ROZKLAD	14
3.1 KOLAGEN	14
3.2 ŽELATINA.....	14
3.3 BÍLKOVINNÝ HYDROLYZÁT	14
4 MODIFIKACE BÍLKOVIN SÍŤOVÁNÍM EPOXIDY A JEJICH BIOLOGICKÝ ROZKLAD	16
4.1 SÍŤOVÁNÍ KOLAGENU	16
4.2 SÍŤOVÁNÍ ŽELATINY	18
4.3 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVINNÉHO HYDROLYZÁTU	19
5 ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ REŠERŠE A CÍL PRÁCE	20
II PRAKTICKÁ ČÁST	21
6 POUŽITÉ MATERIÁLY	22
6.1 CHEMIKÁLIE.....	22
6.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	23
6.3 MINERÁLNÍ MEDIUM	23
6.4 TESTOVANÉ VZORKY A JEJICH PŘÍPRAVA.....	24
7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	27
8 METODY STANOVENÍ	28
8.1 STANOVENÍ STUPNĚ ANAEROBNÍHO ROZKLADU	28
8.2 STANOVENÍ SUŠINY	29
8.3 STANOVENÍ ORGANICKÉHO UHLÍKU	29
8.4 FIXAČNÍ INDEX	29
9 VÝSLEDKY A DISKUSE	31
9.1 POKUS 1 – ANAEROBNÍ ROZKLAD.....	31
9.2 POKUS 2 – ANAEROBNÍ ROZKLAD.....	39
9.3 MĚŘENÍ ROZPUSTNOSTI.....	47
ZÁVĚR	50
SOUHRN	52
SUMMARY	53

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	56
SEZNAM OBRÁZKŮ	57
SEZNAM TABULEK.....	58

ÚVOD

V dnešní době je celosvětová poptávka po plastech vyšší než 100 milionů tun/rok. Ve vyspělých státech je spotřeba plastů na osobu 100 kg/rok. V současnosti jsou syntetické polymery hojně využívány ve všech průmyslových a spotřebních oblastech pro své velmi dobré chemické a fyzikální vlastnosti a často slouží jako náhrada za běžně používané materiály jako papír, sklo, dřevo, kovy, aj. Další nespornou předností je jejich ekonomická výhodnost.

Největším problémem je likvidace resp. recyklace po skončení jejich životnosti. Převážná část plastových odpadů (hlavně obaly) končí na skládce, kde představují závažný problém pro životní prostředí a jeho ochranu, díky své vysoké odolnosti proti mikrobiálnímu rozkladu, resp. enzymatické degradaci.

Řešením by mohly být tzv. biorozložitelné polymery, které jsou po skončení své životnosti snadno degradovatelné v přírodě. Přírodní polymer jako celuloza, škrob, želatina, pektin mají ve svém hlavním řetězci místa vhodná pro enzymatické štěpení, které umožňují jejich dobrou biorozložitelnost a jsou tedy vhodným materiálem pro přípravu diskutovaných polymerů. Pro zlepšení především jejich mechanických vlastností se přírodní polymery modifikují. Velmi rozšířený způsob modifikace patří jejich síťování různými činidly. Síťování musí být prováděno tak, aby nebyla ohrožena přirozená biodegradabilita takto modifikovaných biopolymerů.

Vhodným materiálem mohou být také odpadní bílkoviny jako např. bílkovinný hydrolyzát. Síťováním bílkovinného hydrolyzátu (Hykol) vysokomolekulárními bis-epoxidy a jeho následným biologickým rozkladem za anaerobních podmínek se zabývá tato práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOLOGICKÝ ROZKLAD

Během tohoto pochodu jsou rozkládány organické látky na jednodušší sloučeniny, které se mohou následně zapojit do procesů, které probíhají v přírodě. V aerobním prostředí dochází k rozkladu substrátu na CO_2 , vodu a vzniká biomasa. V anaerobních podmínkách se substrát rozkládá na CH_4 , CO_2 , vodu a opět za tvorby biomasy.

Významný vliv na rozklad polymerů v biosféře má UV záření, které snižuje molární hmotnost a zhoršuje mechanické vlastnosti substrátu. Mikroorganismy se při biodegradaci uplatňují obvykle až v závěrečné fázi, které předchází fyzikální a chemické rozkladné procesy. K nejvýznamnějším mikroorganismům podílejícím se na biodegradaci patří nejrůznější druhy bakterií, plísní a hub.

Kameya a kol. [1] studovali obecně biodegradaci některých organických sloučenin. Z jejich práce vyplývá, že většina alifatických uhlovodíků a karboxylových kyselin se rozkládá velmi dobře. Opakem jsou rozvětvené uhlovodíky nebo sloučeniny, které obsahují etherovou vazbu, a jsou podstatně hůře rozložitelné. Dalším poznatkem bylo, že sloučeniny obsahující primární hydroxylovou skupinu, aldehydickou skupinu, nebo $-\text{OH}$ skupinu jsou dobře odbouratelné. Velmi těžce odbouratelné jsou látky, které obsahují nitroskupinu, halogeny a sulfoskupinu.

U polymerních materiálů, jsou-li biologicky odbouratelné, jsou předpokládány stejné nebo podobné degradační předpoklady, jako u přírodních polymerů. V době, kdy jsou používány, by měly mít stále fyzikální a chemické vlastnosti, po skončení životnosti by se měly v přírodě rozložit.

Stupeň biodegradace se dá zvýšit řadou způsobů, např. změnou chemické struktury polymeru při kopolymeraci s lehce rozložitelnými monomery, zavedením lehce rozložitelných funkčních skupin, atd. Jednou z možností je mechanické smísení plastu s lehce rozložitelnou látkou. Mohou to být např. škrob, bílkoviny, celuloza, polyhydroxymásečná kyselina aj. Těmito kroky je umožněna fragmentace polymeru na menší části, které jsou snáze atakovatelné mikroorganismy.

2 ANAEROBNÍ ROZKLAD A JEHO SLEDOVÁNÍ

Anaerobní rozklad je soubor biologických procesů, které na sebe navazují a na kterém se podílejí různé skupiny mikroorganismů. Konečnými produkty anaerobního rozkladu jsou metan a oxid uhličitý. Aby rozklad mohl probíhat, musejí být produkty jedné mikrobiální skupiny substrátem pro mikroorganismy druhé skupiny. Pokud se naruší pochody v jedné skupině, je narušen celý rozklad a tím je ovlivněna i jeho účinnost.

Anaerobní rozklad je také široce využíván při čištění odpadních vod. Důvodem je jeho ekonomická, prostorová a energetická nenáročnost. Anaerobní rozklad produkuje méně biomasy než za aerobních podmínek, příslušné mikroorganismy mají malé nároky na živiny; nevýhodou tohoto procesu je malá reakční rychlost. Ta se dá ovlivnit např. zvýšením teploty, nebo mícháním směsi.

Aby anaerobní rozklad mohl správně probíhat, musí být dodrženy určité podmínky prostředí:

➤ Složení substrátu a anaerobního kalu

Biogenní prvky jsou uhlík, dusík a fosfor, bez jejich přítomnosti nedochází k růstu bakterií. Minimální koncentrace N ve 100 g sušiny kalu je 2,5 g, u fosforu 0,5 g. Poměr C : N : P při anaerobních podmínkách by měl být 100 : 10 : 0,2, při aerobních podmínkách 100 : 10 : 1. Anaerobní rozklad probíhá pomaleji než rozklad aerobní, protože anaerobní mikroorganismy mají delší generační dobu.

➤ Teplota

S rostoucí teplotou (do cca 65 °C) roste rychlost všech probíhajících procesů. Se změnou teploty se také mění zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů (může se porušit rovnováha systému). Tvorba methanu, hlavní složky anaerobního rozkladu, probíhá v širokém rozmezí teplot (4 – 65 °C). Většina procesů probíhá v mezofilní oblasti (30 – 45 °C), popřípadě v termofilní oblasti (45 – 60 °C), kdy je reakční rychlost nejvyšší.

➤ pH

Optimální hodnota pH je v rozmezí 6,5 – 7,5. Mimo toto rozmezí je biorozklad značně omezen (příčinou snížení pH je především přítomnost nižších mastných kyselin).

➤ Toxické látky

Pro striktně anaerobní organismy je nejvíce toxický kyslík, dále pak sulfidy, kyanidy, siřičitany a soli těžkých kovů (Cr, Pb, Cu, Cd).

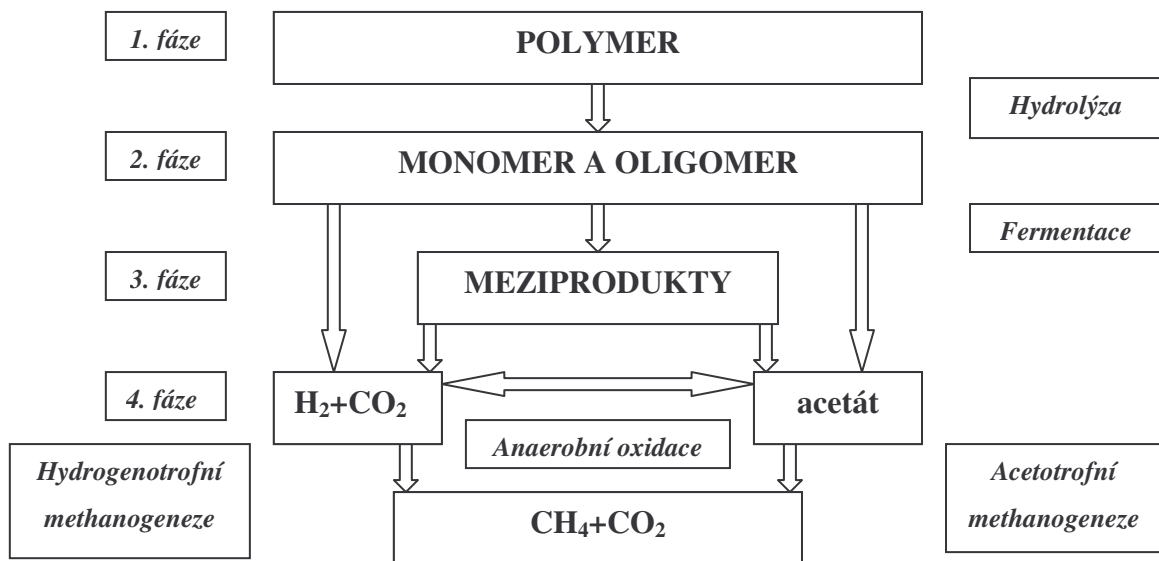
Z organických sloučenin jsou toxické zejména rozpouštědla, fenoly a pesticidy [2,3].

Anaerobní rozklad je ovlivněn řadou faktorů. Platí, že čím je molekulová hmotnost polymeru menší, tím jsou jeho řetězce kratší a proto je snadněji rozložitelný. Schopnost biodegradace je výrazně ovlivněna síťováním, větvením a stupněm krystalinity.

Pokud je řetězec polymeru větvený, nebo prostorově síťovaný, tak se rapidně zhoršuje biodegradabilita polymeru [4,5]. Velmi důležité je dodržet co nejmenší rozdíl polarit mezi polymerem a rozpouštědlem, ve kterém probíhá biodegradace. Nejpoužívanějším rozpouštědlem při biodegradaci je voda. Rozpustnost polymeru ve vodě usnadňuje přístup enzymů k řetězcům a také usnadňuje případnou hydrolyzu řetězců.

Anaerobní rozklad je rozdělen do 4 fází:

1. fáze: **hydrolyza** – při hydrolyze dochází k rozkladu vysokomolekulárních látek na nízkomolekulární látky či monomery; na tomto rozkladu se podílejí extracelulární hydrolytické enzymy.
2. fáze: **acidogeneze** – hydrolyzované produkty se dále rozkládají na jednodušší organické látky (kyseliny a alkoholy). Zastoupení těchto produktů je závislé na charakteru prvotního substrátu a na podmínkách prostředí.
3. fáze: **acetogeneze** – v této fázi dochází k oxidaci na CO₂, vodu a kyselinu octovou (ta tvoří až 75 % substrátu pro závěrečný methanogenní proces).
4. fáze: **methanogeneze** – je poslední fází, ve které mikroorganismy produkují především methan.



Obr. 1: Schéma anaerobního rozkladu [6]

Během anaerobního rozkladu mikroorganismy přeměňují substrát na plynné složky, vodu a novou biomasu. Proto můžeme sledovat změny koncentrace oxidu uhličitého, methanu nebo množství vzniklé biomasy. Sledování změn množství biomasy je obtížné, protože její nárůst je velmi pomalý a obtížně měřitelný. Z tohoto důvodu je lepší sledovat produkci plynů při konstantní teplotě. Produkce plynů se při různých teplotách liší a to díky rozdílné reakční rychlosti. Bioplyn, který se tvoří, obsahuje cca 70% methanu, zbytek je především oxid uhličitý; mohou se zde nacházet stopy H_2S , NH_3 , H_2 , aj. [6]

Pro studování rozkladu polymerů pomocí mikroorganismů je možné použít řadu metod. Např. Day a kol. [7] sledovali degradaci polymeru na základě produkce CO_2 , CH_4 , snižování viskozity, úbytku hmoty, aj.

3 CHARAKTERISTIKA NĚKTERÝCH BÍLKOVIN A JEJICH BIOLOGICKÝ ROZKLAD

Bílkoviny představují velice rozsáhlou skupinu látek. V předkládané diplomové práci zkoumaný bílkovinný hydrolyzát je produktem enzymové hydrolyzy kolagenu. Pro základní informaci jsou proto dále uvedeny některé charakteristiky původního polymeru (kolagenu) degradovaného substrátu kolagenu (želatiny) a bílkovinného hydrolyzátu získaného z koželužského odpadu.

3.1 Kolagen

Kolagen je nerozpustná fibrilární bílkovina, která je základním stavebním prvkem živočišných tkání, svalů, vaziv a kůže. Kolagen na svém řetězci má kyselé a bazické funkční skupiny. Podle pH prostředí nesou tyto skupiny elektrický náboj. Kolem každé nabitě funkční skupiny se vytvoří elektrostatické pole, které umožňuje orientovat molekuly vody, a tak vytvářet hydratační obaly kolem těchto skupin. Hustota výsledného náboje je závislá na aktivitě H^+ iontů a iontové síle.

3.2 Želatina

Při zahřívání roztoku kolagenu nad $60^{\circ}C$ dochází k výrazným strukturálním změnám, které jsou provázeny zvýšeným bobtnáním a změnou fyzikálně mechanických vlastností. Modifikace, čili změna vlastností, je také závislá na pH, iontové síle a stupni kovalentního zesíťování kolagenu. Takto modifikovaný kolagen tj. želatina vykazuje mj. nižší odolnost vůči proteinázám a má nižší stupeň prostorového uspořádání [8].

3.3 Bílkovinný hydrolyzát

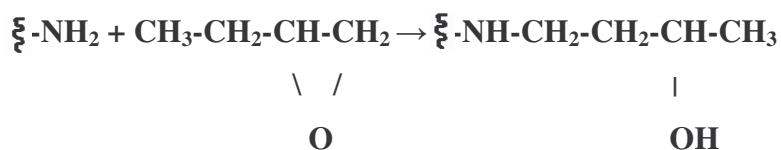
Hydrolyzát kolagenu (dále jen Hykol) se získává dvoustupňovou hydrolyzou (alkalickou a enzymovou) chromočiněných postružin za atmosférického tlaku s následným oddělením chromu a tuhých částic. Množství zůstatkového chromu je 20 – 30 ppm. Hykol je dodáván v práškové formě nebo v roztoku. Je levný a snadno biologicky rozložitelný. Nejčtenější aminokyseliny v Hykolu jsou glycin (33,0 hm.%), prolin (12,5 hm.%) a hydroxyprolin (10,0 hm.%). Hykol se využívá při vytlačování PVA jako plnivo, protože je levnější a zlepšuje biodegradabilní vlastnosti PVA. Takto upravené PVA se používají v zemědělství

jako fólie, secí pásky či mulčovací fólie; modifikovaný PVA má také lepší mechanické vlastnosti; tepelná stabilita fólií PVA byla sledována s různými poměry PVA a Hykolu. Tepelná degradace se výrazně snížila až při vyšších koncentracích Hykolu. Vyšší koncentrace Hykolu měly za následek zvýšení viskozity a tím zhoršení zpracovatelnosti [9].

4 MODIFIKACE BÍLKOVIN SÍŤOVÁNÍM EPOXIDY A JEJICH BIOLOGICKÝ ROZKLAD

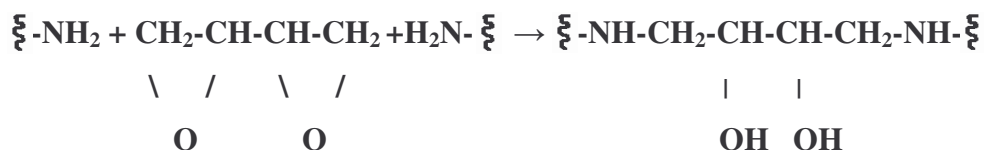
Pojmem síťování se označuje proces vytvoření trojrozměrné struktury, která je vytvořena spojením reaktivních skupin polymeru a síťovadla. Po vytvoření sítě se změní mechanické, chemické a fyzikální vlastnosti.

Při reakci pouze monofunkčního epoxidu s aminoskupinou je schéma následující:



Tomuto síťování se říká maskování, protože nedochází k propojení řetězců bílkovin mezi sebou.

Při síťování polyfunkčního epoxidu je schéma odlišné, protože dochází ke spojování řetězců bílkovin mezi sebou jak je možné vidět na tomto schématu:



Takové síťování se nazývá pravé a tkáň sesíťované těmito epoxidy jsou méně pružné než tkáň sesíťované monofunkčními epoxidy.

4.1 Síťování kolagenu

Tuto oblast jsme si vybrali zejména z hlediska její propracovanosti. Z široké nabídky relevantních citací uvádíme pouze ty, které nějak korespondují se zadáním a cílem této práce.

Síťování bílkovin pomocí epoxidů má v dnešní době čím dál větší uplatnění a to především v medicíně. Nejvíce jsou zkoumány možnosti uplatnění takto zesíťovaných kolagenních bílkovin, jako náhražky za poškozené cévy, šlachy, vazy, atd. Vytvoří se síť, která mění pružnost, pevnost, atd. V bílkovinách reaguje nejčastěji při síťování aminoskupina bílkoviny s epoxyskupinou.

Autoři [10] zaměřili svoji práci na zkoumání fyzikálních vlastností artérií, které byly zpevněny pomocí epoxidů. Jako kontrolní vzorky byly použity zdravé, glutaraldehydem zpevněné artérie. Artérie opracované epoxidy (i glutaraldehydem) vykazovaly stejné

narůstající hodnoty fixačního indexu a teplota denaturace byla stejná jako u zdravých artérií, odolnost takto upravených artérií vůči bakteriím byla ve srovnání s nativním kolagenem obdobná.

Bylo zjištěno, že síťování pomocí glutaraldehydu doprovázely cytotoxické vlastnosti, pokud koncentrace přesáhla 25 ppm. Místa zpevněné pomocí glutaraldehydu jsou pro buňky neprostupné a proto se nemohou dostat ke ztenčenému místu. Při použití epoxidů nebyla cytotoxicita tak velká. Cytotoxicita epoxidů se neprojevila ani při koncentraci 55-60 ppm., díky tomuto byly epoxidy mnohem vhodnější než glutaraldehyd.

Dalším faktorem, který zvýhodňuje epoxidy před glutaraldehydem je podstatný vliv teploty a pH na síťovací efekt. Epoxidy byly schopny síťovat jak v zásaditém tak v kyselém prostředí. Fixační index se rapidně zvyšoval s rostoucím pH a při zvyšování fixační teploty. Další předností epoxidů před glutaraldehydem je také skutečnost, že epoxidy mohou reagovat jak s aminoskupinami, tak i s karboxylovými a hydroxylovými skupinami, ale glutaraldehyd může reagovat pouze s aminoskupinou. To je příčinou používání epoxidů i v případech kdy je malý počet volných aminoskupin.

V jiné práci z oblasti medicíny, kde se také využívají vlastností epoxidů, je při vytváření protéz a náhražek mechanicky namáhaných kolagenních tkání. Autoři [11] ve své práci srovnávali také glutaraldehyd s epoxidy, ale srovnávali ještě rozdíl mezi monofunkčními a polyfunkčními epoxidy. Zatímco barva tkání zpevněných epoxidy zůstala přirozená, tak barva tkání zpevněných glutaraldehydem se změnila na žlutou. Rozdíl mezi monofunkčním a polyfunkčním epoxidem byl především v ohebnosti výsledného produktu. Tkáň zpevněná monofunkčním epoxidem byla více ohebná (díky maskování) než tkáň zpevněná vícefunkčním epoxidem [12,13], tedy při pravém síťování.

V jiné [16] studii byly zkoumány změny na kolagenních tkáních, které byly způsobené bakteriemi, které rozkládají kolagen. Tkáň byla sesíťována glutaraldehydem a epoxidem (ethylen glykol diglycidyl ether). Jako kontrolní vzorek byly použity čerstvé tkáně. Během degradace bylo na vysoce citlivém kalorimetru sledováno uvolňující se teplo. V průběhu měření byl také sledován úbytek volných aminoskupin, hodnoty denaturačních teplot vzorků a jejich pružnost. Působením bakterií dochází k rozštěpení peptidické vazby. To zapříčinilo zvýšení počtu volných aminoskupin, snížení denaturační teploty a snížení pružnosti. Bylo zjištěno, že čerstvá tkáň nedokáže odolávat bakteriím, ale tkáň sesíťovaná pomocí glutaraldehydu vykazovala dobrou odolnost vůči bakteriím. Tkáň sesíťovaná

pomocí epoxidu měla menší odolnost než tkáň sesíťovaná glutaraldehydem. Tento rozdíl mezi epoxidem a glutaraldehydem je zapříčiněn různou hustotou vytvořené sítě. Glutaraldehyd vytváří hustější síť, která brání v přístupu enzymu ke tkáni.

Fixační rychlost síťování roste s teplotou, s rostoucí koncentrací síťovadla a pH. Tento jev lze vysvětlit zvýšením koncentrace efektivních reaktantů. Zásaditá aminoskupina vytváří v bílkovině rovnováhu, která je naznačená na následujícím schématu:



Nepronizovaná aminoskupina na levé straně je aktuální reaktivní skupinou, která vstupuje do reakce. Pokud se pH zvýší, tak je rovnováha posunuta doleva. Při poklesu pH vzniká stádium protonizovaného epoxidu. V zásadité oblasti je aminoskupina silné nukleofilní činidlo.

Síťování, které probíhá mimo peptidickou vazbu podléhá hydrolyze. To je vlastní příčinou biologického rozkladu kolagenu. Síť, která se takto vytváří, sice brání některým enzymům, aby se dostaly k reaktivním místům; výsledkem je, že mírně klesne rychlost rozkladu a bílkovina je stále biologicky rozložitelná.

4.2 Síťování želatiny

Práce s touto problematikou nás zajímaly především proto, že byly provedeny na materiálu, který je značně blízký (až na mol. hmotnost) sledovanému bílkovinnému hydrolyzátu.

Patil a kol. [13-15] zkoumali síťování želatiny, které prováděli pomocí 1,2:3,4 – diepoxybutanu (dále jen DEB) a 1,2:7,8 – diepoxyoktanu (dále jen DEO) a jeho vlivu na rozpustnost. Rozpustnost různě zesíťovaných vzorků se lišila podle stupně sesíťování. Více sesíťované vzorky měly strukturu více propojenou, a proto se pomaleji nebo méně rozpouštěly. Rozpouštědlem byla voda a fosfátový pufr o pH=8,2. Teplota rozpouštění byla 50 °C. Na počátku pokusu se rychleji rozpouštěly vzorky síťované pomocí DEO, než vzorky síťované pomocí DEB. Po uplynutí asi 3 hodin se jejich rozpustnosti vyrovnaly.

Dále byl zkoumán v půdě [8] rozklad fólií z želatiny, které byly síťovány pomocí DEO a DEB. K dokonalému rozložení všech vzorků došlo za 6 dní. Dále byla zkoumána schopnost rozkladu síťované želatiny v říční a jezerní vodě. Vzorky se dokonale rozložily

za 4-6 dní. Síťovaná želatina je tedy za anaerobních podmínek rozložitelná ve vodném i půdním prostředí.

4.3 Síťování bílkovinného hydrolyzátu

Síťováním Hykolu epoxycyklohexanem se ve své práci zabýval autor práce [17]; popsal výsledky snížení stupně anaerobního rozkladu po zesíťování. Vzorky byly připraveny síťováním Hykolu E epoxycyklohexanem v koncentracích 1, 2, 5 a 10 hmot. %. Stupeň zesíťování vzorků byl stanoven podle rozpustnosti v intervalu 90 minut pomocí bilance TOC (analyzátor uhlíku) a pomocí UV-VIS spektroskopie v rozmezí 90,6 – 69,1 % resp. 86,4 – 66,2 %. Z bilance volných aminoskupin, které byly stanoveny ninhydrinovou metodou, byl spočítán tzv. fixační index, který pro řadu s 1, 2, 5 a 10 hmot. % síťovadla vzrostla z 43,6 na 68,2 %. Pro zmíněnou řadu s rostoucím obsahem síťovadla bylo pozorováno snížení stupně biodegradace (D_t) z 67,8 na 46,8 %. Z výsledků je zřejmé, že rychlost rozkladu se snižuje s rostoucím množstvím použitého síťovadla. Konečný stupeň rozkladu se postupně s časem blíží hodnotě platné pro nativní hydrolyzát, tato skutečnost je příznivá pro životní prostředí.

Síťováním Hykolu a následným anaerobním rozkladem se zabýval také Jelínek [18]. Síťovadlem byl epoxybutan (EB) v přídavicích 1, 2, 5 a 10 hmot. % na sušinu Hykolu. Stupeň síťování byl opět stanoven pomocí rozpustnosti síťovaných vzorků v intervalu 90 minut (bilance TOC) a pomocí UV-VIS spektroskopie v rozmezí 97,3 – 82,3 % resp. 97,2 – 78,4 %. Fixační index pro vzorky s obsahem síťovadla v rozmezí 1 – 10 hmot. % vzrostl z 6,7 na 47,7 %. Bylo pozorováno snížení celkové biodegradace (D_t) z 77,4 na 41,4 %. Je zřejmé, že s růstem obsahu použitého síťovadla se snižuje rychlost biologického rozkladu tak i celková biodegradace.

Podrobněji (z hlediska makromolekulárního) byla tato tematika ještě rozvedena v diplomových pracích [19 – 21] a publikovaném článku [22].

5 ZHODNOCENÍ LITERÁRNÍ REŠERŠE A CÍL PRÁCE

Z uvedeného literárního přehledu (není rešerší v pravém slova smyslu) je zřejmé, že síťování bílkovinných materiálů je jednou z důležitých cest zlepšení řady vlastností těchto důležitých látek. Jde o zlepšení jejich vlastností z hlediska stability botnání aj. včetně důležitých parametrů mechanických – pevnostních. Toto hledisko je zejména důležité u kolagenních matric (životně důležité orgány), kdy právě síťování vede ke zlepšování nutných mechanických vlastností např. u cév, součástí srdečního svalu aj. V tomto ohledu je možno v literatuře najít obrovské množství citací, které ale souvisejí se zadáním diplomové práce pouze okrajově. Jde zejména o skutečnost, že námi zkoumaný bílkovinný hydrolyzát se samozřejmě dá více srovnávat s želatinou, než s kolagenem.

V případě pro nás kompatibilní želatiny existují citace týkající se síťování nízkomolekulárními diepoxidy, ale práce s využitím výšemolekulárních diepoxysloučenin chybějí. Pro účely této studie byly proto vybrány některé obecné závěry, které se mohou týkat tohoto síťování s jeho dopadem na bílkoviny obecně.

Cílem předložené práce bylo pokusit se o síťování silně zhydrolyzovaného kolagenního materiálu (Hykol), který má potenciální i reálné využití v praxi. Nebylo tedy záměrem připravit mechanicky výhodnější materiál, protože na malé fragmenty rozlitý kolagen nemůže ani síťováním polymerními bis-expoxidy dát mechanicky pevný materiál. Vždy půjde o více-méně křehký produkt. Síťování se ale mění řada jiných vlastností bílkovinného hydrolyzátu (rozpuštěnost, botnání, limitní viskózní číslo), včetně ochoty k biologickému rozkladu. Dá se totiž předpokládat, že do různého stupně vytvořená síť brání přístupu mikroorganismů (včetně enzymů) a zpomaluje i snižuje celkovou ochotu takto opracovaného materiálu k biologickému rozkladu. Hlavním předmětem práce bylo tedy pokusit se o popis v hydrolyzátu síťováním provedených změn, zejména o jejich vliv na anaerobní biologický rozklad.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 POUŽITÉ MATERIÁLY

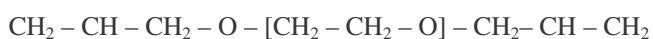
6.1 Chemikálie

Použité anorganické chemikálie byly vyrobeny nebo distribuovány firmou Lachema a. s., Brno.

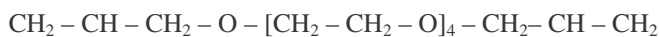
KH_2PO_4	dihydrogenfosforečnan draselný
K_2HPO_2	hydrogenfosforečnan draselný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu draselného
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	síran amonný
CaCl_2	chlorid vápenatý
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu železitého
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu hořečnatého
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinečnatého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu manganatého
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu měďnatého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdenanu amonného
CH_3COONa	octan sodný
Kolagenový hydrolyzát	Hykol E, výrobce Kortan, Hrádek nad Nisou (ČR) – (dále HK)



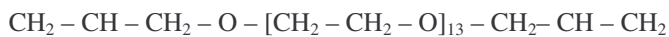
glycerin triglycidylether, dodavatel
Polysciencies, USA



ethylenglykoldiglycidylether,
dodavatel Polysciencies, USA



polyethylenglykol(200)diglycidylether,
dodavatel Polysciencies, USA



polyethylenglykol(600)diglycidylether,
dodavatel Polysciencies, USA

6.2 Biologický materiál

Pro testování anaerobního rozkladu byl používán částečně vyhnílý aktivovaný kal z anaerobní stabilizace čistírny odpadních vod Zlín – Malenovice. Před použitím byl anaerobní kal 10 minut probubláván dusíkem a následně odstředován 10 minut při 3000 G. Pomocí minerálního media byl ředěn.

6.3 Minerální medium

Minerální medium bylo připraveno podle předpisů ÚIOŽP vycházejícího z norem ASTM D 5210-91 a ISO 11734 pro testování biodegradability za anaerobních podmínek. Množství následujících roztoků je použito na 1 liter minerálního media (doplnění destilovanou vodou na 1 liter).

40 ml fosfátového pufru:	8,5 g/l KH_2PO_4
	21,75 g/l K_2HPO_4
	44,7 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
50ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 g/l

1ml CaCl ₂	27,5 g/l
1ml FeCl ₃ .6H ₂ O	0,25 g/l
1 ml MgSO ₄ .7H ₂ O	22,5 g/l
1 ml roztoku stopových prvků: 0,75 g/l H ₃ BO ₃	
	3 g/l FeSO ₄ .7H ₂ O
	0,1 g/l ZnSO ₄ .7H ₂ O
	0,5 g/l MnSO ₄ .4H ₂ O
	0,05 g/l CuSO ₄ .5H ₂ O
	0,1813 g/l CoSO ₄ .7H ₂ O
	0,05 g/l (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O

6.4 Testované vzorky a jejich příprava

Jako modelová látka pro ověření správné činnosti použitého inokula i přístroje byl použit snadno rozložitelný octan sodný (dále jen NaAc). Jak NaAc tak i ostatní vzorky byly dávkovány tak, aby obsah organického uhlíku v testovací baňce (ve 100 ml kapalné fáze) byl cca 20 mg. Obsah uhlíku před i po každém pokusu byl měřen na analyzátoru uhlíku Shimadzu, model TOC – 5000 A [16].

Síťované vzorky byly připraveny z roztoku bílkovinného hydrolyzátu (Hykolu) v destilované vodě o sušině 41,7 %. Jako síťovací činidla byly použity následující látky :

glycerin triglycidylether (**G**)

ethylenglykoldiglycidylether (**E**)

polyethylenglykol (200) diglycidylether (**PEG 200**)

polyethylenglykol (600) diglycidylether (**PEG 600**)

Objem 40ml 41,7% Hykolu byl smíchán s 0,6ml 12,1 M - NaOH. Alkalizovaný Hykol (pH=10) byl síťován uvedenými látkami vmícháním v množstvích uvedených v tab.1-4. Navážky alkalizovaného Hykolu a síťovadel byly promíchány a homogenizovány přetlačováním ze stříkačky do stříkačky.

Samotné síťování probíhalo v Petriho miskách vyložených miskou z Al folie ve skleněných ampulkách v digestoři po dobu 1 dne při laboratorní teplotě cca 25 °C, 1 den při teplotě 90 °C a 1 den byly vzorky sušeny na otevřených miskách při 100 °C.

Údaje pro přípravu vzorků jsou v tab. 1-4.

Tab.1.: Navážky G / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Vzorek	G 08	G16	G 25	G 33
G / Hykol [w/w sušina Hykol]	0,082	0,164	0,247	0,329
Předpokládaný stechiometrický poměr oxiran / NH ₂ [mol / mol]	0,527	1,054	1,581	2,107
mg roztoku Hykolu pro 1820 mg sušiny	4042	3755	3505	3287
G [mg]	139	257	360	451

Tab.2.: Navážky E / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Vzorek	E 07	E 15	E 22	E 29
E / Hykol [w/w sušina Hykol]	0,073	0,146	0,219	0,292
Předpokládaný stechiometrický poměr oxiran / NH ₂ [mol / mol]	0,606	1,212	1,818	2,424
mg roztoku Hykolu pro 1820 mg sušiny	4076	3814	3584	3379
E [mg]	124	232	328	412

Tab.3.: Navážky PEG200 / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Vzorek	PEG200/15	PEG200/29	PEG200/44	PEG200/58
PEG200 / Hykol [w/w sušina Hykol]	0,146	0,292	0,438	0,584
Předpokládaný stechiometrický poměr oxiran / NH ₂ [mol / mol]	0,697	1,394	2,09	2,786
mg roztoku Hykolu pro 1820 mg sušiny	3817	3384	3038	2757
PEG200 [mg]	232	412	555	671

Tab.4.: Navážky PEG600 / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Vzorek	PEG600/16	PEG600/32	PEG600/48	PEG600/64
PEG600 / Hykol [w/w sušina Hykol]	0,159	0,318	0,477	0,636
Předpokládaný stechiometrický poměr oxiran / NH ₂ [mol / mol]	0,695	1,394	2,09	2,786
mg roztoku Hykolu pro 1820 mg sušiny	3774	3317	2958	2669
PEG600 [mg]	250	440	588	708

* Výpočet předpokládaného stechiometrického poměru oxiran / -NH₂ vychází z hodnot WPE udávaných výrobcem (M_{ekv. epoxi}) a ekv. hmotnosti Hykolu připadající na jednu aminoskupinu / odhad z předpokládaného zastoupení aminokyselin v řetězci Hykolu M_{ekv. NH₂} = 930g sušiny Hykolu / 1 mol NH₂ skupin [24].

7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Micro-Oxymax fy Columbus, Columbus, Ohio, USA

Elektromagnetická míchačka Variomag Telemodul 40S, H+P

Labortechnik GmbH, SRN

Termostat MLW, typ U2C, SRN

Analytické váhy KERN 770, SRN

PH metr OP 208, Maďarsko

Sušárna Chirana, ČR

Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu Corp., Austrálie

UV-VIS Spektrometr, UNICAM, Thermo Electron Corporation, Madison, USA

Chlazená centrifuga MR23i, Jouan, Francie

Běžné laboratorní sklo a vybavení

8 METODY STANOVENÍ

8.1 Stanovení stupně anaerobního rozkladu

Anaerobní kal byl nejprve odstředován 10 minut při 3000 G. Potom byl pomocí minerálního media ředěn na požadovaný obsah sušiny a probubláván dusíkem. Takto připraveným kalem byly plněny testovací baňky, do kterých byl poté přidán testovaný vzorek v množství cca 20 mg TOC na testovací baňku. Naplněná baňka byla probublávána dusíkem, rychle uzavřena a připojena k měřicímu přístroji. Baňky byly umístěny na elektromagnetické míchadlo ponořené do vodní lázně o stálé teplotě 35°C a míchány rychlostí 300 ot/min [17].

Plynné produkty vznikající při anaerobním rozkladu testovaných vzorků byly analyzovány na obsah CH₄ a CO₂ pomocí přístroje Micro-Oxymax fy Columbus, s detekcí na principu jednopaprskového infračerveného detektoru.

Tento přístroj je schopen vyhodnotit množství objemů sledovaných plyných produktů (CH₄ a CO₂) vznikajících při rozkladu za anaerobních podmínek. Vzorky, které mají být podrobeny biorozkladu jsou dávkovány do baněk (měřící místa) spolu s vhodně upravenou suspenzí anaerobního kalu (inokulum). Vznikající plyny jsou periodicky (ve zvolených časových intervalech) cirkulovány přes chladič a sušící věž do plynových senzorů, kde jsou následně stanoveny jejich přesné koncentrace a vypočítány vzniklé objemy. Naměřená data jsou převedena do počítače, kde jsou dále zpracovávána.

Celková hmotnost metabolizovaného uhlíku daného vzorku odpovídá (po odečtení slepého pokusu) množství anorganického uhlíku ve vodné fázi a množství uhlíku ve vytvořeném bioplynu. Rozsah celkové biodegradace je dán:

$$D_t = \frac{m_t}{m_v} \cdot 100 \quad [\%]$$

kde D_t celková biodegradace vyjádřená v procentech [%]

m_t celkový metabolizovaný uhlík [mg] (bioplyn + IC v roztoku na výstupu)

m_v organický uhlík v testovaném vzorku [mg]

8.2 Stanovení sušiny

10 ml anaerobního kalu bylo vakuově zfiltrováno přes filtrační papír, který byl vysušen při teplotě 105°C do konstatní hmotnosti a po vychladnutí v exikátoru zvážen. Koncentrace sušiny anaerobního kalu byla vyjádřena v g/l.

8.3 Stanovení organického uhlíku

Stanovení uhlíku u testovaných vzorků bylo realizováno pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu, model 5000A.

Stanovení celkového uhlíku (TC) je založeno na detekci oxidu uhličitého, vznikajícího spalováním látek na oxidu kobaltnato – kobaltitém (katalyzátor) při teplotě 670°C v proudu kyslíku. Vzniklý oxid uhličitý je veden do detektoru pracujícím v infračervené oblasti spektra. Signál, vzniklý absorpcí záření příslušné vlnové délky, se registruje jako pík. Výška píku je přímo úměrná koncentraci TC vzorku.

Při stanovení anorganického uhlíku (IC) je vzorek nastříknut v proudu kyslíku na interní nosič s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění oxidu uhličitého. Analytická koncovka je stejná jako u stanovení celkového uhlíku.

Z rozdílu obou stanovení se vypočte organický uhlík (TOC).

8.4 Fixační index

Fixační index (FI) je procentuální podíl aminoskupin, které zreagovaly s příslušným síťovadlem. Vyšší hodnota fixačního indexu znamená nižší počet zbylých volných aminoskupin a znamená vyšší stupeň síťování použitého materiálu [5].

$$FI = \frac{NH_2(v) - NH_2(z)}{NH_2(v)} \cdot 100 \quad [\%]$$

kde FI fixační index podíl zreagovaných aminoskupin [%]

NH₂(v) množství volných aminoskupin v nesíťovaném vzorku [mmol/g]

NH₂(z) množství volných aminoskupin v síťovaném vzorku [mmol/g]

Ke stanovení stupně zesíťování byla použita ninhydrinová metoda stanovení volných aminoskupin. Aminokyseliny s volnou aminoskupinou poskytují s ninhydrinem kondenzační produkty modře až fialově zbarvené o různých odstínech a intenzitách. Vyjimku tvoří pouze prolin a hydroxyprolin, které poskytují žluté zbarvení. Absorbance roztoků se měří při 570 nm. Kalibrace se provádí na aminokyselinu L-leucin [23].

Popsanou metodu stanovení volných aminoskupin lze využít pro kvantitativní vyjádření stupně zesíťování pomocí tzv. fixačního indexu (FI). Fixační index obecně slouží k výpočtu procenta původně volných aminoskupin, které zreagovaly s příslušným bis-epoxidem. Vyšší FI ukazují na nižší počet zbylých volných aminoskupin ve fixovaném materiálu a tedy vyšší stupeň zesíťování.

Hodnoty FI jsou uvedeny v tab. 5. Z této tabulky je patrný růst FI se vzrůstajícím přídatkem použitého síťovadla.

Tab.5: Fixační indexy

Síťovadlo	G				E			
hm. síťovadla [%]	8,2	16,4	24,7	32,9	7,3	14,6	21,9	29,2
FI [%]	55	63	72	83	68	74	83	88
Síťovadlo	PEG 200				PEG600			
hm. síťovadla [%]	14,6	29,2	43,8	58,4	15,9	31,8	47,7	63,6
FI [%]	70	83	88	91	68	74	84	89

9 VÝSLEDKY A DISKUSE

9.1 Pokus 1 – Anaerobní rozklad

K anaerobnímu rozkladu rozpustných podílů vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy byly použity všechny připravené vzorky, kromě nejvíce síťovaných kvůli velmi nízké rozpustnosti. Dále byly nasazeny 2 tzv. slepé pokusy (baňky s kalem bez substrátu). Octan sodný ve dvou baňkách posloužil jako modelová látka. Bylo obsazeno všech 30 měřících míst. Jako inokulum byl použit anaerobní kal z ČOV Zlín-Malenovice, sušina surového kalu byla 20,3 g/l. Kal byl dávkován tak, aby jeho koncentrace v testovacích baňkách byla 4,5 g/l.

Byly připraveny suspenze vzorků (navážka 0,2 g/50ml), které byly následně podrobeny sonifikaci, tato trvala 1,5 h a napomohla rozpuštění vzorků - bohužel jen částečnému. Poté byly roztoky vzorků zfiltrovány a bylo stanoveno množství rozpuštěného podílu (viz tab.6).

Tab.6: Rozpuštěný podíl (sol) vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy

VZOREK	G08	G16	G24	G32	E07	E15	E22	E29
Rozpuštěný podíl [%]	100	86	76	53	100	100	100	75
VZOREK	PEG 200/15	PEG 200/29	PEG 200/44	PEG 200/58	PEG 600/16	PEG 600/32	PEG 600/48	PEG 600/64
Rozpuštěný podíl [%]	100	92	71	75	100	100	100	100

Pro samotné stanovení rozkladů byl do měrných baňek dávkován filtrát tak, aby výsledná koncentrace TOC v baňce byla cca 200 mg/l. Hodnoty TOC a IC jsou uvedeny v tab.7.

Před stanovením hodnot rozpuštěného uhlíku pomocí analyzátoru uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu, byl pevný podíl kalové suspenze oddělen centrifugací při 20000 G po dobu 10 min a při teplotě 15°C.

Pokus byl ukončen po 234 hodinách. Hodnoty TOC a IC byly stanovovány jak na začátku (v čase $t = 0$ h) tak i na konci pokusu ($t = 234$ h).

Tab.7: Vstupní a výstupní hodnoty TOC a IC v testovacích baňkách (150ml)

VZOREK	Vstup		Výstup	
	TOC [mg]	IC [mg]	TOC [mg]	IC [mg]
NaAc	12,80	2,12	1,93	8,42
Hykol	17,32	2,56	5,43	7,43
G08	14,83	3,18	4,88	6,10
G16	16,26	2,70	4,91	6,97
G24	15,11	2,17	9,83	6,70
G32	16,70	3,55	9,91	5,59
E07	18,73	2,39	4,68	6,01
E15	18,35	2,39	4,83	6,92
E22	14,23	2,26	6,94	6,27
E29	15,29	3,17	12,65	7,67
PEG 200/15	16,50	3,09	9,40	7,08
PEG 200/29	14,74	2,61	10,12	6,21
PEG 200/44	16,08	2,20	10,15	5,61
PEG 200/58	18,69	3,87	14,90	6,82
PEG 600/16	17,87	2,07	5,09	6,59
PEG 600/32	11,64	1,62	7,48	5,95
PEG 600/48	15,61	2,42	7,45	5,11
PEG 600/64	18,83	2,97	12,54	6,09

Pro výpočet celkového rozkladu byly jako vstupní hodnoty TOC použity hodnoty odečtené ze skutečných navážek, čili ve všech případech 20 mg TOC na baňku, protože nameřené hodnoty pro vstupní vzorky neodpovídaly teoretickým předpokladům a výpočtům. Pravděpodobným viníkem je samotný analyzátor Shimadzu, bohužel z důvodů nedostatku vzorků nebylo možné toto měření opakovat. Výsledky na výstupu z analyzátoru

Shimadzu (resp. na konci pokusu) již byly přesvědčivější a tudíž byly i použity ve výpočtech.

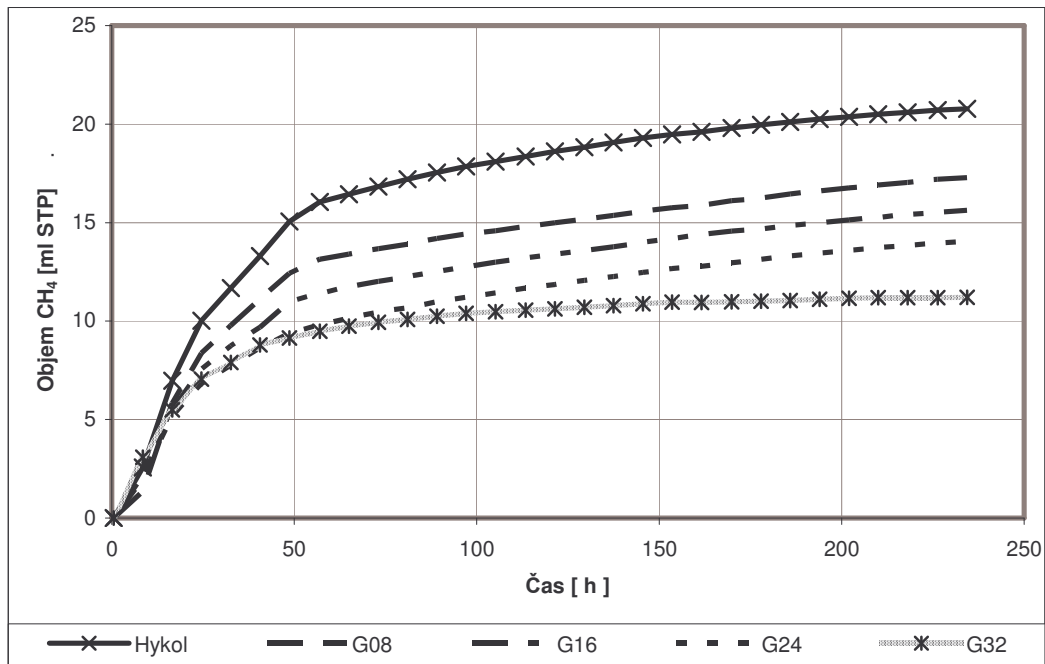
K výpočtu D_t byla použita klasická rovnice bilance uhlíku v plynné a kapalně fázi. Tato množství odpovídala prakticky pouze rozpuštěnému CO_2 . Rozpustnost CH_4 za daných podmínek je zanedbatelná. Hodnoty D_t jsou uvedeny v tab.8.

Tab.8: Celková biodegradace

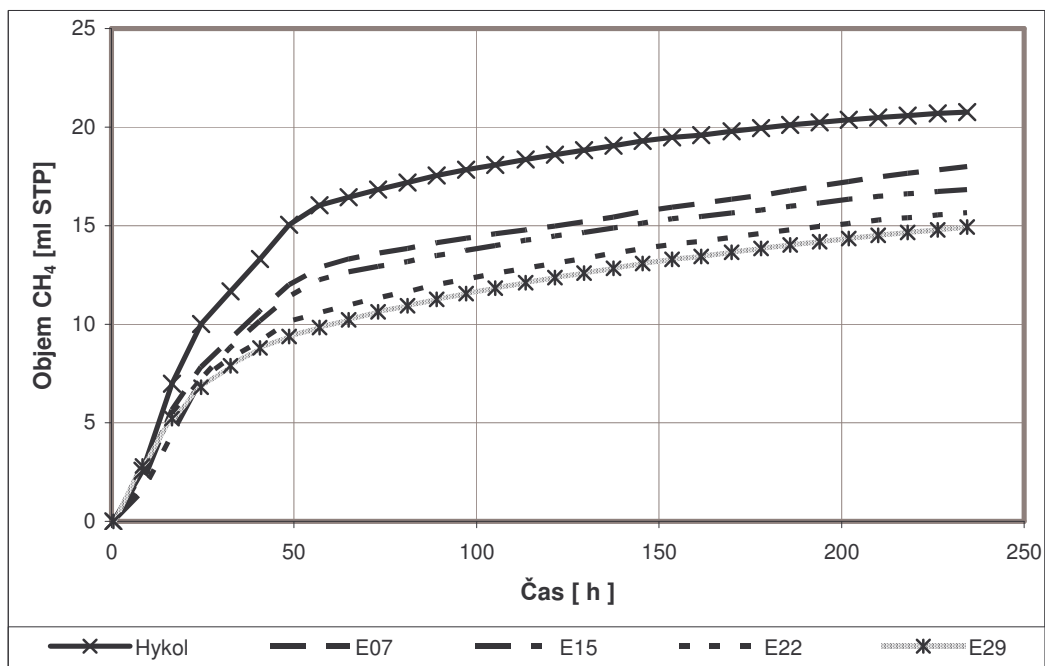
VZOREK	G08	G16	G24	G32	E07	E15	E22	E29	Hykol
D_t [%]	79	78	76	50	76	75	69	64	
VZOREK	PEG 200/15	PEG 200/29	PEG 200/44	PEG 200/58	PEG 600/16	PEG 600/32	PEG 600/48	PEG 600/64	96
D_t [%]	81	72	69	61	91	75	67	70	

V následujících obr. 2 - 5 jsou znázorněny křivky produkce CH_4 (STP = standardní podmínky) vzorků síťovaných různými epoxidy, nejlépe rozložitelný je samozřejmě Hykol. S rostoucím množstvím přidaného síťovadla klesá produkce, resp. se zhoršuje možnost rozkladu u všech sledovaných vzorků.

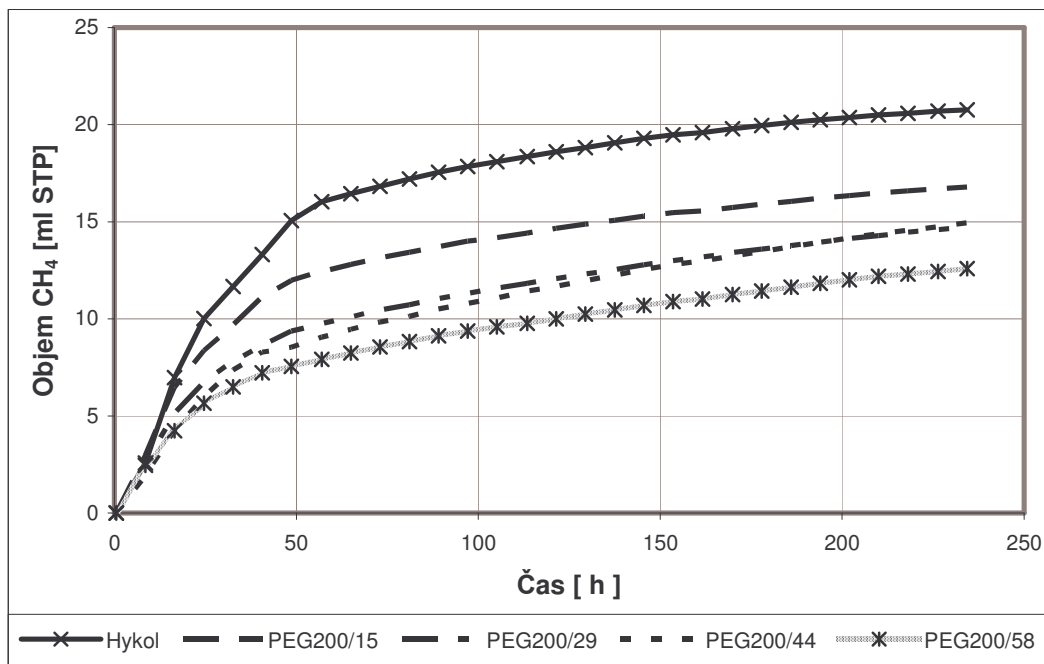
Lze předpokládat, že vytvořená síť brání přístupu mikroorganismů vyvolávajících příslušný biorozklad na molekulární úrovni tj. i v pravém roztoku či jemné disperzi. Pro srovnání byl jako další síťovadlo použit glycerintriglycidylether.



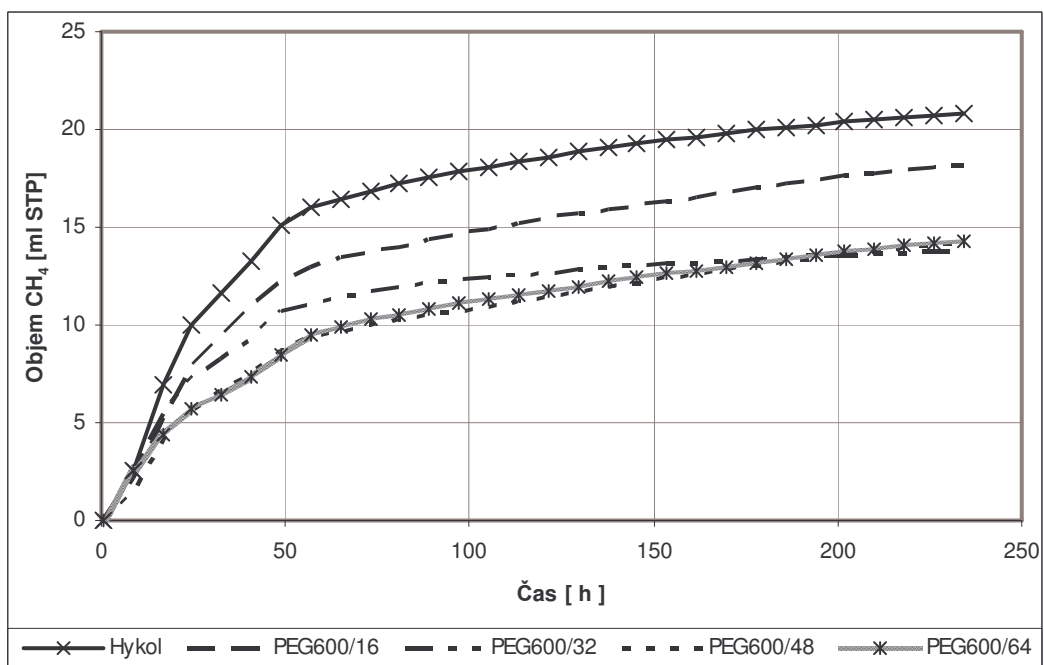
Obr. 2: Produkce CH₄ ze vzorků Hykolu síťovaných glycerin triglycidyletherem



Obr. 3: Produkce CH₄ ze vzorků Hykolu síťovaných ethylenglykoldiglycidyletherem



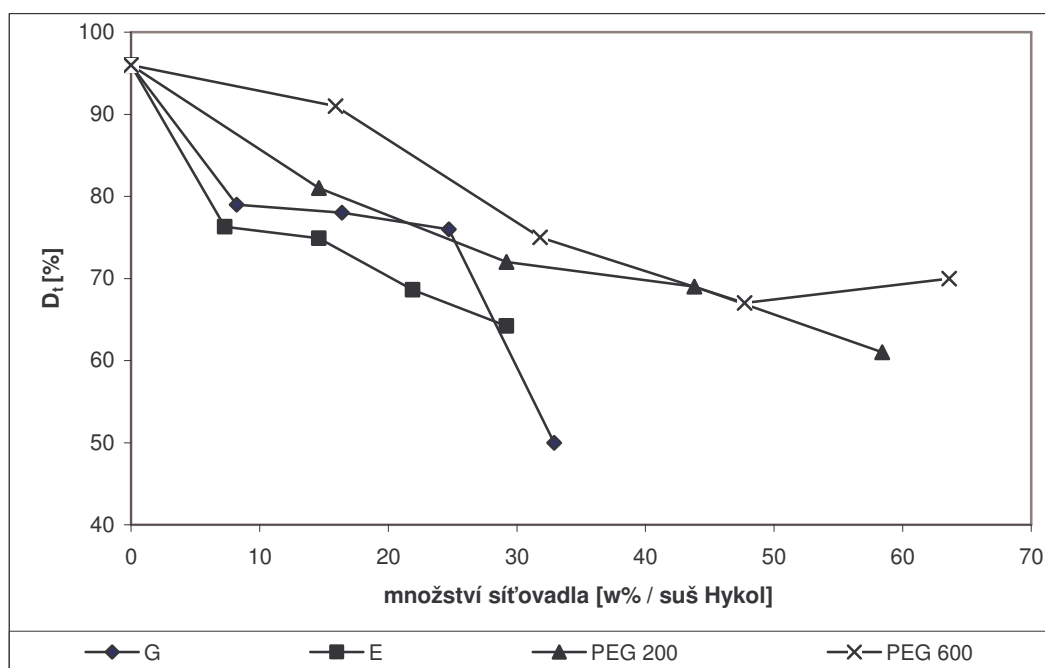
Obr. 4: Produkce CH₄ ze vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (200) diglycidyletherem



Obr. 5: Produkce CH₄ ze vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (600) diglycidyletherem

Dále je z průběhu křivek patrné, že při skončení pokusu nebyl rozklad ještě úplný. Toto se může nepatrně projevit při hodnocení celkového rozkladu, který je pak ale ve všech

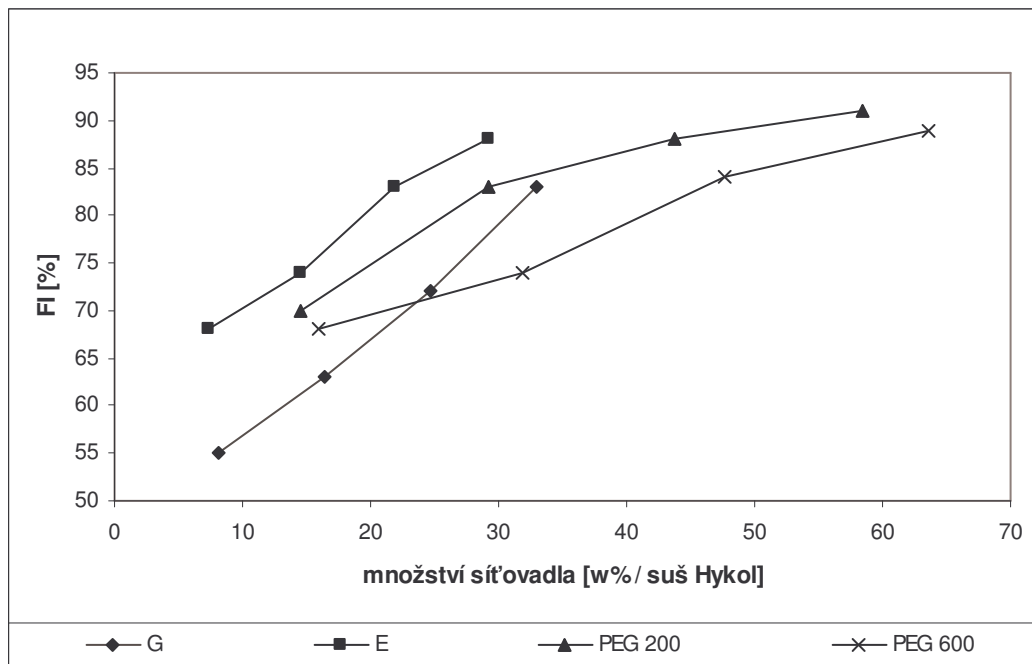
případech stejnou měrou podhodnocen. Bohužel je zde třeba zvážit i možnost tzv. driftu přístroje. Tato otázka vyvstává při srovnání výsledků celkových degradací, kdy bylo dosaženo u Hykolu téměř 100%. Takto vysoké hodnoty nebylo v našich předcházejících pokusech dosaženo [20, 21].



Obr. 6: Stupeň biodegradace rozpustných podílů Hykolu síťovaného různými epoxidy

Ze srovnání celkových rozkladů (tab. 8) je zřejmé, že nejlépe biologicky rozložitelné byly vzorky síťované pomocí PEG 600. Vzhledem k jejich velmi dobré rozpustnosti (viz tab. 6 a obr. 18) lze o skutečném síťování s úspěchem pochybovat. Hodnoty fixačních indexů v obr. 7. pro vzorky síťované tímto epoxidem dokazují, že skutečně došlo k reakcím aminových skupin, bohužel není z těchto grafů možné vyčíst zda - li byla vytvořena síť, či ne.

Před vytvořením sítě mělo růst LVC měřených vzorků a vytvořením sítě by zanikla jejich úplná rozpustnost, objevila by se gelová frakce a poklesla by rychlost rozpouštění těchto vzorků. Větší rozsah reakcí ve vzorku by měl přivést zjevné změny v IR spektru síťovaných vzorků. Výrazné maskování ani síťování však nebylo u těchto rozpustných vzorků prokázáno. Toto by mělo potvrdit či vyvrátit měření těchto vzorků na FTIR [25].



Obr. 7: Závislost stanoveného FI vzorků na množství použitých síťovadel

Z hlediska chemického síťování srovnáním fixačních indexů (obr. 7) vychází jako nejlepší síťovadlo E. Již v nízkých koncentracích (7 % wt.) dochází k obsazení 67 % volných aminoskupin naproti tomu relativně „nejhorším“ síťovadlem je G, které má při téměř stejné koncentraci síťovadla o 12 % nižší účinnost.

Tab.9: Přehled množství transformovaného uhlíku po 234 hodině anaerobního rozkladu při 37 °C

VZOREK	CH₄ v plynné fázi [mg]	CO₂ v plynné fázi [mg]	CO₂ v roztoku [mg]	D_t [%]
NaAc	9,80	1,69	6,30	89
Hykol	10,19	4,24	4,87	97
G08	8,48	4,49	2,92	79
G16	7,66	4,01	4,07	79
G24	6,88	4,49	3,85	76
G32	5,50	2,56	2,04	51
E07	8,81	2,83	3,62	76
E15	8,26	2,20	4,53	75
E22	7,69	2,02	4,01	69
E29	7,32	2,01	3,50	64
PEG 200/15	8,24	3,96	4,00	81
PEG 200/29	7,23	3,68	3,60	73
PEG 200/44	7,33	3,19	3,41	70
PEG 200/58	6,18	3,12	2,95	61
PEG 600/16	8,93	4,68	4,52	91
PEG 600/32	6,75	3,96	4,34	75
PEG 600/48	6,99	3,74	2,70	67
PEG 600/64	7,01	3,98	3,12	71

9.2 Pokus 2 – Anaerobní rozklad

K anaerobnímu rozkladu roztoků vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy byly použity všechny připravené síťované vzorky včetně vzorků s nejvyšším obsahem síťovadla a nasazeny 2 slepé pokusy. Octan sodný ve dvou měrných místech opět sloužil jako modelová látka. Bylo obsazeno všech 30 měřících míst. Jako inokulum byl použit anaerobní kal z ČOV Zlín-Malenovice, o sušině 33,7 g/l. Kal byl dávkován tak, aby sušina v testovacích baňkách byla 4,5 g/l.

Připravené suspenze vzorků (navážka 0,25 g/10 ml) byly podrobeny sonifikaci. Tato trvala 10 min a napomohla rozpuštění vzorků, opět jen částečně. Poté byly roztoky vzorků včetně nerozpuštěného podílu nadávkovány do testovacích baněk, tak aby výsledná koncentrace vstupní TOC byla 0,2 g/l.

Hodnoty TOC a IC jsou uvedeny v tab.10. Před stanovením hodnot rozpuštěného uhlíku pomocí analyzátoru celkového uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu po 322 h, byl pevný podíl suspenze oddělen centrifugací při 20000 G po dobu 10 min při teplotě 15°C.

Z důvodu neúplné rozpustnosti vzorků a tudíž i nemožnosti přesně stanovit hodnoty TOC a IC na vstupu bylo při výpočtech použito teoretické hodnoty 20 mg TOC na testovací baňku. Tato hodnota vychází z navážky. I když se podařilo stanovit hodnoty IC a TOC jak na začátku tak i na konci pokusu nebylo možné se spolehnout na jejich správnost z výše uvedených důvodů. Pro výpočty celkových rozkladů byly použity jen hodnoty získané z analyzátoru methanu.

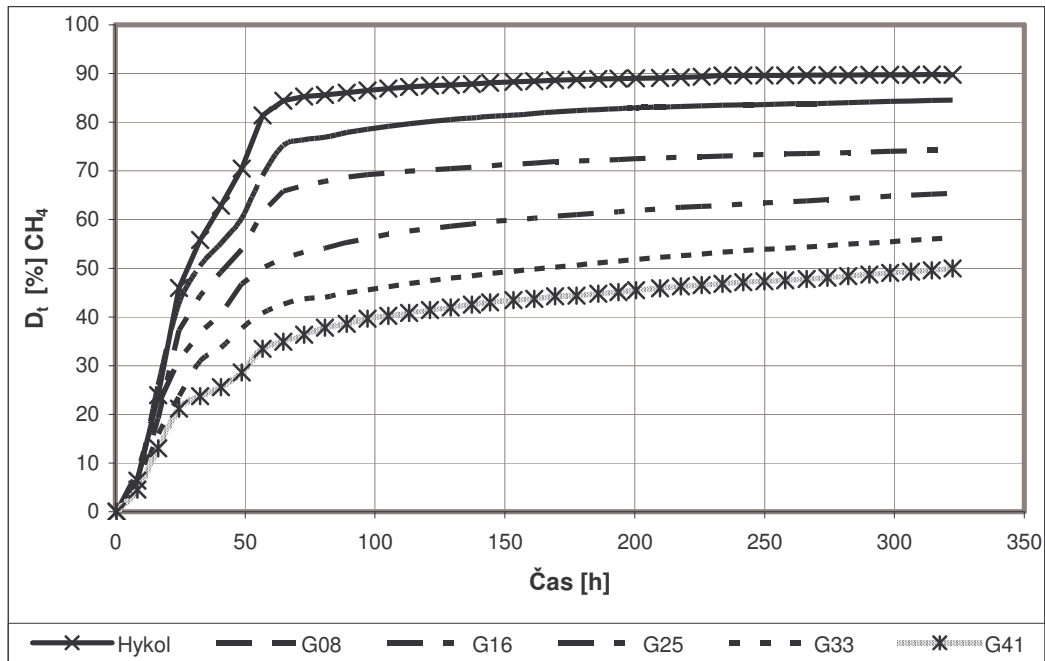
Pokus byl ukončen po 325 hodinách. Hodnoty CH₄ byly odečítány v čase t = 125 h kvůli vyloučení zkreslení měření driftem přístroje. V tomto čase jsme předpokládali, že by měl být veškerý substrátový uhlík spotřebován.

Tab. 10: Vstupní a výstupní hodnoty TOC a IC v testovacích baňkách (150ml)

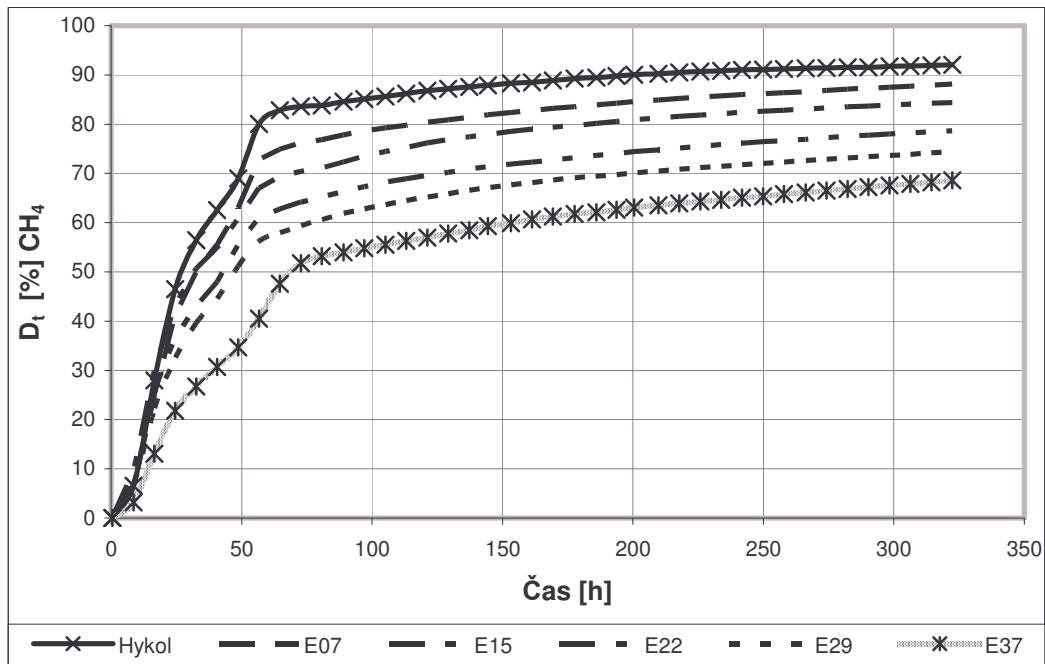
VZOREK	Vstup		Výstup	
	TOC [mg]	IC [mg]	TOC [mg]	IC [mg]
NaAc	26,72	0,59	-	10,43
Hykol	10,60	-	-	6,92
G08	9,53	-	-	2,49
G16	13,13	-	-	5,61
G24	0,88	0,44	-	7,08
G32	-	0,03	-	5,69
G41	-	0,51	0,59	5,61
E07	25,13	-	6,93	8,10
E15	31,08	1,16	11,51	7,70
E22	20,06	0,11	-	6,06
E29	14,60	0,24	0,12	7,08
E37	12,45	1,02	1,73	6,20
PEG 200/15	19,47	-	6,75	6,68
PEG 200/29	7,53	-	15,96	4,44
PEG 200/44	5,65	0,02	7,97	5,58
PEG 200/58	8,34	-	-	4,19
PEG 200/73	15,81	1,70	-	4,61
PEG 600/16	13,13	-	-	5,73
PEG 600/32	13,04	-	7,19	5,78
PEG 600/48	20,64	0,32	1,70	5,22
PEG 600/64	21,66	-	-	3,11
PEG 600/80	4,53	2,39	1,95	-
G	-	1,58	1,61	-
E	9,42	2,67	-	1,68
PEG 200	4,80	2,31	-	-
PEG 600	8,63	1,94	-	1,04

V následujících obr. 8 - 11 jsou znázorněny křivky stupně dosažení teoretické produkce CH_4 vzorků řady G, E, PEG 200 a PEG 600 dávkovaných ve formě suspenze. Z průběhu křivek je zřejmé, že nejlépe rozložitelný je opět čistý Hykol. S rostoucím množstvím přidaného síťovadla opět klesá produkce methanu, resp. se zhoršuje možnost rozkladu.

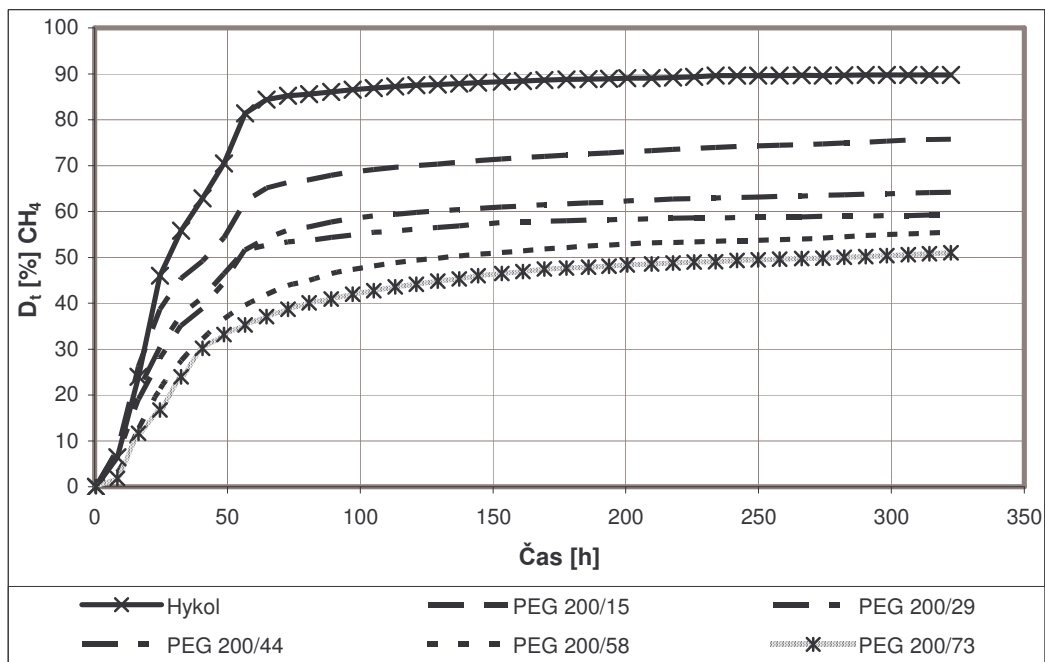
Uvedené grafy, obdobné jako v případě POKUSU 1, potvrzují předpoklad klesající biodegradability s rostoucím množstvím síťovadla a to ve všech případech.



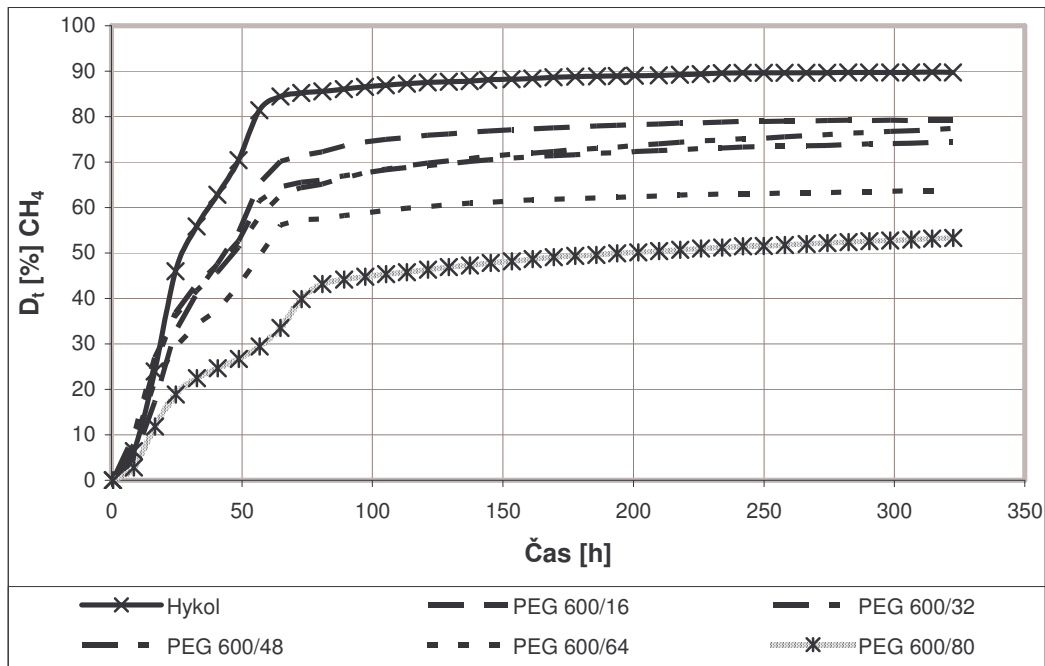
Obr. 8: Stupeň dosažení teoretické produkce CH_4 rozkladem Hykolu síťovaného přísávkou glycerintriacylidyletheru



Obr. 9: Stupeň dosažení teoretické produkce CH₄ rozkladem Hykolu síťovaného přísavky ethylenglykoldiglycidyletheru

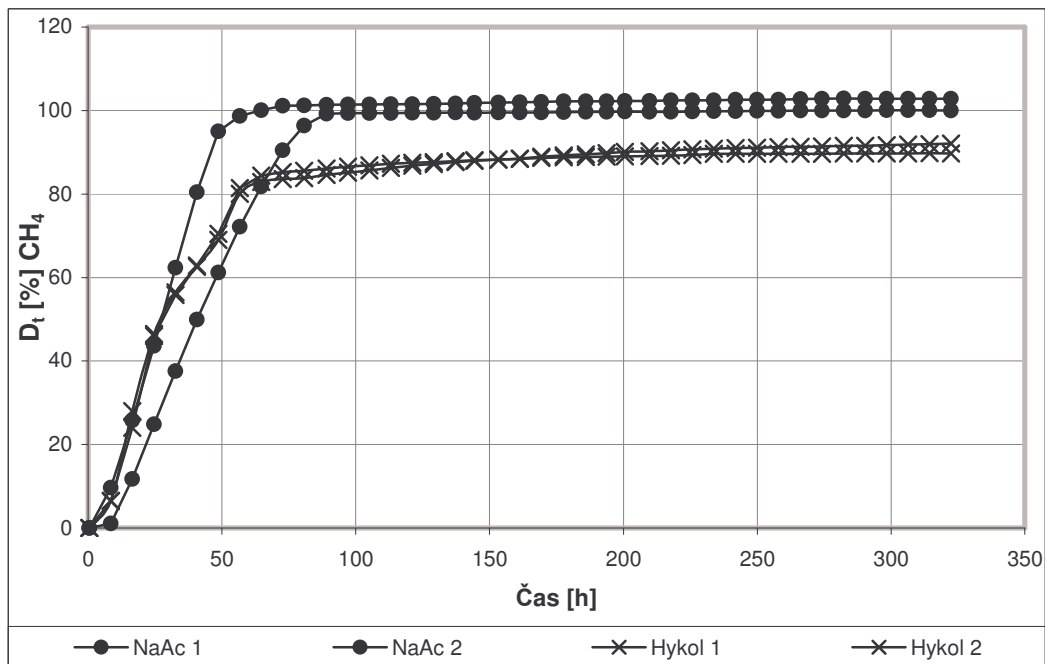


Obr. 10: Stupeň dosažení teoretické produkce CH₄ rozkladem Hykolu síťovaného přísavky polyethylenglykol (200) diglycidyletheru



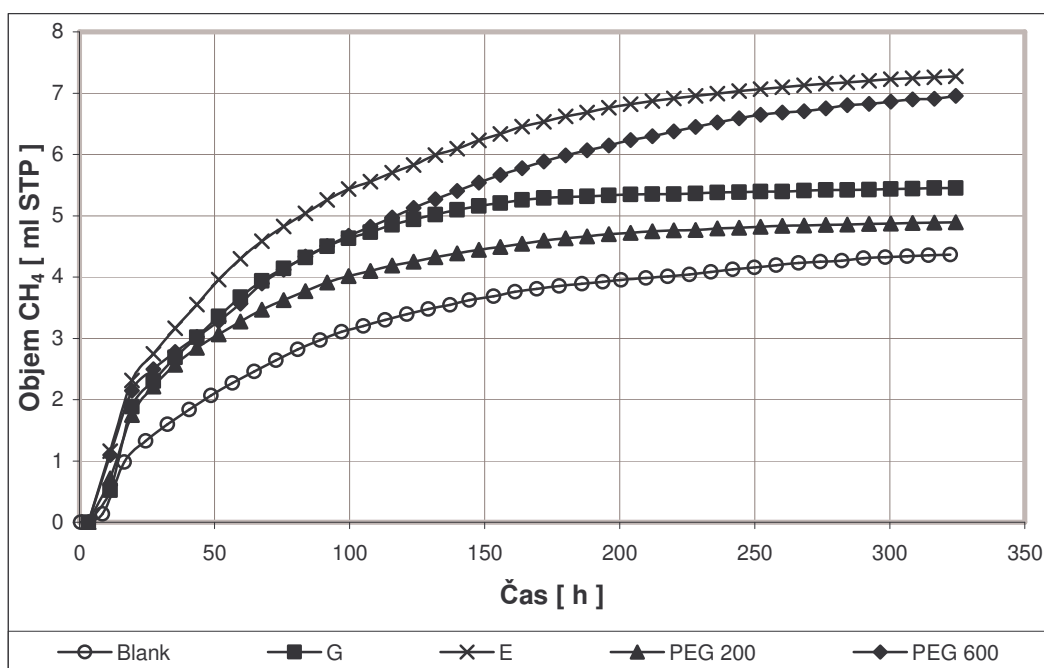
Obr. 11: Stupeň dosažení teoretické produkce CH₄ rozkladem Hykolu síťovaného přísádky polyethylenglykol (600) diglycidyletheru

Pro ověření aktivit anaerobního kalu byly použity jako modelové látky- octan sodný a Hykol. Z obr. 12 vyplývá, že bylo u obou použitých kultur dosaženo shodně 100%-ního rozkladu u NaAc a cca 87 %-ního rozkladu u Hykolu po 125 hodinách.



Obr. 12: Stupeň dosažení teoretická produkce CH₄ standardních látek

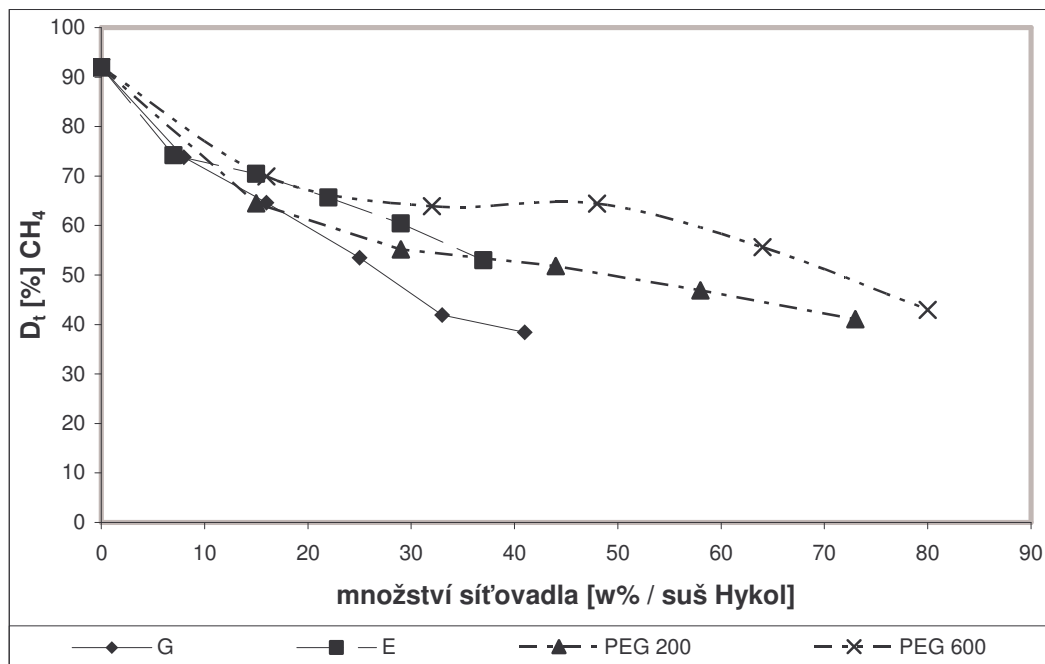
Ověření případného toxického vlivu použitých sířovadel byla ověřena i tato skutečnost; toxicita těchto sířovadel byla testována při koncentraci 10 μl na testovací baňku. Množství bylo voleno tak, aby představovalo dle odhadu horní hranici použitých sířovadel. Jak je patrné z obr. 13, použitá sířovadla byla poměrně dobře rozložitelná. Nedošlo k inhibici, protože produkce CH_4 byla vyšší než u slepého vzorku. V testovaných koncentracích nepůsobila tedy sířovadla toxicky a mohla by být využita anaerobními mikroorganismy jako zdroj uhlíku.



Obr. 13: Produkce CH_4 - testování toxicity epoxidů použitých jako sířovadlo

Ukázalo se, že stejně jako u sledování biorozkladu rozpustných podílů vzorků, jsou nejlépe biologicky odbouratelné vzorky sířované pomocí PEG 600 (obr. 14).

Celkové biodegradace byly vyhodnoceny po uplynutí 125 hodin u všech vzorků, protože produkce CH_4 se již ve většině případů nezvyšovala, oproti předešlému pokusu, kde jsme vyhodnocovali celkovou biodegradaci až na konci anaerobního rozkladu, tj. po 234 hodinách.



Obr. 14: Stupeň biodegradace teoretické produkce CH₄ ze vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy (gel + sol) po 125 hod

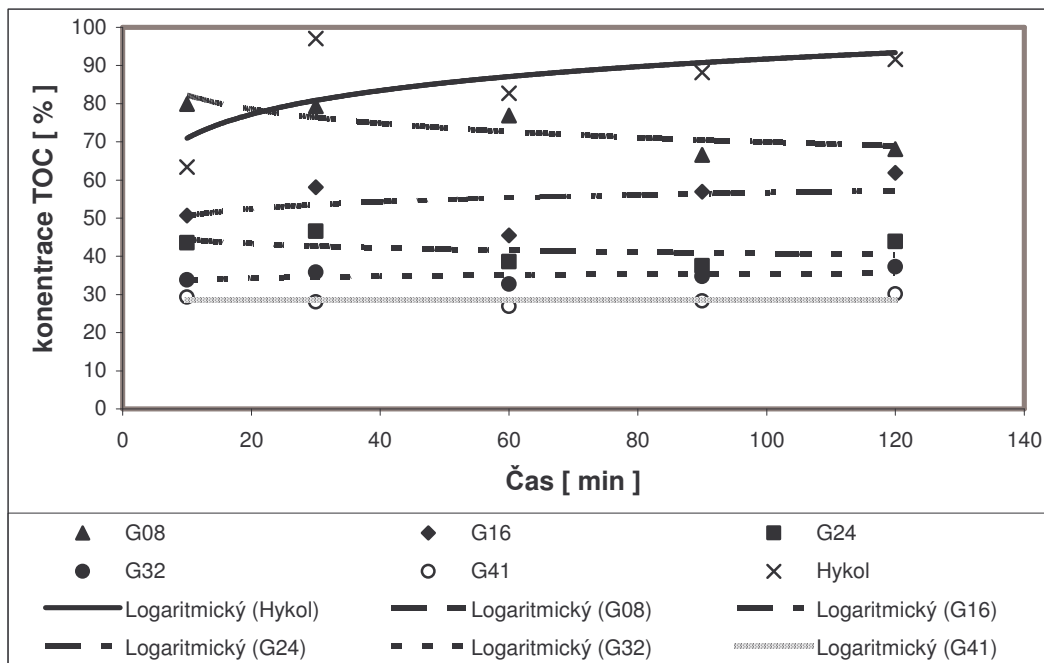
V tab. 11. jsou uvedeny hodnoty získané po 125 hodinách přímým odečtem z dat přístroje MicroOxymax. Hodnoty byly odečteny jako objemy vyprodukovaného CH₄ a přepočteny na mg uhlíku.

Tab. 11: Přehled množství transformovaného uhlíku po 125 hodině

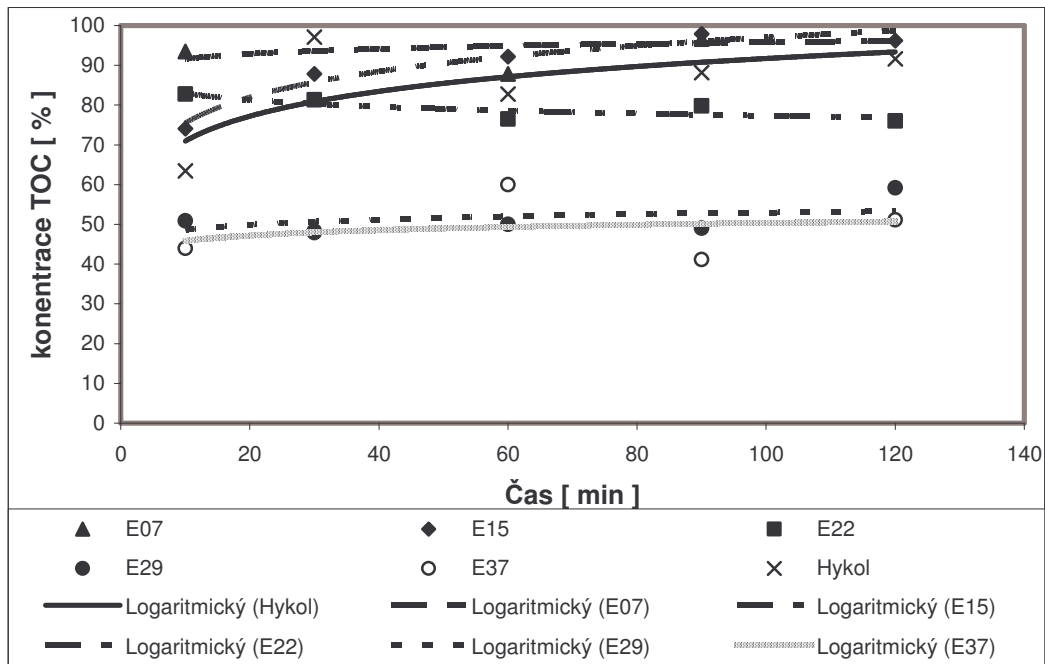
VZOREK	CH ₄ v plynné fázi [mg]	CO ₂ v plynné fázi [mg]	CO ₂ v roztoku [mg]	D _t [%]
NaAc	10,07	1,45	6,56	100
Hykol	8,74	4,35	5,26	92
G08	8,05	4,00	2,08	81
G16	7,05	2,40	3,81	71
G24	5,68	3,14	4,65	58
G32	4,57	2,51	3,82	46
G41	4,19	2,58	3,40	42
E07	8,10	4,10	5,48	81
E15	7,69	3,99	4,36	77
E22	7,46	3,73	4,26	72
E29	6,59	3,40	4,75	66
E37	5,78	2,61	3,45	58
PEG 200/15	7,04	3,52	5,16	70
PEG 200/29	6,02	2,38	3,20	60
PEG 200/44	5,68	2,47	4,00	57
PEG 200/58	5,12	3,23	3,12	51
PEG 200/73	4,48	2,08	1,94	44
PEG 600/16	7,63	3,55	4,08	76
PEG 600/32	6,98	3,31	3,98	70
PEG 600/48	7,15	3,76	3,39	70
PEG 600/64	6,07	3,89	2,51	61
PEG 600/80	4,69	2,70	-	47
G	0,59	0,38	-	6
E	1,50	0,98	-	15
PEG 200	0,27	0,05	-	3
PEG 600	1,39	1,41	-	14

9.3 Měření rozpustnosti

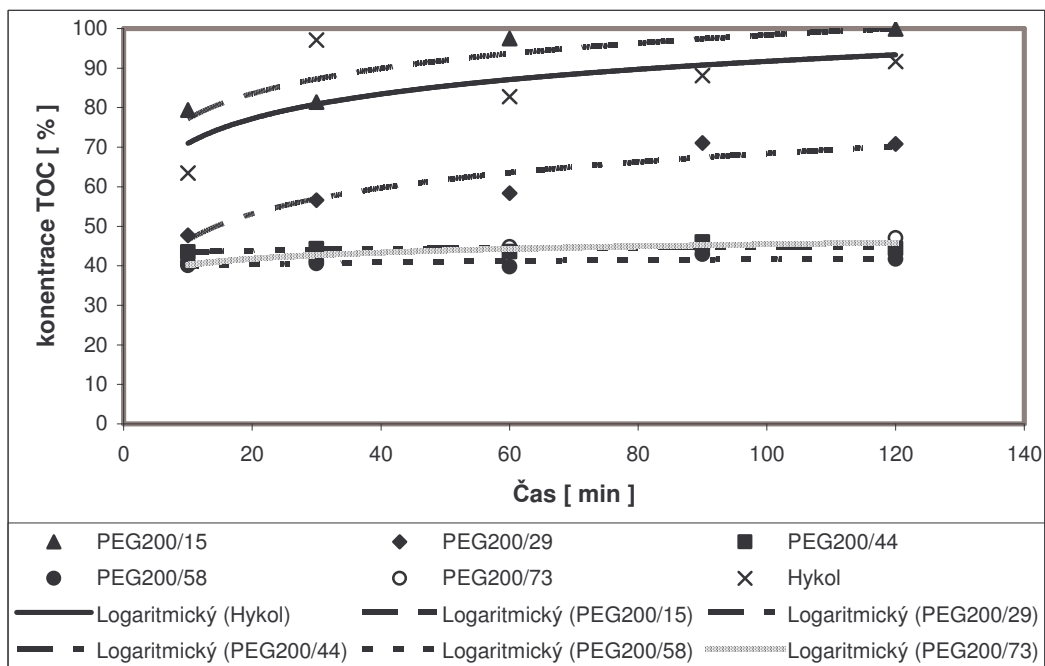
Ze všech síťovaných vzorků, včetně čistého Hykolu, byly připraveny suspenze (navážka 0,1 g/ 20ml destilované vody). Měření rozpustností bylo prováděno za laboratorní teploty a suspenze byly míchány na magnetických míchačkách. Z takto připravených suspenzí bylo v časových intervalech 10, 30, 60, 90 a 120 min odebráno po 4 ml. Odebrané množství bylo přefiltrováno přes červený filtr, který byl před použitím důkladně promyt vroucí destilovanou vodou a vysušen. Filtrát byl ředěn 50x a analyzován na analyzátoru uhlíku Shimadzu.



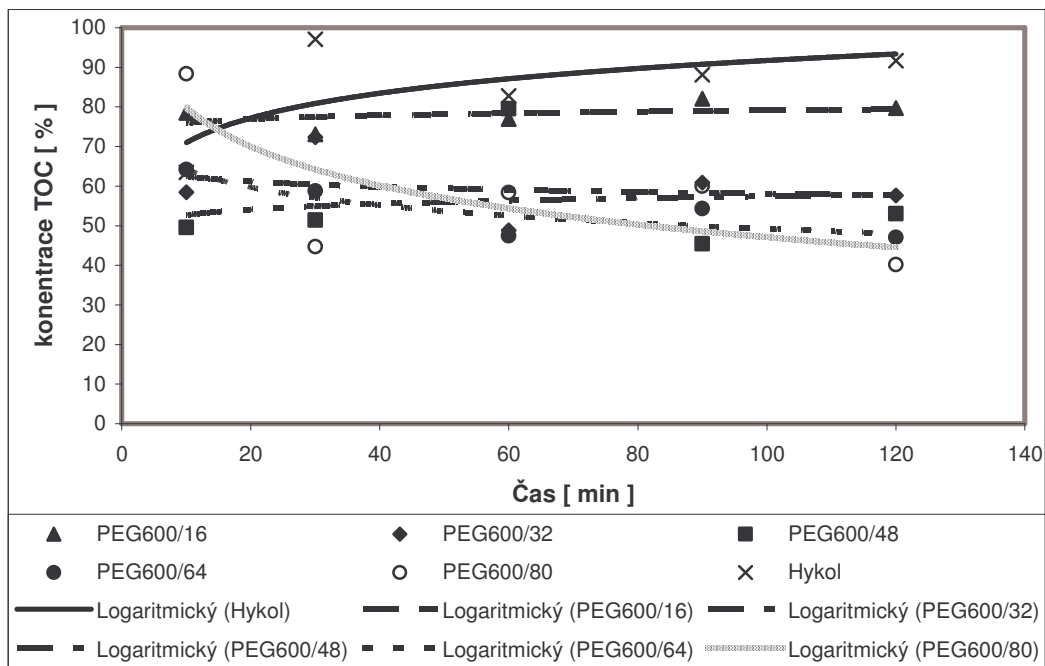
Obr. 15: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných glycerintriglycidyletherem



Obr. 16: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných ethylenglykoldiglycidyletherem



Obr. 17: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (200) diglycidyletherem



Obr. 18: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (600) diglycidyletherem

Z výše uvedených grafů je zřejmý vliv rostoucího množství síťovadla na snižující se rozpustnost. Tvary křivek sice neodpovídají zcela našim předpokladům, ale u většiny síťovadel je patrný trend snižování rozpustnosti s rostoucím množstvím síťovadla. Jednotlivé body byly proloženy logaritmickou regresí.

Při srovnání grafů vychází jako nejlépe rozpustné vzorky s PEG 600 a E. U vzorků tekutých i po pokusu o zesíťování je možné předpokládat, že došlo jen k maskování.

ZÁVĚR

V práci byl sledován vliv síťování vybranými bis-epoxidy (a glycerintriglycidyletheru) na biologický anaerobní rozklad bílkovinného hydrolyzátu Hykol. K popsání vlastností jednotlivých vzorků byly použity různé metody fyzikálních a chemických analýz, počínaje měřením FI po stanovení rozpustnosti pomocí měření obsahu organického uhlíku. Částečně byl brán zřetel na výsledky získané v souběžně probíhající diplomové práci [25].

Při stanovení stupně biologického rozkladu v anaerobních podmínkách byl potvrzen předpoklad, že se zvyšujícím se množstvím síťovadla se snižuje stupeň biologického rozkladu takto upravených vzorků. Oproti předchozím diplomovým pracím na obdobné téma, kde byla použita jiná síťovadla, byly naše vzorky jen částečně rozpustné. Tyto obtíže byly v menším rozsahu očekávány. Výjimkou zde byly jen vzorky síťované polyethylenglykol (600) diglycidyletherem, které byly bez problému rozpustné i při nejvyšším množství přidaného síťovadla. Toto mohlo být způsobeno úpravou vzorků při síťování, kdy zřejmě došlo z neznámého důvodu k narušení řetězce bílkovinného hydrolyzátu a jeho rozpadu na menší fragmenty, které po síťování nebyly součástí rozsáhlejší sítě a tudíž mohly být snadněji rozpustné. Tato pravděpodobná destrukce vzorku také způsobila u vzorků síťovaných polyethylenglykol (600) diglycidyletherem relativně snadnější biodegradaci oproti vzorkům síťovaným jinými síťovadly. Dalším možným vysvětlením by mohlo být nevytvoření klasické sítě, ale pouze tzv. maskování jednotlivých funkčních aminoskupin. Nicméně, ani jednu z těchto domněnek jsme pomocí FTIR analýzy nedokázali potvrdit [25].

Pokud bychom vzorky hodnotili z pohledu ochoty k biologickému rozkladu, vycházel by polyethylenglykol (600) diglycidylether jako nejvhodnější, naopak glycerintriglycidylether jako nejhorší. Ovšem z jiného pohledu, např. z pohledu mechanické odolnosti vzorku, by mohlo být za nejvhodnější síťovadlo považován právě glycerintriglycidylether z logického důvodu vyššího počtu funkčních skupin a tudíž možnosti vytvoření pevnější sítě; prakticky to bylo dokázáno měřením rozpustností.

K vytvoření sítě je zapotřebí použít látky s větším počtem síťujících funkčních skupin. Pokud je funkčnost síťujících látek pouze málo větší než 2, je nutné ji smíchat v přesném stechiometrickém poměru a reakce musí proběhnout do vysoké konverze, jinak se síť nemůže vytvořit. Protože Hykol nemá příliš vysokou funkčnost, pokud je bis-epoxid použit v nevhodném stechiometrickém poměru nebo reakce neproběhla do vysoké konverze, síť

se nemusí vytvořit. Použité diepoxidy mohou být znečištěny monofunkčními látkami, event. vlivem homopolymerace může vzrůstat jejich WPE a může dojít k přípravě nestechiometrické směsi. Může dojít i k hydrolýze Hykolu event. ke zvýšení obsahu monofunkčních látek v Hykolu schopných reakce s epoxidem.

Značný stupeň hydrolýzy kolagenu na hydrolyzát Hykol (poměrně malé fragmenty ve srovnání např. s želatinou) je tedy hlavní příčinou jisté rozpornosti výsledků.

Pro další výzkum této problematiky by bylo vhodné prozkoumat mechanismus síťování mnohem podrobněji, zejména přesně rozlišit síťování a maskování, tak aby bylo možné jednoznačně popsat typ či tvar sítě a na základě těchto poznatků zhodnotit všechna, i dříve používaná síťovadla.

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývala sledováním vlivu síťování vybranými bis-epoxidy (a glycerin triglycidyletheru) na biologický anaerobní rozklad bílkovinného hydrolyzátu Hykol. Při biologickém rozkladu testovaných vzorků Hykolu byla sledována methanogenní aktivita přítomných mikroorganismů resp. množství vyprodukovaného bioplynu (CH_4 , CO_2).

V obou anaerobních rozkladech byla koncentrace sušiny inokula 4,5 g/l a teplota vodní lázně v níž byly ponořené testovací baňky 35 °C. Vzorky Hykolu síťovaného vybranými bis-epoxidy byly dávkovány v takovém množství, aby koncentrace TOC v testovacích baňkách činila cca 20 mg.

Při hodnocení vzorků podle jejich ochoty k biologickému rozkladu, vycházel v obou anaerobních pokusech polyethylenglykol (600) diglycidylether jako nejvhodnější síťovadlo a naopak glycerin triglycidylether jako nejhorší. Z pohledu mechanické odolnosti vzorku, by mohlo být za nejvhodnější síťovadlo považován glycerin triglycidylether z důvodu vyššího počtu funkčních skupin a tedy možnosti vytvoření pevnější sítě.

Pro další výzkum této problematiky by bylo vhodné prozkoumat podrobněji mechanismus síťování.

SUMMARY

This diploma work which has presented, dealing with influence of cross-link of bis-epoxides (and glycerin triglycidylether) on biodegradation of protein hydrolysate Hycol under anaerobic conditions. During biodegradation of testing Hycol samples was determined methane-activity of present micro-organism, other way of quantity how many biogas (CH_4 , CO_2) has been produced.

Both anaerobic biodegradations included concentration of suspended solid inoculum 4,5 g/l and temperature of water tank with testing bulbs was 35 °C. Hycol cross-link samples of bis-epoxides were injection with such quantity to concentration TOC inside bulbs equals cca 20 mg.

During evaluation of testing samples according to availability for biodegradation, both anaerobic tests confirm that polyethylenglykol (600) diglycidylether is the most cross-link material and in the opposite side glycerin triglycidylether as worst material. However, on the other side, concerning mechanical - resistance of testing sample would be glycerin triglycidylether as the most available as cross-link material – reason is that this material has more function groups to build more strong net-link.

Concerning the future research of above mentioned matter, it will be advisable to investigate cross-link process in more detail.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kameya T., Murayama T., Urano K., Kitano M.: Biodegradation ranks of priority organic compounds under anaerobic conditions. *Sci. Total Environ.*, 1995, pp 45-51.
- [2] Kupec J.. Zpracování odpadních vod a kalů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ES, Zlín 2002.
- [3] Lin CY.: Effect of heavy-metals in acidogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*, 1993, Vol. 27, No. 1, pp. 147 – 152.
- [4] Zábranská J. a kol.: Laboratorní metody v technologii vody. VŠCHT, Praha 1997; kap. 7.1, 7.2, 8.7, 8.8.
- [5] Kawahara K., Yakabe Y., Ohide T., Kida K.: Evolution of laboratory made sludge for anaerobic degradability test and it is for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 1999, Vol. 39, No. 12, pp 2007 – 2018.
- [6] Dohányos M., Zábranská J., Jeníček P.: Anaerobní technologie v ochraně životního prostředí. Ministerstvo život.prostředí, Praha 1996
- [7] Day M., Shaw K., Cooney D.: Biodegradability: An assessment of commercial polymers according to the Canadian method for anaerobic conditions. *Journal of Environ. Polym. Degr.*, 1994, Vol. 2, No. 2.
- [8] Patil R. D., Dalev P. G., Mark J. E., Vassileva E., Fakirov S.: Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil. *J. Appl., Polymer. Sci* 78, 2000, pp.1341 – 1347.
- [9] Alexy P., Bakoš D., Crkoňová G., Kolomazník K., Kršiak M.: Blends of polyvinylalcohol with collagen hydrolyzate: Thermal degradation and processing properties. *Marcomol. Symposia*, 2001, Vol. 170, pp.41 – 49.
- [10] Sung H.-W., Hsu C.-S., Lee Y.-S.: Physical properties of a porcine internal thoracic artery fixed with an epoxy compound, *Biomaterials* 17, 1996, pp. 2357, 2363, 2364
- [11] Sung H. W., Hsu H. L., Shih C. C., Lin D. S.: Gross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. *Biomaterials* 17, 1996, pp. 1405 – 1410.

- [12] Imamura E., M. D., Sawatani O., Koykanagi H, Noishiki Y., Miyata T.: Epoxy compounds as a new Cross-linking agent for porcine aortic leaflets: Subcutaneous implant studies in rats. *J. Card. Surg.* 4, 1989, 50 – 57.
- [13] Patil R. D., Dalev P. G., Mark J. E., Vassileva E., Fakirov S.: Biodegradation of chemically modified gelatin films in simulated natural environment. *Biotechnic&Biotech.*15, 2001, 116 – 123
- [14] Patil R. D., Dalev P. G., Mark J. E., Vassilev E., Falivov S.: Biodegradation of Chemically Modified Gelatin Films in Lake and River waters, *J. Appl. Polym. Sci.* 76, 29 – 37, 2000
- [15] Tomihata K., Burczak K., Shivaki K., Ikada Y.: Cross - Linking and Biodegradation of Native and Denatured Collagen. *Amer. Chem. Soc.* (1994), chapter 24, 275 - 286
- [16] Sung H.-W., Chen W.-Y., Tsai C.-C., Hsu H.-L.: In vitro study of enzymatic degradation of biological tissues fixed by glutaraldehyde or epoxy compound, *Biomater. Sci. Polymer Edn*, 1997, pp. 587, 588, 599
- [17] Pšejka J.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2003), str. 24
- [18] Jelínek K.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2003), str. 53 - 54
- [19] Tupý M.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2005), str. 41 - 55
- [20] Charvátová H.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2004), str. 41 - 47
- [21] Hruzík P.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2004)
- [22] Pšejka J., Hrnčířík J., Kupec J., Charvátová H., Hruzík P., Tupý M.: Effect of Cross – Linking Waste Protein with Diepoxides on its Biodegradation under Anaerobic Conditions, *J. Polym. Environ.* 14, No3 (2006)
- [23] Davídek J. a kol.: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, SNTL, Praha (1981)
- [24] Hrnčířík J., Dvořáčková M., Hruška F., Kupec J., Kolomazník K.: *Jalca* 100 (2005), 1-7
- [25] Nosková R.: Diplomová práce, UTB, Zlín (2006)

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

DEB	Diepoxy – 1,2:3,4 – butan	
DEO	Diepoxy – 1,2:7,8- oktan	
D_t	Celková biodegradace	[%]
E	Ethylenglykoldiglycidyleter	
FI	Fixační index	[%]
G	Glycerin triglycidyleter	
Hykol	Hydrolyzát kolagenu	
m_t	Hmotnost organického uhlíku ve vzorku	[mg]
m_v	Hmotnost celkového metabolizovaného uhlíku	[mg]
PEG 200	Polyethylenglykol(200)diglycidyleter	
PEG 600	Polyethylenglykol(600)diglycidyleter	
TC	Obsah celkového uhlíku	[mg.l ⁻¹]
TOC	Obsah celkového organického uhlíku	[mg.l ⁻¹]
NaAc	Octan sodný	

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Schéma anaerobního rozkladu

Obr. 2: Produkce CH_4 ze vzorků Hykolu síťovaných glycerin triglycidyletherem

Obr. 3: Produkce CH_4 ze vzorků Hykolu síťovaných ethylenglykoldiglycidyletherem

Obr. 4: Produkce CH_4 ze vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (200) diglycidyletherem

Obr. 5: Produkce CH_4 ze vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol (600) diglycidyletherem

Obr. 6: Stupeň biodegradace rozpustných podílů Hykolu síťovaného různými epoxidy

Obr. 7: Závislost stanoveného FI vzorků na množství použitých síťovadel

Obr. 8: Stupeň dosažení teoretické produkce CH_4 rozkladem Hykolu síťovaného přidavky glycerin triglycidyletheru

Obr. 9: Stupeň dosažení teoretické produkce CH_4 rozkladem Hykolu síťovaného přidavky ethylenglykoldiglycidyletheru

Obr. 10: Stupeň dosažení teoretické produkce CH_4 rozkladem Hykolu síťovaného přidavky polyethylenglykol (200) diglycidyletheru

Obr. 11: Stupeň dosažení teoretické produkce CH_4 rozkladem Hykolu síťovaného přidavky polyethylenglykol (600) diglycidyletheru

Obr. 12: Stupeň dosažení teoretická produkce CH_4 standardních látek

Obr. 13: Produkce CH_4 - testování toxicity epoxidů použitých jako síťovadlo

Obr. 14: Stupeň biodegradace teoretické produkce CH_4 ze vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy (gel + sol) po 125 hod

Obr. 15: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných glycerin triglycidyletherem

Obr. 16: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných ethylenglykoldiglycidyletherem

Obr. 17: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol(200)diglycidyletherem

Obr. 18: Rozpustnost vzorků Hykolu síťovaných polyethylenglykol(600)diglycidyletherem

SEZNAM TABULEK

Tab.1.: Navážky G / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Tab.2.: Navážky E / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Tab.3.: Navážky PEG200 / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Tab.4.: Navážky PEG600 / Hykol a předpokládané * stechiometrické poměry oxiran / NH₂

Tab.5: Fixační indexy

Tab.6: Rozpuštěný podíl (sol) vzorků Hykolu síťovaných různými epoxidy

Tab.7: Vstupní a výstupní hodnoty TOC a IC v testovacích baňkách (150ml)

Tab.8: Celková biodegradace

Tab.9: Přehled množství transformovaného uhlíku po 234 hodině anaerobního rozkladu při 37 °C

Tab. 10: Vstupní a výstupní hodnoty TOC a IC v testovacích baňkách (150ml)

Tab. 11: Přehled množství transformovaného uhlíku po 125 hodině