



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

**STANOVENÍ ANAEROBNÍHO ROZKLADU
BÍLKOVINNÉHO HYDROLYZÁTU SÍŤOVANÉHO
VYBRANÝMI EPOXIDY**

2005

Michael Tupý

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

Děkuji také všem ostatním pracovníkům Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí za vytvoření dobrých podmínek pro vypracování diplomové práce , za jejich ochotu a vstřícnost při řešení mé diplomové práce.

Zvlášť bych chtěl poděkovat Ing. Josefu Hrnčíříkovi, CSc. a Ing. Jiřímu Pšejovi za 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 26.5.2005

.....

podpis diplomanta

Abstrakt

Česky :

Tato práce obsahuje souhrn poznatků o průběhu síťování hydrolyzovaného kolagenu vybranými epoxidy 1,2:3,4 – diepoxybutan (DEB) a 1,2:7,8 – diepoxyoktan (DEO) a biologickém rozkladu připravených vzorků za anaerobních podmínek. Kromě biologického rozkladu byla věnována pozornost nejen studiu původního hydrolyzovaného kolagenu , ale také připraveným vzorkům z hlediska chemických a fyzikálních vlastností , průběhu síťování DEB a DEO , kinetice rozpouštění modifikovaných vzorků , viskozitním měřením roztoků a FTIR spekter. Z měření vyplývá , že s rostoucím zesíťováním Hycolu klesá schopnost mikroorganismů rozkládat modifikované bílkoviny.

Anglicky :

This thesis contains survey of know-how about procedure of netting hydrolyze collagen with chosen epoxy's 1,2,3,4 - diepoxybutan (DEB) a 1,2,7,8 - diepoxyoktan (DEO) and biodegradation of prepared samples in anaerobic conditions. Apart from biodegradation was attention direct not only to study original hydrolyzed collagen but also to prepared samples from the point of view chemical and physical characteristics , procedure cross linking of DEB and DEO, kinetics of solution modified samples , viscosity measuring of solutions and FTIR spectrums. From measuring is eventuating that with cross linking of Hycol is dropping down the possibility microorganisms to biodegradation of modified protein.

OBSAH

Strana

ÚVOD

1. TEORETICKÁ ČÁST	7
1.1 BIOLOGICKÝ ROZKLAD	7
1.2 ANAEROBNÍ ROZKLAD	8
1.2.1 Faktory ovlivňující rozklad mikroorganismy	8
1.2.2 Faktory ovlivňující anaerobní rozklad polymerů	10
1.2.3 Popis průběhu anaerobního rozkladu	11
1.3 SLEDOVÁNÍ ANAEROBNÍHO ROZKLADU	12
1.4 CHARAKTERISTIKA ZÁKLADNÍCH BÍLKOVIN	13
1.4.1 Kolagen	13
1.4.2 Želatina	13
1.4.3 Hydrolyzát kolagenu	14
1.5 SÍŤOVÁNÍ BÍLKOVIN EPOXIDY A BIOROZLOŽITELNOST	14
1.5.1 Síťovaný kolagen	16
1.5.2 Síťovaná želatina	16
1.5.3 Síťovaný hydrolyzát kolagenu	17
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	19
3.1.1 Chemikálie	19
3.1.2 Biologický materiál	20
3.1.3 Minerální medium	20
3.1.2 Testované vzorky	21
3.2 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ	22
3.3 METODY STANOVENÍ	22
3.3.1 Stanovení volných aminoskupin	22
3.3.1.1 Stanovení NH ₂ skupin ninhydrinovou metodou	22
3.3.1.1 Stanovení NH ₂ a COOH skupin potenciometrickou metodou	23
3.3.2 Stanovení anorganického uhlíku	23
3.3.3 Stanovení anaerobního rozkladu	24
3.3.4 Příprava vzorků a měření IČ spekter	25

OBSAH	Strana
3.3.5 Stanovení viskozity	26
3.3.6 Stanovení rozpustnosti pomocí TOC	26
3.3.7 Stanovení sušiny	26
3.4 ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	27
3.4.1 Stupeň anaerobního rozkladu	27
3.4.2 Fixační index	27
3.4.3 FTIR spektra	28
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1 STANOVENÍ COOH A NH ₂ SKUPIN	30
4.2 NAVRŽENÍ VHODNÝCH PODMÍNEK PRO SÍŤOVÁNÍ	34
4.3 STANOVENÍ KINETIKY ROZPUSTNOSTI MĚŘENÍM TOC	38
4.4 MĚŘENÍ VSKOZITY NA UBBELOHDEHO VSKOZIMETRU	41
4.5 FTIR SPEKTRA HYKOLU A SÍŤOVANÝCH VZORKŮ	48
4.6 BIOLOGICKÝ ROZKLAD ZA ANAEROBNÍCH PODMÍNEK	56
5. ZÁVĚR	72
SOUHRN	74
SUMMARY	75
SEZNAM TABULEK	76
SEZNAM OBRÁZKŮ	77
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBLŮ A ZKRATEK	78
LITERATURA	79

ÚVOD

V současné době je zapotřebí věnovat pozornost rozličným technologiím a spotřebitelskému využití různorodých materiálů. Postupem času začaly více a více do života člověka prostupovat plasty a staly se z nich běžné součásti našeho životního stylu. Plasty mají totiž řadu fyzikálních i chemických vlastností, které bychom u jiných materiálů jen velmi těžko hledali. Například pevnost, pružnost a houževnatost, transparentnost, lehká vybarvitelnost, snadná zpracovatelnost, odolnost proti chemikáliím a mnohé další (pro určité skupiny plastů) specifické vlastnosti.

Problém je ale v současné době posunut do jiné roviny, než v době, kdy vědci hledali pouze nové druhy plastů s rozdílnými vlastnostmi. Jednou totiž pro každý výrobek přijde čas, kdy se stává nepotřebným. Proto i v případě plastů je nutno výrobek z vysokomolekulární složky recyklovat nebo rozložit a zařadit zpět do přirozeného koloběhu chemických prvků.

Současným (a ne právě nejlepším řešením) je plastový výrobek spálit nebo jej skládkovat. Pokud výrobek spálíme, potřebujeme na jeho „likvidaci“ energii exhaláty nejsou ovšem také přijatelné pro životní prostředí. Proto je výhodné využít principu biodegradace, který byl přírodou pro koloběh organických látek vytvořen, tedy využít přirozené biologické rozložitelnosti těchto organických látek v biosféře.

Jinými slovy, budeme-li skládkovat odpad, který je biologicky sám a relativně rychle rozložitelný, ušetříme další generace spousty ekologických problémů a ještě využijeme například anaerobním prostředím produkovaný metan k výrobě tepelné nebo elektrické energie.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 *Biologický rozklad*

Biologický rozklad (nebo také biodegradace) je přírodní proces , díky kterému dochází k rozkladu organických látek na jednodušší sloučeniny , které jsou schopny se zapojit do přírodních cyklů mineralizací. V aerobním prostředí dochází k mineralizaci rozložením organického substrátu na CO_2 a vodu, případně na biomasu typu huminových látek. Při anaerobním prostředí vzniká CO_2 , CH_4 , voda a další biomasa. [1].

Do přirozených degradačních vlivů lze počítat především atmosférický kyslík , světelné záření a mikroorganismy. Nejvýznamnější vliv má při rozkladu polymerů z těchto faktorů UV záření , jehož působením se snižuje molární hmotnost a zhoršují se mechanické vlastnosti. Biologická degradace působením mikroorganismů se při likvidaci plastů uplatňuje převážně jako závěrečná fáze po předcházejících fyzikálních a chemických procesech.

Autoři práce [2] studovali obecně biorozložitelnost u organických sloučenin a zjistili , že například většina alifatických uhlovodíků a karboxylových kyselin se rozkládá velmi dobře a naopak sloučeniny obsahující etherovou vazbu nebo rozvětvený uhlovodík se rozkládají hůře. Dále zjistili , že sloučeniny obsahující primární hydroxylovou skupinu , aldehydickou skupinu , $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ skupinu nebo karboxylovou , či $-\text{OH}$ skupinu jsou lehce odbouratelné. Látky s nitroskupinami , halogeny , aminoskupinami a sulfoskupinami se odbourávají velmi těžce.

U biologicky odbouratelných polymerních materiálů se očekávají podobné degradační vlastnosti , jako mají přírodní polymery. Během jejich používání by měly být stále svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi a po skončení své životnosti by měly být v přírodě volně rozložitelné [21].

Ke zvýšení biologické rozložitelnosti vede řada cest. Můžeme změnit chemickou stavbu polymeru kopolymerací s v přírodě lehce rozložitelným polymerem či monomerem, zavedením rozložitelných funkčních skupin, změnou struktury řetězce a podobně. Další možností (podobné kopolymeraci) je smísení plastu s lehce rozložitelnou látkou, což je například biopolymer. Mohou to být například škrob, celulóza, různé bílkoviny či kyselina p-hydroxymáselná. Tím umožníme rozštěpení částic polymeru na menší fragmenty, které jsou pak lépe napadnutelné mikroorganismy.

1.2 Anaerobní rozklad

Anaerobní rozklad je soubor dílčích, na sebe navazujících biologických procesů, na kterých se podílí několik základních skupin specifických mikroorganismů. Rozklad organických látek až na konečné produkty (methan a oxid uhličitý) vyžaduje jejich koordinovanou metabolickou součinnost. Produkt jedné mikrobiální skupiny se stává ihned substrátem pro mikroorganismy skupiny druhé. Pokud narušíme chod skupiny jedné, naruší se celý sled po sobě jdoucích rozkladů a tím i účinnost procesu.

Proces anaerobního odbourávání se uplatňuje v čistících zařízeních stále ve větší míře. Důvodem toho je ekonomická, prostorová a energetická nenáročnost, nižší produkce biomasy a malé nároky na živiny. Nevýhodou tohoto procesu je jeho malá reakční rychlost. Tu lze ovlivnit například zvýšením teploty procesu nebo mícháním směsí anaerobního kalu a substrátu (odpadu).

1.2.1 Faktory ovlivňující rozklad mikroorganismy

Dobrá biodegradabilita polymerů je určena i prostředím, ve kterém se mikroorganismy nacházejí. Je nutná přítomnost více druhů bakterií, které pak produkují vícero druhů enzymů. Pro zajištění vhodných podmínek pro jejich život je důležité udržovat specifické fyzikální vlastnosti prostředí, které jsou uvedeny dále.

- **Složení anaerobního kalu a substrátu**

Dusík a fosfor jsou životně důležité prvky pro růst bakterií. Minimální koncentrace dusíku je 2,5 g na 100 g sušiny kalu a potřebná koncentrace fosforu je 0,5 g na 100 g sušiny kalu. Poměr uhlíku , dusíku a fosforu tak je u anaerobního procesu 100 : 10 : 0,2 [7, 9]. Tento poměr je oproti aerobnímu prostředí , kde jsou poměry C : N : P rovny 100 : 10 : 1 , hodně ochuzen o nutriční prvky a proto je anaerobní systém pomalejší , než systém aerobní.

- **Teplota**

Teplota ovlivňuje anaerobní procesy obdobně , jako jiné biochemické reakce. S rostoucí teplotou roste rychlost všech probíhajících reakčních procesů. Se změnou teploty se též mění zastoupení jednotlivých druhů bakterií , což může porušit rovnováhu systému.

Mikrobiální tvorba methanu probíhá v širokém rozmezí teplot a to od 4 až po 65 °C. Většina aerobních reaktorů pro sterilizaci kalů i pro čištění odpadních vod pracuje v mezofilní oblasti , tedy kolem teplot 30 – 45 °C , popřípadě v termofilní oblasti kolem teplot 45 – 60 °C. Nad touto teplotou již dochází k postupné denaturaci mikroorganismů. Při methanizaci v termofilní oblasti dosahuje reakce vyššího stupně rozkladu i rychlosti [10].

- **pH**

Optimální hodnota pro růst methanogenních mikroorganismů je v neutrální oblasti , tedy v rozmezí 6,5 – 7,5. Mimo tento interval je biodegradabilita značně inhibována [12]. Nejčastější příčinou výkyvu pH je tvorba nižších mastných kyselin acidogenními mikroorganismy.

Byl zkoumán vliv pH na hydrolýzu a bylo zjištěno, že je závislá na jeho změně , ale nezávisí na samotném množství těkavých mastných kyselin [13].

- ***Hydrofilnost polymeru***

Zásadním faktorem hydrofilnosti je vysoká polarita polymeru a obsah hydrofilních skupin. Ve vodě rozpustné biopolymery jsou lépe rozložitelné. Zvýšení hydrofilnosti nebo hydrofilního povrchu polymeru chemickou modifikací vede k jeho lepší biodegradabilitě.

- ***Nutrienty***

Mimo hlavní nutriční prvky (dusík a fosfor) je třeba mikroorganismům dodat i Na , K , Ca , Mg , Fe a stopová množství Mn , Ni , Zn.

- ***Inhibující a toxické látky***

Na striktně anaerobní bakterie nejvíce toxicky působí kyslík , dále z anorganických sloučenin jsou to sulfidy , kyanidy , siřičitany a soli následujících těžkých kovů: chróm , kadmium , olovo , měď. Zinek a nikl nemají vliv na snížení produkce nižších mastných kyselin , ani jsou-li přítomny ve větší míře.

Z organických sloučenin jsou to především saponáty , fenoly , pesticidy a rozpouštědla [12, 14].

- ***Vliv míchání***

Mícháním zajišťujeme v systému jednak homogenitu všech složek (například koncentrace živin , substrátu) , ale zároveň nedochází k lokálnímu hromadění toxických látek a metabolických toxických produktů. Dochází k lepšímu odvodu bioplynu ze systému a udržuje se tak správný chod reakcí.

1.2.2 Faktory ovlivňující anaerobní rozklad polymerů

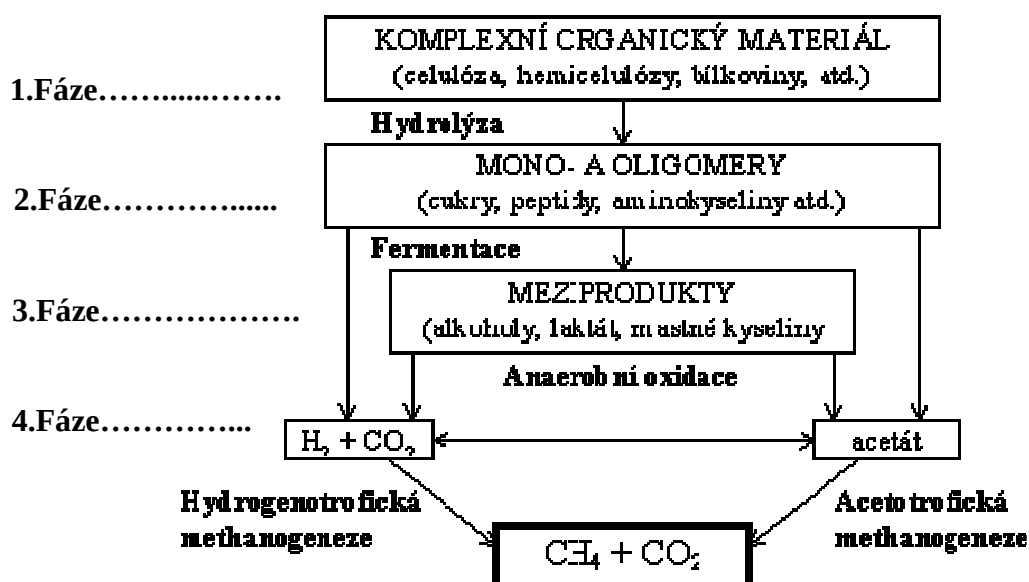
Biologický rozklad za těchto podmínek ovlivňuje řada okolností. Čím má polymer menší molekulovou hmotnost , tím jsou jeho řetězce kratší a má proto větší ochotu se rozkládat. Schopnost biodegradace je m.j. ovlivněna síťováním , případným větvením řetězců či stupněm krystalinity polymeru [4 - 6].

Je-li řetězec větven , popřípadě , je-li dvourozměrně či prostorově síťován , rapidně to zhoršuje možnost enzymu pronikat do sítě a tím i biodegradabilitu polymeru [7 , 8].

Samozřejmě důležitou věcí je , aby polymer a rozpouštědlo , ve kterém k degradaci dochází , měly co nejmenší rozdíl polaroty. Protože na zemském povrchu je nejdostupnějším rozpouštědlem voda , jsou ve vodě rozpustné polymery lépe rozložitelné , než nerozpustné se stejnou molekulovou hmotností. Rozpustnost polymeru ve vodě jednak urychluje jeho „rozmotání“ ze statistických klubek (tím i lepší dostupnost degradabilních enzymů mezi řetězce) z také případnou hydrolýzu řetězců a zmenšování molární hmotnosti.

1.2.3 Popis průběhu anaerobního rozkladu

Anaerobní rozklad je souborem dílčích pochodů na sebe vzájemně navazujících , za které jsou zodpovědné určité skupiny mikroorganismů. Celkový průběh lze rozdělit do následujících čtyř skupin (obr.1):



Obr.1: Schéma anaerobního biologického rozkladu [1]

1.*Fáze: **hydrolýzou*** jsou vysokomolekulární látky rozkládány na nízkomolekulární látky či základní monomery. Uplatňují se zde extracelulární hydrolytické enzymy. Vzniklé produkty jsou již obvykle schopné transportu do buňky.

2.*Fáze: **acidogeneze*** je stádium , kde jsou hydrolyzované produkty dále rozkládány na jednodušší organické látky , jako kyseliny a alkoholy. Jejich fermentací se tvoří celá řada redukovaných produktů (na úkor tvorby oxidu uhličitého a vody). Produkty jsou závislé na charakteru počátečních substrátů a podmínkách prostředí.

3.*Fáze: v průběhu **acetogeneze*** dochází k další oxidaci na CO₂ , vodu a kyselinu octovou, která tvoří až 75 % substrátu pro závěrečný methanogenní proces.

4.*Fáze: **methanogeneze*** je posledním degradačním pásmem. Mikroorganismy mohou produkovat methan pouze z relativně malého počtu jednoduchých organických sloučenin s maximálně čtyřmi atomy uhlíky [14].

1.3 Sledování anaerobního rozkladu

V průběhu anaerobního rozkladu se do mikrobiálního systému přidává substrát , který se mění na plynné složky , vodu a z něj vznikající další biomasu. Můžeme tedy sledovat změny koncentrace oxidu uhličitého , methanu a vznikající biomasu. Biomasa se ovšem k příliš malé rychlosti růstu měří obtížně. Je pro nás tedy pohodlnější sledovat produkci plynů při konstantní teplotě. Při různých teplotách reakce probíhá rozdílnou reakční rychlostí. Produkovaný bioplyn se skládá z cca 70 % methanu , zbytek je oxid uhličitý (popř. stopy H₂S, NH₃, H₂, aj.) [1].

Při sledování rozkladu polymeru mikroorganismy je tedy teoreticky možné použít celé řady metod. Autoři článku [15] sledovali degradaci polymerních materiálů a na základě produkce oxidu uhličitého a methanu , dále dle snižování viskozity , úbytku hmotnosti , podle fyzikálních změn , spektrální analýzy UV – VIS , aj.

1.4 Charakteristika základních látek

Bílkoviny obecně představují velké spektrum látek , které jsou součástí těl jiných organismů , jsou produkty jejich částečného rozkladu nebo výsledkem jejich zpracování. Protože sledovaný bílkovinný hydrolyzát (kapitola 1.4.3) je produktem hydrolýzy kolagenu , je v krátkém přehledu zmínka také o něm a jeho nejdůležitějším produktu hydrolýzy – želatině. Právě želatina je určitým „modelem“ pro obdobný hydrolytický produkt s obchodním názvem „Hykol E“ , dále popsany v následující kapitole.

1.4.1 Kolagen

Kolagen představuje fibrilární nerozpustnou bílkovinu , tvořící základní stavební složku živočišných tkání , svalů vaziv a kůže. Je tak nejčastěji se vyskytující bílkovinou v těle savců. Díky schopnosti nebránit buněčné výměně se po zesíťování glutaraldehydem (a sterilizaci) se používá kvůli mechanickým vlastnostem , například na řadu implantátů do lidského těla , jako jsou srdeční chlopně , cévy , vaziva a řada dalších [16].

Kolagen má ve svých polymerních řetězcích kyselé a bazické funkční skupiny. V závislosti na hodnotě pH prostředí nesou tyto funkční skupiny náboj (kyselé v alkalické oblasti a bazické v kyselé oblasti pH). Kolem každé nabitě funkční skupiny se vytváří elektrostatické pole, které je schopno orientovat molekuly vody a vytvářet hydratační obaly kolem těchto skupin. Hustota výsledného náboje je závislá na aktivitě H^+ iontů a iontové síle.

1.4.2 Želatina

Při zahřátí roztoků kolagenu dochází při zvýšené teplotě kolem 60 °C dochází k výrazné strukturální změně , provázené zvýšeným botnáním a změnou fyzikálně mechanických vlastností. Změna vlastností (modifikace) kolagenu je ještě závislá na pH , iontové síle a stupni kovalentního zesíťování kolagenu. Takto modifikovaný kolagen není odolný proti běžným proteinásám a má mnohem nižší stupeň prostorového uspořádání [17].

1.4.3 Hydrolyzát kolagenu

Tento produkt pod komerčním názvem „Hykol E“ se získává dvoustupňovou (alkalickou a enzymovou) hydrolyzou chromočinných postružin za atmosférického tlaku v následném oddělení chrómu a tuhých částic. Množství chrómu v tomto hydrolyzátu kolagenu pak dosahuje kolem 20 – 30 ppm , hydrolyzát je ve formě roztoku či prášku. Zastoupení nejčtetnějších aminokyselin je :

glycin 33,0 hm.% , prolin 12,5 hm.% , hydroxyprolin 10,0 hm.% [21].

Hykol se používá například při vytlačování ve směsi s PVA jako plnivo , protože je o polovinu levnější a přispívá i ke zlepšení biodegradabilních vlastností. Zvyšuje totiž degradaci výsledného modifikovaného polymeru a překvapivě zlepšuje i mechanické vlastnosti a tepelnou stabilitu [18].

Pomocí termogravimetrické analýzy byla sledována tepelná stabilita PVA fólií v závislosti na různých poměrech PVA a Hykolu ve směsi. Bylo zjištěno , že koncentrace 5 % Hykolu ve směsi neměla na tepelnou stabilitu žádný vliv. Míra tepelné degradace se silně snížila , hlavně při vyšších koncentracích Hykolu. Nevýhodou je , že větší množství Hykolu ve směsi zvyšuje viskozitu směsi a tak zhoršuje zpracovatelnost. [19].

1.5 *Sít'ování bílkovin epoxidy a biologická rozložitelnost*

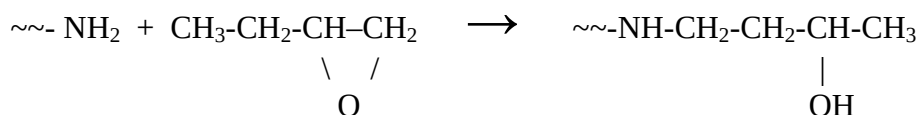
Sít'ování bílkovin látkami s epoxyskupinami má z hlediska využitelnosti v praxi velký význam , zejména v medicíně (viz kap. 1.4.1). Nabízí řadu způsobů , jak přizpůsobit výsledné vlastnosti proteinu k požadavkům zpracovatele i uživatele. Mezi nejvíce studované materiály kolagenu včetně jeho samotného patří sít'ované epoxidy již výše uvedené modifikace. Procesem sít'ování rozumíme vytvoření trojrozměrné struktury pomocí chemického propojení reaktivních skupin v polymeru s reakčním činidlem , což je vícefunkční epoxid. Vytvoření takovéto prostorové sítě má za následek změnu mechanických vlastností , jako pružnosti a pevnosti.

Základní reaktivní skupiny v kolagenu jsou: -NH_2 , -COOH , -OH , -SH .
V epoxysloučenině je to reakční skupina: $\sim\sim\sim\sim\text{CH}-\text{CH}-$



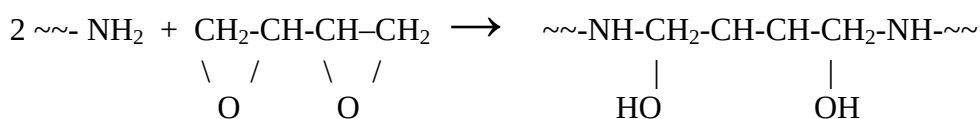
V bílkovinách probíhá síťování nejvíce mezi amino a epoxyskupinou ; v menší míře pak skupinou karboxylovou a hydroxylovou (peptidická vazba se síťování s epoxidy neúčastní) [3 , 20].

Pokud se síťovací reakce zúčastní jen monofunkční epoxid nebo vícefunkční epoxid reaguje jen s jednou reaktivní skupinou (např. -NH_2) , probíhá pak reakce dle následujícího schématu:



Protože prakticky nedochází k propojení řetězců bílkoviny , hovoříme v tomto případě o „maskování“ [3 , 20].

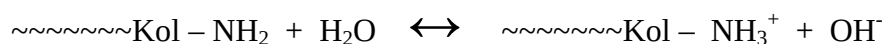
Síťovací reakce vícefunkčního epoxidu již probíhá i mezi řetězci dle tohoto schématu:



V tomto případě již lze hovořit o „pravém“ síťování [3 , 20]. Z výzkumů vyplývá , že tkáň síťovaná monofunkčními epoxidy (maskované) jsou pružnější a měly nižší denaturační teploty , než tkáň síťovaná pomocí polyfunkčních epoxidů.

1.5.1 Sít'ovaný kolagen

Jak již bylo uvedeno , rychlost fixace sít'ování bílkovin polyepoxydy roste se zvyšující se teplotou , dále také se zvyšující se koncentrací sít'ovacího činidla a sít'ování probíhá v oblasti vyššího pH prostředí. To lze vysvětlit zvýšením koncentrace efektivních reaktantů. Zásaditá aminoskupina v kolagenu vytváří totiž v proteinu následující rovnováhu:



Neprotonizovaná aminoskupina na levé straně rovnice je aktuální reaktivní skupinou vstupující do reakce. Při vyšším pH je rovnováha posunuta doleva. V kyselé oblasti lze očekávat stádium protonizovaného epoxidu , v zásadité oblasti se pak vytváří z ϵ -aminoskupiny silné nukleofilní činidlo [11].

Protože sít'ování probíhá mimo peptidickou vazbu , která je snadno rozštěpitelná vodou (podléhá hydrolýze) , podléhá i sít'ovaný kolagen biologickému rozkladu. Vytvořená síť sice částečně brání některým enzymům dostat se na reaktivní místa , ale tím jen mírně klesne rychlost rozkladu a bílkovina je dále biologicky rozložitelná.

1.5.2 Sít'ovaná želatina

V pracích [17, 20] se autoři zabývali výzkumem sít'ování želatiny pomocí 1,2:3,4-diepoxybutanu (DEB) a 1,2:7,8-diepoxyoktanu (DEO). Zkoumali rozpustnost různě sít'ovaných vzorků a došli k závěru , že je-li vzorek více zesít'ován , tedy je-li jeho struktura sítě více propojena , tím méně nebo alespoň pomaleji se vzorek rozpouští. Jako rozpouštědlo byla zvolena voda a poté fosfátový pufr o pH = 8,2 a teplota rozpouštění 50 °C. Z počátku se vzorek sít'ovaný pomocí DEO rozpouštěl rychleji , než vzorek s DEB , ale po cca 180 minutách se jejich rozpustnosti vyrovnaly.

Byly zkoumány vzorky fólie želatiny síťované pomocí DEB a DEO. Jejich rozklad probíhal v půdě ; všechny se kompletně rozložily za 6 dní [17]. Dále byl zkoumán rozklad síťované želatiny v říční a jezerní vodě ; kompletně se rozložila za 4 – 6 dnů. Z toho plyne, že takto síťovaná želatina je rozložitelná jak v anaerobním vodním prostředí , tak půdním.

1.5.3 Síťovaný hydrolyzát kolagenu

Hykol je technický hydrolyzát připravený z kožedělného odpadu a je využitelný v technické praxi. Je levný , biologicky snadno rozložitelný a působí dobře ve směsích s jinými biodegradabilními polymery a některými plasty. Hykol lze síťovat již výše uvedenými činidly , jako je DEB , DEO a další epoxysloučeninami i organickými aldehydy.

Autoři [11] se zabývali síťováním Hykolu E epoxycyklohexanem. Připravili vzorky síťované 1, 2, 5 a 10 hmotnostních % síťovadla. Čím více síťovadla vzorek Hykolu obsahoval, tím více byla jeho prostorová síť provázána (testoval se biologický rozpad pomocí TOC , FTIR , UV – VIS a fixační indexy). S rostoucím provázáním sítě pak klesala rozpustnost vzorku a jeho rychlost biodegradace.

Přídavek Hykolu je vhodný jako plnivo do směsi s jinými polymery , které se v přírodě špatně rozkládají. Například PVA plněný Hykolem je v mnoha technologiích velmi úspěšně používán jako fólie v zemědělství , secí pásy a mulčovací fólie.

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce byla příprava síťovaného bílkovinného hydrolyzátu vybranými epoxidy a stanovení chemicko-fyzikálních vlastností těchto vzorků včetně míry biologické rozložitelnosti za anaerobních podmínek pomocí anaerobního kalu z aktivační čistírny odpadních vod.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité materiály a chemikálie

3.1.1 Chemikálie

Použité chemikálie byly distribuovány, popř. i vyrobeny firmou Lachema a.s., Brno.

KH_2PO_4	-	dihydrogenfosforečnan draselný
K_2HPO_4	-	hydrogenfosforečnan draselný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	-	dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	síran amonný
CaCl_2	-	chlorid vápenatý
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	trihydrát 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
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	trihydrát octanu sodného
H_3BO_3	-	kyselina boritá
$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$	-	1,2:3,4 – diepoxybutan ; $M = 86 \text{ g/mol}$
$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}_6$	-	1,2:7,8 – diepoxyoktan ; $M = 142 \text{ g/mol}$
Kolagenový hydrolyzát	-	Hykol E , výrobce Kortan, Hrádek nad Nisou, ČR
SnCl_2	-	chlorid cínatý
$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	triketo-hydrindenhydrát (ninhydrin)
$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_2\text{N}$	-	kyselina α -aminoizokapronová (L-leucin), fy Merk
CH_3COOH	-	kyselina octová
NaOH	-	hydroxid sodný
KOH	-	hydroxid draselný
HCl	-	kyselina chlorovodíková
KHCO_3	-	hydrogenuhličitan draselný
$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	-	ethylalkohol
$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$	-	glycin

Ninhydrinové činidlo - 0,4 ninhydrinu se rozpustí ve 30 ml ethanolu, přidá se 10 ml acetátového pufru (115,5 ml 1 M – CH_3COOH + 100 ml 1 M – NaOH) o pH = 5,5 a 18 mg SnCl_2 .

3.1.2 Biologický materiál

Pro testování byl použit kal z anaerobní stabilizace aktivovaného kalu z čistírny odpadních vod v Malenovicích.

3.1.3 Minerální médium

Minerální médium bylo připraveno dle interního předpisu ÚITŽP, vycházejícího z norem ASTM D 5210-91 a ISO 11734 pro testování biodegradability za anaerobních podmínek z následujících zásobních roztoků a doplněno destilovanou vodou na objem 1 litr:

- 40 ml fosfátového pufru: (8,5 g/l KH_2PO_4
21,75 g/l K_2HPO_4
44,7 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- 50 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10,0 g/l)
- 1 ml CaCl_2 (27,5 g/l)
- 1 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,25 g/l)
- 1 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (22,5 g/l)
- 1 ml roztoku stopových prvků: (0,75 g/l H_3BO_3
3 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,5 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
0,05 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
0,1813 g/l $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,05 g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.1.4 Testované vzorky

HYKOL E – (bílkovinný hydrolyzát) v hmotnostním složení:

48,4 % C $\pm$ 0,1 %

6,6 % H $\pm$ 0,1 %

14,1 % N $\pm$ 0,1 %

0,9 % S $\pm$ 0,1 %

30,0 % O (dopočteno)

Sítované vzorky byly připraveny z roztoku bílkovinného hydrolyzátu (hykolu) v destilované vodě o sušině 43 %. Jako síťovací činidla byly použity diepoxy-1,2:3,4-butan (dále DEB) a diepoxy-1,2:7,8-oktan (dále DEO). K roztoku byla síťovadla přidána v množstvích, kdy jejich obsah činil 0,38 ; 0,76 ; 1,13 ; 2,27 ; 4,53 ; 9,06 a 18,12 hmot. % DEB a 0,55 ; 1,10 ; 1,65 ; 3,30 ; 6,60 ; 13,21 a 26,41 hmot. % DEO (počítáno na sušinu hykolu). Množství přídavku síťovadla DEO je oproti přídavku DEB 1,65 krát větší, protože je o tento násobek větší jeho molekulová hmotnost. Je totiž třeba zachovat správný molekulární poměr epoxy a aminoskupin pro síťování.

Samotné síťování probíhalo v Petriho miskách vyložených hliníkovou fólií v digestoři po dobu 1 dne při laboratorní teplotě cca 25 °C a poté se další 2-3 dny sušil již vysítovaný vzorek v sušárně při 80 °C. Následně byl rozetřen ve třecí misce na jemný prášek.

3.2 *Přístroje a 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 – THERMO SPECTRONIC

Chlazená centrifuga MR23i , Jouan , Francie

FT-IR spektrometr Svatar 320 , software Omnic 5.1.b; jednorázové ZnSe ATR „Miracle“
s přítlačkou

Ubbelohdeho viskozimetr , TS č.11130 - typ U1 , Sklářny Kavalier , Držkov , ČR

Běžné laboratorní sklo a vybavení

3.3 *Metody stanovení*

3.3.1 Stanovení volných aminoskupin a COOH skupin [24 , 31]

3.3.1.1 Stanovení NH₂ skupin ninhydrinovou metodou

Látky s volnou aminoskupinou poskytují s ninhydrinem modře až fialově zbarvené kondenzační produkty různého odstínu i intenzity dle typu a koncentrace těchto aminoskupin. Intenzita zbarvení se stanoví spektrofotometricky.

Aminokyseliny s volnou aminoskupinou poskytují s ninhydrinem kondenzační produkty s modrofialovým zbarvením různého odstínu , dle intenzity volných -NH₂ skupin. Výjimkou jsou prolin a hydroxyprolin , které poskytují s ninhydrinem žluté zbarvení. Absorbance byla u vzorků měřena při 570 nm , konc. vzorku byla použita 1000 mg/l a jako standard byl použit L-leucin [16].

3.3.1.2 Stanovení NH_2 skupin a COOH skupin potenciometrickou metodou

Jako měřicí přístroj byla použita kombinovaná kalomelová elektroda pro měření pH, pH-metr a magnetická míchačka. Ve vyhodnocení pak byla použita závislost změny pH na přídávku titračního činidla.

Protože u aminokyselin podléhá aminoskupina i karboxylová skupina vzájemné interakci vzniku soli $-\text{NH}_3^+ \sim \text{COO}^-$, dochází proto v bodě ekvivalence k vytitrování této asociační vazby soli, nikoliv však kyselého vodíku z $-\text{COO}^-$ nebo zásadité $-\text{NH}_2$ skupiny. Příznivé je provádět titrace v prostředí se zvýšenou solností (iontovou silou), kdy se zvýší disociační konstanty a titrační přechody jsou poněkud ostřejší.

3.3.2 Stanovení organického uhlíku [29]

Celkový organický uhlík (TOC) v roztocích analyzovaných vzorků byl stanoven pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu, model TOC-5000 A z rozdílu hodnot TC a IC.

Princip stanovení TC spočívá v oxidaci veškerého uhlíku ve vzorku ve spalovací trubici při $670\text{ }^\circ\text{C}$ s oxidem kobaltnato-kobaltitým v proudu kyslíku. Vzniklý CO_2 je veden do IČ detektoru, kde je signál vzniklý absorpcí příslušné vlnové délky registrován jako pík a je úměrný koncentraci TC vzorku.

Při stanovení IC je vzorek nastříknut v proudu kyslíku na inertní nosič s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění CO_2 . Analytická koncovka je shodná, jako u stanovení TC.

3.3.3 Stanovení anaerobního rozkladu [29]

Anaerobní kal byl nejprve odstředěn po dobu 12 minut při 3000 G a poté pomocí minerálního media ředěn na požadovaný obsah sušiny 3 g/l a pro zajištění anaerobního prostředí byl kal probubláván dusíkem , čímž se zajistilo „vystripování“ veškerého O₂. Do baňek bylo dávkováno 100 ml takto připraveného kalu a roztok testovacího vzorku odpovídající koncentraci 20 mg TOC na baňku. Poté byly baňky připojeny k přístroji. Po celou dobu pokusu byla udržována konstantní teplota 35 °C a rychlost míchání 250 ot/min.

Jako modelová látka pro ověření aktivity použitého inokula a správné činnosti přístroje byl použit snadno rozložitelný octan sodný (dále AcNa). Celkový objem kapalné fáze (anaerobní kal o dané sušině + vzorek) byl 112 ml. Vzorky včetně AcNa byly dákovány tak , aby jejich obsah organického uhlíku (dále TOC) byl v testované baňce cca 20 mg. TOC byl měřen na analyzátoru uhlíku Shimadzu , model TOC – 5000 A [28].

Plynné produkty vznikající při anaerobním rozkladu testovaných vzorků byly analyzovány pomocí přístroje Micro-Oxymax fy Columbus. Množství vyprodukovaných plynů (CO₂ a CH₄) bylo stanovováno na základě IČ absorpce v příslušných vlnových délkách oblasti IČ.

Přístroj je schopen vyhodnotit množství sledovaných plynných produktů vznikajících při rozkladu za anaerobních podmínek. Plynný obsah baňky je periodicky cirkulována přes chladič a sušící věž do IČ analytických senzorů , kde je stanovena jejich koncentrace. Naměřená data jsou převedena do počítače , kde jsou dále zpracována a archivována.

3.3.4 Příprava vzorků a měření IČ spekter [30 - 31]

Nezastupitelná je správná příprava vzorku a volba techniky (typ tablety , typ hranolu) tak , aby podíl pohlcené energie v pozorovaných oblastech spektra byl optimální (ani příliš nízký, ani příliš vysoký) , event. pro různé oblasti spektra nutno měřit jinými technikami. Dlouhé měření snižuje šum , ale projevují se driftы přístroje či vzorků. V některých případech může být optimální doba měření 1 - 2 minuty , záleží na kvalitě a stabilitě přístroje , prostředí a stabilitě vzorku. Rozhodující je tedy volba ATR hranolů či vhodné složení tablety.

Fólie připravené síťováním kolagenového hydrolyzátu příslušným epoxidem byly rozdrceny v achátové misce na jemný prášek a uchovávány v exikátoru nad silikagelem při laboratorní teplotě.

Při vlastním měření byl vzorek nanesen na ATR krystal , ke kterému byl na ploše cca 16 mm^2 přitlačován silou cca 40 N tak , aby bylo docíleno maximálního kontaktu vzorku s krystalem. Spektra pozadí byla snímána 32 skeny , spektra vzorků 64 skeny vše při rozlišení 4 cm^{-1} .

Za účelem získání spekter s co nejméně odlišnými driftы přístroje a prostředí byla spektra měřena v sérii: pozadí_i , vzorek_i , pozadí_{i+1} , vzorek_{i+1} , pozadí_{i+2} ; ke každému vzorku bylo vypočteno jeho průměrné pozadí. Odečtením spektra tohoto průměrného pozadí byly získány spektra samotných vzorků minimálně ovlivněné driftы.

Řada měření byla potom nezávisle opakována , aby bylo možno zjistit rozptyly či systematické posuny při opakování měření. Podle jemnosti mletí , přítlaku či stupně pokrytí hranolu ATR se naměřené absorbance poněkud liší, proto je třeba normalizace spektra na jednotkovou plochu , pochopitelně při obvyklém výnosu absorbance jako funkce vlnočtu.

3.3.5 Stanovení viskozity

Viskozita byla měřena na Ubbelohdeho výtokovém viskozimetru (typ U1) při konstantní teplotě 25 °C. Roztok bílkovinného hydrolyzátu byl měřen jak ve fosfátovém pufru, tak ve vodném prostředí. Fosfátový pufr byl používán pro stabilizaci pH a solnosti i při nízkých koncentracích roztoků. Principem bylo měření průtokové doby jednotlivých vzorků při různé hmotnostní koncentraci, solnosti a pH.

Byly měřeny výtokové doby roztoků síťovaných vzorků (koncentrace 1,25 - 20 g/l) a jejich průměrné hodnoty pak byly přepočteny na specifickou viskozitu a limitní viskozitní číslo. Molekulovou hmotnost vzorků nebylo možné určit, protože nám nejsou známy konstanty pro Mark-Houwinkovu rovnici.

3.3.6 Stanovení rozpustnosti pomocí TOC [29]

Rozpustnost vzorků byla stanovována pomocí TOC v roztoku v časových intervalech 10; 30; 60; 90 minut, kdy bylo odebráno vždy 10 ml roztoku k analýze TOC. Výsledná teoretická koncentrace roztoku vzorku mohla být maximálně 5000 mg/l (při úplném rozpuštění dávkovaného vzorku).

3.3.7 Stanovení sušiny anaerobního kalu [29]

10 ml suspenze anaerobního kalu bylo vakuově zfiltrováno přes vysušený filtrační papír červené pásky. Filtrační koláč byl sušen při 105 °C do konstantní hmotnosti a po vychladnutí v exikátoru zváženo. Koncentrace sušiny byla vyjádřena v g/l.

3.4 Zpracování výsledků

3.4.1 Stupeň anaerobního rozkladu [29]

Celková hmotnost metabolizovaného uhlíku daného vzorku odpovídá po odečtení slepého pokusu množství anorganického uhlíku ve vodné fázi a množství uhlíku v daném objemu vytvořeného bioplynu. Rozsah celkové biodegradace je dán vztahem:

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

D_t – celková biodegradace vzorku [%]

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

m_v – organický uhlík v testovaném vzorku [mg]

3.4.2 Fixační index (FI) [16]

Fixační index je označován , jako podíl aminoskupin zreagovaných při síťování s epoxidem. Slouží obecně k vyjádření síťování a výpočtu procent zbylých volných aminoskupin v látce. Vyšší FI značí nižší počet volných aminoskupin zbylých ve vysíťovaném vzorku a tedy i vyšší stupeň zesíťování. Fixační index je definován vztahem:

$$FI = \frac{NH_2 (\alpha) - NH_2 (\omega)}{NH_2 (\alpha)} * 100 \quad [\%]$$

FI – fixační index (počet volných aminoskupin po zesíťování , stupeň zesíťování) [%]

α – vzorek před síťováním [mmol / l]

ω - vzorek po síťování [mmol / l]

Do zkumavek se odpipetuje 1 ml vzorku (koncentrace vzorku 1000 mg/l) a 0,5 ml ninhydrinového činidla. Zkumavky byly vloženy na 15 minut do vroucí vodní lázně a poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Jejich obsah se zředí 50 %ním ethanolem do 5 ml. Změří se absorbance při 570 nm. V případě silné intenzity zabarvení je nutné vzorek ředit. Intenzita modrého zbarvení se porovnává s kalibrační křivkou L-leucinu.

3.4.3 FTIR spektra [28]

Spektra byla vyjádřena a dále zpracována v obvyklém formátu absorbance jako funkce vlnočtu. V případech , kde bylo vhodné zjednodušení pro porovnání vzorků , byla spektra normalizována (součet absorbancí přes celé spektrum byl jednotkový).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V této části diplomové práce jsou soustředěny výsledky pokusů , které jsou rozděleny na dvě části.

První část se zabývá sledováním chemických a fyzikálních vlastností bílkovinného hydrolyzátu a vzorků síťovaných vybranými epoxidy (DEB a DEO). Nejprve bylo nutno stanovit vhodné podmínky pro síťování , jako je především pH , teplota , doba a množství dávkovaného epoxidu. Dále bylo třeba u zesíťovaných vzorků stanovit jejich fixační indexy a rozpustnost ve vodě.

Druhá část se zabývá ověřením stupně zesíťení u vzorků určených k anaerobnímu rozkladu vyhodnocením měřením viskozit roztoků síťovaných vzorků a jejich IČ spekter získaných spektrální analýzou prášků vysušených vzorků technikou ATR (FTIR).

Třetí část se zabývá sledováním průběhu anaerobního rozkladu vzorků bílkovinného hydrolyzátu síťovaného vybranými epoxidy a měřením produkce bioplynu. Z měření rozpuštěného anorganického i organického uhlíku na začátku a na konci pokusu byla provedena kontrolní bilance uhlíku.

4.1 Stanovení chemických a fyzikálních vlastností Hykolu a množství volných $-COOH$ a $-NH_2$ skupin

Před zkoumáním biodegradability epoxidy síťovaných vzorků bílkovinného hydrolyzátu, bylo nejprve třeba zjistit co nejvíce chemických a fyzikálních vlastností čistého Hykolu. Proto byl připraven zásobní roztok, který byl pro další testy a analýzy dále ředěn nebo použit pro síťování.

U tohoto zásobního roztoku byly stanoveny tyto vlastnosti:

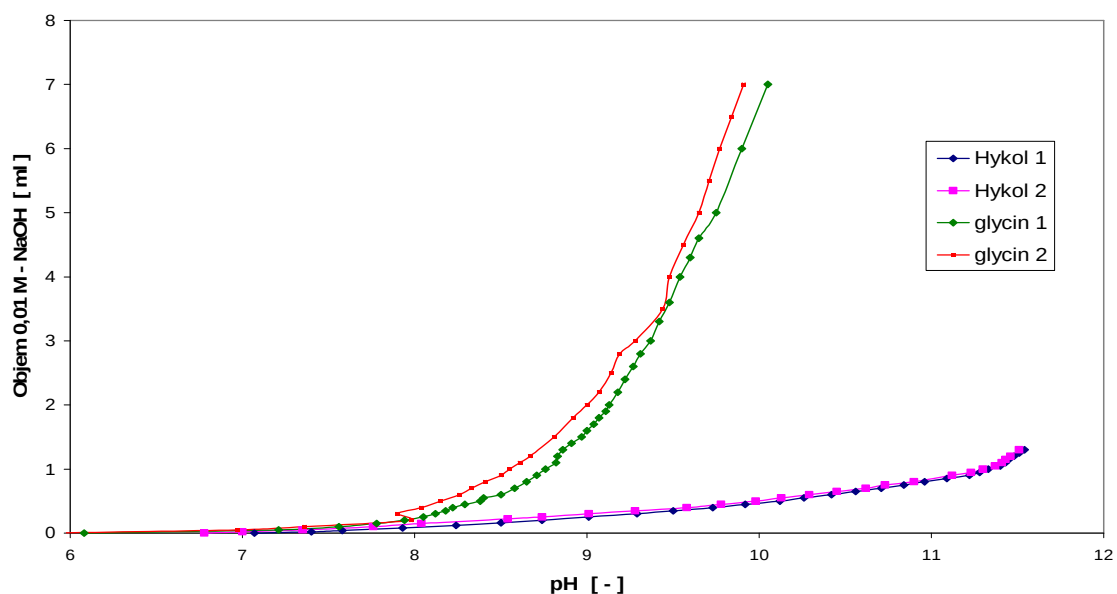
Sušina při 105 °C 42,59 %, hustota = 1,1564 g/cm³, pH = 7,08 a molekulová hmotnost Hykolu podle výrobce je cca 10 000 g/mol. Mísitelnost tohoto zásobního roztoku s vodou je neomezená.

Při síťování mohou s epoxidy polykondenzačně reagovat především volné $-NH_2$, $-COOH$, $-OH$ skupiny na řetězci bílkoviny. Proto je třeba stanovit jejich množství a nastavit pro síťování příznivé podmínky.

Jelikož je Hykol bílkovina se silnou pufrací schopností, není možné stanovit její obsah $-NH_2$, $-COOH$ za klasických analytických podmínek, tedy titračně na fenolftalein s minimálním množstvím vzorku (cca 100 mg) za působení titračního činidla o koncentraci cca 0,01 M. Ve zředěném prostředí vznikla velmi plochá titrační křivka neumožňující určit bod ekvivalence.

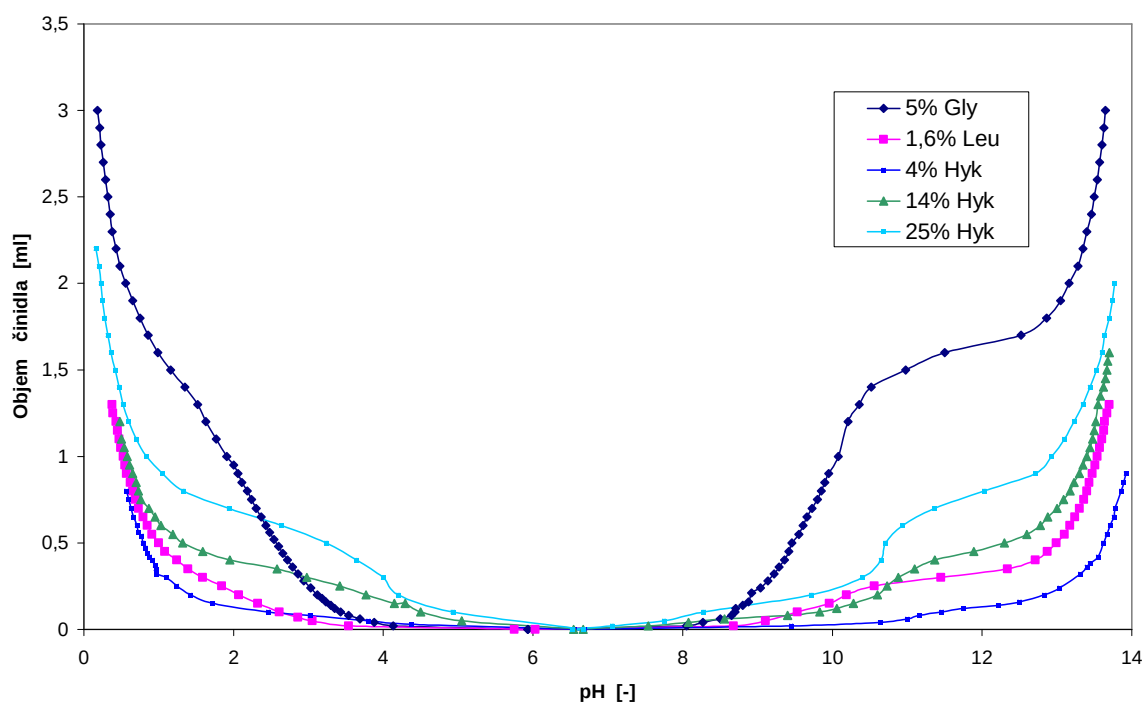
To bylo způsobeno pufrací schopností aminokyselin a tím, že mimo extrémní pH interagují $-NH_2$ a $-COOH$ za vzniku soli $-NH_3^+ \sim COO^-$. Proto musela být analýza potenciometrickou titrací provedena v koncentrovaném prostředí vzorku i činidla. Jako modelová látka pro porovnání správnosti metody byl použit glycin [24].

Obr.2: Titrace Hykolu [24]



Jako příklady titrace v koncentrovanějším prostředí jsou uvedeny titrace 5 % roztoku glycinu a 1,6 % L-leucinu (koncentrovanější L-leucin nebylo možné připravit). Byly též titrovány roztoky Hykolu o koncentracích 4 ; 14 ; 25 hmot. %. Jako titrační činidla byly použity roztoky 5,93 M – KOH a 6,26 M – HCl.

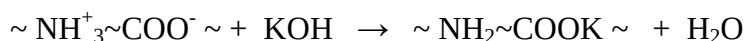
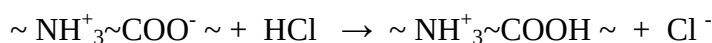
Obr.3: Titrace Hykolu, glycinu a L-leucinu



U aminokyselin podléhá aminoskupina i karboxylová skupina vzájemné interakci za snadné tvorby soli $\sim\text{NH}_3^+\sim\text{COO}^-$ s iontovou vazbou. V bodě ekvivalence při titraci aminokyselin dochází k vytitrování této asociační vazby, nikoliv však jednoduše kyselého vodíku z $\sim\text{COOH}$ nebo zásadité $\sim\text{NH}_2$ skupiny, jako u samotné kyseliny či aminu. Použijeme-li tedy jako titrační činidlo silnou kyselinu, stanovujeme tím vlastně množství $\sim\text{COOH}$ skupin ve vzorku a obdobně; použijeme-li jako titrační činidlo silnou zásadu, stanovujeme množství $\sim\text{NH}_2$ skupin. Podobná situace nastane, titrujeme-li např. hydroxidem sodným octan amonný, kdy dochází k uvolnění amoniaku hydroxidem.

U referenční látky glycinu je teoretický obsah skupin $\sim\text{COOH}$ 59,96 hm. %; mnou titračně stanoveno bylo 62,68 hm. %, což ověřilo použitelnost metody. U glycinu pak byly z grafu odečteny hodnoty pK_A , které odpovídají tabelovaným: $\text{pK}_A = 2,34$; $\text{pK}_B = 9,60$. Pro Hykol byly stanoveny hodnoty: $\text{pK}_A = 2,20$; $\text{pK}_B = 10,60$. Titrace polyelektrolytu je výraznější při zvýšené solnosti indiferentního elektrolytu (např. KCl) a dává vyšší hodnoty pK_A a pK_B .

Při titraci Hykolu s HCl nebo KOH pak dochází k reakcím:



Např. pro titraci 15 ml 25 % roztoku hykolu o hustotě $1,1 \text{ g/cm}^3$ byla spotřeba 6,26 M – HCl 0,75 ml.

- Z toho byl vypočten počet molů v bodě ekvivalence:

$$n_{\text{COOH}} = n_{\text{HCl}} = V_{\text{HCl}} * c_{\text{HCl}} = 0,75 * 6,26 = 4,70 \text{ mmol } \sim\text{COOH}$$

- Z množství molů $\sim\text{COOH}$ v bodě ekvivalence byla vypočtena koncentrace $\sim\text{COOH}$ na 1 gram Hykolu:

$$n_{\text{COOH/hyk}} = \frac{n_{\text{COOH}} * 100 \%}{V_{\text{Hykol}} * w_{\text{Hykol}} * \rho_{\text{rozt.}}} = \frac{4,70 * 100 \%}{15 * 25 * 1,1} = 1,14 \text{ mmol } \sim\text{COOH} / \text{g sušiny Hyk}$$

- Z množství molů $-\text{COOH}$ v sušině Hykolu byla vypočtena ekvivalentová molekulová váha na 1 mol $-\text{COOH}$ v Hykolu:

$$M_{\text{EKV. COOH}} = \frac{m_{\text{suš.hyk}}}{n_{\text{COOH}}} = \frac{1 \text{ g Hykolu}}{0,00114} = 726 \text{ g suš. Hyk / mol } -\text{COOH}$$

- Z výše uvedené rovnice plyne , že 1 mol $-\text{COOH}$ je obsažen v 726 g sušiny Hykolu.
Platí:

$$\% -\text{COOH} = \frac{m_{\text{COOH}} * 100 \%}{m_{\text{EKV. COOH}}} = \frac{45 * 100 \%}{726} = 5,12 \% \text{ COOH v Hykolu}$$

Obdobně bylo vypočteno množství $\% -\text{NH}_2$, kdy pro titraci 15 ml 25 % roztoku hykolu o hustotě $1,1 \text{ g/cm}^3$ byla spotřeba 5,93 M $-\text{KOH}$ byla 0,75 ml.

- Z toho byl vypočten počet molů $-\text{NH}_2$ v bodě ekvivalence:

$$n_{\text{NH}_2} = n_{\text{HCl}} = V_{\text{HCl}} * c_{\text{HCl}} = 0,75 * 5,93 = 4,45 \text{ mmol } -\text{NH}_2$$

- Z množství molů $-\text{NH}_2$ v bodě ekvivalence plyne koncentrace $-\text{NH}_2$ na 1 gram Hykolu:

$$n_{\text{NH}_2 / \text{hyk}} = \frac{n_{\text{COOH}} * 100 \%}{V_{\text{Hykol}} * w_{\text{Hykol}} * \rho_{\text{rozt.}}} = \frac{4,45 * 100 \%}{15 * 25 * 1,1} = 1,08 \text{ mmol } -\text{NH}_2 / \text{g sušiny Hyk}$$

- Z množství molů $-\text{NH}_2$ v sušině Hykolu byla vypočtena ekvivalentová molekulová váha $-\text{NH}_2$ v Hykolu:

$$M_{\text{EKV. NH}_2} = \frac{m_{\text{suš.hyk}}}{n_{\text{NH}_2}} = \frac{1 \text{ g Hykolu}}{0,00108} = 930 \text{ g suš. Hyk / mol } -\text{NH}_2$$

- Z níže uvedené rovnice plyne , že 1 mol $-\text{NH}_2$ je obsažen v 930 g sušiny Hykolu.
Potom:

$$\% -\text{NH}_2 = \frac{m_{\text{NH}_2} * 100 \%}{m_{\text{EKV. NH}_2}} = \frac{45 * 100 \%}{930} = 4,84 \% -\text{NH}_2 \text{ v Hykolu}$$

Izoelektrický bod Hykolu a všech použitých aminokyselin se pohyboval v okolí bodu $\text{pH} = 6,5$. V Hykolu bylo titračně stanoveno 5,12 hm. % $-\text{COOH}$ a 4,84 hm. % $-\text{NH}_2$.

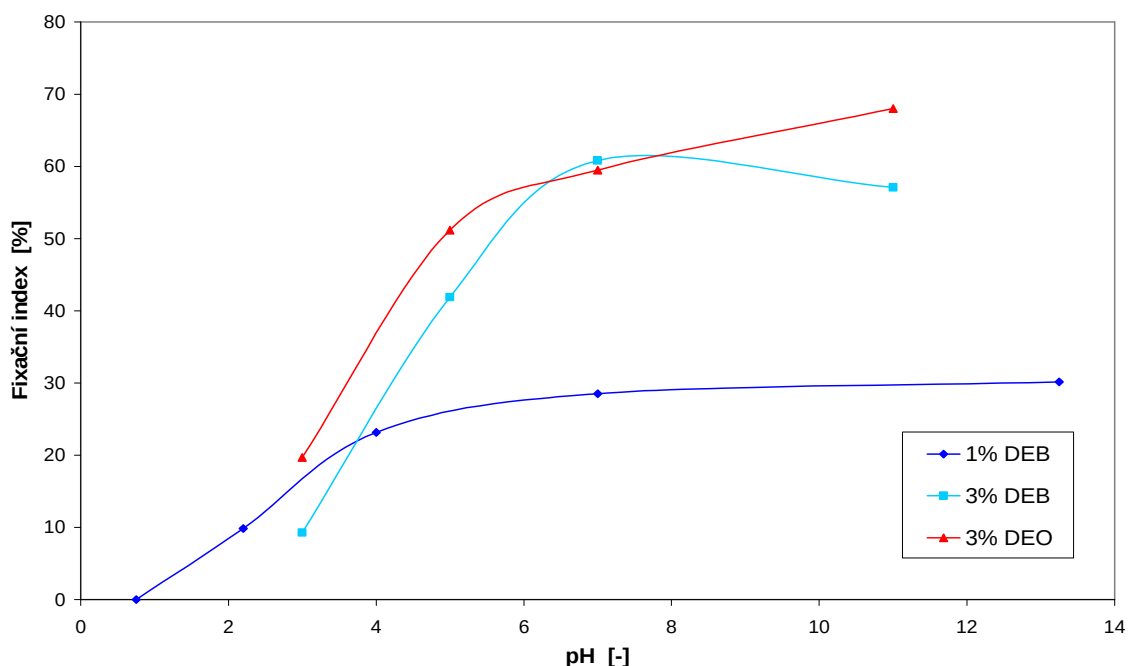
Byly vypočteny ekvivalentové molekulové hmotnosti na $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$ skupiny u Hykolu, které jsou 726 g/mol $-\text{COOH}$ a 930 g/mol $-\text{NH}_2$.

4.2 Navržení vhodných podmínek pro síťování a příprava vzorků

Z výsledků titračních stanovení vyplývá, že hodnoty pK Hykolu jsou $\text{pK}_\text{A} = 2,2$ a $\text{pK}_\text{B} = 10,6$. V těchto bodech jsou kyselé či zásadité skupiny bílkovinného hydrolyzátu neutralizovány právě z poloviny a proto je v těchto bodech dosaženo již prakticky maximální koncentrace reaktivních skupin (síťování by mělo s epoxidy probíhat prakticky maximální rychlostí).

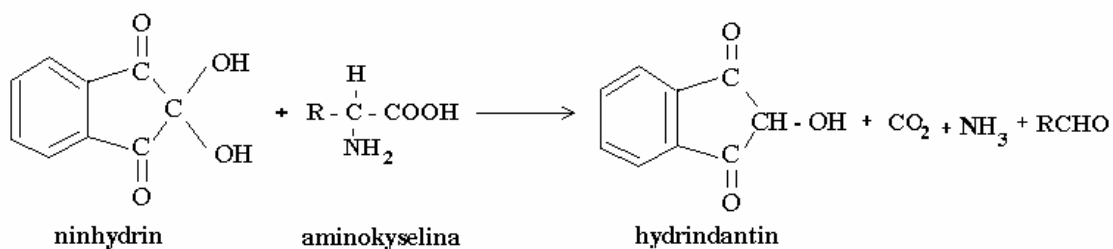
Byly síťovány vzorky Hykolu s přídavkem 1,13 hm. % a 2,27 hm. % DEB (1,2:3,4-diepoxybutan) a 3,30 hm. % DEO (1,2:7,8-diepoxyoktan) vztaženo na sušinu Hykolu při různých hodnotách pH a u těchto vzorků byly následně stanoveny fixační indexy ninhydrinovou metodou.

Obr.4: Vliv pH prostředí na stupeň zreagování $-\text{NH}_2$ skupin Hykolu s epoxidy

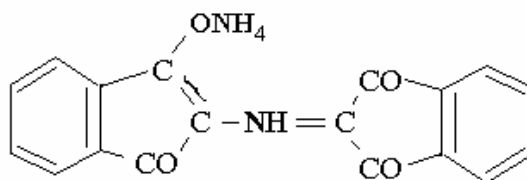


Z grafu jasně vyplývá , že v kyselém prostředí je síťování NH_2 skupin inhibováno, popř. při nízkých hodnotách pH může dojít i k rozkladu epoxidu hydrolýzou. Při $\text{pH} = 7$ a vyšším je již fixační index stabilní a proto bylo zvoleno pH prostředí pro síťování vzorků 9,0 ; kdy dochází k vysoké konverzi aminoskupin a vzorky nejsou zatěžovány extrémně zásaditým prostředím. Navíc vysoké pH potlačuje možné navázání epoxidu na $-\text{COOH}$ skupiny. Při $\text{pH} = 9$ reagují s epoxidem prakticky pouze $-\text{NH}_2$ skupiny. Nezařegované NH_2 skupiny se pak stanoví ninhydrinovou metodou (fixační index).

Při stanovení fixačního indexu mohou stanovení rušit volné amonné ionty vyskytující se ve vzorku např. již z výroby Hykolu. Příčina rušivého vlivu amonných iontů je zřejmá z následující rovnice popisující mechanismus reakce , při níž ninhydrin reaguje s volnou aminokyselinou:



Vzniklý amoniak poté reaguje s redukčním produktem ninhydrinu (hydrindantinem) a další molekulou ninhydrinu na modrofialové barvivo diketohydrindilidendiketonhydridamin [30].



Pro síťování připravených vzorků Hykolu byly stanoveny tyto podmínky a postup síťování:

Zásobní roztok Hykolu (42,6 % suš.) byl upraven cca 6 M – KOH na pH = 9,0 a k tomuto roztoku bílkovinného hydrolyzátu bylo přidáno množství síťovadla dle níže uvedené tabulky.

Tab.1: Množství přídavku síťovadla vyjádřené v hmotnostních % na sušinu Hykolu

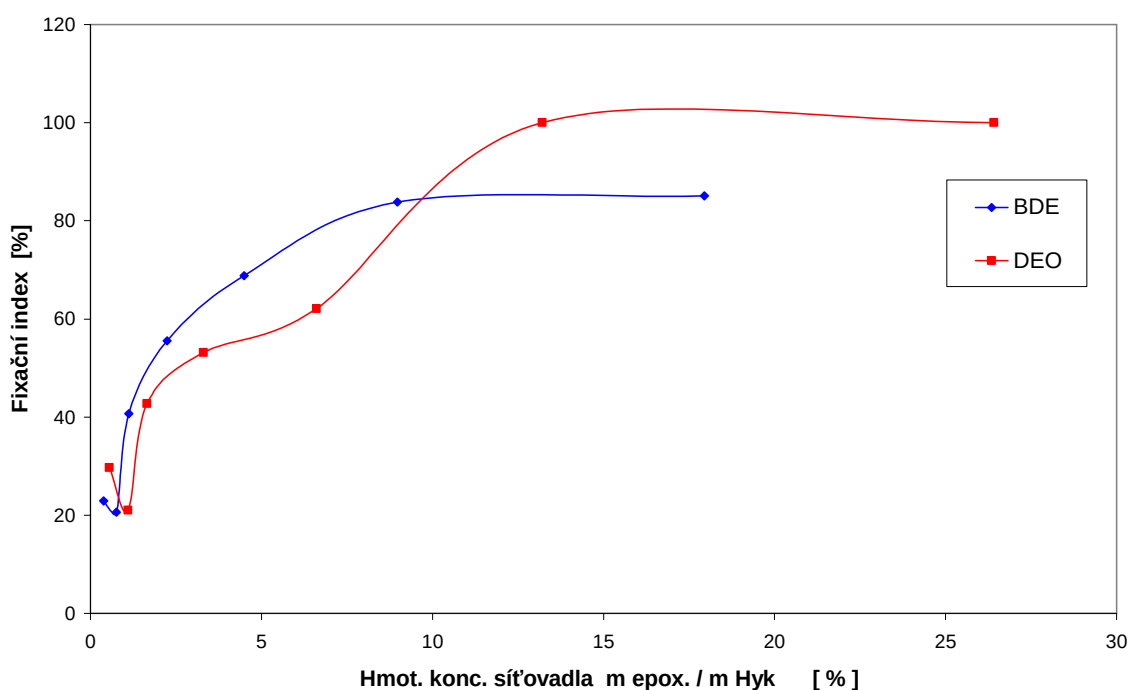
DEB [hm. % / suš.Hyk.]	0,38	0,76	1,13	2,24	4,53	9,06	18,12
DEO [hm. % / suš.Hyk.]*	0,55	1,10	1,65	3,30	6,60	13,21	26,41

*) přídavek DEO je větší ~ $M(\text{DEB}) = 86 \text{ g/mol}$; $M(\text{DEO}) = 142 \text{ g/mol}$

Směs byla po zamíchání ponechána v Petriho miskách vyložených hliníkovou fólií v digestoři po dobu 1 dne při laboratorní teplotě cca 25 °C a poté se další 2 - 3 dny sušil již vysíťovaný vzorek v sušárně při 80 °C. Následně byl rozetřen ve třecí misce na jemný prášek.

U takto zesíťovaných vzorků byl stanoven jejich fixační index ninhydrinovou metodou stanovením obsahu volných (dosud nezreagovaných) aminoskupin.

Obr.5: Závislost fixačního indexu (konverze –NH₂ skupin) na přídavku DEB a DEO



Z grafu znázorňující síťování vzorků vyplývá, že s rostoucím množstvím epoxidu ve směsi roste fixační index. U vzorků síťovaných DEB nastává maximum (100 %) konverze -NH₂ skupin při cca 9 hm. % DEB. U vzorků síťovaných DEO nastává 100 % konverze -NH₂ skupin při cca 13 hm. % DEO. Podle níže uvedených výpočtů založených na ekvivalentních hmotnostech epoxidů a hykolu (pro -NH₂ skupiny) by však mohla 100 % konverze u vzorků síťovaných DEB nastat již při 4,0 hm. % a u vzorků síťovaných DEO by měla být 100 % konverze -NH₂ skupin při 6,6 hm. % DEO.

U vzorků s přídavkem 13,21% DEO a 26,41% DEO nebylo možné ninhydrinovou metodou určit jejich fixační indexy, protože nebyly plně rozpustné ani po silném zředění. Lze u nich předpokládat 100 % konverzi -NH₂ skupin.

- **Hmotnostní procenta** množství síťovadla (epoxidu) byla vypočtena ze vztahu:

$$W_{E/NH_2} = \frac{m_{\text{epox}}}{m_{\text{Hykol-suš.}}} \cdot 100\%$$

- **Molární procenta** množství síťovadla na -NH₂ skupin byla vypočtena ze vztahu:

$$X_{E/NH_2} = \frac{m_{\text{epox.}} / M_{\text{EKV-epox}}}{m_{\text{Hykol-suš.}} / M_{\text{EKV-Hykol}}} \cdot 100\%$$

Ekvivalentová molekulová hmotnost epoxidů ... $M_{\text{EKV-epox}} = \frac{1}{2} M_{\text{epox.}}$, protože jde o dvoufunkční epoxidy.

- **100 %ní konverze** -NH₂ skupin může teoreticky nastat při hm. zlomku epoxidu:

$$W_{\text{teoret. DEB / Hykol NH}_2} = \frac{M_{\text{EKV-DEB}}}{M_{\text{EKV-Hykol}}} \cdot 100\% = \frac{43}{1075} \cdot 100\% = 4,00 \text{ hm. \% pro DEB}$$

$$W_{\text{teoret. DEO / Hykol NH}_2} = \frac{M_{\text{EKV-DEO}}}{M_{\text{EKV-Hykol}}} \cdot 100\% = \frac{71}{1075} \cdot 100\% = 6,60 \text{ hm. \% pro DEO}$$

Tab.2: Hmotnostní a látkové zastoupení **DEB** (1,2:3,4-diepoxybutanu) ve vzorcích

W DEB [% _{hmot./ suš.hyk.}]	0,38	0,76	1,13	2,27	4,53	9,06	18,12
2X DEB [% _{EP molární / NH₂}]	9,4	18,9	28,3	56,6	113	227	453
FI [%]	22,9	20,6	40,7	55,6	68,8	83,8	85,1

*) jde o molární poměr reagujících epoxyskupin a aminoskupin

Tab.3: Hmotnostní a látkové zastoupení **DEO** (1,2:7,8-diepoxyoktanu) ve vzorcích

W DEO [% _{hmot./ suš.hyk.}]	0,55	1,10	1,65	3,30	6,60	13,21	26,41
2X DEO [% _{EP.molární / NH₂}]	8,3	16,3	25,0	50,0	100	200	400
FI [%]	29,7	21,0	42,7	53,2	62,1	100	100

*) jde o molární poměr reagujících epoxyskupin a aminoskupin

4.3 Stanovení kinetiky rozpouštění sířovaných vzorků Hykolu

Pro stanovení kinetiky rozpouštění vysířovaných vzorků bílkovinného hydrolyzátu byla použita ověřená metoda z předchozích diplomových prací [27 – 30]. Samotný postup spočíval v přidání 375 mg vzorku ve formě drti do kádinky se 75 ml destilované vody o teplotě 25 °C, míchané teflonovým míchadlem o velikosti 6 x 30 mm a rychlosti 200 ot/min. Výsledná maximální koncentrace roztoku tedy měla být 5000 mg/l. V časových intervalech 10; 30; 60; 90 minut bylo odebíráno vždy 10 ml vzorku k analýze TOC. Před vlastní analýzou TOC byl vzorek ještě 25x ředěn.

Nerozpouštěný podíl vzorku se před odběrem usadil u dna kádinky. Vzorky s obsahem 6,6 hm. % ; 13,2 hm. % a 26,4 hm. % DEO se rozpouštěly obtížně ; musely být proto po odebrání přefiltrovány přes filtrační papír s červenou páskou , který byl důkladně promyt vřící vodou.

Dávkování DEB a DEO je hmotnostně na množství Hykolu.

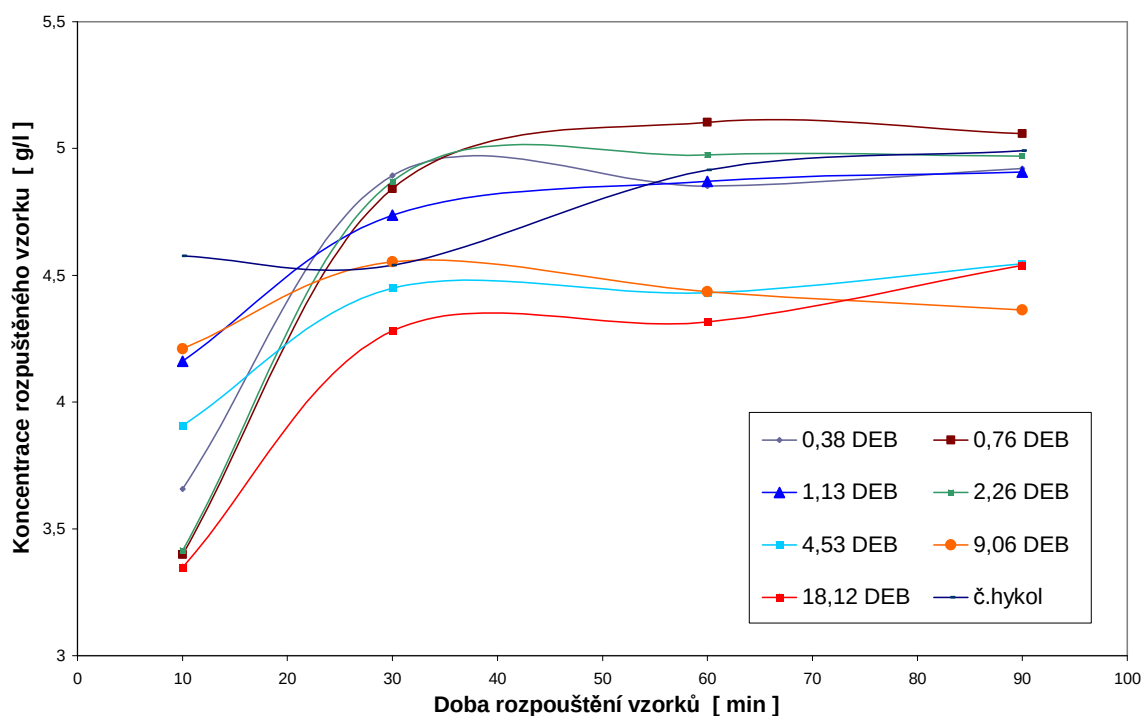
Tab.4: Kinetika rozpouštění ve vodě při 25 °C vzorků hykolu síťovaných DEB ; pH = 9,0

Čas odebrání od začátku rozpouštění [min]	Koncentrace rozpuštěného Hykolu [g / l]						
	0,38 % DEB	0,76 % DEB	1,13 % DEB	2,27 % DEB	4,35 % DEB	9,06 % DEB	18,12 % DEB
10	3,66	3,40	4,16	3,42	3,91	4,21	3,35
30	4,89	4,84	4,74	4,87	4,45	4,55	4,28
60	4,85	5,10	4,87	4,98	4,43	4,44	4,32
90	4,92	5,06	4,91	4,97	4,55	4,36	4,54

Tab.5: Kinetika rozpouštění ve vodě při 25 °C vzorků hykolu síťovaných DEO ; pH = 9,0

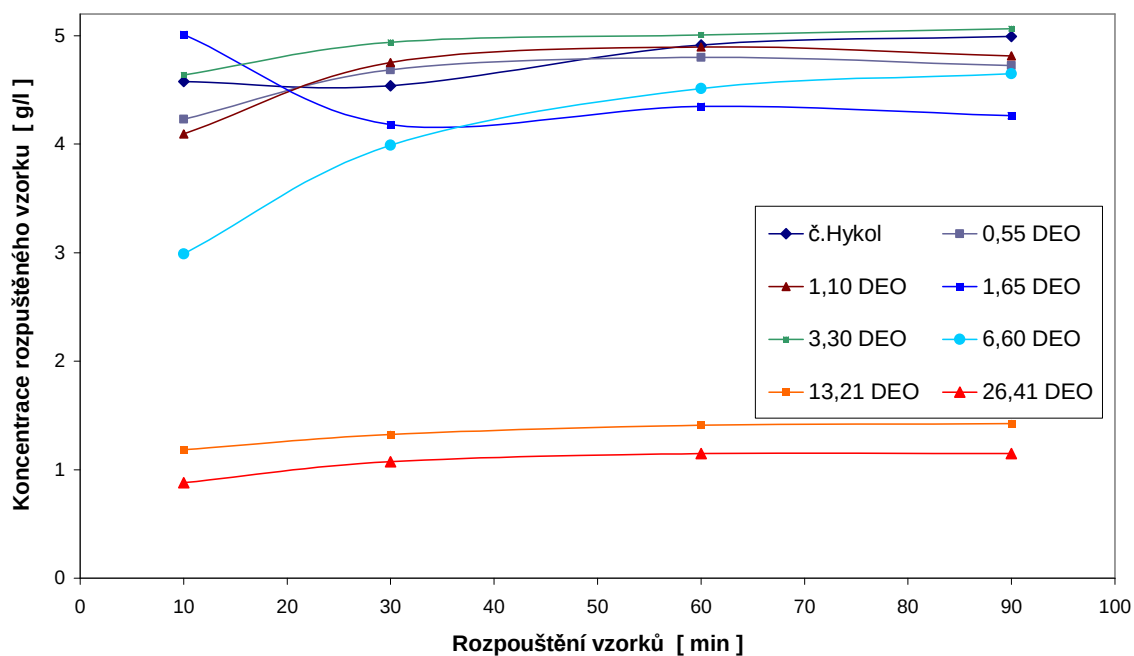
Čas odebrání od začátku rozpouštění [min]	Koncentrace rozpuštěného Hykolu [g / l]						
	0,55 % DEO	1,10 % DEO	1,65 % DEO	3,30 % DEO	6,60 % DEO	13,21 % DEO	26,41 % DEO
10	4,23	4,09	5,01	4,64	2,99	1,16	0,88
30	4,68	4,75	4,18	4,94	3,99	1,37	1,07
60	4,80	4,87	4,35	5,01	4,51	1,41	1,15
90	4,72	4,81	4,26	5,07	4,65	1,43	1,15

Obr.6: Kinetika rozpouštění ve vodě při 25 °C vzorků síťovaných pomocí DEB



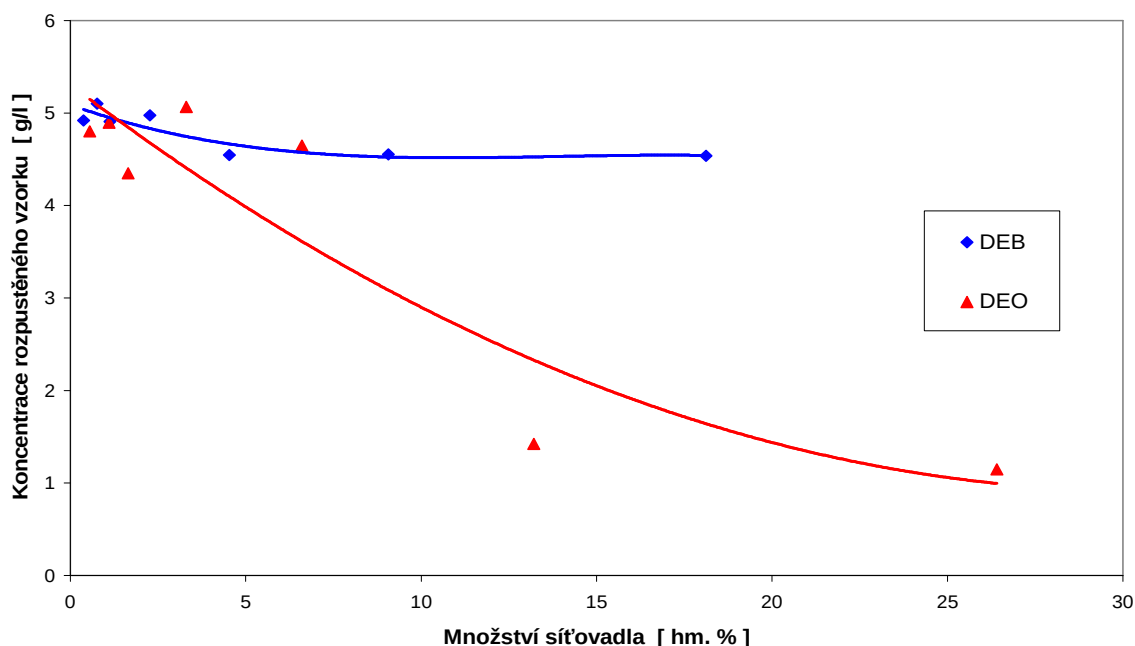
Z obr. 6 kinetiky rozpouštění vzorků Hykolu síťovaných DEB vyplývá, že oproti čistému Hykolu, který se již po 10 minutách rozpustí prakticky téměř úplně, se rychlost rozpouštění u síťovaných vzorků mírně snižuje s rostoucím množstvím epoxidu. Koncentrace roztoků málo síťovaných vzorků dosahuje možného maxima, tedy 5000 mg/l. U vzorků s obsahem 4,4 %, 9,1 % a 18,1 % DEB je maximální rozpustnost po 90 minutách okolo 4,5 g/l při rozpouštění 5 g vzorku.

Obr.7: Kinetika rozpouštění ve vodě při 25 °C vzorků síťovaných pomocí DEO



Z obr. 7 vyplývá, že vzorky síťované DEO se prakticky rozpouští již po 10 minutách, odchylka byla naměřena jen u vzorku s obsahem 6,6 % DEO. Ten se rozpouští méně a výrazně pomaleji - až po 90 minutách. Vzorky s obsahem 13,2 % a 26,4 % DEO se rozpouštějí omezeně. Vzorek s obsahem 13,2% DEO má rozpouštěný podíl po 90 minutách 1,43 g/l a vzorek s obsahem 26,4 % DEO má rozpustnost po 90ti minutách 1,15 g/l.

Obr.8: Rozpustnost síťovaných vzorků (ve vodě po 90 min.) na množství epoxidu



Koncentrace při 25 °C ve vodě rozpuštěného podílu vzorku v závislosti na procentuálním zastoupením síťovadla probíhá podobně , jako koncentrace volných -NH_2 skupin vyjádřených fixačními indexy. U vzorků síťovaných DEB zůstává prakticky zůstává prakticky úplná rozpustnost ve vodě po 90 min. při 25 °C i po přidavku 18,1 hm. % DEB. U vzorků síťovaných DEO zůstává prakticky končí prakticky úplná rozpustnost ve vodě po 90 min. při 25 °C při dávce 6,6 hm. % DEB.

4.4 Měření viskozity na Ubbelohdeho zřed'ovacím viskozimetru

Pro volbu optimálního zvolit správné prostředí , ve kterém bude viskozimetrické měření probíhat , byl otestován vliv pH a solnosti rozpouštědla na limitní viskozitní číslo. Teplota měření byla zvolena 25,0 °C a byla udržována termostatem.

Nejprve byl změřen roztok bílkovinového hydrolyzátu ve fosfátovém pufru o složení 8,5 g/l KH_2PO_4 ; 21,75 g/l K_2HPO_4 ; 44,7 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (solnost 74,95 g/l). Protože závislost η_{spec} / c versus C byla silně nelineární , byl poté byl měřen roztok Hykolu rozpuštěného v 16 krát ředěném fosfátovém pufru o solnosti 4,68 g/l.

Pufr má koncentraci fosforu $c = 312,2 \text{ mmol/l}$ a iontová síla $I = 2,34 \text{ mol/l}$.

16 x ředěný pufr má koncentraci fosforu $c = 19,5 \text{ mmol/l}$ a iontová síla $I = 0,15 \text{ mol/l}$

Byly měřeny výtokové doby roztoků epoxidy modifikovaných vzorků (o koncentracích $1\ 250 - 20\ 000 \text{ mg/l}$) a jejich průměrné hodnoty pak přepočteny na specifickou viskozitu a limitní viskozitní číslo. pH pufru bylo v případě potřeby upraveno pomocí $6 \text{ M} - \text{HCl}$ na hodnotu $\text{pH} = 4$ nebo pomocí $6 \text{ M} - \text{KOH}$ na hodnotu $\text{pH} = 10$. Vzhledem k použití vysokých koncentrací kyseliny a louhu se příliš nezměnila koncentrace fosforu v roztoku i iontová síla.

- Složení roztoku s pufrem I (silným):

4,70 g 42,59 %ního zásobního roztoku (odpovídá 2,000 g suš.Hykolu) byly přidány k 66,77 ml fosfátového pufru o $\text{pH} = 7,3$ (obsah sušiny pufru v roztoku pak byl 50 g/l). Tomuto 2 %nímu roztoku Hykolu bylo upraveno pH přidavkem cca 6ti molární HCl nebo KOH na požadovanou hodnotu a byla měřena viskozita. Další ředění pak byla prováděna čistým pufrem o solnosti 74,95 g/l.

- Složení roztoku s pufrem II (slabým):

4,70 g 42,59 %ního zásobního roztoku (odpovídá 2,000 g suš.Hykolu) byly přidány k vypočtenému objemu 16x ředěného fosfátového pufru , který byl ředěn destilovanou vodou. Tomuto 2 %nímu roztoku Hykolu bylo upraveno pH přidavkem cca 6ti molární HCl nebo KOH na požadovanou hodnotu a byla měřena viskozita. Další ředění pak byla prováděna tímto ředěným pufrem o koncentraci sušiny 4,68 g solí na litr.

Tab.6: pH roztoků použitých při měření viskozit

% Hykolu	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	42,59 (zásobní)
ředění pufru	žádné (1x)	4 x	16 x	4 x	16 x	bez pufru
pH	7,40	7,55	7,66	7,24	7,23	7,08

Měření viskozity roztoků ve zředovacím Ubbelohdeho viskozimetru vychází ze známé Hagen – Poiseuillovy rovnice pro průtok kapilárou. Z průtokové doby roztoku se určí jeho kinematická viskozita ν definovaná vztahem:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}, \text{ kde } \eta \text{ je dynamická viskozita a } \rho \text{ je hustota kapaliny.}$$

K výpočtu ν se používá vztah: $\nu = A * t - B / t$, kde konstanty A , B jsou dány konstrukcí viskozimetru a jsou dodány společně s viskozimetrem nebo je možno stanovit je měřením 2 kalibračních kapalin o známých hodnotách dynamické viskozity a hustoty. V případě měření vodných roztoků hykolu byl použit viskozimetr s udávanými údaji:

$$\nu \text{ [mm}^2\text{/s]} = 0,004991 * t - 5,6 / t.$$

Druhý člen v rovnici představuje korekci na kinetickou energii vytékající kapaliny. Jeho vliv je významný pouze při velmi krátkých průtokových dobách v kapilárách malého průměru, tj. při měření málo viskózních roztoků. Často bývá zanedbáván.

Relativní viskozita η_r je definována, jako podíl viskozity roztoku a čistého rozpouštědla:

$$\eta_r = \eta / \eta_0$$

Specifická viskozita η_{spec} je dána vztahem:

$$\eta_{\text{spec}} = \eta_r - 1$$

Limitní viskozitní číslo (LVČ) nebo též vnitřní viskozita $[\eta]$ je definována vztahem:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{spec}}}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_r - 1}{c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\ln \eta_r}{c}$$

Limitní viskozitní číslo závisí na molekulové hmotnosti polymeru v roztoku dle Mark – Houwinkovy rovnice:

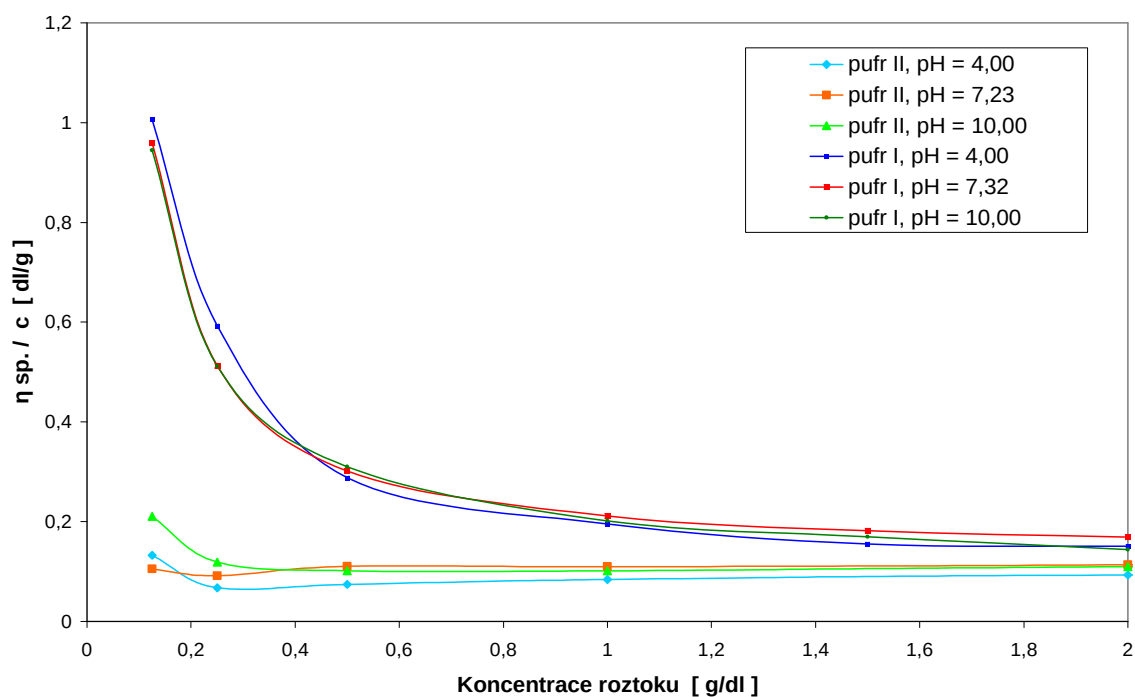
$$[\eta] = K * M^a$$

Obvykle bývá udáno v [dl/g]. Konstanty K , a závisí na kombinaci složek polymer – rozpouštědlo a teplotě. Exponent a je v případě neporušeného „gausovského“ klubka roven $a = 0,5$; běžně v případě expandovaného „gausovského“ klubka má hodnotu $a = 0,6 - 0,8$ a v případě tuhé tyčinky hodnotu $a = 2$. Pro spolehlivou extrapolaci $[\eta]$ je nutno měřit v oblasti nízkých koncentrací, tedy kdy $c * [\eta] < 0,7$. Závislosti η_{spec} / c jsou nelineární v systémech s větší interakcí, tj. v polárních systémech. Obtížné je stanovení $[\eta]$ v případě polyelektrolytu, kde je závislost η_{spec} / c velmi nelineární. Linearita se vždy zlepší zvýšením iontové síly po přidavku indiferentního elektrolytu, který potlačí vzájemné interakce skupin řetězce. Event. je doporučována extrapolace $[\eta]$ k nekonečné iontové síle v souřadnicích $[\eta]; 1/\sqrt{I}$:
$$[\eta] = [\eta]_{\text{oo}} + k / \sqrt{I}.$$
 Z tohoto plyne požadavek udržování konstantní, pokud možno vysoké iontové síly.

Ke stanovení $[\eta]$ polyelektrolytu je vhodné udržovat konstantní $\text{pH} = \text{pI}$ (izoelektrický bod) a vyšší iontovou silou, alespoň $I = 0,05 \text{ M}$; lépe $0,5 \text{ M}$. K ilustraci problémů se stanovením $[\eta]$ je často užívána kyselina polyakrylová s $[\eta] > 10 \text{ dl/g}$, kdy koncentrační závislost η_{spec} / c je nelineární i při $c = 0,1 \text{ g/dl}$. Při stanovení LVČ želatiny nejsou v literatuře zvláštní problémy zmiňovány. Pro 20°C ; $0,5 \text{ M} - \text{KCl}$ je uváděno $[\eta] = 4,033 * 10^{-4} * M^{0,52} \text{ [dl/g]}$, [g/mol]. Hykol by se měl chovat podobně. Při jeho $M = 10^4 \text{ g/mol}$ je očekáváno $[\eta] = 0,05 \text{ dl/g}$. Sít'ováním karboxylových skupin epoxidy by se však mohl výrazně zvýšit izoelektrický bod [26].

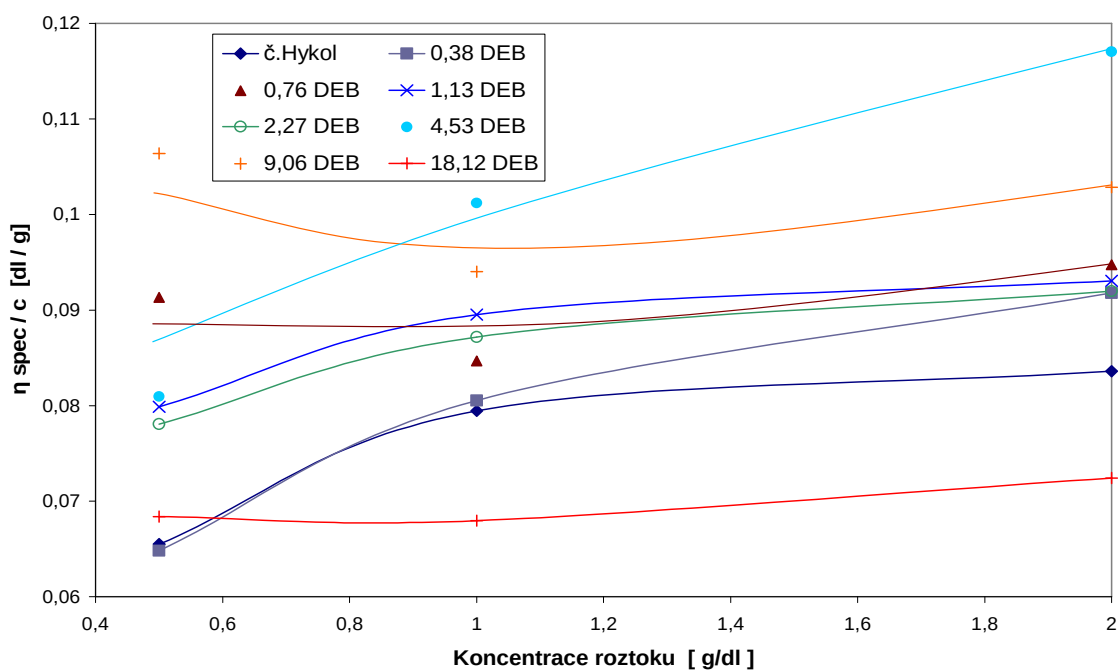
Hodnoty závislosti η_{spec} / c na koncentraci c byly extrapolovány k limitnímu viskozitnímu číslu $[\eta]$. Přítomnost pufru má u polyelektrolytů obecně zvýšit linearitu výnosu η_{spec} / c a usnadnit extrapolaci $[\eta]$, ale experiment této teorii neodpovídal nejspíše proto, že nebyla udržována stejná iontová síla při ředění vzorků v silnějším pufru. Závislost η_{spec} / c na koncentraci roztoku byla u ředěného pufru alespoň méně zakřivená, proto měření viskozit vzorků sít'ovaných DEB a DEO probíhalo ve vodném prostředí. Hodnotami η_{spec} / c se v závislosti na pH v rozmezí 4 - 10 se kupodivu výrazně neliší.

Obr.9: Závislosti η_{spec} / c na koncentracích Hykolu v různých pufrch při 25 °C

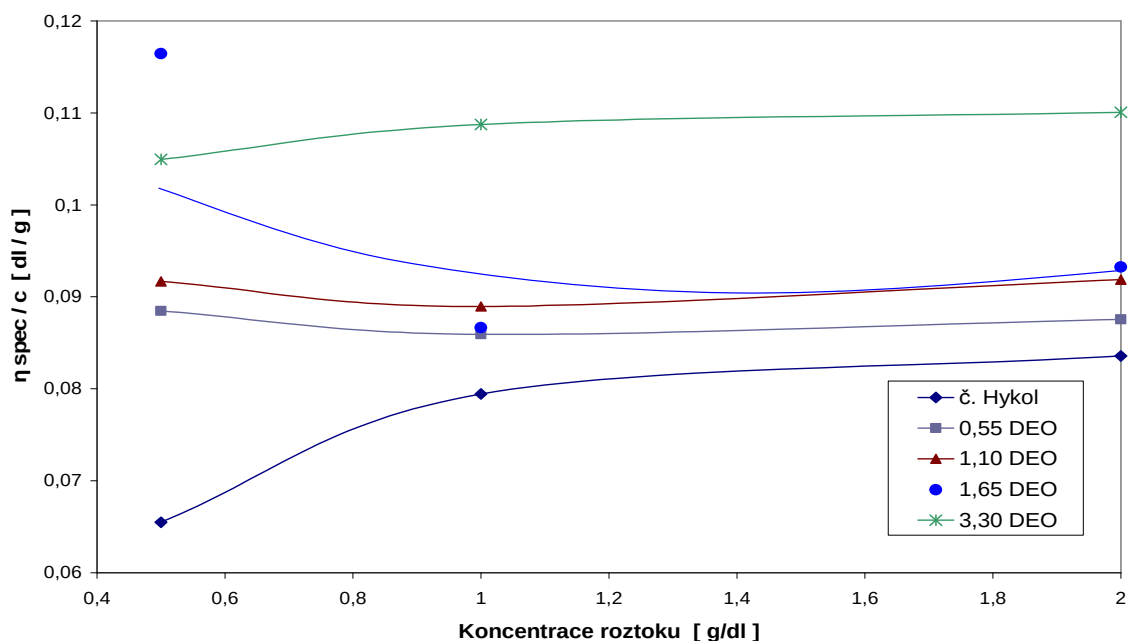


Základní roztok s obsahem 2,00 hm. % modifikovaného Hykolu byl zředěn na 1,00 %, 0,50 % a 0,25 % roztok a opět měřen.

Obr.10: Vzorky Hykolu síťovaných pomocí DEB při pH = 9: (hm. % DEB / Hykol)

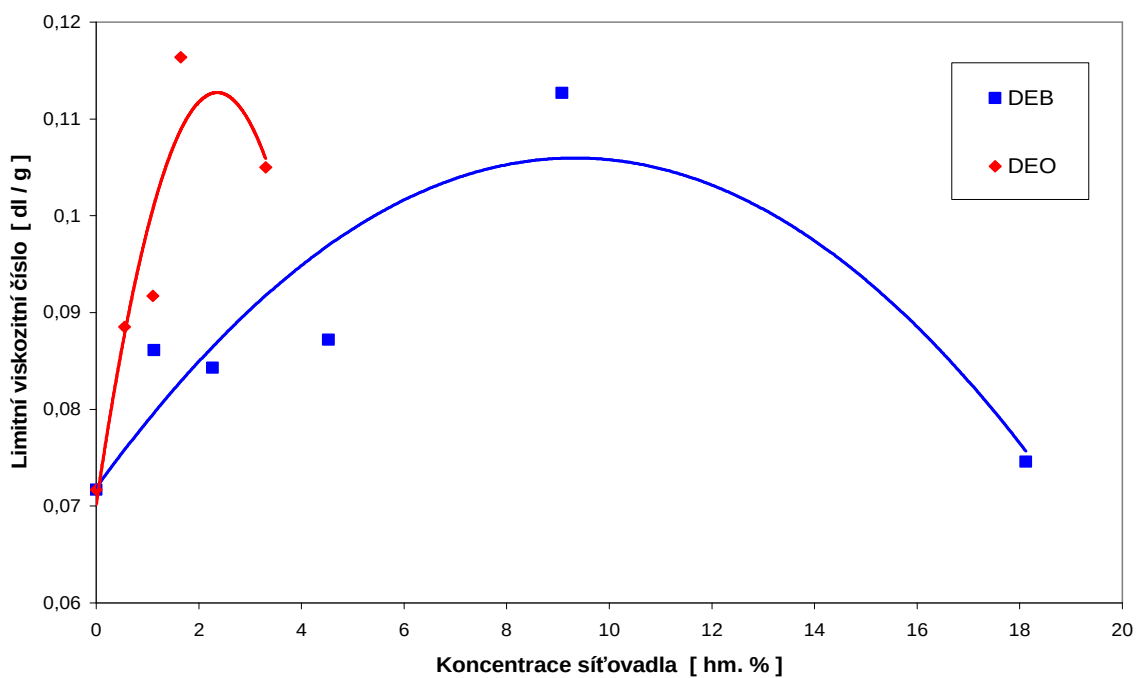


Obr.11: Vzorky Hykolu síťované pomocí DEO při pH = 9: (hm. % DEO / Hykol)



Vzorky síťované obsahem 6,6 hm. % ; 13,2 hm. % a 26,4 hm. % DEO se nerozpustily na požadovanou koncentraci. Event. by se proměřovala pouze frakce solu bez výšemolekulárních frakcí přešlých do frakce gelu. Tato měření nebyla provedena.

Obr.12: Závislost limitního viskozitního čísla ve vodě při 25 °C na dávkování síťovadla (epoxidu) (hm. % / Hykol)



Ke tvorbě prostorové sítě (ztrátě tekutosti a nekonečné viskozitě) dojde při dostatečně vysoké konverzi funkčních skupin a pokud reagující látky mají vysokou funkčnost a vhodný stechiometrický poměr epox / - NH₂ = 1 . Diepoxidy při reakci s aminy jsou pouze dvoufunkční. Hykol je podle předchozích výpočtů desetifunkční na aminoskupiny.

Doby síťování a pH byly pro vysokou konverzi příznivé. V případě Hykolu musí poměrně krátké řetězce nesoucí epoxidové skupiny propojit 2 prostorově vzdálené aminoskupiny. V nenabotnaném stavu jsou v Hykolu aminoskupiny od sebe vzdáleny cca 7,1 vazeb na řetězci. DEB má vzdálenost mezi reaktivními kyslíky epoxiskupiny cca 3 vazby (natažené) ; DEO má vzdálenost mezi reaktivními kyslíky epoxiskupiny cca 7 vazeb. Po 90 % ní konverzi (na -NH₂) bylo potřeba překonat vzdálenost cca 9,9 vazeb , tj. mít v řetězci 10 vazeb mezi epoxyskupinami [31].

Tyto úvahy platí pro suchý Hykol. Pro síťování 40 % roztoku Hykolu by bylo zapotřebí 14 natažených vazeb. Na 13 % roztok Hykolu pak by bylo zapotřebí 22 vazeb , tj. pro diepoxidy o $M = 14 \cdot 22 = 308$ g/mol. Diepoxidy při stechiometrické reakci s desetifunkčním Hykolem by při optimální stechiometrii utvořily první podíly gelu při konverzi cca 33 %. Jsou-li sterická omezení příliš velká (zejména ve zředěných roztocích) , příliš krátké diepoxidy pak neutvoří síť ani při 100 %ní konverzi a ideální stechiometrii [31].

To též umožňuje vysvětlit , že snadná tvorba gelu nebyla pozorována ani při síťování s DEO. K omezení rozpustnosti vzorků (výrazně pouze u DEO) došlo až po jejich vysušení (mohlo se projevit odboťování). K očekávaným nárůstům LVC při síťování nedošlo pravděpodobně ze sterických důvodů především u hykolu síťovaného pomocí DEB.

Naopak i při podmínkách pro poměrně rychlou reakci epoxyskupin s Hykolem by i při optimální stechiometrii v systému měly zůstat volné epoxyskupiny nezreagované ze sterických důvodů [31].

4.5 FTIR spektra Hykolu a Hykolu po reakci s epoxidy

Závěry byly vytvořeny z porovnání neupravovaných spekter. Ta byla normalizována ; tj. vynásobena konstantou , aby měla jednotkou plochu a dala se tak lépe porovnat. Pochopitelně se jedná o závislosti absorbance na vlnočtu , (nikoliv na transmittance, protože uvažované skupiny pohlcují světlo dle Lambert – Beerova zákona). Ze souhrnného pohledu na všechna spektra je vidět , že základní linie je dosti nestabilní , zvláště u velkých vlnočtů.

Absorbance vzorků s DEB v mnoha oblastech je velmi vysoká a píky se překrývají. Oblasti nadějných vlnočtů , kde je možno nejlépe sledovat změny ve spektru vlivem reakce s epoxidy , je možno nejsnáze vyhledat z diferenčních spekter vzorků modifikovaných epoxidy oproti čistému Hykolu. Tyto diferenční spektra jsou uvedena na obr. 16 a 18. Kladné píky představují absorbance nově vzniklých skupin oproti čistému Hykolu ; záporné píky pak zreagované funkční skupiny čistého Hykolu [31].

Nejvýznamnější změny jdou vidět v systému Hykol + DEO. Široký pík v oblasti $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ může představovat absorbanci nově vzniklých --OH skupin po síťování. Přitom by však měl být ve shodné oblasti pozorovatelný pík zreagovaných --NH_2 skupin. Přitom je nepravděpodobné , že extinkční koeficient (schopnost pohlcovat světlo) --OH skupin by byl velmi výrazně vyšší , než pro zanikající --NH_2 skupinu. Event. by se změny absorbance projeví na stejných vlnočtech, proto se raději přikláním k jednoduššímu vysvětlení , že tento pík je spojen spíše se systematickou změnou obsahu vlhkosti. Vyplývá z toho , jako by víc síťované vzorky byly hydrofilnější. Tento pík se začíná projevovat již od dávky 1,1 hm. % DEB a 1,6 hm. % DEO. Zvýšená hydrofilita není ale tolik pravděpodobná [31].

Síťováním DEO se sníží hydrofilita vzorků více, než-li síťováním s DEB ; navýší se více obsahu uhlovodíkových skupin a sníží se obsah kyslíku. Uhlovodíkové píky zreagovaných epoxyskupin u obou použitých síťovadel byly málo zřetelné. Obsah --CH-- skupin (ať již --CH-- ; $\text{--CH}_2\text{--}$; $\text{--CH}_3\text{--}$) v Hykolu byl podobný obsahu v epoxidech ; pochopitelně s ohledem na normalizace spektra ovlivněnou silnou absorbancí.

Takto by bylo možno vysvětlit praktickou absenci změny ve spektrech vody uhlovodíkových píků v oblasti $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ u vzorků Hykolu síťovaných DEB. Tyto píky jsou výrazně vidět jen u vzorků s obsahem 13,2 a 26,4 hm. % DEO.

U vzorků s DEB a DEO vzniká nový pík ve vlnočtu 1050 cm^{-1} . Toto může být nejspíše vazba $-\text{CO}-$ z hydroxylové skupiny po reakci epoxidu s aminem. Tento pík je zřetelný pouze v dávkování nad 4,5 hm. % DEB a 6,6 hm. % DEO.

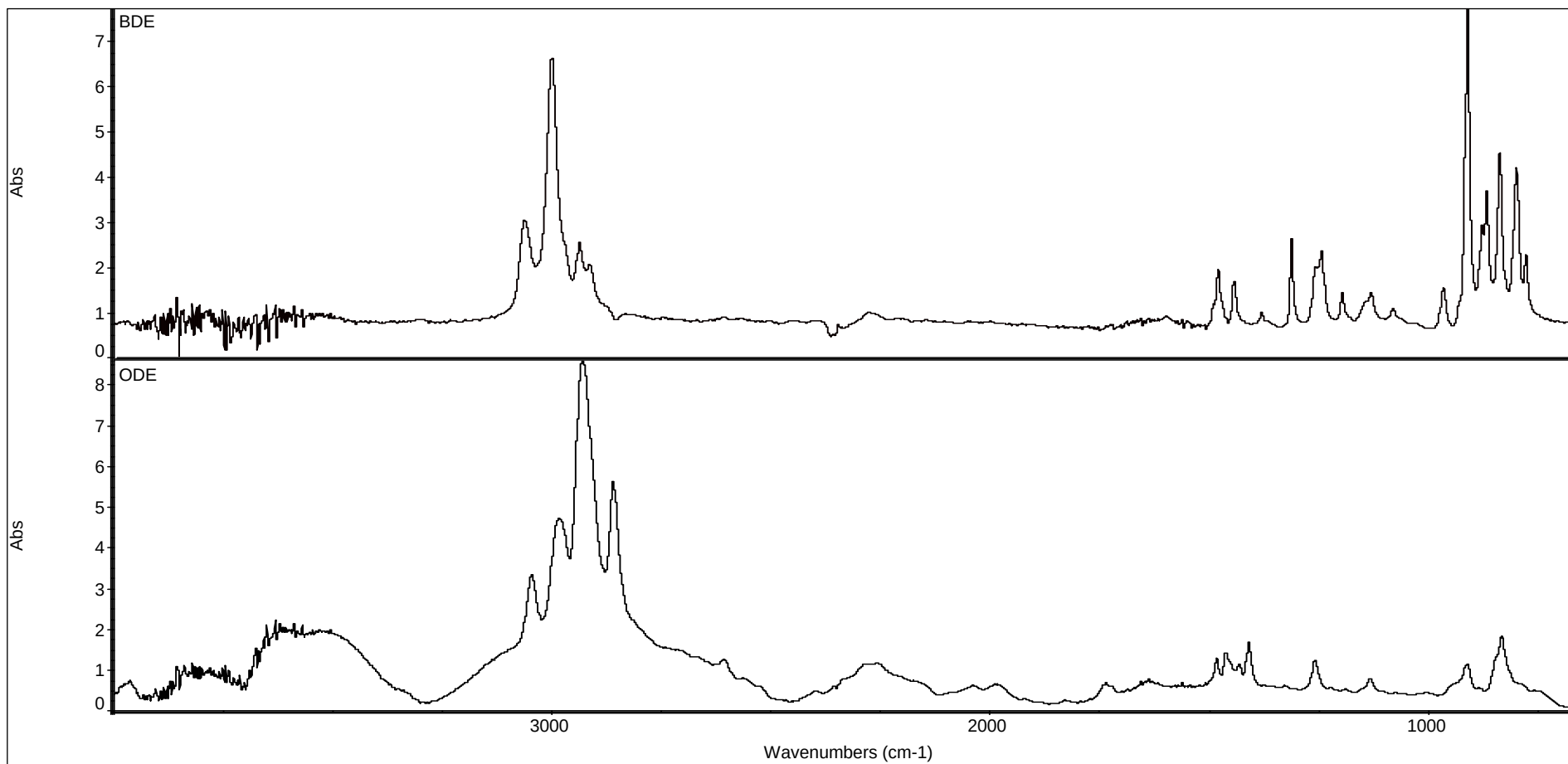
Záporné píky , tj. píky spojené s reakčními skupinami v Hykolu v oblasti 1100 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} nejsou jednoznačně tabelovány , jako píky odpovídající $-\text{NH}_2$ skupině. Byly by očekávány při vlnočtu kolem 1590 cm^{-1} , jednalo-li by se o zředěné roztoky aminů.

Měření spekter bílkovin síťovaných s DEB a DEO v tuhé fázi je obtížné , protože se píky překrývají , jsou vysoké a široké ; event. mají proměnlivý obsah vlhkosti v oblasti našeho zájmu. Případně obsah vlhkosti též poněkud ovlivňuje výšku a šířku píků skupin interagujících s vodou.

Pro ověření výsledků a jejich lepší interpretaci je nutné změřit spektra v roztocích H_2O a D_2O ; nejlépe i modelovými látkami (aminy , kyseliny , aminokyseliny) ; event. při různých pH.

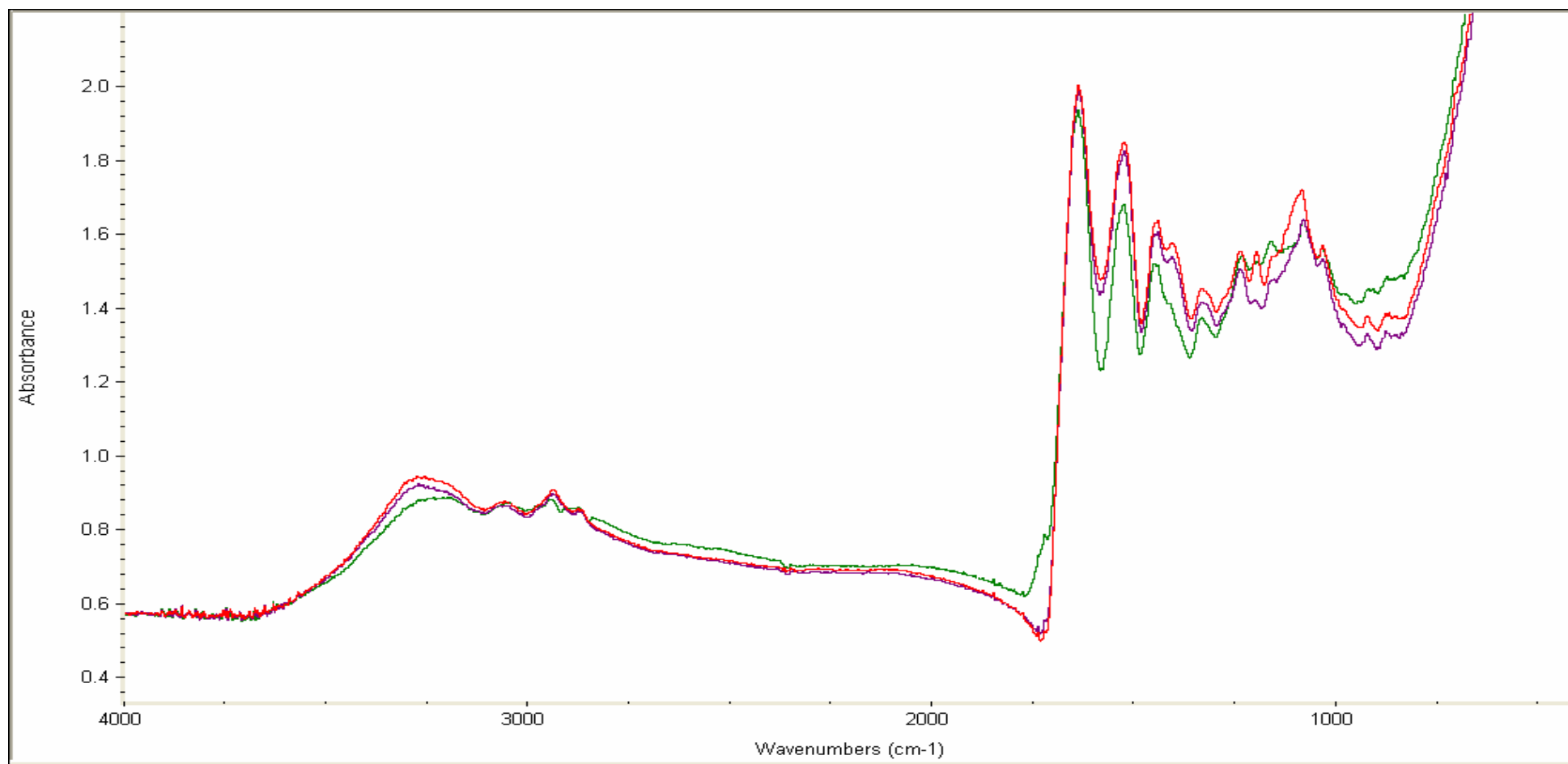
Měření spekter v tuhé fázi je vhodné provést i technikou KBr tablety a to při různých koncentracích. Při měření roztoků bude zásadní problém mimořádně velká absorbance vody v oblasti zajímavých vlnočtů. Při použití D_2O bude způsobovat komplikace okamžitá výměna vodíku a deuteria v $-\text{NH}_2$ a $-\text{COOH}$ skupině a rychlá výměna v $-\text{OH}$ skupině a peptidické vazbě $-\text{NH}-\text{CO}-$ [31].

Spektra se základním komentářem jsou uvedena na následujících stranách na obr. 13 - 18. Jsou popsány spektra čistých složek epoxidů DEB a DEO , Hykol bez přídavku síťovadla při různých pH prostředích , modifikované vzorky Hykolu pomocí DEB a DEO a difference jejich spekter.



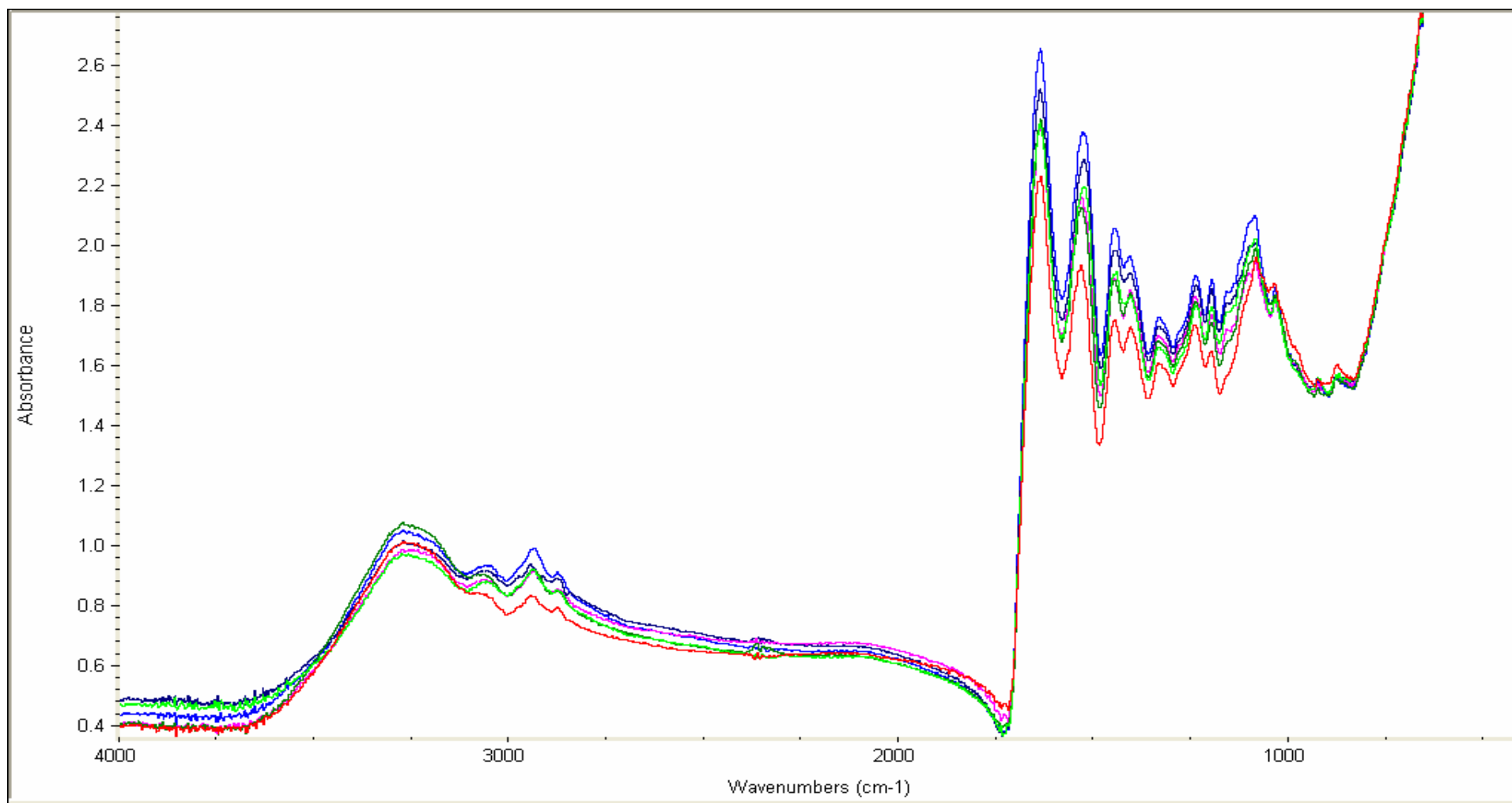
Obr. 13: FTIR absorpční spektra 1,2:3,4-diepoxybutanu (DEB) a 1,2:7,8-diepoxyoktanu (DEO); čisté kapaliny

Spektra jsou zobrazena po korekci na ATR techniku a normalizována. Absorpční píky se překrývají méně než u vzorků hykolu. Vodu očekáváme jako nečistotu v DEB ; spektrum ukazuje spíše na pík vody v okolí 3500 cm⁻¹ u DEO.



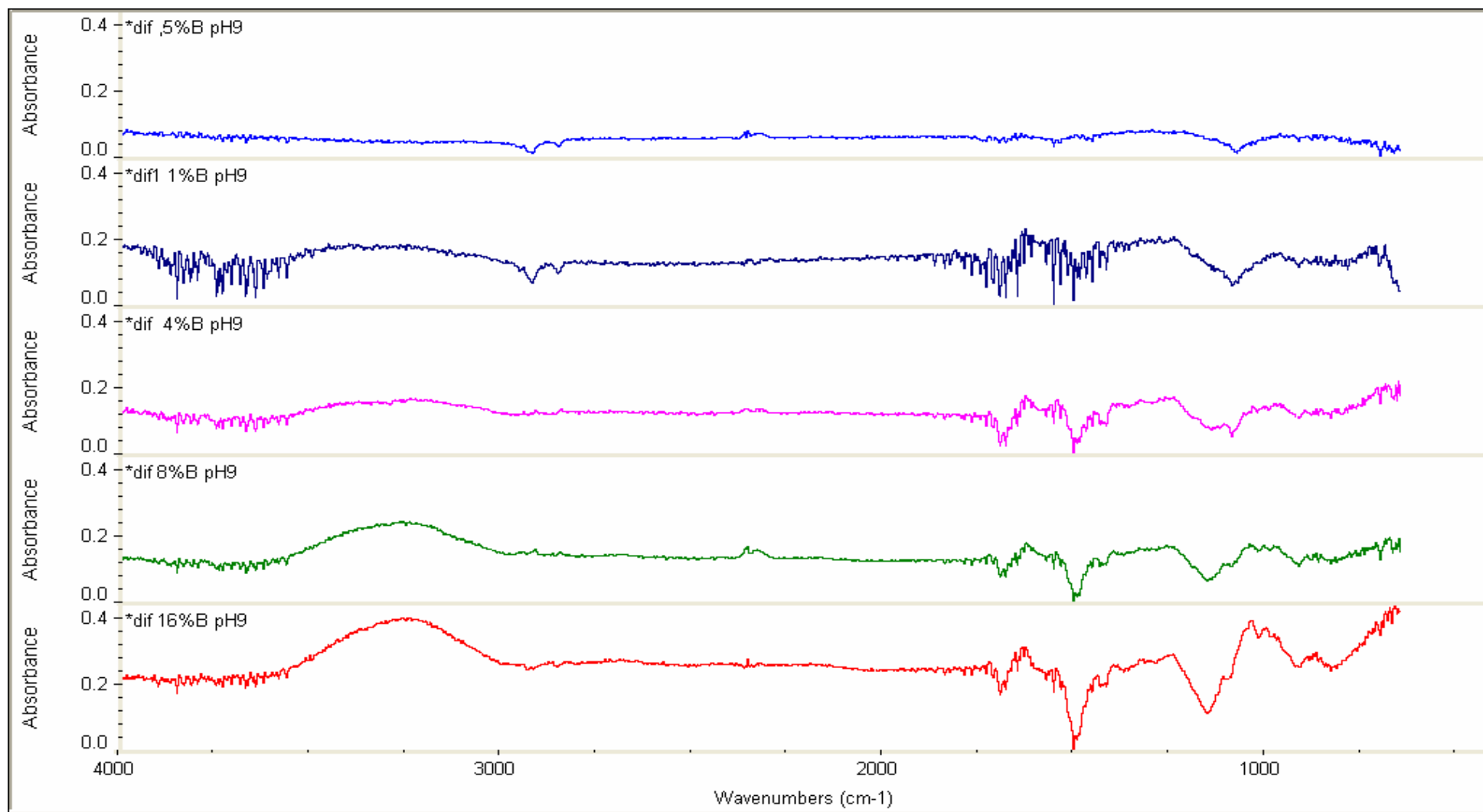
Obr. 14: FTIR absorpční spektra hydrolyzátu kolagenu (Hykol) ; prášek na krystalu ZnSe , bez ATR korekce

Spektra všech vzorků (měřených ve formě vysušeného prášku) jsou zobrazena bez korekce na ATR techniku , ale jsou normalizována. Jsou uvedena spektra Hykolu upravených na hodnoty pH = 2 ; 7 ; 9. Zelené křivka značí Hykol při pH = 2 , fialová křivka značí Hykol při pH = 7 a červená křivka značí Hykol při pH = 9.



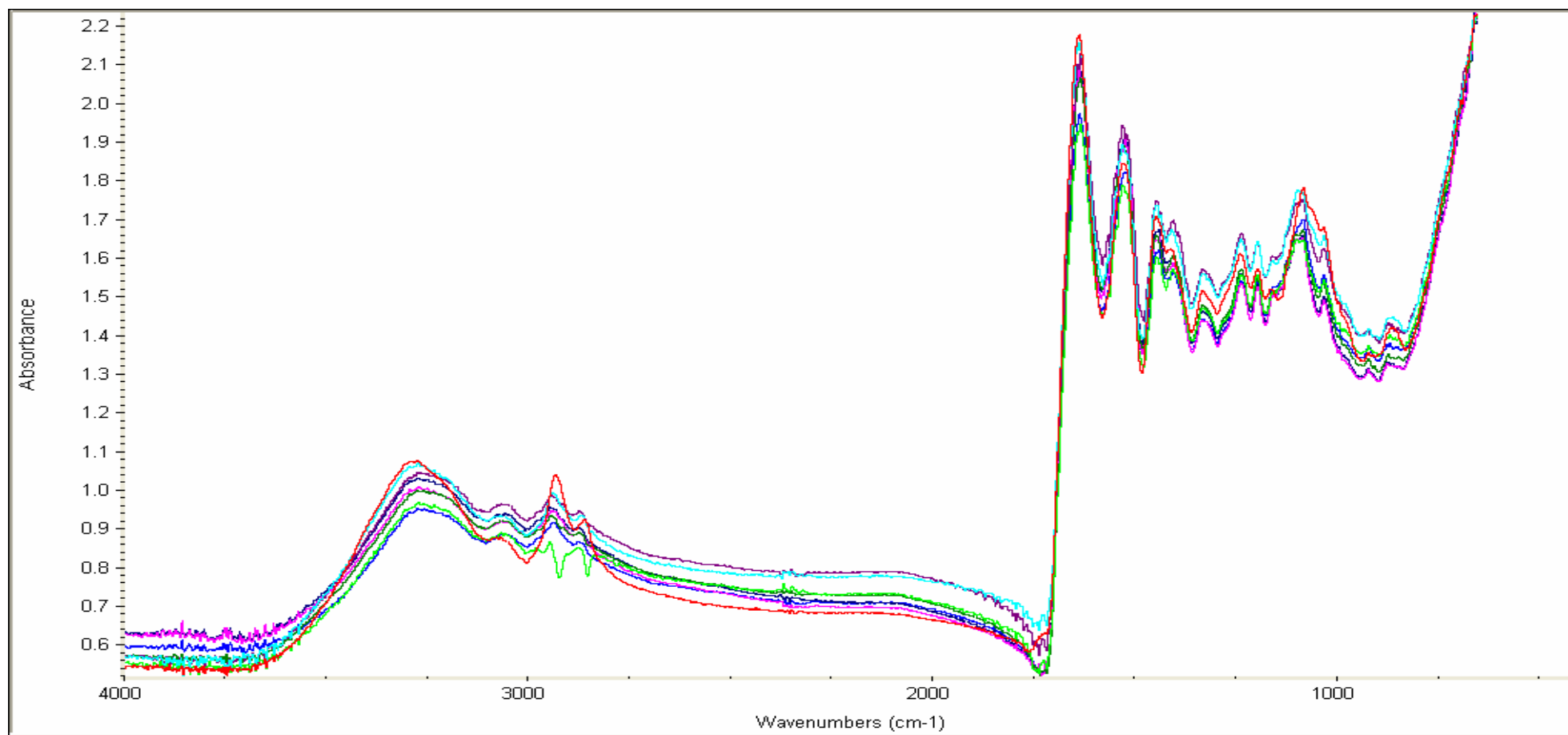
Obr. 15: FTIR absorpční spektra vzorků Hykolu síťovaného pomocí DEB ; prášek na krystalu ZnSe , bez ATR korekce

Všechny vzorky Hykolu byly síťované při stejném pH = 9. Světle zelená křivka znázorňuje čistý Hykol ; modrá křivka pak vzorek s obsahem 0,38 hm. % DEB ; tmavomodrá pak vzorek s obsahem 0,76 hm. % DEB ; fialová pak vzorek s obsahem 4,53 hm. % DEB ; tmavě zelená pak vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB a červená vzorek se 18,21 hm. % DEB.



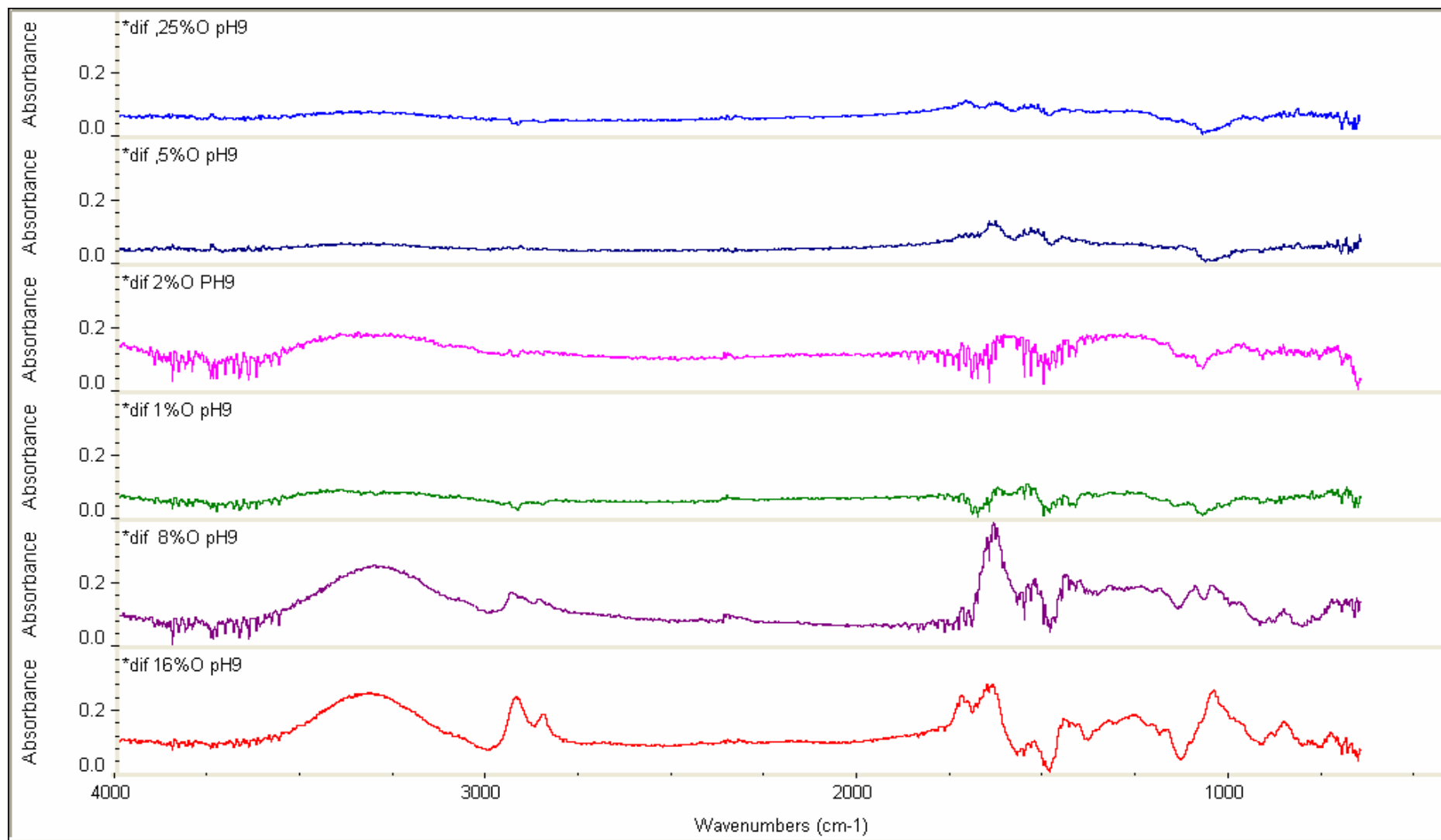
Obr. 16: Diference FTIR absorpčních spekter vzorků Hykolu síťovaného pomocí DEB ; prášek na krystalu ZnSe , bez ATR korekce

Rozdíly spektra čistého Hykolu od spektra vzorků s DEB s odečty spektra čistého Hykolu.



Obr. 17: FTIR absorpční spektra vzorků Hykolu síťovaného pomocí DEO ; prášek na krystalu ZnSe , bez ATR korekce

Všechny vzorky Hykolu byly síťovány při stejném pH = 9. Modrá křivka znázorňuje čistý Hykol ; černá pak vzorek s obsahem 0,55 hm. % DEO ; fialová pak vzorek s obsahem 1,10 hm. % DEO ; tmavě zelená pak vzorek s obsahem 1,65 hm. % DEO ; hnědá pak vzorek s obsahem 3,30 hm. % DEO ; světle zelená pak vzorek s obsahem 6,60 hm. % DEO ; světle modrá pak vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO a červená vzorek s 26,41 hm. % DEO.



Obr. 18: Diference FTIR absorpčních spekter vzorků Hykolu síťovaného pomocí DEO ; prášek na krystalu ZnSe , bez ATR korekce

Rozdíly spektra čistého Hykolu od spektra vzorků s DEO s odečty spektra čistého Hykolu.

4.6 *Biologický rozklad za anaerobních podmínek měřený na přístroji Micro-Oxymax fy Columbus*

Měřicí místa 1 – 6 byly obsazeny vzorky , které měly prověřit kvalitu použitého inokula i správný chod měřicího přístroje. Měřená místa 7 – 18 byly obsazeny síťovanými vzorky Hykolu , kdy obsah síťovadla DEB činil 0,8 – 9,1 hm. % (místa 17 a 18 zbyly obsazeny pouze čistým DEB bez Hykolu, čímž byla otestována toxicita použitého síťovadla) a měřená místa 19 – 30 byly obsazeny síťovanými vzorky Hykolu , kdy obsah síťovadla DEB činil 1,1 – 13,2 hm. % (místa 29 a 30 zbyly obsazeny pouze čistým DEO bez Hykolu, čímž byla otestována toxicita použitého síťovadla).

Tab.7: Obsazení měřících míst:

Měřicí místo	1	2	3	4	5	6
Vzorek	blank		AcNa		Hykol	

Měřicí místo	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Vzorek	0,76 DEB		1,13 DEB		2,27 DEB		4,53 DEB		9,06 DEB		DEB-tox.	

Měřicí místo	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Vzorek	1,10 DEO		1,65 DEO		3,30 DEO		6,60 DEO		13,21 DEO		DEO-tox.	

Pokus probíhal v období 14.4.2005 – 4.5.2005 , tj. 21 dní. (490 hodin).

Inokulum:

- anaerobní kal z ČOV Zlín – Malenovice
- kal byl uchováván v termostatu při 35 °C
- sušina kalu po odebrání z ČOV byla 61,5 g/l , obsah popela činil 21,9 g/l
- sušina kalu použitého k anaerobnímu rozkladu byla 2,52 g/l
(původní kal z ČOV kal byl odstředěn

Substráty:

- AcNa zásobní roztok o koncentraci 15,40 g/l $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 18,4 mg TOC v testovací baňce
- Hykol zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 18,4 mg TOC v testovací baňce
- 0,76 DEB zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 0,76 hm. % DEB ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 16,4 mg TOC v testovací baňce
- 1,13 DEB zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 1,13 hm. % DEB ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 17,1 mg TOC v testovací baňce
- 2,27 DEB zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 2,27 hm. % DEB ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 17,4 mg TOC v testovací baňce
- 4,53 DEB zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 4,53 hm. % DEB ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 16,7 mg TOC v testovací baňce
- 9,06 DEB zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 9,06 hm. % DEB ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 15,6 mg TOC v testovací baňce
- DEB zásobní roztok o koncentraci 566 mg/l diepoxy – 1,2:3,4 – butanu (DEB) ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 0,9 mg TOC v testovací baňce

- 1,10 DEO zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 1,10 hm. % DEO ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 15,4 mg TOC v testovací baňce
- 1,65 DEO zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 1,65 hm. % DEO ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 14,8 mg TOC v testovací baňce
- 3,30 DEO zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem hm. % DEO ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 16,2 mg TOC v testovací baňce
- 6,60 DEO zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 6,60 hm. % DEO ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 14,2 mg TOC v testovací baňce
- 13,21 DEO zásobní roztok o koncentraci 6,25 g/l Hykolu s obsahem 13,21 hm. % DEO ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 1,3 mg TOC v testovací baňce
- DEO zásobní roztok o koncentraci 826 mg/l diepoxy – 1,2:7,8 – oktanu (DEO) ; bylo dávkováno 12 ml na obsah testovací baňky (100 ml kalu) , to odpovídá 2,2 mg TOC v testovací baňce

Vzorky (substrát) byly rozpouštěny na magnetické míchačce po dobu 30 minut při cca 500 ot/min. Koncentrace 200 mg/l TOC vzorku je použita z důvodu srovnání s předchozími diplomovými pracemi , kde byla použita stejná koncentrace substrátu.

Před stanovením hodnot rozpuštěného uhlíku pomocí analyzátoru celkového organického uhlíku TOC-5000 A , Shimadzu po 21 denní expozici byl pevný a kapalný obsah měrných baněk oddělen pomocí centrifugace při zrychlení 18 000 G po dobu 12 minut při teplotě 18 °C.

Tab.8: Vstupní hodnoty rozpuštěného uhlíku v testovací baňce (ve 112 ml kapalně fáze)

Vzorek	TC [mg/baňku]	IC [mg/baňku]	TOC [mg/baňku]
Blank	9,30	2,09	7,21
AcNa	28,99	3,41	25,57
č. Hykol	29,12	4,41	24,71
0,76 DEB	28,11	4,31	23,79
1,13 DEB	28,14	3,46	24,68
2,27 DEB	27,82	3,29	24,53
4,53 DEB	27,13	3,33	23,80
9,06 DEB	26,24	3,19	23,05
DEB	10,65	2,60	8,05
1,10 DEO	26,74	4,14	22,60
1,65 DEO	25,96	4,02	21,94
3,30 DEO	26,52	3,18	23,34
6,60 DEO	24,90	3,54	21,37
13,21 DEO	11,90	3,35	8,55
DEO	12,32	2,88	9,45

Tab. 9: Výstupní hodnoty rozpuštěného uhlíku v testovací baňce (ve 112 ml kapalné fáze)

Vzorek	TC [mg/baňku]	IC [mg/baňku]	TOC [mg/baňku]
Blank	20,87	3,45	17,42
AcNa	29,77	10,92	18,85
č. Hykol	25,71	7,60	18,11
0,76 DEB	25,93	7,30	18,63
1,13 DEB	26,12	7,24	18,87
2,27 DEB	25,34	7,12	18,23
4,53 DEB	20,71	6,45	16,26
9,06 DEB	21,01	5,58	15,43
DEB	8,17	1,52	6,65
1,10 DEO	12,79	5,17	7,62
1,65 DEO	14,12	5,13	9,00
3,30 DEO	14,24	4,97	9,27
6,60 DEO	13,18	4,70	8,48
13,21 DEO	10,35	2,67	7,69
DEO	12,10	2,52	9,57

Tab. 10: U vybraných vzorků byla na konci pokusu stanovena hodnota sušiny (na vstupu byla hodnota sušiny 2,52 g/l):

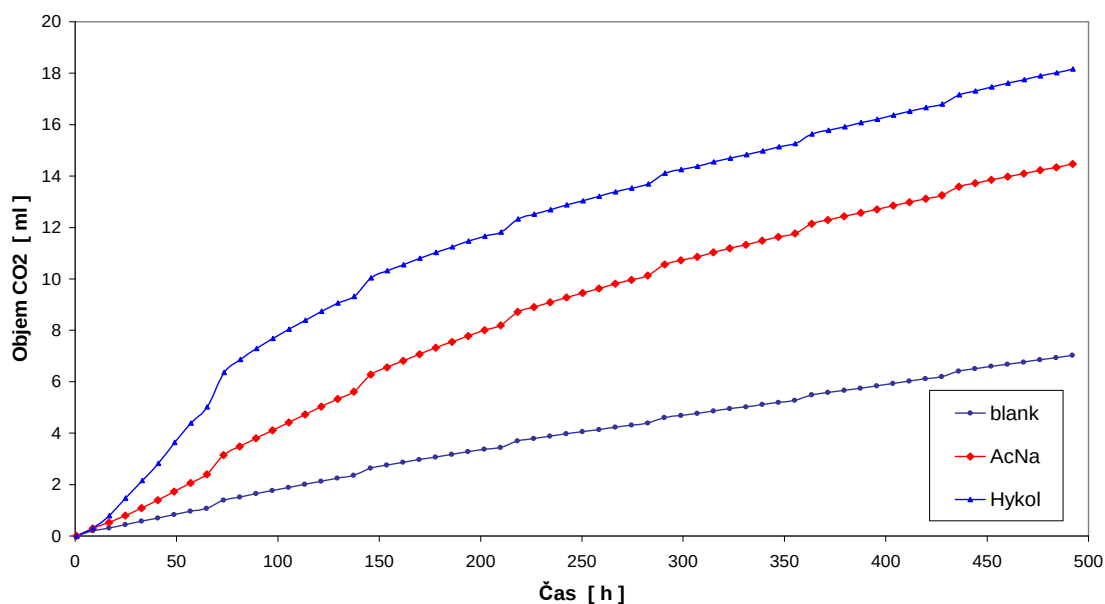
Vzorek	Sušina [g/l]
blank	2,24
2,27 % DEB	2,56
DEB	2,23
3,30 % DEO	2,18
DEO	2,51

Vzorky neobsahující Hykol nebo s jeho nižším obsahem a vzorky s velkým množstvím DEO, které byly jen minimálně rozpustné, měly hodnotu konečného pH blízkou slepému pokusu. Vzorky obsahující Hykol mají hodnotu pH oproti slepému pokusu nepatrně vyšší (hodnoty pH na vstupu i výstupu jsou uvedeny v tab. č.13 a 14).

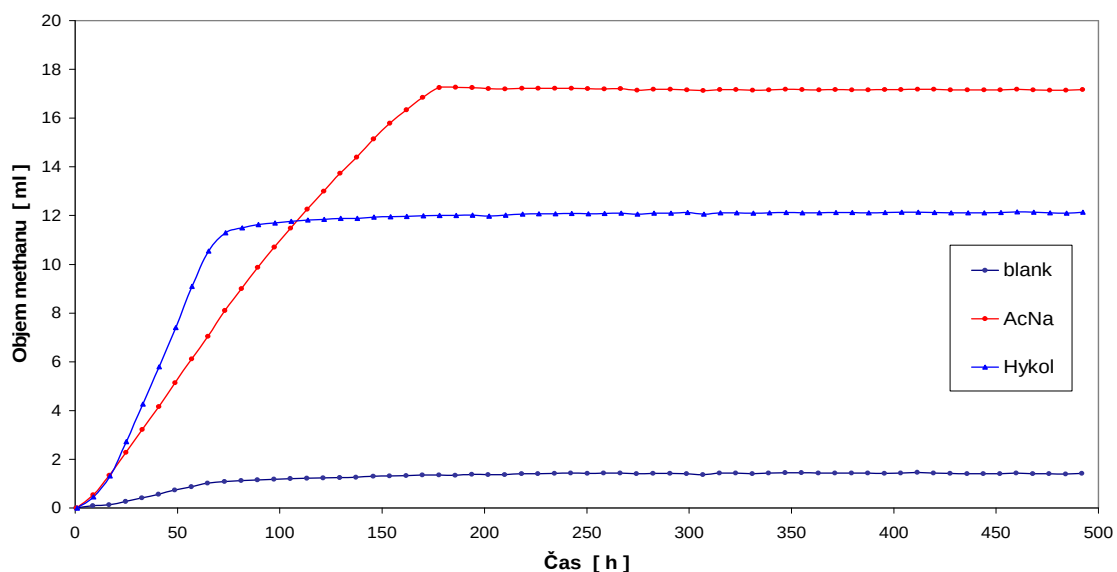
Vzorky neobsahující Hykol nebo s jeho nižším obsahem a vzorky s velkým množstvím DEO, které byly jen minimálně rozpustné měly světlehnědou barvu kalu, což bylo způsobeno snad horší výživou anaerobního kalu, popř. inhibiční schopností epoxidů. Kal v ostatních testovacích baňkách obsahující síťované vzorky Hykolu byl hnědočerný.

Obr. 19 - 21 znázorňují závislosti produkce CO₂, methanu a celkové produkce bioplynu na čase u základních (referentních) látek.

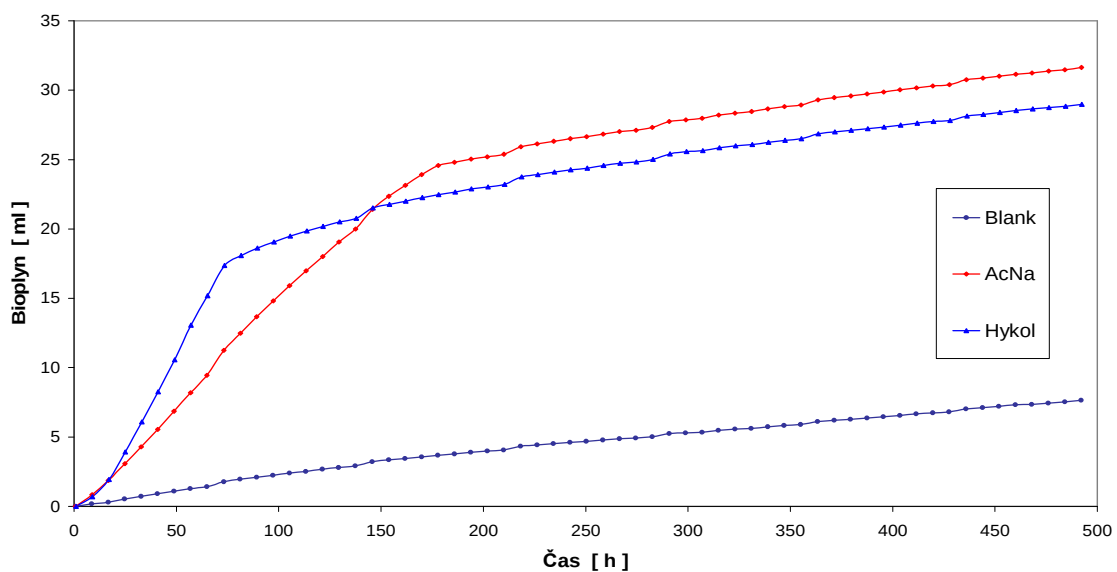
Obr. 19: Produkce CO₂ v závislosti na čase u základních látek



Obr. 20: Produkce CH_4 v závislosti na čase u základních látek

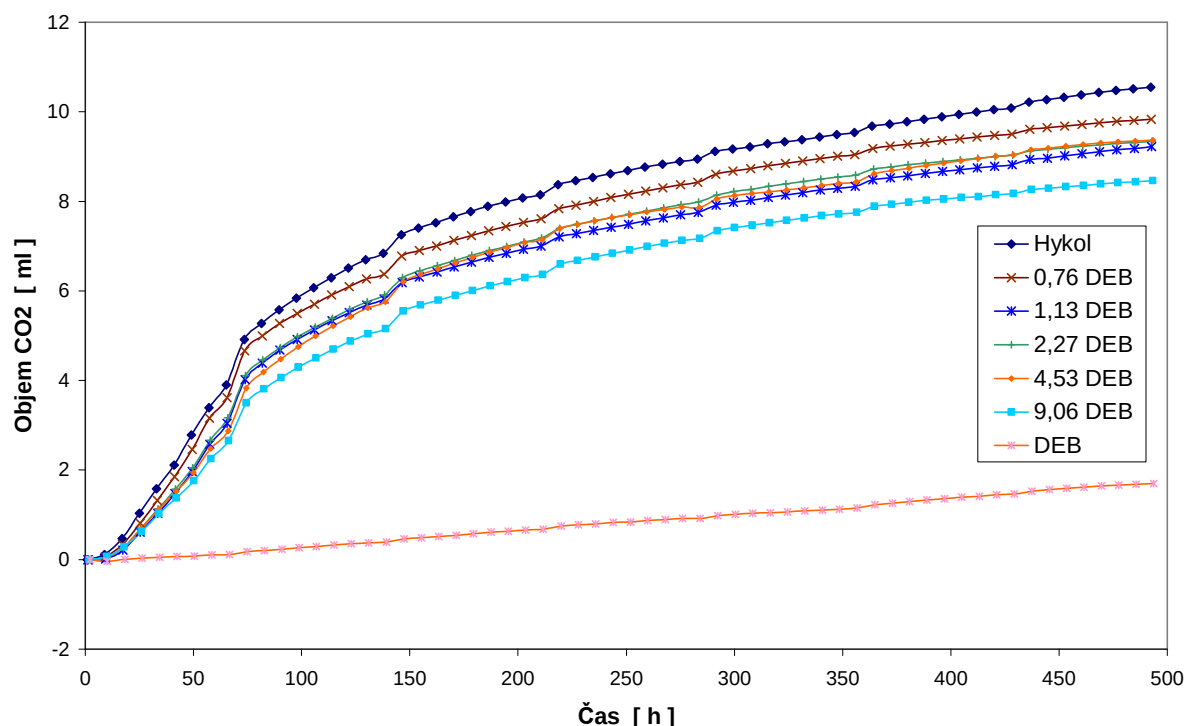


Obr. 21: Celková produkce bioplynu v závislosti na čase rozkladu u základních látek (množství bioplynu je vyjádřeno jako součet CO_2 a CH_4)



Z průběhu křivek na obr. 19 a 21 je patrný růst objemu CO_2 i po odbourání veškerého přidaného substrátu. Tato produkce je pravděpodobně způsobena nečistotami v anaerobním kalu přítomnými v kapalně fázi i po odstředění nebyl tím odstraněn rozpuštěný uhlík, který slouží jako substrát pro přítomné mikroorganismy. Tento růst je patrný u všech následujících křivek CO_2 a bioplynu. Další příčiny mohou být autolýza kalu v různých dobách při různých podmínkách; event.drift celého měřicího systému (průběh CO_2 , bioplyn). Popř. může vlivem netěsnosti do baňky vnikat kyslík.

Obr. 22: Produkce CO_2 v závislosti na čase u vzorků Hykolu sítovaného pomocí DEB
(po odečtení slepého pokusu)

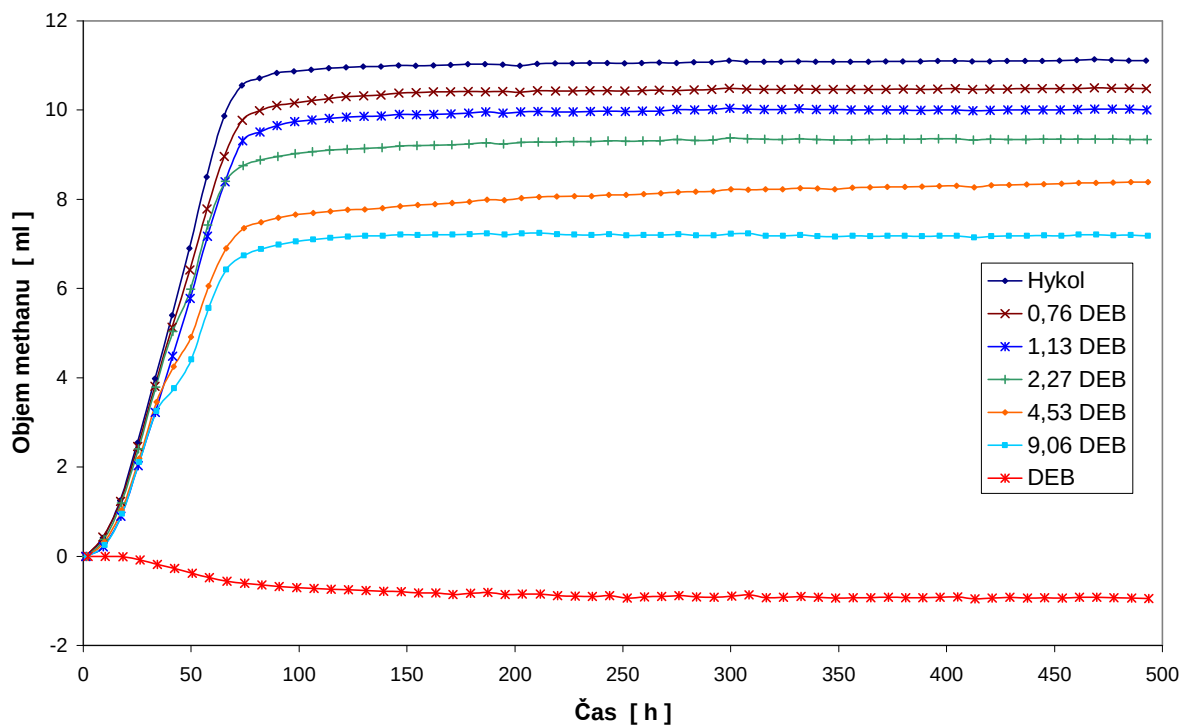


Obr. 22 znázorňuje průběh produkce CO_2 u vzorků Hykolu sítovaných pomocí DEB. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 7,3 ml CO_2 ; rozkladem vzorku s obsahem 0,76 hm. % DEB 6,8 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 1,13 hm. % DEB vyprodukoval 6,3 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 2,27 hm. % DEB vyprodukoval 6,2 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 4,53 hm. % DEB vyprodukoval 6,2 ml CO_2 a vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB vyprodukoval 5,6 ml CO_2 . Doba rychlého rozkladu vzorku je cca 80 hodin (celková cca 150 hodin), poté již dochází k rozkladu substrátu, který byl v kalu přítomen již v ČOV. Doba rozkladu všech testovaných vzorků je podobná.

Z průběhu křivek je patrné, že přidavek DEB ke vzorku Hykolu způsobuje zpomalení biologického rozkladu a jeho vyšší přidavek snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB má oproti čistému Hykolu o $\frac{1}{4}$ nižší produkci CO_2 .

V baňce, kde byla testována toxicita DEB nedošlo k žádné negativní změně vývoje CO_2 oproti slepému pokusu. Lze tedy usuzovat, že DEB není pro metabolické pochody mikroorganismů žijících ve vodném anaerobním prostředí toxický.

Obr. 23: Produkce CH_4 v závislosti na čase u vzorků Hykolu sítovaného pomocí DEB
(po odečtení slepého pokusu)

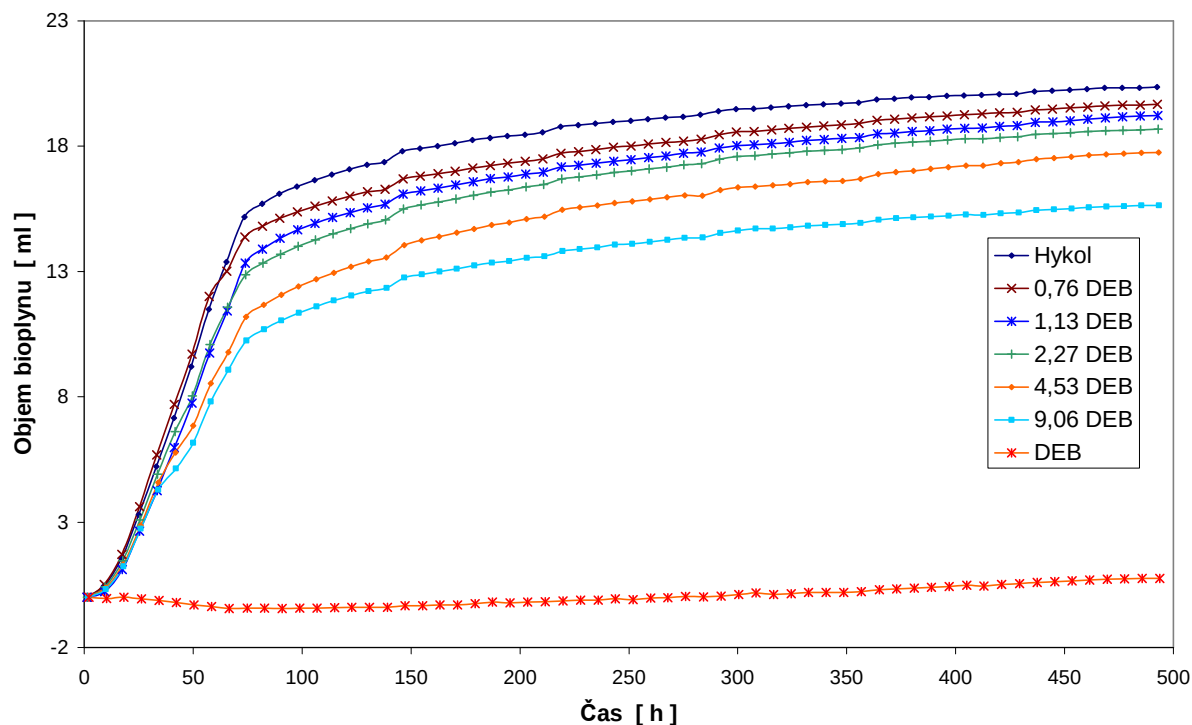


Obr. 23 popisuje průběh produkce methanu u vzorků Hykolu sítovaných pomocí DEB. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 10,8 ml methanu ; rozkladem vzorku s obsahem 0,76 hm. % DEB 10,1 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 1,13 hm. % DEB vyprodukoval 9,7 ml methanu ; vzorek s obsahem 2,27 hm. % DEB vyprodukoval 9,0 ml methanu ; vzorek s obsahem 4,53 hm. % DEB vyprodukoval 7,6 ml methanu a vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB vyprodukoval 7,0 ml methanu. Doba produkce methanu u vzorku skončila po 80 hodinách a je podobná u všech testovaných.

Z průběhu křivek je patrné , že přidavek DEB ke vzorku Hykolu způsobuje zpomalení methanogenního procesu rozkladu vzorku a jeho vyšší přidavek snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB má oproti čistému Hykolu o $\frac{1}{3}$ nižší produkci methanu.

V výsledků , kde byla testována toxicita DEB jde zřejmé , že oproti slepému pokusu produkce methanu klesla a to o 0,9 ml. Z toho vyplývá , že DEB je pro methanogenní mikroorganismy ve vodném anaerobním prostředí poněkud inhibující.

Obr. 24: Produkce bioplynu v závislosti na čase u vzorků Hykolu sít'ovaného pomocí DEB (po odečtení slepého pokusu)

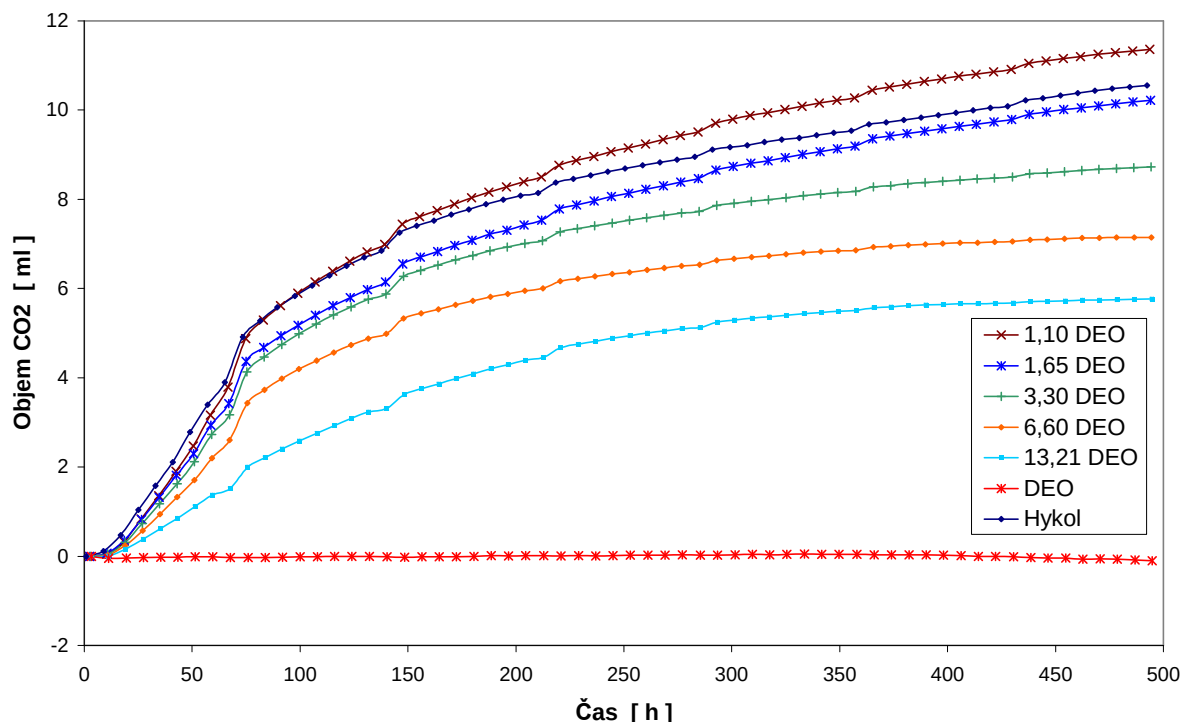


Obr. 24 popisuje průběh celkové produkce bioplynu u vzorků Hykolu sít'ovaných pomocí DEB. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 17,8 ml bioplynu ; rozkladem vzorku s obsahem 0,76 hm. % DEB 16,8 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 1,13 hm. % DEB vyprodukoval 16,0 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 2,27 hm. % DEB vyprodukoval 15,3 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 4,53 hm. % DEB vyprodukoval 13,5 ml bioplynu a vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB vyprodukoval 12,5 ml bioplynu. Doba celkového rozkladu vzorku je podobná u všech testovaných , tedy cca 80 hodin.

Z průběhu křivek je patrné , že přidavek DEB ke vzorku Hykolu způsobuje zpomalení biologického rozkladu vzorku a snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 9,06 hm. % DEB má oproti čistému Hykolu o $\frac{1}{3}$ nižší produkci bioplynu.

V baňce , kde byla testována toxicita DEB nedošlo k výrazné změně produkce bioplynu (oproti slepému pokusu). Lze tedy usuzovat , že DEB je pro mikroorganismy ve vodném anaerobním prostředí celkově neinhibující.

Obr. 25: Produkce CO_2 v závislosti na čase u Hykolu vzorků sít'ovaného pomocí DEO
(po odečtení slepého pokusu)

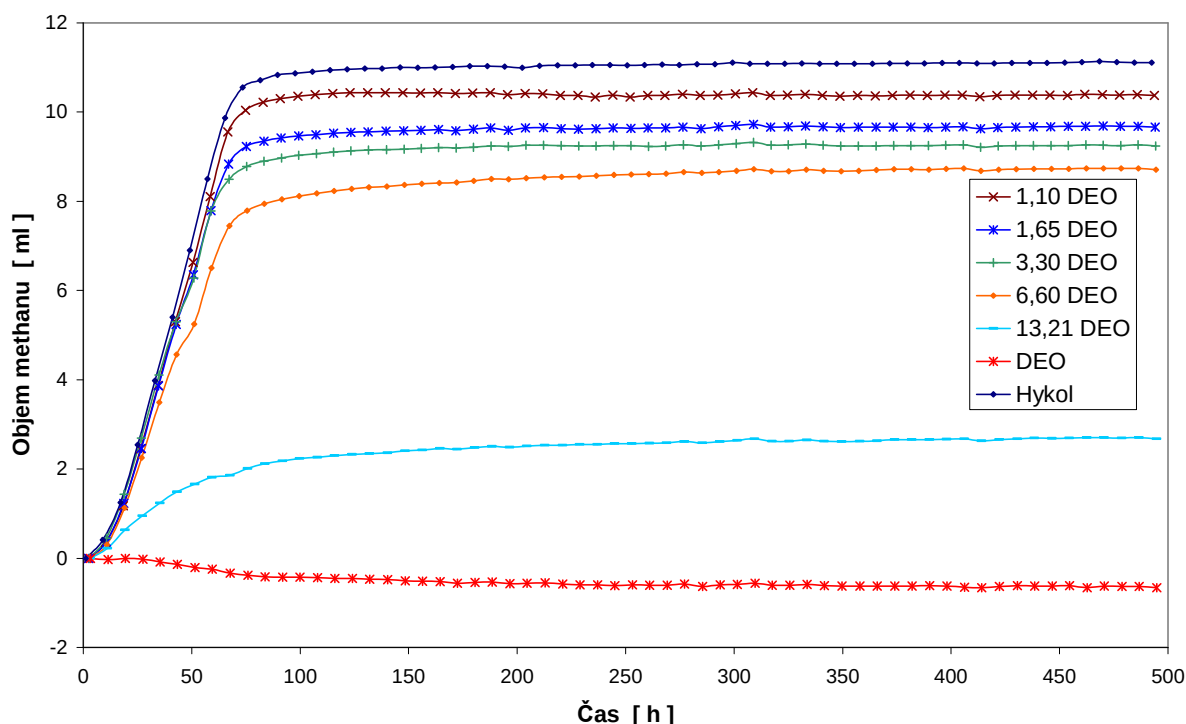


Obr. 25 popisuje průběh produkce CO_2 u vzorků Hykolu sít'ovaných pomocí DEO. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 7,3 ml CO_2 ; rozkladem vzorku s obsahem 1,10 hm. % DEO 7,4 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 1,65 hm. % DEO vyprodukoval 6,6 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 3,30 hm. % DEO vyprodukoval 6,3 ml CO_2 ; vzorek s obsahem 6,60 hm. % DEO vyprodukoval 5,3 ml CO_2 a vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO vyprodukoval 3,6 ml CO_2 . Doba rychlého rozkladu vzorku je cca 80 hodin (celková cca 150 hodin) , poté již dochází k rozkladu substrátu , který byl v kalu přítomen již v ČOV. Doba rozkladu všech testovaných vzorků je podobná .

Z průběhu křivek je patrné , že přidavek DEO ke vzorku Hykolu způsobuje zpomalení biologického rozkladu vzorku a jeho vyšší přidavek snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO má oproti čistému Hykolu o $\frac{1}{2}$ nižší produkci CO_2 .

V baňce , kde byla testována toxicita DEO nedošlo k výrazné změně oproti slepému pokusu produkce CO_2 neklesla. Lze tedy usuzovat , že DEO není pro metabolické pochody mikroorganismů žijících ve vodném anaerobním prostředí toxický.

Obr. 26: Produkce CH_4 v závislosti na čase u vzorků Hykolu sítovaného pomocí DEO
(po odečtení slepého pokusu)

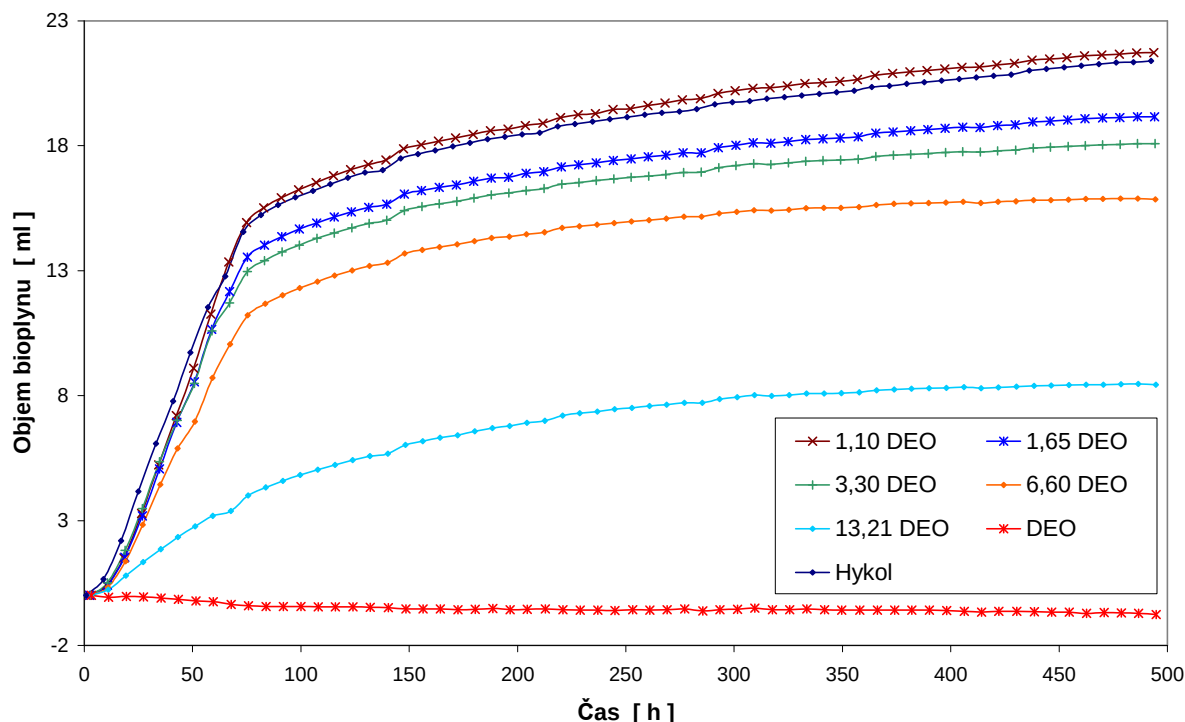


Obr. 26 popisuje průběh produkce methanu u vzorků Hykolu sítovaných pomocí DEO. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 10,8 ml methanu ; rozkladem vzorku s obsahem 1,10 hm. % DEO 10,3 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 1,65 hm. % DEO vyprodukoval 9,4 ml methanu ; vzorek s obsahem 3,30 hm. % DEO vyprodukoval 8,9 ml methanu ; vzorek s obsahem 6,60 hm. % DEO vyprodukoval 8,0 ml methanu a vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO vyprodukoval pouze 2,3 ml methanu. Doba produkce methanu u vzorku skončila po 90 minutách a je podobná u všech testovaných vzorků mimo vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO. Ten se rozložil až po 120 hodinách.

Z průběhu křivek je patrné , že přidavek DEO ke vzorku Hykolu způsobuje zpomalení methanogenního procesu rozkladu vzorku a jeho vyšší přidavek výrazně snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO má oproti čistému Hykolu o 80 % nižší produkci methanu.

V baňce , kde byla testována toxicita DEO jde vidět , že oproti slepému pokusu produkce methanu klesla a to o 0,5 ml. Z toho vyplývá , že DEO je pro methanogenní mikroorganismy ve vodném anaerobním prostředí mírně inhibující.

Obr. 27: Produkce bioplynu v závislosti na čase u vzorků Hykolu sítovaného pomocí DEO (po odečtení slepého pokusu)

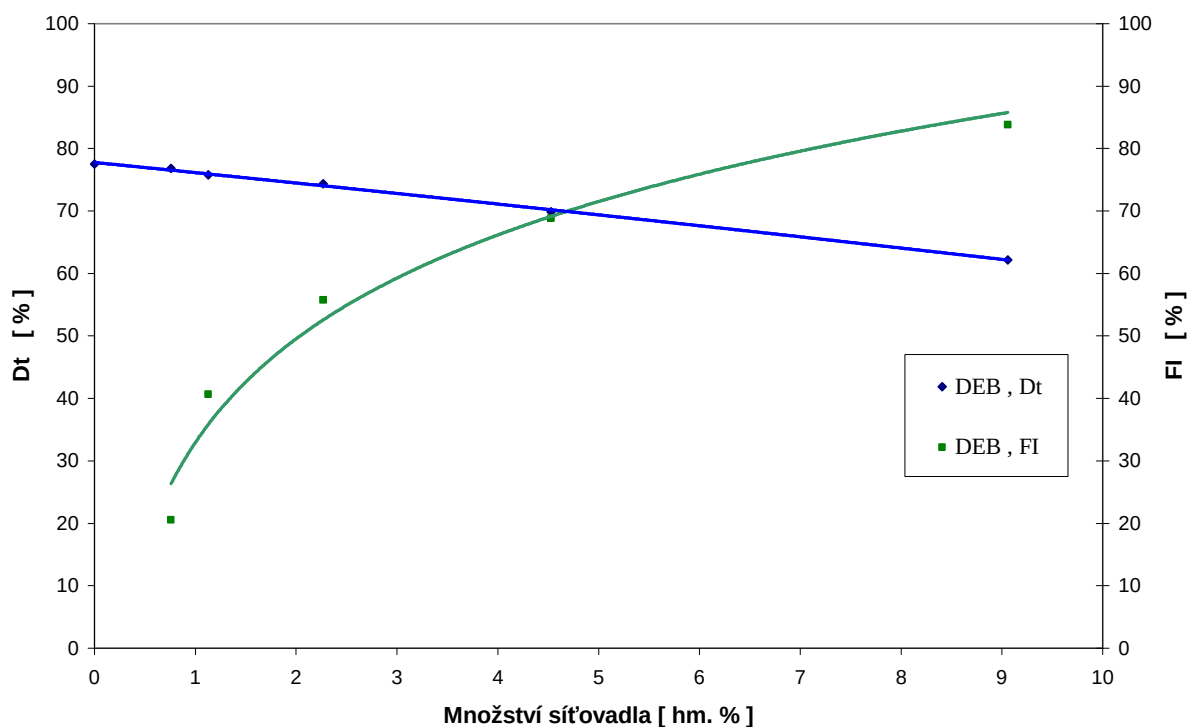


Obr. 27 popisuje průběh celkové produkce bioplynu u vzorků Hykolu sítovaných pomocí DEO. Rozkladem čistého Hykolu bylo vyprodukováno 17,8 ml bioplynu ; rozkladem vzorku s obsahem 1,10 hm. % DEO 17,9 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 1,65 hm. % DEO vyprodukoval 15,9 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 3,30 hm. % DEO vyprodukoval 15,5 ml bioplynu ; vzorek s obsahem 6,60 hm. % DEO vyprodukoval 13,5 ml bioplynu a vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO vyprodukoval 7,7 ml bioplynu. Doba celkového rozkladu vzorku je 80 minut a je podobná u všech testovaných vzorků mimo vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO. Ten se rozložil až po 280 hodinách.

Z průběhu křivek je patrné , že přidavek DEO ke vzorku hykolu způsobuje zpomalení biologického rozkladu vzorku a jeho vyšší přidavek výrazně snižuje jeho celkovou biodegradabilitu. Vzorek s obsahem 13,21 hm. % DEO má oproti čistému Hykolu o $\frac{1}{2}$ nižší produkci bioplynu za dvojnásobný čas rozkladu.

V baňce , kde byla testována toxicita DEO jde vidět , že oproti slepému pokusu produkce bioplynu nepatrně klesla. Lze tedy usuzovat , že DEO je pro mikroorganismy ve vodném anaerobním prostředí celkově neinhibující.

Obr. 28: Celková biodegradace D_t a fixační index FI (%) v závislosti na množství DEB

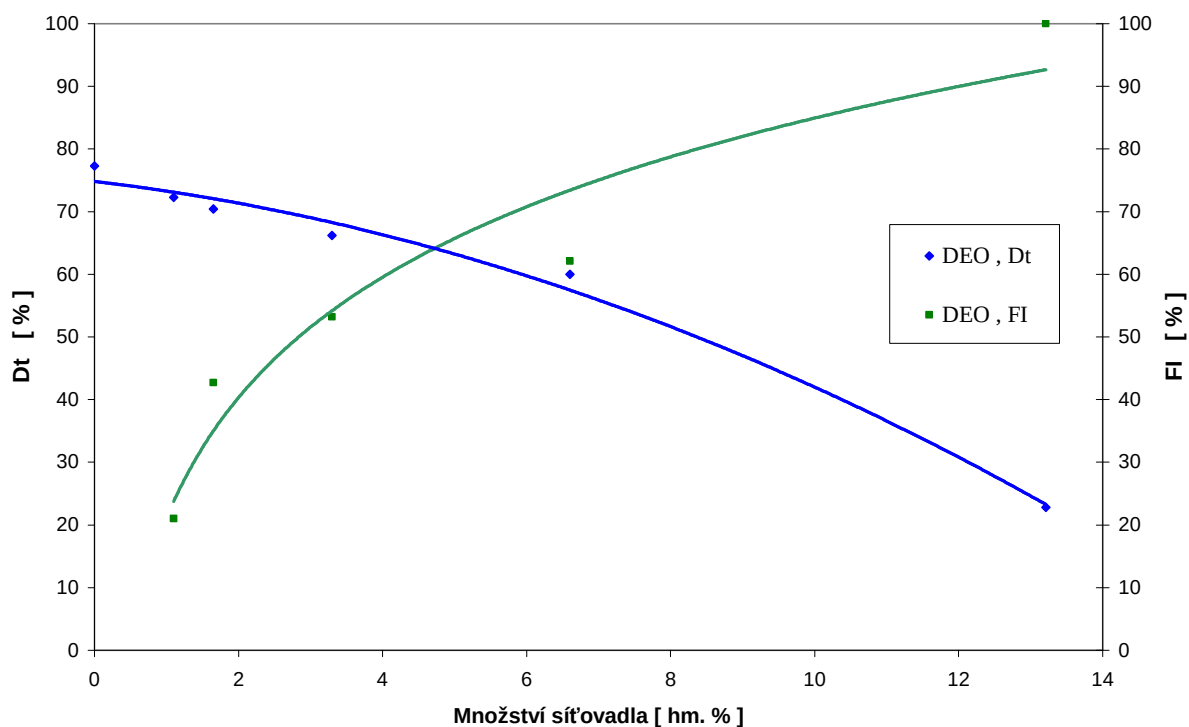


Obr. 28 znázorňuje závislost celkové biologické degradace D_t na množství použitého síťovadla DEB a velikost fixačního indexu na množství použitého síťovadla DEB.

Tab. 11: Sumární výsledky celkové biologické degradace vzorků síťovaných DEB

Vzorek	Hykol	0,76 DEB	1,13 DEB	2,27 DEB	4,53 DEB	9,06 DEB
D_t [%]	77,5	76,8	75,8	74,4	69,9	62,2

Obr. 29: Celková biodegradace D_t a fixační index FI (%) v závislosti na množství DEO



Obr. 29 znázorňuje závislost celkové biologické degradace D_t na množství použitého síťovadla DEO a velikost fixačního indexu na množství použitého síťovadla DEO.

Tab. 12: Sumární výsledky celkové biologické degradace vzorků síťovaných DEO

Vzorek	Hykol	1,10 DEO	1,65 DEO	3,30 DEO	6,60 DEO	13,21 DEO
D_t [%]	77,5	72,3	70,4	66,2	60,0	22,8

Tab. 13: Přehled výsledků testovaných vzorků modifikovaných pomocí DEB

		AcNa	Hykol	0,76 % DEB	1,13 % DEB	2,27 % DEB	4,53 % DEB	9,06 % DEB	DEB
TC [mg]	vstup	19,7	21,9	20,4	19,7	18,5	17,6	18,3	1,0
	výstup	8,8	5,4	4,0	5,8	4,2	1,9	5,0	_*
IC [mg]	vstup	1,4	1,9	1,4	1,6	1,2	1,4	1,2	0,5
	výstup	7,6	4,2	3,7	4,1	3,5	2,6	2,8	_*
TOC [mg]	vstup	18,1	19,7	18,6	17,9	17,1	16,0	16,9	0,5
	výstup	1,2	1,3	0,3	1,7	0,7	_*	2,3	_*
pH	vstup	7,75	7,64	7,62	7,65	7,63	7,67	7,65	7,55
	výstup	8,58	8,37	8,21	8,21	8,17	8,10	8,13	7,53
V _{bioplyn} [mg]		23,6	22,5	21,0	20,5	19,7	18,7	16,6	1,7
m _{bioplyn} [mg]		11,6	11,0	10,3	10,1	9,6	9,2	8,2	0,8
IC _{vys.} -IC _{vs.} [mg]		7,0	2,9	3,0	3,2	3,1	2,0	2,3	_*
D _t [%]		100,0	77,5	76,8	75,8	74,4	69,9	62,2	-
FI [%]		-	0,0	20,6	40,7	55,6	68,8	83,8	-

Tab. 14: Přehled výsledků testovaných vzorků modifikovaných pomocí DEO

		AcNa	Hykol	1,10 % DEO	1,65 % DEO	3,30 % DEO	6,60 % DEO	13,21 % DEO	DEO
TC [mg]	vstup	19,7	21,9	17,5	17,2	17,6	16,4	3,3	3,2
	výstup	8,8	5,4	_*	_*	_*	_*	_*	_*
IC [mg]	vstup	1,4	1,9	1,8	2,2	1,5	1,3	1,3	0,8
	výstup	7,6	4,2	1,5	1,8	1,8	1,8	_*	_*
TOC [mg]	vstup	18,1	19,7	15,4	14,7	15,8	14,8	1,7	2,1
	výstup	1,2	1,3	_*	_*	_*	_*	_*	_*
pH	vstup	7,75	7,64	7,61	7,68	7,62	7,58	7,54	7,56
	výstup	8,58	8,37	8,14	8,23	8,31	7,61	7,88	7,67
V _{bioplyn} [mg]		23,6	22,5	22,7	20,2	19,2	16,9	9,4	0,2
m _{bioplyn} [mg]		11,6	11,0	11,1	9,9	9,4	8,3	4,6	0,1
IC _{vys.} -IC _{vs.} [mg]		7,0	2,9	0,3	0,2	1,0	1,2	_*	_*
D _t [%]		100,0	77,5	72,3	70,4	66,2	60,0	22,8	-
FI [%]		-	0,0	21,0	42,7	53,2	62,1	100,0	-

*) hodnoty TC , IC a TOC byly v záporné , tedy pod hodnotou slepého pokusu

5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala hledáním vhodných podmínek pro síťování Hykolu, hodnocením vybraných vlastností zesíťovaných vzorků a sledováním biologického rozkladu modifikovaného hydrolyzátu kolagenu (Hykol E) za anaerobních podmínek. Hykol byl síťován pomocí diepoxy – 1,2:3,4 – butanu (DEB) a diepoxy – 1,2:7,8 – oktanu (DEO).

Při hledání vhodných podmínek pro síťování vzorků byly vybrány tři oblasti pH a to 2 ; 7 a 9. Při pH = 2 nedocházelo k požadovanému síťování přes $-NH_2$ skupiny , nýbrž epoxid se snaží reagovat s $-COOH$ skupinami a navíc je takto nízkým pH rozkládán. Při pH = 7 docházelo k navázání jak na skupiny $-NH_2$, tak na skupiny $-COOH$. Proto bylo jako nejvhodnější zvoleno pH = 9 , kde bylo možné víceméně eliminovat navázání na $-COOH$ skupiny.

Dále byly sledovány vybrané fyzikální a chemické vlastnosti. Zejména viskozita , rozpustnost , počet volných aminoskupin a FTIR spektra. Měřením viskozity mělo být zjištění molekulové hmotnosti jednotlivých síťovaných vzorků. Bohužel z průběhu naměřených křivek nebylo možné tuto veličinu určit objektivně , i když byl pozorován jistý trend vzrůstu hodnoty η_{spec}/c v závislosti na koncentraci roztoku a množství síťovadla.

Při zjišťování počtu volných aminoskupin byla využívána ověřená ninhydrinová metoda a je možné říci , že výsledky těchto stanovení odpovídají předpokladům ; tzn. , že s rostoucím množstvím síťovadla klesá počet volných $-NH_2$ skupin. To potvrdilo i nepřímo měření FTIR spekter , kdy oblasti vlnočtů $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$ je pozorovatelný široký pík , který odpovídá dávce epoxidu.

Bohužel je tato oblast příliš široká na to , aby bylo možné jednoznačně identifikovat skupinu , která jej vytváří. Dá se předpokládat , že se v této oblasti vyskytují $-OH$ skupiny vzniklé reakcí $-NH_2$ skupiny a epoxidu.

Při biologickém rozkladu testovaných vzorků byla sledována methanogenní aktivita přítomných mikroorganismů dle množství vyprodukovaného CO_2 , CH_4 a přírůstek anorganického uhlíku v kapalně fázi (rozpuštěný CO_2).

Byly testovány vzorky síťované pomocí DEB v množství 0,76 – 9,06 hm. % na sušinu Hykolu. U této síťované řady byla zjištěna celková biodegradace (D_t) v rozsahu 76,8 – 62,2 %. Zjištěním množství volných aminoskupin u síťovaných vzorků pomocí ninhydrinové metody byl stanoven fixační index (FI) v rozsahu 20,6 – 83,8 %.

Pro řadu vzorků síťované pomocí DEO v množství 1,10 – 13,21 hm. % na sušinu Hykolu byla zjištěna celková biodegradace (D_t) v rozsahu 77,5 – 22,8 %. Zjištěním množství volných aminoskupin byl stanoven fixační index (FI) v rozsahu 21,0 – 100 %.

Na základě dosažených výsledků je zřejmé, že s rostoucím zesíťováním Hykolu klesá jeho možnost rozpouštět se a tím i schopnost mikroorganismů pronikat do strukturní sítě modifikované bílkoviny a biologicky ji rozkládat.

SOUHRN

Tato práce obsahuje souhrn poznatků o průběhu síťování hydrolyzovaného kolagenu vybranými epoxidy 1,2:3,4 – diepoxybutan (DEB) a 1,2:7,8 – diepoxyoktan (DEO) a biologickém rozkladu připravených vzorků za anaerobních podmínek. Kromě biologického rozkladu byla věnována pozornost nejen studiu původního hydrolyzovaného kolagenu, ale také připraveným vzorkům z hlediska chemických a fyzikálních vlastností, průběhu síťování DEB a DEO, kinetice rozpouštění modifikovaných vzorků, viskozitním měřením roztoků a FTIR spekter.

Diplomová práce byla doplněna o stanovení $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$ skupin původního Hykolu, navržení vhodných podmínek pro přípravu síťovaných vzorků pomocí DEB a DEO, kinetiku rozpouštění modifikovaných vzorků, viskozitní měření roztoků Hykolu vč. jeho modifikací s použitými epoxidy a vyhodnocení FTIR spekter vzorků.

Na základě dosažených výsledků je zřejmé, že s rostoucím zesíťováním Hykolu klesá jeho možnost rozpouštět se a tím i schopnost mikroorganismů pronikat do struktury modifikované bílkoviny a biologicky ji rozkládat.

SUMMARY

This thesis contains survey of know-how about procedure of netting hydrolyze collagen with chosen epoxy's 1,2,3,4 - diepoxybutan (DEB) a 1,2,7,8 - diepoxyoktan (DEO) and biodegradation of prepared samples in anaerobic conditions. Apart from biodegradation was attention direct not only to study original hydrolyzed collagen but also to prepared samples from the point of view chemical and physical characteristics , procedure cross linking of DEB and DEO, kinetics of solution modified samples , viscosity measuring of solutions and FTIR spectrums.

Diploma thesis was complement of quantization -COOH a -NH_2 groups of original Hycol , nomination of available conditions for preparation of cross linked samples per DEB and DEO solution kinetics of modified samples viscosity measuring solution of Hycol including its modifications with used epoxies and evaluation FTIR samples spectrum.

Based on achieved results is obvious that with increasing cross linking of Hycol is dropping down its possibility to dissolve and also possibility of microorganisms penetrate to structure of modified protein and biodegradation it.

SEZNAM TABULEK

TABULKA	Strana
Tab. 1	<i>Množství přídatku sířovadla vyjádřené v hm. % na sušinu Hykolu 36</i>
Tab. 2	<i>Hmotnostní a látkové zastoupení DEB ve vzorcích 38</i>
Tab. 3	<i>Hmotnostní a látkové zastoupení DEO ve vzorcích..... 38</i>
Tab. 4	<i>Kinetika rozpouštění ve vodě vzorků Hykolu s DEB 39</i>
Tab. 5	<i>Kinetika rozpouštění ve vodě vzorků Hykolu s DEO..... 39</i>
Tab. 6	<i>pH roztoků použitých při měření viskozit 42</i>
Tab. 7	<i>Obsazení měřených míst při anaerobním rozkladu 56</i>
Tab. 8	<i>Vstupní hodnoty rozpuštěného uhlíku v testované baňce 59</i>
Tab. 9	<i>Výstupní hodnoty rozpuštěného uhlíku v testované baňce 60</i>
Tab. 10	<i>Hodnoty sušiny na výstupu u vybraných vzorků 61</i>
Tab. 11	<i>Sumární výsledky celkové biodegradace u vzorků s DEB 69</i>
Tab. 12	<i>Sumární výsledky celkové biodegradace u vzorků s DEO 70</i>
Tab. 13	<i>Přehled výsledků testovaných vzorků modifikovaných DEB 71</i>
Tab. 14	<i>Přehled výsledků testovaných vzorků modifikovaných DEO 71</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

OBRÁZEK	Strana
Obr. 1	<i>Schéma anaerobního biologického rozkladu</i> 11
Obr. 2	<i>Titrace Hykolu</i> 31
Obr. 3	<i>Titrace Hykolu, glycinu a L-leucinu</i> 31
Obr. 4	<i>Vliv pH prostředí na stupeň zreagování –NH₂ skupin Hykolu s epoxidy</i> 34
Obr. 5	<i>Závislost fixačního indexu na přídávku DEB a DEO</i> 36
Obr. 6	<i>Kinetika rozpouštění ve vodě vzorků Hykolu s DEB</i> 39
Obr. 7	<i>Kinetika rozpouštění ve vodě vzorků Hykolu s DEO</i> 40
Obr. 8	<i>Rozpusťnost síťovaných vzorků (po 90 min.) na množství epoxidu</i> 41
Obr. 9	<i>Závislost η_{spec} / c na koncentracích Hykolu při 25 °C</i> 45
Obr. 10	<i>Viskozitní měření vzorků modifikovaných pomocí DEB</i> 45
Obr. 11	<i>Viskozitní měření vzorků modifikovaných pomocí DEO</i> 46
Obr. 12	<i>Závislost LVČ ve vodě při 25 °C na dávce sířovadla</i> 46
Obr. 13	<i>FTIR spektra DEB a DEO</i> 50
Obr. 14	<i>FTIR spektra Hykolu při různých hodnotách pH</i> 51
Obr. 15	<i>FTIR spektra u vzorků modifikovaných s DEB</i> 52
Obr. 16	<i>Diferenční FTIR spektra vzorků modifikovaných s DEB</i> 53
Obr. 17	<i>FTIR spektra u vzorků modifikovaných s DEO</i> 54
Obr. 18	<i>Diferenční FTIR spektra vzorků modifikovaných s DEO</i> 55
Obr. 19	<i>Produkce CO₂ v závislosti na čase u základních látek</i> 61
Obr. 20	<i>Produkce CH₄ v závislosti na čase u základních látek</i> 62
Obr. 21	<i>Celková produkce bioplynu v závislosti na čase u základních látek</i> 62
Obr. 22	<i>Produkce CO₂ v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEB</i> 63
Obr. 23	<i>Produkce CH₄ v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEB</i> 64
Obr. 24	<i>Celková produkce bioplynu v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEB</i> 65
Obr. 25	<i>Produkce CO₂ v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEO</i> 66
Obr. 26	<i>Produkce CH₄ v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEO</i> 67
Obr. 27	<i>Celková produkce bioplynu v závislosti na čase u vzorků síťovaných DEO</i> 68
Obr. 28	<i>Celková biodegradace Dt a fixační index v závislosti na množství DEB</i> 69
Obr. 29	<i>Celková biodegradace Dt a fixační index v závislosti na množství DEO</i> 70

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

TC	total carbon (veškerý uhlík)	[mg/l]
IC	inorganic carbon (anorganický uhlík)	[mg/l]
TOC	total organic carbon (veškerý organický uhlík)	[mg/l]
AcNa	octan sodný	
-NH ₂	volná aminoskupina	[mmol/l]
-COOH	volná karboxylová skupina	[mmol/l]
A	Absorbance	
FI	fixační index	[%]
DEB	1, 2 : 3, 4 – diepoxybutan	
DEO	1, 2 : 7, 8 – diepoxyoktan	
D _t	celková biologická degradace	[%]
FTIR	Infra-červená spektroskopie s Fourierovou transformací	
UV	ultrafialová spektroskopie	
VIS	spektroskopie ve viditelné oblasti	
M _{BP}	hmotnost bioplynu	[mg]
V _{BP}	objem bioplynu	
pH	hodnota záporného logaritmu vodíkových iontů v roztoku	
w _{E/NH₂}	hmotnostní procenta množství síťovadla	[% _{hmot./ suš.hyk.}]
X _{E/NH₂}	molární procenta množství síťovadla	[% _{EP molární / NH₂}]
w _{/Hykol NH₂}	vyjádření 100%ní konverze, kdy zesít'ují všechny –NH ₂ skupiny	[%]
ν	kinematická viskozita	[mm ² /s]
η	dynamická viskozita	
ρ	hustota kapaliny	[g/cm ³]
η _r	relativní viskozita	
η _{spec}	specifická viskozita	
[η]	limitní viskozitní číslo (LVČ) nebo též vnitřní viskozita	[dl/g]
I	iontová síla roztoku	[mol/l]
M	molekulová hmotnost chemického individua	[g/mol]

LITERATURA

- [1] Dohányos M., Zábranská J., Jeníček P.: Anaerobní technologie v ochraně životního prostředí. Ministerstvo život.prostředí, Praha 1996
- [2] Kameya T., Murayama T., Urano K., Kitano M.: Biodegradation ranks of priority organic compounds under anaerobic conditions. Sci. Total Environ., 1995, pp 45-51.
- [3] Imamura E., M. D., Sawatani O., Koykanagi H, Noishiki Y., Miyata T.: Epoxy compounds as a new Gross-linking agent for porcine aortic leaflets: Subcutaneous implant studies in rats. J. Card. Surg. 4, 1989, 50 – 57.
- [4] Matsumura S., Toshima K.: Biodegradation of poly(vinyl alkohol) and vinyl alkohol block as biodegradable segment. Hydrogels and Biodegradable Polymers for Biaapplications, 1996, Vol. 627, pp 137 - 148.
- [5] Andrads A. L.: Biodegradability of polymers. Physical Properties of Polymers Handbook, Ed by J. E. Mark, AIP, 1996, pp 625 – 635.
- [6] Seal K. J.: Test methods and standards for biodegradable plastics. Chemistry and technology of biodegradable polymers, ED by Griffin, Haman & Hall, pp 116- 121.
- [7] Zábranská J. a kol.: Laboratorní metody v technologii vody. VŠCHT, Praha 1997; kap. 7.1, 7.2, 8.7, 8.8.
- [8] 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.
- [9] Adbel Shafy H. I.: Transformation in bioenergy production. Environmental Xenobiotics, ED by Richardson, Taylor&Francis Ltd., 1996, pp 95 – 119.
- [10] Hoffmann J., Řezníčková I., Růžička J.: Technologická cvičení z Ochrany prostředí II, FT UTB ve Zlíně ES, Zlín 2000.

- [11] Tu R., Lu C. L., Thyagarajan K., Ngyyen H., Shen S., Hata C., Quijano R. C.: Kinetic study of collagen fixation with polyepoxy fixatives., J.Biomed Mater. Res. 27, 1993, 3-9.
- [12] Kupec J.. Zpracování odpadních vod a kalů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická ES, Zlín 2002.
- [13] Verkem A., Kulyushnyi S., Schlarf H., Hamalers B.: Effect of pH and VFA on hydrolysis of organic solid waste. J.Environ. Energ-ASCE, 2000, Vol. 126, No. 12, pp. 1076 – 1081.
- [14] Lin CY.: Effect of heavy-metals in acidogenesis in anaerobic digestion. Water Research, 1993, Vol. 27, No. 1, pp. 147 – 152.
- [15] 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.
- [16] Sung H. W., Hsu H. L., Snih C. C., Lin D. S.: Gross-linking characteristics of biological tissues fixed with monofunctional or multifunctional epoxy compounds. Biomaterials 17, 1996, pp. 1404 – 1410.
- [17] Patil R. D., Dalev P. G., Mark J. E., Vassileva E., Fakirov S.: Biodegradation of chemically modified želatin films in soil. J. Appl., Polymer. Sci 78, 2000, pp.1341 – 1347.
- [18] Kolomazník K., Mládek M., Langmaier F., Janáčková D.: Experience in industrial practise of enzymatic dechromation of chrome shavings. J.Amer. Leather Chem. Assn. Q, 2000, Vol. 95, No. 2, pp. 43 – 84.
- [19] Alexy P., Bakoš D., Crkoňová G., Kolomazník K., Kršiak M.: Blends of polyvinylalcohol with collagen hydrolyzát: Thermal degradation and processing properties. Marcomol. Symposia, 2001, Vol. 170, pp.41 – 49.

- [20] Patil R. D., Dalev P. G., Mark J. E., Vassileva E., Fakirov S.: Biodegradation of chemically modified želatin films in simulated natural environment. *Biotechnik&Biotech.*15, 2001, 116 – 123
- [22] J. Musil, M. Adam, V.Houba: Vysokomolekulární složky a pojiva. Academia, Praha 1966
- [23] Instruction manual Total organic karbon analyse model TOC – 5000 A. Shimadzu Corp. Japan , (1996).
- [24] M. Jureček: Organická analyza II. ČSAV, Praha 1957; str.321.
- [25] Keil B., Šomová Z.: Laboratorní technika biochemie. ČSAV, Praha 1959.
- [26] Ionesen I.B., Trandafir V., Demetresca I., Iovu H., Zqirian G.: European Cells and Materiále, Vol.5, Iuppl 1, 2003, pp 10-11).
- [27] Hnaničková L.: Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2002.
- [28] Pšeja J.: Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2003.
- [29] Hrůzík P.: Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004.
- [30] Charvátová H.: Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2004.
- [31] Hrnčířík J.: Nepublikované sdělení.

EVIDENČNÍ LIST MAGISTERSKÉ DIPLOMOVÉ PRÁCE

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE: ÚSTŘEDNÍ KNIHOVNA UTB VE ZLÍNĚ	
AUTOR PRÁCE:	TUPÝ MICHAEL
NÁZEV PRÁCE	
ČESKY:	ANAEROBNÍ ROZKLAD BÍLKOVINNÉHO HYDROLYZÁTU SÍŤOVANÉHO VYBRANÝMI EPOXIDY
ANGLICKY:	ANAEROBIC BIODEGRADATION OF ALBUMINOUS HYDROLYZATE CROSS LINKING CHOICE EPOXIDE
VEDOUČÍ PRÁCE:	PROF. ING. JAN KUPEC, CSC.
VYSOKÁ ŠKOLA (NÁZEV A ADRESA):	
UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ, MOSTNÍ 5139, 760 01 ZLÍN	
FAKULTA TECHNOLOGICKÁ, NÁM. T. G. MASARYKA 275, 762 72 ZLÍN	
ÚSTAV INŽENÝRSTVÍ OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ	
ROK OBHÁJENÍ PRÁCE:	2005
POČET STRAN, OBRÁZKŮ, TABULEK: 82 STRAN , 29 OBRÁZKŮ , 14 TABULEK	
PŘEDMĚTOVÁ HESLA:	
ČESKY:	ANAEROBNÍ, BÍLKOVINY, EPOXIDY, BIOROZLOŽITELNOST, SPEKTRA, VISKOZITA, FIXAČNÍ INDEX, SÍŤOVÁNÍ
ANGLICKY:	ANAEROBIC, PROTEINS, EPOXIDES, BIODEGRADABILITY, SPECTRUM, VISCOSITY, FIXATION INDEX, CROSS LINKING
SOUHRN	
česky: Z výsledků je zřejmé , že s rostoucím zesíťováním Hykolu klesá schopnost mikroorganismů pronikat do struktury modifikované bílkoviny a biologicky ji rozkládat.	
anglicky: From achieved is obvious that with increasing cross linking of Hycol is dropping down possibility of microorganisms penetrate to structure of modified protein and biodegradation it.	

--