

Enzimatska razgradnja PLA i PLA/HPC biorazgradivih polimera

Bošković, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:796497>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Antonela Bošković

Enzimatska razgradnja PLA i PLA/HPC biorazgradivih polimera

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Mirela Leskovic, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Doc. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Vesna Ocelić Bulatović, poslijedoktorand
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Sveučilište u Zagrebu

Zagreb, rujan 2015.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Mireli Leskovic na predloženoj temi, stručnim savjetima i pruženom strpljenju.

Također, zahvaljujem se tehničaru Borisu Pleši na pomoći pri mjerenju mehanike materijala i dr. sc. Zrinki Buhin Štrulić koja je pomogla pri snimanju SEM mikrofotografija.

Hvala mojim kolegicama Matei Stanojević i Sanji Pavišić na pomoći u laboratoriju tijekom ovog diplomskog rada.

Najljepše hvala mojoj obitelji, posebno mojim roditeljima Zdenki i Danijelu na razumijevanju, savjetima, ljubavi i pruženoj potpori tijekom dosadašnjeg obrazovanja.

Veliko hvala svim mojim prijateljima koji su mi uljepšali moj studentski život i bili uz mene.

Na velikoj ljubavi i podršci.....

Mojoj zvijezdi vodilji....

Mom anđelu....

Bojanu

✍ Antonela Bošković

SAŽETAK

Alifatski poliesteri razgrađuju se jednim ili kombinacijom više mehanizama npr. hidrolizom, enzimskom, mikrobnom i toplinskom razgradnjom. Brzina razgradnje je ovisna o nekoliko čimbenika, uključujući i stupanj kristalnosti, hidrofilnost, sastav kopolimera, molekulsku masu, molekulnu građu, veličinu i geometriju uzoraka, i uvjete u okruženju razgradnje poput pH i temperature. Razgradnja u okolišu je praktički nepromjenjiva *in vivo*, stoga svojstva polimera u konačnici određuju brzinu razgradnje. Jedan od načina da se utječe na brzinu razgradnje jest uvođenje dodataka koji će povećati hidrofilnost polimera.

U ovom radu istražen je utjecaj hidroksipropil celuloze kao hidrofilne komponente na brzinu hidrolitičke razgradnje i svojstva poli(laktida) i poli(laktid)/hidroksipropil celuloza (HPC) mješavina (PLA/HPC) s enzimom kutinaze i α -amilaze.

α -amilaza je enzim koji se prirodno nalazi u ljudskom tijelu dok je kutinaza enzim svojom strukturom sličan lipazama, enzimima koji se također nalaze u ljudskom tijelu. Rezultati ukazuju na promjene svojstava i brzine razgradnje poli(laktida) dodatkom HPC, uz enzim kutinazu.

Ključne riječi : PLA, PLA/HPC mješavina, kutinaza, α -amilaze

ABSTRACT

Aliphatic polyesters degrade in one or in combination of several mechanisms, for example hydrolysis, enzymatic, microbial and thermal decomposition. Degradation rate is dependent on several factors, including the degree of crystallinity, hydrophilicity, copolymer composition, molecular weight, molecular structure, size and geometry of the sample, and environment conditions such as pH and temperature. Environmental degradation is practically unchanged *in vivo*, therefore, polymer properties, eventually, determine the degradation rate. One of the ways to influence the degradation rate is the integration of supplements that will increase the hydrophilicity of polymer.

In this diploma thesis influence of hydroxypropylcellulose (HPC) addition, as a hydrophilic component, on the hydrolytic degradation rate and properties of poly(lactide) (PLA) and *poly(lactide)/hydroxypropylcellulose* (PCL/HPC) blends with the presence of enzymes cutinase and α -amylase has been studied.

α -amylase is an enzyme that naturally occurs in the human body, while the cutinase has similar structure to lipases, enzymes that are also found in the human body. Results indicate the changes of the *poly(lactide)* properties and degradation rate with the addition of HPC and enzyme cutinase.

Keywords: PLA, PLA/HPC blend, cutinase, α -amylase

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Biomedicinski materijali	2
2.2. Poli(laktid) (PLA)	2
2.2.1. Dobivanje i struktura polilaktida	3
2.2.2. Svojstva polilaktida.....	5
2.3. Biorazgradljivost polimera	7
2.3.1. Biorazgradljivost polilaktida	8
2.4. Enzimski razgradnja	8
2.5. α - amilaze	9
2.6. Kutinaza	10
2.7. Hidroksipropilceluloza (HPC)	11
2.8. Površinske metode karakterizacije	12
2.8.1. FTIR – ATR spektroskopija	12
2.8.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	12
2.8.3. Mjerenje kontaktnog kuta.....	13
2.9. Toplinske metode karakterizacije	13
2.9.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC).....	13
2.9.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Materijali	16
3.3. Priprava fosfatom puferirane otopine soli (PBS)	18
3.4. Postupak enzimske razgradnje	19
3.5. Mjerenje kontaktnog kuta	20
3.6. FTIR-ATR spektroskopija	20
3.7. Diferencijalna pretražna kalorimetrija	21
3.8. Termogravimetrijska analiza	22
3.9. Određivanje mehaničkih svojstava	22
3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Utjecaj enzimske razgradnje na gubitak mase	24
4.2. Rezultati FTIR – ATR spektroskopije	27
4.3. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta	30
4.4. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC)	32
4.5. Rezultati termogravimetrijske analize	37
4.6. Rezultati mehaničkih svojstava	43
4.7. Pretražna elektronska mikroskopija, SEM	47

5. ZAKLJUČCI	54
6. LITERATURA	55
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA	58

1. UVOD

Zadnjih godina, značajan interes je usmjeren na istraživanja biorazgradivih polimera koji posjeduju ekološki opravdana svojstva u usporedbi s nerazgradivim ili sporo razgradivim sintetskim petrokemijskim polimernim materijalima. Biorazgradivi polimeri razgrađuju se u fiziološkom okruženju cijepanjem lanaca makromolekula u manje fragmente, i konačno u jednostavne stabilne krajnje produkte. Razgradnja se može odvijati na različite načine, kao napr. katalizom aerobnih i anaerobnih mikroorganizama, biološki aktivnim procesima (tj. enzimskim reakcijama) i hidrolitičkim cijepanjem.¹

Polilaktidna kiselina (PLA) jedan je od važnijih predstavnika polimera koji se dobivaju iz obnovljivih izvora. Tako se proizvodi od polilaktida široko primjenjuju u biomedicini. Međutim njen nedostatak je njena krhkost i niska žilavost unatoč visokom rasteznom modulu i čvrstoći. Fleksibilnost, žilavost i stabilnost taline PLA može se poboljšati različitim pristupima kao na primjer: kopolimerizacijom, zamiješavanjem i dodatkom plastifikatora. Općenito zamiješavanje predstavlja relativno jednostavan i lagan postupak u usporedbi s drugim načinima. U zadnje vrijeme, mješavine PLA s biokompatibilnim ili biorazgradivim polimerima kao što su polikaprolakton (PCL), poli(etilen glikol) (PEG), škrob i dr. istražuju se kao potencijalni materijali za primjenu kao nosači lijekova i u inženjerstvu tkiva. Zahvaljujući esterskoj vezi koja lako hidrolizira poliesteri imaju dominantnu ulogu kao biorazgradive plastike.

Potražnja za biomaterijalima s kontroliranom kinetikom razgradnje obuhvaća širok spektar biomedicinskih primjena, što je rezultiralo brojnim istraživanjima razgradnje različitih biorazgradivih polimera. Uvjeti korišteni tijekom obrade i proizvodnje polimernih materijala mogu također dovesti do razgradnje polimera, a time utječu na njihovo ponašanje razgradnje *in vivo*.

U ovom radu praćen je utjecaj hidroksipropil celuloze (HPC) kao hidrofilne komponente na strukturu, toplinska svojstva i brzinu razgradnje, PLA polimera i PLA/HPC (90/10) mješavina u PBS otopini uz prisutnost enzima α -amilaze i kutinaze .

2. OPĆI DIO

2.1. Biomedicinski materijali

Biomedicinski materijali su materijali koji se koriste za biološku dijagnozu, liječenje, popravak ili zamjenu tkiva, organa ili novi high-tech materijali kako bi se poboljšala njegova funkcionalnost. Postali su jedan od stupova industrije biomedicinskog istraživanja, koji pruža bogatstvo materijalne osnove za razvoj medicinske znanosti, farmakologije, biologije i drugih disciplina.²

Prema svojstvima, biomedicinske materijale dijelimo na:

- Biomedicinske metalne predmete (metalni materijali metala ili legura)
- Biomedicinski polimerni materijali (prirodni i sintetski)
- Anorganski nemetalni materijali za biomedicinsku ili biološku keramiku (biološki inertna keramika-aluminij); (bioaktivna keramika-bioaktivno staklo)
- Biomedicinski kompoziti (dva ili više različitih materijala)

Biopolimeri ili biorazgradivi polimerni materijali proizvode se različitim postupcima iz obnovljivih izvora životinjskog ili biljnog podrijetla i mogu se razgraditi kompostiranjem na ugljični dioksid, vodu, anorganske spojeve i biomasu. Tijekom tog procesa ne stvaraju nikakve štetne spojeve. Ovi se materijali pomoću fizikalnih, kemijskih i biokemijskih procesa pretvaraju u polimere, za čiju su proizvodnju do sada bila potrebna fosilna goriva.³

Biokompatibilnost je opisni pojam koji se odnosi na biološku prihvatljivost i podnošljivost materijala korištenih u medicini i stomatologiji. Pod biokompatibilnošću podrazumijeva se izostanak značajne interakcije između materijala i okolnog tkiva. Idealno biokompatibilan materijal trebao bi biti: nerazgradljiv, neiritirajući, netoksičan i nekancerogen.⁴

2.2. Poli(laktid) (PLA)

Polilaktid odnosno poli (laktidna) kiselina, PLA je biorazgradivi termoplastični alifatski poliester. Do danas je u svijetu najveći stupanj komercijalizacije u proizvodnji biorazgradljivih polimera postigla proizvodnja polilaktida ili polilaktidne kiseline (PLA),

biorazgradljive plastike dobivene polimerizacijom mliječne kiseline koja se proizvodi bioprocenom od biljaka bogatih škrobom (npr. krumpir, kukuruz, pšenica).

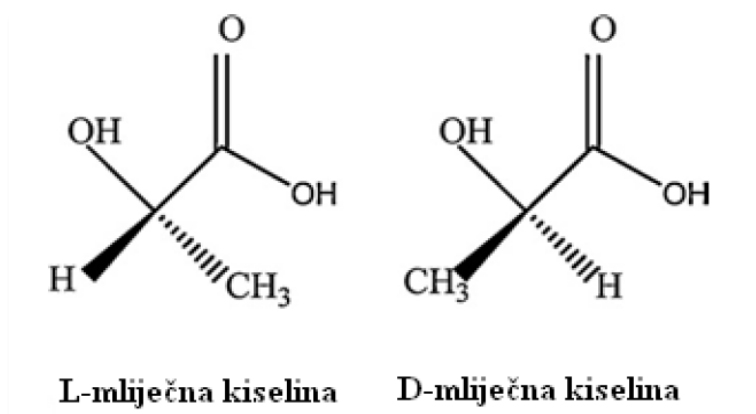
Osim što je biorazgradiva i komostabilna (primjena za kratkotrajnu ambalažu), PLA je biokompatibilan u kontaktu s živim tkivima (primjena u biomedicini). Uporabom PLA i sličnih vrsta biorazgradljive plastike stvorila bi se dodana vrijednost bez štetnog utjecaja na okoliš.

Zahvaljujući kiralnoj molekuli monomera iz kojeg je dobivena, PLA je jedna od rijetkih polimera sa stereokemijskom strukturom koja se jednostavno modificira polimerizacijom kontrolirane mješavine L i D izomera radi postizanja željenog stupnja kristalnosti i velike molekulske mase.

2.2.1. Dobivanje i struktura polilaktida

Monomer PLA-mliječna kiselina

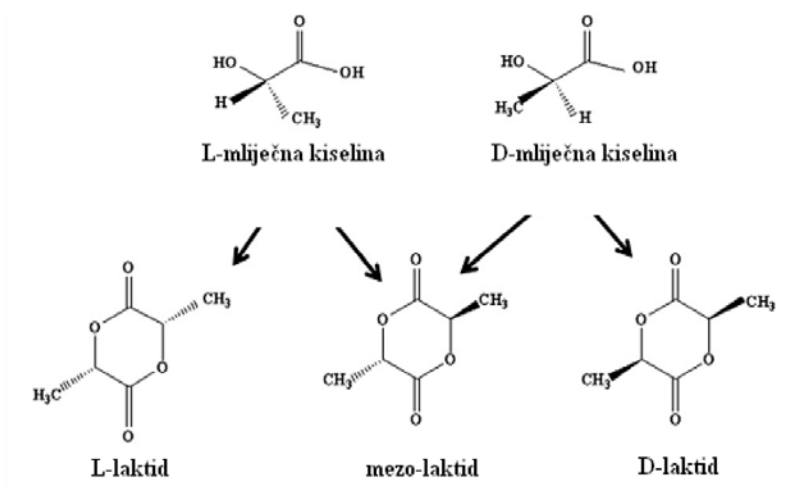
Monomer za dobivanje polilaktidne kiseline je mliječna kiselina, $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$. U svojoj molekuli sadrži jedan asimetrični ugljikov atom pa se pojavljuje u dvjema optički aktivnim modifikacijama: D – mliječna i L – mliječna kiselina. L – mliječna kiselina stvara se raspadanjem glikogena u mišićima koji su pod opterećenjem. D – mliječna kiselina nastaje vrenjem iz šećera i drugih ugljikohidrata djelovanjem anaerobnih bakterija.⁴



Slika 1. Stereoizomeri mliječne kiseline⁵

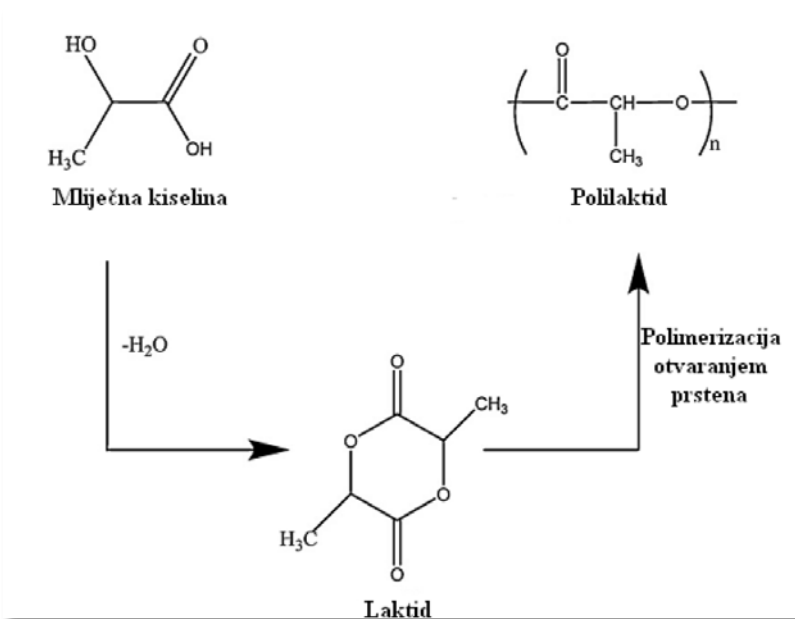
PLA se može dobiti na dva načina; izravnom kondenzacijom mliječne kiseline ili polimerizacijom otvaranja prstena. Komercijalni PLA kopolimeri su L- i D- laktida. Obično, L izomer je glavni produkt L – mliječne kiseline iz bioloških izvora, kao što su gljivične i

bakterijske fermentacije.⁴ Veliku primjenu u dobivanju polilaktidne kiseline ima polimerizacija laktida otvaranjem prstena. U prvoj fazi tijekom oligomerizacije isparavanjem se uklanja kondenzacijska voda. Ovisno o udjelu L i D stereoisomera, dolazi do stvaranja PLA oligomera niske molekulske mase koji se katalitički depolimeriziraju transesterifikacijom pri čemu mogu nastati tri stereoooblika: L – laktid, D – laktid i mezo – laktid (smjesa L i D izomera).



Slika 2. Stereoooblici laktida⁶

U drugoj fazi iz nastalog laktida monomera polimerizacijom otvaranja prstena nastaje polimer visoke molekulske mase.⁷



Slika 3. Polimerizacija otvaranjem prstena⁸

Polimerizacija otvaranjem prstena obično se izvodi katalizirana kositrovim oktoatom. Cargill Dow LL je razvio i patentirao ekonomični kontinuirani proces za proizvodnju polilaktida. Taj proces ujedinjuje značajne ekološke i ekonomske koristi sinteze laktida i PLA iz taljevine umjesto iz otopine i prvi osigurava komercijalno održiv biorazgradivi polimer iz obnovljivih izvora.⁵

2.2.2. Svojstva polilaktida

Fizikalna svojstva

Polilaktid je proziran, bezbojan, termoplastičan materijal sličan polistirenu. Na sobnoj i tjelesnoj temperaturi je krta, neovisno o stupnju kristalnosti.⁹ Biopolimer je netopljiv u vodi, ali se otapa u organskim otapalima kao što je kloroform i diklormetan. Oko 99 % mliječne kiseline pripremljene fermentacijom je oblik L – mliječne kiseline. Dok su D i L – PLA oblici mliječne kiseline polu-kristalni polimeri s visokim talištem od 180 °C i tranzicijskim temperaturama između 55 – 60 °C, D,L – PLA je amorfan.¹⁰ PLA proizvod od L – mliječne kiseline ima visoku čistoću, transparentnost nakon što je film i jednostavnost izrade. Iz tih razloga, PLA je postao potencijalni polimerni materijal zbog svojih različitih prednosti kao što je : smatra se obnovljivom plastikom od svoje sirovine, uključujući saharozu, kukuruz i tapioke šećera.¹¹

Toplinska svojstva

Enantiomerski čist PLA je djelomično kristalast polimer s temperaturom staklastog prijelaza (T_g) između 50 – 60 °C i talištem (T_m) oko 180°C.¹² Iznad točke staklišta PLA je u visokoelastičnom, a ispod T_g u staklastom stanju. PLA ima sposobnost u staklastom stanju puzanja sve do hlađenja na temperaturi od -45 °C kada dolazi do prijelaza u β – oblik i nakon čega se ponaša kao krhki polimer. Može kristalizirati polaganim hlađenjem pri čemu stupanj kristalnosti i tališta lako mogu varirati ovisno o uvjetima procesa polimerizacije i udjelu mezo, D – i L- laktida. PLA kristalizira u 3 oblika: α , β i γ . α – oblik je stabilniji s temperaturom taljenja na 185 °C, dok β – oblik ima talište na 175° C.¹³ Za PLA se veže pojam hladne kristalizacije. Pri temperaturi staklastog prijelaza PLA prelazi iz staklastog u visokoelastično stanje, pri čemu se potpuno rastali. Daljnjim zagrijavanjem dolazi do hladne kristalizacije, to

je proces kristalizacije iz kapljevitog kristalnog stanja u kojem polimer ima nizak stupanj kristalizacije. Kristalnost PLA polimera se najčešće određuje pomoću diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) mjerenjem topline fuzije (ΔH_m) i topline kristalizacija (ΔH_c), stupanj kristalnosti se može odrediti prema jednadžbi (1) :

$$\text{-----} \quad (1)$$

Stupanj kristalnosti PLA se u nekim slučajevima nastoji povećati kako bi se dobila veća toplinska otpornost materijala. Amorfni PLA niskog modula iznad temperature staklastog prijelaza zahtjeva modifikaciju. Stupanj kristalnosti može se povećati polaganim hlađenjem. Polukristalni uzorci mogu se dobiti prestankom zagrijavanja iznad pika kristalizacije i prije početka taljenja uz daljnje hlađenje na sobnu temperaturu. Dvostruki pik taljenja PLA odgovara različitim kristalnim oblicima, stabilniji, α – oblik se tali na višim temperaturama, a manje stabilan, β – oblik na nižim temperaturama.¹³

Mehanička svojstva

Mehanička svojstva PLA ovise o molekulskoj strukturi, strukturi kristala i morfologiji. PLA predstavlja alternativu petrokemijskoj plastici u mnogim primjenama, zbog svoje čvrstoće i krutosti.¹⁴ Stereokemijska građa može se lako kontrolirati polimerizacijom D – laktida, L – laktida, D,L – laktida s ciljem stvaranja slučajnih ili blok stereo – kopolimera, dok se molekulska masa direktno kontrolira dodatkom hidroksilnih spojeva kao laktidna kiselina, voda ili alkoholi.¹⁵ Promatrajući utjecaj kristalnosti, pokazalo se da polukristalni PLA u odnosu na amorfni ima bolja mehanička svojstva, visoku čvrstoću i krutost. Molekulska masa PLA ima utjecaj na svojstva tako da se vrijednosti rasteznog modula povećavaju porastom mase polimera.⁵ PLA homopolimeri koji su krhki i imaju visoki modul mogu postići fleksibilnost uključivanjem polimera niskog T_g u lance. Tako na primjer kopolimerizacija sa ϵ - kaprolaktonkopolimera koji imaju nižu rasteznu čvrstoću, ali veću elastičnost, postiže se porast istezanja i viša udarna žilavost.¹⁶⁻¹⁷ Kristalizirani PLA se lomi prije granice popuštanja dok amorfni PLA pokazuje granicu popuštanja na oko 5 % istezanja i kod naprežanja od 47 MPa uz izvjesnu sposobnost plastičnog tečenja; kod loma prosječno istezanje je oko 18 % i čvrstoća kod loma je 41 MPa.¹⁸ Iako PLA ne zadovoljava svojstva žilavosti, danas je velik

interes usmjeren na mješavine PLA kojima bi se također zadržala i biodegradibilnost materijala uz odgovarajuća mehanička i barijerna svojstva.¹⁹

2.3. Biorazgradljivost polimera

Biorazgradljivi polimeri se prema podrijetlu mogu klasificirati u 4 osnovne skupine:

- Prirodni polimeri
- Kemijski modificirani polimeri
- Sintetski polimeri sastavljeni iz obnovljivih konstitucijskih jedinica
- Sintetski polimeri sastavljeni iz neobnovljivih konstitucijskih jedinica

Očekuje se daljnje širenje primjene polimernih materijala zahvaljujući njihovim sve nižim cijenama, poboljšanim svojstvima, zakonskom poticanju uporabe biorazgradljivih materijala.

Biorazgradnja (e. biodegradation) je razgradnja koja uzrokuje biološka aktivnost, posebno enzimatska, koja dovodi do značajne promjene u kemijskoj strukturi materijala.²⁰

Biorazgradljiva plastika (e. biodegradableplastic) je plastika koja se djelovanjem prirodnih mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i alge razgrađuje u niskomolekulne spojeve.²¹

Potpuna biorazgradljivost (e. ultimatebiodegradability) naziva se raspadanje organskog kemijskog spoja djelovanjem mikroorganizama u prisutnosti kisika do ugljikova (IV) oksida, vode i mineralnih soli bilo kojeg prisutnog elementa i nove biomase ili bez prisustva kisika do CO₂, CH₄, mineralnih soli i nove biomase.⁸

Bioplastika može u potpunosti zamijeniti mnoge postojeće sintetske plastične materijale te se prerađivati u filmove, folije ili otpreske. Najviše se prerađuje u biorazgradljive plastične vrećice i ambalažu tj. u proizvode kratkog životnog vijeka ili namijenjene jednokratnoj uporabi gdje je poželjna biorazgradljivost materijala. Očekuje se i daljnje širenje primjene tih polimernih materijala zahvaljujući njihovim sve nižim cijenama, poboljšanim svojstvima, zakonskom poticanju uporabe biorazgradljivih materijala, te edukaciji krajnjih korisnika.

2.3.1. Biorazgradljivost polilaktida

U 2005. Godini najveći dio biorazgradivih polimernih materijala odnosio se na one načinjene od škroba (više od 47 %). Na drugom mjestu po potrošenoj količini bili su PLA, a zatim sintetski alifatsko – aromatski kopoliesteri. Polilaktid (PLA) je biorazgradivi termoplastični linearni poliester, po svojim svojstvima sličan polistirenu. U aerobnim uvjetima potpuno se razgrađuje preko mliječne kiseline u vodu i ugljični dioksid, a biorazgradnja u povoljnim uvjetima traje 3 – 4 tjedna. Najvećim dijelom prerađuje se u toplooblikovane podloške i spremnike za pakiranje i serviranje hrane, filmove, boce i drugu puhanu ambalažu.³ Zadnjih godina, PLA se zbog lakoće oblikovanja i velike mehaničke čvrstoće uglavnom koristi za proizvodnju medicinskih implanata u obliku sidra, vijka, pločica, igla i šipke.²² U obliku vlakana i netkanih tekstila PLA se koristi npr. kao presvlaka, jednokratna odjeća, za tende, žensku higijenu proizvoda i pelene. Zbog visoke cijene (1.80 – 4.00 Eura/kg) ugrožena je njegova kompetitivnost u odnosu na petrokemijske termoplaste. Za proširenje primjene PLA treba poboljšati svojstva kao što su udarna žilavost, svojstva nepropusnosti za plinove i vodenu paru, termičku stabilnost i sniziti troškove proizvodnje.

2.4. Enzimska razgradnja

Enzimi su biološki katalizatori, oni ubrzavaju stope reakcija u živim organizmima, bez da prolaze sami svaku trajnu promjenu. U stvari u odsutnosti enzima većina reakcija staničnog metabolizma neće se dogoditi. Enzimska hidroliza polimernih biomaterijala je heterogeni proces koji utječe na način interakcije između enzima i polimernih lanaca uključuje 4 koraka: prolazak enzima iz otopine za punjenje za čvrstu površinu, adsorpcija enzima na podlogu; što je rezultiralo u formiranju enzim – supstrat kompleks, kataliza reakcije hidrolize i širenje topljivih razgradnih produkata iz krutina supstrata u otopini. Kemijska modifikacija polimera (umrežavanje, uklanjanje ili uvođenje u kemijske grupe u polimernom lancu) također može utjecati na enzimsku degradaciju od cijene, ovisno o stupnju kemijske modifikacije može ugroziti sposobnost enzima da prepozna mijenjati supstrat. Krv plazma sadrži više od 150 proteina, i svaki od ovih može se adsorbirati na biomaterijal, ovisno o vezanju potencijala određenog proteina. Proteini mogu adsorbirati na površinu s biomaterijalom niskog afiniteta i mogu biti zamijenjene s drugim proteinima s višim

afinitetom vezanja. Taloženje proteina na površini biomaterijala slijedi pridržavanje određenog tipa stanica. Enzimi prisutni u serumu mogu se podijeliti u 2 kategorije: u plazmi specifičnih enzima i ne – specifičnih plazma enzima. Određivanje enzimске aktivnosti u plazmi korišten je za kliničku dijagnozu od visoke razine određenih enzima u serumu što može ukazivati na oštećenje tkiva ili kvara. Enzim kataliziran katalizatorom razgrađuje polimerne biomaterijale i može slijediti mehanizam erozije površine pogotovo za visoke kristalne i hidrofobne homopolimere. Zbog njihove relativno velike veličine, molekule enzima ne mogu prodrijeti u čvrsto upakiranu strukturu pojedinih polimera, tako da se enzimska kataliza pojavljuje na polimer – enzim sučelju. Kao ponižavajuće površine postaje hrapavost ili fragmentiran, enzimsko djelovanje može pojačati kao rezultat povećane površine. Mehanizam enzimске razgradnje polimernih materijala ovisi i o drugim čimbenicima kao što su kemijski sastav, stupanj homogenosti i tehnike obrade.²³

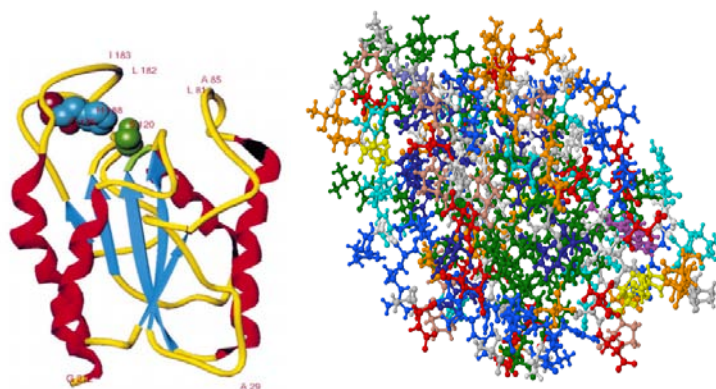
2.5. α - amilaze

α - amilaze su enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize α -1,4) glikozidne veze u molekulama škroba te se svrstavaju u skupinu hidrolaza i podskupinu glikozidaza. α - amilaza je široko rasprostranjen enzim u prirodi s obzirom da je škrob jedan od najrasprostranjenijih ugljikohidrata te služi kao izvor energije za životinje, biljke i mikroorganizme.²⁴ U ljudskom organizmu α - amilaza nalazi se u slini te je luči gušterača prilikom probave hrane. α - amilaza je enzim koji se sastoji od proteinskog dijela (apoenzim) te od neproteinskog dijela enzima (prostetičke skupine). Funkciju prostetičke skupine α - amilaza ima ion kalcija te je α - amilaza enzim aktiviran metalom. Aktivnost α - amilaze ovisit će o koncentraciji kalcijevih iona u otopini.²⁵ Sekvencija aminokiselina proteinskog dijela α - amilaze znatno se razlikuje kod α - amilaza iz različitih izvora. Prostorna struktura α - amilaza sastoji se od tri domene (A, B, C) od kojih je domena A najveća. Karakteristike domene A je osam paralelno poredanih β - nabranih ploča koje formiraju cilindar oko kojeg se nalaze koncentrično poredano osam α - uzvojnica. U α - amilazi iz ljudske gušterače u domeni B je vezan ion kalcija, dok je u domeni A vezan ion klora. Uloga iona kalcija u domeni B je povezivanje s domenom A te stabilizacija katalitički aktivnog centra koje se nalaze u domeni A. Katalitički

aktivan centar α - amilaze čini tirada Asp (asparaginska kiselina)- Glu (glutaminska kiselina) - Asp (asparaginska kiselina).²⁶

2.6. Kutinaza

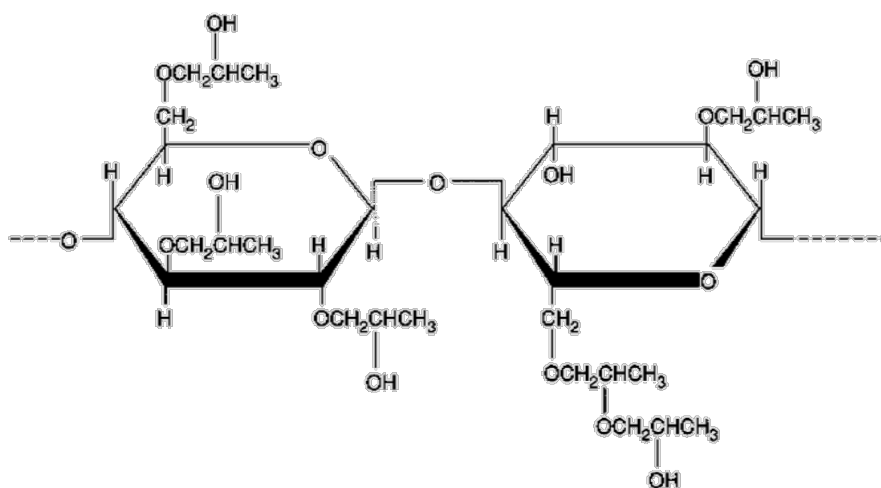
Kutinaze su hidrolitički enzimi koji kataliziraju reakciju hidrolize kutina (kutin - strukturni poliestar koji izgrađuje kutikulu biljaka). Osim kutina, kutinaze kataliziraju reakciju hidrolize esterske veze nekih od sintetskih polimera te esterske veze triglicerida.²⁷ Glavne dijelove prostorne strukture kutinaze čini pet paralelnih β - nabranih ploča koje su lagano zakrivljene, a oko njih se nalaze četiri α - uzvojnice (slika 4). Kutinaza spada u skupinu hidrolaza i podskupinu serinesteraza na koje je karakteristično da se katalitički aktivan serin nalazi na okretu koji spaja C - terminalni kraj β - nabrane ploče i α - uzvojnica. Osim serina (Ser 120) katalitički aktivnu trijadu čine asparaginska kiselina (Asp 175) i histidin (His 188). Navedena katalitički aktivna triada također je karakteristična za lipaze i esteraze. Za lipaze je karakteristično da kataliziraju hidrolizu esterskih veza kod netopljivih triglicerida koji sadrže dugolančane masne kiseline, dok je za esteraze karakteristično da kataliziraju hidrolizu esterskih veza kod triglicerida koji sadrže masne kiseline s kratkim lancima, ne duljim od šest ugljikovih atoma.²⁸ Kutinaza pokazuje veću katalitičku aktivnost u reakcijama hidrolize triglicerida koji sadrže kratkolančane masne kiseline.²⁹



Slika 4. Prikaz trodimenzijske strukture kutinaze²⁹

2.7. Hidroksipropilceluloza (HPC)

Hidroksipropil celuloza je neionski u vodi topljivi celulozni eter sa značajnom kombinacijom svojstava. Povezuje organsku topljivost otapala, termoplastičnost i površinsku aktivnost s nataloženim zadebljanjima i stabilizacijskim svojstvima karakterističnim za druge u vodi topljive polimere. Proizvodi se reakcijom lužnate celuloze s propilenoksidom, na povišenoj temperaturi i tlaku. Propilen oksid može supstituiran na celulozi preko esterske veze na tri reaktivne hidroksilne skupine prisutne u svakom anhidroglukoznom monomerne jedinice u celuloznom lancu. Sekundarni hidroksil prisutan u bočnom lancu je dostupan za daljnju reakciju s oksidom i učlanjivanje se može odvijati, to rezultira formiranjem bočnih lanaca koji sadrže više od jednog mola kombinacija propilen oksida.



Slika 5. Struktura hidroksipropilceluloze (HPC)³⁰

Apsorbira vlagu iz atmosfere kao i drugi u vodi topljivi materijali, sugerirano je da se Klucelhydroxypropylceluloza skladišti u dobro zatvorenim spremnicima i u suhoj atmosferi da bi se spriječilo povećanje sadržaja vlaga. Ima odlična vezivna svojstva, često se koristi kao privremeno vezivo u proizvodnji keramike, glazure, vatrostalni i praškastih proizvoda od metala. Topiv je u vodi pri sobnoj temperaturi, dok je iznad 45 ° C u vodi netopiv međutim lako je topiv u mnogim organskim otapalima. Izvrstan je termoplastični polimer koji može obraditi sve metode izradbe koje se koriste za plastiku. Koristan je u stvaranju premaza / obloga na papirima, tkaninama, prehrambenim proizvodima i ostalim supstratima. Fleksibilne ambalaže prevlaka i ploča mogu se proizvesti konvencionalnim tehnikama ekstruzije. Premazi mogu biti nanoseni ekstruzijom ili sustavom vodenih ili organskih otapala.

Sve prevlake Klucelhydroxypropylceluloza karakteriziraju slijedeća izvanredna svojstva: izvrsna fleksibilnost, nedostatak ljepljivosti pri visokoj vlažnosti, dobra toplinska izolacija i barijera za ulja i masti. Budući da su prevlake Klucelhydroxypropylceluloze inherentno fleksibilne nije potrebno dodavati plastifikatore kako bi se odbacile prevlake. Međutim, u ekstrudiranim prevlakama plastifikatori pružaju željeno podmazivanje koje nedostaje, smanjenje viskoznosti taline i poboljšavanje ravnomjernosti taline. U svim prevlakama dodani će plastifikatori omekšati prevlake, smanjiti temperaturu toplinske izolacije i dodati poboljšanu fleksibilnost te povećano produljenje.³⁰

2.8. Površinske metode karakterizacije

2.8.1. FTIR – ATR spektroskopija

FTIR-ATR Infracrvena spektroskopija: Prigušena totalna refleksija (*eng. Infraredspectroscopy: Attenuated total reflection – ATR*). ATR tehnika u kombinaciji s infracrvenom spektroskopijom omogućava ispitivanje uzoraka u krutom ili tekućem stanju bez daljnje pripreme. Refleksijska infracrvena spektroskopija može se provesti primjenom prigušene unutarnje refleksije (ATR) kada je uzorak relativno mekan materijal s niskim indeksom loma. Iskorištava fizička svojstva svjetlosti u susretu dva materijala s razlikama u indeksu loma; kada dolaze u kontakt s uzorkom različitog indeksa loma infracrveno svjetlo stvara prolazan val koji pruža vrlo malu i specifičnu dubinu prodora. Dubina prodora je reda veličine oko mikrometra.³¹

2.8.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) se temelji na identifikaciji sekundarnih elektrona koji se usmjeravaju prema površini uzorka. Upadni elektroni se vraćaju bilo kao primarno raspršeni prema natrag (*eng. „backscatteredelectrons“*) ili kao sekundarno raspršeni koji se najviše koriste za istraživanje površine. Sekundarni elektroni su niskih energija (manje od 50 eV) tako da samo oni stvoreni nekoliko nanometara ispod površine uzorka mogu izaći i biti detektirani. Također primarni elektroni mogu pobuditi karakteristično rendgensko zračenje kojim se analizira kemijski sastav uzorka. Međutim lakše će se detektirati sekundarni elektroni jer su vrlo brojni i malih energija. Za konvencionalne

slike u SEM, uzorci moraju biti električki vodljivi barem na površini, a električki uzemljeni kako bi se spriječilo nakupljanje elektrostatičkog naboja na površini. Uzorci koji se analiziraju SEM tehnikom moraju biti vodljivi kao metali zbog analize sekundarnih elektrona s površine. Uzorci koji nisu vodljivi trebaju se prethodno prekriti tankim slojem zlata, kroma i volframa raspršivanjem.³²

2.8.3. Mjerenje kontaktnog kuta

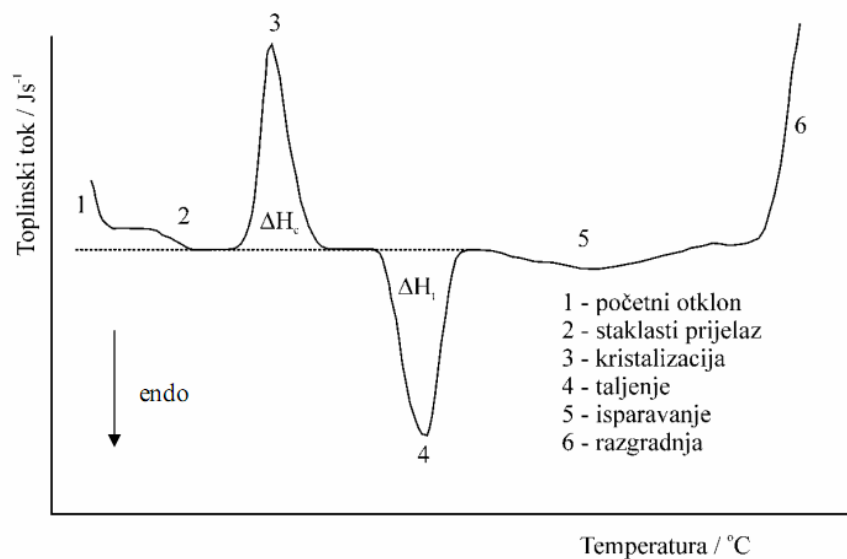
Određivanje kontaktnog kuta provodi se upotrebom uređaja goniometra. Goniometar preko video sustava projicira sliku kapljice na zaslonu računala; te određuje poziciju kapljice s točnošću od ± 1 mm. Mjerenje se provodi testnim kapljevinama poznatih vrijednosti energija površine. Mjeri se kut kapi na površini uzorka koji zajedno energijom površine poznatih kapljevinama i računanjem pomoću modela (Owens – Wendt – Kaeble model Wu model i van Oss model) daje vrijednost energije površine uzorka. Kut močenja može se odrediti kompjuterski; pomoću Whilhelmy metode ili Sessile drop metode, te može varirati od 0 do 180 °, ovisno razlici energija površine. U ovom radu kontaktni kut mjeren je metodom viseće kapi, odnosno Sessile drop metodom. Sessile drop metoda ili metoda viseće kapi – kada kap tekućine dođe u kontakt s čvrstom ravnom površinom, kapljica formira određeni oblik. Kontaktni kut se mjeri između osnove razine (dodirne površine tekućine i krute tvari) i tangente kapljice na granici triju faza (čvrsto, tekuće i plinovito).³³

2.9. Toplinske metode karakterizacije

2.9.1. Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) instrumentalna tehnika koja omogućava mjerenje i karakterizaciju toplinskih svojstava materijala. Toplinska analiza DSC – om zasniva se na zagrijavanju ili hlađenju uzorka i inertnog referentnog materijala programiranom brzinom. Zagrijavanje ili hlađenje uzorka javljaju se toplinski prijelazi kao npr. Taljenje i kristalizacija što rezultira s endotermnom ili egzotermnom promjenom. Količina topline

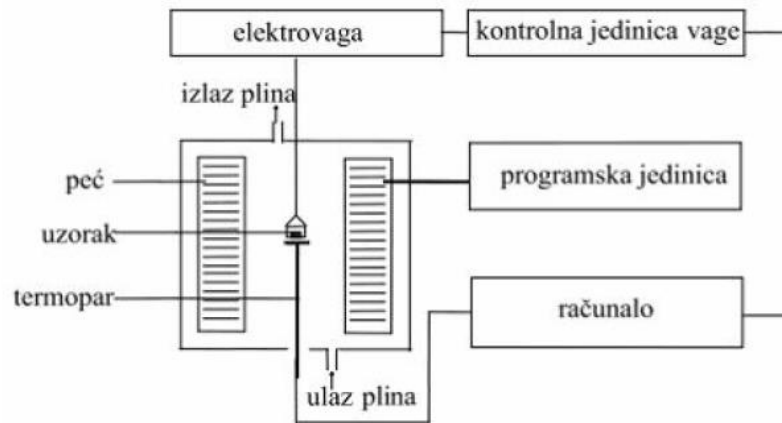
(energije) koju je potrebno dovesti uzorku ili odvesti da bi se održala konstantna razlika temperatura između ispitivanog i referentnog uzorka registrira se kao pik na DSC krivulji, gdje je ta vrijednost u svakom trenutku ekvivalentna brzini adsorpcije ili oslobađanja energije u uzorku. Metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije mogu se odrediti specifični toplinski kapacitet (C_p), promjena specifičnog toplinskog kapaciteta (ΔC_p), temperature faznih prijelaza; talište (T_m), staklište (T_g), kristalište (T_c), topline faznih prijelaza; topline kristalizacije (ΔH_c), topline taljenja (ΔH_t) i podaci o kemijskim reakcijama (polimerizaciji, oksidaciji i razgradnji).



Slika 6. Zbirna DSC krivulja¹³

2.9.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Toplinska gravimetrijska analiza (TGA) mjeri promjenu mase uzorka u ovisnosti o vremenu (izotermna TGA) ili temperaturi (neizotermna TGA). Najčešće korištena metoda za procjenu toplinske stabilnosti polimera.



Slika 7. Shema TGA analizatora¹³

Na dijagramu se može jasno vidjeti da je cijeli ravnotežni sustav je smješten u kućištu kako bi se zaštitio od prašine i ostvarila inertna atmosfera. Tu je kontrolni mehanizam za regulaciju protoka inertnog plina kako bi inertne atmosfere i vode da se ohladi peći. Senzor temperature peći je povezan s programom za kontrolu cijene grijanja, itd. ravnoteža proizvodnje i termopar signala može hraniti snimač za snimanje TGA krivulja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Polilaktid (PLA)

Za pripravu uzoraka za enzimsku razgradnju korišten je polilaktid (PLA), komercijalnog naziva Polylactide resin Ingeo™ 3251D, Nature Works LLC, USA. PLA je biorazgradiv termoplastični alifatski poliestar dobiven iz obnovljivih izvora kao što su: kukuruzni škrob, tapioka korijena, šećerne trske. Tipična fizikalna i mehanička svojstva PLA polimera, Polylactide resin Ingeo™ 3251D, prikazana su u tablici 1.

Tablica 1. Fizikalna i mehanička svojstva PLA polimera, Polylactide resin, Ingeo™ 3251D

Fizikalna svojstva			
gustoća (g cm ⁻³)	MFR, g/10 min (160°C, 5 kg)	talište T _m (°C)	staklište T _g (°C)
1,24	80	150-160	55-60

Mehanička svojstva	
Rastezna čvrstoća σ (MPa)	Prekidno istezanje ε (%)
62	3,5

Hidroksipropil celuloza

Za pripravu polimernih mješavina PLA/HPC korištena je hidoksipropil celuloza (2-hidroksipropil celuloza), komercijalnog naziva Klucel®HPC – G (farmaceutske čistoće), proizvođača Hercules Divison, USA. Hidroksipropil celuloza je neionski, vodo-topljivi celulozni eter raznolikih svojstava.

Površinski je aktivni termoplastični polimer, koji se može prerađivati različitim metodama za preradu plastike. M_w je 370.000, pH vodene otopine je 5,0 – 8,0, gustoće 0,5 g/cm³, temperature mekšanja 100-150°C. Potpuno se razgrađuje u području temperatura od 400-500°C u struji N₂ i O₂.

Topljiv je u hladnoj vodi i polarnim organskim otapalima ispod 38°C, a netopljiv u vodi iznad 45°C. Kompatibilan je s brojnim anionskim i amfoternim površinski aktivnim tvarima.

Fosfatom puferirana otopina soli (PBS) (engl. *phosphate buffered saline*)

Za pripravu otopine korištene su sljedeće kemikalije:

Natrijev klorid, p.a. čistoće, Gram Mol

Kalijev klorid, p.a. čistoće T.T.T. d.o.o.

Natrijev hidrogen fosfat, p.a. čistoće, SigmaAldrich

Kalijev dihidrogen fosfat, p.a. čistoće, SigmaAldrich

Deionizirana voda

Enzimi

Kutinaza, Novozym 435, Novozymes 20 mg/L

α -amilaza, BEISOL LZV CHT Bezema 20 mg/L

3.2. Priprava PLA/HPC mješavine

PLA/HPC mješavina sastava 90% PLA i 10% HPC pripravljena je u laboratorijskom uređaju za zamiješavanje u talini, Brabendergnjetilici, (slika 8.) umješavanjem pri temperaturi od 190 °C i brzini okretanja gnjetila 60 o/min. PLA i HPC tijekom 15 min, a zatim je mješavina izvađena iz gnjetilice, usitnjena te hlađena na sobnoj temperaturi.



Slika 8. Brabender gnjetelica

Dobivena talina prebačena je na teflonsku podlogu i usitnjena rezanjem. Pločice PLA polimera i PLA/HPC mješavina dimenzija 10 x 10 cm pripravljene su prešanjem na hidrauličkoj preši, Dake (slika 9.) pri temperaturi od 190 °C i tlaku od 135 bara u trajanju od 7 min uz predgrijavanje od 2 min i prešanje 5 min. Nakon toga uzorci su hlađeni pod tlakom, do 100 °C, te izvađeni iz kalupa.



Slika 9. Hidraulička preša Dake

3.3. Priprava fosfatom puferirane otopine soli (PBS)

Fosfatom puferirana otopina soli pripravljena je u odmjernoj tikvici volumena 1000 ml, prema prema sljedećoj recepturi, tablica 2.

Tablica 2. Komponente soli za pripravu PBS otopine

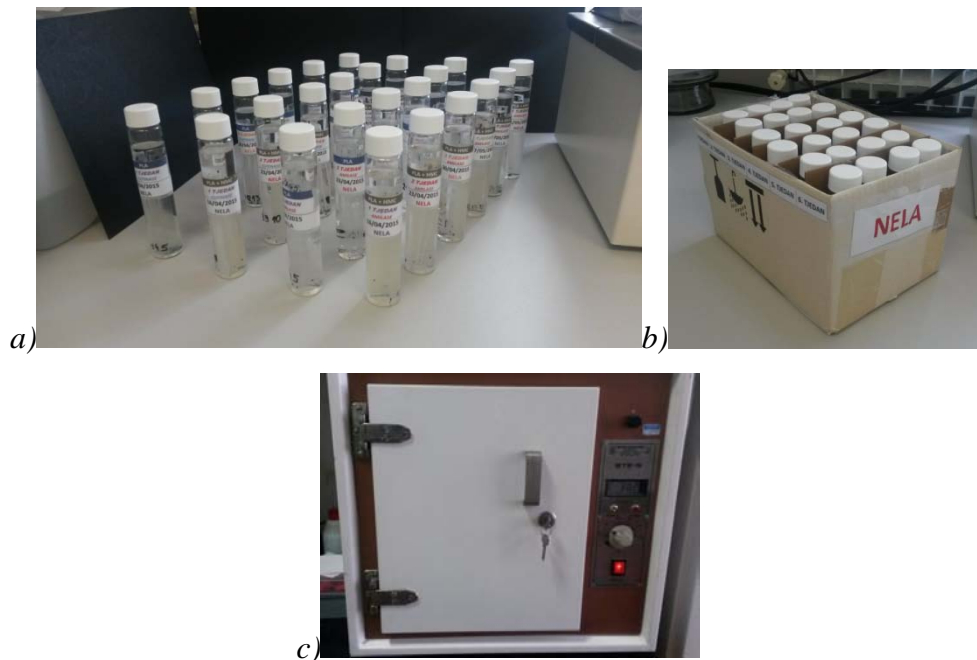
Komponenta	masa (g)
NaCl	8,00
KCl	0,20
Na ₂ HPO ₄	1,44
KH ₂ PO ₄	0,24

Navedene količine soli odvagane su i dodane u odmjernu tikvicu s 900 ml deionizirane vode. Nakon otapanja soli, tikvica se nadopuni vodom do oznake.

3.4. Postupak enzimске razgradnje

U 1000 ml fosfatom puferirane otopina soli dodano je 5 ml otopine enzima kutinaze i α -amilaze koncentracije 20 mg/L. Uzorci PLA-a i mješavine PLA/HPC dimenzija 1x10 cm su izvagani i stavljeni u bočice s PBS otopinom s enzimom, slika . U svaku bočicu je postavljeno 5 pločica, s razmakom od 1 mm između pojedine pločice. Hidrolitička razgradnja u PBS otopini enzima inkubirana je na 37 °C, tijekom različitih vremenskih perioda (6 tjedna). Nakon 168, 336, 504, 672, 840, 1008 sati uzorci su izvađeni iz otopine, isprani destiliranom vodom te osušeni na filtarskom papiru. Uzorci su zatim sušeni do konstantne mase na sobnoj temperaturi. Kako bi se utvrdila promjena mase uvjetovane razgradnjom uzorci su vagani nakon sušenja. Kao rezultat dobiven je postotni gubitak mase, GM polimera nakon razgradnje proračunat prema izrazu (2):

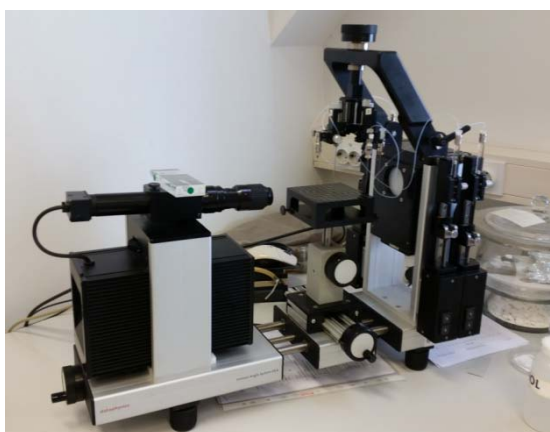
(2)



Slika 10. a) Posudice s uzorcima PCL, PLA, PCL/PLA i PCL/PLA/HPC mješavina prije stavljanja u inkubator, b) kutija s uzorcima i c) inkubator

3.5. Mjerenje kontaktnog kuta

Mjerenje kontaktnog kuta provedeno je na uređaju DataPhysics OCA 20 Instruments GmbH, slika 11. Kako bi se utvrdile promjene hidrofobnosti/hidrofilnosti uvjetovane razgradnjom kao testna kapljevina korištena je voda. Kontaktni kut je mjeran na 5 različitih mjesta izračunata prosječna vrijednost. Na pločici PLA-a i mješavine PLA/HPC mjeran je kontaktni kut s formamidom i glicerolom kao testnim kapljevinama. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi od 23°C.



Slika 11. Goniometar, instrument za mjerenje kontaktnog kuta, DataPhysics OCA 20 Instrument

3.6. FTIR-ATR spektroskopija

FTIR-ATR spektri PLA polimera i PLA/HPC mješavina prije i nakon različitih vremena izlaganja hidrolitičkoj razgradnji u otopinama različitih pH vrijednosti snimljeni su u području od 650 – 4000 cm^{-1} pomoću PerkinElmerSpectrum One Spectrometer spektrometra koristeći SingleReflection ATR System, slika 12. Spektri su snimljeni rezolucijom 4 cm^{-1} akumulirajući rezultat 4 skena.



Slika 12. FTIR spektrometar, PerkinElmer Spectrum One Spectrometer s ATR komorom

3.7. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Ispitivanja toplinskih svojstava uzoraka provedeno je na uređaju MettlerToledo DSC 822^e. Uzorci mase ~ 10 mg, stavljeni su u aluminijske posudice i hermetički zatvoreni. Mjerenje je provedeno pri brzini zagrijavanja/hlađenja 10 °C/min u temperaturnom području od -85 °C do 150 °C. Da bi svi uzorci imali jednaku toplinsku prošlost u prvom ciklusu su zagrijani na 150 °C brzinom zagrijavanja 10 °C/min te zatim hlađeni do -85 °C brzinom hlađenja 10 °C/min. Nakon toga proveden je još jedan ciklus zagrijavanja/hlađenja pri jednakim uvjetima. Toplinska svojstva uzoraka ispitana su prije i nakon enzimske razgradnje.



Slika 13. Diferencijalni pretražni kalorimetar, Mettler Toledo DSC 822e

3.8. Termogravimetrijska analiza

Toplinska stabilnost uzoraka ispitana je na uređaju TA Instruments Q500, slika14. Mjerenje je provedeno pri brzini zagrijavanja 10 °C/min u temperaturnom području od 25 °C do 900 °C. Uzorci mase oko 10 mg zagrijavani su u otvorenom platinskom lončiću u inertnoj atmosferi N₂ u protok 60 ml/min. Toplinska razgradnja je praćena prije i nakon enzimske razgradnje uzoraka.



Slika 14. Uređaj za termogravimetrijsku analizu, TA Instruments Q500

3.9. Određivanje mehaničkih svojstava

Eksperimentalno određivanje mehaničkih svojstava uzoraka provedeno je na univerzalnom uređaju za mehanička ispitivanja Zwick 1445. Mjerena su mehanička svojstva PLA-a i mješavine PLA/HPC prije i nakon enzimske razgradnje tijekom različitog vremenskog perioda. Mjerenje je provedeno pri brzini rastezanja uzoraka 50 mm/min i razmaku čeljusti kidalice 35 mm. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi 22 °C. Na slici 15. Prikazana je mehanička kidalica.



Slika 15. *Stroj za mehanička ispitivanja, Zwick 1445*

3.2. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Mehanizam popuštanja i morfologija uzoraka praćeni su pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM). Mikrografije polimera rađene su na pretražnom elektronskom mikroskopu visoke rezolucije, tipa TescanVega serija 3, Bruker, Češka. Uzorci su snimljeni u visokom vakuumu. Prije snimanja uzorci su neparavani zlatom kako bi se osigurala vodljivost. U komori za uzorke tlak je bio 10^{-5} Pa, a uzorci su snimljeni pri naponu od 10 kV i različitim povećanjima. Snimana je površina i mjesto kidanja čistih polimera PLA i PLA/HPC mješavina i nakon 6. tjedna razgradnje u PBS otopinama različitih enzima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj enzimske razgradnje na gubitak mase

U ovom radu praćen je utjecaj dodatka hidroksipropil celuloze kao hidrofilne komponente na brzinu razgradnje i svojstva polilaktida (PLA) i PLA/HPC (90/10) mješavina prije i nakon izlaganja uzoraka PBS otopini enzima kutinaze i amilaze.

Kako bi se utvrdio da li je tijekom različitih vremena hidrolitičke razgradnje PLA polimera i PLA/HPC mješavine u PBS otopini enzima kutinaze i α -amilaze, došlo do razgradnje, u određenim vremenskim intervalima tijekom 6. tjedana, vađeni su uzorci iz otopine, sušeni i vagani, te je određena promjena mase.

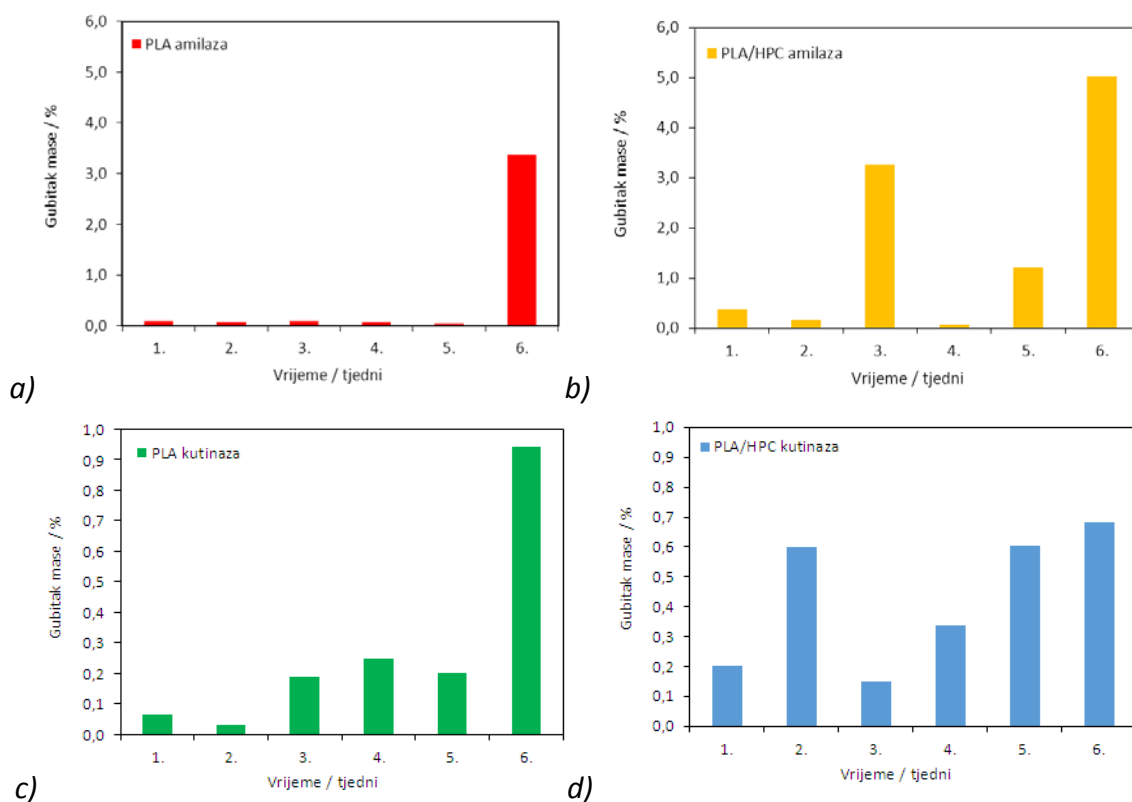
U tablicama 3. i 4., te na slikama 16. i 17. prikazan je gubitak mase uzoraka PLA polimera i PLA/HPC mješavine u ovisnosti o vremenu izlaganja tijekom 6 tjedana u fosfatnoj otopini s α -amilazom i kutinazom.

Tablica 3. Promjena mase PLA i mješavine PLA/HPC tijekom 6 tjedana u PBS otopini enzima α -amilaze i kutinaze

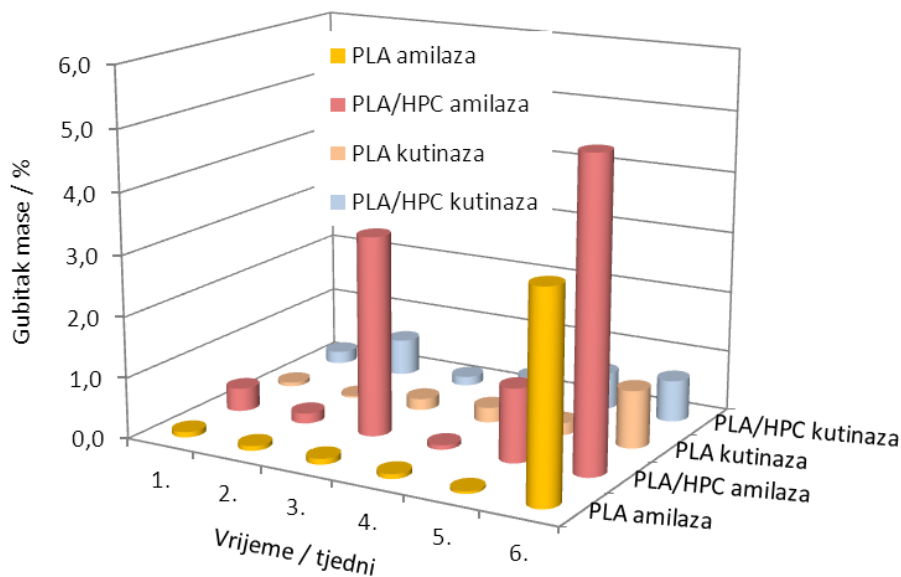
Enzim	Vrijeme razgradnje	Uzorak	Gubitak mase (%)
α -amilaza	1.	PLA	0,088±0,024
	2.	PLA	0,077±0,033
	3.	PLA	0,094±0,033
	4.	PLA	0,077±0,005
	5.	PLA	0,041±0,017
	6.	PLA	3,364±6,644
kutinaza	1.	PLA	0,065±0,025
	2.	PLA	0,032±0,016
	3.	PLA	0,187±0,029
	4.	PLA	0,246±0,080
	5.	PLA	0,201±0,180
	6.	PLA	0,944±1,488

Tablica 4. Promjena mase PLA/HPC mješavine tijekom 6 tjedana u PBS otopini enzima α -amilaze i kutinaze

Enzim	Vrijeme razgradnje	Uzorak	Gubitak mase (%)
α -amilaza	1.	PLA/HPC	0,383±0,065
	2.	PLA/HPC	0,166±0,086
	3.	PLA/HPC	3,267±5,601
	4.	PLA/HPC	0,074±0,071
	5.	PLA/HPC	1,209±0,093
	6.	PLA/HPC	5,018±4,346
kutinaza	1.	PLA/HPC	0,204±0,120
	2.	PLA/HPC	0,601±0,129
	3.	PLA/HPC	0,149±0,115
	4.	PLA/HPC	0,339±0,111
	5.	PLA/HPC	0,602±0,610
	6.	PLA/HPC	0,682±0,459



Slika 16. Gubitak mase a) PLA, b) PLA/HPC u PBS otopini α -amilaze i c) PLA, d) PLA/HPC u PBS otopini kutinaze tijekom 6. tjedana



Slika 17. Gubitak mase PLA i PLA/HPC kroz 6.tjedana u PBS otopini enzima α -amilaze i kutinaze

Vidljivo je da u PBS otopini s α -amilazom (slika 16 a) i b)) dolazi do značajnijeg gubitka mase PLA polimera i PLA/HPC mješavine u odnosu na kutinazu (slika 16 c) i d)). Od 1. do 5. tjedna nema značajne promjene mase s α -amilazom a zatim u 6. tjednu PLA gubi oko 3% a PLA/HPC oko 5% mase. slika 16 i 17, tablica 3. i 4.

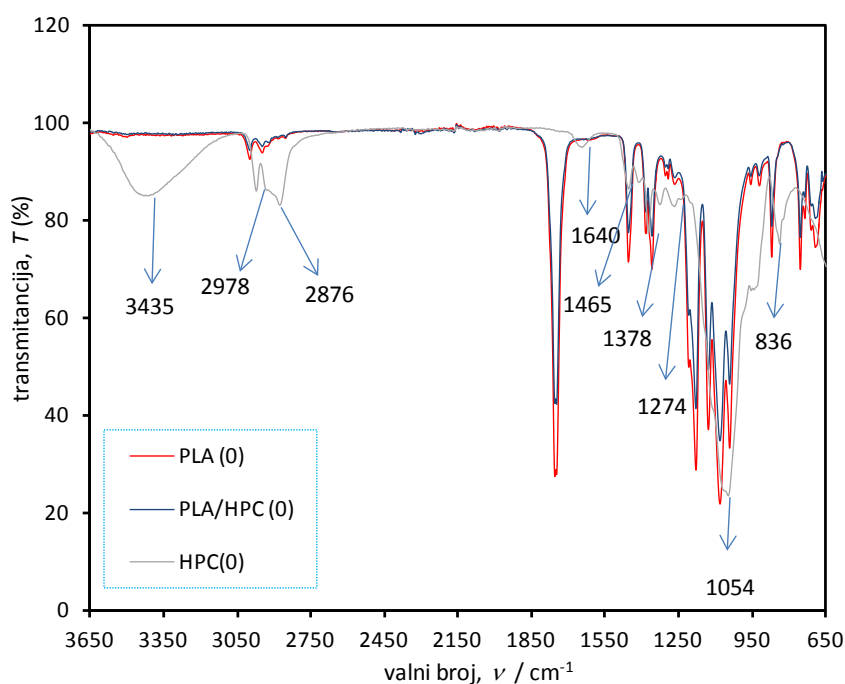
Nešto veći gubitak mase PLA/HPC mješavine vjerojatno je rezultat povećanja hidrofилности i površine kontakta dodatkom celuloze. Ceuloza lako bubri i otapa se u vodenom mediju (do 38°C) pa je za očekivati da otopina enzima lakše prodire kroz čitav presjek uzorka dok kod PLA spora difuzija vode rezultira površinskom erozijom. Značajniji doprinos brzini razgradnje vidljiv je kod PLA/HPC mješavine u otopini α -amilaze,

Iako je očekivan značajan utjecaj enzima kutinaze na razgradnju PLA koji je poliestar vidljivo je da tijekom 6 tjedana ne dolazi do značajnijeg gubitka mase niti kod PLA polimera niti kod PLA/HPC mješavine. PLA nakon 6. tjedna gubi oko 1% mase a PLA/HPC oko 0,7% mase.

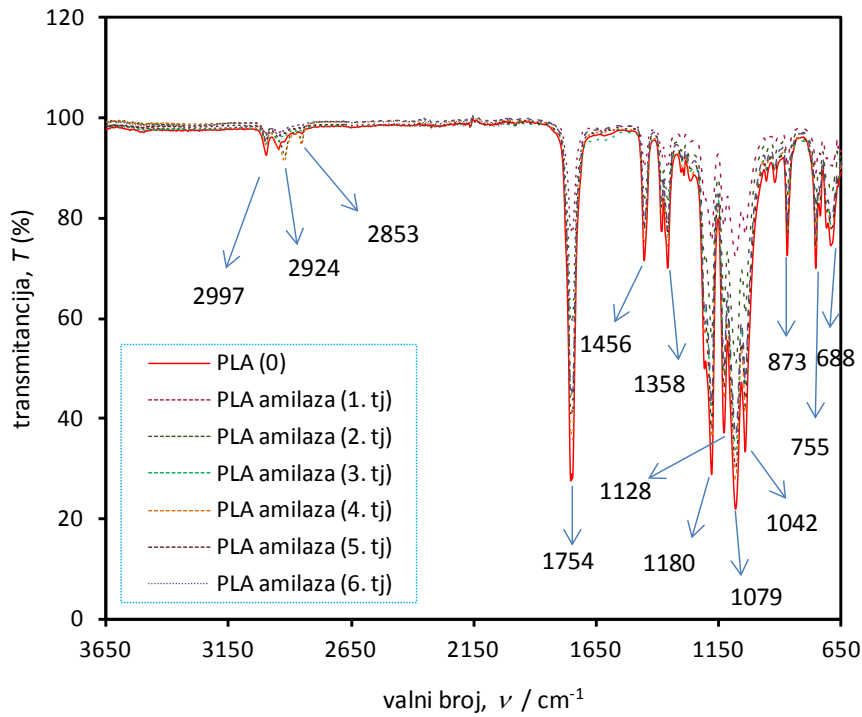
4.2. Rezultati FTIR – ATR spektroskopije

U nastavku su FTIR-ATR spektroskopijom praćene promjene u strukturi PLA polimera i PLA/HPC mješavine (90/10) tijekom 6 tjedana hidrolitičke razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze i α -amilaze.

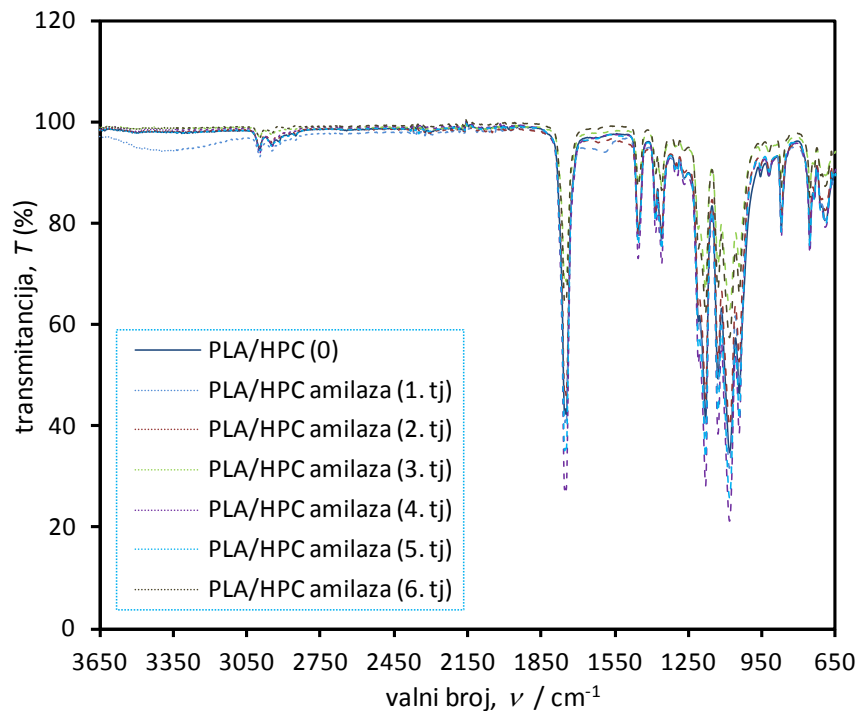
Usporedni FTIR-ATR spektri čistih komponenata PLA, HPC – celuloza i mješavine PLA/HPC dobiveni prije i tijekom različitih vremena, 1. - 6. tjedna hidrolitičke razgradnje u otopinama različitih enzima prikazani su na slikama 18.– 22.



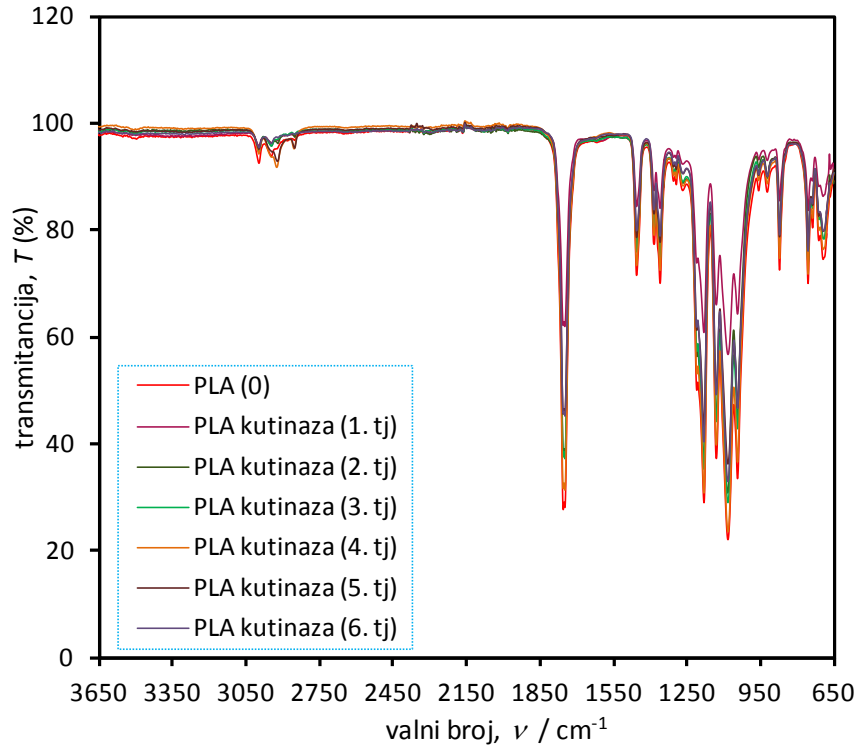
Slika 18. Usporedni FTIR spektri PLA, PLA/HPC i HPC polimera



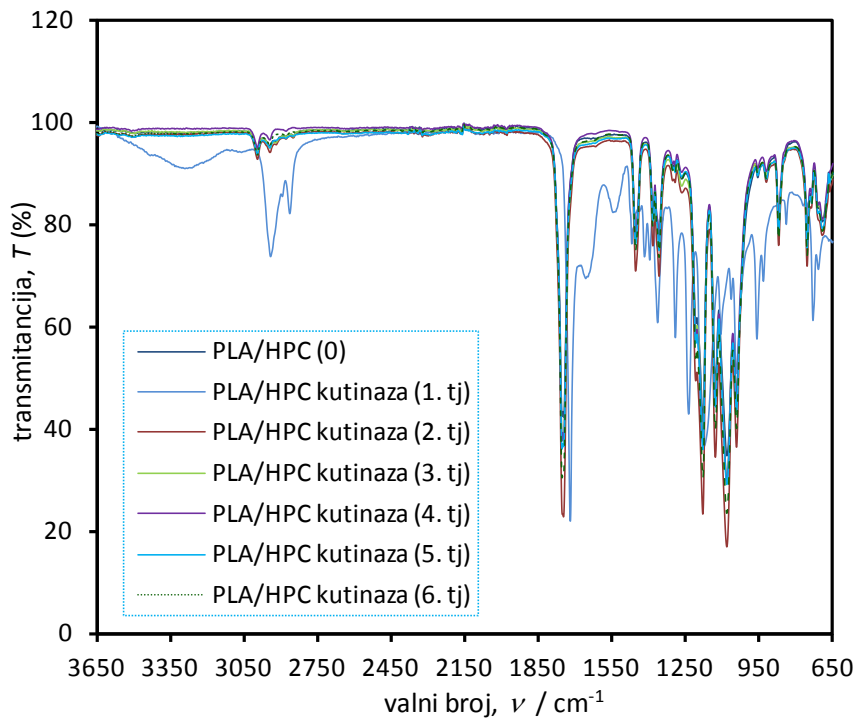
Slika 19. FTIR-ATR spektri PLA nakon različitih vremena (1. - 6. tjedna) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima α -amilaze



Slika 20. FTIR-ATR spektri mješavine PLA/HPC nakon različitih vremena (1. - 6. tjedna) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima α -amilaze



Slika 21. FTIR-ATR spektri PLA nakon različitih vremena (1. - 6.tjedna) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze



Slika 22. FTIR-ATR spektri mješavine PLA/HPC nakon različitih vremena (1. - 6.tjedna) enzimske razgradnje u PBS otopini enzima kutinaze

Na spektru ishodnog PLA polimera prikazanog na slici 18. vidljive su apsorpcijske vrpce kod 1269 cm^{-1} i $1215\text{-}1186\text{ cm}^{-1}$, koje su prema literaturi³⁴ poznate kao vrpce kristalita u PLLA strukturama. One se sastoje od vibracijskih komponenata tj. C-COO istezanja, O-CH istezanja, CH₃ i CH savijanja.³⁴ Na spektru PLA, slika 22. vidljive su vrpce između 1240 i 1200 cm^{-1} koje nisu vidljive kod amornog PLA koji se navodi u literaturi. Mali pomak ovih vrpca može se očekivati ovisno o načinu pripreme uzorka, molekulskoj masi i drugim čimbenicima. Odsutnost vrpca kristalita u niskomolekulnim uzorcima između 1215 i 1186 cm^{-1} odgovara odsutnosti kristalnosti PLA.³⁴

Na FTIR spektru ishodnog HPC polimera prikazanog na slici 18. vidljiva je široka vrpca kod 3436 cm^{-1} koja se pripisuje vibracijama O-H istezanja, čiji se intenzitet smanjuje esterifikacijom. Vrpca koja se uočava kod 2935 cm^{-1} pripisuje se vibraciji asimetričnog C-H istezanja. Intenzivnost ovog pika raste s porastom duljine alkoksi lanca s C-H istezanjem zbog razlike u broju CH₂ skupina. Vrpce koje se javljaju kod 1770 cm^{-1} , 1267 cm^{-1} , 1600 cm^{-1} , and 700 cm^{-1} pripisuju se istezanju C=O, C-O skupina, C-C istezanju aromatske C-C veze odnosno savijanju aromatske C-H veze. Vrpca slabog intenziteta kod 1646 cm^{-1} odgovara vibracijama O-H-O skupina vode u celulozi. U području od 1500 do 1200 cm^{-1} pojavljuje se nekoliko vrpca slabog intenziteta (1463 cm^{-1} , 1374 cm^{-1} , 1268 cm^{-1}) i one odgovaraju vibraciji CH₂ i O-H skupina. Vrpce koje se pojavljuju u području od 1200 do 850 cm^{-1} odgovaraju istezanju C-O i C-C skupina.³⁵

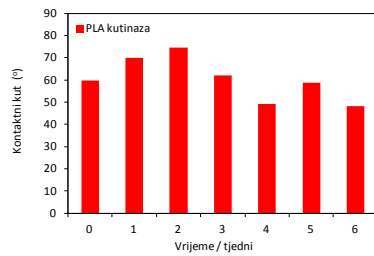
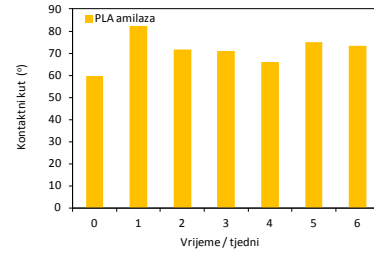
Usporedni FTIR spektri PLA polimera PLA/HPC mješavine snimljeni tijekom 6 tjedana hidrolitičke razgradnje u otopini enzima amilaze i kutinaze prikazani su na slikama 19-22. Tijekom 6 tjedana nema značajnih promjena u spektrima PLA i PLA/HPC mješavina odnosno ne dolazi do vidljivih strukturnih promjena.

4.3. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta

Primjenom tehnike mjerenja kontaktnog kuta određene su karakteristike površine PLA polimera i PLA/HPC mješavine prije i nakon enzimске razgradnje u PBS otopini s enzimima amilaze i kutinaze. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom na površini PLA i PLA/HPC mješavine prije i nakon enzimске razgradnje prikazani su u tablicama 5 i 6.

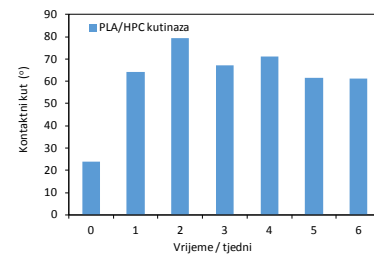
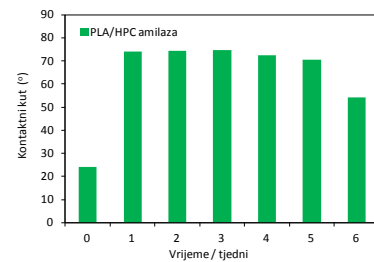
Tablica 5. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta PLA prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini α – amilaze i kutinaze

Enzim	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Uzorak	Kontakti kut (°)
α -amilaza	0	PLA	59,80±0,03
	0	PLA/HPC	24,01±0,3
	1.	PLA	82,28±0,02
	2.	PLA	71,65±0,01
	3.	PLA	71,05±0,02
	4.	PLA	65,91±0,01
	5.	PLA	75,07±0,02
kutinaza	6.	PLA	73,30±0,40
	1.	PLA	70,06±0,03
	2.	PLA	74,47±0,03
	3.	PLA	61,89±0,01
	4.	PLA	49,12±0,02
	5.	PLA	58,66±0,01
	6.	PLA	48,30±3,10



Tablica 6. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta PLA/HPC mješavine prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini α – amilaze i kutinaze

Enzim	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Uzorak	Kontakti kut (°)
α -amilaza	1.	PLA/HPC	74,16±0,05
	2.	PLA/HPC	74,46±0,04
	3.	PLA/HPC	74,75±0,02
	4.	PLA/HPC	72,52±0,01
	5.	PLA/HPC	70,64±0,03
	6.	PLA/HPC	54,20±3,00
kutinaza	1.	PLA/HPC	64,31±0,04
	2.	PLA/HPC	79,25±0,01
	3.	PLA/HPC	67,21±0,03
	4.	PLA/HPC	71,01±0,01
	5.	PLA/HPC	61,47±0,03
	6.	PLA/HPC	61,10±3,20



Vrijednost kontaktnog kuta s vodom na površini PLA polimera prije razgradnje iznosi $59,8^\circ$ što ukazuje na hidrofilnost površine PLA. Dodatkom HPC celuloze značajno se povećava vlaženje površine i kontaktni kut se smanjuje te na uzorku PLA/HPC iznosi $24,01^\circ$. To ukazuje na značajnu hidrofilnost površine i preferirano smještanje hidrofilne HPC komponente na površini, tablica 5.

Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom na PLA polimeru nakon razgradnje s α -amilazom povećavaju se već nakon 1. tjedna a zatim se postupno smanjuju s duljim vremenom enzimske razgradnje, tablica 5. Razgradnja u otopini amilaze rezultira manje hidrofilnom površinom.

Hidrofilnost površine PLA polimera nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom u početku je manja a zatim se povećava s vremenom što je vidljivo iz smanjenja kontaktnog kuta, tablica 5. Može se pretpostaviti da je kod duljeg vremena enzimske razgradnje nastala poroznija struktura na površini.

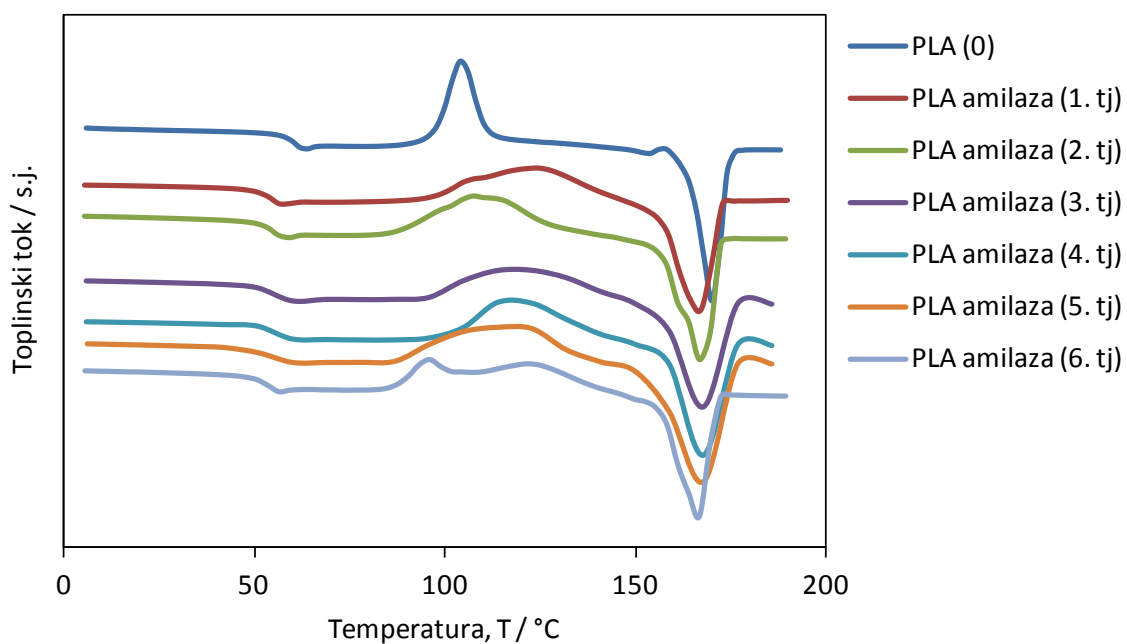
Hidrofilnost uzoraka PLA/HPC mješavine nakon razgradnje u PBS otopini s α -amilazom značajno se smanjila što je vidljivo iz većih vrijednosti kontaktnog kuta, tablica 6. S obzirom da je HPC u vodi topljiv može se pretpostaviti da se tijekom vremena došlo do njegovog izdvajanja iz PLA/HPC mješavine, što rezultira porastom kontaktnog kuta s vodom. To dodatno potvrđuje činjenica da je nakon 6. tjedna kontaktni kut sličan onom čistog PLA polimera, tablica 5.

Hidrofilnost uzoraka PLA/HPC mješavine nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom pokazuje sličan trend kao djelovanje amilaze. Vrijednosti kontaktnog kuta rastu, tablica 6. a nakon 6. tjedna sličnih su vrijednosti koja odgovara čistom PLA polimeru.

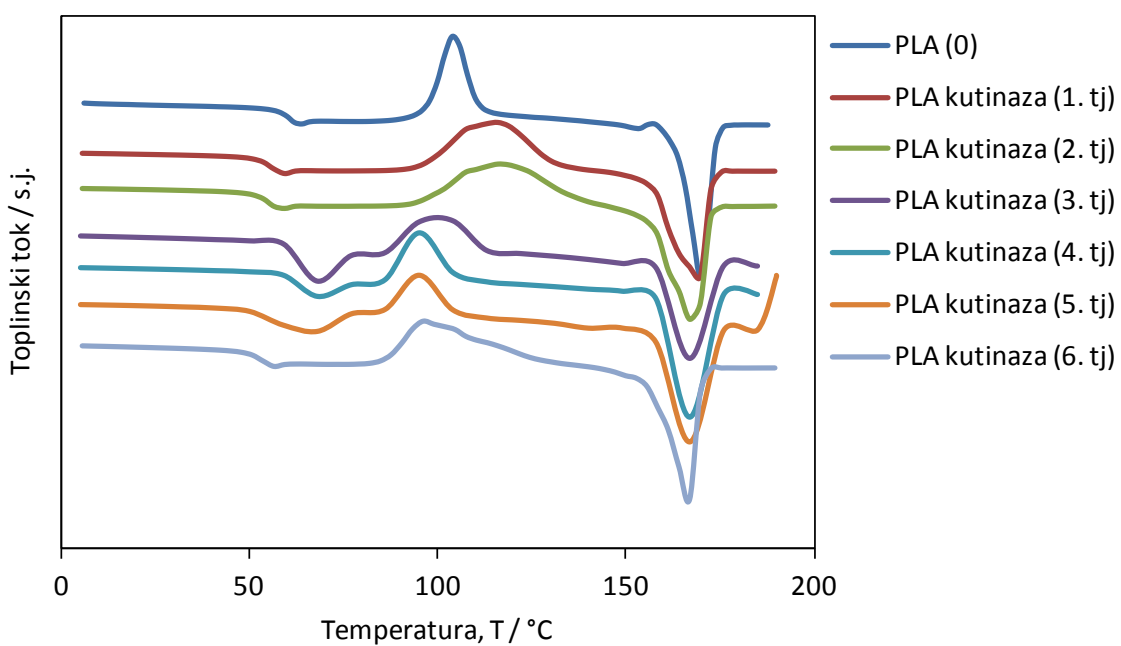
4.4. Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC)

U nastavku rada provedena su ispitivanja toplinskih svojstava PLA polimera i PLA/HPC mješavine prije i nakon enzimske razgradnje primjenom diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) u neizotermnim uvjetima u struji dušika.

Na *slikama 23. i 24.* prikazani su usporedni DSC termogrami dobiveni u 2. ciklusu zagrijavanja PLA polimera tijekom 6 tjedana u PBS otopini s amilazom i kutinazom.



Slika 23. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PLA prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze



Slika 24. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PLA prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze

Tablica 7. Rezultati DSC mjerenja 2. ciklusa zagrijavanja PLA i PLA/HPC mješavine prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze

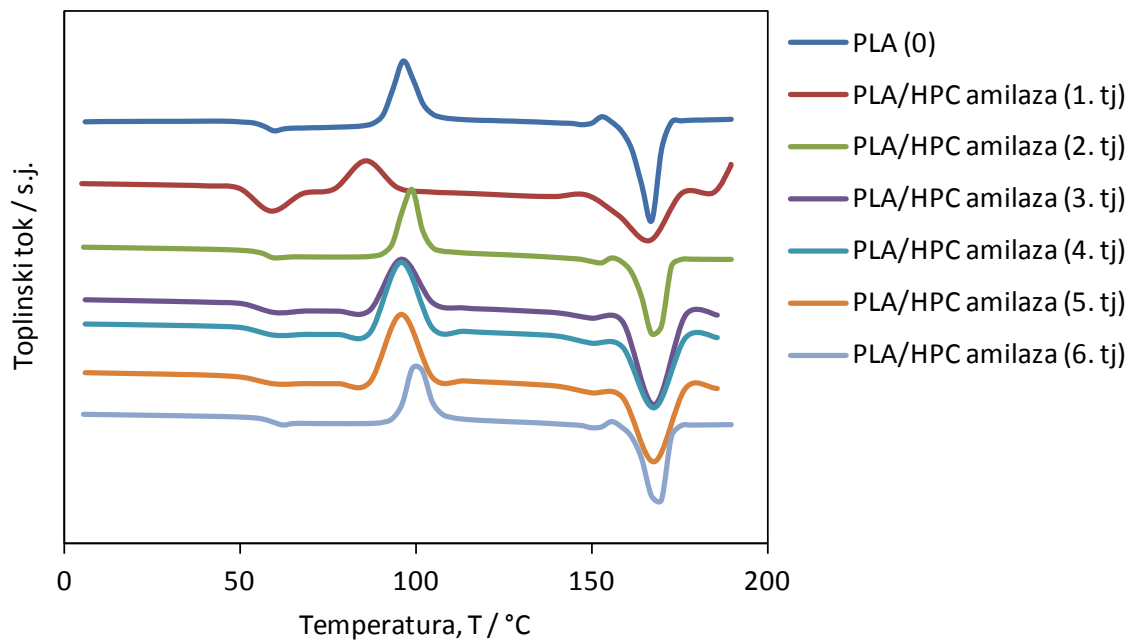
DSC 5. segment (2. ciklus zagrijavanja)								
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	T_g (°C)	T_{cc} (°C)	ΔH_c (J/g)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
α -amilaza	PLA	0	59,74	104,22	28,23	169,86	39,13	27,46
	HPC	0	/	/	/	149,49	84,02	/
	PLA/HPC	0	56,15	96,24	35,58	167,04	45,61	35,56
	PLA	1.	53,43	124,22	41,42	167,37	42,87	30,08
	PLA	2.	54,35	96,87	30,51	168,17	47,57	31,97
	PLA	3.	54,42	118,53	42,06	168,33	41,82	29,34
	PLA	4.	58,12	119,69	43,89	169,00	44,21	31,02
	PLA	5.	52,51	119,03	46,23	167,17	48,49	34,02
	PLA	6.	52,76	95,70	39,82	167,33	46,91	32,91
	PLA/HPC	1.	47,39	87,73	32,18	161,03	44,56	34,74
	PLA/HPC	2.	56,85	98,39	32,53	168,36	39,25	30,60
	PLA/HPC	3.	56,86	97,52	31,47	167,31	37,37	29,13
	PLA/HPC	4.	54,67	96,38	32,62	166,52	41,30	32,20
	PLA/HPC	5.	53,69	96,36	34,05	166,66	44,10	34,38
	PLA/HPC	6.	57,48	100,72	32,63	168,36	40,54	31,61

Na slikama 25. i 26. prikazani su usporedni DSC termogrami dobiveni u 2. ciklusu zagrijavanja PLA/HPC mješavina tijekom 6 tjedana u PBS otopini s amilazom i kutinazom. Vrijednosti staklišta T_g ; tališta T_m ; entalpije taljenja ΔH_m , temperature hladne kristalizacije T_{cc} i entalpije hladne kristalizacije ΔH_{cc} , te kristališta T_c i entalpije kristalizacije ΔH_c prikazane su u tablicama 7. i 8.

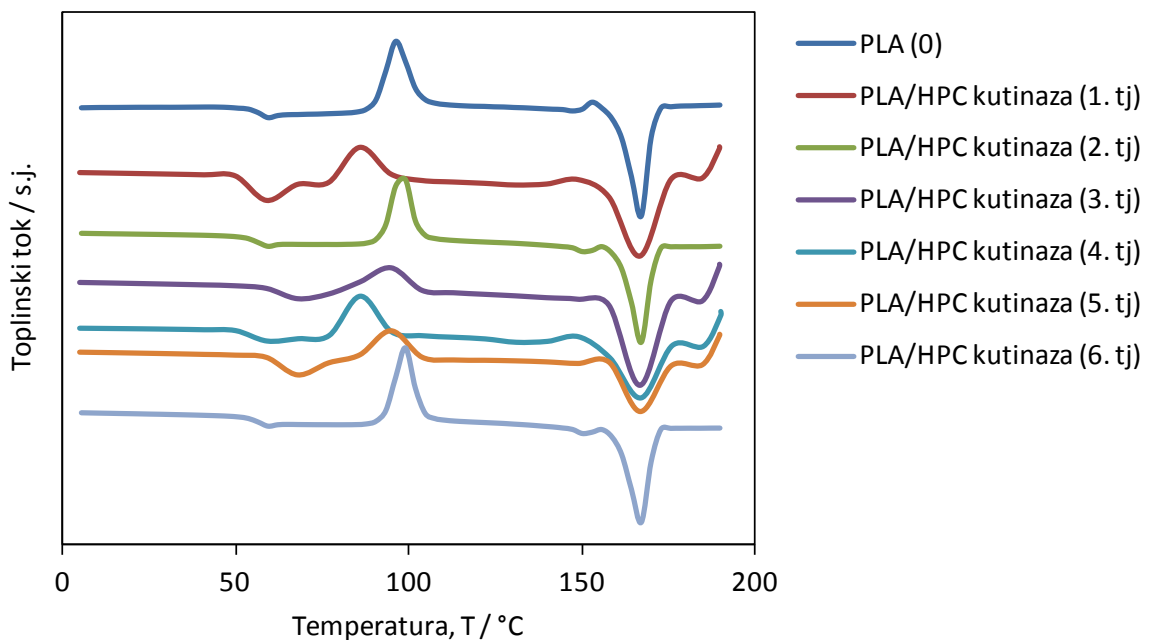
Čistom PLA prije razgradnje enzimima kristalnost je 27,46 %. U prvom tjednu u PBS otopini s amilazom dolazi do porasta kristalnosti na 30,08%. Tijekom 6. tjedana udio kristalne strukture više se ne mijenja značajno, tablica 7.

Staklište PLA polimera u PBS otopini tijekom razgradnje s amilazom pomiče se prema nižoj temperaturi u odnosu na vrijednost staklišta PLA polimera prije razgradnje, od 59,74°C za ishodni PLA na 52,76°C za PLA nakon 6. tjedna razgradnje u amilazi, što ukazuje na porast fleksibilnosti polimernih lanaca PLA. Talište PLA ne mijenja se značajno tijekom 6. tjedana razgradnje u otopini enzima amilaze. Izvjesno sniženje i porast temperature hladne

kristalizacije upućuje na povećanje odnosno sniženje brzine neizotermne kristalizacije PLA polimera.



Slika 25. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PLA/HPC mješavine prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze



Slika 26. DSC krivulja 2. ciklusa zagrijavanja PLA/HPC mješavine prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze

Tablica 8. Rezultati mjerenja 2. ciklusa zagrijavanja PLA i mješavine PLA/HPC prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze

DSC (2. ciklus zagrijavanja)								
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	T _g (°C)	T _{cc} (°C)	ΔH _{cc} (J/g)	T _m (°C)	ΔH _m (J/g)	X _c (%)
kutinaza	PLA	0	59,74	104,22	28,23	169,86	39,13	27,46
	HPC	0	/	/	/	149,49	84,02	/
	PLA/HPC	0	56,15	96,24	35,58	167,04	45,61	35,56
	PLA	1.	54,72	115,54	42,01	169,02	44,99	31,57
	PLA	2.	54,24	115,54	47,24	168,18	46,58	32,69
	PLA	3.	57,98	134,32	25,15	167,13	35,13	24,65
	PLA	4.	54,74	94,87	14,97	166,99	53,77	37,73
	PLA	5.	55,53	121,52	30,66	165,50	43,32	30,40
	PLA	6.	52,32	96,38	38,22	166,51	48,26	33,87
	PLA/HPC	1.	49,67	89,40	30,23	162,71	42,93	33,47
	PLA/HPC	2.	55,62	97,89	30,94	167,53	41,24	32,09
	PLA/HPC	3.	54,88	97,52	34,12	166,48	42,68	33,27
	PLA/HPC	4.	54,80	97,73	32,07	167,37	39,27	30,61
	PLA/HPC	5.	58,35	102,05	31,19	168,53	39,23	30,59
	PLA/HPC	6.	57,19	100,25	31,57	168,23	40,03	31,21

Tablica 9. Rezultati DSC mjerenja ciklusa hlađenja PLA i mješavine PLA/HPC prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini α - amilaze

DSC (ciklus hlađenja)				
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	T _c (°C)	ΔH _c (J/g)
α-amilaza	PLA	0	63,91	9,03
	PLA/HPC	0	60,76	20,99
	PLA	1.	59,58	24,60
	PLA	2.	60,23	21,85
	PLA	3.	62,56	14,29
	PLA	4.	64,05	27,89
	PLA	5.	58,39	19,11
	PLA	6.	59,05	23,67
	PLA/HPC	1.	53,08	22,31
	PLA/HPC	2.	59,74	16,77
	PLA/HPC	3.	61,88	24,51
	PLA/HPC	4.	60,40	26,47
	PLA/HPC	5.	59,88	20,45
	PLA/HPC	6.	63,25	21,23

Tablica 10. Rezultati DSC mjerenja ciklusa hlađenja PLA i mješavine PLA/HPC prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje u PBS otopini s kutinazom

DSC (ciklus hlađenja)				
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	T _c (° C)	ΔH _c (J/g)
kutinaza	PLA	0	63,91	9,03
	PLA/HPC	0	60,76	20,99
	PLA	1.	60,40	23,50
	PLA	2.	60,41	26,46
	PLA	3.	102,34	3,39
	PLA	4.	59,72	28,36
	PLA	5.	62,06	24,28
	PLA	6.	58,57	27,26
	PLA/HPC	1.	54,42	18,51
	PLA/HPC	2.	60,41	17,21
	PLA/HPC	3.	61,38	24,72
	PLA/HPC	4.	59,75	20,89
	PLA/HPC	5.	63,41	16,99
	PLA/HPC	6.	60,73	19,36

Toplinska svojstva PLA/HPC mješavina tijekom razgradnje s amilazom pokazuju sličan trend kao razgradnja čistog PLA, porast kristalnosti i sniženje staklišta tj. porast fleksibilnosti molekula.

PLA i PLA/HPC nakon razgradnje u otopini s kutinazom pokazuju sličan trend kao uzorci s amilazom, tablica 7. i 8. slika 24 i 25.

4.5. Rezultati termogravimetrijske analize

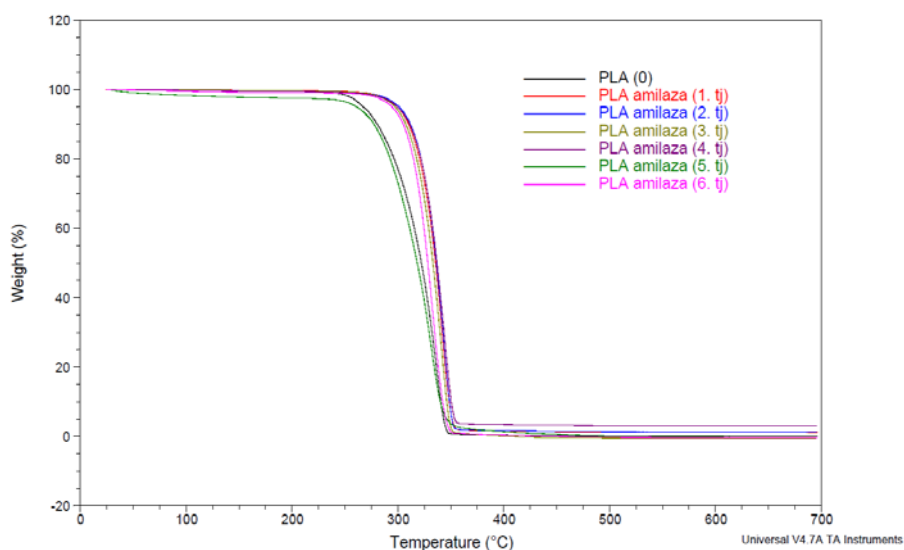
Toplinska stabilnost PLA polimera i PLA/HPC mješavine prije i tijekom 6. tjedana razgradnje u otopini amilaze i kutinaze istražena je termogravimetrijskom analizom. Karakteristične vrijednosti očitane iz TG i DTG krivulja prikazanih na slikama 27. – 34. prikazane su u tablicama 11 i 12.

Tablica 11. Vrijednosti temperature početka razgradnje (T_{onset}), temperature kraja razgradnje (T_{end}), temperature maksimalne brzine razgradnje (T_{max}), temperature kod 5 % gubitka mase i ostatak nakon razgradnje PLA prije i nakon enzimске razgradnje u PBS otopini α -amilaze i kutinaze

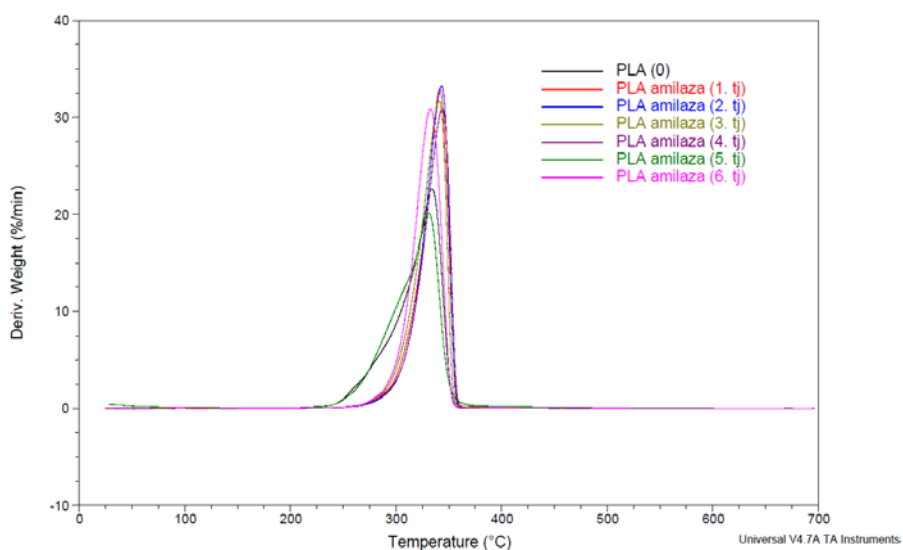
Enzim	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Uzorak	TG				DTG
			Temperatura kod 5 % gubitka mase ($^{\circ}\text{C}$)	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{end} ($^{\circ}\text{C}$)	Ostatak (%)	T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)
α -amilaza	0	PLA-0	273,56	282,07	347,83	1,14	339,55
	0	HPC-0	293,30	325,29	372,09	0,25	355,16
	0	PLA+HPC	280,00	278,46	342,43	1,46	329,57
	1.	PLA	299,67	300,64	350,80	1,21	341,32
	2.	PLA	301,30	311,33	351,24	1,27	341,18
	3.	PLA	297,51	301,10	348,71	0,43	340,93
	4.	PLA	299,54	312,53	352,04	3,02	344,23
	5.	PLA	261,30	266,94	342,24	0,33	330,32
	6.	PLA	294,58	299,23	343,94	0,31	333,90
kutinaza	1.	PLA	302,53	305,62	349,24	1,98	342,24
	2.	PLA	300,34	309,72	350,62	2,28	342,32
	3.	PLA	296,92	305,37	349,45	1,29	342,80
	4.	PLA	294,55	302,47	347,76	0,26	340,41
	5.	PLA	289,75	302,36	346,23	1,83	338,57
	6.	PLA	284,52	291,83	341,17	0,54	330,21

Tablica 12. Vrijednosti temperatura početka razgradnje (T_{onset}), temperatura kraja razgradnje (T_{end}), temperatura maksimalne brzine razgradnje (T_{max}), temperatura kod 5 % gubitka mase i ostatak za uzorke mješavina PLA/HPC prije i nakon razgradnje

Enzim	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Uzorak	TG				DTG
			Temperatura kod 5 % gubitka mase ($^{\circ}\text{C}$)	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{end} ($^{\circ}\text{C}$)	Ostatak (%)	T_{max} ($^{\circ}\text{C}$)
α -amilaza	1.	PLA/HPC	291,15	298,77	340,74	0,545	329,28
	2.	PLA/HPC	293,90	292,68	349,91	3,047	331,97
	3.	PLA/HPC	290,85	293,81	345,19	1,941	330,01
	4.	PLA/HPC	286,19	290,23	345,27	1,844	332,64
	5.	PLA/HPC	293,05	298,82	345,47	0,131	333,00
	6.	PLA/HPC	288,62	294,01	341,64	1,292	331,41
kutinaza	1.	PLA/HPC	279,41	286,77	343,93	0,305	333,20
	2.	PLA/HPC	291,52	292,44	343,70	1,923	330,78
	3.	PLA/HPC	281,43	289,76	345,68	0	332,63
	4.	PLA/HPC	287,66	289,29	342,55	0,739	331,56
	5.	PLA/HPC	289,75	302,36	346,23	1,828	338,57
	6.	PLA/HPC	284,23	290,31	338,97	2,228	328,84



Slika 27. TG krivulja PLA prije i nakon razgradnje tijekom 6. tjedana u PBS otopini α -amilaze

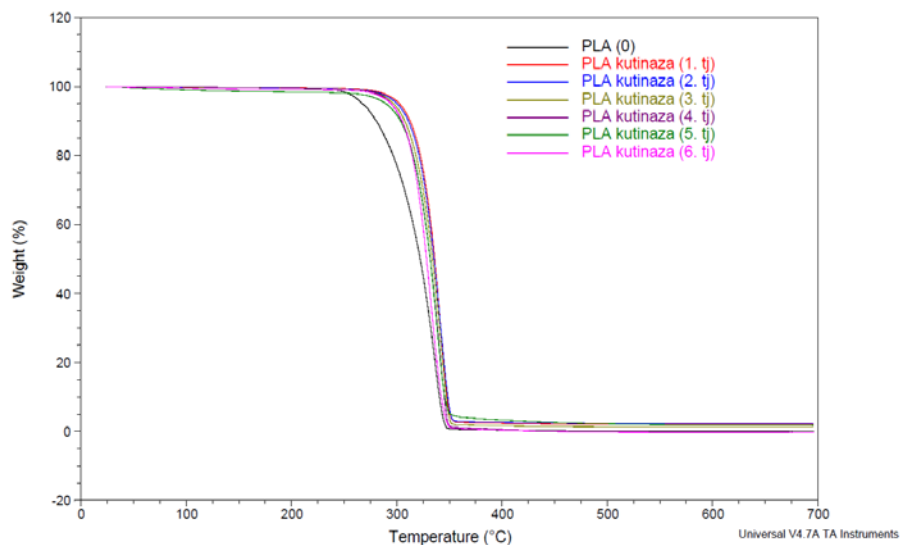


Slika 28. DTG krivulja PLA prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6. tjedana u PBS otopini α -amilaze

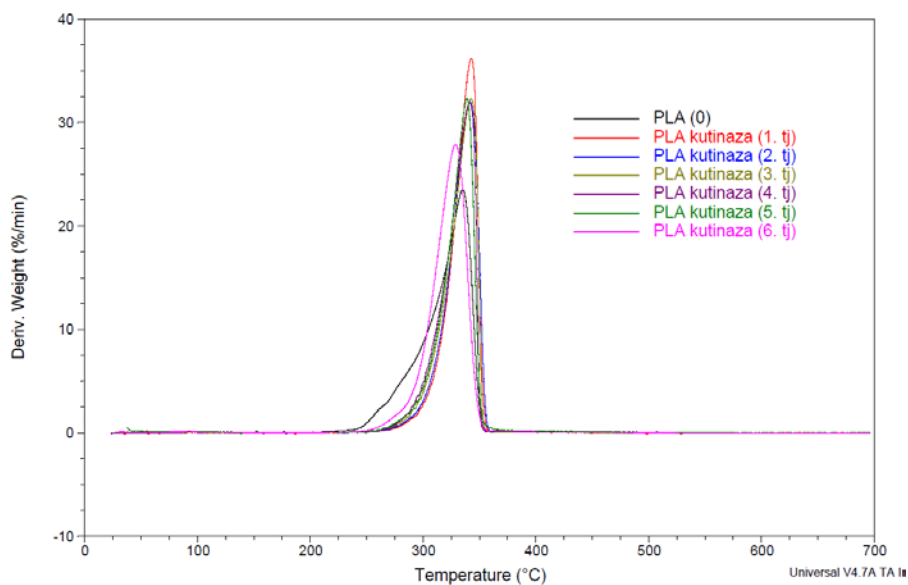
Iz rezultata je vidljivo da se PLA polimer razgrađuje u jednom stupnju u relativno uskom području temperatura, slika 27. i 28. tablica 11.

Vrijednosti maksimalne brzine razgradnje uzoraka PLA nakon razgradnje u PBS otopini s amilazom bliske su početnoj vrijednosti PLA polimera prije razgradnje, tablica 11. Temperatura kod 5 % gubitka mase prati taj isti trend kao i temperature početka razgradnje i kraja razgradnje. Nakon enzimske razgradnje uzoraka PLA starenih u PBS otopini amilaze

masa uzorka se nije bitno promijenila, te su toplinska svojstva ostala nepromijenjena, slika 28.

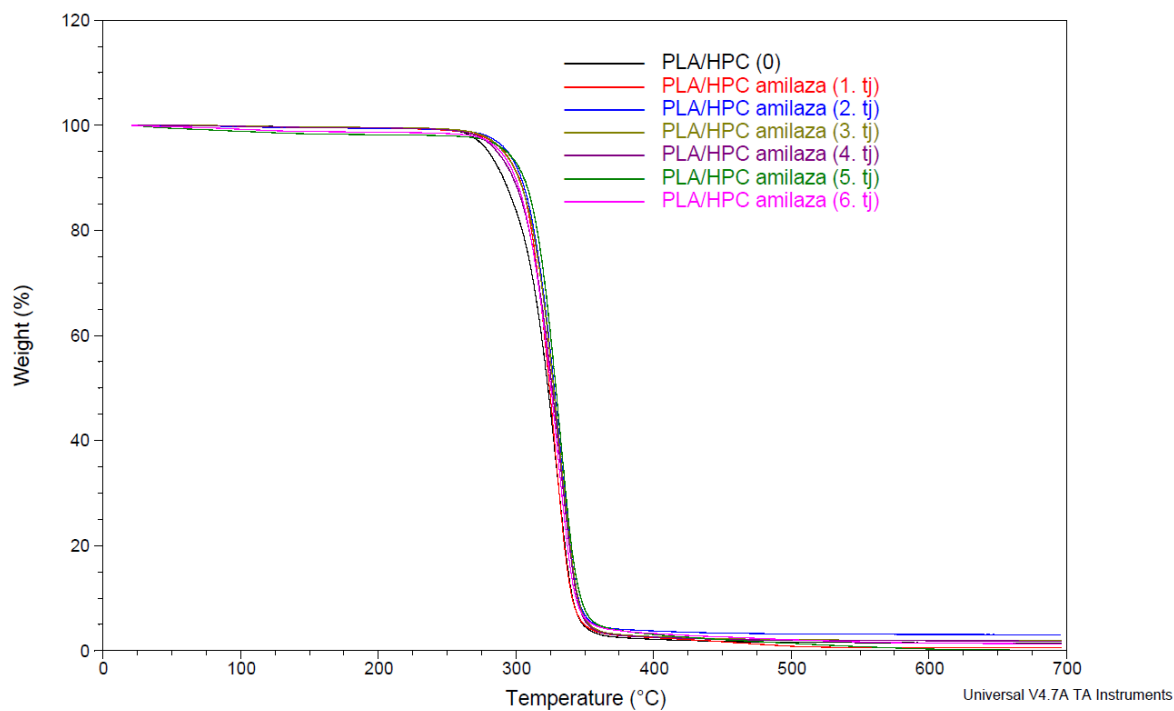


Slika 29. TG krivulja PLA prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6. tjedana u PBS otopini kutinaze

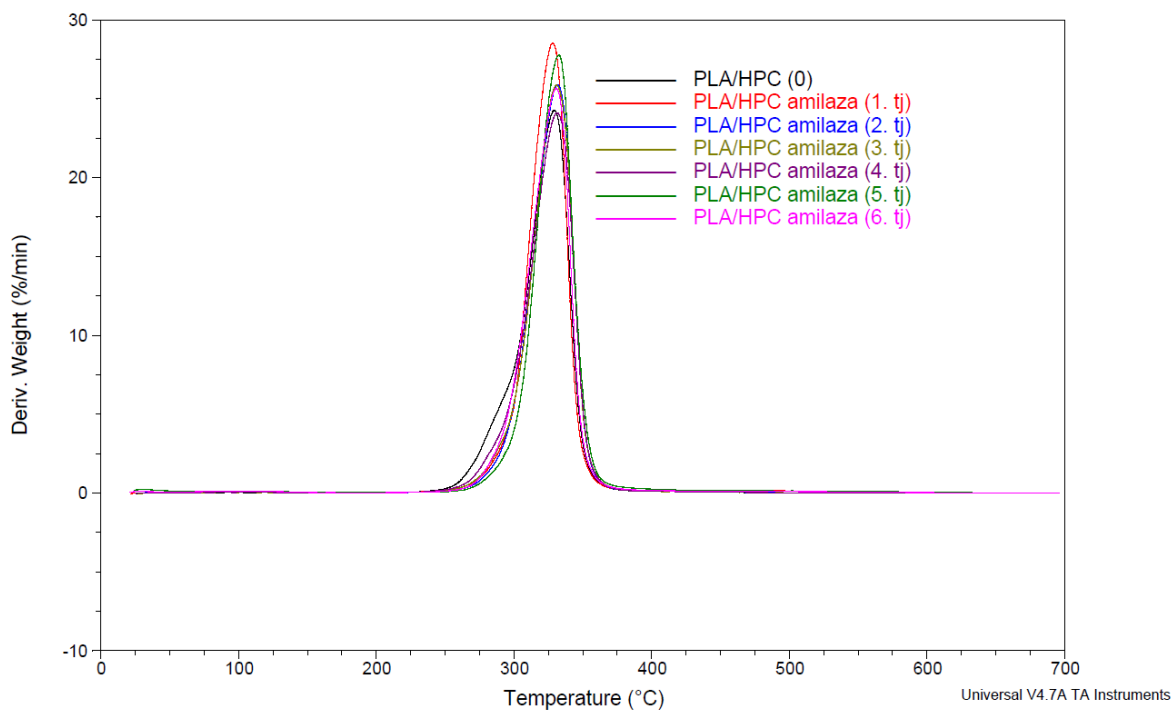


Slika 30. DTG krivulja PLA prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6. tjedana u PBS otopini kutinaze

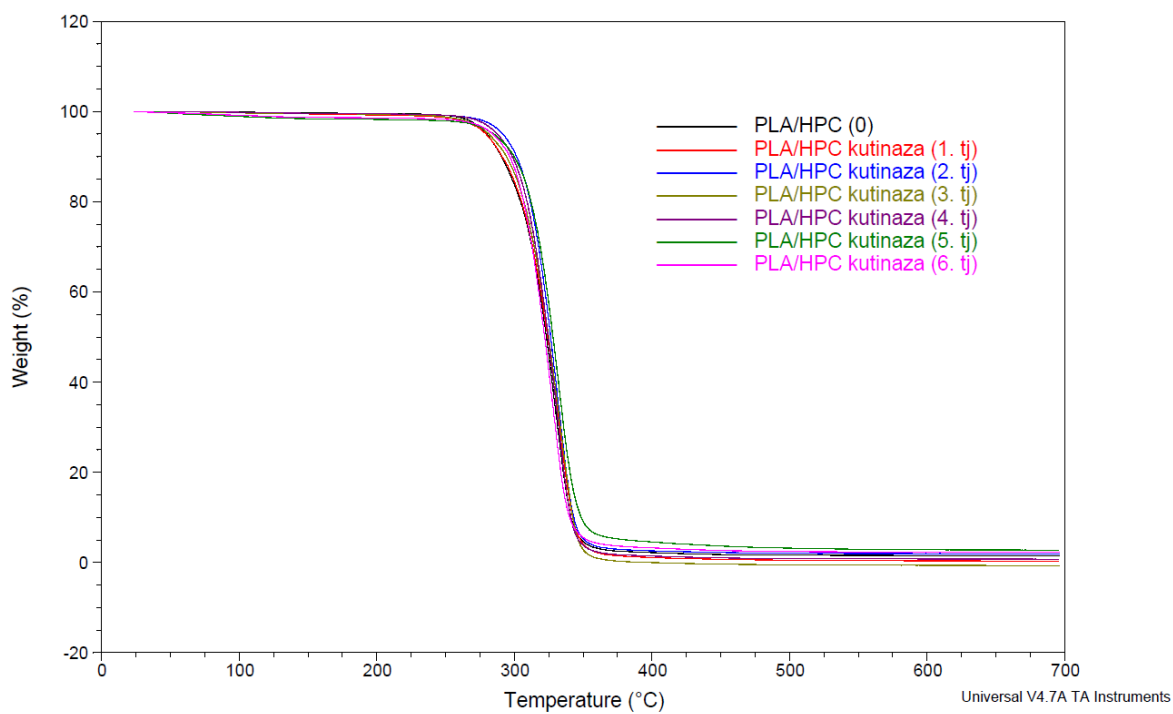
Iz dobivenih rezultata vidljivo je da kod uzorka PLA tretiranog kutinazom nema znatnih promjena toplinske stabilnosti kao i kod uzoraka PLA tretiranih α - amilazom, tablica 11, slika 29. i 30.



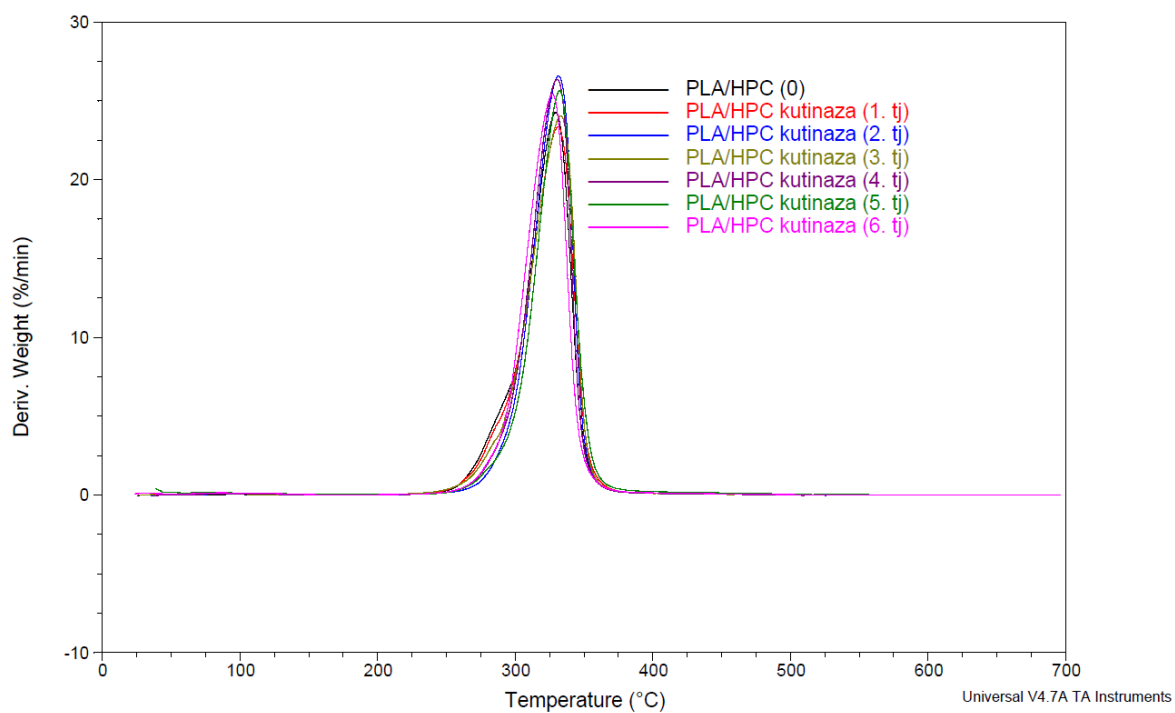
Slika 31. TG krivulja mješavine PLA/HPC prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6 tjedana u PBS otopini α -amilaze



Slika 32. DTG krivulja mješavine PLA/HPC prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6 tjedana u PBS otopini α -amilaze



Slika 33. TG krivulja mješavine PLA/HPC prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6 tjedana u PBS otopini kutinaze



Slika 34. DTG krivulja mješavine PLA/HPC prije i nakon enzimske razgradnje tijekom 6 tjedana u otopini kutinaze

Dodatak HPC polimera u PLA rezultira pomakom temperature početka razgradnje prema višim vrijednostima što ukazuje na povećanje toplinske stabilnosti dodatkom celuloze, slika 31.-34, tablica 12. PLA/HPC mješavine se također razgrađuju u jedno razgradnom stupnju u uskom području temperatura. Tijekom 6 tjedana razgradnje u PBS otopini amilaze i kutinaze ne dolazi do promjena toplinske stabilnosti.

4.6. Rezultati mehaničkih svojstava

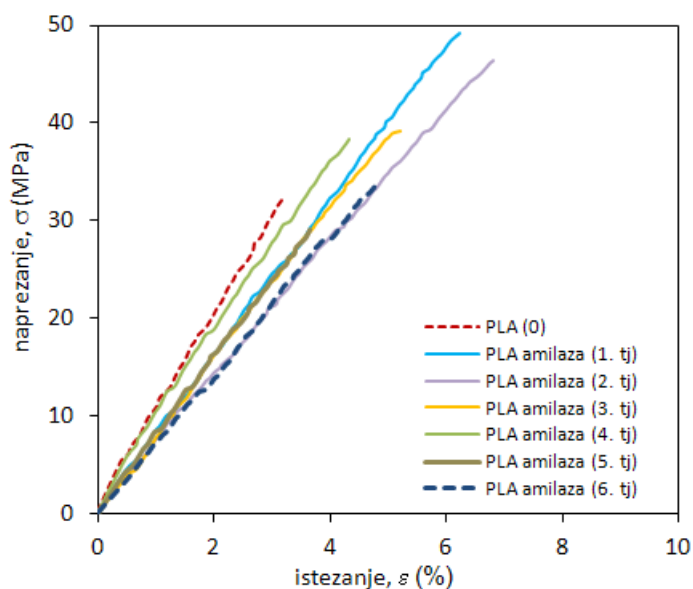
Kako bi se dobio bolji uvid utjecaja enzimske razgradnje na svojstva PLA polimera i PLA/HPC mješavina u nastavku su provedena ispitivanja mehaničkih svojstava. Na slikama 35.-38. prikazane su usporedne krivulje PCL i PLA polimera i PCL/PLA, PCL/PLA/HPC mješavina prije i tijekom 6 tjedana razgradnje. U tablici 13. i 14. su dane vrijednosti značajki (rasteznog modula, prekidne čvrstoće, prekidnog istezanja i rada) očitane iz krivulja.

Tablica 13. Vrijednosti prekidne čvrstoće σ , prekidnog istezanja ε , rasteznog modula (E) i rada (W) za PLA polimer i PLA/HPC mješavine prije i nakon razgradnje u PBS otopini s amilazom

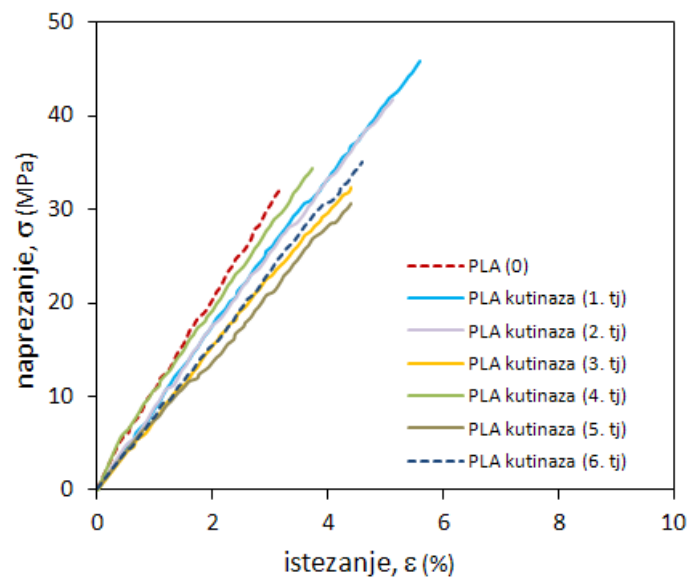
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Rastezni modul E (MPa)	Prekidna čvrstoća σ (MPa)	Prekidno istezanje ε (%)	Rad W (Nm)
α -amilaza	PLA	0	1129,3±180,4	32,2±8,7	3,3±1,1	0,14±0,09
	PLA/HPC	0	1012,2±74,4	42,7±4,1	6,3±0,9	0,45±0,11
	PLA	1.	913,5±74,0	49,6±6,7	6,5±0,8	0,49±0,12
	PLA	2.	860,5±63,1	46,2±6,9	6,1±0,8	0,41±0,12
	PLA	3.	968,9±130,9	43,0±2,8	5,1±0,5	0,32±0,06
	PLA	4.	995,4±146,5	37,2±1,4	4,8±0,5	0,27±0,02
	PLA	5.	938,7±97,4	37,7±7,7	4,6±0,8	0,28±0,11
	PLA	6.	897,4±183,2	43,7±7,4	5,5±0,5	0,34±0,08
	PLA/HPC	1.	773,0±67,9	46,7±2,9	8,1±1,4	0,69±0,25
	PLA/HPC	2.	885,8±72,6	33,8±3,0	4,6±0,9	0,26±0,05
	PLA/HPC	3.	859,1±46,5	42,2±5,6	6,9±2,1	0,58±0,30
	PLA/HPC	4.	-	-	-	-
	PLA/HPC	5.	734,2±68,8	34,1±5,0	5,9±1,2	0,34±0,13
	PLA/HPC	6.	753,5±109,7	41,6±3,9	7,2±1,4	0,52±0,15

Tablica 14. Vrijednosti prekidne čvrstoće (σ), prekidnog istezanja (ε), rasteznog modula (E) i rada (W) za PLA polimer i PLA/HPC mješavine prije i nakon razgradnje u PBS otopini s kutinazom

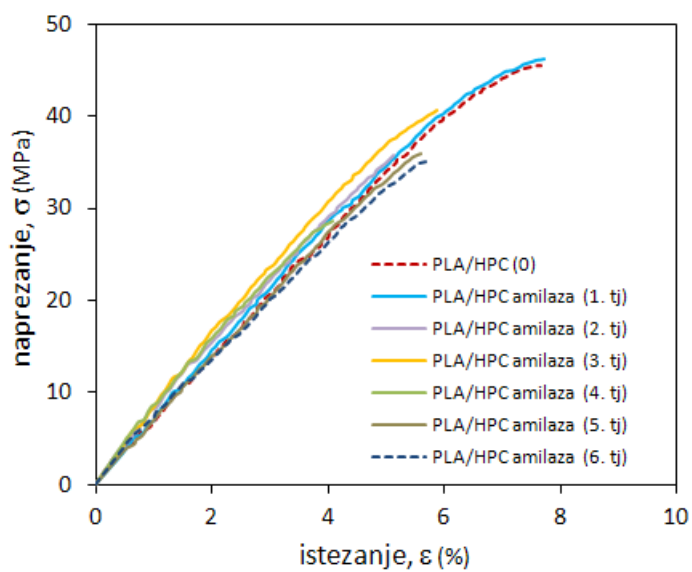
Enzim	Uzorak	Vrijeme razgradnje (tjedni)	Rastezni modul E (MPa)	Prekidna čvrstoća σ (MPa)	Prekidno istezanje ε (%)	Rad W (Nm)
kutinaza	PLA	0	1129,3±180,4	32,2±8,7	3,3±1,1	0,14±0,09
	PLA/HPC	0	1012,2±74,4	42,7±4,1	6,3±0,9	0,45±0,11
	PLA	1.	948,9±109,2	50,9±1,0	6,4±0,6	0,51±0,06
	PLA	2.	944,5±57,0	39,0±18,3	4,7±2,1	0,32±0,23
	PLA	3.	1039,6±251,9	46,8±7,3	5,8±1,3	0,43±0,17
	PLA	4.	1301,7±174,4	33,6±7,8	3,9±0,8	0,21±0,10
	PLA	5.	899,7±97,1	41,7±8,9	5,6±0,9	0,37±0,14
	PLA	6.	857,2±40,1	39,2±9,1	5,2±1,5	0,33±0,15
	PLA/HPC	1.	711,4±171,1	24,7±17,2	5,9±3,3	0,40±0,37
	PLA/HPC	2.	770,6±88,7	38,2±13,6	6,2±2,3	0,49±0,35
	PLA/HPC	3.	983,9±119,9	27,9±16,7	5,9±2,9	0,47±0,40
	PLA/HPC	4.	923,6±167,6	35,9±3,4	5,7±0,5	0,34±0,06
PLA/HPC	5.	723,2±55,9	39,6±3,1	6,6±0,9	0,46±0,11	
PLA/HPC	6.	611,9±191,3	23,9±13,5	5,2±1,9	0,23±0,16	



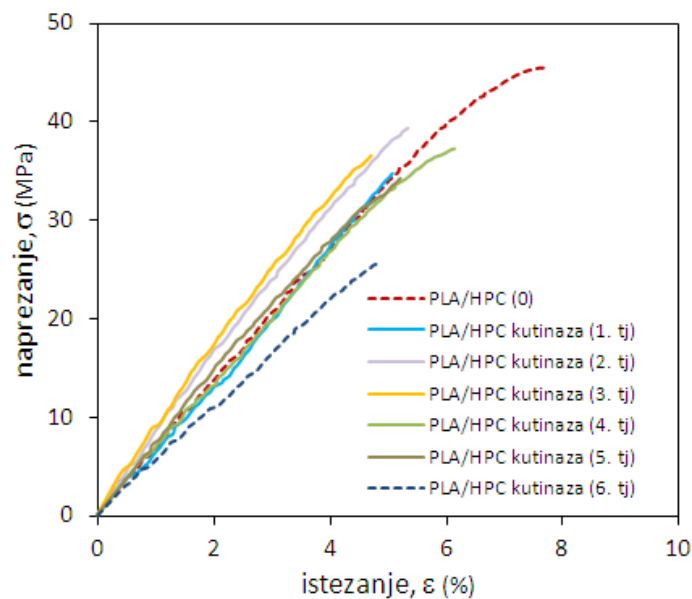
Slika 35. Krivulje naprezanje-istezanje PLA polimera prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini s α -amilazom



Slika 36. Krivulje naprežanje-istežanje PLA polimera prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini s kutinazom



Slika 37. Krivulje naprežanje-istežanje PLA/HPC mješavina prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini s α -amilazom



Slika 38. Krivulje naprežanje-istežanje PLA/HPC mješavina prije i nakon enzimske razgradnje u PBS otopini s kutinazom

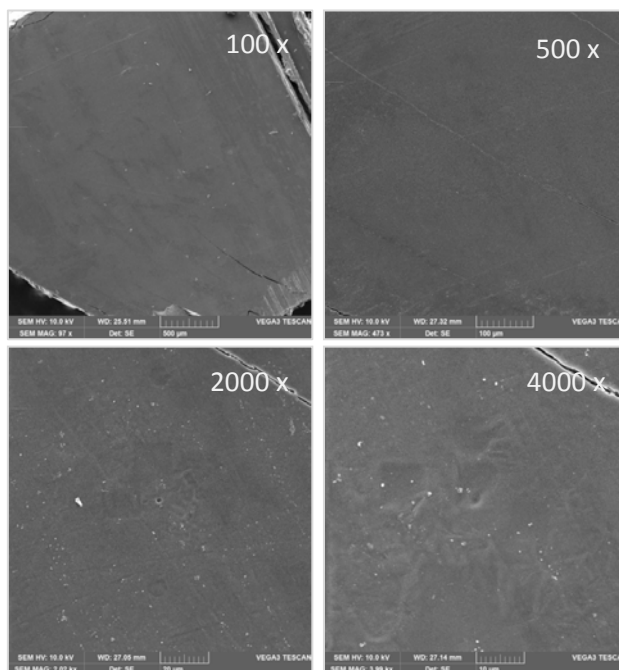
Krivulja naprežanje-istežanje PLA polimera odražava ponašanje vrlo krto, čvrstog materijala visokog rasteznog modula, slika 35 i 36, tablica 13 i 14. Vidljivo je da dodatak HPC polimera rezultira porastom čvrstoće i istežanja uz izvjesno sniženje rasteznog modula, slika 37. i 38. tablica 13. i 14. Ovaj rezultat ukazuje na dobre interakcije između PLA i HPC polimera.

Vidljivo je da se tijekom 6 tjedana razgradnje u PBS otopini amilaze i kutinaze postupno snižava čvrstoća i istezljivost PLA polimera, što ukazuje na izvjesne promjene u strukturi uzrokovane enzimskom razgradnjom.

PLA/HPC mješavine pokazuju značajniji utjecaj enzimske razgradnje osobito s enzimom kutinaze, slika 37. i 38. tablica 13. i 14.. Vidljivo je da se vrijednosti prekidne čvrstoće i istežanja značajnije smanjuju kod mješavina tretiranih u PBS otopini s kutinazom. Jedan od razloga značajnijeg sniženja mehaničkih svojstava PLA/HPC mješavina tijekom duljeg vremena enzimske razgradnje u vodenoj otopini može se povezati s poroznom strukturom koja nastaje otapanjem HPC faze. Na taj način voda i enzimi lakše prodiru u unutrašnjost materijala što doprinosi bržoj razgradnji polimera.

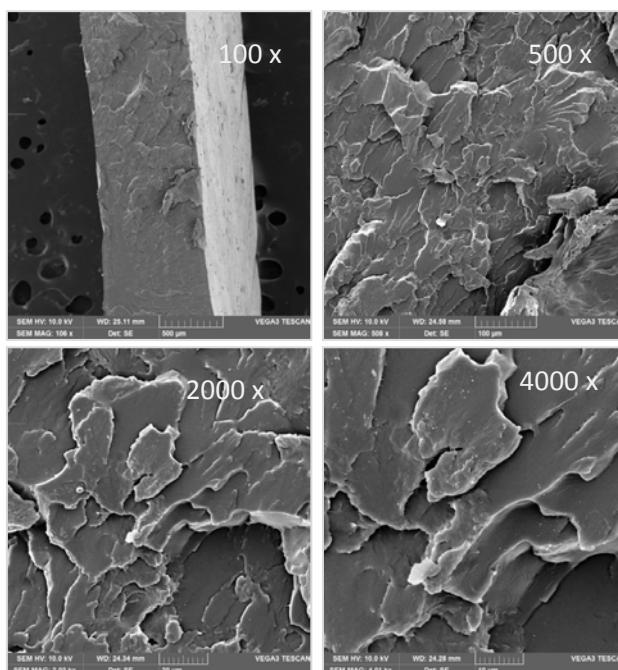
4.7. Pretražna elektronska mikroskopija, SEM

Pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), ispitana je morfološka struktura PLA polimera i PLA/HPC mješavine prije i nakon 6. tjedna razgradnje u PBS otopini s enzimom α -amilaze i kutinaze.



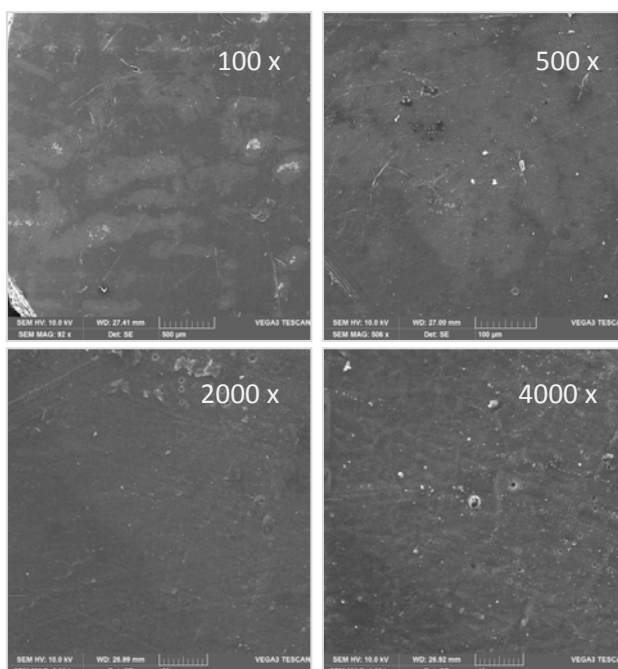
Slika 39. SEM mikrografije površine PLA prije razgradnje, pri različitim povećanjima

Na SEM mikrografiji (slika 39.) PLA polimera vidljiva je ravna, glatka i homogena površina. Na SEM mikrografiji površine nakon kidanja PLA polimera (slika 40) vidljive su duge mikronske linije koje su indicacija širenja pukotina nastalih djelovanjem vanjske sile u testu jednoosnog istezanja. Ovakav izgled površine loma karakterističan je za PLA matricu koja se na sobnoj temperaturi nalazi ispod staklišta te stoga popušta mehanizmom krtog loma.

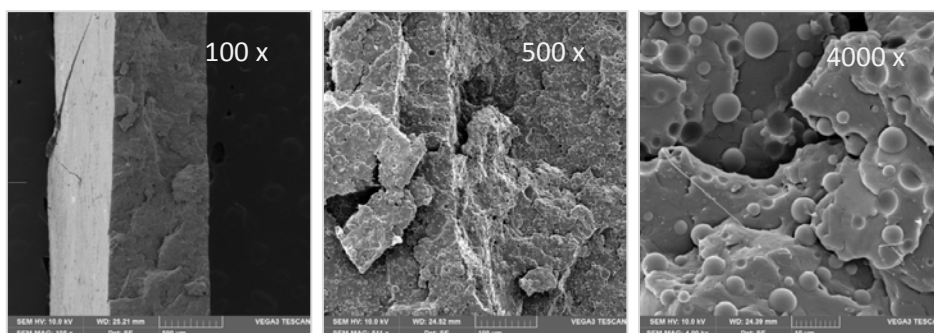


Slika 40. SEM mikrografija površine loma PLA prije razgradnje, pri različitim povećanjima

Na slici 41. prikazane su mikrografije PLA/HPC mješavine prije razgradnje. Površina PLA/HPC mješavine je glatka i homogena bez vidljivo izdvojenih faza. Površina nakon kidanja prikazana je na slici 42. Osobito pri većem povećanju vidljive su jasno izdvojene čestice HPC polimera što ukazuje na nemješljivost PLA i HPC polimera.

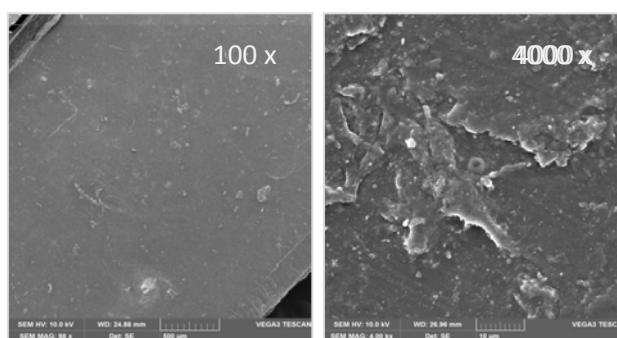


Slika 41. SEM mikrografija površine mješavine PLA/HPC prije razgradnje, pri različitim povećanjima

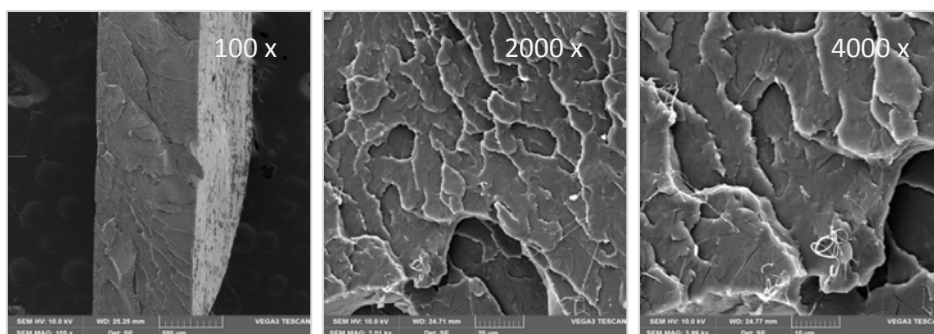


Slika 42. SEM mikrografija površine loma, mješavine PLA/HPC prije razgradnje, pri različitim povećanjima

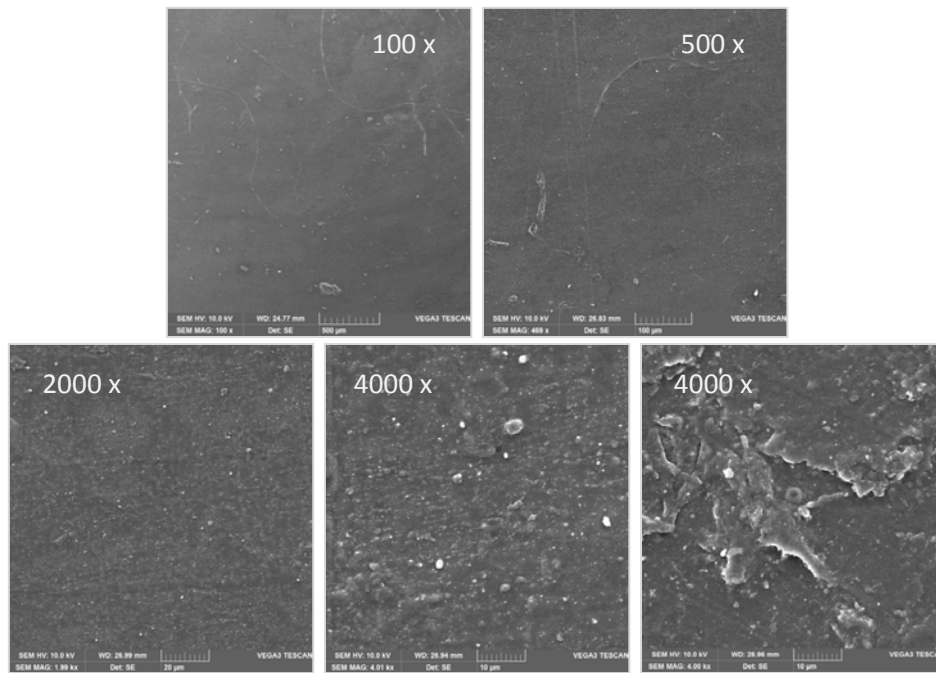
Na slici 43. prikazana je SEM mikrografija PLA polimera nakon razgradnje u otopini amilaze. Vodljivo je da je naizgled glatka površina pri manjem povećanju ustvari dosta nehomogena, a na samoj površini se uočavaju izbočine koje su vjerjatno nastale kao posljedica hidrolitičke / enzimske razgradnje i erozije površine. Površina loma PLA polimera nakon razgradnje, prikazana na slici 44. ne pokazuje značajne razlike u usporedbi s površinom loma netretiranog PLA polimera.



Slika 43. SEM mikrografija površine PLA nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze, pri različitim povećanjima



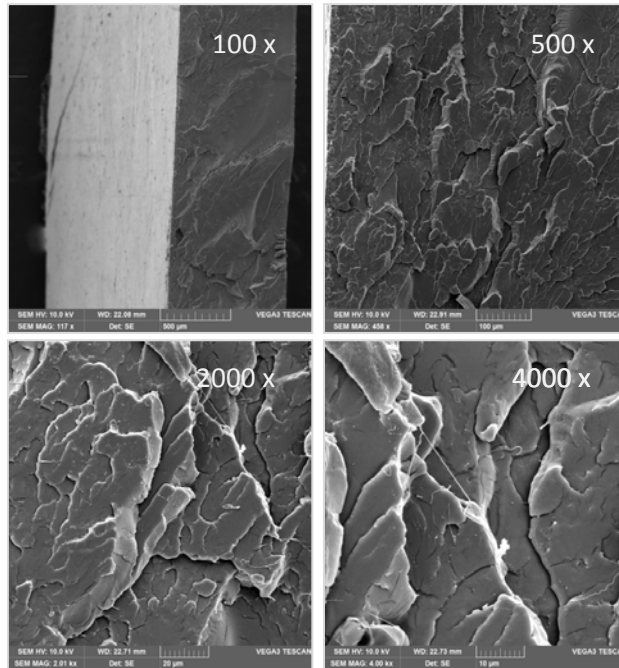
Slika 44. SEM mikrografija površine loma PLA nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze, pri različitim povećanjima



Slika 45. SEM mikrografija površine PLA nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze, pri različitim povećanjima

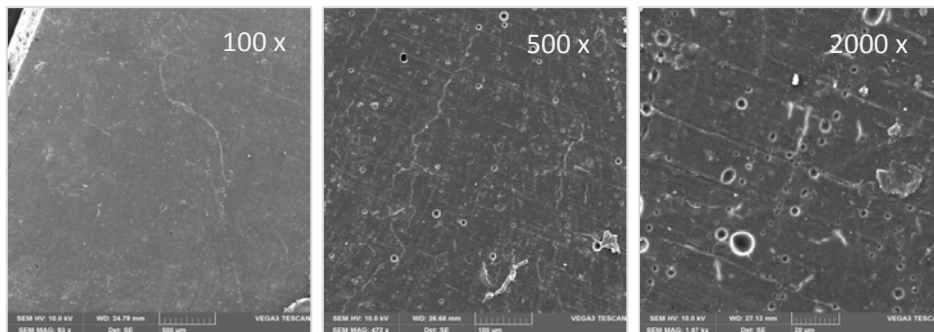
Na slici 45. prikazane su SEM mikrografije PLA polimera nakon 6 tjedana razgradnje u otopini kutinaze. Vidljivo je da je površina PLA polimera znatno hrapavija i nepravilnija u odnosu na netretirani PLA i PLA nakon razgradnje s amilazom što ukazuje na značajnije djelovanje kutinaze.

Površina loma PLA uzorka, slika 46., nakon razgradnje u otopini kutinaze takođe ne pokazuje razlike u odnosu na čisti PLA i PLA nakon razgradnje amilazom. Vidljiva je karakteristična morfologija loma krtog polimera.



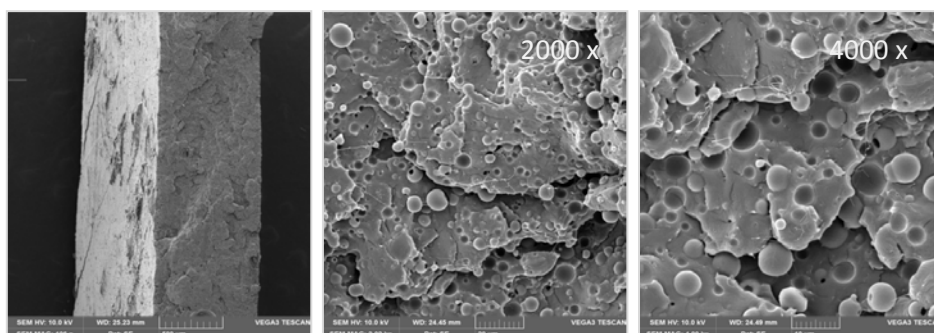
Slika 46. SEM mikrografija površine loma mješavine PLA nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze, pri različitim povećanjima

Morfologija površine PLA/HPC mješavine nakon razgradnje u otopini amilaze prikazana je na slici 47. Na površini uzorka vidljive su šupljine koje su nastale otapanjem i na taj način uklanjanjem HPC polimera iz mješavine.



Slika 47. SEM mikrografija površine PLA/HPC nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze, pri različitim povećanjima

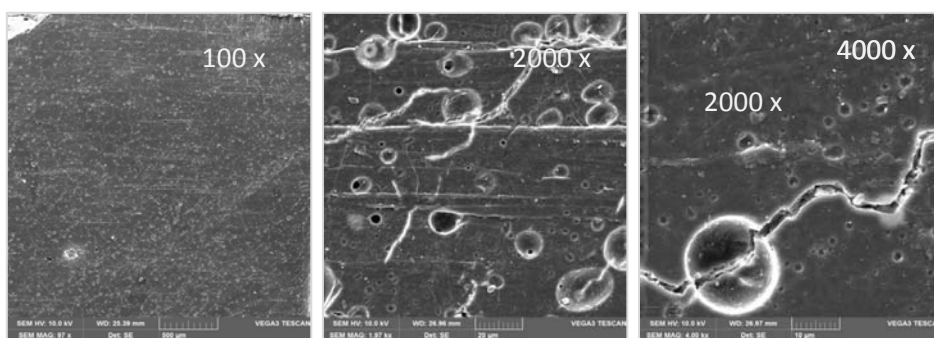
Na površini loma PLA/HPC uzorka nakon razgradnje u otopini amilaze, slika 48. vidljive su ravne plohe s nešto obližim bridovima i kuglicama HPC-a u usporedbi s netretiranim PLA/HPC uzorkom, što ukazuje na mogućnost da je zbog prodora vode u unutrašnjost materijala došlo do plastifikacije PLA.



Slika 48. SEM mikrografija površine loma PLA/HPC nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini α -amilaze, pri različitim povećanjima

Na slici 49. prikazana je mikrografija površine PLA/HPC mješavine nakon razgradnje u otopini kutinaze. Znatno veći broj šupljina i prisutne napukline ukazuju na značajnije djelovanje enzima kutinaze na razgradnju PLA/HPC mješavine u odnosu na enzim amilaze. Ovi rezultati potvrđuju znatno lošija mehanička svojstva PLA/HPC mješavina nakon razgradnje u otopini kutinaze.

Površina loma PLA/HPC mješavine nakon razgradnje u otopini kutinaze prikazana na slici 50., također ukazuje na plastificirajući učinak vode, koja je lakše prodrla u unutrašnjost PLA matrice što je rezultiralo nastajanjem „mekšeg“ materijala. Na površini loma vidljivi su oblji rubovi nakon kidanja.

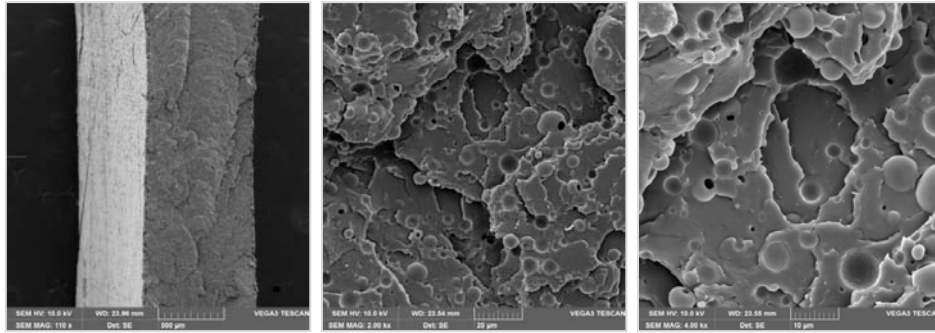


Slika 49. SEM mikrografija površine mješavine PLA/HPC nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze, pri različitim povećanjima

100 x

2000 x

4000 x



Slika 50. SEM mikrografija površine loma mješavine PLA/HPC nakon 6. tjedna enzimske razgradnje u PBS otopini kutinaze, pri različitim povećanjima

5. ZAKLJUČCI

veći gubitak mase uzoraka PLA/HPC mješavina nakon 6 tjedana razgradnje u PBS otopini α -amilaze i kutinaze ukazuje na bržu difuziju vode zbog prisutne hidrofilne HPC faze

- ✓ FTIR-ATR spektroskopijom nisu utvrđene promjene u strukturi PLA i PLA/HPC nakon enzimske razgradnje s α -amilazom i kutinazom
- ✓ mjerenja kontaktnog kuta s vodom na uzorcima PLA polimera pokazuju porast hidrofobnosti površine nakon razgradnje s α -amilazom te porast hidrofilnosti nakon razgradnje s kutinazom
- ✓ kontaktni kut s vodom kod uzoraka PLA/HPC mješavina nakon enzimske razgradnje u otopini α -amilaze i kutinaze upućuje na izdvajanje HPC faze
- ✓ DSC analizom potvrđene su promjene u strukturi nakon razgradnje PLA i PLA/HPC mješavine u otopini α -amilaze i kutinaze
- ✓ toplinska stabilnost PLA polimera i PLA/HPC mješavina ne mijenja se nakon enzimske razgradnje s α -amilazom i kutinazom u vremenu od 6 tjedana
- ✓ značajno sniženje prekidnih karakteristika PLA/HPC mješavina nakon razgradnje u otopini kutinaze ukazuje na bržu razgradnju u prisutnosti ovog enzima
- ✓ pretražnom elektronskom mikroskopijom potvrđeno je značajnije djelovanje enzima kutinaze na PLA polimer i PLA/HPC mješavinu

6. LITERATURA

1. D. Satyanarayana, P.R. Chatterji, J. Macromol. Sci. 33(3) (1993) 349-368.
2. http://hr.swewe.net/word_show.htm/?1296059_2&Biomedicinski_Materijali
(pristup 24.05.2015.)
3. I. Tokić, G. Fruk, T. Jemrić, Biodegradable packaging for storage of fruit and other horticultural products: materials, properties and its effect on fruit quality, Journal of Central European Agriculture 12 (1) (2011) 226-238.
4. V. Carek, V. Jerolimov, R. Rozgaj, Cytotoxicity and Genotoxicity of Some Dental Alloys, Acta stomatologica Croatica, 28 (3) (1994) 177-183.
5. S. Sukkhum, V. Kitpreechavanich, New Insight into Biodegradation of Poly(L-Lactide), Enzyme Production and Characterization, Progress in Molecular and Environmental Bioengineering – From Analysis and Modeling to Technology Applications, 27 (2011).
6. A. Södergard, M. Stolt, Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, Progress in Polymer Science 27 (2002) 1123-1163.
7. K. Madhavan Nampoothiri, N. Rajendran Nair, R. Pappy John, An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research, Bioresource Technology 101 (2010) 8493-8501.
8. R. Auras, B. Harte, S. Selke, An overview of polylactides as packaging materials, Macromolecular Bioscience, 4 (2004) 835-864.
9. R. M. Rasal, A. V. Janorkar, D. E. Hirt, Poly (lactic acid) modifications, Progress in Polymer Science 35 (2010) 338 – 356.
10. H. Urayama, S. I. Moon, Y. Kimura, Microstructure and thermal properties of polylactides with different L- and D- unit sequences: importance of the helical nature of the L- sequenced segments, Macromolecular Materials Engineering, 288 (2003) 137-143.
11. Sudhir S. Chakravarthi, Dennis H. Robinson, Biodegradation and autocatalysis of polylactides, University of Nebraska Medical Center, Nova Science Publishers (2009) 163-176.
12. Y. Tokiwa, A. Jarerat, Biodegradation of poly(L-lactide) Biotechnology Letters 26 (2004) 771-777.
13. T. Kovačić, Struktura i svojstva polimera, Sveučilišni udžbenik, Udžbenici Sveučilišta u Splitu, Split, 2010.
14. S. Sinha Ray, M. Okamoto, Biodegradable Polylactide and Its nanocomposites: Opening a new Dimension for Plastics and Composites, Macromolecular Rapid Communications 24 (2003) 815-840.

15. D.L.Kaplan, *Biopolymers from Renewable Resources*, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1 (1998) 21-22.
16. D.W. Grijpma, A.J. Nijenhuis, P.G.T. van Wijk, Pennings, A.J., High impact strength as-polymerised PLLA, *Polymer Bulletin* 29 (1992) 571-578
17. M. Hiljanen-Vanio, P.A. Orava, J.V. Seppala, Properties of ϵ -caprolactone/DL-lactide copolymers with a minor ϵ -CL content, *Journal of Biomedical Materials Research* 34 (1997) 39-46.
18. M. Hiljanen-Vanio, T. Karjalainen, J. Seppala, Biodegradable lactone copolymers, I. Characterisation and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers, *Journal of Applied Polymer Science*, 59 (1996) 1281-1288.
19. L. Avérous, E. Pollet, *Biodegradable Polymers, Environmental Silicate Nano- Biocomposites*, Springer – Verlag London 2 (2012) 25 – 26.
20. HRN EN ISO 472:2007 *Plastika – Rječnik*
21. HRN EN 13432:2003 *Ambalaža - Zahtjevi za oporabivost ambalaže kompostiranjem i biorazgradnjom - Sheme ispitivanja i kriteriji prihvatljivosti ambalaže*
22. R. Auras, L.-T. Lim, S. E. M. Selke, H. Tsuji (ed.). *Poly(Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications.*, Wiley, (2010) 317-320.
23. H. S. Azevedo, R. L. Reis, *Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate, Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (2004) 177-201.
24. V. Horvathova, Š. Janček, E. Šturdik, *Amylolytic enzymes: their specificities origins and properties*, *Biologia*, 55/6 (2000) 605-615.
25. A. Sharma, T. Satyanarayana, *Microbial acid-stable-amylases: Characteristics genetic engineering and applications*, *Process Biochemistry*, 48 (2013) 201-211.
26. G.D. Brayer, Y. Luo, Withers, S. G., *The structure of human pancreatic α -amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes*, *Protein Science*, 4 (1995) 1730-1742.
27. R. Aranjo, *Molecular biotechnology approaches towards the optimization of enzymes for advanced textile applications*, *Disertacija, Universidade do Minho, Minho, 2008*
28. D.B. Lopes, L.P. Fraga, L.F. Fleuri, G.A. Macedo, *Lipase and esterase-o what extent can this classification be applied accurately*, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31 (2011) 608-613.
29. S. Longhi, C. Cambillan, *Structure-activity of cutinase a small lipolytic enzyme*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1441(1999) 185-196.
30. *Product and technical information*, Aqualon, Klucel[®]HPC, hercules incorporated, USA (2001) 1-26.

31. www.agilent.com (pristup 17.05.2015.)
32. [http://www.phy.pmf.unizg.hr/~atonejc/MATEKAR%203%20Povrsinske%20metode .pdf](http://www.phy.pmf.unizg.hr/~atonejc/MATEKAR%203%20Povrsinske%20metode.pdf) (pristup 12.05.2015.)
33. P. Yadranka Žitinski Elías, T. Tomašegović, Djelovanje razvijača na vlaženje slobodnih površina ofsetnih tiskovnih formi, Sveučilište u Zagrebu, Grafički fakultet, Zagreb (2009)
34. T. Patrício, P. Bártolo, *Thermal stability of PCL/PLA blends produced by physical blending process*, *Procedia Engineering* 59 (2013) 292-297.
35. N. A. El-Wakil, Y. Fahmy, R. E. Abou-Zeid, A. Dufresne, S. El-Sherbiny, Liquid crystalline cellulose esters, *Bioresources* 5(3) (2010) 1834-1845.

7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

ν	valni broj (cm^{-1})
θ	kontaktni kut ($^{\circ}$)
χ_c	stupanj kristalnosti (%)
Asp	asparaginska kiselina
ATR	Infracrvena spektroskopija: Prigušena totalna refleksija (<i>engl. Infrared spectroscopy: Attenuated total reflection</i>)
C_p	toplinski kapacitet (J/K)
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija
E	rastezni modul (MPa)
FTIR	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
Glu	glutamiska kiselina
His	histidin
HPC	hidroksipropilceluloza
PBS	fosfatom puferirana otopina soli (<i>engl. Phosphate Buffered Saline</i>)
PLA	poli(laktid)
PLA/HPC	mješavina poli(laktida) i hidroksipropilceluloze
PLDA	poli (D-mliječna kiselina)
PLLA	poli (L-mliječna kiselina)
SEM	pretražni elektronski mikroskop
Ser	serin
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
T_c	kristalište ($^{\circ}\text{C}$)
T_{cc}	temperatura hladne kristalizacije ($^{\circ}\text{C}$)
T_{end}	temperatura maksimalne brzine razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
T_g	staklište ($^{\circ}\text{C}$)
TGA	termogravimetrijska analiza
T_m	talište ($^{\circ}\text{C}$)
T_{max}	temperatura kraja razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{on\ set}$	temperatura početka razgradnje ($^{\circ}\text{C}$)
w	maseni udio (%)
W	rad (Nm)
ΔC_p	specifični toplinski kapacitet (J/kgK)
ΔH_c	entalpija kristalizacije (J/g)
ΔH_m	entalpija taljenja (J/g)
Δm	gubitak mase (%)
ϵ	istezanje (%)
σ	naprezanje (MPa)

ŽIVOTOPIS

Antonela Bošković rođena je 12.06.1990. u Metkoviću. Osnovnu i srednju školu završila je u Metkoviću. 2009. Godine upisala je preddiplomski studij kemijskog inženjerstva na Kemijsko – tehnološkom fakultetu u Splitu, te je 2013. Godine stekla titulu prvostupnika. Na temelju natječaja „10 stipendija za 10 najstudentskih projekata“ koji je u organizaciji Jutarnjeg lista i Ine dobila je jednogodišnju stipendiju za svoj završni rad „Ispitivanje pucolanske aktivnosti silicijske prašine iz proizvodnje ferosilicija“. Iste godine upisala je diplomski studij kemijsko inženjerstvo u zaštiti okoliša na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Sudjelovala je 2014. godine na Međunarodnom skupu studenata tehnologije u Novom Sadu s radom „ Katalitička oksidacija fenolne otpadne vode uz katalizatore na bazi zeolita“.