

Enzimaska razgradnja polimera

Tolj, Mirjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:821300>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mirjana Tolj

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Mirjana Tolj

ENZIMSKA RAZGRADNJA POLIMERA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Mirela Leskovic

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Mirela Leskovic

Dr. sc. Zrinka Buhin Šturlić, poslijedoktorand

Doc. dr. sc. Ljerka Kratofil Krehula

Zagreb, srpanj 2018.

SAŽETAK

Enzimska razgradnja polimera

Razgradivi polimeri se razgrađuju tijekom ili neposredno nakon njihovog perioda primjene. Biorazgradnja se može odvijati pod utjecajem mikroorganizama, enzima ili gljivica ili se može javiti isključivo zbog kemijskih ili radikalskih procesa kao što su hidroliza, oksidacija i UV zračenje. Polistiren (PS) je plastomer linearnih makromolekula koje se sastoje od niza $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-$ ponavljanih jedinica. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) je biorazgradivi alifatski poliester koji se široko primjenjuje za uporabu u medicinskim implantatima. PCL se polako razgrađuje zbog prisutnosti pet hidrofobnih $-\text{CH}_2$ skupina u njegovim ponavljajućim jedinicama.

U ovom radu istražen je utjecaj enzima lipaze na razgradnju poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) i polistirena (PS). Praćena je promjena mase prije i tijekom enzimske razgradnje te količina apsorbirane vode, dok su površinske karakteristike istražene mjerenjem kontaktnog kuta i primjenom FTIR-ATR spektroskopije. Dobiveni rezultati pokazali su da u prisutnosti enzima lipaze dolazi do razgradnje PCL-a.

Ključne riječi: polistiren, poli(ϵ -kaprolakton), enzimska razgradnja, lipaza

ABSTRACT

Enzymatic degradation of polymers

Degradable polymers will degrade throughout or instantly after their application period. Biodegradation can take place under the influence of microorganisms, enzymes or fungi or may occur due to the chemical or radical processes, such as hydrolysis, oxidation, and UV irradiation. Polystyrene (PS) is a plastomer of linear macromolecules consisting of $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-$ repetitive units. Poly (ϵ -caprolactone) (PCL) is biodegradable aliphatic polyester widely used for medical implants. PCL slowly degrades due to the presence of five hydrophobic $-\text{CH}_2$ groups in its recurring units.

In this work, the effect of the enzyme lipase on the degradation of poly (ϵ -caprolactone) and polystyrene was investigated. Before and during enzymatic degradation the mass change and the amount of absorbed water were investigated. Surface characteristics were explored by measuring the contact angle and using FTIR-ATR spectroscopy. The obtained results show that PCL degrade in the presence of enzyme lipase.

Keywords: polystyrene, poly (ϵ -caprolactone), enzymatic degradation, lipase

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Mireli Leskovic na pruženoj pomoći i savjetima, strpljenju i stručnom vodstvu pri izradi ovog završnog rada.

Dr. sc. Zrinki Buhin Šturlić, neposrednoj voditeljici, zahvaljujem na pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada, na pruženoj pomoći, savjetima i strpljenju.

Također, zahvaljujem se obitelji koja je moja najveća podrška i koja je imala povjerenja i razumijevanja za sve moje životne izbore.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. POLIMERI	3
2.1.1. Podjela polimera	4
2.1.2. Sintetski polimeri	7
2.1.3. Biorazgradivi polimeri	7
2.2. Polistiren (PS).....	9
2.2.1. Dobivanje i struktura polistirena.....	9
2.2.2. Svojstva i primjena polistirena.....	11
2.3. Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL)	12
2.3.1. Dobivanje i struktura polikaprolaktona	12
2.3.2. Svojstva i primjena polikaprolaktona	13
2.4. ENZIMI	14
2.4.1. Struktura enzima	15
2.4.2. Aktivno mjesto.....	17
2.4.3. Lipaza.....	18
2.4.4. Enzimska razgradnja PCL-a	18
2.5. METODE KARAKTERIZACIJE POVRŠINE.....	20
2.5.1. Mjerenje kontaktnog kuta	20
2.5.2. FTIR-ATR spektroskopija	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. MATERIJALI.....	23
3.2. PRIPRAVA PS i PCL PLOČICA	24
3.3. POSTUPAK ENZIMSKE RAZGRADNJE	25
3.4. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE	27
3.4.1. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom.....	27
3.4.2. FTIR-ATR spektroskopija	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Utjecaj enzima lipaze na promjenu mase	29
4.2. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom	32
4.3. Rezultati FTIR-ATR analize	35
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	40
7. ŽIVOTOPIS	42

1. UVOD

Polimeri su makromolekulni spojevi sastavljeni od istovrsnih ponavljanih jedinica. Polimerni materijali imaju različiti spektar svojstava ovisno o njihovoj strukturi.¹⁻³ Upravo ta svojstva učinila su polimere iznimno korisnim za čovječanstvo. Koriste se za pakiranje hrane, proizvodnju odjeće, u transportu, u medicinskim uređajima, informacijskoj tehnologiji itd. Polimeri mogu biti sintetski ili prirodni. Važna primjena polimera jest u biomedicinske svrhe za izradu različitih implantata. U odnosu na prirodne polimere koji su često vrlo skupi, skloni promjeni svojstava i interakcijama s virusima i bakterijama sintetski polimeri nalaze širu primjenu iz razloga što im se mogu lako kontrolirati fizikalno-kemijska svojstva i kvaliteta te se lako mogu prilagoditi i dati širi raspon svojstava. Sintetski polimeri mogu se podijeliti na: biorazgradive i ne-biorazgradive. Sintetski biorazgradivi polimeri poželjniji su za primjenu u inženjerstvu tkiva. Njihovom primjenom smanjuje se moguća reakcija tijela na strano tijelo i omogućava stvaranje novog prirodnog tkiva te su biološki inertni i imaju ujednačena i predvidiva svojstva koja se lako modeliraju.

Najčešće korišteni biorazgradivi polimeri su alifatski poliesteri koji se lako resorbiraju u ljudskom tijelu dajući neotrovne monomerne hidroksi kiseline kao razgradne produkte što ih čini prikladnima za medicinsku primjenu. Najčešće se primjenjuju u inženjerstvu tkiva i u kontroliranoj isporuci lijeka. Alifatski poliesteri se razgrađuju jednim ili kombinacijom mehanizama, npr. hidrolizom, enzimskom, mikrobiološkom ili toplinskom razgradnjom.⁴⁻⁸

Polistiren je lagani i čvrsti materijal dobiven polimerizacijom stirena (vinil benzena). Ataktan, amorfni polimer, nazvan samo polistiren, čvrst je i tvrd, sličan staklu, proziran materijal, visokog indeksa loma i velike propusnosti za vidljivi dio svjetla. Zbog nepolarnog karaktera molekula, polistiren je potpuno postojan na utjecaj vode, pa je izvrsnih električnih izolacijskih svojstava. Jednostavno se prevodi u pjenasti materijal niske gustoće i tada je jedan od najboljih izolatora zvuka i topline.

Poli-ε-kaprolakton (PCL) je biorazgradivi polimer, koji ima dugo vrijeme razgradnje. PCL se razgrađuje u vremenu od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o molekularnoj masi, stupnju kristaliničnosti i uvjetima razgradnje. Posjeduje izvrsna mehanička svojstva u usporedbi s ostalim biorazgradivim polimerima. Njegova visoka čvrstoća i elastičnost ovise o njegovoj molekularnoj masi. Pogodan je za uporabu u šavovima, tetivama, hrskavicama, kostima i drugim biomedicinskim primjenama u kojima je potrebna mehanička čvrstoća.

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus* na svojstva sintetičkog polimera polistirena (PS) i poli(ϵ -kaprolaktona) (PCL) tijekom razgradnje u vremenu od 4 tjedna, pri temperaturi od 37 °C.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIMERI

Naziv polimer grčkog je podrijetla, nastao od dvije riječi, poli što znači mnogo i meros što znači dio, a prvi put ga je upotrijebio švedski kemičar Jöns Jakob Berzelius još 1833. To su kemijski spojevi koji imaju jednaki sastav, a razlikuju se veličinom molekulske mase. Prvu reakciju polimerizacije u laboratoriju, vjerojatno je proveo berlinski ljekarnik Eduard Simon 1839. godine, kad je zagrijavanjem uljaste tekućine nastale destilacijom prirodnog balzama, storaksa, koju je nazvao stirolom, dobio krutu, prozirnu masu. Na temelju tog opisa francuski kemičar Marcelin Berthelot je 1866. reakciju nastajanja velike, asocirane molekule od većeg broja manjih molekula, nazvao reakcijom polimerizacije. 1924. godine njemački kemičar Hermann Staudinger uveo je naziv i pojam makromolekula.¹

Makromolekule su kemijski spojevi vrlo velikih relativnih molekulskih masa koje mogu biti u rasponu od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna, tako da su i njihove dimenzije također velike, promjera od 10 do 1000 nm pa ulaze u područje koloidnog razdjeljenja tvari. Velika većina makromolekula sastavljena je od istovrsnih ponavljanih jedinica pa se tada nazivaju polimerima.¹

Dakle, polimeri su dugolančane molekule vrlo visoke molekulske mase, sastavljene od mnogo ponavljajućih jedinica iste ili različite vrste (od monomera). Prvi upotrijebljeni polimeri bili su prirodni proizvodi poput pamuka, škroba, proteina i vune. Početkom dvadesetog stoljeća napravljeni su i sintetski polimeri.²

Polimerni materijali imaju visoku čvrstoću, posjeduju temperaturu staklastog prijelaza i imaju visoku viskoznost kao taline i otopine. Upravo ta svojstva učinila su polimere iznimnom korisnima za čovječanstvo. Koriste se u pakiranju hrane, odjeći, transportu, medicinskim uređajima, informacijskoj tehnologiji itd.³

2.1.1. Podjela polimera

Polimeri se razvrstavaju na nekoliko načina i skupina:

1. Podjela prema podrijetlu

- Prirodni polimeri: celuloza, škrob, kaučuk, svila, vuna, pamuk i biopolimeri.

Biopolimeri su prirodni polimeri od kojih su izgrađeni živi organizmi, prije svega bjelačevine, nukleinske kiseline, posebni polisaharidi, a zatim hormoni, fermenti i sl.

- Sintetski polimeri

a) prema reakcijskom mehanizmu nastajanja:

- stupnjeviti (postupni, kondenzacijski)
- lančani (adicijski)

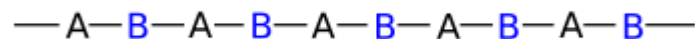
b) prema vrsti ponavljanih jedinica

- homopolimeri (jedna ili više vrsta ponavljanih jedinica)
- kopolimeri (dvije ili više vrsta ponavljanih jedinica)

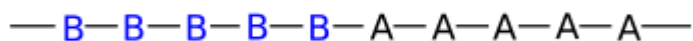
- ◆ Statistički kopolimer – nasumična, nepravilna raspodjela dviju monomernih jedinica duž kopolimernog lanca i to je najzastupljenija vrsta kopolimera



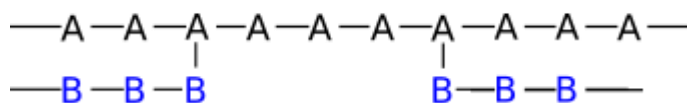
- ◆ Alternirajući kopolimer - dvije monomerne jedinice u ekvimolarnim količinama, naizmjeničan raspored



- ◆ Blok-kopolimer – duge sekvencije (blokovi) ponavljanih jedinica pojedinih vrsta monomera

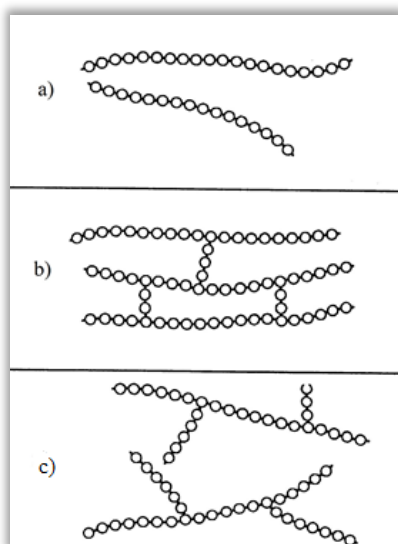


- ◆ Cijepljeni kopolimer - razgranati kopolimer - na lancu jedne vrste ponavljanih monomernih jedinica (temeljni lanac) vezan je jedan ili više bočnih lanaca druge vrste ponavljanih monomernih jedinica



c) prema oblicima makromolekula

- linearni, granati, umreženi, trodimenzijski (slika 1.)



Slika 1. Strukture sintetskih polimera ovisno o oblicima molekula:

- a) linearna, b) umrežena, c) razgranata

2. Podjela prema primjenskim svojstvima

- **poliplasti** (plastični materijali): plastomeri (termoplastične mase) i duromeri (termoreaktivne plastične mase)
- **elastomeri**
- **vlakna**
- **premazi, ljepila, veziva, funkcionalni polimeri**: katalizatori, ionski izmjenjivači, poboljšivači viskoznosti, membrane, elektrovodljivi, senzori, monitori itd.

Polimeri su većinom organskog podrijetla i sastoje se od ugljika, vodika, kisika, dušika, a rjeđe sadrže i druge, anorganske elemente kao B, Si, P, S, F i Cl, pa u ovisnosti o njihovom udjelu mogu biti poluorganski ili potpuno anorganski polimeri. Anorganski polimeri ne sadrže ugljikove atome već su građeni od makromolekula koje sadrže anorganske temeljne lance i bočne skupine. Poluorganski polimeri imaju anorganske elemente u temeljnom lancu ili bočnim skupinama. Velika većina sintetskih polimera neutralne su molekule, međutim, ako imaju ionizirajuće skupine u ponavljanim jedinicama, nazivaju se polielektrolitima i pri disocijaciji stvaraju poliione. Tipični primjeri su polikiseline koje disocijacijom stvaraju polianione, kao što su poli (akrilna kiselina) i polibaze koje s protonima stvaraju polikatione, kao što je poli (vinil-amin).¹ Makromolekule koje sadrže i pozitivne i negativne naboje nazivaju se poliamfolitima.¹

Polimeri mogu biti ili semikristalni ili amorfni. Semikristalni polimeri imaju ponavljajuće jedinice koje dopuštaju lancima da se preklope u guste regije zvane kristalitima. Tako se dobivaju polimeri veće vlačne čvrstoće u usporedbi s amornim analogom. Niti jedan polimer se ne može potpuno organizirati u potpuno kristalni materijal i zbog toga još uvijek postoje amorfna područja u semikristalnim polimerima. Amorfni polimeri i amorfna područja semikristalnih polimera pokazuju temperaturu staklastog prijelaza (T_g). Na temperaturama iznad T_g , polimeri djeluju više poput gume, a na temperaturama ispod T_g , polimeri djeluju više poput stakla.⁴

2.1.2. Sintetski polimeri

Sintetski polimeri dobivaju se polimerizacijom monomera i osnova su za proizvodnju polimernih materijala. Broj monomernih jedinica u lančanim polimernim molekulama naziva se stupnjem polimerizacije, pa o njemu ovisi i relativna molekulska masa polimera, koja je uglavnom veća od 10 000. Pojedini sintetski polimeri nemaju točno određenu i uvijek jednaku relativnu molekulsku masu, jer su to smjese makromolekula samo približno jednake veličine, pa se računa s prosječnim vrijednostima. Polimeri s malim stupnjem polimerizacije nazivaju se oligomeri.

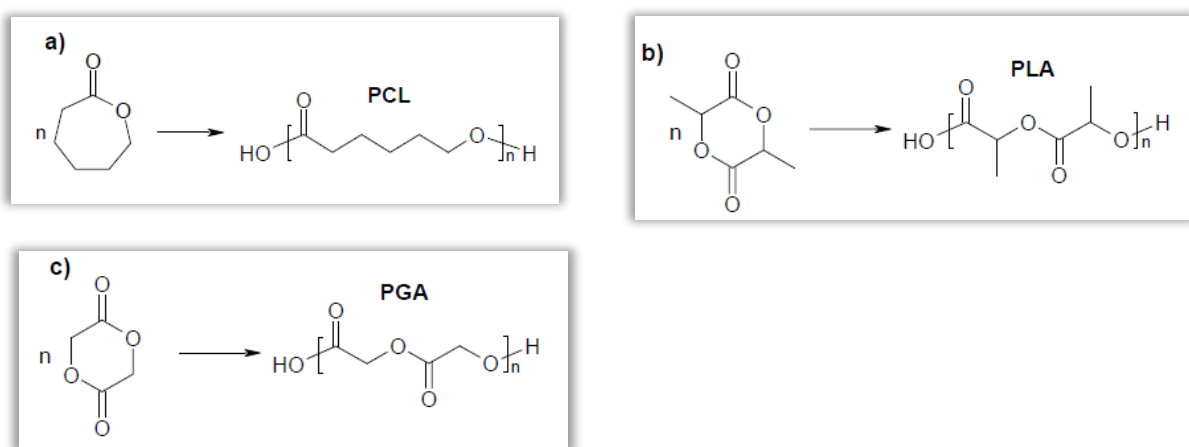
U homopolimerima su sve monomerne jedinice jednake, dok se kopolimeri sastoje od dvije do tri vrste monomernih jedinica.⁵

2.1.3. Biorazgradivi polimeri

Razgradivi polimeri se razgrađuju tijekom ili neposredno nakon njihovog perioda primjene. Ukoliko se razgradnja odvija djelovanjem okolišnih čimbenika, polimer se smatra biorazgradivim.

Biorazgradnja se može odvijati ili pod utjecajem mikroorganizama, enzima ili gljiva ili se može odvijati isključivo kemijskim ili radikalskim procesima kao što su hidroliza, oksidacija i UV zračenje.

Najčešće korišteni biorazgradivi polimeri su alifatski poliesteri polilaktid (PLA), poliglikolid (PGA) i poli(ϵ -kaprolakton) (PCL). Obično se sintetiziraju iz svojih cikličkih monomera putem polimerizacije otvaranja prstena (slika 2).⁶

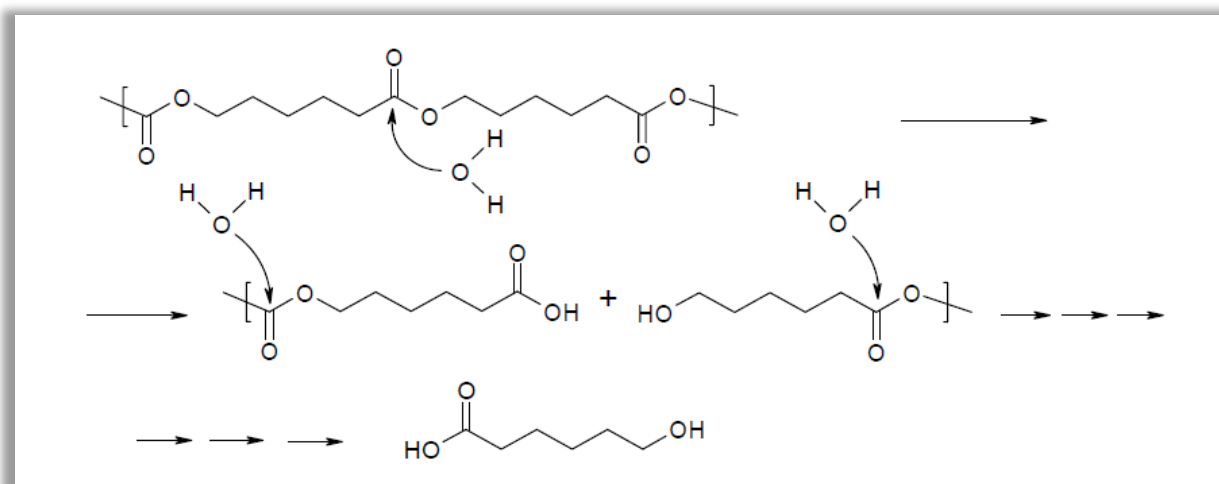


Slika 2. Prikaz polimerizacije otvaranja prstena: a) PCL, b) PLA, c) PGA

Dobiveni polimeri su semikristalni i imaju dobra mehanička svojstva. Najčešće se primjenjuju u inženjerstvu tkiva i u kontroliranoj isporuci lijeka. Alifatski poliesteri se resorbiraju u ljudskom tijelu dajući neotrovne monomerne hidroksi kiseline kao proizvode razgradnje što ih čini prikladnima za medicinsku primjenu.⁶

Biorazgradnja je postignuta sintetiziranjem polimera koji imaju hidrolitički nestabilne veze. Najčešće kemijske, funkcionalne skupine su esterske, anhidridne, ortoesterske i amidne.⁴

Alifatski poliesteri se razgrađuju jednim ili kombinacijom nekoliko mehanizama, npr. hidrolizom, enzimskom, mikrobiološkom ili toplinskom razgradnjom. Brzina razgradnje je ovisna o nekoliko čimbenika kao što su stupanj kristalnosti, hidrofilnost, sastav kopolimera, molekulska masa, veličina i geometrija uzoraka i uvjeti razgradnje polimera u okolini kao što su pH i temperatura. Razgradnja polimera u okolini je praktički nepromjenjiva *in vivo* pa stoga svojstva polimera u konačnici određuju brzinu razgradnje. Alifatski poliesteri se razgrađuju *in vivo* hidrolitičkim cijepanjem esterskih veza. (slika 3.)⁶



Slika 3. Shematski prikaz hidrolize PCL polimera⁶

Poli- ϵ -kaprolakton (PCL) je jedan od biorazgradivih polimera, koji ima dugo vrijeme razgradnje.⁷ PCL se razgrađuje u roku od nekoliko mjeseci do nekoliko godina, ovisno o molekularnoj masi, stupnju kristalnosti i uvjetima razgradnje.⁸ PCL polako degradira zbog prisutnosti pet hidrofobnih $-\text{CH}_2$ skupina u njegovim ponavljajućim jedinicama. PCL se podvrgava hidrolitičkoj razgradnji pod fiziološkim uvjetima zbog osjetljivosti njegovog alifatskog estera.⁷

Razgradnja semikristalnih poliestera, kao što je i PCL, u vodenom mediju se odvija u dva stupnja. Prvi stupanj započinje difuzijom vode u amorfna područja, nakon čega slijedi

hidrolitička razgradnja esterske veze u amorfnom području, što dovodi do gubitka mase i kasnije do povećanja kristalnosti. Drugi stupanj počinje s hidrolitičkom razgradnjom kristalnih domena nakon što je većina amornog područja razgrađena (slika 3.). Razgradnja je autokatalizirana karboksilnim kiselinama nastalim tijekom hidrolize, ali također može biti i katalizirana enzimom koji ubrzava razgradnju.⁸

Biorazgradivi polimeri mogu biti ili prirodni ili sintetski. Sintetski polimeri imaju veću prednost u odnosu na prirodne iz razloga što se mogu prilagoditi i dati širi raspon svojstava. Čimbenici koji utječu na svojstva biorazgradivih polimera su odabir monomera, odabir inicijatora, uvjeti procesa i prisutnost aditiva. Ti čimbenici utječu na površinska svojstva polimera, kristalnost, temperaturu taljenja, temperaturu staklastog prijelaza, molekulsku masu, raspodjelu molekulskih masa, završne skupine i prisutnost ostataka monomera, te na mehanička svojstva.

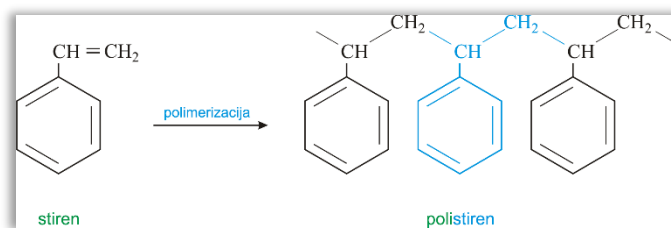
Polimeri pripremljeni od glikolne kiseline i mliječne kiseline su pronašli brojne primjene u medicinskoj industriji, počev od biorazgradivih šavova. Od tada i drugi medicinski uređaji, na osnovi mliječne i glikolne kiseline, kao i drugih materijala, prihvaćeni su za uporabu kao medicinski uređaji.⁴

2.2. Polistiren (PS)

Polistiren je plastomer linearnih makromolekula koje se sastoje od niza $-\text{CH}_2 - \text{CH}(\text{C}_6\text{H}_5)-$ ponavljanih jedinica. Polistiren je lagani i čvrsti materijal dobiven polimerizacijom stirena (vinil benzena). Svojstva su mu slična svojstvima konstrukcijskih polimera-izvršna toplinska postojanost i dobra električna izolacijska svojstva omogućuju mu predvidivu primjenu u obliku mješavina s drugim polimerima, prije svega u elektrotehnici i elektronici.¹

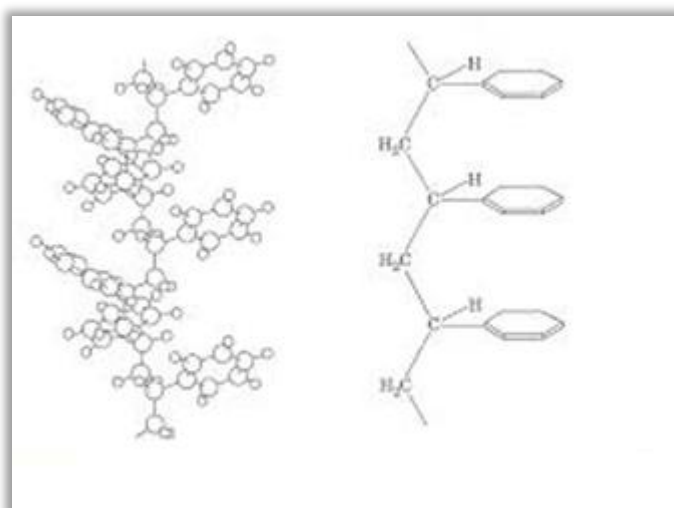
2.2.1. Dobivanje i struktura polistirena

Uobičajeno je amorfne strukture kao rezultat statističke orijentacije makromolekula ataktne konfiguracije. Dobiva se polimerizacijom stirena, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}=\text{CH}_2$ (slika 4.),



Slika 4. Polimerizacija stirena

industrijski radikalnom polimerizacijom, procesima u masi, suspenziji i emulziji, a laboratorijski i uz stereospecifične Ziegler-Natta inicijatore. Najvažniji su postupci proizvodnje polistirena procesi polimerizacije stirena u masi i suspenziji, a rjeđe u otopini i emulziji. U tom slučaju nastaje polimer izotaktne strukture (slika 5.), velike teorijske zanimljivosti, ali bez tehničke primjene. Priređen je također i sindiotaktni polistiren polimerizacijom stirena metalocenskim koordinativnim katalizatorima.



Slika 5. Izotaktna struktura polistirena

Polimerizacijom stirena u masi nastaje proizvod velike čistoće i zato velike prozirnosti i izvrsnih električnih svojstava. Tehnološka provedba tog procesa otežana je zbog velike reakcijske topline (672 kJkg^{-1}) i velike viskoznosti sustava. Polimerizacija stirena u masi teče uz ili bez radikalnih inicijatora, pri visokim temperaturama uz manje količine neutralnog otapala, najčešće etilbenzena. Mehanizam reakcije temelji se na prethodnoj dimerizaciji stirena, a nastali dimer zatim s trećom molekulom stvara radikal, aktivan inicijator reakcije.

Polimerizacija stirena u suspenziji služi za dobivanje svih komercijalnih vrsta polistirena, a osnovni je postupak za proizvodnju pjenećeg (ekspandirajućeg) polistirena. Inicijatori reakcije su obično organski peroksidi topljivi u monomeru. Polimerizacijom u vodenoj suspenziji olakšan je prijenos topline, a dobiveno polimerno zrnje lako se odvaja, međutim, proizvod je malo onečišćen stabilizatorima suspenzije.

Proces u emulziji se primjenjuje samo u malom opsegu za dobivanje polistirenskog lateksa jer prisutan emulgator znatno onečišćuje proizvod. Navedenim procesima promjenom temperature i vrste inicijatora reakcije, dobiva se polistiren odgovarajuće relativne molekularne mase. ¹

2.2.2. Svojstva i primjena polistirena

Ataktan, amorfan polimer, nazvan samo polistiren, čvrst je i tvrd, sličan staklu, proziran materijal, visokog indeksa loma i velike propusnosti za vidljivi dio svjetla. Zbog kristalne prozirnosti, premda amorfne strukture, često se naziva i kristalan polistiren. Zahvaljujući raznolikostima primjene, laganoj preradljivosti i relativno niskim cijenama, polistiren i drugi polimeri na osnovi stirena, zauzimaju treće mjesto u ukupnoj svjetskoj potrošnji plastomera. Nagli razvoj tih polimera uslijedio je nakon Drugoga svjetskog rata, zahvaljujući velikim kapacitetima za proizvodnju stirena koji su izgrađeni u SAD-u, u sklopu programa proizvodnje sintetskog kaučuka. U tom razdoblju dolazi i do jednog od najvažnijih otkrića na tom području kad je J.L. Amos 1950. proveo cijepljenu polimerizaciju stirena i sintetskog SBR-kaučuka. Na taj način dobiven je modificirani polistiren koji uz maseni udjel samo nekoliko postotaka kaučuka poprima veliku udarnu žilavost, što je inače jedan od osnovnih nedostataka čistog polistirena.

Polistiren ima relativno nisku temperaturu taljenja, oko 100 °C. Temperatura staklastog prijelaza mu je 80-100 °C, a gustoća polistirena iznosi 1,05-1,07 gcm⁻³. Upotrebljava se do 75 °C, a ta temperaturna postojanost ne ovisi o molekularnoj masi, ali se znatno smanjuje s povećanjem količine ostatnog monomera. Pri temperaturama višim od 300 °C dolazi do nagle depolimerizacije i razgradnje polistirena. Stirenski polimeri podložni su i fotokemijskoj razgradnji pod utjecajem sunčevog svjetla zbog adsorpcije ultraljubičastog zračenja. Izloženi materijal najprije poprimi žuto obojenje, a zatim dolazi do smanjenja vrijednosti većine mehaničkih svojstava. Dodavanjem antioksidansa u količini do 0,5%, kao što je tert-

butilkatehol, znatno se povećava postojanost polistirena prema toplinskoj i fotokemijskoj razgradnji. Zbog nepolarnog karaktera molekula, polistiren je potpuno postojan na utjecaj vode, pa je izvršnih električnih izolacijskih svojstava. Jednostavni se prevodi u pjenasti materijal niske gustoće i tada je jedan od najboljih izolatora zvuka i topline.¹

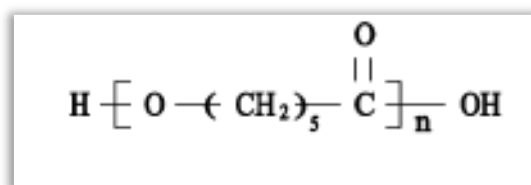
U građevinskoj industriji se koriste dvije vrste polistirena: ekspanzirani polistiren i ekstrudirani polistiren. Ekspanzirani polistiren se često zove i stiroporom ili bijelim stiroporom, a ekstrudirani polistiren se zove i tvrdim stiroporom ili plavim/zelenim/rozim stiroporom. Upotrebljavaju se kao toplinska izolacija zidova, podova i krovova.⁹

2.3. Poli(ε-kaprolakton) (PCL)

PCL je biorazgradivi alifatski poliester koji se široko primjenjuje za uporabu u medicinskim implantatima. Zbog propusnosti lijekova, obično se koristi i u isporuci lijekova.¹⁰

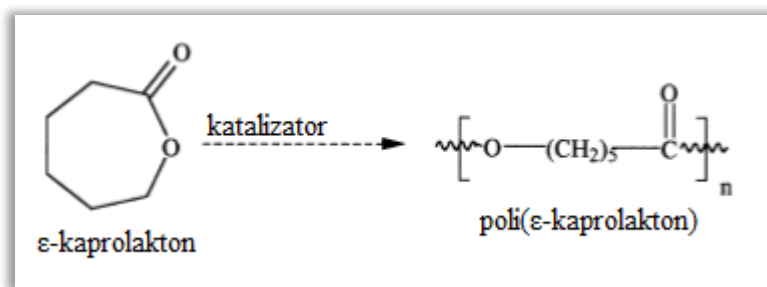
2.3.1. Dobivanje i struktura polikaprolaktona

Strukturna formula PCL-a prikazana je na slici 6.



Slika 6. Strukturna formula PCL-a

Poli(ε-kaprolakton) je moguće sintetizirati na dva načina. Prvi način je iz cikličkog monomera polimerizacijom otvaranja prstena (eng. ring-opening polymerization) što je prikazano na slici 7. Pri ovoj polimerizaciji dolazi do otvaranja prstena ε-kaprolaktona primjenom anionskih, kationskih i koordinacijskih katalizatora. Drugi način je slobodna radikalska polimerizacija. Dolazi do otvaranja prstena 2-metilen-1,3-dioksiciklopentana.⁷



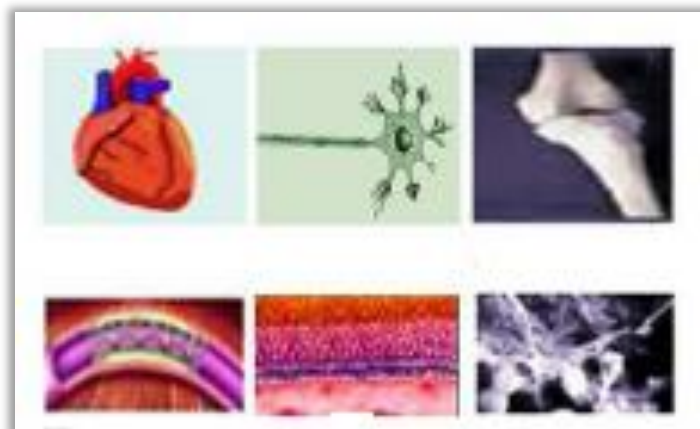
Slika 7. Polimerizacija otvaranjem prstena ϵ -kaprolaktona

2.3.2. Svojstva i primjena polikaprolaktona

PCL je hidrofobni, semikristalan polimer. On spada u skupinu alifatskih poliestera. Njegova kristalinična svojstva se smanjuju s povećanje molekulske mase. PCL je topljiv pri sobnoj temperaturi u kloroformu, diklormetanu, benzenu, toluenu, cikloheksanonu, tetrahidrofuranu i octenoj kiselini, slabo topljiv je u acetonu, 2-butanonu, etil-acetatu i acetonitrilu, a netopiv je u alkoholu, petroleju i dietil-eteru. Poli(ϵ -kaprolakton) ima temperaturu staklastog prijelaza ili staklišta (T_g) od -60°C i temperaturu taljenja (T_m) u rasponu od 59 do 64°C .⁷

Posjeduje vrhunska mehanička svojstva u usporedbi s ostalim biorazgradivim polimerima. Njegova vrlo visoka čvrstoća i elastičnost ovise o njenoj molekularnoj težini. Pogodan je za uporabu u šavovima, tetivama, hrskavicama, kostima i drugim biomedicinskim primjenama u kojima je potrebna mehanička čvrstoća.¹¹

PCL-a se najčešće koristi za obnovu tkiva (tetiva i ligamenata, srčanih i krvnih žila, živaca) što je prikazano na slici 8.



Slika 8. Primjena PCL u inženjerstvu tkiva¹¹

PCL se može koristiti kao jedna od komponenata mješavine ili kao kopolimer zbog toga što mehanička i razgradna svojstva čistog PCL-a nisu primjerena zahtjevu za neke vrste tkiva, kao što je npr. koštano tkivo. Ugradnja nanostrukturiranog materijala za punjenje u PCL može biti važna strategija za poboljšanje i modeliranje mehaničkih i razgradnih svojstava materijala na bazi PCL-a.⁸

2.4. ENZIMI

Enzimi su iznimno velike molekule. Njihova molekulska masa varira od 5000 do 5 000 000 *Da*, s tipičnim vrijednostima od 20 000 do 100 000 *Da*. Enzimi pripadaju velikoj biokemijskoj obitelji makromolekula poznatoj kao proteini.¹²

Enzimi su biokatalizatori i oni povećavaju brzinu reakcije za postizanje ravnoteže, ali ne utječu na položaj ravnoteže. Oni za razliku od kemijskih katalizatora posjeduju izrazitu specifičnost prema supstratu, tj. oni reagiraju s točno određenim produktom metabolizma, a ne reagiraju ni sa strukturno sličnim spojevima. Enzimi djeluju stereospecifično tj. reagiraju samo s jednim od dva moguća enantiomera. Svaka enzimska reakcija započinje reverzibilnim vezanjem supstrata. Enzimi, kao i drugi katalizatori, izlaze nepromijenjeni iz reakcije.¹³

Svaki enzim katalizira samo jednu kemijsku reakciju na određenom kemijskom supstratu.¹²

Prema vrsti katalitičke reakcije enzimi se mogu podijeliti u šest glavnih skupina: ¹³

- Oksidoreduktaze
- Transferaze
- Hidrolaze
- Liaze
- Izomeraze
- Ligaze

Unutar glavnih skupina podjela se provodi prema kemijskim vezama koje nastaju ili se cijepaju.

2.4.1. Struktura enzima

Najveći broj enzima pripada skupini globularnih proteina molekulske mase od 10 000 do 100 000. Izgrađeni su od proteinskog dijela i neke prostetske ili neproteinske grupe. Neki enzimi u svojoj aktivnoj formi vežu takvu grupu reverzibilno pa takve enzime nazivamo apoenzimima, a prostetsku grupu koenzimom.^{12,13}



Proteini se sastoje samo od L-aminokiselina i stoga su enzimi kiralne molekule tj. njihova zrcalna slika ne može se dodijeliti izvornoj molekuli.¹²

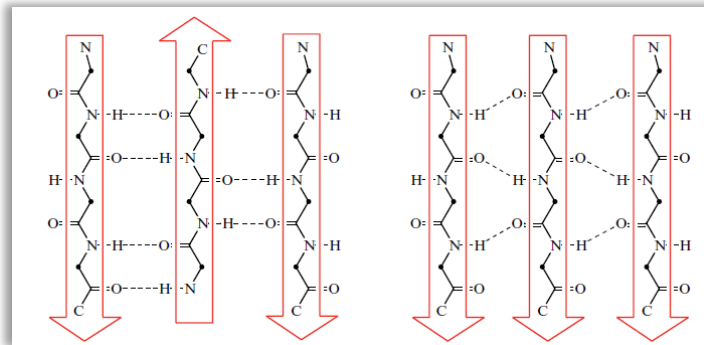
Svi enzimi su proteini, ali nisu svi proteini enzimi, a razlika je da enzimi imaju katalitičku aktivnost.¹²

Primarnu strukturu polipeptidnog lanca čini linearni slijed od 100 do 1000 aminokiselina povezanih preko amidne veze. Sekundarna struktura predstavlja raspored peptidnih lanaca, ne uzimajući u obzir pobočne aminokiselinske ostatke.

Lanac je na određeni način nabran i nabiranje nastaje kao posljedica sila koje povezuje različite odsječke peptidnog lanca.

Strukturu stabiliziraju vodikove veze između karbonilne skupine i protona –NH skupine druge peptidne veze. Razlikujemo strukturu α -uzvojnice (eng. α -Helix) kod koje su peptidni lanci namotani kao oko valjka i β -nabrane ploče kod koje se vodikove veze stvaraju između susjednih peptidnih lanaca.^{12,13}

α -uzvojnica sastoji se samo od jednog polipeptidnog lanca, dok se β -nabrana ploča sastoji od dva ili više polipeptidna lanca koji su povezani u izduženoj konformaciji. Kod β -nabrane ploče razlikujemo dvije vrste ovisno o tome da li su lanci poredani paralelno ili anti-paralelno (slika 9.).¹²

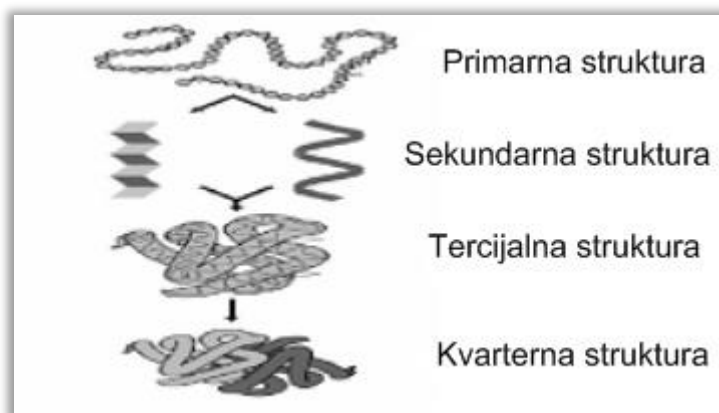


Slika 9. Prikaz strukture β -nabrane ploče (lijevo- anti-paralelne i desno- paralelne)

Tercijarna struktura prikazuje položaj svih atoma u prostoru, pa i atoma bočnih aminokiselinskih ostataka.¹³ Trodimenzijska struktura podjednog proteina, poznata kao tercijarna struktura, proizlazi iz zajedničkog rasporeda elemenata sekundarne strukture.¹²

Kvaternarna struktura opisuje međusobni položaj podjedinica.

Svaka pojedina struktura prikazana je na slici 10.



Slika 10. Moguće strukture proteina¹²

Razni enzimski proteini mogu se povezati u multienzimске komplekse. Takve visoko uređene strukture obično su mjesta važnih regulacijskih procesa.

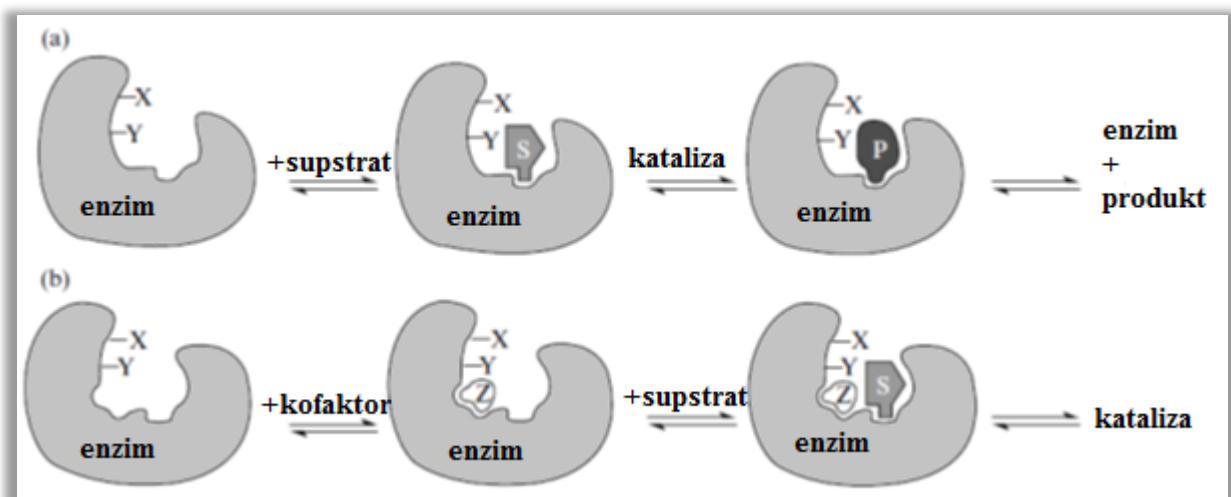
Mnogostruko nabrani polipeptidni lanac stvara razgranati molekulski skelet za stabilizaciju aktivnog središta.¹³

2.4.2. Aktivno mjesto

Dio tercijarne strukture enzima koja je odgovorna za katalitičku aktivnost zove se „aktivno mjesto“ enzima i često čini samo 10-20% ukupnog volumena enzima.¹²

Struktura aktivnog mjesta nije kruta, već zbog svoje fleksibilnosti dopušta reverzibilne konformacijske promjene, koje su vrlo važne za vezivanje supstrata, a time i za sam mehanizam katalitičke reakcije na enzimima. Aktivno mjesto je obično hidrofilna šupljina koja sadrži niz aminokiselinskih bočnih lanaca koji vežu supstrat i provode enzimsku aktivnost reakcija (slika 11.a).

U nekim slučajevima aktivno mjesto enzima veže jedan ili više kofaktora koji pomažu u katalizi pojedinih vrsta enzimске reakcije (slika 11.b).^{12,13}



Slika 11. a) enzim plus supstrat; b) enzim plus supstrat plus kofaktor^{12,13}

Molekula proteina, a tako i supstrat, može poprimiti izmijenjenu prostornu strukturu prilikom vezanja u enzim-supstrat kompleks. Supstrat može biti povezan ionskim, hidrofobnim ili vodikovim vezama.

Aktivno mjesto nekog enzima nakon vezanja supstrata poprima komplementarnu strukturu prema strukturi prijelaznog stanja molekule supstrata. Time dolazi do smanjenja energije aktivacije reakcije što uvjetuje ubrzanje reakcije vezanih supstrata. Brzina reakcije ograničena je samo brzinom difuzije molekula u reakcijskoj sredini.¹³

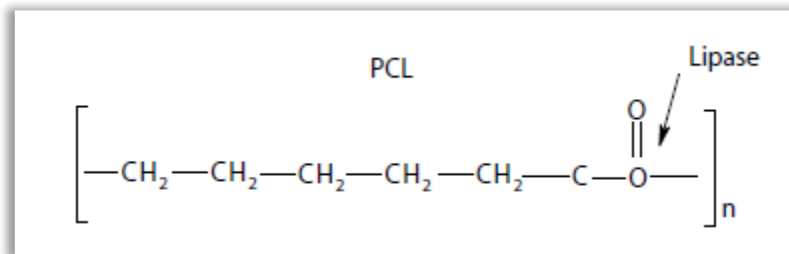
2.4.3. Lipaza

Lipaze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu masti i ulja oslobađanjem slobodnih masnih kiselina, diglicerida, monoglicerida i glicerola. U organskoj medicini također kataliziraju sintetske reakcije, uključujući esterifikaciju i acidolizu. Lipaze mogu djelovati pod blagim uvjetima, vrlo su stabilne u organskim otapalima, pokazuju široku supstratnu specifičnost i stereoselektivnost u katalizi. Upravo zbog toga čine jednu od najčešće korištenih skupina biokatalizatora za biotehnološki proces. Lipaze su izvanredni biokatalizatori koji se koriste u različitim bioprocima. U nekim područjima, industrijska primjena lipaze još uvijek je ograničena zbog visokih troškova. Lipaze se koriste u različitim industrijama (farmaceutska, kožna, tekstilna i papirna), u formulacijama deterdženata, proizvodnji biodizela i biopolimera itd. Nalaze se također u mnogim vrstama životinja, biljaka, bakterija i gljiva. Mikrobiološke lipaze su najprivlačnije zbog jednostavne masovne proizvodnje. Također se koriste u sintezi korisnih i biorazgradivih biopolimera poput poliestera. Polimerizacijske reakcije katalizirane lipazom razvrstane su u dva glavna oblika polimerizacije: polimerizacija otvaranja prstena i polikondenzacija.¹⁴

2.4.4. Enzimska razgradnja PCL-a

Lipaza je enzim koji može katalizirati hidrolizu esterskih veza u poliesterima. Pronađeno je da su određene lipaze poboljšale razgradnju polikaprolaktona u usporedbi s inkubacijom samo u puferu. Enzimska razgradnja PCL-a se odvija u dva stupnja na površini polimera jer je teško hidrofilnom enzimu difundirati u hidrofobni polimer poput PCL-a.¹⁵

Razgradnja započinje kada atom kisika serina napada atom ugljika karbonilne veze i nastaje tetraedarski međuprodukt, kompleks acil-lipaze i oslobađa se molekula alkohola. U konačnici dolazi do hidrolize kompleksa i oslobađa se slobodna masna kiselina.¹⁴



Slika 12. Shematski prikaz PCL razgradnje lipazom¹⁴

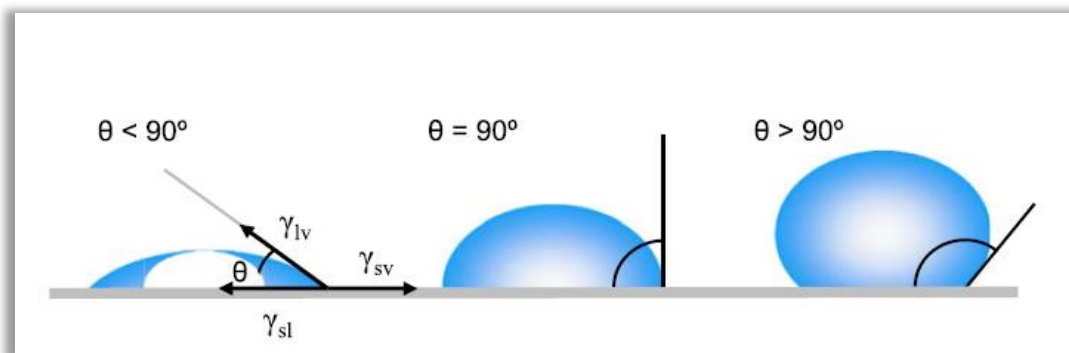
Mehanizam enzimske razgradnje ovisi o raznim čimbenicima kao što su: kemijski sastav, stupanj homogenosti i tehnika obrade.

2.5. METODE KARAKTERIZACIJE POVRŠINE

2.5.1. Mjerenje kontaktnog kuta

Mjerenje kontaktnog kuta je jedan od primarnih podataka koji ukazuju na stupanj vlaženja kada međusobno djeluju kruti i tekući uzorak. Niska vrijednost kontaktnog kuta odgovara visokom vlaženju ($<90^\circ$) dok visoka vrijednost kontaktnog kuta odgovara niskom vlaženju. Izračuni na temelju mjerenih vrijednosti kontaktnih kutova daju važan parametar-napetost čvrste površine koja kvantificira karakteristike vlaženja krutog materijala.

Kontaktni kut je definiran kao kut koji je dobiven sjecištem površine tekućine i čvrste površine. Mali kontaktni kut opaža se kada se tekućina širi na površini, a veliki kontaktni kut opaža se kada tekućina ostaje na površini u obliku kuglice što je prikazano na slici 13.



Slika 13. Kontaktni kut tekućine na čvrstoj površini

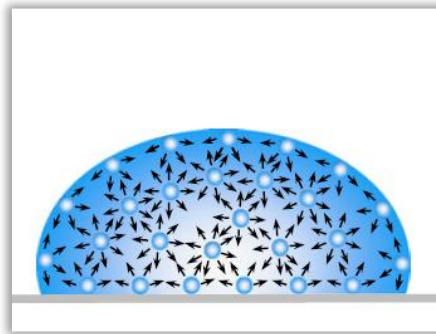
Potpuno vlaženje nastaje kada je kontaktni kut 0° odnosno dok se kapljica razlijeva po ravnoj površini. Ako je kontaktni kut s vodom manji od 90° površina je hidrofilna, a ako je veći od 90° površina je hidrofobna. Za jako hidrofobnu površinu kontaktni kut s vodom je obično veći od 150° tj. gotovo nikakav kontaktni kut nije moguće vidjeti između kapljice tekućine i čvrste površine i to je tzv. lotosov efekt (slika 14.)

Listovi indijskog lotosovog cvijeta su uvijek čisti jer posjeduju ugrađeni mehanizam samočišćenja koji je nazvan lotosovim efektom s obzirom da je po prvi puta otkriven u lotosovom cvijetu. Efekt lotosa nije biološki nego fizikalno-kemijski fenomen koji se može opisati fizikalno-kemijskim parametrima od kojih je najvažniji kontaktni kut s vodom.



Slika 14. Lotosov efekt

Površinska napetost uzrokovana je neuravnoteženim silama molekula tekućine na površini (slika 15.)



Slika 15. Prikaz površinske napetosti

Nadalje, vanjske sile poput gravitacije deformiraju kapljicu. Stoga se kontaktni kut određuje kombinacijom površinske napetosti i vanjskih sila.

Kontaktni kut prvi je definirao Thomas Young postavljanjem sljedeće jednadžbe:

$$\gamma_{lv} \cos \theta_Y = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$

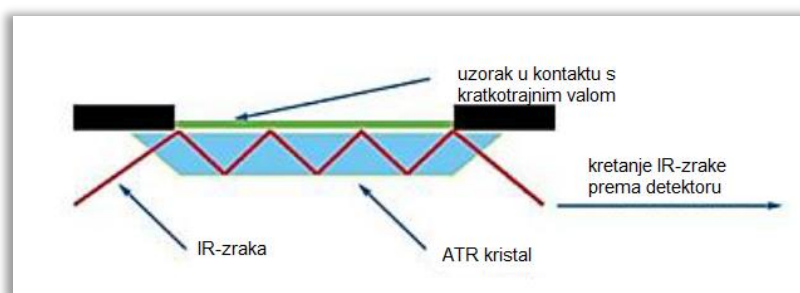
gdje je γ_{sv} – slobodna međupovršinska energija krutina–plin, γ_{sl} - slobodna međupovršinska energija krutina–tekućina, γ_{lv} - slobodna međupovršinska energija tekućina–plin. Iz Youngove jednadžbe proizlazi Youngov kontaktni kut θ_Y .¹⁶

2.5.2. FTIR-ATR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija je izuzetno pouzdana i dobro poznata metoda otiska prsta. Mnoge se tvari mogu identificirati i kvantificirati ovom metodom. Jedna od prednosti IR spektroskopije, kao analitičke tehnike je sposobnost za dobivanje spektra vrlo širokog raspona krutina, tekućina i plinova. U mnogim slučajevima je potreban neki oblik pripreme uzorka kako bi se dobio spektar visoke kvalitete. Princip rada IR spektrometra temelji se na prijenosu infracrvenog zračenja izravno na uzorak.¹⁷

Prigušena totalna refleksija (eng. Attenuated Total Reflectance)

ATR je tehnika koja je omogućila mjerenje visokokvalitetnih spektara tvari koje jako apsorbiraju u srednje infracrvenom području, što je dovelo do prave revolucije u području infracrvene spektrometrije vodenih otopina i tekućih smjesa koje sadrže vodu.¹⁸ ATR djeluje mjerenjem promjena koje se javljaju u potpuno reflektiranim infracrvenim zrakama, kada zraka dolazi u kontakt s uzorkom (slika 16.).¹⁷ Uređaj za prigušenu totalnu refleksiju sastoji se od precizno izbrušenog kristala velikog indeksa loma.¹⁸



Slika 16. Refleksija ATR sustava

Infracrvena zraka usmjerena je na gusti kristal pod određenim kutom. Ova unutarnja refleksija stvara kratkotrajni val koji se proteže izvan površine kristala. U područjima infracrvenog spektra gdje uzorak apsorbira energiju, kratkotrajni val će se mijenjati. Energija iz svakog kratkotrajnog vala se vraća prema IR zraci koja tada izlazi iz suprotnog kraja kristala i vraća se do detektora u IR spektrometru. Sustav zatim generira infracrveni spektar. Obzirom da zraka prodire samo nekoliko mikrona u uzorak potrebno je osigurati dobar kontakt uzorka s ATR kristalom. Prednost ATR tehnike je što nema pripreme uzorka pa je stoga kraće vrijeme potrebno za mjerenje.¹⁷

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Polistiren (PS)

Za pripremu pločica za enzimsku razgradnju korišten je polimer PS, komercijalnog naziva DIOKI POLISTIREN 678 E, proizvođača DIOKI d.d. Svojstva polistirena navedena su u tablici 1.

Tablica 1. Svojstva polistirena

Svojstvo	ISO norma	Vrijednost	Jedinica
Gustoća	1183	1,05	g/cm ³
Temperatura omekšavanja po VICAT-u	306 B/50	85	°C
Granica razvlačenja	527/2	43	MPa
Rastezna čvrstoća	527/2	43	MPa
Prekidno rastezanje	527/2	1	%
Modul rastezljivosti	527/2	3300	MPa
Savojna žilavost sa zarezom, po Izodu	180/4A	< 1	kJ/m ²
Rockwellova tvrdoća	2039	105	Skala R
Maseni protok taljevine (uvjet H)	1133	11,0	g/10 min

Polikaprolakton (PCL)

U ovome radu je korišten polimer poli(ε-kaprolakton), Polycaprolactone, Capa 68000, Perstorp, UK. PCL je linearni poliester visoke molekulske mase, kompatibilan s velikim brojem termoplasta. Biorazgradivi je polimer i nalazi široku primjenu. Fizikalna i mehanička svojstava Polycaprolactone, Capa 6800 dana su u tablici 2.

Tablica 2. Fizikalna i mehanička svojstva Polycaprolactone, Capa 68000

Fizikalna svojstva			
gustoća, g cm ⁻³	MFR, g/10 min (160 °C, 5 kg)	talište, °C	staklište, °C
1,145	35	58-60	55-60
Mehanička svojstva			
rastezna čvrstoća, MPa		prekidno istežanje, %	
20		800	

Enzim

U radu je korišten enzim lipaza *Thermomyces lanuginosus*, proizvođača Sigma Aldrich. Otopina sadrži $\geq 100,000$ U/g. Lipaza *Thermomyces lanuginosus* je tekućina svijetlo žute boje i vrijednosti pH od 5,6 pri temperaturi od 25,7 °C. Enzim se čuva na suhom i hladnom mjestu.

3.2. PRIPRAVA PS i PCL PLOČICA

Pločice PCL i PS polimera pripravljene su prešanjem na hidrauličkoj preši Fontune (slika 17.). Od svakog polimera pripremljene su po 3 pločice.



Slika 17. Hidraulička preša Fontune

Granulat PS i PCL polimera (masa=11,5 g) stavljen je između dvije metalne ploče obložene teflonskom folijom i zatim stavljen između zagrijanih ploča preše. Pločice za ispitivanja prešane su u kalupu dimenzija 100 x 100 mm, pri temperaturi od 190 °C u trajanju od 8 minuta, 3 minute predgrijavanja i 5 minuta prešanje.

Nakon toga, preša je hlađena vodom koja prolazi kroz ploče sustavom cijevi, a provedeno je hlađenje pod tlakom do 59 °C za polistiren odnosno do 56 °C za polikaprolakton , a potom su uzorci izvađeni iz kalupa.

Dobivene pločice izrezane su na trake dimenzija 10 x 100 mm (slika 18.).



Slika 18. Rezanje pločica

3.3. POSTUPAK ENZIMSKE RAZGRADNJE

Prije postavljanja pločica u otopinu enzima provedena je dezinfekcija pločica, bočica i čepova otopinom PLIVA®sept - Izosan®-G. U tikvicu od 1000 mL dodano je 1,7 g Izosana i 1000 mL destilirane vode. Pločice, bočice i čepovi uronjeni su u tako pripremljenu otopinu na 10 minuta, zatim izvađeni i isprani destiliranom vodom. Zatim su bočice i čepovi osušeni u sušioniku, a pločice su osušene na zraku.

Priprema otopine enzima

U tikvicu od 1000 mL dodano je 20 mL enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus* slika 19. i do oznake nadopunjeno je destiliranom vodom.



Slika 19. Enzim *Lipaza Thermomyces lanuginosus*, otopina $\geq 100,000$ U/g, proizvođač Sigma Aldrich

Po tri pločice od svakog polimera ostavljene su kao nulti uzorci odnosno uzorci koji nisu stavljeni u otopinu enzima. Pločice PS i PCL polimera dimenzija 10 x 80 mm debljine 1 mm izvagane su na analitičkoj vagi i stavljene u bočice s čepom volumena 50 mL. U svaku bočicu su postavljene po 3 pločice, s razmakom od 1 mm između pojedine pločice i uliveno 50 mL otopine enzima. Tako pripravljene bočice s uzorcima i otopinom stavljene su u inkubator na temperaturu od 37 °C u vremenskom razdoblju od 4 tjedna. Na slici 20. prikazane su bočice PS i PCL stavljenje u inkubator, kao i sam inkubator.



Slika 20. Inkubator i bočice s pločicama PS i PCL polimera stavljenje u inkubator, na 37°C u vremenu od 4 tjedna

Nakon 24, 96, 168, 336, 504 i 672 sata uzorci su izvađeni iz otopine, isprani destiliranom vodom, posušeni na filter papiru i izvagani na analitičkoj vagi. Pločice su sušene do stalne mase pri sobnoj temperaturi kako bi se utvrdila promjena mase uvjetovana razgradnjom. Na pločicama nakon određenih vremena hidrolitičke razgradnje u otopini enzima provedena je karakterizacija.

3.4. TEHNIKE KARAKTERIZACIJE

Na pločicama PS i PCL polimera provedena su ispitivanja strukturnih i površinskih svojstava mjerenjem kontaktnog kuta s vodom i primjenom FTIR-ATR spektroskopije.

3.4.1. Mjerenje kontaktnog kuta s vodom

Mjerenje kontaktnog kuta s vodom provedeno je na pločicama PS i PCL polimera prije i nakon određenih vremena hidrolitičke razgradnje, na goniometru DataPhysics OCA 20 Instruments, GmbH, slika 21. Mjerenje kontaktnog kuta provedeno je na pločicama PS i PCL polimera s ispitnom testnom kapljevnom vodom, volumena 2 μL pri temperaturi od 23°C i relativnoj vlažnosti 60%. Kontaktni kut je mjeren na 5-10 različitih mjesta istog uzorka te su izračunate srednje vrijednosti kontaktnog kuta. Vrijednost kontaktnog kuta koji kapljevina zatvara s krutinom mjerena je prije i nakon uspostavljanja ravnotežnog stanja (~10 sekundi).



Slika 21. Goniometar DataPhysics OCA 20 Instruments, GmbH

3.4.2. FTIR-ATR spektroskopija

ATR-FTIR spektri PS i PCL polimera snimljeni su prije i nakon hidrolitičke razgradnje u otopini enzima tijekom različitih vremena u područje od $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ pomoću Perkin Elmer Spectrum One Spectrometer spektrometra koristeći Single Reflection ATR System, slika 22. Spektri su snimljeni pri rezoluciji od 4 cm^{-1} akumulirajući rezultat 10 skenova.



Slika 22. FTIR spektrometar, Perkin Elmer Spectrum One Spectrometers

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Utjecaj enzima lipaze na promjenu mase

U ovom radu istražen je utjecaj enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus* na hidrolitičku razgradnju PCL i PS polimera. Praćena je promjena mase polimera i količina apsorbirane vode tijekom vremena od 4 tjedna. Nakon 24, 96, 168, 336, 504 i 672 sati uzorci su izvađeni iz otopine enzima, isprani, sušeni na sobnoj temperaturi do konstantne mase i izvagani. Promjena mase određena je na osnovi razlike mase prije i nakon određenog vremena razgradnje. Gubitak mase funkcija je brzine razgradnje. Promjena mase odnosno postotni gubitak mase izračunat je prema izrazu 1:

$$GM = \left(\frac{m_0 - m_t}{m_0} \right) * 100 \quad (1)$$

gdje je: GM - gubitak mase, %

m_0 – početna masa, g

m_t – masa nakon vremena t , g

Količina vode koja prodire u uzorak ili apsorbirana količina vode izražena je u %, i izračunata je iz mase mokrog uzorka i mase uzorka nakon enzimske razgradnje kada je postignuta stalna masa prema izrazu 2.

$$\Delta m_v = \left(\frac{m_v - m_t}{m_t} \right) * 100 \quad (2)$$

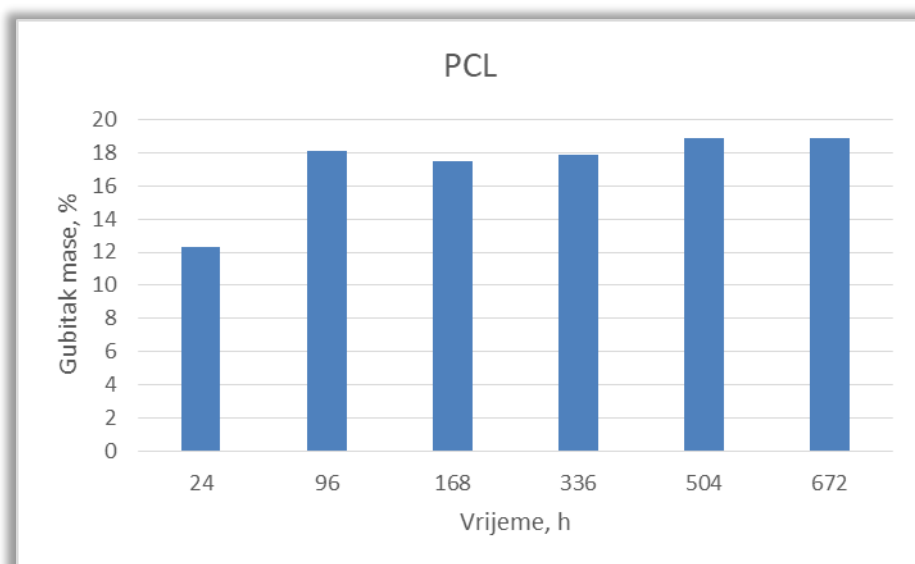
gdje je: m_v - masa vlažnog uzorka, g

m_t – masa nakon vremena t , g

U tablici 3. i na slici 23. prikazana je ovisnost gubitka mase PCL polimera o vremenu hidrolitičke razgradnje u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*.

Tablica 3. Promjena mase PCL polimera tijekom 4 tjedna u otopini lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Uzorak	Vrijeme razgradnje, h	Gubitak mase, %
PCL	24	12,3
	96	18,1
	168	17,5
	336	17,9
	504	18,9
	672	18,9

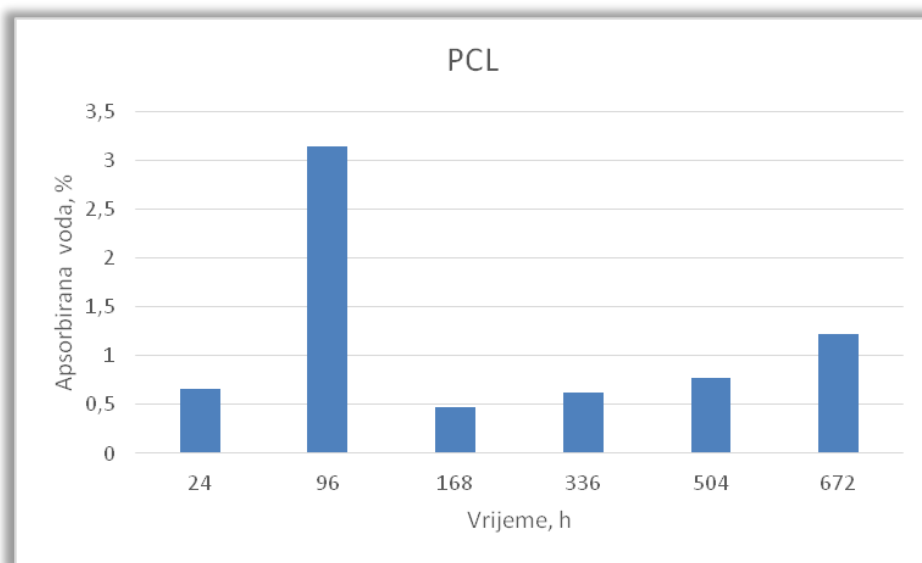


Slika 23. Gubitak mase PCL polimera u ovisnosti o vremenu hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Iz slike 23. vidljivo je da već nakon 24 sata dolazi do značajnog gubitka mase PCL-a (12%). Značajan gubitak mase PCL polimera tijekom hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze ukazuje na katalitičku aktivnost enzima. Nakon 96 sati gubitak mase PCL polimera iznosi oko 18% i gotovo se ne mijenja tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u otopini enzima što ukazuje na mogućnost vezivanja enzima na površinu uzoraka i uslijed toga smanjene katalitičke aktivnosti enzima. Utjecaj enzima lipaze na razgradnju PCL polimera koji je poliester očekivan

je, jer je to enzim koji katalizirati hidrolizu esterskih veza u poliesterima. Mehanizam djelovanja enzima lipaze na PCL polimer odvija se mehanizmom erozije površine.

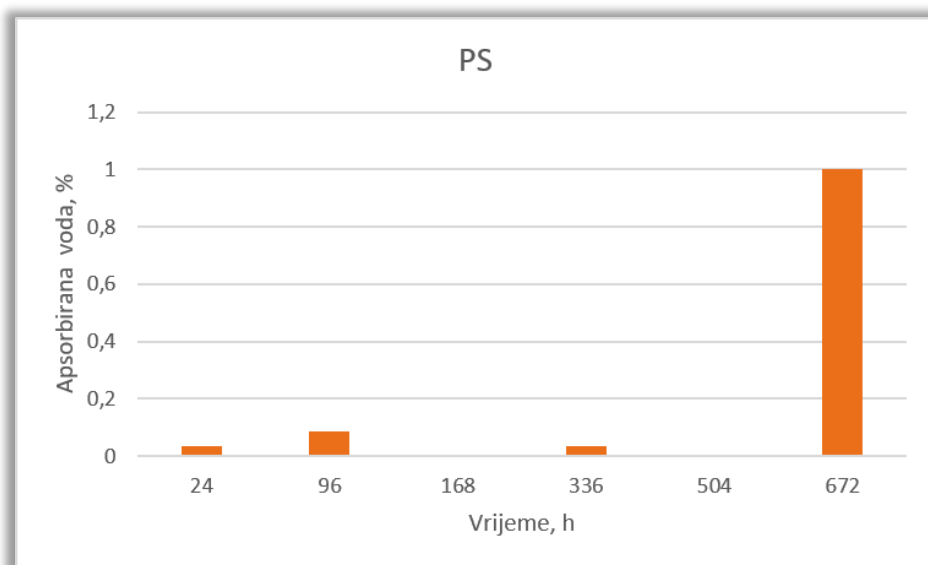
Na slici 24. prikazana je ovisnost apsorpcije vode o vremenu enzimske razgradnje PCL-a. Iz dobivenih rezultata vidljiv je porast količine apsorbirane vode s vremenom enzimske razgradnje od 0,5 do 3% vode što je rezultat promjene karaktera površine tijekom razgradnje od hidrofobne prema hidrofilnoj površini. Najveću količinu vode apsorbira uzorak tijekom 96 sati enzimske razgradnje.



Slika 24. Ovisnost apsorbirane vode PCL polimera o vremenu enzimske razgradnje u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Tablica 4. Promjena mase PS polimera tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Uzorak	Vrijeme razgradnje, h	Gubitak mase, %
PS	24	0
	96	0,04
	168	0
	336	0
	504	0
	672	0,01



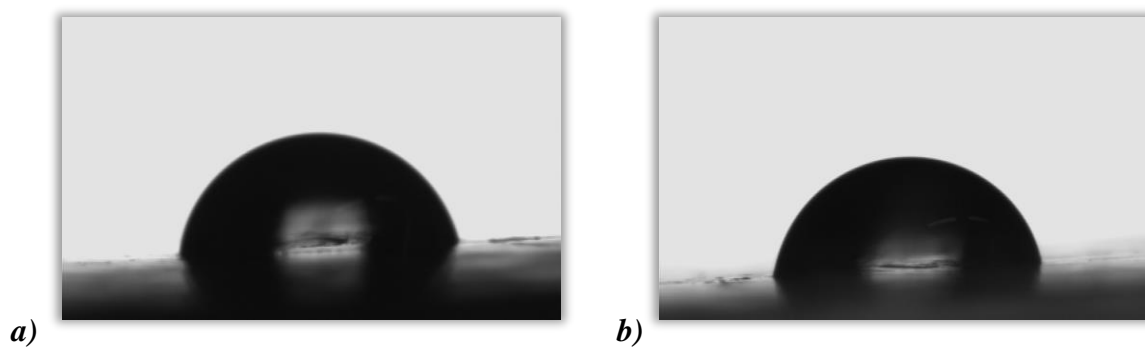
Slika 25. Ovisnost apsorbirane vode PS polimera o vremenu hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus*

Iz rezultata promjene mase PS polimera i količine apsorbirane vode, koji su prikazani u tablici 4. vidljivo je da kod PS-a tijekom 4 tjedna razgradnje u enzimu lipazi ne dolazi do promjene mase te da PS ne upija vodu tijekom razgradnje. Iz slike 25. vidljivo je da nakon 4 tjedna PS apsorbira 1% vode. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da enzim lipaza ne razgrađuje PS, a razlog tome je struktura PS-a koji u sebi sadrži benzensku jezgru.

4.2. Rezultati mjerenja kontaktnog kuta s vodom

Mjerenja kontaktnog kuta provedena su na goniometru, a dobiveni podaci prikazani su kao aritmetička sredina 5-10 mjerenja. Glavni čimbenici koji utječu na vlaženje polimera povezani su s njihovim stupnjem kristalnosti i kemijskom strukturom. U tablici 5. dane su vrijednosti kontaktnog kuta s vodom PS i PCL polimera prije enzimske razgradnje.

Na temelju dobivenih eksperimentalnih vrijednosti kontaktnog kuta PCL i PS polimera s vodom vidljivo je da veću vrijednosti kontaktnog kuta prije enzimske razgradnje ima poli(ϵ -kaprolakton). Visoka vrijednosti kontaktnog kuta vode na površini PCL polimera prije enzimske razgradnje ukazuje na veću hidrofobnost površine PCL polimera u odnosu na PS. Kontaktni kut PS polimera s vodom je nešto niži u odnosu na PCL i iznosi 74,6 °.

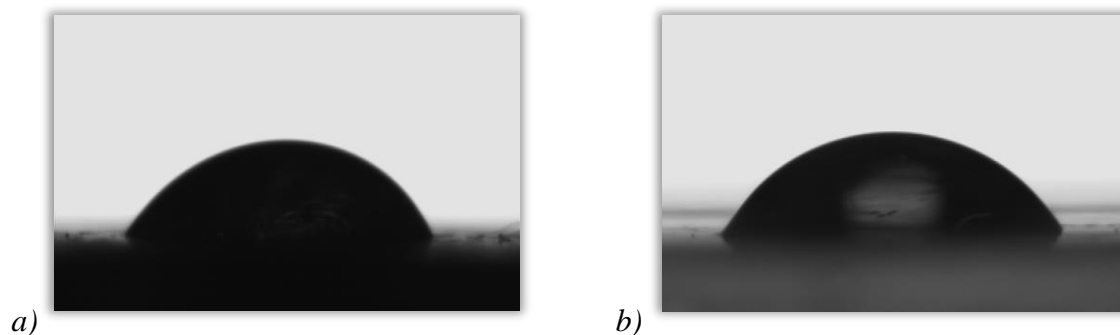


Slika 26. Kapljice vode na površini a)PCL i b) PS polimera prije enzimske razgradnje

Tablica 5. Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom PCL i PS polimera prije enzimske razgradnje

Uzorak	Kontaktni kut, $\theta / ^\circ$
PCL	89,0
PS	74,6

Rezultati mjerenja kontaktnih kutova s vodom nakon različitih vremena enzimske razgradnje za PCL i PS prikazani su u tablici 6. i 7. i na slici 27.



Slika 27. Kapljice vode na površini a) PCL i b) PS polimera nakon 672 sata enzimske razgradnje

Tablica 6. Vrijednosti kontaktnog kuta s vodom za PCL nakon različitih vremena enzimске razgradnje u otopini enzima lipaze

Uzorak	Vrijeme razgradnje, h	Kontaktни kut s vodom, °
PCL	96	88,3
	168	90,1
	336	87,7
	504	68,9
	672	76,3

Kontaktни kut PCL-a s vodom nakon različitih vremena enzimске razgradnje diskontinuirano se smanjuje odnosno površina PCL polimera postaje hidrofilnija. Dolazi do jačih sila međudjelovanja kapljevine i krutine i do boljeg vlaženja površine PCL-a s vodom. Razlog smanjenja kontaktnog kuta je promjena karaktera površine i nastajanja porozne površine PCL-a koja je posljedica razgradnje i erozije površine djelovanjem enzima lipaze.

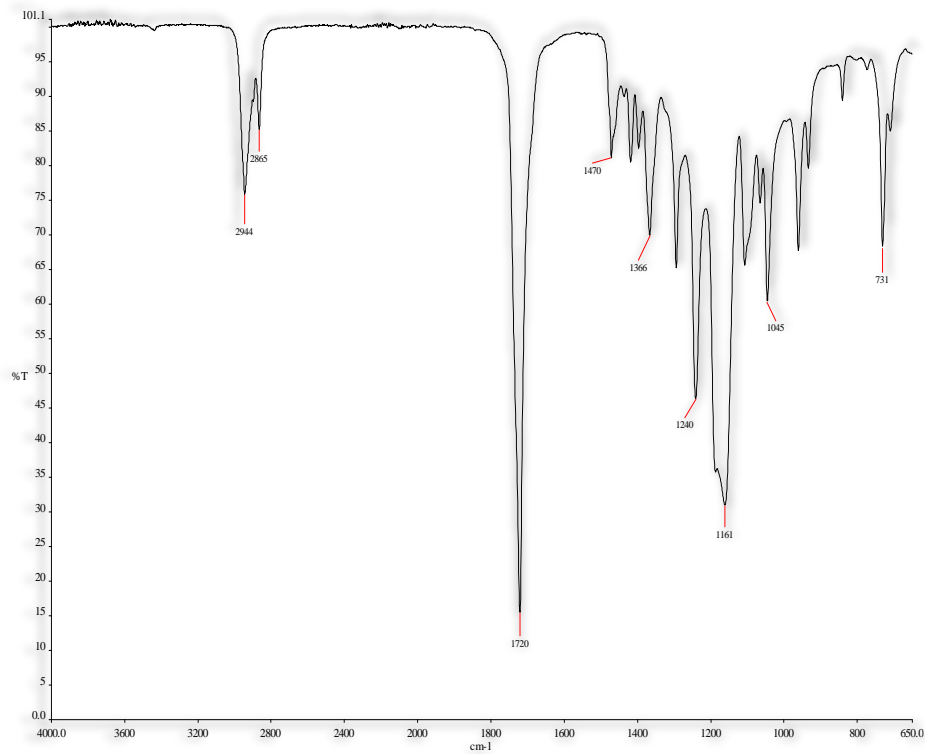
Tablica 7. Vrijednosti kontaktnih kutova s vodom za PS nakon različitih vremena enzimске razgradnje u otopini enzima lipaze

Uzorak	Vrijeme razgradnje, h	Kontaktни kut s vodom, °
PS	24	66,8
	96	53,9
	168	63,2
	336	49,4
	504	64,1
	672	59,1

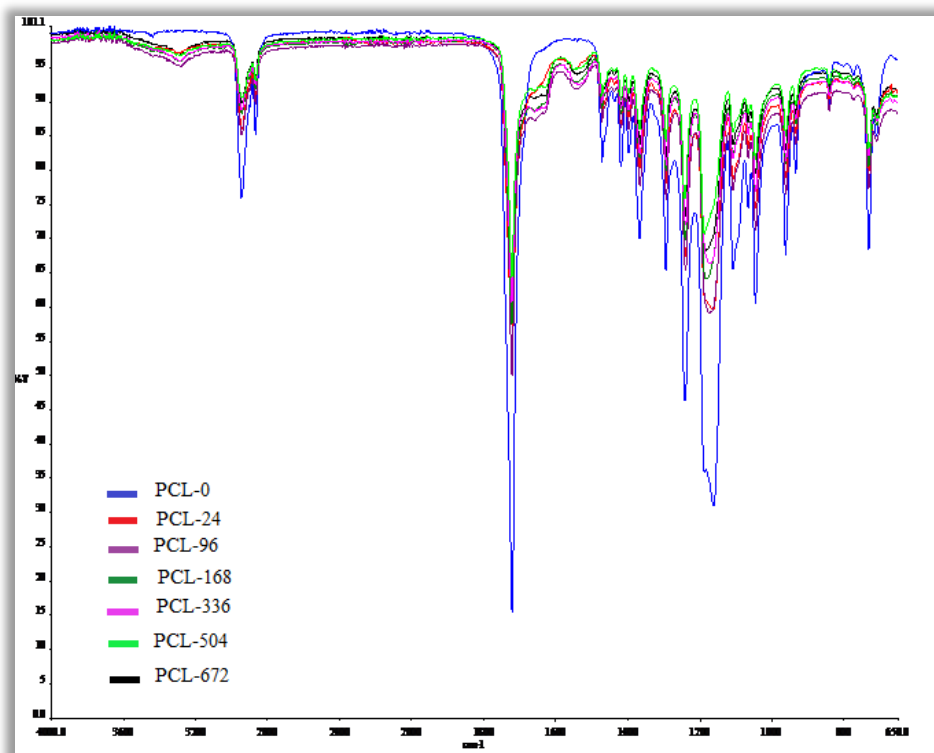
Na temelju dobivenih rezultata određivanja kontaktnog kuta PS-a s vodom vidljivo je da hidrolitička razgradnja u otopini enzima lipaze rezultira sniženjem kontaktnog kuta s vodom i porastom hidrofilnosti površine što se može objasniti promjenom karaktera površine uslijed djelovanja vode i oksidacije površine polistirena. Kao i kod PCL-a ta promjena nije kontinuirana s porastom vremena razgradnje.

4.3. Rezultati FTIR-ATR analize

Strukturne promjene PCL i PS polimera tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze *Thermomyces lanuginosus* praćene su primjenom FTIR-ATR spektroskopije. FTIR-ATR spektri PCL i PS polimera prije i nakon enzimske razgradnje prikazani su na slikama 28-31.



Slika 28. FTIR-ATR spektar PCL polimera prije enzimske razgradnje s obilježenim pikovima

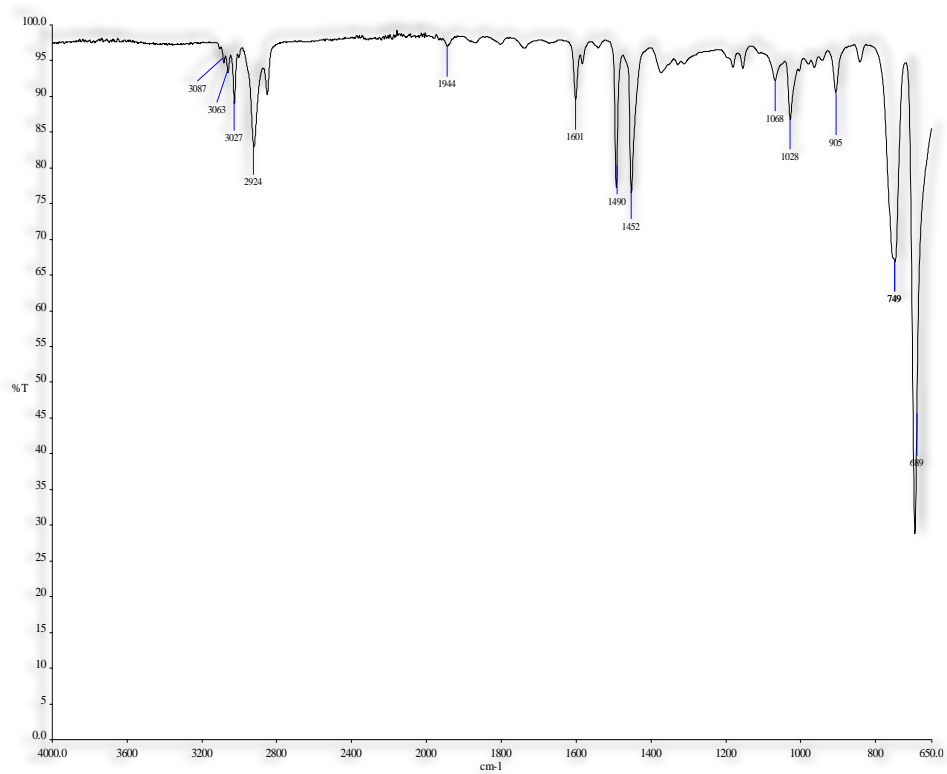


Slika 29. FTIR-ATR spektri PCL polimera prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje

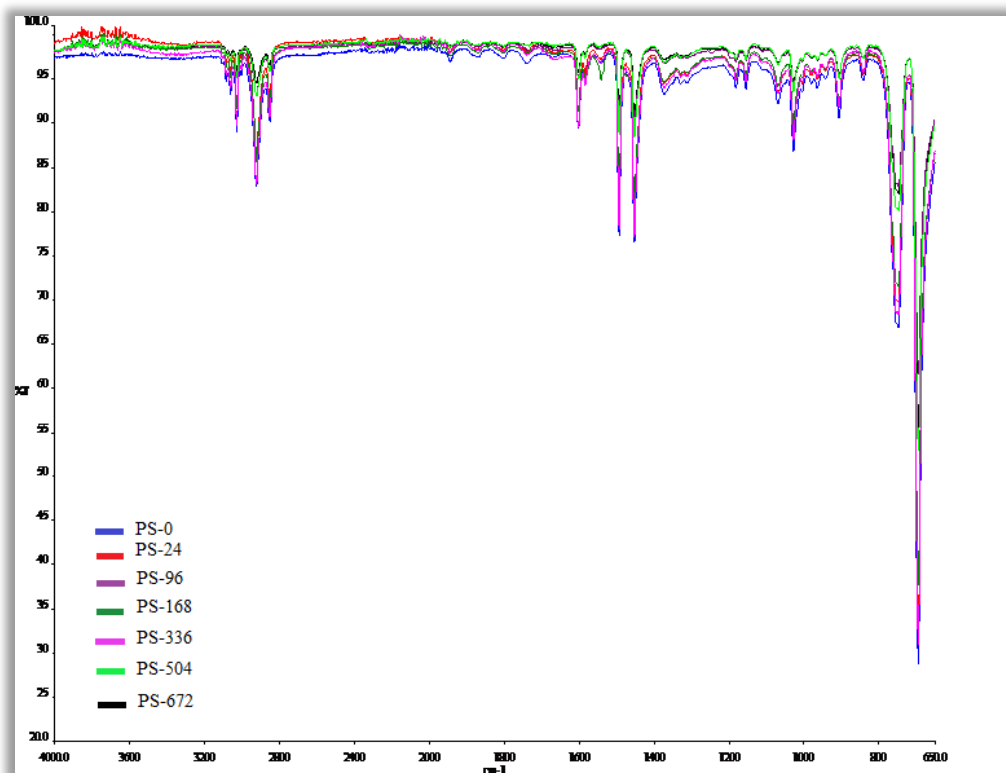
Na spektru PCL polimera prije enzimske razgradnje vidljive su apsorpcijske vrpce na 2944 cm^{-1} i 2865 cm^{-1} koje odgovaraju C-H istezanju. Područje od $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ naziva se područjem „otiska prsta“. Na spektru su vidljive jake apsorpcijske vrpce između 1720 i 1161 cm^{-1} . Vrpca najveće intenzivnosti je na 1720 cm^{-1} i predstavlja simetrično C=O istezanje karbonilne skupine. Vrpca na 1161 cm^{-1} predstavlja istezanje C-O skupina esterske veze. Apсорpcijske vrpce u području 1473 , 1397 i 1361 cm^{-1} mogu se pripisati CH_2 savijanju. U području 1233 i 1042 cm^{-1} apсорpcijske vrpce odgovaraju C-O-C istezanju.^{19,20}

Vidljivo je da nakon enzimske razgradnje dolazi do sniženja intenzivnosti apсорpcijskih vrpca s porastom vremena razgradnje. Promjena intenzivnosti vrpca može se pripisati vibracijama istezanja koje su posljedica hidrolize polimernih lanaca tijekom izlaganja PCL u otopini enzima. Intenzivnost vrpce kod 1720 cm^{-1} se smanjuje dok se intenzivnost vrpca kod 1653 cm^{-1} i 1542 cm^{-1} povećava s vremenom hidrolitičke razgradnje.²¹

Daljnje promjene u strukturi PCL-a zbog hidrolize i apсорpcije vode uočavaju se kod vrpca u području $1451\text{--}1454\text{ cm}^{-1}$, $1381\text{--}1383\text{ cm}^{-1}$, $1264\text{--}1267\text{ cm}^{-1}$, $1180\text{--}1181\text{ cm}^{-1}$, $1127\text{--}1129\text{ cm}^{-1}$, $1080\text{--}1083\text{ cm}^{-1}$, $955\text{--}956\text{ cm}^{-1}$, 921 cm^{-1} . Sličan trend povezan s tom skupinom može se uočiti kod $\sim 1264\text{ cm}^{-1}$.



Slika 30. FTIR-ATR spektar PS polimera prije enzimske razgradnje s obilježenim pikovima



Slika 31. FTIR-ATR spektri za PS prije i nakon različitih vremena enzimske razgradnje

Na slici 30. prikazan je spektar PS-a s obilježenim karakterističnim vrpčama. Aromatske C-H veze su iznad 3000 cm^{-1} , a alifatske ispod 3000 cm^{-1} . Na spektru PS polimera vrhovi apsorpcije na 3087 cm^{-1} , 3063 cm^{-1} i 3027 cm^{-1} odgovaraju aromatskim C-H istezanjima. Vidljive su apsorpcijske vrpce u području 2924 cm^{-1} i 2845 cm^{-1} koje odgovaraju alifatskim vibracijama C-H istezanja. Vibracije istezanja C-C veze daju set karakterističnih oštrih pikova između $1452\text{--}1601\text{ cm}^{-1}$. Apsorpcijske vrpce u području 1068 cm^{-1} i 1028 cm^{-1} pripisuju se vibracijama C-H savijanja i upućuju na monosupstituirani benzen. Pikovi koji se nalaze na valnoj duljini 749 i 689 cm^{-1} također govore da je riječ o monosupstituiranom benzenu.²⁰ Intenzivnost vrpce kod 1653 cm^{-1} koja odgovara vibracijama savijanja OH veza adsorbirane vode povećava se s vremenom hidrolitičke razgradnje.

Na temelju snimljenih spektara PS-a nakon enzimske razgradnje ne dolazi do vidljivih strukturnih promjena jer nema značajnih promjena u spektrima PS-a nakon određenih vremena razgradnje. Intenzivnost apsorpcijskih vrpca nakon različitih vremena razgradnje je nešto manja u odnosu na intenzivnost apsorpcijske vrpce polistirena prije izlaganja djelovanju enzima lipaze.

5. ZAKLJUČCI

- ✓ Promjena mase PCL polimera tijekom 4 tjedna hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze iznosi oko 19% što ukazuje na razgradnju mehanizmom površinske erozije.
- ✓ Tijekom enzimske razgradnje PS polimera ne dolazi do promjene mase uzoraka što ukazuje na neučinkovitost enzima lipaze na PS polimer.
- ✓ Porast apsorpcije vode s vremenom hidrolitičke razgradnje u otopini enzima lipaze PCL polimera posljedica je promjena karaktera površine uvjetovanih enzimskom razgradnjom. Tijekom hidrolitičke razgradnje PS polimera u otopini enzima ne dolazi do značajne apsorpcije vode.
- ✓ Mjerenja kontaktnog kuta s vodom na površini PCL i PS polimera nakon enzimske razgradnje pokazuju smanjenje vrijednosti kontaktnog kuta odnosno porast hidrofilnosti tijekom 4 tjedna enzimske razgradnje.
- ✓ FTIR-ATR spektroskopijom utvrđeno je da kod PCL polimera dolazi do promjene intenziteta apsorpcijskih vrpca nakon izlaganja PCL-a otopini enzima kao posljedica razgradnje PCL-a. Kod PS-a ne dolazi do značajnih promjena u strukturi nakon enzimske razgradnje s lipazom.

6. LITERATURA

1. Z. Janović, Polimerizacije i polimeri/udžbenik, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera – Kemija u industriji, Zagreb, 1997.
2. D. W. Van Krevelen and K. T. Nijenhuis, Properties of polymers (Fourth Edition), Elsevier Science, Oxford, 2009.
3. A. Ram, Structure and Characterization of Polymers (chapter 3), Fundamentals of polymer engineering, Marcel Dekker, New York 2003
4. J.C. Middleton, A. J. Tipton, Biomaterials 21 (2000) 2335-2346.
5. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=49180> (pristup: 03. srpnja 2018.)
6. A. Höglund, Controllable Degradation Product Migration From Biomedical Polyester-Ethers, Stockholm, 2007.
7. M .A. Woodruff, D. W. Hutmacher: Prog Polym Sci 35 (2010) 1217-1256.
8. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2016.
9. http://www.arhiteko.hr/menu.html?http://www.arhiteko.hr/_polistiren.html (pristup: 28. svibnja 2018.)
10. L. Tan, X. Yu, P. Wan, K. Yang, J. Mater. Sci. Technol., (2013) 29(6), 503-513.
11. M. Abedalwafa, F. Wang, L. Wang i Ch. Li, Rev. Adv. Mater. Sci. 34 (2013) 123-140.
12. T. Bugg, Introduction to enzym and coenzym chemistry: Second edition, Blackwell Publishing Ltd, UK, 2004.
13. P. Karlson, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1993.
14. C. D. Anobom, A. S. Pinheiro, R. A. De-Andrade, Bio. Med. Research International, (2014)1-11.
15. H. S. Azevedo i 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, CRC Press LLC, 2005.
16. Y. Yuan i T. Randall Lee, Contact Angle and Wetting Properties G. Bracco, B. Holst (eds.), *Surface Science Techniques*, Springer Series in Surface Sciences 51, DOI 10.1007/978-3-642-34243-1_1, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
17. http://www.uts.utoronto.ca/~traceslab/ATR_FTIR.pdf (pristup: 01. lipnja 2018.)

18. Nikola Bilškov, Mjerenje optičkih konstanti u srednjem infracrvenom području, *Kem. Ind.* 59 (1) (2010) 11–18.
19. E. M. Abdelrazek, A.M. Hezma, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (2016) 10–15.
20. I. Škorić, Molekulska spektroskopija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, predavanja, Zagreb, 2017.
21. H.L. Luo, J. Sheng, Y.Z. Wan, *J. Mat. Lett.* 62 (2008) 37.

