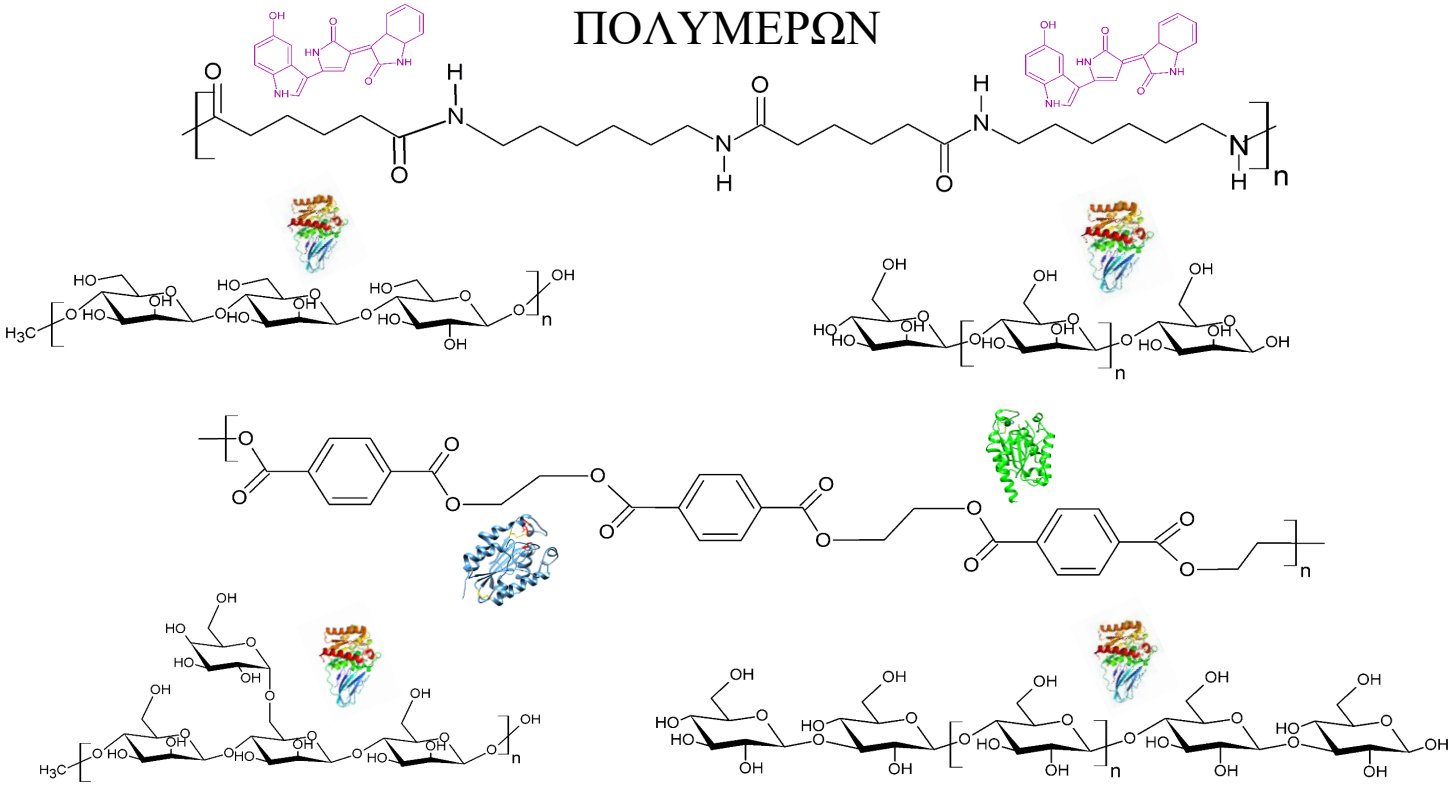
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY AND BIOCATALYSIS GROUP

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ



Μαρία Κανελλή

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας, Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα 2018

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έτυχε χορήγηση υποτροφίας από το Ίδρυμα Ωνάση.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ανωτάτη Σχολή Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, Άρθρο 202).

Στην οικογένειά μου, το στήριγμά μου.

“Satisfaction of one's curiosity is one of the greatest sources of happiness in life”

Linus Pauling

so

be curious, be bold, be kind, be great

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Τόπακας, Επιβλέπων, Επίκουρος Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Δημήτριος Κέκος, Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Φραγκίσκος Κολίσης, Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ευάγγελος Τόπακας, Επιβλέπων, Επίκουρος Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Δημήτριος Κέκος, Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Φραγκίσκος Κολίσης, Καθηγητής Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Παύλος Χριστακόπουλος, σ. Καθηγητής Σχολής Χημκών Μηχανικών, ΕΜΠ

Σταματίνα Βουγιούκα, Επίκουρη Καθηγήτρια Σχολής Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ

Δημήτριος Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Σχολή Θετικών Επιστημών, ΕΚΠΑ

Μαρία Δημαρόγκωνα, Επίκουρη Καθηγήτρια Τμήματος Χημικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

Εργασίες σχετιζόμενες με την παρούσα διδακτορική διατριβή

M. Kanelli, S. Vasilakos, E. Nikolaivits, S. Ladas, P. Christakopoulos, E. Topakas. **Surface modification of poly(ethylene terephthalate) (PET) fibers by a cutinase from *Fusarium oxysporum***. Process Biochemistry, 2015: 50(11), 1885–1892

M. Dimarogona, E. Nikolaivits, M. Kanelli, P. Christakopoulos, M. Sandgren, E. Topakas. **Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with poly(ethylene terephthalate) modification potential.** Biochimica et Biophysica Acta, 2015: 1850(11), 2308-17

M. Kanelli, S. Vasilakos, S. Ladas, E. Symianakis, P. Christakopoulos, E. Topakas. **Surface modification of polyamide 6.6 fibers by enzymatic hydrolysis.** Process Biochemistry, 2017: 59, 97-103

M. Kanelli, E. Topakas. **Acylation of soluble polysaccharides in a biphasic system catalyzed by a CE2 acetyl esterase.** Carbohydrate Polymers, 2017: 163, 208-215

M. Kanelli, E. Topakas. **Acylation of soluble polysaccharides in a biphasic system catalyzed by a CE2 acetyl esterase.** http://atlasofscience.org/acylation-of-soluble-polysaccharides-in-a-biphasic-system-catalyzed-by-a-ce2-acetyl-esterase/ December 19, 2017

M. Kanelli, M. Mandic, M. Kalakona, S. Vasilakos, D. Kekos, J. Nikodinovic-Runic, E. Topakas. **Microbial Production of Violacein and Process Optimization for Dyeing Polyamide Fabrics with Acquired Antimicrobial Properties**, Frontiers in Microbiology, in press

Εργασίες μη σχετιζόμενες με την παρούσα διδακτορική διατριβή

M. Kanelli, A. Douka, S. Vouyiouka, C. Papaspyrides, E. Topakas, L.-M. Papaspyridi, P. Christakopoulos. **Production of biodegradable polyesters via enzymatic polymerization and solid state finishing**. Journal of Applied Polymer Science, 2014

ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Διεθνή Συνέδρια

BIOPOL 2013, 4th International Conference on Biodegradable and Biobased Polymers, Rome, Italy 1-3/10/2013
"Production of Biodegradable Polyesters via Enzymatic Polymerization and Solid State Finishing", M. Kanelli, A. Douka, S. Vouyiouka, C.D. Papaspyrides, E. Topakas, L.-M. Papaspyridi, P. Christakopoulos

ECB16 2014, 16th European Congress on Biotechnology, Edinburgh, United Kingdom
13-16/1-/2014
"A cutinase from *Fusarium oxysporum* with potential for PET surface modification", Evangelos Topakas, Efstratios Nikolaivits, Maria Kanelli, Paul Christakopoulos

12th Carbohydrate Bioengineering Meeting, Vienna, Austria 23-26/4/2017
"Polysaccharide acylation mediated by a CE2 acetyl esterase in biphasic systems", M. Kanelli and E. Topakas

AUTEX 2017 International Textiles Conference 29-31/5/2017
"Dyeing textiles with bacterial pigment", M. Kanelli, S. Vasilakos, C. Raspanti, N. Papakonstaninou and E. Topakas

TCBL 2018 Textile and Clothing Business Labs 28-31/5/2018
Oral presentation: Bioshades-TCBL true stories, Cases of business model innovation in the TCBL Business Pilots
Oral presentation: TCBL Lam Session- Biotechnology Laboratory presentation

Εθνικά Συνέδρια

9th PESXM, Athens, Greece 23-25/5/2013

"Production of biodegradable aliphatic polyesters via enzymatic polymerization and solid post-polymerization", A. Douka, M. Kanelli, S. Vouyiouka, C. Papaspyrides, E. Topakas, P. Christakopoulos

9th PESXM, Athens, Greece 23-25/5/2013

"Superficial modification of synthetic fabrics with the use of a cutinase from *Fusarium oxysporum",* M Kanelli, E. Nikolaivits, P Christakopoulos, E. Topakas

10th PESXM, Patras, Greece 4-6/6/2015

"Application of alternative polymerization procedure for the production of biodegradable polyesters", M. Kanelli, A. Douka, S. Vouyiouka, C. Papaspyrides, L. Papaspyridi, E. Topakas, P. Christakopoulos

10th PESXM, Patras, Greece 4-6/6/2015

"Enzymatic modification of polyester fabrics*",* M Kanelli, E. Nikolaivits, P Christakopoulos, E. Topakas

6th Conference of Microbiokosmos, Athens, Greece 3-5/4/2015

"Acetyl esterases of glucomannan: synthetic tools for the enzymatic modification of mono-, di- and polysaccharides", M. Kanelli, P. Christakopoulos, E. Topakas

7th Conference of Microbiokosmos, Athens, Greece 7-9/4/2017

"A CE2 acetyl esterase acylation approach on polysaccharide substrates", M. Kanelli, E. Topakas

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύσσονται καινοτόμες βιοτεχνολογικές, φιλικότερες προς το περιβάλλον διεργασίες για την τροποποίηση συνθετικών και φυσικών πολυμερών, με στόχο την αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους και την διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών τους.

Τα συνθετικά υφάσματα αποτελούν σημαντικό κομμάτι της κλωστοϋφαντουργίας, καθώς έχουν ευρύ πεδίο εφαρμογών, ωστόσο η υψηλή υδροφοβικότητα τους αποτελεί βασική αδυναμία. Η ενζυμική επεξεργασία αυτών των πολυμερικών υλικών είναι μια σύγχρονη και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση που αποσκοπεί στην αύξηση της υδροφιλικότητας. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση υφάσματος πολυ(τερεφθαλικού αιθυλεστέρα) (PET) επιτυγχάνεται με χρήση μιας ανασυνδυασμένης κουτινάσης από τον *Fusarium oxysporum*. Αρχικά εξετάστηκε και επιβεβαιώθηκε η υδρολυτική ικανότητα της κουτινάσης σε δύο μοντέλα υποστρώματα, το τερεφθαλικό δις-βενζοϋλοξυαιθυλεστέρα και το εμπορικό τερεφθαλικό 2-υδροξυαιθυλεστέρα, που προσομοιάζουν την επιφάνεια του PET. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υδρόλυση πλεκτών υφασμάτων PET. Η υδρόλυση ποσοτικοποιήθηκε με υπολογισμό της συγκέντρωσης του τερεφθαλικού οξέος και των παραγώγων του που απελευθερώνονται στο υπερκείμενο της αντίδρασης, ενώ βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ενζυμικής υδρόλυσης: 40 ^{o}C, pH 8.0, και 1.92 $mg_{ενζυμικού\ φορτίου}/g_{υφάσματος}$. Ακολούθως, έλαβε χώρα μελέτη αντοχής σε εφελκυσμό και δοκιμές βαφής, όπου επιτεύχθηκε αύξηση της έντασης χρώματος K/S κατά 150 %, χωρίς να υποβαθμίζεται η ποιότητα του αρχικού υλικού. Η επιφανειακή ενζυμική υδρόλυση του πολυαμιδικού (PA) 6.6 υφάσματος έλαβε χώρα με χρήση της εμπορικής πρωτεάσης Alcalase 2.4 L σε βέλτιστες συνθήκες, όπως αυτές ορίζονται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας Novozymes. Αρχικά εξετάστηκε και επιβεβαιώθηκε η δυνατότητα ενζυμικής υδρόλυση ενός μοντέλου υποστρώματος, του αδιπικού δις-εξυλαμιδίου, που μιμείται την πολυαμιδική επιφάνεια, με ποσοτικοποίηση των αμινομάδων που απελευθερώνονται στο υπερκείμενο της αντίδρασης. Στη συνέχεια τα τροποποιημένα PA υφάσματα μελετήθηκαν μέσω βαφής και αξιολόγησης της έντασης χρώματος K/S και διαφορά χρώματος ΔΕ. Με εφαρμογή θερμοκρασιών από 40 έως 60 ^{o}C και pH 8.0 επιτεύχθηκε ΔΕ ίσο με 14 και 1.24-φορές αύξηση του K/S. Η ενζυμική υδρόλυση παράλληλα αύξησε την απορροφητικότητα σε νερό κατά 2.7 φορές, ενώ διατηρήθηκαν οι θερμικές και μηχανικές ιδιότητες της κύριας μάζας του συνθετικού

υλικού. Η ελεγχόμενη ενζυμική τροποποίηση των PET και PA υφασμάτων εξετάστηκε και μέσω φασματοσκοπικών και αναλυτικών μεθόδων, όπως FTIR-ATR και XPS.

Επιπρόσθετα, στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η παραγωγή της χρωστικής βιολασεΐνης από το βακτήριο *Janthinobacterium lividum* και η χρήση της για την βαφή πολυαμιδικών υφασμάτων, τα οποία απέκτησαν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Οι βέλτιστες συνθήκες για μέγιστη παραγωγή βιομάζας και συνεκδοχικά βιολασεΐνης βρέθηκαν να είναι οι 25 ^{o}C, pH 7.0, ενώ η προσθήκη αμπικιλλίνης 0.2 mg/mL οδήγησε σε 1.3 φορές αύξηση της βιολασεΐνης. Σε μεγαλύτερη κλίμακα η προσθήκη 1 % (v/v) γλυκερόλης στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου οδήγησε σε πενταπλάσια παραγωγή εκχυλισμένης ακατέργαστης βιολασεΐνης συγκέντρωσης 1.83 g/L. PA 6.6 υφάσματα βάφτηκαν μέσω τριών διεργασιών: μέσω παράλληλης ζύμωσης και βαφής του υφάσματος (SFD), μέσω επώασης του υφάσματος σε βακτηριακή καλλιέργεια μετά τη ζύμωση και ύστερα από εφαρμογή υπερήχων και τέλος με χρήση της εκχυλισμένης βιολασεΐνης από το εσωκυτταρικό. Οι μέγιστες τιμές ΔΕ και K/S που σημειώθηκαν ήταν 74.81 και 22.01, αντίστοιχα, για υφάσματα που βάφτηκαν μέσω της διεργασίας SFD. Ακόμη τα SFD βαμμένα δείγματα δεν επέδειξαν υποβάθμιση της αντοχής του χρώματος στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα και στο νερό. Με στόχο την μελέτη της αντιμικροβιακής ιδιότητας των βαμμένων με βιολασεΐνη υφασμάτων, εξετάστηκε η παρεμποδιστική τους δράση στην ανάπτυξη διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών. Τα βαμμένα υφάσματα παρουσίασαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μυκήτων *Candida albicans, Candida parapsilosis* και *Candida krusei,* όπως επίσης και κατά των βακτηριακών στελεχών *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* και του υπερβακτηρίου *S. aureus* MRSA.

Αναφορικά με τα φυσικά πολυμερή, οι ακυλιωμένοι πολυσακχαρίτες ελκύουν το ενδιαφέρον, καθώς βρίσκουν εφαρμογή σε πολλούς τομείς ως βιοσυμβατές και βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις. Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η δυνατότητα μιας εστεράσης του οξικού οξέος, που ανήκει στην οικογένεια υδατανθρακικών εστερασών CE2 από τον *Clostridium thermocellum,* να καταλύει την σύνδεση ακυλομάδων σε γλυκάνη και μαννο-πολυσακχαρίτες. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις μετεστεροποίησης μονοσακχαριτών και δισακχαριτών αλδοεξόζων, παρουσιάζοντας ενζυμική τοποεκλεκτικότητα στη θέση *O*-6 των σακχάρων, όπως επιβεβαιώθηκε μέσω NMR και ESI-MS. Οι τροποποιημένοι μονοσακχαρίτες παρουσίασαν αποδόσεις ακυλίωσης από 11 έως 65 %, με προτίμηση σε ακυλοδότες βραχείας αλύσου, ενώ οι δισακχαρίτες επέδειξαν αποδόσεις από 23 έως 58 %, με προτίμηση στην

μονοακυλίωση. Οι αντιδράσεις μετεστεροποίησης των εν λόγω πολυσακχαριτών έλαβαν χώρα για πρώτη φορά σε συστήματα δύο φάσεων νερού/βινυλεστέρων, καθώς, όπως διαπιστώθηκε, δεν υπάρχει αντίστοιχη αναφορά στη βιβλιογραφία. Η μετεστεροποίηση των πολυσακχαριτών επιβεβαιώθηκε με TLC και FTIR, ενώ ο βαθμός ακυλίωσης προσδιορίστηκε, ύστερα από μεθανόλυση των πολυσακχαριτών και ποσοτικοποίηση των σχηματιζόμενων μεθυλεστέρων με HPLC, από 0.022 έως 1.083 $mmol_{acyl\ group}/g_{polysaccharide}$, ανάλογα τη δομή και την σύσταση του πολυσακχαρίτη-στόχου.

ABSTRACT

Synthetic fabrics occupy a great part of the textile industry production satisfying variable ordinary needs, nonetheless, their high hydrophobicity constitutes an important weakness that impedes process manufacture. The enzymatic superficial treatment of these materials is a modern and eco-friendly procedure that aims at the increase of the polymers' hydrophilicity. Herein, the enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) (PET) fabric is succeeded using a recombinant cutinase from *Fusarium oxysporum*. Initially, the potential of this enzyme in PET modification was proved by its capability to hydrolyze two model substrates, bis(benzoyloxyethyl) terephthalate and commercial bis(2-hydroxyethyl) terephthalate, that mimic polyester surface. Subsequently, PET fabrics were superficially hydrolyzed using the tested cutinase as biocatalyst. The extent of the enzymatic treatment was monitored by the quantification of terephthalic acid and its derivatives released in reaction supernatant. The optimal parameters were found to be 40 ^{o}C, pH 8, and 1.92 mg enzyme loading per gram of fabric. Tensile test and dyeability analyses were also employed achieving a color strength K/S increase up to 150 %, confirming the successful surface modification without degrading the quality of the starting material. The enzymatic surface modification of polyamide (PA) 6.6 fabric was studied with the use of the commercial protease Alcalase 2.4 L at optimal conditions as described in the data sheet provided by the company Novozymes. Initially, in order to test the potential of hydrolytic activity of Alcalase, the enzyme was successfully tested on a model substrate, bis-hexyl amide, that mimics polyamide surface, by monitoring the quantification of amino-groups released in the reaction supernatant. Subsequently, Alcalase was applied for surface modification of PA fabrics that were studied via dyeing parameters K/S and ΔE values. For treatment at 40–60 ^{o}C and pH 8 ΔE was found to be approximately 14 and K/S was 1.24-fold increased. The investigated enzymatic process enhanced the hydrophilicity with 2.7-fold water absorbency increase of PA textiles, while maintaining the thermal and mechanical properties of the bulk synthetic material. The controlled enzymatic hydrolysis of PET and PA textiles is further confirmed and characterized using various spectroscopic and analytical methods, such as FTIR-ATR and XPS.

Furthermore, in the current PhD thesis the use of crude violacein derived from the bacterium *Janthinobacterium lividum* for preparing antimicrobial polyamide fabrics is investigated. The optimal culture conditions for maximum biomass and violacein production were found to be 25

^{o}C, pH 7.0, while the addition of ampicillin of 0.2 mg mL^{-1} in the small scale increased violacein production 1.3-fold. In scale-up trials, the addition of 1 % (v/v) glycerol in the logarithmic phase in a fed batch bioreactor, resulted in 5-fold extracted crude violacein increase with final concentration of 1.83 g/L. PA 6.6 fabrics were dyed following three different processes; through simultaneous fermentation and dyeing (SFD), by incubating the fabric in the sonicated bacterial culture after fermentation and finally by using cell-free methanol extract. The maximum ΔE and K/S obtained for PA fabrics were 74.81 and 22.01, respectively and were obtained through SFD approach. Furthermore, for SFD dyed samples, no alteration of fastness and staining of dye at acid and alkaline perspiration or at water was indicated. In order to examine the antimicrobial activity of the dyed polyamide fabrics, they were tested against cell growth of several pathogenic microorganisms. The violacein dyed fabrics presented significant antifungal activity against *Candida albicans, Candida parapsilosis* and *Candida krusei,* as well as antibacterial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and the superbug *S. aureus* MRSA.

As far as natural polymers are concerned, acylated polysaccharides have drawn attention, since they find applications in numerous fields as biocompatible and biodegradable amphiphilic compounds. The ability of an acetic acid esterase form carbohydrate esterases family 2 (CE2) CE2 from *Clostridium thermocellum* to catalyze acyl transfer to glucan and manno-polysaccharides of significant interest was investigated. Initially, screening tests were conducted on aldohexose monosaccharides and disaccharides, exploiting the enzyme's strict regioselectivity at *O*-6 position which was justified via NMR and ESI-MS. Modified monosaccharides acquired acylation yields from 11 up to 65 %, showing preference for small chain acyl donors, while disaccharides exhibited conversion yields from 23 up to 58 %, with preference to monoacylation. The transesterification reactions of the pre-mentioned polysaccharides were carried out, for the first time, in two-phase mixtures consisted of water/vinyl esters. Acylation of polysaccharides were confirmed by TLC and FTIR, while the degree of acylation was determined via methanolysis and quantification of the produced methyl esters with HPLC, estimating a range of acylation from 0.022 to 1.083 $mmol_{acyl\ group}/g_{polysaccharide}$ depending on the structure and composition of the target polysaccharide.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (ΕΜΠ), υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ευάγγελου Τόπακα και χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Ωνάση.

Με την ολοκλήρωση αυτής της επίπονης και δημιουργικής θητείας και εργασίας θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Ευάγγελο Τόπακα, καθώς είναι ο λόγος που εντρύφησα στον θαυμαστό κόσμο της Βιοτεχνολογίας. Ακόμη τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, τις συμβουλές αλλά και τις γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου. Επίσης θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τις αναμετρήσεις μας στα τερέν, αλλά και την συνεργασία για την λύση γρίφων και την "επιβίωση" μας. Συνάμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα αξιότιμα μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής, τους καθηγητές Φραγκίσκο Κολίση και ειδικότερα τον Δημήτριο Κέκο για την βοήθεια και στήριξή του, για την οποία του είμαι ευγνώμων, όπως επίσης και την αγαπητή Δρ. Διόμη Μαμμά την οποία εκτιμώ και συμπαθώ ιδιαιτέρως.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Σώζοντα Βασιλάκο για την συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ πολύ και την καθηγήτρια Ματίνα Βουγιούκα για τις συμβουλές της, την καθοδήγησή της και και το πνεύμα συνεργασίας και υποστήριξης όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα, επιπρόσθετα, να ευχαριστήσω τον καθηγήτη Σπύρο Λαδά για την βοήθεια που μου προσέφερε στις αναλύσεις XPS και την Jasmina Nikodonovic-Runic για την φιλοξενία και τις γνώσεις που μου προσέφερε σε επίπεδο μορικακής βιολογίας στο εργαστήριο της στο IMGGE στο Βελιγράδι.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου, τους συμπορευτές μου, αυτούς που ήρθαν και αυτούς που απήλθαν, που έκαναν τα πέντε χρόνια του διδακτορικού μου να είναι γεμάτα γέλιο, ένταση, καλή ατμόσφαιρα και πολύ ωραίες στιγμές, με τις εξόδους μας, τα πάνω και τα κάτω μας, τα juicy μας και τις σκουριές μας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την μανούλα μου Ειρήνη και τις αδερφές μου Βίκυ και Εύα για την αγάπη, την συμπαράσταση, την φροντίδα και όσα άλλα μου προσφέρουν.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ στον Κώστα μου για τις συμβουλές και την αμέριστη και αμοιβαία υποστήριξή και αγάπη του.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

Abs	Απορρόφηση	Absorbance
APS	Υπερθειϊκό αμμώνιο	Ammonium persulfate
Ara	Αραβινόζη	Arabinose
BA	Βενζοϊκό οξύ	Benzoic acid
BHET	Τερεφθαλικός δις-2-υδροξυαιθυλεστέρας	Bis(2-hydroxyethyl) terephthalate
BMGY	Θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκερόλη	Buffered glycerol-complex medium
BMMY	Θρεπτικό μέσο που περιέχει μεθανόλη	Buffered methanol-complex medium
Celb	Κελλοβιόζη	Cellobiose
Gal	Γαλακτόζη	Galactose
Glc	Γλυκόζη	Glucose
*Ct*CE2	Εστεράση του οξικού οξέος του *C. thermocellum*	Acetic acid esterase from *C. thermocellum*
DAFS	Βαφή ύστερα πό ζύμωση και διάρρηξη κυττάρων καλλιέργειας με υπερήχους	Dyeing after fermentation and sonication
DD	Άμεση βαφή	Direct dyeing
ΔE	Διαφορά χρώματος	Color change
DMF	Διμεθυλοφορμαμίδιο	Dimethylformamide
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Dimethylsulfoxide
DPPH	1,1-διφαινυλ-2-πικρυλ-υδραζύλιο	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DSC	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης	Differential scanning calorimetry
ε	Συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας	Molecular extinction coefficient
ξ. β.	Ξηρό βάρος	dry weight
ESI-MS	Φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό	Electrospray ionization-Mass spectrometry
FTIR-ATR	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier-Αποσβένουσα ολική ανάκλαση	Fourier-transform infrared spectroscopy - Attenuated total reflectance
*Fo*Cut5a	Κουτινάση του *F. oxysporum*	Cutinase ftom *F. oxysporum*
*Fo*FaeC	Εστεράση του φερουλικού οξέος τύπου C του *F. oxysporum*	Ferulic acid esterase type C from *F. oxysporum*
HCl	Υδροχλωρικό οξύ	Hydrochloric acid
HCOOH	Μεθανικό/μιρμιγκικό οξύ	Formic acid
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής	High-performance liquid chromatography

	απόδοσης	
IC50	Συγκέντρωση όπου παρατηρείται 50 % δέσμευση ουσίας	Half maximal inhibitory concentration
IPTG	ισοπροπυλ-1-β-D-θειογαλακτοπυρανοζίτης	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K/S	Ένταση χρώματος	Color strength
LB	Θρεπτικό μέσο Luria Bertani	Luria Bertani broth
Man	Μαννόζη	Mannose
β-Manb	β-Μαννοβιόζη	β-Mannobiose
MHET	Τερεφθαλικός μονο-2-υδροξυαιθυλεστέρας	Mono(2-hydroxyethyl) terephthalate
MOPS	3-(N-μορφολινο)-προπανοσουλφονικό οξύ	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
*Mt*FaeC	Εστεράση του φερουλικού οξέος τύπου Β του *M.thermophila*	Ferulic acid esterase type B from *M.thermophila*
NA	Θρεπτικό μέσο NB+άγαρ	Nutrient agar
Na_2CO_3	Ανθρακικό νάτριο	Sodium carbonate
$Na_2HPO_4 \bullet 2H_2O$	Όξινο διβασικό φωσφορικό νάτριο με 2 νερά	Sodium phosphate dibasic dihydrate
$NaH_2PO_4 \bullet 2H_2O$	Δις-όξινο μονοβασικό φωσφορικό νάτριο με 2 νερά	Sodium phosphate monobasic dihydrate
NaOH	Καυστικό νάτριο	Sodium hydroxide
NB	Θρεπτικό μέσο Nutrient broth	Nutrient broth
NB-G	NB+γλυκόζη	NB+glucose
NB-GY	NB+γλυκερόλη	NB+glycose
NB-X	NB+γξυλόζη	NB+xylose
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός	Nuclear magnetic resonance
OD	Οπτική πυκνότητα	Optical density
PA 6.6	Πολυαμίδιο 6.6	Polyamide 6.6
PCL	Πολυκαπρολακτόνη	Polycaprolactone
PET	Πολυτερεφθαλικός αιθυλεστέρας	Polyethylene terephthalate
3PET	Τερεφθαλικός δις-βενζοϋλοξυαιθυλεστέρας	Bis(benzoyloxyethyl)terephthalate
PLA	Πολυγαλακτικό οξύ	Polylactic acid
PLA A, PLA B	PLA φύλλα με διαφορετικά πάχη και περιεκτικότητα σε βιολασεΐνη	PLA sheets with different thichness and violacein content
pNPh	4-Νιτροφαινόλη	4-Nitrophenol

pNPhB	Βουτυρικός νιτροφαινυλεστέρας	4-Nitrophenyl butyrate
pNPhL	Λαυρικός νιτροφαινυλεστέρας	4-Nitrophenyl laurate
SEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σαρωσης	Scanning electron spectroscopy
SFD	Ταυτόχρονη ζύμωση και βαφή υφάσματος	Simultaneous fermentation and dyeing
SDS-PAGE	Ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
*St*GE2	Εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από S. thermophile (M. thermophile)	Glycuronic acid esterase from S. thermophile (M. thermophile)
TEMED	Τετραμεθυλενοαιθυλενοδιαμίνη	Tetramethylethylenediamine
TCA	Τριχλωροοξικό οξύ	Trichloroacetic acid
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση	Thermogravimetric analysis
TLC	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	Thin layer chromatography
TNBS	2,4,6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ	2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid
TPA	Τερεφθαλικό οξύ	Terephthalic acid
XPS	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ	X-ray photoelectron spectroscopy
Xyl	Ξυλόζη	Xylose

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ 1
1.1 Εισαγωγή 1
1.2 Ιδιότητες συνθετικών ινών 1
1.3 Τροποποίηση συνθετικών ινών 3
1.3.1 Γενικά 3
1.3.2 Χημική τροποποίηση 5
1.3.3 Ενζυμική τροποποίηση 6
1.3.3.1 Γενικά 6
1.3.3.2 Ενζυμική υδρόλυση πολυαμιδίων 10
1.3.3.3 Ενζυμική υδρόλυση πολυεστέρων 11
1.3.3.4 Μέθοδοι ανάλυσης – ποσοτικοποίησης ενζυμικής τροποποίησης 17
1.3.3.5 Μοντέλα υποστρώματα 18
1.3.3.6 Πρωτεϊνική Μηχανική 19
2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ 23
2.1 Εισαγωγή 23
2.2 Ταξινόμηση Χρωστικών 23
2.3 Χρήση φυσικών χρωστικών 26
2.4 Παραγωγή Χρωστικών από Μικροοργανισμούς 27
2.4.1 Χρωστικές από βακτήρια 27
2.4.2 Χρωστικές από μύκητες 30
2.4.3 Χρωστικές από ζύμη 31
2.4.4 Χρωστικές από φύκια 31
2.5 Εφαρμογές βακτηριακών χρωστικών 32
2.5.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα 32
2.5.2 Εφαρμογές στη φαρμακευτική βιομηχανία 33
2.5.3 Εφαρμογές στην κλωστοϋφαντουργία 35
2.6 Βιολασεΐνη 37
2.6.1 Γενικά 37
2.6.2 Πιθανές εφαρμογές 42
2.6.3 Οικονομική Βιωσιμότητα 44

3 ΦΥΣΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ 47
3.1 Εισαγωγή 47
3.2 Σημαντικοί πολυσακχαρίτες 49
3.3 Ενζυμική τροποποίηση πολυσακχαριτών 50
3.4 Μέθοδοι ανάλυσης τροποποίησης πολυσακχαριτών 54
3.5 Εφαρμογές πολυσακχαριτών 55
3.5.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα 57
3.5.2 Εφαρμογές στην παραγωγή μεμβρανών 59
3.5.3 Εφαρμογές σε κόλλες 59
3.5.4 Εφαρμογές στα καλλυντικά 60
3.5.5 Εφαρμογές στην Ιατρική 60
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 63
4.1 Ένζυμα 63
4.2 Μικροοργανισμοί 63
4.3 Υλικά 63
4.4 Θρεπτικά μέσα 65
4.5 Παραγωγή ενζύμων 66
4.5.1 Ετερόλογη έκφραση της κουτινάσης *Fo*Cut5a 66
4.5.2 Ετερόλογη έκφραση των εστερασών *Mt*faeC, *Fo*faeC, *St*GE2 67
4.5.3 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 67
4.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 68
4.5.5 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και ενζυμικής συγκέντρωσης 70
4.6 Σύνθεση των μοντέλων υποστρωμάτων του PET και του PA 6.6 71
4.6.1 Χημική σύνθεση του 3PET 71
4.6.2 Χημική σύνθεση του αδιπικού δις-εξυλαμιδίου 75
4.6.3 Ταυτοποίηση των μοντέλων υποστρωμάτων 75
4.7 Ενζυμική υδρόλυση των μοντέλων υποστρωμάτων 76
4.7.1 Υδρόλυση των μοντέλων του PET 76
4.7.2 Υδρόλυση των μοντέλου του PA 77
4.8 Ενζυμική τροποποίηση πολυεστερικών υφασμάτων PET 78
4.9 Ενζυμική τροποποίηση υφαντών PA 6.6 υφασμάτων 79

4.10 Βαφή ενζυμικά τροποποιημένων συνθετικών υφασμάτων 79
4.11 Μηχανικές ιδιότητες συνθετικών υφασμάτων 81
4.12 Αντοχή χρωματισμού στο οικιακό πλύσιμο, στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα 85
4.13 Αντοχή χρωματισμού στην ξηρή και υγρή τριβή 86
4.14 Αντοχή βαφής σε ακτινοβολία ΧΕΝΟΝ 86
4.15 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων συνθετικών υφασμάτων 87
4.15.1 Ανάλυση FTIR-ATR 87
4.15.2 Ανάλυση SEM 87
4.15.3 Ανάλυση XPS 87
4.15.4 Ανάλυση DSC και TGA 88
4.16 Μέτρηση υδροφιλικότητας ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων 88
4.17 Παραγωγή και απομόνωση βιολασεΐνης από το βακτήριο *J. lividum* 88
4.17.1 Βελτιστοποίηση παραγωγής σε φιάλες Erlenmeyer 88
4.17.2 Παραγωγή βιολασεΐνης σε Βιοαντιδραστήρα 90
4.18 Τροποποίηση πλεκτών PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη 91
4.19 Προετοιμασία φύλλων PLA με βιολασεΐνη με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος .. 93
4.20 Μελέτη αντιμικροβιακής ιδιότητας τροποποιημένων PA υφασμάτων και φύλλων PLA με βιολασεΐνη 94
4.21 Μελέτη αντιοξειδωτικής ιδιότητας τροποποιημένων PA υφασμάτων και φύλλων PLA με βιολασεΐνη 94
4.22 Ενζυμική μετεστεροποίηση μονομερών και διμερών φυσικών υποστρωμάτων 95
4.23 Ενζυμική μετεστεροποίηση πολυσακχαριτών 95
4.24 Ανάλυση μετεστεροποιημένων μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και πολυσακχαριτών με μεθόδους χρωματομετρίας 96
4.24.1 Ανάλυση TLC 96
4.24.2 Ανάλυση HPLC 97
4.25 Φασματοσκοπική ανάλυση μετεστεροποιημένων μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και πολυσακχαριτών 98
4.25.1 Ανάλυση ESI- MS 98
4.25.2 Ανάλυση FTIR 99
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ
5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΕΚΤΩΝ ΥΦΑΣΜΑΤΩΝ PET 101

5.1 Ενζυμική υδρόλυση μοντέλων υποστρωμάτων του PET 101
5.2 Βελτιστοποίηση ενζυμικής διεργασίας 105
5.3 Ταυτοποίηση των προϊόντων υδρόλυσης 108
5.4 Βαφή των ενζυμικά τροποποιημένων PET υφασμάτων 109
5.5 Μηχανικές ιδιότητες των PET υφασμάτων 112
5.6 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων PET ……..113
5.6.1 Ανάλυση FTIR-ATR 113
5.6.2 Ανάλυση SEM 115
5.6.3 Ανάλυση XPS 116
5.6.4 Ανάλυση DSC-TGA 118
6 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΥΦΑΝΤΩΝ ΥΦΑΣΜΑΤΩΝ PA 6.6 119
6.1 Ενζυμική υδρόλυση μοντέλου υποστρώματος του PA 6.6 119
6.2 Επιφανειακή υδρόλυση και βαφή υφασμάτων PA 6.6 119
6.3 Μέτρηση υδροφιλικότητας 123
6.4 Μηχανικές ιδιότητες ενζυμικά τροποποιημένων PA 6.6 υφασμάτων 124
6.5 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων PA 6.6 ……..127
6.5.1 Ανάλυση FTIR-ATR 127
6.5.2 Ανάλυση SEM 128
6.5.3 Ανάλυση XPS 129
6.5.4 Ανάλυση DSC και TGA 131
7 ΒΙΟΛΑΣΕΪΝΗ: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΥΛΙΚΑ 133
7.1 Βελτιστοποίηση παραγωγής βιολασεΐνης 133
7.2 Παραγωγή βιολασεΐνης σε Βιοαντιδραστήρα 140
7.3 Βαφή πλεκτών PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη 143
7.3.1 Αντιμικροβιακή ιδιότητα τροποποιημένων PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη... 146
7.3.2 Αντιοξειδωτική ιδιότητα PA 6.6 υφασμάτων τροποποιημένων με βιολασεΐνη ... 150
7.4 Τροποποίηση φύλλων PLA με βιολασεΐνη 151
7.4.1 Αντιμικροβιακή ιδιότητα τροποποιημένων φύλλων PLA με βιολασεΐνη 152
7.4.2 Αντιοξειδωτική ιδιότητα τροποποιημένων φύλλων PLA με βιολασεΐνη 153
8 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ 155
8.1 Ενζυμική μετεστεροποίηση αναγωγικών σακχάρων 155

8.1.1 Βελτιστοποίηση προπυλίωσης της D-μαννόζης 155
8.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση μετεστεροποιημένων σακχάρων 157
8.1.2.1 Ανάλυση TLC 157
8.1.3 Ανάλυση HPLC 161
8.1.4 Ταυτοποίηση μετεστεροποιημένων σακχάρων 162
8.1.4.1 Ανάλυση ESI-MS 163
8.1.5 Ανάλυση NMR 167
8.2 Ποιοτική ανίχνευση μετεστεροποιημένων πολυσακχαριτών 169
8.2.1 Ανάλυση FTIR 170
8.2.2 Ανάλυση TLC 171
8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των μετεστεροποιημένων προϊόντων 173
9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ 177
9.1 Ενζυμική τροποποίηση συνθετικών πολυμερών 177
9.2 Μικροβιακή παραγωγή βιολασεΐνης και βαφή συνθετικού πολυμερικού υφάσματος 180
9.3 Ενζυμική τροποποίηση φυσικών πολυμερών 181
9.4 Μελλοντικές προκλήσεις 183
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 186
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ 202
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ 204
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 211

1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

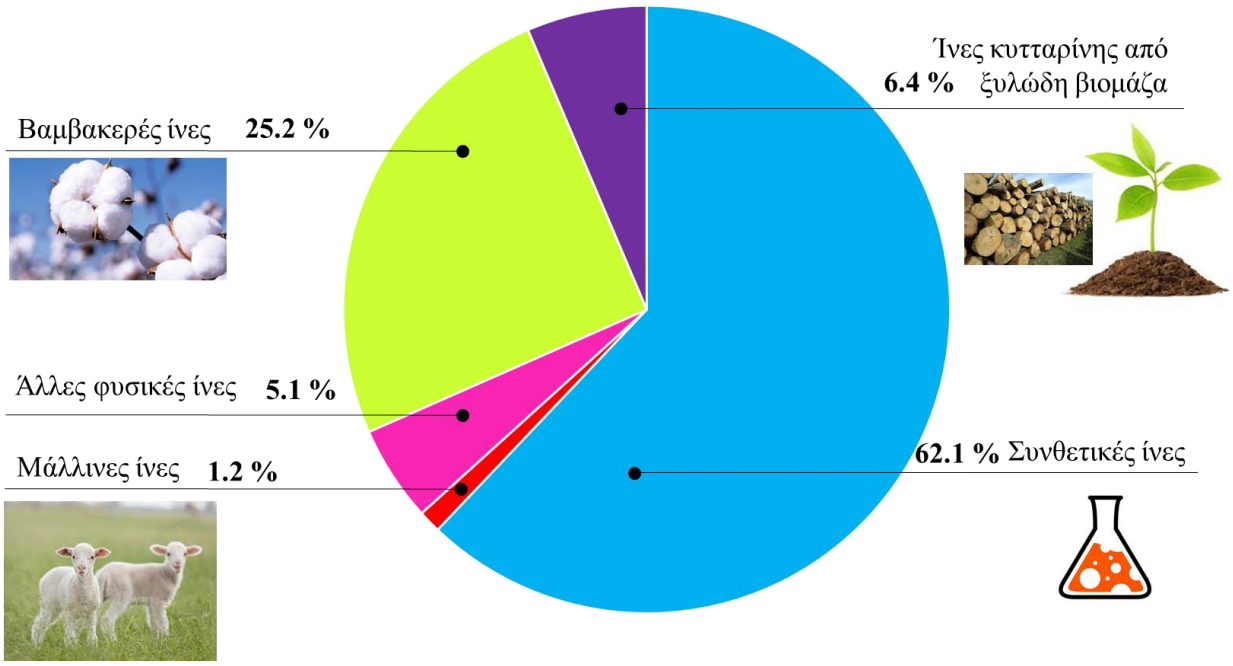
1.1 Εισαγωγή

Στη σύγχρονη εποχή η πρόοδος της τεχνολογίας και της επιστήμης έχει επιφέρει σημαντικές αλλαγές και έχει συμβάλει στην εξέλιξη διάφορων βιομηχανικών τομέων, όπως είναι η βιομηχανία της κλωστοϋφαντουργίας. Πλέον οι κλωστοϋφαντουργικές ίνες που παρασκευάζονται, από τις οποίες προκύπτουν τα νήματα και τα υφάσματα, προορίζονται για ένδυση, οικιακή χρήση (κουβέρτες, σεντόνια), τεχνικά υφάσματα (πυρανθεκτικά, αγώγιμα, διαστημικές κουβέρτες) και διαχωρίζονται σε φυσικές (μαλλί, βαμβάκι, λινάρι, κυτταρίνη), τεχνητές (όπως αναγεννημένη φυτική κυτταρίνη και καζεΐνη του γάλακτος), συνθετικές (πολυαμίδια, πολυεστέρες, πολυολεφίνες, ακρυλικές) και ανόργανες (γυαλί, άσβεστος). Οι συνθετικές ίνες (Σχήμα 1) καλύπτουν το 62 % κ.β. της ζήτησης, με τις πολυεστερικές ίνες να είναι οι κατ' εξοχήν παραγόμενες συνθετικές ίνες (Papaspyrides et al. 2009).

Σχήμα 1: Συνθετικές υφάνσιμες ίνες.

1.2 Ιδιότητες συνθετικών ινών

Σύμφωνα με την Lenzing AG, η κατανάλωση συνθετικών ινών το 2015 ανερχόταν στο 62.1 % της συνολικής παγκόσμιας κατανάλωσης έναντι του 37.9 των φυσικών ινών (Σχήμα 2). Το μεγαλύτερο μέρος των συνθετικών ινών παρασκευάζονται από πολυ(τερεφθαλικό αιθυλεστέρα) (polyethylene terephthalate, PET), από πολυαμίδια/ (polyamide, PA ή nylon) και από πολυακρυλονιτρίλιο (polyacrylonitrile, PAN). Δεν υπάρχει αμφιβολία πως τα συνθετικά πολυμερή έχουν μοναδικές ιδιότητες, όπως είναι η υψηλή ομοιομορφία, η καλή μηχανική και χημική αντοχή και η αντοχή στην τριβή. Ωστόσο η υψηλή υδροφοβικότητα, η συσσώρευση στατικών φορτίων και η αδυναμία «αναπνοής» του υλικού αποτελούν ανεπιθύμητες ιδιότητες των συνθετικών υλικών (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008).

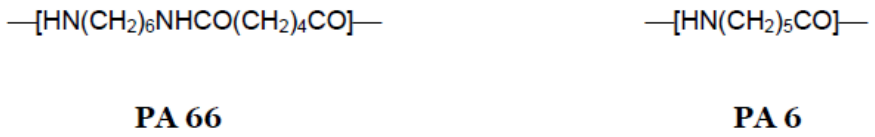


Σχήμα 2: Συνολική παγκόσμια κατανάλωση συνθετικών και φυσικών ινών (Lenzing AG, 2015).

Οι συνθετικές ίνες σε σύκγριση με τις φυσικές παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες, είναι πολύ εύφλεκτες και δεν αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, απαιτούν πολυπλοκότερες διαδικασίες επεξεργασίας και σε ξηρό περιβάλλον αναπτύσσουν στατικό ηλεκτρισμό και μπορεί να προκαλέσουν δερματικές παθήσεις, ενώ η χαμηλή διαπερατότητα του νερού σε αυτές οδηγεί στη συγκράτηση λεκέδων κατά τη διαδικάσια του πλυσίματος (Kiumarsi and Parvinzadeh 2010; Roshan Paul 2015). Ακόμη, οι συνθετικές ίνες έχουν χαμηλή υδροφιλικότητα που δυσχεραίνει τις διεργασίες του φινιρίσματος και της βαφής, εμποδίζει την ενσωμάτωση προσθέτων, όπως επιβραδυντικά καύσης, ενώ δεν είναι άνετα στην ένδυση, καθώς εμποδίζει την εξάτμιση λόγω εφίδρωσης δημιουργώντας ασφυκτικές συνθήκες για το δέρμα και δυσοσμία (Yoon et al.; Kwon et al. 1998; Lee and Song 2010; Bishop et al. 2013). Ωστόσο οι συνθετικές ίνες χαρακτηρίζονται και από πληθώρα πλεονεκτημάτων που τα καθιστούν κατάλληλα για πολλές εφαρμογές. Ενδεικτικά, οι συνθετικές ίνες παρουσιάζουν άριστες φυσικές ιδιότητες, όπως είναι η αντοχή και η ελαστικότητα των ινών PA και PET και υψηλότερη ανθεκτικότητα σε επιθέσεις εντόμων και παράσιτων, όπως ο σκώρος (Djordjevic et al. 2005). Επιπλέον, ζαρώνουν λιγότερο, στεγνώνουν πιο γρήγορα, μπορούν να

παραχθούν σε μαζικές ποσότητες σε ελάχιστο χρόνο και έχουν χαμηλότερο κόστος παραγωγής (Uttam et al. 2013).

Τα πλέον γνωστά πολυαμιδικά πολυμερή για παρασκευή συνθετικών ινών είναι τα: PA 6.6, που προκύπτει με αντίδραση πολυσυμπύκνωσης μεταξύ της εξαμεθυλενοδιαμίνης και του αδιπικού οξέος, και το PA 6, που προκύπτει με πολυμερισμό διάνοιξης του δακτυλίου της καπρολακτάμης (Σχήμα 3).



Σχήμα 3: Χημική δομή των επαναλαμβανόμενων δομικών ομάδων των PA 6.6 και PA 6.

1.3 Τροποποίηση συνθετικών ινών

1.3.1 Γενικά

Η αύξηση της υδροφιλικότητας των συνθετικών πολυμερών είναι καθοριστικής σημασίας για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων τους και πλέον μπορεί να επιτευχθεί με επιφανειακή ενζυμική υδρόλυση, αντικαθιστώντας με αυτόν τρόπο επίπονες χημικές διαδικασίες τροποποίησης.

Τα συνθετικά πολυμερή επικαλύπτονται με βιοενεργές ενώσεις για εφαρμογές στην παρασκευή υφάνσιμων προϊόντων, μικροηλεκτρονικών προϊόντων, σε διάφορες βιοδιεργασίες, στη Βιοϊατρική και στη συσκευασία τροφίμων. Ενδεικτικά η βιοεπικάλυψη (biocoating) του PET μπορεί να οδηγήσει σε βιοσυμβατά και/ ή ημιβιοσυβατά υλικά, σε αντιμικροβιακές επιφάνειες, ενώ χρησιμοποιείται στην κατασκευή ιστών (Goddard and Hotchkiss 2007). Η επιφανειακή αύξηση της υδροφιλικότητας αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς την διαδικασία την βιοεπικάλυψης. Επιπλέον το PET χρησιμοποιείται σε καρδιοαγγειακά εμφυτεύματα, όπως είναι η τεχνητή βαλβίδα καρδιάς, ειδικά ράμματα και τα τεχνητά αιμοφόρα αγγεία. Η αυξημένη υδροφιλικότητα του PET (πχ. γωνία επαφής μικρότερη από 158°) σε αυτές τις εφαρμογές οδήγησε σε μειωμένη βακτηριακή προσκόλληση, με αποτέλεσμα τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης (Li et al. 2007). Ακόμη το PET παρουσιάζει πολύ καλές ιδιότητες για χρήση ως διαφανές επικαλυπτικό στρώμα σε εύκαμπτες ηλεκτρονικές συσκευές (για οθόνες ή φωτοβολταϊκές κυψέλλες), όπως είναι η μηχανική σταθερότητα και η αντίσταση στο οξυγόνο της ατμόσφαιρας και στην υγρασία. Στην περίπτωση των ηλεκτρονικών προϊόντων, η επιφάνεια

του PET πρέπει να καταστεί περισσότερο υδρόφιλη για καλύτερη προσκόλληση λειτουργικών στρωμάτων, ώστε να αυξάνεται η λειτουργικότητα, η επάρκεια και η διάρκεια ζωής στης συσκευής (Laskarakis et al. 2008). Η υπερδιήθηση χρησιμοποιείται σε διάφορες διεργασίες, όπως είναι ο καθαρισμός του νερού και/ ή αφαλάτωσή του, η διαχείριση των υδατικών αποβλήτων και οι διαχωρισμοί που πραγματοποιούνται στις χημικές και βιοχημικές βιομηχανίες και στις βιομηχανίες τροφίμων, γαλακτοκομικών προϊόντων, χάρτου και κλωστοϋφαντουργίας. Η ρύπανση των μεμβρανών από πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια αυξάνει την ενεργειακή απαίτηση για διήθηση και επιβάλλεται καθαρισμός με δραστικά χημικά ή αντικατάσταση της μεμβράνης. Οι συσκευές υπερδιήθησης και αντίστροφης ώσμωσης με βάση το PA ή το PAN μπορούν να καταστούν περισσότερο υδρόφιλες με τον εμβολιασμό πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στις συσκευές, ή με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλικού στις συσκευές αυξάνοντας την αντίσταση στις μολύνσεις (Li et al. 2007; Kim et al. 2007).

Υφάσματα που κατασκευάζονται από PA και PET δεν είναι βολικά για ένδυση, καθώς ο ιδρώτας δεν μπορεί να διαπεράσει το υλικό και να εξατμιστεί. Η φτωχή διαπερατότητα οφείλεται στην υδρόφοβο χαρακτήρα των συνθετικών πολυμερών που οδηγεί και σε στατικό ηλεκτρισμό και κατακράτηση των λεκέδων στο πλύσιμο. Κατά καιρούς έχουν διερευνηθεί διαφορετικές μέθοδοι επεξεργασίας πλάσματος, προκειμένου να αυξηθεί η υδροφιλικότητα για τις ίνες και τις μεμβράνες από PET, PA και PAN (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008). Ενδεικτικά ευρέως χρησιμοποιούνται χημικά φινιρίσματος (chemical finishers) που έχουν ως βάση υδρόφιλα πολυμερή που περιέχουν καρβοξυλομάδες, με σκοπό να αυξήσουν την υδροφιλικότητα κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων. Τα χημικά αυτά συνεχώς βελτιώνονται και υπάρχουν πολυάριθμες πατέντες που αφορούν σε αυτά (Soane et al. 2002). Επιπροσθέτως η αυξημένη υδροφιλικότητα καθιστά την επεξεργασία των πολυμερών πιο αποτελεσματική (π.χ. τη βαφή). Η αλκαλική κατεργασία του πολυεστέρα μπορεί να βελτιώσει την υφή και την υδροφιλικότητα, και να μειώσει το χνούδιασμα (pilling) (Li et al. 2014). Ωστόσο, σε αυτές τις διεργασίες έχουν σημειωθεί εξαιρετικά υψηλές απώλειες βάρους από 10-30 %. Από την άλλη η κατεργασία με αλκαλικό υπεροξείδιο του υδρογόνου ή με πυκνό ισχυρό οξύ για την υδρόλυση πολυμερικών υλικών είναι δύσκολο να ελεγχθούν και έχουν αρνητική επίπτωση στο περιβάλλον. Αντιθέτως, η ενζυμική υδρόλυση στοχεύει στην επιφάνεια των πολυμερών, ενώ οι ιδιότητες της κύριας μάζας του πολυμερούς παραμένουν αμετάβλητες.

1.3.2 Χημική τροποποίηση

Ένας τρόπος για να βελτιώσουμε τις ιδιότητες των συνθετικών ινών, ώστε να εξαλειφθούν κάποια από τα αρνητικά χαρακτηριστικά τους, είναι η επιφανειακή τροποποίηση των ινών που μπορεί να επιτευχθεί χημικά ή ενζυμικά, με σκοπό την αύξηση της υδροφιλικότητας των ινών αυτών. Η αύξηση της υδροφιλικότητας των συνθετικών ινών και των αντίστοιχων κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων αποτελεί σημαντικό ζητούμενο στην βιομηχανία συνθετικών ινών. Η αύξηση της υδροφιλικότητας πραγματοποιείται μέσω της τροποποίησης της πολυμερικής επιφάνειας των ινών, υδρολύοντας σε περιορισμένο βαθμό τους χημικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών ενώσεων. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η εμφάνιση πολικών ομάδων στην επιφάνεια της συνθετικής ίνας προσδίδοντας έτσι μεγαλύτερη υδροφιλικότητα στο τροποποιημένο υλικό. Οι πολικές αυτές ομάδες είναι εξαρτώμενες της φύσης του συνθετικού πολυμερούς από το οποίο αποτελείται η ίνα ή το αντίστοιχο κλωστοϋφαντουργικό προϊόν. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των ινών πολυαμιδίου έχουμε εμφάνιση καρβοξυ- και αμινο-ομάδων, ενώ στους πολυεστέρες έχουμε εμφάνιση καρβοξυ- και υδροξυ- ομάδων.

Η κλασσική χημική τροποποίηση των συνθετικών κλωστοϋφαντουργικών προϊόντων, χρησιμποποιώντας ισχυρά οξέα ή άλκαλι, απαιτεί υψηλά ποσά ενέργειας και χημικά, μέρος των οποίων απελευθερώνονται στο περιβάλλον, ενώ μπορεί να επηρεάσει τις ιδιότητες της κύριας μάζας των υφασμάτων (Brueckner et al. 2008; Parvinzadeh 2012; Ribitsch et al. 2012). Η αλκαλική κατεργασία μπορεί να βελτιώσει την υδροφιλικότητα και τη χημική ενεργότητα των συνθετικών ινών, ωστόσο είναι δύσκολο να γίνει έλεγχος του βαθμού και του εύρους της τροποποίησης, οδηγώντας έτσι σε μη ανεκτά επίπεδα απώλειας αντοχών του υλικού (Silva et al. 2005). Τα μειονεκτήματα της χημικής τροποποίησης συνοψίζονται:

-στον κίνδυνο μετανάστευσης των χημικών ουσιών τροποποίησης κατά τη χρήση του υφάσματος, γεγονός που μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την υγεία του χρήστη και παράλληλα να μειώσει το χρόνο ζωής του προϊόντος

-σε υποβάθμιση της ποιότητας του προϊόντος, η οποία έγκειται σε μη αντιστρεπτό κιτρίνισμα, μείωση της ανθεκτικότητας (Gübitz and Paulo 2003) και σημαντική μείωση του βάρους του πολυμερούς (10-30 %) εξαιτίας της εκτεταμένης υδρόλυσης της συνθετικής πολυμερικής αλυσίδας (Zeronian and Collins 1989).

Με σκοπό τον περιορισμό της χρήσης τέτοιων χημικών για την προστασία του περιβάλλοντος έχουν αναπτυχθεί νέες τεχνολογίες για να αντικαταστήσουν τις κλασσικές, όπως

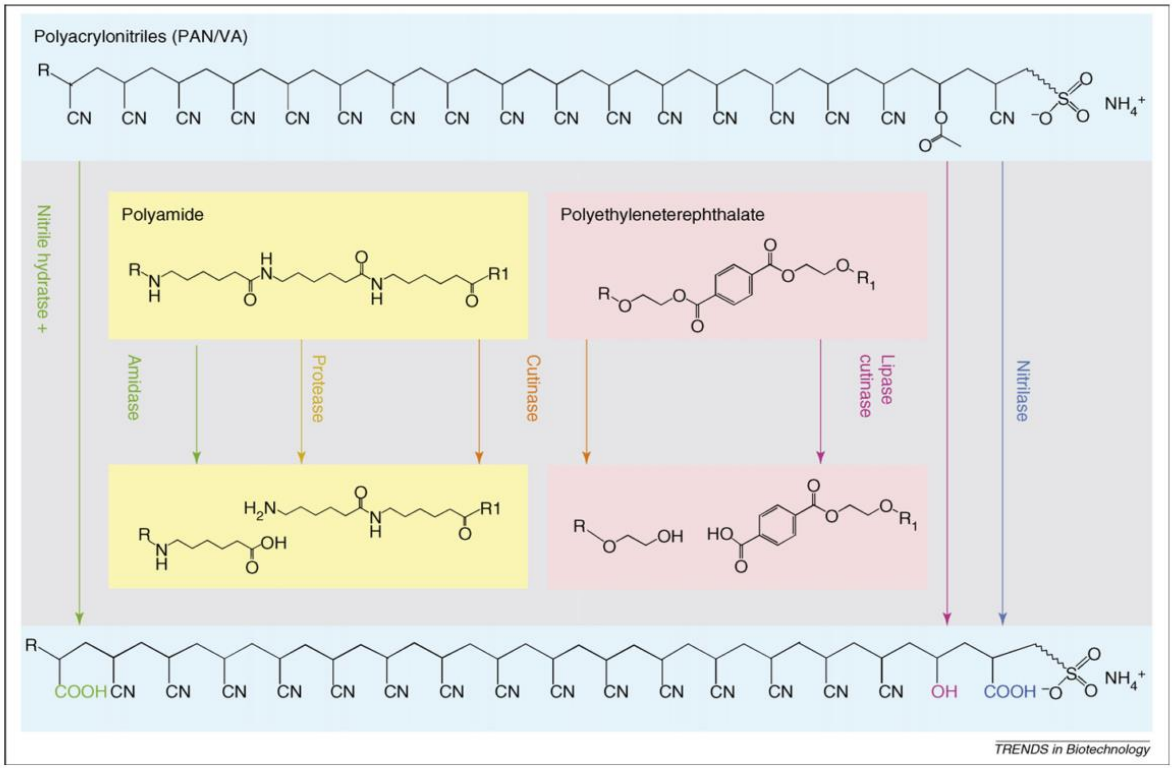
είναι η επεξεργασία του υλικού με χρήση πλάσματος, δημιουργώντας έτσι υδροφιλικές ομάδες στην επιφάνεια, και η δημιουργία συγκεκριμένων υδροφιλικών ομάδων στην επιφάνεια των ινών μέσω συμπολυμερισμού (graft polymerization) (McCord et al. 2002; Vertommen et al. 2005; Pappas et al. 2006).

1.3.3 Ενζυμική τροποποίηση

1.3.3.1 Γενικά

Σε αυτό το πλαίσιο μία καινοτόμος προσέγγιση είναι η ενζυμική τροποποίηση της επιφάνειας των ινών για τη βελτίωση της ποιότητας και των ιδιοτήτων των συνθετικών ινών, προστατεύοντας και διατηρώντας την αντοχή των τροποποιημένων υλικών Στο Σχήμα 4 παρουσιάζεται σχηματικά η ενζυμική υδρόλυση PAN, PA και PET. Επεξηγηματικά, τα ένζυμα εμφανίζουν εξειδίκευση και δρουν μόνο στην επιφάνεια των ινών και όχι στο εσωτερικό τους, λόγω του μεγάλου μεγέθους τους, το οποίο δεν τους επιτρέπει τη διάχυση προς το εσωτερικό των ινών. Ως εκ τούτου δεν πραγματοποιείται υποβάθμιση άλλων ιδιοτήτων (O'Neill and Cavaco-Paulo 2004; Matamá et al. 2006).

Επιπλέον πλεονέκτημα της ενζυμικής τροποποίησης είναι ότι πρόκειται για βιοκαταλυτική και όχι χημική μέθοδο και δεν είναι απαραίτητη η χρήση πολύπλοκων μηχανημάτων, όπως π.χ. στην περίπτωση τροποποίησης με χρήση πλάσματος. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές Γενετικής Μηχανικής με σκοπό τη μεγέθυνση του ενεργού κέντρου των ενζύμων τροποποίησης πολυεστέρων, ώστε να μπορεί να φιλοξενήσει καλύτερα τα μεγαλομόρια των πολυμερών. Νέες μοντέρνες τεχνικές Μοριακής Βιολογίας και Βιοπληροφορικής γίνονται ολοένα πιο απαραίτητες ως εργαλεία για την αναβάθμιση συνθετικών πολυμερών μέσω της μετατροπής των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων προς πιο λειτουργικούς βιοκαταλύτες. Στην πρόσφατη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ της τάξης των ενζύμων ή της πηγής προέλευσής τους και της δραστικότητας που εμφανίζουν αυτά για την τροποποίηση ινών PA ή PET. Για το λόγο, αυτό είναι αναγκαία η μελέτη πολλών και διαφορετικών ενζύμων, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών για τη δυνατότητα επιφανειακής τροποποίησης ινών. Κύριο πρόβλημα της μελέτης αυτής είναι ο μεγά-



Σχήμα 4: Ενζυμική υδρόλυση συνθετικών πολυμερών (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008).

λος χρόνος που απαιτείται για την ανάλυση των ιδιοτήτων των τροποποιημένων ινών και γενικά της επίδρασης των ενζύμων πάνω στη δομή των μακρομορίων. Εξαιτίας αυτού, προτείνεται η χρήση μορίων-μοντέλων, τα οποία μιμούνται χημικά τις επιφάνειες των ινών με σκοπό τη γρήγορη εύρεση ενζύμων που έχουν το δυναμικό να τροποποιήσουν ίνες PET και PA (Heumann et al. 2006). Η ανίχνευση της υδρολυτικής ικανότητας διαφόρων ενζύμων απέναντι στα μόρια αυτά αποτελεί μία αποδοτική και γρήγορη μέθοδο επιλογής των κατάλληλων βιοκαταλυτών, οι οποίοι θα επιταχύνουν ουσιαστικά την έρευνα γύρω από την ενζυμική τροποποίηση συνθετικών ινών. Παραδείγματα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης πολυμερικών υλικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Επιφανειακή τροποποίηση συνθετικών πολυμερών.

Ένζυμο	Οργανισμός	Προέλευση	Πολυμερές	Μέθοδος ανάλυσης	Πηγή
Κουτινάση Novozym® 735 (lipase A)	*Fusarium solani pisi* *Candida.antarctica*	Unilever (Vlaardingen) Novozymes	PET	HPLC	(Vertommen et al. 2005)
Κουτινάση (GCI 2002/1410)	-	Genencor	PA 6.6	Βαφή με χρωστική κατάλληλη για πρωτοταγείς αμινομάδες	(Silva et al. 2005)
Κουτινάση	*Humicola insolens* *Pseudomonas mendocina*	Novozymes	PET	SEM, HPLC	(Ronkvist et al. 2009)
		Genencor	PET		-//-
Λιπάση (Lipolase 100T)	*Thermomyces lanuginosus*	Novozymes	PET	WCA, HPLC–UV-detection	(Eberl et al. 2009)
Κουτινάση	*F. solani pisi,* *Thermobifida fusca*		PET		-//-
Λιπάση Κουτινάση	*C. antarctica*	Novozymes	PET	SEM, WCA, αντοχή σε εφελκυσμό	(Lee et al., 2010)
Λιπάση Bc-Lip και Cr-Lip	*Burkholderia cepacia* και *Candida rugosa*	Amano Enzyme Inc.	PET		(Sulaiman et al., 2012)
Lipomod 338P *Lipomod 224P* *Lipomod 29P*	-	Biocatalysts	PET	SEM, απορρόφηση σε νερό, μηχανικές ιδιότητες	(Djordjević et al., 2005)
TEXAZYM PES sp5 Λιπάση PS Πρωτεάση Multiplus L		inoTEX Ltd. Amano Enzyme Inc., Genencor	PET, PA	HPLC	(Heumann et al., 2006)
Λιπάση	*T. lanuginosus*	Novozymes	PET	SEM, HPLC, XPS	(Brueckner et al., 2008)
Λιπάση Lipex 50T	*A. terreus*	Novo Nordisk	PA 6		(Kiumarsi et al., 2010)
Λιπάση	*A. oryzae*	Novozymes	PET	WCA, SEM	(Kim et al., 2010)
TEXAZYM EM		inoTEX Ltd.	PET	WCA, FTIR, φθορισμομετρία	(Donelli et al., 2009)
Υδρατάση νιτριλίου	*Rhodococcus rhodochrous*		PAN[2]	XPS, σχηματισμός NH_3, βαφή με κατάλληλη χρωστική	(Tauber et al. 2000)
Νιτριλάση	*Agrobacterium tumefaciens*		PAN	XPS, FTIR, SEM, βαφή με κατάλληλη χρωστική	(Fischer-Colbrie et al. 2006)
Εστεράση σερίνης	*Pseudomonas spp.*		PET	Απελευθέρωση τερεφθαλικού οξέος, δοκιμή δέσμευσης χρωστικής ουσίας, υδροφιλικότητα, Δοκιμή αντοχής στο χνούδιασμα	(Yoon et al. 2002)

Ένζυμο	***Οργανισμός***	**Προέλευση**	**Πολυμερές**	**Μέθοδος ανάλυσης**	**Πηγή**
Κουτινάση	*T. fusca,* *Penicillium citrinum,* *Fusarium oxysporum,* *F. solani*		PET	Απελευθέρωση τερεφθαλικού οξέος, υδροφιλικότητα, XPS, βαφή με κατάλληλη χρωστική και φασματομετρία	(Alisch-Mark et al. 2006; Mueller 2006; Liebminger et al. 2007; Nimchua et al. 2007)
Λιπάση	*C. antarctica* *Humicola sp.,* *Candida sp.,* *Pseudomonas sp.* *T. lanuginosus*		PET	Δοκιμή αντοχής στο χνούδιασμα, απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης	(Andersen et al. 1998; Heumann et al. 2006)
Νιτρο-βενζυλεστεράσες	*Bacillus sp.*		PET	Υδρόλυση των μοντέλων υποστρωμάτων των δις-p-μεθυλβενζοϊκής αιθυλενογλυκόλης, τερεφθαλικού διμεθυλεστέρα, τερεφθαλικού διαιθυλεστέρα, Δοκιμή αντοχής στο χνούδιασμα	(Michels et al. 2006)
Πρωτεάση	*Bacillus subtilis* *Beauveria sp.*		PA	Απελευθέρωση ολιγομερών, δοκιμή δέσμευσης χρωστικής ουσίας, υδροφιλικότητα	(Heumann et al. 2006; Silva et al. 2007)
Κουτινάση	*F. solani pisi*		PA	Απελευθέρωση ολιγομερών, δοκιμή δέσμευσης χρωστικής ουσίας, υδροφιλικότητα	(Heumann et al. 2006; Silva et al. 2007)
Αμιδάση	*Nocardia sp*		PA	Απελευθέρωση ολιγομερών, υδροφιλικότητα	(Heumann et al. 2006)
Υδρολάση	*Arthrobacter sp.*		PA	Απελευθέρωση προϊόντων υδρόλυσης από τα διμερή του 6-αμινοεξανοϊκού	(Negoro et al. 2007)
Κουτινάση	*Thermobifida cellulosilytica*		PEF[3]	HPLC-DAD, LC/TOF-MS	(Pellis et al. 2016)
Protex Gentle L, Protex 40 L, Protex Multiplus L, Protex 50FP		Genecor International	PA 6.6	FTIR, SEM, απορροφητικότητα σε νερό, μηχανικές ιδιότητες	(Gashti et al. 2013)
Λιπάση B (fCaLB)	*C. antarctica*	Sigma-Aldrich	PLLA[4]	WCA, XPS	(Pellis et al. 2015)
Κουτινάση	*T. cellulosilytica*		HMLS-PET[1], PET	Απελευθέρωση προϊόντων, SEM, HPLC	(Vecchiato et al. 2017), (Gamerith et al. 2017)

[1]high modulus and low shrinkage poly(ethylene terephthalate), [2]*Polyacrylonitrile*, [3]*poly(ethylene furanoate)*, [4]poly(L-lactic acid)

1.3.3.2 Ενζυμική υδρόλυση πολυαμιδίων

Ειδικότερα για την κατηγορία των γραμμικών PAs, η χρήση ενζύμων για τη βελτίωση ιδιοτήτων αποτελεί πρόσφατη και καινοτόμο μεθοδολογία, τροποποιώντας εξειδικευμένα μόνο την επιφάνεια των ινών και όχι την κύρια μάζα τους. Η τροποποίηση του PA εστιάζεται στην επιφανειακή υδρόλυση των αμιδικών δεσμών, δημιουργώντας ελεύθερες καρβοξυλο- και αμινο-ομάδες στην επιφάνεια των ινών (Silva et al. 2005). Τα ένζυμα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για την τροποποίηση ινών πολυαμιδίου, είναι εστεράσες, κουτινάσες και πρωτεάσες (Heumann et al. 2006). Σε κάποιες περιπτώσεις έχει γίνει και χρήση υπεροξειδάσης του μαγγανίου, η οποία τροποποίησε την επιφάνεια του PA 6.6 και του PA 6, χωρίς να μειώσει τη διάμετρο των ινών (Deguchi et al. 1998; Friedrich et al. 2007). Επίσης, έχουν αναφερθεί και οι λακκάσες, οι οποίες σε συνδυασμό με μία ενδιάμεση ουσία αύξησαν την υδροφιλικότητα υφασμάτων από PA 6.6 (Miettinen-Oinonen et al., 2002).

Το πιο σημαντικό PA είναι το PA 6.6 που παράγεται από την αντίδραση μεταξύ του αδιπικού οξέος και της εξαμεθυλενοδιαμίνης. Ωστόσο, υπάρχουν κι άλλα εμπορικά διαθέσιμα PA, όπως τα PA 4.6, 6.10, 6.12, τα PA 6 και 11 που βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς, ο πιο σημαντικός από τους οποίους είναι η παραγωγή υφάνσιμων προϊόντων. Τα ένζυμα που υδρολύουν τα πολυμαμίδια είναι οι πρωτεάσες, οι αμιδάσες και οι κουτινάσες. Κάποιοι ερευνητές χρησιμοποίησαν ως μοντέλο το υπόστρωμα το αδιπικό δις-εξυλαμίδιο για να δοκιμάσουν την ενεργότητα μιας πολυαμιδάσης. Για το ίδιο μοντέλο-υπόστρωμα έγινε έλεγχος της ενεργότητας στην υδρόλυση μιας πρωτεάσης από το μύκητα *Beauveria sp*., μιας αμιδάσης από το βακτήριο *Nocardia sp*. και μιας κουτινάσης από το μύκητα *F. solani*. Η κουτινάση αυτή στη συνέχεια τροποποιήθηκε (L182A) με σκοπό να επιτευχθεί υψηλότερη υδρολυτική ενεργότητα ως προς το PA. Ομοίως η ενεργότητα του ενζύμου EII' από το βακτήριο *Flavobactererium sp.*στην υδρόλυση ενός ολιγομερούς PA αυξήθηκε 200 φορές μέσω Γενετικής Μηχανικής. Εκτός όμως της Γενετικής Μηχανικής, η μηχανική της αντίδρασης (π.χ. θερμοκρασία αντίδρασης, διαλύτης, πρόσθετα) αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα και η ενζυμική υδρόλυση πολυαμιδίων μπορεί να ενισχυθεί με την παρουσία κατάλληλων διαλυτών. Κατά την παραγωγή PA παράγονται ορισμένα γραμμικά και κυκλικά πολυαμιδικά ολιγομερή ως παραπροϊόντα τα οποία απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Οι Negoro et al. (2007) περιέγραψαν την ενζυμική αποικοδόμηση αυτών των παραπροϊόντων με τη βοήθεια βακτηρίων, όπως το *Arthrobacter sp*. Τέλος, *οι* υπεροξειδάσες που αποικοδομούν τα νάυλον επιτίθενται στις

ομάδες μεθυλενίου δίπλα στα άτομα αζώτου ακολουθώντας μία αυτοοξειδωτική διαδικασία. Βιβλιογραφικά ακόμη αναφέρεται πως η δυνατότητα αποικοδόμησης πολυαμιδίων από το μύκητα *Bjerkandera adusta* οφείλεται σε δύο υπεροξειδάσες του μαγγανίου. Γενικά η χρήση οξειδωτικών ενζύμων δεν ενδείκνυται για επιφανειακή τροποποίηση πολυαμιδίων, εξαιτίας της μη ελεγχόμενης δράσης αυτών των ενζύμων (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008).

1.3.3.3 Ενζυμική υδρόλυση πολυεστέρων

Τα ένζυμα μπορούν να συμμετάσχουν τόσο στη σύνθεση λειτουργικών πολυεστέρων όσο και στη δημιουργία συγκεκριμένων υδροφιλικών ομάδων στην επιφάνεια των ινών μέσω συμπολυμερισμού (grafting) (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008). Κατά κύριο λόγο οι αλειφατικοί πολυεστέρες είναι περισσότερο απλοί δομικά σε σύγκριση με τους αρωματικούς ή ημιαρωματικούς πολυεστέρες, συνεπώς οι αρωματικοί πολυεστέρες μπορούν να υδρολυθούν και να τροποιηθούν δυσκολότερα (Vertommen et al. 2005). Οι λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση διλειτουργικών πολυεστέρων, βιοσυμβατών πολυεστέρων που περιέχουν σορβιτόλη, όπως επίσης και για την πολυεστερική επικάλυψη της κυτταρίνης (Gustavsson et al. 2003; Mei et al. 2004; Takwa et al. 2006). Το PET είναι ένα πολυμερές που παράγεται από την αντίδραση μεταξύ της αιθυλενογλυκόλης και του τερεφθαλικού οξέος, που προέρχεται από καθαρισμένο και απαλλαγμένο από ακαθαρσίες τερεφθαλικό οξύ ή εναλλακτικά, από τερεφθαλικό διμεθυλεστέρα. Εκτός από την παραγωγή ινών, κάποια ποσότητα του PET που παράγεται χρησιμοποιείται για τη συσκευασία (30%) και σε άλλες εφαρμογές (5 %). Τα ένζυμα αποτελούν πιθανά εργαλεία για την ανακύκλωση του PET, για στοχευμένη επιφανειακή υδρόλυση υλικών με βάση τα PAT και για την αποφυγή χνουδιάσματος των υφασμάτων από PAT κατά τη διαδικασία πλύσης. Τα PAT βάσει βιβλιογραφίας υδρολύονται από κουτινάσες, λιπάσες και εστεράσες.

Οι λιπάσες είναι μία υποκατηγορία των εστερασών και αποτελούν ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό ή την υδρόλυση των λιπών (λιπιδίων). Οι λιπάσες θεωρούνται από τους ερευνητές από τα πιο ευπροσάρμοστα ένζυμα, καθώς έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολυάριθμες βιομετατροπές και μπορούν να βρουν εφαρμογή σε διάφορους κλάδους, όπως η φαρμακοβιομηχανία, η βιομηχανία των γαλακτοκομικών, των απορρυπαντικών, των καλλυντικών, κ.ά. Λιπάσες που υδρολύουν τα PAT προέρχονται από μικροοργανισμούς όπως

Humicola sp., Candida sp., Pseudomonas sp. και *T. lanuginosus* (Heumann et al. 2006b; Guebitz and Cavaco-Paulo 2008).

Οι κουτινάσες είναι μία ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση της κουτίνης, ενός βιοπολυεστέρα που αποτελεί μία προστατευτική στοιβάδα στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών π.χ. της τομάτας. Η κουτίνη αποτελείται από τα ακόλουθα λιπαρά οξέα: ο-υδροξυ λιπαρά οξέα, διυδροξυ-παλμιτικό οξύ, κορεσμένα 18-υδροξυ-9, 10, εποξυ C18 κορεσμένα, ακόρεστα D12 λιπαρά οξέα και ακόρεστα 9,10,18-τριϋδροξυ C18 και μονοακόρεστα D12 λιπαρά οξέα. Οι κουτινάσες είναι επίσης ικανές να καταλύουν και τις αντίστροφες αντιδράσεις, την αιθεροποίηση, την trans-αιθεροποιήση (ενδοεστεροποίηση, αλκοόλυση, και ραδιόλυση), και την αμινόλυση. Η θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού του μέσου της αντίδρασης είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τον προσδιορισμό του τύπου της αντίδρασης που θα επικρατήσει (Pio and Macedo 2009). Η κουτινάση ανήκει στην οικογένεια των υδρολασών σερίνης που, όπως είναι γνωστό, υδρολύει π-νιτροφαινυλο-εστέρες όπως και διαλυτά και αδιάλυτα τριγλυκερίδια (Silva et al. 2005). Οι κουτινάσες έχουν προτίμηση στην υδρόλυση μικρού μήκους τριγλυκεριδίων σε αντίθεση με τις λιπάσες και παρουσιάζουν σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες. Οι κουτινάσες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσες ιδιότητες για εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα προϊόντων, από τρόφιμα μέχρι απορρυπαντικά. Εξαιτίας αυτού, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει εστιαστεί επί της δομής, της λειτουργίας, του καθαρισμού και των εφαρμογών των κουτινασών, με στόχο την ανάπτυξη νέων διαδικασιών όπου θα γίνεται χρήση αυτών των ενζύμων.

Οι κουτινάσες αποτελούν ένα από τα πιο μικρά σε μέγεθος μέλη της οικογένειας των α/β υδρολασών σερίνης (~20-25 kDa) και παρουσιάζουν την κλασική καταλυτική τριάδα που αποτελείται από σερίνη, ιστιδίνη και μία καρβοξυλομάδα. Η υποοικογένεια των κουτινασών αποτελείται από σχεδόν 20 μέλη, που παρουσιάζουν μικρές διαφορές στην αλληλουχία των αμινοξέων. Η δομή και η μοριακή δυναμική έχουν καθοριστεί με ακρίβεια με τη βοήθεια κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και με αναλύσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (nuclear magnetic resonance, NMR). Σε όλες τις υδρολάσες σερίνης το ενεργό κέντρο είναι πάντοτε στο καρβοξυ-τελικό άκρο μιας αλυσίδας β. Σύμφωνα με τους Borreguero et al. (2001), η καταλυτική θέση της κουτινάσης δεν προστατεύεται από ένα αμφιπατικό ελικοειδές "καπάκι", όπως υπάρχει στις λιπάσες. Παρόλα αυτά, η θέση και ο σχηματισμός της οξυανιονικής οπής πραγματοποιείται σε αναλογία με τις λιπάσες κατά τη σύζευξη τους με το υπόστρωμα. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά μπορεί να ευθύνονται για την απουσία διεπιφανειακής ενεργοποίησης που

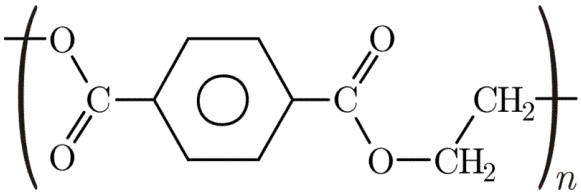
χαρακτηρίζει την καταλυτική συμπεριφορά των κουτινασών. Επεξηγηματικά οι κουτινάσες δεν έχουν την ανάγκη ενεργοποίησης, όπως οι λιπάσες στην παρουσία διεπιφάνειας νερού-ελαίου (Pio and Macedo 2009).

Οι Baker et al. μελέτησαν και σύγκριναν την ενεργότητα και σταθερότητα πέντε κουτινασών από τους μύκητες *Alternaria brassicicola* (AbC), *Aspergillus fumigatus* (AfC), *A. oryzae* (AoC), *Humicola insolens* (HiC), και *F. solani* (FsC). Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως σε υψηλές θερμοκρασίες (~85 ^{o}C) η κουτινάση HiC υδρόλυσε την πολυ(ε-καπρολακτόνη) (poly(ε-caprolactone)) στο μεγαλύτερο βαθμό σε όλες τις τιμές pH που εφαρμόστηκαν, ακολουθούμενο από τις AoC και AfC. Τόσο η AbC όσο και η FsC απεδείχθη πως είναι λιγότερο σταθερές και υπολειτουργούν σε υψηλές θερμοκρασίες και σε όξινες συνθήκες. Ο υπολογισμός του φορτίου της επιφάνειας και η φυλογενετική ανάλυση αποκαλύπτουν δύο σημαντικά βήματα σταθεροποίησης της κουτινάσης:

1) ένα συνολικά ουδέτερο επιφανειακό φορτίο στην περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο και
2) συμπληρωματικό σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού (Baker et al. 2012).

Το PET είναι ο πολυεστέρας που παράγεται στη μεγαλύτερη ποσότητα, καθώς χρησιμοποιείται σε πολυάριθμες εφαρμογές, όπως είναι οι μεμβράνες, οι ίνες και οι συσκευασίες. Η δομή του φαίνεται στο Σχήμα 5. Είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη συνθετική ίνα (25 Mt που παράγονται ετησίως σε όλο τον κόσμο). Ένα μειονέκτημα του PET είναι ο υδρόφοβος χαρακτήρας του, με αποτέλεσμα η επιφάνειά του να διαβρέχεται ανεπαρκώς. Κατά συνέπεια, συναντώνται δυσκολίες κατά τις διαδικασίες φινιρίσματος και βαφής των ινών από PET. Επιπλέον, οι ίνες PET με υδρόφοβες επιφάνειες αναπτύσσουν ηλεκτροστατικά φορτία και είναι επιρρεπείς σε βακτηριακή προσβολή. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η τροποποίηση της επιφάνειας του PET για εφαρμογή στις διάφορες βιομηχανίες, όπως είναι η κλωστοϋφαντουργία, η βιοϊατρική, η μικροηλεκτρονική και η βιομηχανία συσκευασίας. Η τροποποίηση αυτή για αύξηση της υδροφιλικότητας μπορεί να συμβεί με χημικό τρόπο (π.χ. κατεργασία με άλκαλι, χάραξη), αλλά και με κατεργασία με πλάσμα (Ronkvist et al. 2009). Ωστόσο η πιο ενδιαφέρουσα μέθοδος επιφανειακής τροποποιήσης ινών και υφασμάτων από PET είναι η ενζυμική υδρόλυση, με στόχο να περιοριστούν τα μειονεκτήματα των προϊόντων αυτών, όπως η μικρή ελαστικότητα, η υψηλή υδροφοβικότητα, η χαμηλή αντοχή στο χνούδιασμα (pilling), η συγκέντρωση ηλεκτροστατικών φορτίων, η δυσκολία πλυσίματος και η μικρότερη άνεση στην ένδυση, λόγω χαμηλής υδροφιλικότητας (Alisch et al. 2004; Vertommen et al. 2005). Όπως και στην

περίπτωση των πολυαμιδικών ινών, η χημική τροποποίηση αυξάνει την υδροφιλικότητα, αλλά την ίδια στιγμή μειώνει την ποιότητα των ινών PET, υποβαθμίζοντας την αντοχή τους (Zeronian and Collins 1989; Vertommen et al. 2005). Η ενζυμική τροποποίηση, εκτός από το φιλικό προς το περιβάλλον χαρακτήρα, πλεονεκτεί έναντι της χημικής, διότι διατηρεί τη μηχανική σταθερότητα, όπως και το φυσικό χρώμα του πολυμερούς. Επιπλέον, η ελεγχόμενη ενζυμική τροποποίηση της επιφάνειας των ινών PET διευκολύνει την επικόλληση κατιοντικών μορίων, όπως είναι οι βασικές βαφές ή την απευθείας εφαρμογή επιστρώσεων για την παραγωγή υφασμάτων, χρησιμοποιώντας μικρότερη ποσότητα μέσου σκλήρυνσης/διασταύρωσης (coupling agents) (Yoon et al. 2002; Khoddami et al. 2001). Επιπρόσθετα πλεονεκτήματα της ενζυμικής μεθόδου είναι το γεγονός πως πραγματοποιείται υπό ήπιες συνθήκες, με χαμηλές απαιτήσεις ενέργειας και με μη δαπανηρό εξοπλισμό. Ακόμη, η ενζυμική υδρόλυση περιορίζεται στην επιφάνεια του υλικού, λόγω του μεγάλου μεγέθους του ενζύμου και της ασυμβατότητας του με το πολυμερικό υπόστρωμα, φορτίζοντας έτσι την επιφάνεια, χωρίς να επηρεάζονται οι ιδιότητες της κύριας μάζας του πολυμερούς (Ronkvist et al. 2009). Η υψηλή κρυσταλλικότητα μπορεί να επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα των ενζύμων να υδρολύουν το PET, όπως έχει αποδειχθεί για ένζυμα από *F. solani* και από *T. fusca*, καθώς και για μία πειραματική πολυεστεράση από την Danisco (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008).



Σχήμα 5: Χημική δομή PET

Επεξεργασία υφασμάτων PET με λιπάσες αύξησε την υδροφιλικότητα και την απορροφητικότητα τους, ενώ διατηρήθηκε η αντοχή του υλικού (Hsieh and Cram 1998; Hasan et al. 2006). Αύξηση της υδροφιλικότητας και του χρόνου ζωής της βαφής παρατηρήθηκε κατά την ενζυμική τροποποίηση υφασμάτων PET με πολυεστεράσες (Yoon et al. 2002; Alisch et al. 2004). Εκτός από τις λιπάσες και τις εστεράσες έχουν χρησιμοποιηθεί και οι κουτινάσες οι οποίες μπόρεσαν να τροποποιήσουν την επιφάνεια ινών PET (Calado et al. 2004; O'Neill and Cavaco-Paulo 2004; Alisch-Mark et al. 2006; Nimchua et al. 2007; Ronkvist et al. 2009). Πειραματικές δοκιμές έδειξαν πως η κατεργασία του PET με κουτινάσες από *Pseudomonas*

mendocina, F. solani, και *T. fusca* οδήγησε σε αυξημένη υδροφιλικότητα στην επιφάνεια με συνέπεια τη δέσμευση κατιονικής βαφής (cationic dye binding) (Ronkvist et al. 2009). Οξειδωτικά ένζυμα, όπως οι λακκάσες, έχει αναφερθεί ότι τροποποιούν την επιφάνεια ινών PET, χωρίς παρ' όλα αυτά να είναι γνωστός ο μηχανισμός της διεργασίας αυτής (Miettinen-Oinonen et al., 2002).

Οι Ronkvist et al. (2009) μελέτησαν την καταλυτική δραστικότητα κουτινασών από τους μύκητες *H. insolens* (*Hi*C) και *F. solani* (*Fs*C) και το βακτήριο *P. mendocina* (*Pm*C) σε χαμηλής κρυσταλλικότητας 7 % (low-crystallinity, lc) και διαξονικά προσανατολισμένες/υψηλής κρυσταλλικότητας 35 % (biaxially oriented, bo) μεμβράνες PET ως μοντέλα-υποστώματα. Όπως ήταν αναμενόμενο η αύξηση της κρυσταλλικότητας επηρεάζει αρνητικά την ικανότητα της κουτινάσης να δράση επί του υποστρώματος. Σκοπός των πειραμάτων τους ήταν να διασαφηνιστεί η επίδραση του pH και της θερμοκρασίας στην ενζυμικά καταλυόμενη αποικοδόμηση-υποβάθμιση του lcPET, ενώ από αυτή τη μελέτη επιβεβαιώθηκε και η κινητική της υδρόλυσης, με μετρήσεις του pH κατά την απελευθέρωση οξέος από την σχάση των εστερικών δεσμών. Ακόμη έγιναν μετρήσεις της απώλειας μάζας και συσχέτιση των αποτελεσμάτων από την απώλεια βάρους με την υποβάθμιση των μεμβρανών. Από τα αποτελέσματα της έρευνας προέκυψε πως οι κουτινάσες *Pm*C και *Fs*C έχουν την υψηλότερη και τη χαμηλότερη συγγένεια, αντίστοιχα, με το lcPET. Επιπλέον, ο αρχικός ρυθμός υδρόλυσης του HiC είναι 7 φορές μεγαλύτερος από αυτούς των *Pm*C και *Fs*C. Η πολύ καλή δραστικότητα της κουτινάσης *Hi*C στην υδρόλυση του lcPET οφείλεται στην ικανότητά της να παραμείνει ενεργή στους 70 ^{o}C, θερμοκρασία λίγο κατώτερη της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης T_g του PET. Σε αυτή τη θερμοκρασία η *Hi*C επωφελείται από την κινητικότητα των αλυσίδων στην άμορφη φάση, αυξάνοντας έτσι την προσβασιμότητα της *Hi*C στις εστερικές ομάδες του PET.

Οι Vertommen et al. (2005) μελέτησαν τη δράση δύο λιπολυτικών ενζύμων, της κουτινάσης από το μύκητα *F. solani pisi* και της λιπάσης A από τη ζύμη *Candida antarctica,* σε πολυμερικά υποστρώματα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η κουτινάση παρουσιάζει σημαντική υδρολυτική δράση στις άμορφες περιοχές του PET. Από την άλλη, η λιπάση A δεν φαίνεται να υδρόλυσε ούτε κρυσταλλικές ούτε άμορφες περιοχές του PET, κάτι που έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες.

Οι Djordjevic et al. (2005) ερεύνησαν και αυτοί την ενζυμική τροποποίηση πολυεστερικών ινών με χρήση λιπασών. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου.

Οι λιπάσες που χρησιμοποιήθηκαν (σε μορφή πούδρας) είναι η Lipomod 338P από το μύκητα *Penicillium roqueforti*, η Lipomod 224P από πάγκρεας χοίρου και η Lipomod 29P από πάγκρεας χοίρου ή από τη ζύμη *Candida cylindracea* και αποτελούν εμπορικά προϊόντα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων τους έδειξαν πως η ενζυμική τροποποίηση με διαφορετικές λιπάσες ήταν επιτυχείς, καθώς βελτιώθηκαν οι ιδιότητες των υλικών, όπως η διαπερατότητα του νερού, η απορροφητικότητα, ενώ οι μηχανικές ιδιότητες παρέμειναν ικανοποιητικές, καθώς η δράση των ενζύμων δεν προκάλεσε σημαντική αναδιοργάνωση των επιφανειακών στρωμάτων των ινών. Μελέτες έχουν δείξει ότι το ένζυμο αποικοδομεί την επιφάνεια του PET σε δύο στάδια: αρχικά παραγματοποιείται υδροφοβική απορρόφηση του ενζύμου στην επιφάνεια του πολυεστέρα και έπειτα ακολουθεί υδρόλυση των εστερικών δεσμών (τα ένζυμα δεν μπορούν να "εισβάλλουν" στην κύρια μάζα του πολυμερούς).

Οι Lee και Song (2010) μελέτησαν την ενζυμική υδρόλυση υφασμάτων PET με χρήση λιπάσης από τη ζύμη *C. antarctica* και μιας κουτινάσης. Η ενζυμική δράση έλαβε χώρα υπό ελεγχόμενες συνθήκες για διάφορες τιμές pH, θερμοκρασίας, συγκέντρωσης ενζύμου και χρόνου αντίδρασης, με αύξηση της ανάκτηση υγρασίας κατά 2.2 % για τη λιπάση και κατά 4.7 % για την κουτινάση. Οι τιμές αυτές ανάκτησης υγρασίας είναι σημαντικά υψηλότερες από αυτές που έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες. Επίσης έγινε χρήση ενός μη ιονικού επιφανειοδραστικού, του Triton X-100, που προστέθηκε στο διάλυμα του ενζύμου για να βελτιώσει την υδροφιλικότητα των υφασμάτων από PET. Η κατεργασία με κουτινάση υπό την παρουσία Triton X-100 βελτίωσε την ανάκτηση υγρασίας. Ωστόσο, το Triton X-100 απεδείχθη αναποτελεσματικό ως βοηθητικός καταλύτης για τη δράση της λιπάσης.

Οι Eberl et al. (2009) μελέτησαν την υδρόλυση PET υφασμάτων και μεμβρανών και του υποστρώματος τερεφθαλικού δις-βενζοϋλοξυαιθυλεστέρα (3PET) με τη βοήθεια μιας λιπάσης από το μύκητα *Thermomyces lanuginosus* (η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37 ^{o}C) και κουτινασών από τον οργανισμό *T. fusca* (αντίδραση στους 60 ^{o}C) και το μύκητα *F. solani* (αντίδραση στους 37 ^{o}C). Λόγω διεπιφανειακής ενεργοποίησης της λιπάσης με την παρουσία του Triton X-100, παρατηρήθηκε επταπλάσια αύξηση των προϊόντων υδρόλυσης που απελευθερώθηκαν από το 3PET. Η παρουσία του πλαστικοποιητή *N,N*-διαιθυλ-2-φαινυλακεταμιδίου (DEPA), οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού υδρόλυσης των ημι-κρυσταλλικών PET φιλμ και υφασμάτων που κατεργάστηκαν με λιπάση ή κουτινάση. Ο σχηματισμός νέων πολικών ομάδων οδήγησε σε αυξημένη ικανότητα βαφής με πρόσθετη

αύξηση στο βάθος χρώματος κατά 130 % και 300 % για την κουτινάση και τη λιπάση, αντίστοιχα, υπό την παρουσία του πλαστικοποιητή.

Εκτός από την επιφανειακή τροποποίηση, τα ένζυμα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο για την αποικοδόμηση του PET στις περιπτώσεις που η ανακύκλωση του δεν εξυπηρετεί τα συμφέροντα της βιομηχανίας.

1.3.3.4 Μέθοδοι ανάλυσης – ποσοτικοποίησης ενζυμικής τροποποίησης

Οι αλλαγές στις επιφανειακές ιδιότητες μπορούν εύκολα να ποσοτικοποιηθούν με απλές μεθόδους, όπως είναι η μέτρηση τάσεως ή οι μετρήσεις υδροφιλικότητας, όπως η γωνία επαφής (WCA) (Lee and Song 2010; Herrero Acero et al. 2011). Ωστόσο, είναι πολύ πιο δύσκολο να ποσοτικοποιηθούν οι αντίστοιχες χημικές αλλαγές στην επιφάνεια του πολυμερούς, όπως για παράδειγμα η αύξηση των καρβοξυλομάδων. Εάν οι ομάδες νιτριλίου του PAN μετατρέπονται στα αντίστοιχα οξέα, η ταυτόχρονη απελευθέρωση της αμμωνίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ποσοτικοποίηση της βιομετατροπής. Στην περίπτωση των PA και των PAT η υδρόλυση οδηγεί στη διαλυτοποίηση των μικρότερων αλυσίδων που προκύπτουν σταδιακά οι οποίες μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Sulaiman et al. 2012; Ye et al. 2013). Ωστόσο, ο στόχος της ενζυμικής επιφανειακής κατεργασίας δεν είναι να ελευθερωθούν αυτά τα διαλυτά ολιγομερή και ως εκ τούτου να υποβαθμιστεί το πολυμερές. Αντ' αυτού, η περιορισμένη υδρόλυση στη μέση της πολυμερικής αλυσίδας είναι επιθυμητή επειδή οδηγεί στην παραγωγή νέων λειτουργικών ομάδων. Η παραγωγή αυτών των λειτουργικών ομάδων (π.χ. αμινομάδες, καρβοξυλομάδες) αποτελεί μία ακόμη δυνατότητα ποσοτικοποίησης της επιφανειακής υδρόλυσης με βάση την αλλαγή του χρώματος κατάλληλων δεικτών, όπως είναι το 2,4,6-τρινιτροβενζυλοσουλφονικό οξύ ή με βάση την πρόσδεση φθορίζουσων ουσιών, όπως το 2-βρωμομεθυλ-ναφθαλένιο (Heumann et al. 2006b; Donelli et al. 2009).

Ένα ακόμη ισχυρό εργαλείο για την ποσοτικοποίηση των επιφανειακών χημικών αλλαγών που προκύπτουν με ενζυμική τροποποίηση των PAN, PET και του πολυπροπυλενίου είναι η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) (Eberl et al. 2009; Acero et al. 2011; Wu et al. 2014). Εκτός από την XPS, η φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance, FTIR-ATR) και η ηλεκτρονική μικροσκοπία

σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση της επιφανειακής υδρόλυσης των PET και PA 6.6 (Donelli et al. 2009; Lee and Song 2010; Gashti et al. 2013; Du et al. 2014). Ακόμη η μέθοδος NMR έχει χρησιμοποιηθεί προς επιβεβαίωση της ενζυμικής μετατροπής του PAN σε πολυακρυλικό οξύ κατά τη διάρκεια βακτηριακής ανάπτυξης επί αυτού του υποστρώματος (Fischer-Colbrie et al. 2006). Η angle-resolved XPS έχει χρησιμοποιηθεί για να μετρηθεί το πάχος των πρωτεϊνικών στρωμάτων (ένζυμο) στην επιφάνεια του PET, η οποία έχει οδηγήσει πολλές φορές σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων. Εξαιτίας αυτού είναι σημαντικό να προσμετράται η συμβολή της πρωτεϊνικής προσρόφησης κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατεργασίας σε μετρηθείσες τιμές των επιφανειακών ιδιοτήτων, όπως η υδροφιλικότητα. Οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν επίπονες διαδικασίες πλύσης με υπερήχους ή οργανικούς διαλύτες και συγκρίνουν τα αποτελέσματά τους με ελέγχους που έχουν πραγματοποιηθεί με παρεμποδισμένα ένζυμα (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008). Στον Πίνακα 1 γίνεται συγκεντρωτική ανασκόπηση των τεχνικών ανάλυσης και ποσοτικοποίησης ενζυμικής υδρόλυσης συνθετικών πολυμερών βάσει βιβλιογραφίας.

1.3.3.5 Μοντέλα υποστρώματα

Τα ένζυμα αποτελούν τρισδιάστατες μακρομοριακές, φιλικές προς το περιβάλλον, ενώσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ικανοποιητικά στην υδρόλυση συνθετικών πολυμερών, δρώντας ειδικότερα στην πολυμερική επιφάνεια, χωρίς να επηρεάζει τις ιδιότητες της κύριας μάζας του πολυμερούς. Τα ένζυμα που εφαρμόζονται για την υδρόλυση συνθετικών πολυμερών πρέπει να είναι ιδιαίτερα ενεργά ως προς το υπόστρωμα τους, λόγω του παραπάνω βαθμού δυσκολίας της αντίδρασης, λόγω ετερογένειας στο σύστημα. Μόνο λίγες γνωστές και/ή εμπορικά διαθέσιμες εστεράσες και λιπάσες ήταν σε θέση να υδρολύσουν το PET έχοντας την ίδια ενεργότητα στην υδρόλυση του βουτυρικού p-νιτροφαινυλεστέρα (Heumann et al. 2006b; Nimchua et al. 2007).

Προκειμένου να καταστεί η διαδικασία επιλογής του κατάλληλου ενζύμου περισσότερο αποτελεσματική, έχουν αναπτυχθεί μοντέλα υποστρωμάτων από ολιγομερή PET και PA βολικά προς ανάλυση, ενώ παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί νέες πολυεστεράσες και πολυαμιδάσες από τους μύκητες *Penicillium citrinum*, *Beauveria brongniartii* και *Beauveria bassiana* (Liebminger et al. 2007; Almansa et al. 2008). Όσον αφορά τη λειτουργικότητα της επιφάνειας, αυτά τα ένζυμα θα πρέπει να δρουν κατά μήκος της επιφανειακής πολυμερικής αλυσίδας και όχι μόνο

στα άκρα του. Αυτό οδηγεί στην αποφυγή απελευθέρωσης βραχείας αλύσου ολιγομερών και επιπλέον η υδροφιλικότητα που αποκτά το πολυμερές είναι περισσότερο ομοιόμορφα κατανεμημένη. Η επιλογή μικρού μήκους υποστρωμάτων-μοντέλων οδήγησαν στην ταυτοποίηση νέων υδρολασών κατάλληλων για βιομηχανικές εφαρμογές, όπως είναι η διεργασία επεξεργασίας και τροποποίησης του PET. Οι Heumann et al. (2006) κατασκεύασαν ένα μοντέλο υπόστρωμα του PET και ένα του PA, με στόχο την ανάπτυξη μιας γρήγορης και αποτελεσματικής μεθόδου ελέγχου σάρωσης και διαλογής κατάλληλων ενζύμων για την μετέπειτα τροποποίηση PET και PA επιφανειών από 56 ένζυμα που δοκιμάστηκαν συνολικά. Τα μοντέλα αυτά χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή για την επιλογή ενζύμων από την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας προς τροποποίηση PET και PA υφασμάτων.

1.3.3.6 Πρωτεϊνική Μηχανική

Ο τρόπος και βαθμός δράσης των ενζύμων επί των πολυμερικών υποστρωμάτων μπορεί να βελτιωθεί μέσω Πρωτεϊνικής Μηχανικής. Στη βιβλιογραφία έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες βελτίωσης της δράσης και των χαρακτηριστικών των ενζύμων, όπως είναι η θερμοσταθερότητά τους, αποσκοπώντας σε βελτιωμένο αποτέλεσμα υδρόλυσης των υποστρωμάτων στα οποία εφαρμόζονται.

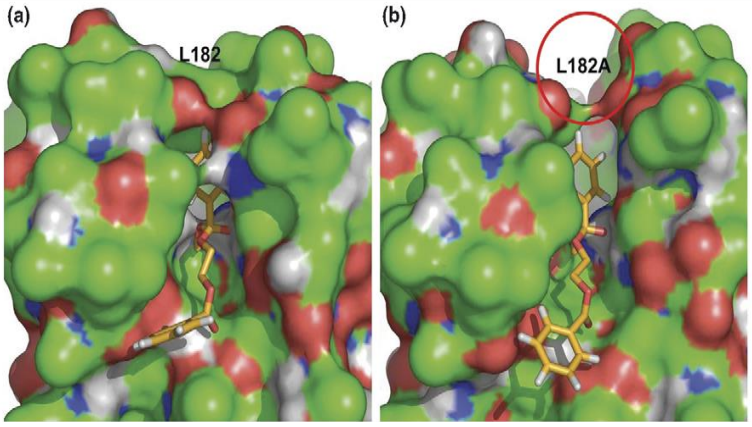
Η δομή και η λειτουργία των κουτινασών έχει μελετηθεί σε βάθος και με τη βοήθεια της Γενετικής Μηχανικής έχουν γίνει προσπάθειες βελτίωσης των ιδιοτήτων τους προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες εφαρμογές, όπως για παράδειγμα στα απορρυπαντικά για την αφαίρεση λιπαρών λεκέδων. Αρκετές τροποποιημένες κουτινάσες, από τις οποίες όλες διέθεταν μεγενθυμένα ενεργά κέντρα, παρουσίασαν έως και πέντε φορές υψηλότερη ενεργότητα ως προς το PET.

Για την υδρόλυση των πολυμερών εκτός από την αρχιτεκτονική των δραστικών θέσεων, παίζουν σημαντικό ρόλο και άλλα δομικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, όπως είναι οι περιοχές που είναι αναγκαίες για τη ρόφηση και την καθοδήγηση του ενζύμου κατά μήκος του υποστρώματος. Είναι τεκμηριωμένο πως οι περιοχές δέσμευσης της κυτταρίνης (cellulose-binding modules CBM) πληρούν τις προαναφερόμενες λειτουργίες στις κυτταρινάσες. Πιο πρόσφατα, μια CBM συνδέθηκε με την *C. antarctica* λιπάση B, η οποία χρησιμοποιείται για την επικάλυψη της κυτταρίνης με τον πολυεστέρα πολυκαπρολακτόνη μέσω διάνοιξης δακτυλίου (Gustavsson et al. 2003). Ομοίως, ένζυμα που υδρολύουν μικροβιακούς πολυεστέρες έχουν

περιοχές δέσμευσης με κύρια λειτουργία την υδρόλυση των πολυ(υδροξυ-αλκανοϊκοί εστέρες (polyhydroxyalkanoates, PHAs) (Hiraishi et al. 2006). Στη φύση, οι μύκητες έχουν επίσης αναπτύξει στρατηγικές, ώστε να καθοδηγούν τα ένζυμα στην επιφάνεια των υδρόφοβων πολυμερών. Ο μύκητας *A. oryzae* χρησιμοποιεί την πρωτεΐνη υδροφοβίνη RolA και την ακόμη πιο υδρόφιλη πρωτεΐνη HsbA ώστε να επιστρατεύσει υψηλά επίπεδα της κουτινάσης της (CutL1) στην επιφάνεια του συμπολυεστέρα πολυ(ηλεκτρικού-co-αδιπικού) βουτυλεστέρα (PBSA) (Takahashi et al. 2005; Ohtaki et al. 2006). Ακόμη απεδείχθη πως το RolA κινείται πλευρικά επί της επιφάνειας του PBSA. Αυτό που παραμένει προς μελέτη είναι η πιθανή επίδραση των δομικών στοιχείων που είναι υπεύθυνα για τους δεσμούς στις πολυεστεράσες και ο ρόλος που πιθανόν να παίζουν τα παρόμοια με την υδροφοβίνη μόρια στην ενζυμική υδρόλυση του PET.

Μια βακτηριακή κουτινάση από τον μικροοργανισμό *T. fusca*, με την ονομασία Tfu_0883, τροποποιήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση σημείου του γονιδίου που την κωδικοποιεί για την ενίσχυση της ενεργότητας της στο PET. Η αντικατάσταση ειδικών αμινοξέων στο ενεργό κέντρο ήταν μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη βελτίωση της ικανότητας της Tfu_0883 κουτινάσης να υδρολύει πολυεστερικές επιφάνειες (Silva et al. 2011).

Οι Araújo et al. (2007) τροποποίησαν γενετικά και μεγένθυναν το ενεργό κέντρο της κουτινάσης από το μύκητα *F. solani pisi* με αποτέλεσμα να αυξήσουν κατά πέντε φορές την ενεργότητα του ενζύμου και να βελτιώσουν τη σύνδεση με τις αλυσίδες του PET. Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση της κουτινάσης αυτής πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη μεγέθυνση των ενεργών κέντρων, ώστε να φιλοξενήσουν καλύτερα τα πολυμερικά υποστρώματα. Οι μεταλλάξεις προσαρμόστηκαν στην καταλυτική θέση για το PET, αυξάνοντας την συγγένεια της κουτινάσης με το υδρόφοβο υπόστρωμα και την ικανότητα της να το υδρολύει. Η μετάλλαξη I218A, που παρουσιάζεται στο Σχήμα 6, σχεδιάστηκε για να δημιουργήσει χώρο και η διπλή μετάλλαξη Q132A/T101A σχεδιάστηκε τόσο για να δημιουργήσει χώρο όσο και για να αυξήσει την υδροφοβικότητα. Η ενεργότητα του διπλά μεταλλαγμένου επί του διαλυτού υποστρώματος του εστέρα του π-νιτροφαινυλο βουτυρικού οξέος παρουσίασε διπλάσια αύξηση σε σύγκριση με τη μη μεταλλαγμένη κουτινάση, ενώ στο PET και οι δύο τροποποιημένες κουτινάσες που σχεδιάστηκαν παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερη απόδοση υδρόλυσης.



Σχήμα 6: Η τροποποίηση των αμινοξέων μιας κουτινάσης από *F. solani* (a) οδηγεί σε διεύρυνση της δραστικής θέσης και καλύτερη σύνδεση με το PET υπόστρωμα μοντέλο, όπως φαίνεται στον κόκκινο κύκλο στο (b). Η L182A μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για την καλύτερη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου 1,2-διβενζοϊκού αιθυλεστέρα και για την πέντε φορές υψηλότερη ενεργότητα ως προς το PET.

Ωστόσο, η Γενετική Μηχανική προσφέρει δυνατότητες που δεν έχουν αξιοποιηθεί πλήρως. Η σε βάθος κατανόηση της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με το υπόστρωμα σε σχέση με διάφορους παράγοντες όπως η ρόφηση, η κίνηση στην επιφάνεια του πολυμερούς και ο ρόλος των υδροφοβινών ή των περιοχών σύνδεσης καθίσταται αναγκαία και θα πρέπει να μελετηθεί εκτενώς στο μέλλον, ώστε να παρασκευαστούν ένζυμα με περαιτέρω αυξημένη ενεργότητα.

2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Μέχρι τον 19^{ο} αιώνα οι βαφές ήταν αποκλειστικά φυσικής προέλευσης και χρησιμοποιούνταν ευρέως, ωστόσο η κατασκευή συνθετικών πιο φθηνών βαφών άλλαξε τα δεδομένα στο εμπόριο και έχουν αποκτήσει μεγαλύτερη ζήτηση-κατανάλωση σε βιομηχανική κλίμακα. Παρ' όλ' αυτά, οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις, απόρροια της παρασκευής και χρήσης συνθετικών βαφών οδήγησε στην αναβίωση της ζήτησης φυσικών βαφών, καθότι παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η βιοαποικοδομησιμότητα και η βιοσυμβατότητα (Kamel et al. 2005). Τα τελευταία χρόνια οι ερευνητές έχουν εστιάσει την προσοχή τους στην παραγωγή μικροβιακών βαφών, για χρήση ως φυσικές χρωστικές, και στην βελτιστοποίηση του μέσου ανάπτυξης ώστε να ελαχιστοποιείται το κόστος παραγωγής και να καθίσταται βιώσιμη η διεργασία για τη βιομηχανία (Nagia and EL-Mohamedy 2007).

2.2 Ταξινόμηση Χρωστικών

Οι χρωστικές ταξινομούνται είτε ως οργανικές/ανόργανες ή ως φυσικές/συνθετικές. Παραδείγματα φυσικών χρωστικών αποτελούν οι ανθοκυανίνες (μπλε-κόκκινες), το καροτένιο (κίτρινο-κόκκινο), οι χλωροφύλλες (πράσινες) και οι ταννίνες (καφέ-κόκκινες), κάποιες από τις οποίες φαίνονται στο Σχήμα 7 (Ahmad et al. 2012a). Τα καροτενοειδή είναι τετρατερπενοειδή τα οποία συντίθενται σε φυτά και άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, όπως επίσης και σε μη φωτοσυνθετικά βακτήρια, ζύμες και μύκητες. Η κόκκινη και κίτρινη απεικόνιση του φθινοπωρινού φυλλώματος οφείλεται στην έκθεση των ανθοκυανίνων, ως αποτέλεσμα της αποσύνθεσης των πράσινων χρωστικών χλωροφύλλης και συνεκδοχικά της αλλοίωσης του φαινομένου επικάλυψης (masking effect). Όλες οι βιολογικές χρωστικές επιλεκτικά απορροφούν συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός και αντανακλούν άλλα. Το απορροφημένο φως μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το φυτό για την τροφοδότηση χημικών αντιδράσεων, ενώ τα ανακλώμενα μήκη κύματος φωτός καθορίζουν το χρώμα της χρωστικής που αντιλαμβάνεται το ανθρώπινο μάτι. Οι χρωστικές επίσης εξυπηρετούν στην έλξη επικονιαστών.

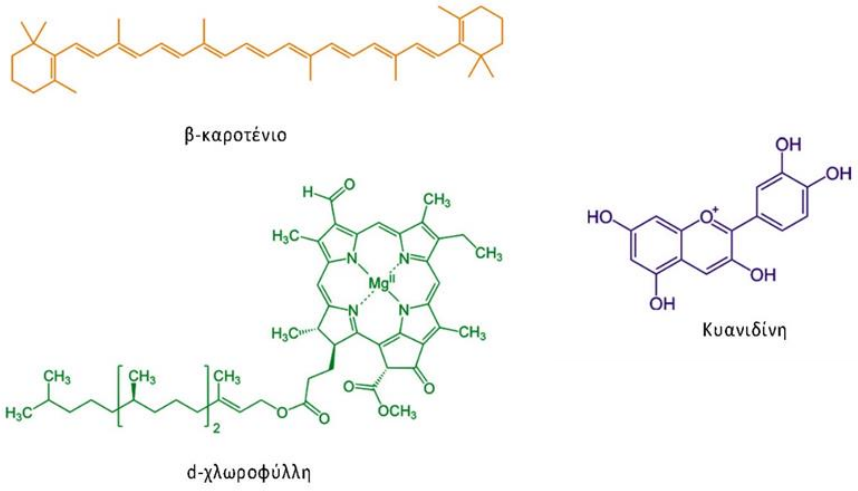
Τα καροτενοειδή μπορεί να είναι κόκκινα, πορτοκαλί ή κίτρινα και λειτουργούν ως βοηθητικές χρωστικές ουσίες στα φυτά, συμβάλλοντας στην τροφοδότηση της φωτοσύνθεσης συλλέγοντας μήκη κύματος φωτός που δεν απορροφώνται εύκολα από τη χλωροφύλλη. Τα πιο

γνωστά καροτενοειδή είναι το καροτένιο (πορτοκαλί χρωστική στα καρότα), η λουτεΐνη (κίτρινη χρωστική στα φρούτα και στα λαχανικά) και το λυκοπένιο (κόκκινη χρωστική στις ντομάτες) (Richelle et al. 2002). Τα καροτενοειδή έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και κάνουν καλό στην ανθρώπινη όραση. Ορισμένα καροτενοειδή αποτελούν συστατικά των χλωροπλαστών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των φυτών από φωτοοξείδωση (Demmig-Adams and Adams 2002).

Το λυκοπένιο συμβάλλει στην προστασία από παθολογίες, όπως είναι η καρδιαγγειακή νόσος, η ηπατική ινογένεση και ορισμένοι τύποι καρκίνου όπως ο προστάτης, ο γαστρεντερικός και ο επιθηλιακός καρκίνος (Clinton 2009).

Η χλωροφύλλη είναι η βασική χρωστική στα φυτά. Η χλωροφύλλη αποτελεί μία πορφυρίνη που απορροφά κίτρινα και μπλε μήκη κύματος φωτός και αντανακλά το πράσινο. Όλα τα φυτά ξηράς και τα πράσινα φύκη διαθέτουν δυο μορφές αυτής της χρωστικής την χλωροφύλλη α και την χλωροφύλλη β. (Goodwin 1965).

Οι ανθοκυανίνες αποτελούν υδατοδιαλυτές φλαβονοειδείς χρωστικές με κόκκινο έως μπλε χρώμα αναλόγως της τιμής του pH. Οι ανθοκυανίνες συναντώνται στους ιστούς των ανώτερων φυτών, προσφέροντας χρώμα σε στελέχη, ρίζες, λουλούδια και φρούτα. Ακόμη στις ανθοκυανίνες οφείλεται το μοβ χρώμα του κάτω μέρους των τροπικών φυτών, όπως είναι το *Tradescantia zebrina* σε αυτά τα φυτά οι ανθοκυανίνες δεσμεύουν το φως που έχει διαπεράσει τα φύλλα και το αντανακλά πίσω προς τις περιοχές που έχουν χλωροφύλλη, ώστε να μεγιστοποιείται η αξιοποίηση του φωτός (Goodwin 1965).



Σχήμα 7: Φυσικές χρωστικές

Οι βεταλαίνες (betalains) παράγωγα ινδόλης που συντίθενται από την τυροσίνη, αποτελούν υδατοδιαλυτές κόκκινες και κίτρινες χρωστικές που συναντώνται μόνο στο γένος Caryophyllales -συμπεριλαμβανομένου των ειδών cactus και amaranth- και δεν συνυπάρχουν σε φυτά που διαθέτουν ανθοκυανίνες. Οι βεταλαίνες είναι υπεύθυνες για το βαθύ κόκκινο χρώμα των παντζαριών και χρησιμοποιούνται εμπορικά ως χρωστικές ουσίες στα τρόφιμα (Ahmad et al. 2012a).

Το σαφράν που είναι γνωστό και ως CI φυσικό κίτρινο 6, κροκίνης και κροκετίνη αποτελεί το αποξηραμένο στίγμα του *Crocus sativus*, ένα ενδημικό φυτό στην Ανατολή, αλλά επίσης διαδεδομένο στην Βόρεια Αφρική, την Ισπανία, το Ιράν και τη Γαλλία. Το σαφράν είναι κοκκινωπή, καφέ ή χρυσοκίτρινη σκόνη με ελαφρώς πικρή γεύση, είναι σταθερή ενάντια στο φως, στην οξείδωση, στις μικροβιολογικές επιθέσεις καις τις αλλαγές pH. Για την παραγωγή 1 kg χρωστικής χρειάζονται τα στίγματα περίπου 165000 ανθών (Ahmad et al. 2012a).

Οι μελανοϊδίνες προσλαμβάνονται μέσω κατανάλωσης καφέ επεξεργασμένων τροφίμων. Οι διατροφικές και φυσιολογικές επιδράσεις των μελανοϊδινών έχουν διερευνηθεί ευρέως. Οι μελανοϊδίνες που προέκυψαν από D-γλυκόζη και γλυκίνη είχαν κίτρινο, κόκκινο και μπλε χρώμα (Kato and Hayase 2002).

Οι περισσότερες χρωστικές (εκτός από τις κίτρινες) περιέχουν άτομα N ή O, ή και τα δυο και οι περισσότερες από αυτές είναι μεγάλα μόρια με μοριακά βάρη (Mw): 200 για τις ανθρακινόνες, 300 για τις ανθοκυανιδίνες, 400 για τις βεταλαίνες, 500 για τα καροτενοειδή και 800 για τις χλωροφύλλες (Hendry and Houghton 1996). Οι βιολογικές βαφές μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι μεγάλες δομικές κατηγορίες, τις τετραπυρρόλες, τα τετρατερπενοειδή, τις κινίνες, τις O-ετεροκυκλικές, N-ετεροκυκλικές και τις μεταλλο-πρωτεΐνες.

Οι φυσικές ανόργανες χρωστικές, που προέρχονται κυρίως από ορυκτές πηγές, χρησιμοποιούνται ως χρωστικές ουσίες από τους προϊστορικούς χρόνους και λίγες από αυτές, κυρίως οξείδια του σιδήρου, εξακολουθούν να βρίσκουν χρήση και σήμερα. Το χρώμα των ανόργανων χρωστικών πηγάζει από τις ηλεκτρονιακές μεταβάσεις (electronic transitions) που ποικίλλουν στη φύση και διαφέρουν από εκείνες που είναι υπεύθυνες για τις οργανικές χρωστικές ουσίες. Οι ανόργανες χρωστικές γενικά εμφανίζουν υψηλή εγγενή αδιαφάνεια, μια ιδιότητα που αποδίδεται στον υψηλό δείκτη διάθλασης, ως αποτέλεσμα της συμπαγής διάταξης των ατόμων στην κρυσταλλική τους δομή. Μερικά παραδείγματα φυσικών ανόργανων

χρωστικών αποτελούν τα: διοξείδιο του τιτανίου, το μαύρο του άνθρακα, τα σουλφίδια του καδμίου και χρωμικές ενώσεις μολύβδου (Ahmad et al. 2012).

2.3 Χρήση φυσικών χρωστικών

Μέχρι τις αρχές του 19ου αιώνα, οι φυσικές χρωστικές έβρισκαν ευρεία χρήση σε πολλές εφαρμογές, όπως στη βαφή φυσικών κλωστοϋφαντουργικών ινών (μάλλινων, βαμβακερών και μεταξωτών), γουνών και δερμάτινων ειδών. Ακόμη οι βαφές αυτές χρησιμοποιούνταν για την χρώση καλλυντικών προϊόντων και την παραγωγή μελανιών, νερομπογιών και χρωμάτων ζωγραφικής (Cristea and Vilarem 2006). Το 1856 ο William Perkin συνέθεσε την μοβ βαφή ανιλίνης (mauvine) και έκτοτε έγινε στροφή στην παραγωγή και χρήση συνθετικών βαφών, οι οποίες είναι πιο οικονομικές (Zollinger 2003). Οι συνθετικές βαφές βρίσκουν εφαρμογή στην κλωστοϋφαντουργία, στη βυρσοδεψία, στην παραγωγή χάρτου, στην τεχνολογία τροφίμων, στις βαφές μαλλιών (Forgacs et al. 2004). Οι αζω-βαφές αποτελούν τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες συνθετικές χρωστικές. Οι συνθετικές βαφές παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως η υψηλή σταθερότητα στο φως, στο οξυγόνο και στο pH, η ομοιομορφία χρώματος, το χαμηλό ποσοστό μικροβιολογικής επιμόλυνσης και το χαμηλότερο κόστος παραγωγής (Alves et al. 2008). Στη φαρμακευτική βιομηχανία γίνεται χρήση συνθετικών βαφών σε πολλά φαρμακευτικά προϊόντα, ώστε να γίνουν πιο ελκυστικά, πιο αναγνωρίσιμα, και σε ορισμένες περιπτώσεις να αποκτήσουν μία αδιαφανής επίστρωση που σταθεροποιεί τα φωτοευαίσθητα συστατικά του φαρμάκου (Jaworska et al. 2005).

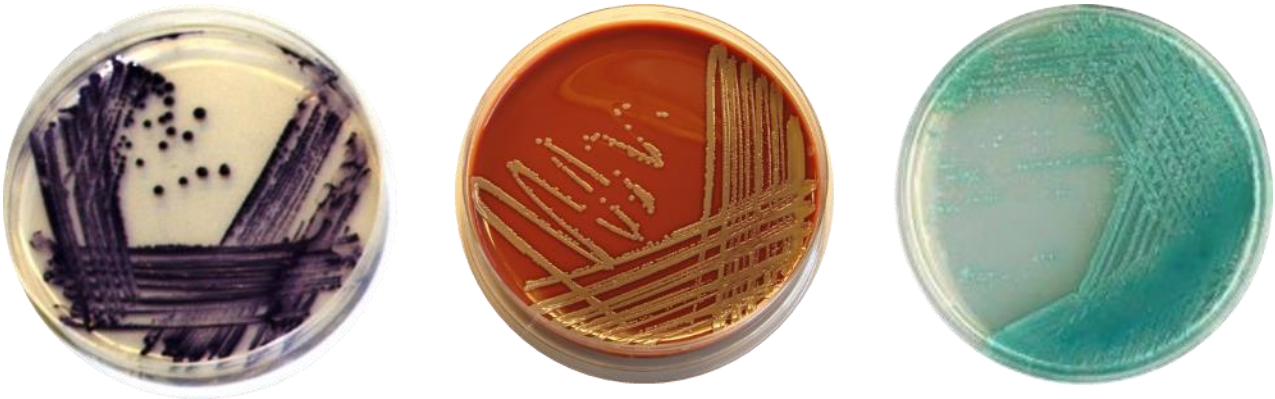
Συμπληρωματικά, η χρήση συνθετικών βαφών στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί μια φτηνή λύση σε σχέση με τις φυσικές βαφές, ωστόσο τίθενται θέματα υγείας και ασφάλειας που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να εξετάζονται. Ενδεικτικά οι βαφές tartrazine (E 102), cochineal red (E 124) και sunset yellow (E 110) μπορεί να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις ιδίως σε ανθρώπους που είναι αλλεργικοί στην ασπιρίνη και άλλους μη στεροειδείς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες, ή σε ανθρώπους που πάσχουν από άσθμα (Rowe and Rowe 1994). Ακόμη οι βαφές βενζιδίνης μπορεί να προκαλέσουν καρκίνο του εντέρου, ενώ το μαύρο του άνθρακα που χρησιμοποιείται σαν μελάνι εκτύπωσης είναι πιθανώς καρκινογόνο. Λαμβάνοντας τα προαναφερόμενα υπόψη η αποκομιδή/απόρριψη των βιομηχανικών αποβλήτων που περιέχουν τοξικές, καρκινογόνες και μη βιοαποικοδομήσιμες συνθετικές βαφές στο υδατικό σύστημα χωρίς να έχει προηγηθεί ειδική επεξεργασία αποτελεί σημαντική πηγή ρύπανσης των

υδάτων (Chung et al. 1992). Παράδειγμα τέτοιων βαφών είναι οι αζω-βαφές που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην κλωστοϋφαντουργία, στα τρόφιμα, στα φάρμακα, κ. ά. Οι αζω-βαφές διατηρούν το χρώμα και την δομική τους ακεραιότητα ύστερα από έκθεση στο φως, το έδαφος και το μικροβιακό φορτίο και αποτελούν ανθεκτικό ρύπο (Eichlerová et al. 2006). Προς επίλυση αυτών των προβλημάτων γίνονται πολλές R&D μελέτες για την διαχείριση των υγρών αποβλήτων, ωστόσο τεχνικές όπως η απορρόφηση, η καταβύθιση, η χημική κατεργασία και η φωτοαποικοδόμηση είναι απαιτητικές, χρονοβόρες και οικονομικά δαπανηρές διεργασίες χωρίς να είναι αποτελεσματικές και βιώσιμες. Επίσης η χρήση αναερόβιων βακτηρίων για τον αποχρωματισμό των αζω-βαφών δεν ενδείκνυται, καθώς η διαδικασία βακτηριακής αναγωγής των βαφών οδηγεί στη δημιουργία αρωματικών αμινών που είναι καρκινογόνες και ως επί το πλείστων πιο τοξικές από τις αρχικές αζω-βαφές (Wong and Yuen 1996; Hu 2001).

2.4 Παραγωγή Χρωστικών από Μικροοργανισμούς

2.4.1 Χρωστικές από βακτήρια

Πληθώρα χρωστικών έχουν απομονωθεί από βακτηριακά συστήματα. Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται η παραγωγή χρωστικών από καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλίο. Ένα παράδειγμα βακτηριακής βαφής αποτελεί η βιολασεΐνη, μία βιολετί χρωστική που παράγεται από διάφορα βακτήρια, όπως τα *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Alteromonas luteoviolacea, Chromobacterium violaceum* και *Janthinobacterium lividum* (Laatsch et al. 1984; Yada et al. 2008a; Rodrigues et al. 2012; Rahul et al. 2015). Ακόμη έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία η παραγωγή από τα βακτηριακά στελέχη *Collimonas*, *Duganella* και *Microbulbifer sp.* (Matz et al. 2008; Wang et al. 2009; Hakvåg et al. 2009).



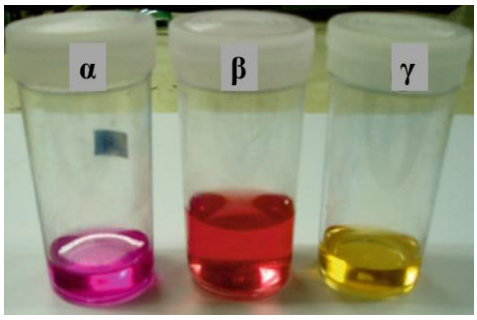
Σχήμα 8: Καλλιέργεια *J. lividum* με παραγωγή βιολασείνης, *S. Aureus* με παραγωγή σταφυλοξανθίνης, *P aeruginosa* με παραγωγή πυοκυανίνης (από αριστερά προς τα δεξιά).

Ένα άλλο παράδειγμα βακτηριακής βαφής αποτελούν τα καροτενοειδή στα οποία αποδίδεται το χρυσαφί χρώμα του παθογόνου *Staphylococcus aureus*. Αυτό το βακτήριο παράγει πολλαπλές καροτενοειδείς χρωστικές μέσω ενός γνωστού βιοσυνθετικού μονοπατιού από δυο μόρια τρυπτοφάνης που ολοκληρώνεται με την παραγωγή της χρυσαφί σταφυλοξανθίνης ως κύριο προϊόν και του κίτρινου 4040-διαπονευροσπορενίου ως δευτερεύον προϊόν (Wieland et al. 1994; Pelz et al. 2005).

Η σταφυλοξανθίνη αποτελείται από μία αλυσίδα πολυενίου με C30 με εναλλασσόμενους μονούς και διπλούς δεσμούς. Οι εναλλασσόμενοι αυτοί δεσμοί απορροφούν την περίσσεια ενέργειας από τα δραστικά είδη οξυγόνου, ROS. Η βιολασεΐνη έχει μία ομάδα υδροξυλίου και τρεις ομάδες N-H, οι οποίες καθορίζουν και την αντιοξειδωτικής δράση (Cao et al. 2007).

Η προδιγιοσίνη (5-[(3-μεθοξυ-5-πυρρολ-2-υλιδεν-πυρρολ-2-υλιδεν)μεθυλ]-2-μεθυλ- 3-πεντυλ-1Η-πυρρόλη) αποτελεί ένα τυπικό αλκανοειδές που παράγεται ως δευτερογενής μεταβολίτης και μπορεί να πάρει διαφορετικές αποχρώσεις συναρτήσει του pH, όπως φαίνεται στο Σχήμα 9. Ακόμη στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται η δομή της προδιγιοσίνης, μεταξύ άλλων μικροβιακών χρωστικών. Υπάρχουν διάφορες προδιγιοσίνες που έχουν μελετηθεί για φαρμακευτική χρήση, όπως οι ενδεκυλπροδιγιοσίνη, μετακυκλοπροδιγιοσίνη, ροσκοφυλίνη και νονυλπροδιγιοσίνη, οι οποίες είναι γνωστές ως δυνητικοί αντιβακτηριακοί, αντιαλλεργικοί, αντικαρκινικοί, κυτταροτοξικοί και ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες (Song et al. 2006). Μια ευρεία ποικιλία βακτηριακών ειδών (taxa) συμπεριλαμβανομένων των αρνητικών κατά Gram ραβδοειδών, όπως τα *S. rubidaea, Vibrio gazogenes, Alteromonas rubra, Rugamonas rubra*, και των θετικών κατά Gram ακτινομυκητών, όπως τα *Streptoverticillium rubrireticuli* και *Streptomyces longisporus Ruber* σχηματίζουν προδιγιοσίνη και τα παράγωγά της. Ενδεικτικά, το βακτήριο *R. rubra* όταν αναπτύσσεται σε ορισμένα θρεπτικά μέσα παράγει τόση προδιγιοσίνη που, καθώς πέφτει το pH, η χρωστική καταβυθίζεται και οι αποικίες από κόκκινες γίνονται βαθύ καφέ με μία πράσινη μεταλλική λάμψη κάτω από το ανακλώμενο φως. Σε αυτό το στάδιο οι αποικίες δεν είναι πια βιώσιμες (Ahmad et al. 2012a). Άλλες χρωματισμένες αποικίες που έχουν παρατηρηθεί στο έδαφος, στο νερό ή σε ιατρικά εργαστήρια είναι αυτές του γένους *Pseudomonas,* όπως οι μπλε-πράσινες αποικίες του *Pseudomonas aeruginosa* ή οι κίτρινες φθορίζουσες αποικίες του *Pseudomonas fluorescens*. Ένα παράδειγμα μιας υδατοδιαλυτής, μη φθορίζουσας μπλε-πράσινης χρωστικής που παράγεται από το *P. aeruginosa* είναι η πυοκυανίνη που κρυσταλλώνεται σαν μπλε βελόνες και μπορεί να επηρεάζει την αναπνοή. Οι κίτρινες

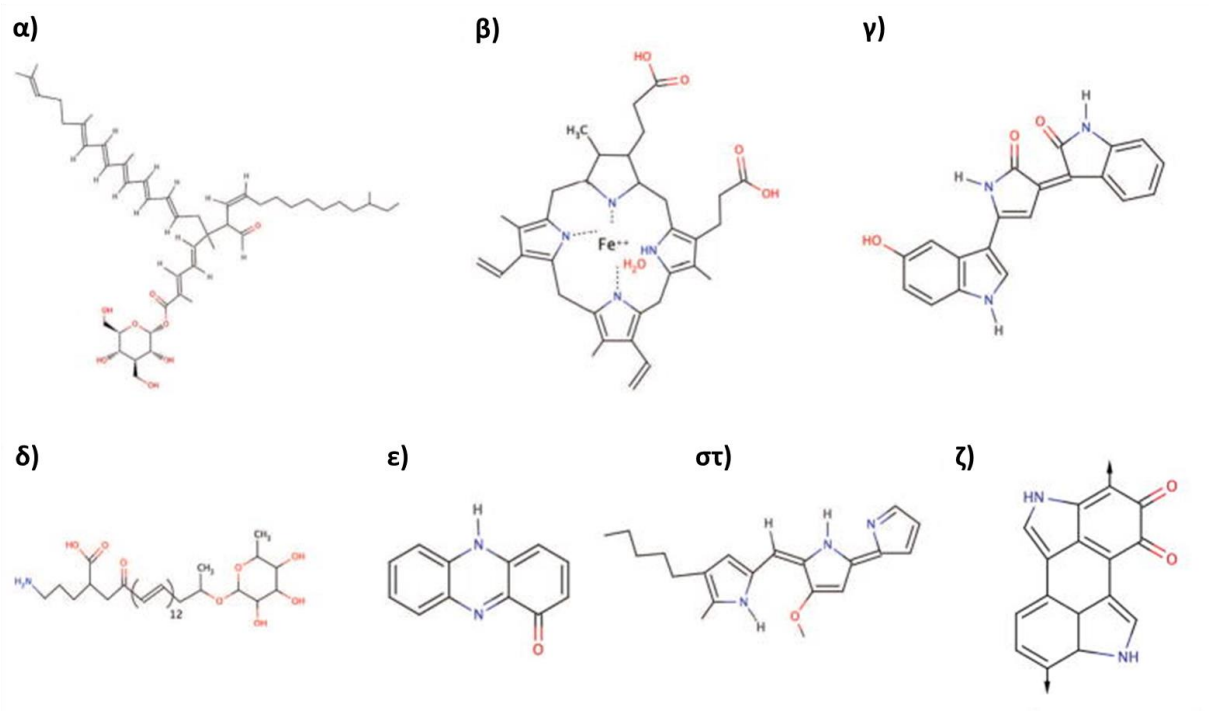
υδατοδιαλυτές φθορίζουσες χρωστικές που παράγονται από διάφορα είδη *Pseudomonas*, ειδικά υπό συνθήκες έλλειψης σιδήρου, ονομάζονται πυοβερδίνη, πυοφθορεσεΐνη ή απλά φθορεσεΐνη. (Ahmad et al. 2012a).



Σχήμα 9: Διαφορετικές αποχρώσεις της προδιγιοσίνης από τον *S. marcescens* για τιμές pH 2.0 (α), 7.0 (β) και 9.0 (γ).

Η ακτινορχοδίνη (actinorhodin), ένα πολυκετιδικό αντιβιοτικό παράγεται από το *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Η διττή χρώση της ακτινορχοδίνης, κόκκινη σε όξινο pH και μπλε σε αλκαλικό pH διευκολύνει την οπτική παρατήρηση του προϊόντος. Η ακτινορχοδίνη χρησιμοποιείται συχνά ως μοντέλο για την μελέτη παραγόντων που ρυθμίζουν την παραγωγή αντιβιοτικών (Ozergin-Ulgen and Mavituna 1994).

Μία από τις βασικές λειτουργίες των βακτηριακών χρωστικών είναι η ταυτοποίηση του βακτηρίου, γι' αυτό και εντάσσεται στην ονομασία του μικροοργανισμού. Ενδεικτικά, το χρυσαφί βακτήριο *S. aureus* (aureus στα λατινικά σημαίνει χρυσό) ονομάστηκε έτσι ώστε να διακρίνεται από το άχρωμο *Staphylococcus alba* (alba στα λατινικά σημαίνει άσπρο). Παρομοίως το μπλε-πράσινο είδος *Pseudomonas* που συναντάται στους πνεύμονες ασθενών με κυστική ίνωση ονομάστηκε *aeruginosa*, που προέρχεται από μία λατινική λέξη που περιγράφει το χρώμα της σκουριάς. Το βακτήριο *C. violaceum* αντίστοιχα παράγει ένα μπλε-βιολετί χρώμα. Αυτοί οι χαρακτηριστικοί φαινότυποι όχι μόνο παρέχουν μια εύκολη ονοματολογία για τους μικροοργανισμούς, αλλά εξακολουθούν να αποτελούν σημαντικές διαγνωστικές ενδείξεις για την ταυτοποίηση μικροβίων σε κλινικές μελέτες (Liu and Nizet 2009). Στο Σχήμα 10 παρουσιάζονται οι δομές των πιο κοινών μικροβιακών χρωστικών.



Σχήμα 10: Χημικές δομές χρωστικών από μικροβιακά παθογόνα: α) σταφυλοξανθίνη, *S.aureus,* β) αιματίνη, *Porphyromonas gingivalis* γ) βιολασεΐνη, *C. violaceum* δ) γρεναδίνη, *Streptococcus agalactiae* ε) πυοκυανίνη, *P. aeruginosa* στ) προδιγιοσίνη, *Serratia marcescens* ζ) μελανίνη, *Cryptococcus neoformans.*

Συμπληρωματικά, οι βακτηριακές χρωστικές έχουν συμβάλλει στην ανακάλυψη μολυσματικών παθογόνων παραγόντων. Μία από τις φυσικές λειτουργίες των μικροβιακών χρωστικών αποτελεί η άμυνα και η προστασία των μικροοργανισμών έναντι υπεριώδους ακτινοβολίας, οξειδωτικών παραγόντων, ακραίων συνθήκων θερμοκρασίας, οι ανιτμικροβιακές ιδιότητες και η δέσμευση θρεπτικών συστατικών (όπως Fe) και ενέργειας μέσω της φωτοσύνθεσης, όπως στην περίπτωση των κυανοβακτήριων (Liu and Nizet 2009).

2.4.2 Χρωστικές από μύκητες

Οι νηματώδεις μύκητες έχουν τη δυνατότητα να συνθέτουν φυσικά προϊόντα, όπως χρωστικές, τα οποία έχουν διάφορες λειτουργίες, Μπορούν να συμμετέχουν στον αμυντικό μηχανισμό του μικροοργανισμού ενάντια θανάσιμες φωτοοξειδώσεις (καροτενοειδή) ή να λειτουργούν ως συμπαράγοντες σε ενζυμικές καταλύσεις (φλαβίνες, flavins) (Firn and Jones 2003). Οι χρωστικές αυτές παρουσιάζουν μοναδική δομική και χημική ποικιλομορφία με

εντυπωσιακό εύρος αποχρώσεων. Οι νηματοειδείς μύκητες παράγουν κινίνες (quinines), όπως ανθρακινόνες και ναφθακινόνες (Baker and Tatum 1998; Medentsev and Akimenko 1998), δι-υδροξυ ναφθαλεν-μελανίνη, ένα περίπλοκο συσσωμάτωμα πολυκετίδων (Butler and Day 1998) και δομές φλαβίνης, όπως είναι η ριβοφλαβίνη. Το γένος *Monascus περιλαμβάνει* τα τέσσερα είδη *M. pilosus, M. purpureus, M. ruber* και *M. Froridanus* και αναφέρεται τη βιβλιογραφία να παράγει τουλάχιστον έξι σχετικές χρωστικές που μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε πορτοκαλί (ρουβροπουκταίνη και μονασκουβρίνη), κίτρινες (μονασκίνη και ανκαφλαβίνη) και κόκκινες (ρουβροπουκταμίνη και μονασκορουβραμίνη) (Wang and Hesseltine 1979; Sabater-Vilar et al. 1999).

2.4.3 Χρωστικές από ζύμη

Τα καροτενοειδή προσδίδουν στα ζώα διακριτικό πορτοκαλί-κόκκινο χρώμα. Η ασταξανθίνη (3,30-δι-υδροξυ-β,β-καροτεν-4,40-διόνη) είναι από τα πιο διαδεδομένα καροτενοειδή στη φύση και αποτελεί τη βασική χρωστική στα καρκινοειδή και σολομοειδή (crustaceans, salmonids). Η κόκκινη ζύμη *Rhodotorula* συνθέτει καροτενοειδείς χρωστικές που αποτελούνται από τορουλένιο και τορουλαρχοδίνη, με ελάχιστη ποσότητα β-καροτένιου. Ζωική τροφή εμπλουτισμένη σε κυτταρική μάζα *Rhodotorula* απεδείχθη ασφαλής και μη τοξική. Καθώς το περιεχόμενο σε β καροτένιο σε άγρια στελέχη του *R. glutinis* είναι χαμηλό έχουν γίνει προσπάθειες αύξησης του μέσω μεταλλάξεων, βελτιστοποίησης του μέσου καλλιέργειας και ρύθμιση των συνθηκών ανάπτυξης (Sakaki et al. 2000; Tinoi et al. 2005).

2.4.4 Χρωστικές από φύκια

Τα μικροφύκη ανήκουν στα πιο γρήγορα αναπτυσσόμενα αυτότροφα που παράγουν πληθώρα φυσικών προϊόντων, όπως πρωτεΐνες, ένζυμα, βιοενεργές ενώσεις και καροτενοειδή. Το μονοκύτταρο μικροφύκος *Dunaleilla salina* παράγει β-καροτένιο. Η χρωστική αυτή απεδείχθη πως έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκριτικά το μικροφύκος *Dunaliella* παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως η ευκολότερη μέθοδος διάρρηξης των κυττάρων σε σχέση με άλλα φύκη, λόγω απουσίας κυτταρικού τοιχώματος, σχετικά υψηλό ρυθμό ανάπτυξης και υψηλότερο επίπεδο ανθεκτικότητας σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Pisal and Lele 2005).

2.5 Εφαρμογές βακτηριακών χρωστικών

Ένας από τους περιορισμούς στη χρήση φυσικών χρωστικών αποτελούν οι χαμηλές αποδόσεις απομόνωσής τους (λίγα g ανά kg ξηρού αρχικού υλικού). Εξαιτίας αυτού η αξιοποίηση άλλων βιολογικών πηγών, όπως είναι οι μύκητες και τα βακτήρια αποτελούν βιώσιμες εναλλακτικές, καθώς με κατάλληλη επιλογή, μετάλλαξη ή τεχνικές γενετικής μηχανικής μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά η παραγωγή των χρωστικών (Mapari et al. 2005). Οι μικροβιακές βαφές βακτηριακής προέλευσης πλεονεκτούν όσον αφορά την παραγωγή τους σε σύγκριση με χρωστικές που προέρχονται από λαχανικά ή ζώα, λόγω της απλής κυτταρικής δομής και της γρήγορης κυτταρικής ανάπτυξης των βακτηρίων. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιτρέπουν την συνεχή λειτουργία ενός βιοαντιδραστήρα σε επίπεδο παραγωγής σε βιομηχανική κλίμακα (Hendry and Houghton 1996). Άλλωστε χρωστικές ανώτερων οργανισμών, όπως είναι τα ζώα, τα φυτά και οι μύκητες είναι λιγότερο κατάλληλα για αξιοποίηση σε βιομηχανικό επίπεδο, λόγω δομικής πολυπλοκότητας των ιστών που φέρουν τη χρωστική και του σχηματισμού της ίδιας της χρωστικής που πραγματοποιείται σε δεδομένα στάδια του κύκλου ζωής αυτών των οργανισμών. Ενδεικτικά, οι χρωστικές που λειτουργούν ως παράγοντας έλξης κατά τη σεξουαλική αναπαραγωγή σχηματίζονται μετά την ολοκλήρωση άλλων πτυχών του κύκλου ζωής (Hendry and Houghton 1996). Ένα ακόμη πλεονέκτημα της χρήσης βακτηριακών χρωστικών είναι η αφθονία τους στη φύση και η εύκολη διάδοση τους σε απλά θρεπτικά μέσα, καθώς τα βακτήρια διαθέτουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν φθηνές πηγές C και N για να παράγουν πολύτιμους μεταβολίτες χαμηλού και υψηλού μοριακού βάρους (Demain 1980). Οι φυσικές πρώτες ύλες και τα παραπροϊόντα των βιομηχανικών διεργασιών έχουν αποδειχθεί χρήσιμοι υποκαταστάτες των ακριβών θρεπτικών μέσων καλλιέργειας κατά τις διαδικασίες ζύμωσης, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς το μέσο καλλιέργειας αποτελεί συνήθως το 38-73% του συνολικού κόστους παραγωγής. Επιπρόσθετα, η βακτηριακή χρωστική μπορεί να απομονωθεί με απλή εκχύλιση με χρήση κάπου διαλύτη, ο οποίος μπορεί να ανακτηθεί για να επαναχρησιμοποιηθεί ελαχιστοποιώντας έτσι το λειτουργικό κόστος.

2.5.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Ο μικροοργανισμός *S. coelicolor* συνθέτει μπλε χρωστικές σταθερές στο φως και στη ζέστη, ανθεκτικές σε οξειδοαναγωγικούς παράγοντες υπό όξινες και αλκαλικές συνθήκες. Τα χαρακτηριστικά αυτά τις καθιστούν κατάλληλες για πιθανή χρήση στη βιομηχανία τροφίμων ως

πρόσθετο για χρωματισμό ποτών και κέικ (Zhang et al. 2006). Το στέλεχος *Bradyrhizobium sp.* παράγει την χρωστική κανθαξανθίνη (4,40-δικετο-β-καροτένιο) (Lorquin et al. 1997). Η κανθαξανθίνη για πολλά χρόνια χρησιμοποιούταν σε ζωοτροφές υδατοκαλλιέργειας ώστε τα εκτρεφόμενα σολομοειδή να αποκτούν το επιθυμητό χρώμα. Ο μικροοργανισμός *Brevibacterium aurantiacum sp. nov.*συναντάται στην κρούστα ωριμασμένων μαλακών τυριών ως κόκκινοι κόκκοι (Galaup et al. 2005; Dufossé 2006). Άλλες χρωστικές που χρησιμοποιούνται ήδη ή ενδείκνυνται για την χρώση τροφίμων είναι η ασταξανθίνη (ροζ-κόκκινη χρωστική) από τον *Agrobacterium aurantiacum* και *Paracoccus carotinifaciens*, η ρουβρολόνη (κόκκινη χρωστική) από τον *Streptomyces echinoruber και* η ζεαξανθίνη (κίτρινη χρωστική) από τον *Flavobacterium sp.* και τον *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (Ahmad et al. 2012a). Στον

Πίνακας **2** παρουσιάζονται διάφορες βακτηριακές χρωστικές που βρίσκουν εφαρμογή στα τρόφιμα (Venil et al. 2013).

Πίνακας 2: Χρωστικές ουσίες τροφίμων από βακτήρια.

Χρωστική	Χρώμα	Βακτήριο	Χρήση
Ζεαξανθίνη	Κίτρινο	*Flavobacterium sp., Paracoccus xanthinifaciens*	Πρόσθετο για ζωοτροφές πουλερικών, ενίσχυση του κίτρινου χρώματος του δέρματος των ζώων, τονισμός του χρώματος του κρόκου αυγού*.
Καροτενοειδή	Κίτρινο	*Streptomyces sp.*	Χρωστικές ουσίες τροφίμων, πρόσθετα ζωοτροφών, χρωματισμός διακοσμητικών ψαριών*
Κανθαξανθίνη	Σκούρο κόκκινο	*Photosynthetic bacterium, Bradyrhizobium sp., Halobacterium sp.*	Χρωστικές ουσίες τροφίμων *
Ασταξανθίνη	Ροζ-κόκκινο	*Agrobacterium aurantiacum, Paracoccus carotinifaciens, Halobacterium salinarium*	Φυσικό διατροφικό συστατικό, συμπλήρωμα διατροφής*. *Σε στάδιο έρευνας

2.5.2 Εφαρμογές στη φαρμακευτική βιομηχανία

Το γένος *Streptomyces* ή *Serratia* παράγει τις ακόλουθες κόκκινες ενώσεις: προδιγιοσίνη, μετακυκ-προδιγιοσίνη, δεσμεθοξυπροδιγιοσίνη και προδιγιοσίνη 25-C. Αυτές οι ενώσεις έχουν αντιβιοτική δράση και δράση κατά της ελονοσίας, ιδιαίτερα η προδιγιοσίνη 25-C που

παρουσιάζει ανοσοκατασταλτική δράση (Kim et al. 2003). Η ανοσοκατασταλτική δράση της προδιγιοσίνης αναφέρεται για πρώτη φορά από τους Nakamura et al. (1989), οι οποίοι παρατή-

Πίνακας 3: Πιθανές εφαρμογές μικροβιακών χρωστικών στη φαρμακευτική βιομηχανία.

Χρωστική	**Χρώμα**	**Μικροοργανισμός**	**Λειτουργία**
Σταφυλοξανθίνη	κίτρινο	*Staphylococcus aureus*	Αντιοξειδωτική, δράση κατά ROS Κυτταροτοξική
Πυοκυανίνη	μπλε-πράσινο	*Pseudomonas* spp.	Απόπτωση ουδετερόφιλων αιμοσφαιρίων Προφλεγμονώδης
Μελανίνη	καφέ-μαύρο	*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp., *Wangiella dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Burkholderia cepacia*	Αντιοξειδωτική Αντιμικροβιακή
Πορφυρίνη	μαύρο	*Porphyromonas gingivalis*	Αντιοξειδωτική, δράση κατά ROS
Γραναδίνη	πορτοκαλί-κόκκινο	*Streptococcus agalactiae*	Αντιοξειδωτική, δράση κατά ROS
Βιολασεΐνη	μοβ	*Chromobacterium violaceum*	Αντιοξειδωτική, δράση κατά ROS
Προδιγιοσίνη	κόκκινο	*Serratia marcescens*	Ανοσοκατασταλτική Αποτοξινωτική
Αιμοζοΐνη	καφέ-μαύρο	*Plasmodium* spp.	Καταστολή μακροφάγου Προφλεγμονώδης

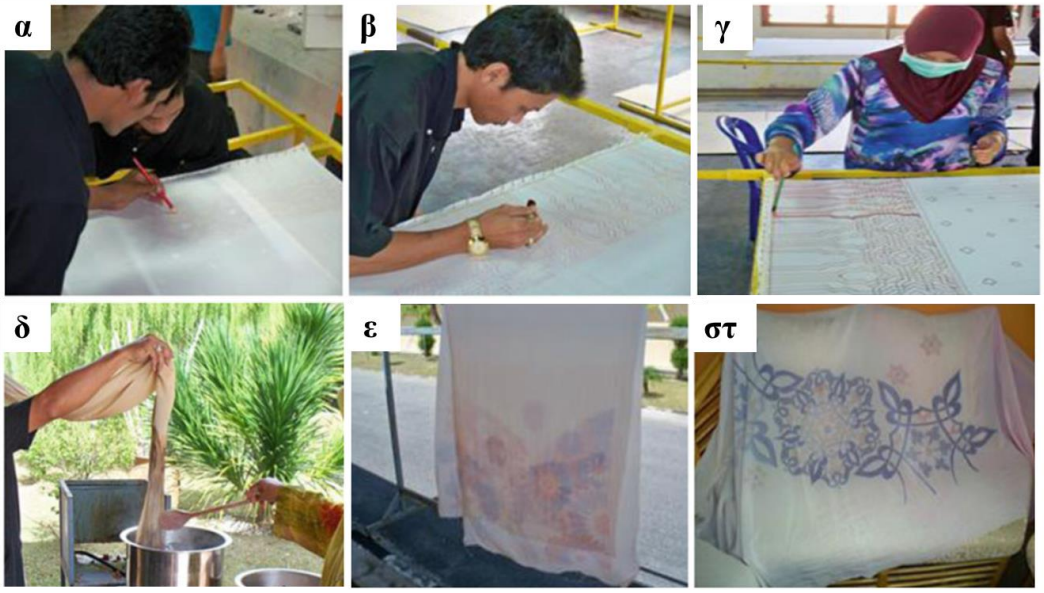
ρησαν πως η παρουσία προδιγιοσίνης και μετακυκλοπροδιγιοσίνης σε καλλιέργεια *Serratia* οδήγησε σε επιλεκτική παρεμπόδιση πολυκλωνικού πολλαπλασιασμού Τ-κυττάρων σε σύγκριση με τα Β-κύτταρα. Επιπρόσθετα, η κυτταροτοξική ισχύς της προδιγιοσίνης έχει εξεταστεί στις πρότυπες 60 κυτταρικές σειρές ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων προερχόμενων από τον πνεύμονα, το κόλον, το νεφρό τις ωοθήκες, τον εγκέφαλο, από μελάνωμα και λευχαιμία, όπου παρατηρήθηκε παρεμπόδιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εντέλει απόπτωση των

κυττάρων. Η *in vitro* αντικαρκινική δράση διάφορων αναλόγων της προδιγιοσίνης και ενός συνθετικού παραγώγου ινδόλης της προδιγιοσίνης έχει μελετηθεί και από τους (Pandey et al. 2007). Συμπληρωματικά, στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά και χρήση της προδιγιοσίνης στη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη (Kim et al. 2003). Στον Πίνακας 3 παρουσιάζονται διάφορες μικροβιακές χρωστικές που βρίσκουν εφαρμογή στη .φαρμακευτική βιομηχανία (Liu and Nizet 2009).

Η βιολασεΐνη παρουσιάζει αντικαρκινικές, αντιικές, αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές ιδιότητες και ιδιότητες εναντίον πρωτόζωων οι οποίες περιγράφονται αναλυτικά στην παράγραφο 2.6.2 (Leon et al. 2001; Nakamura et al. 2003; Andrighetti-Fröhner et al. 2003; Matz et al. 2004; Ferreira et al. 2004; Kodach et al. 2006; Konzen et al. 2006; Sánchez et al. 2006).

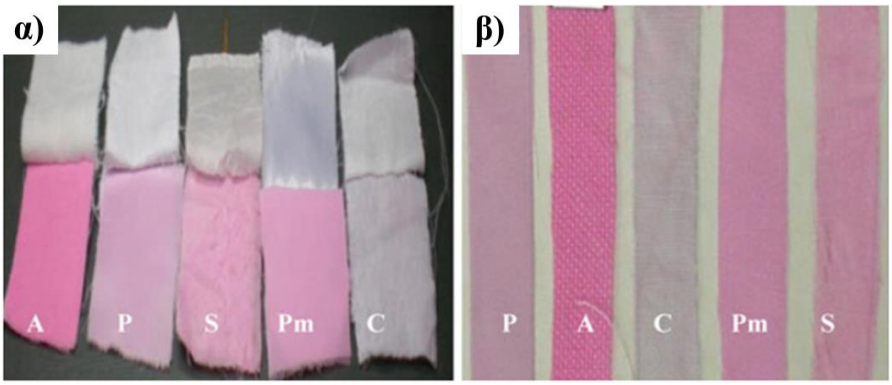
2.5.3 Εφαρμογές στην κλωστοϋφαντουργία

Οι περισσότερες χρωστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται από μη ανανεώσιμες πηγές, όπως το πετρέλαιο. Η παραγωγή συνθετικών χρωστικών είναι οικονομικά βιώσιμη και καλύπτει όλο το χρωματικό φάσμα, ωστόσο, οι συνθετικές βαφές παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως η επιμόλυνση του περιβάλλοντος που συνεπάγεται ανησυχία για το οικοσύστημα. Συνεκδοχικά, η βιοσύνθεση χρωστικών μέσω διεργασιών ζύμωσης αποτελεί μία ελκυστική προσέγγιση για την μείωση της χρήσης συνθετικών βαφών. Στο Σχήμα 11 παρουσιάζεται η βαφή υφασμάτων στην Ινδία με μικροβιακές βαφές. Επιπρόσθετα, ορισμένες φυσικές χρωστικές, εκτός από το έντονο χρώμα παρουσιάζουν και αντιβακτηριακές ιδιότητες και θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν για την βαφή υφασμάτων με αντιμικροβιακή δράση (Frandsen et al. 2006).



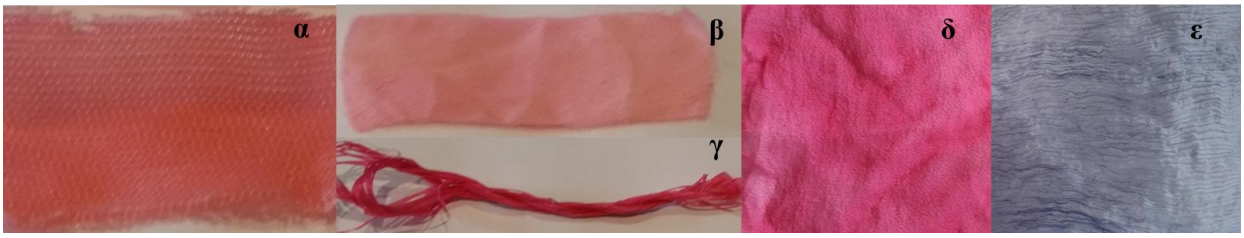
Σχήμα 11: Εφαρμογή βακτηριακών χρωστικών κατά τη βαφή βαμβακερών υφασμάτων με τη μέθοδο "batik": α) σχεδίαση μοτίβων με μολύβι, β) εφαρμογή κεριού πάνω από το σχέδιο με την μέθοδο ''canting'', γ) βαφή υφάσματος με βακτηριακή χρωστική, δ) αποκήρωση και σταθεροποίηση χρώματος υφάσματος, ε) στέγνωμα υφάσματος, στ) τελικό προϊόν.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ενδεχόμενη χρήση της κόκκινης προδιγιοσίνης από τον *Vibrio spp.* για τη βαφή μάλλινων, μεταξωτών, νάυλον και ακριλικών υφασμάτων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12 (Alihosseini et al. 2008).



Σχήμα 12: Βαφή υφασμάτων με προδιγιοσίνη από το *Vibrio spp*. και αντοχή χρώματος σε ιδρώτα α) πριν και (b) μετά το τεστ. P-πολυεστέρας, A-ακρυλικό, C-βαμβακερό, Pm-πολυεστερική μικροΐνα, S-μεταξωτό.

Μολοταύτα, το αποτέλεσμα βαφής ποικίλει ανάλογα με την ίνα-υπόστρωμα. Από τις δοκιμές αντοχής χρώματος που διεξήχθησαν, τα βαμμένα υφάσματα διατηρούν το χρώμα τους υπό διάφορες συνθήκες εφίδρωσης, πλυσίματος και τριψίματος. Ακόμη, πρόσφατα (Μάρτιος, 2018) στη Waag Society (Άμστερνταμ, Ολλανδία) πραγματοποιήθηκε βαφή διαφορετικών υφασμάτων από φλούδα πορτοκαλιού, οργανικό μετάξι και PLA με προδιγιοσίνη και βιολασεΐνη (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Βαφή ινών από α) PLA, β) κυτταρίνη από φλούδα πορτοκαλιού, γ, δ) μετάξι με προδογιοσίνη. ε) Βαφή μεταξωτού υφάσματος με βιολασεΐνη.

Παρόμοια βαφική ικανότητα υφασμάτων περιγράφεται για τη βιολασεΐνη από τον *J.lividum* που απομονώθηκε από υγρό νήμα μεταξιού (Shirata et al. 2000). Η μοβ αυτή χρωστική παρουσίασε καλή βαφική ικανότητα σε μετάξι, βαμβάκι και μαλλί (μπλεδίζον-μοβ), όπως επίσης και σε νάυλον και βινυλ (βαθύ μπλε). Η βαφή πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση των υφασμάτων στο εκχύλισμα της βαφής ή με βρασμό των υφασμάτων μαζί με την καλλιέργεια του βακτηρίου. Ακόμη επιτεύχθηκαν διαφορετικές αποχρώσεις ανάλογα με τον χρόνο εμβάπτισης και τη θερμοκρασία του λουτρού βαφής. Η αντοχή του χρώματος των βαμμένων υλικών με βιολασεΐνη ήταν παρόμοια με μιας βαφής από λαχανικά που χρησιμοποιήθηκε στα ίδια υλικά, με χαμηλότερη ωστόσο αντοχή στο φως. Ακόμη η χρωστική παρουσίασε αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι παθογόνων μυκήτων, όπως ο *Rosellinia necatrix* που προκαλεί σήψη των ριζών της μουριάς (Shirata et al. 2000).

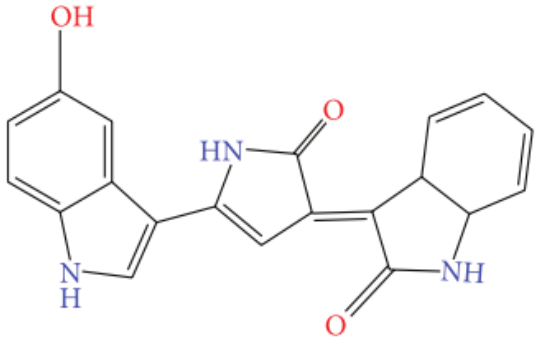
2.6 Βιολασεΐνη

2.6.1 Γενικά

Στη βιβλιογραφία διακρίνεται ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον όσον αφορά την παραγωγή και απομόνωση φυσικών χρωστικών από διαφορετικές βιολογικές πηγές, όπως είναι τα βακτήρια, οι μύκητες και τα φύκη. Ενώ οι συνθετικές βαφές είναι χαμηλότερου κόστους και

έχουν εξαπλωθεί σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της βιομηχανίας, όπως είναι η κλωστοϋφαντουργία, είναι αδιαφιλονίκητο γεγονός πως οι βιολογικές βαφές παραμένουν μία φιλικότερη προς το περιβάλλον λύση, λόγω της βιοαποικοδομησιμότητας τους. Ακόμη, η βιοτεχνολογική παραγωγή βαφών μέσω διαδικασιών ζύμωσης είναι απαλλαγμένη από τα μειονεκτήματα που η χημική σύνθεση συνεπάγεται. Συμπληρωματικά, η τροποποίηση υφασμάτων ώστε να αποκτήσουν αντιμικροβιακές ιδιότητες αποτελεί μία νέα τάση προς αντιμετώπιση του φαινομένου των υπερβακτηρίων (superbugs). Κάποιοι επιβλαβείς για την υγεία μικροοργανισμοί, όπως οι *Clostridium difficile*, και *Enterobacteriaceae*, έχουν εξελιχθεί και έχουν αναπτύξει αντοχή/ανθεκτικότητα έναντι πολλών φαρμάκων (Aruguete et al. 2013; Alpert 2017). Στη βιβλιογραφία η επιφανειακή τροποποίηση βαμβακερών υφασμάτων με ακτινοβολία και σύνδεση της ένωσης 1-βουτυλ-3-βινυλ ιμιδαζολικού χλωριδίου οδήγησε σε αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε υπερβακτήρια, όπως είναι το ανθεκτικό σε μεθικιλλίνη *S. aureus*, το ανθεκτικό σε βανκομυκίνη *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter calcoaceticus* και σε άλλα κοινά βακτήρια (Yu et al. 2016). Από βιοτεχνολογικής σκοπιάς η βαφή υφασμάτων με βιολογικές βαφές, όπως η βιολασεΐνη, που προδίδουν στο ύφασμα αντιμικροβιακή προστασία, αποτελεί μία ελκυστική προοπτική για την αντιμετώπιση των νεοσύστατων κινδύνων.

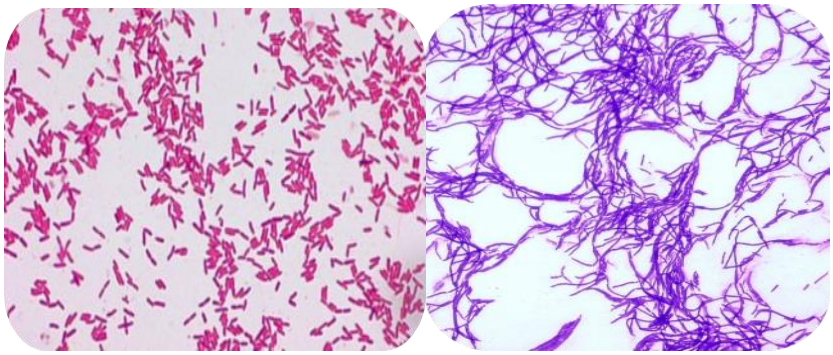
Η βιολασεΐνη (3-[1,2-διυδρο-5-(5-υδροξυ-1Η-ινδολ-3-υλ)-2-οξο-3Η-πυρρολ-3-ιλυδεν]-1,3-διυδρο-2Η-ινδολ-2-όνη) είναι ένα παράγωγο ινδόλης με σκούρα μοβ απόχρωση και απεικονίζεται στο Σχήμα 14.



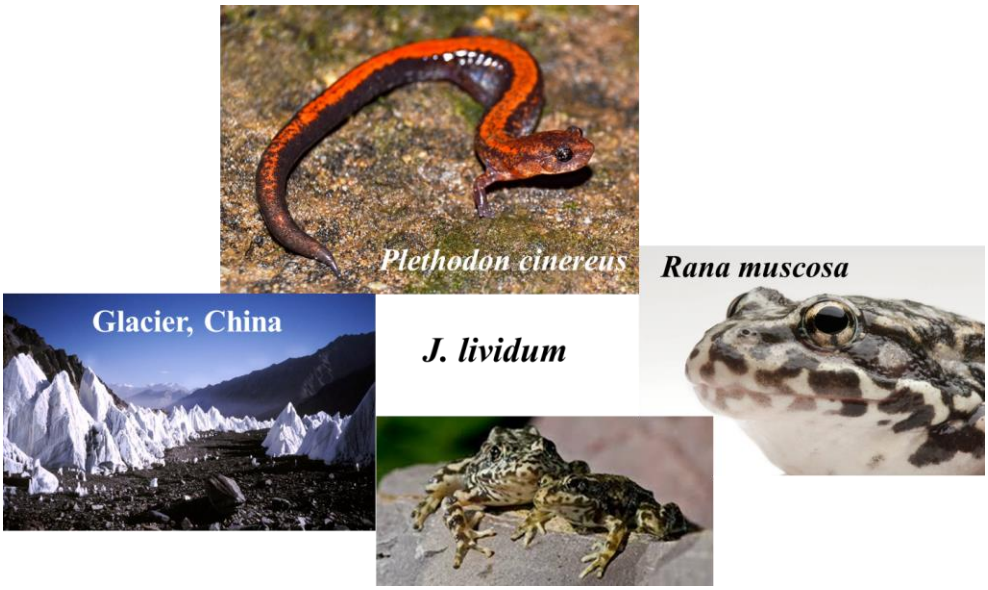
Σχήμα 14: Χημική δομή βιολασεΐνης.

Παράγεται από πολλά βακτήρια, όπως είναι τα *C. violaceum* και *J. lividum*, τα οποία απεικονίζονται στο Σχήμα 15. Το βακτήριο *J. lividum* είναι ψυχροτροπικό είδος που συναντάται σε πολλά αμφίβια, στο δέρμα βατράχων και σε παγετούς στην Κίνα και αναπτύσσεται στο

έδαφος και στα νερά των ποταμών, των λιμνών και των πηγών (Σχήμα 16) (Harris et al. 2009; Lu et al. 2009). Το *J. lividum* είναι ένα αρνητικό κατά Gram ραβδόμορφο, κινούμενο, αερόβιο βακτήριο. Ανήκει στην οικογένεια *Oxalobacteraceae* των β-πρωτεοβακτηρίων (Baldani et al., 2014). Είναι ένα ετερότροφο βακτήριο που αναπτύσσεται στο θερμοκρασιακό εύρος 4-30 ^{o}C, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι ένα ψυχρο-ανεκτικό βακτήριο (Valdes et al., 2015). Παρά το περιβαλλοντικό του οικοσύστημα, το *J. lividum* είναι ενίοτε ικανό να προκαλέσει ευκαιριακές λοιμώξεις, συμπεριλαμβανομένης της θανατηφόρας σηψαιμίας. Επιπλέον το *J. lividum* παράγει μια μεταλλο-β-λακταμάση που προσδίδει αντίσταση σε αρκετά αντιβιοτικά β-λακτάμης (Pantanella et al., 2007). Κατά την ανάπτυξη του, το *J. lividum* παράγει τη βιολασεΐνη, η βιοσύνθεση της βιολασεΐνης κωδικοποιείται από ένα οπερόνιο αποτελούμενο από τα γονίδια vioA, vioB, vioC και vioD και η έκφραση του ρυθμίζεται από την πηγή άνθρακα (August et al., 2000). Επιπλέον, το *J. lividum* είναι ικανό να αναπτυχθεί σε υγρό περιβάλλον, όπως τα περισσότερα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, σχηματίζοντας εκτεταμένα βιοφιλμ. Η ανάπτυξη του βιοφιλμ είναι γνωστό ότι ρυθμίζεται από τα συστήματα ενδοκυτταρικής επικοινωνίας (quorum sensing). Στην πραγματικότητα, πολλά αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια παράγουν σχετικές ποσότητες εξωπολυσακχαριτών (EPS) μόνο όταν διεγείρονται από σηματοδοτικά μόρια, τα οποία ονομάζονται αυτοεπαγωγείς. Στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως το *J. lividum*, τα σηματοδοτικά μόρια αυτά είναι ακυλομοσερίνες της λακτόνης (AHLs) που διαφέρουν στη δομή των N-ακυλ πλευρικών αλυσίδων τους (Pantanella et al., 2007). Ανάλογα με το μικροβιακό είδος, το μέσο καλλιέργειας και τις συνθήκες ανάπτυξης ακολουθείται διαφορετικό μονοπάτι για την παραγωγή της βιολασεΐνης. Η παραγωγή της εν λόγω μοβ χρωστικής αποτελεί αντίδραση του μικροοργανισμού σε συνθήκες στρες και συμβάλλει στην άμυνα του σε εξωγενείς κινδύνους (Pantanella et al. 2007).



Σχήμα 15: Απεικόμιση των *C. violaceum* και *J. lividum* στο μικροσκόπιο.



Σχήμα 16: Εύρεση του *J. lividum* στο δέρμα της σαλαμάνδρας *Plethodon cinereus*, στο δέρμα του βάτραχου *Rana muscosa* και σε παγετούς στην Κίνα.

Στον Πίνακας 4 παρουσιάζονται διάφορα στελέχη που παράγουν τη βιολασεΐνη, καθώς και τα περιβάλλοντα στα οποία έχουν βρεθεί, όπως στην επιφάνεια θαλάσσιων σφουγγαριών (Yang et al. 2007) και την ριζόσφαιρα ελαιώνων (Aranda et al. 2011). Επιπλέον, η παραγωγή της βιολασεΐνης από τον *C. violaceum* και άλλα στελέχη ρυθμίζεται από τη διακυτταρική επικοινωνία (quorum sensing) (McClean et al. 1997).

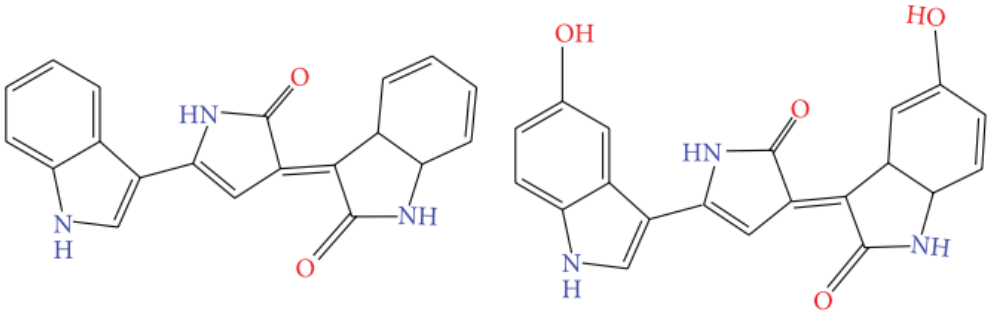
Η πιο γνωστή δευτερεύουσα ένωση που παράγεται από το βιοσυνθετικό μονοπάτι της βιολασεΐνης είναι δεοξυβιολασεΐνη, όπως συμβαίνει και στα βακτηριακά στέλεχη *J. lividum* και *Duganela sp*. B2 όπου παράγεται δεοξυβιολασεΐνη μολονότι σε μικρότερο ποσοστό από τη βιολασεΐνη, όπως προέκυψε από ανάλυση HPLC (Rodrigues et al. 2012; Jiang et al. 2012). Η δεοξυβιολασεΐνη (Σχήμα 17) είναι ένας δευτερεύων, πιο υδρόφοβος συν-μεταβολίτης της βιολασεΐνης που παράγεται στα άγρια στελέχη ως παραπροϊόν τη βιοσύνθεσης της βιολασεΐνης. (Wang et al. 2012). Η δεοξυβιολασεΐνη παρουσιάζει καλύτερη φωτοσταθερότητα έναντι της βιολασεΐνης στο UV-Vis φως (Jiang et al. 2012).

Πίνακας 4: Μικροοργανισμοί που παράγουν βιολασεΐνη.

Στέλεχος	**Απομόνωση**	**Βιβλιογραφία**
Alteromonas luteoviolacea	Θαλάσσιο βακτήριο, Σκωτία	(Laatsch & Thomson, 1984)
Chromobacterium violaceum	*Bacillus violaceum,* Η.Π.Α.	(Tobie 1934)
C. violaceum ATCC 553	Συλλογή	(DeMoss and Happel 1959)
C. violaceum	Ποταμός Lowland, Αγγλία	(Moss et al. 1978)
C. violaceum B78	Αμαζόνιος ποταμός, Βραζιλία	(Riveros et al. 1989)
C. violaceum CCT 3496	Συλλογή	(Mendes, et al., 2001; Rettori & Durán, 1998)
C. violaceum	Αγροτικά απόβλητα, Μαλαισία	(Ahmad et al. 2012b)
C. violaceum MTCC 2656	Ινδική συλλογή	(Chaudhari, et al., 2014)
Citrobacter freundii/ pCOM10vio	Ανασυνδυασμένα στέλεχη	(Jiang, et al., 2010; C. Yang et al., 2011)
Collimonas sp.	Παράκτια ύδατα Νορβηγίας	(Hakvåg et al. 2009)
Duganella violaceinigra	Έδαφος δάσους	(Li et al. 2004)
D. violaceinigra str. NI28	Έδαφος δάσους	(Choi, et al., 2015)
Duganella sp. B2	Κίνα	(Wang et al. 2009)
Duganella sp.	Γεωργικά εδάφη (ελιά), Ισπανία	(Aranda et al. 2011)
Escherichia coli K12 DH5a	Κλωνοποιημένο	(Ahmetagic and Pemberton 2010)
E. coli MG1655-Vio4	Ανασυνδυασμένα στέλεχη	(Rodrigues et al. 2013)
E. coli BL21(DE3)/ pET32avio	Ανασυνδυασμένα στέλεχη	(Jiang et al. 2010)
E. coli BL21(DE3) B2/pED+pVio	Ανασυνδυασμένα στέλεχη	(Fang et al. 2015)
Janthinobacterium lividum S9601	Συλλογή	(Shirata et al. 1998)
J. lividum DSM1522	Συλλογή	(Pantanella et al. 2007)
J. lividum	Παγετώνας, Κίνα	(Lu et al. 2009)
Janthinobacterium svalbardensis	Παγετώνας, Σλοβενία	(Avguštin, et al., 2013)
Pseudoalteromonas DSM 13623	Βακτήριο θαλάσσιου ιζήματος	(Tan et al. 2002)
Pseudoalteromonas sp.	Θαλάσσια βαθιά ύδατα, Ιαπωνία	(Yada et al. 2008b)
Pseudoalteromonas luteoviolacea	Θαλάσσιος σπόγγος, Κίνα	(Yang, Xiong, Lee, Qi, & Qian, 2007)
Pseudoalteromonas sp. 520P1	Ακτή του Ειρηνικού, Ιαπωνία	(Dang et al. 2014)
Psychotropic bacterium RT102	Συγγενικό του *J. lividum*	(Nakamura et al. 2003)
Psychotropic bacterium XT1	Συγγενικό του *J. lividum*	(Lu et al. 2009)

Το ποσοστό της δεοξυβιολασεΐνης εντός των ακατέργαστων εκχυλισμάτων βιολασεΐνης, που λαμβάνονται από τα βακτηριακά στελέχη είναι συνήθως 10-20 %. Άλλο ένα δομικό ανάλογο της βιολασεΐνης με ένα παραπάνω άτομο οξυγόνου στη θέση 20 του δακτυλίου της ινδόλης είναι η οξυβιολασεΐνη (Choi et al. 2015). Τα δυο δομικά ανάλογα της βιολασεΐνης εμφανίζουν αντιμικροβιακές και αντιμυκητιακές δράσεις που μπορεί να διαφέρουν ωστόσο από την βιολασεΐνη, λόγω των δομικών τους διαφορών (θέση και αριθμό των υδροξυλομάδων στην 6^{η} ή

στην 20η θέση). Έτσι, καθώς η απώλεια ενός υδροξυλίου στη δεοξυβιολασεΐνη οδηγεί σε μείωση της δραστικότητα της ουσίας κατά του *S. aureus*, η παρουσία ενός επιπλέον υδροξυλίου στην οξυβιολασεΐνη βρέθηκε να αυξάνει την αντιμικροβιακή της δράση (Wang et al. 2012).



Σχήμα 17: Χημική δομή δεοξυβιολασεΐνης (αριστερά) και οξυβιολασεΐνης (δεξιά).

2.6.2 Πιθανές εφαρμογές

Τα βακτηριακά γένη που παράγουν βιολασεΐνη συναντώνται σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως σε θαλασσινά και γλυκά νερά και στην ξηρά. Εξαιτίας αυτού είναι δύσκολο να επισημανθεί ο βιολογικός ρόλος της βιολασεΐνης στο οικοσύστημα. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των μικροοργανισμών που την παράγουν είναι ότι αποτελούν επιδημητικά (sessile) βακτήρια (βακτήρια που κάθονται σε επιφάνειες και βακτήρια που ζουν σε βιοφίλμ) και συνεκδοχικά είναι περισσότερα ευάλωτα σε σχέση με άλλους οργανισμούς (Matz et al. 2008). Το γεγονός αυτό οδηγεί στη θεωρία πως η βιολασεΐνη λειτουργεί ως αμυντικός μηχανισμός του στελέχους που την παράγει και παρέχει στα επιδημητικά αυτά βακτήρια ανταγωνιστικό πλεονέκτημα όσον αφορά την επιβίωσή τους. Συγκεκριμένα, η βιολασεΐνη έχει αποδειχθεί πως παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση ενάντια σε θετικά κατά Gram βακτηριακά στελέχη (Lichstein and Van De Sand 1945; Nakamura et al. 2002). Ενδεικτικά μελέτες στη βιβλιογραφία έχουν δείξει πως η ακατέργαστη βιολασεΐνη παρεμποδίζει την ανάπτυξη του *S. aureus*, ενός παθογόνου ανθεκτικού σε πολλά φάρμακα, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 5.7 και 15 mg/L, ή αντίστοιχα 17 και 43 μmol/L (Nakamura et al. 2003; Vynne et al. 2012; Subramaniam et al. 2014). Πρόσφατα μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση της βιολασεΐνης από το στέλεχος *D. violaceinigra* NI28 ενάντια στο βακτήριο *S. aureus* (Choi et al. 2015a). Ακόμη, η βιολασεΐνη αναφέρεται να δρα ενάντια στο φυτοπαθογόνο μύκητα *Rosellinia necatrix* (Duran et al. 2007). Το στέλεχος *Janthinobacterium* σχηματίζει βιοφίλμ και επικάθεται στο δέρμα βατράχων και σαλαμανδρών, ενώ η βιολασεΐνη

που παράγεται παρέχει αντιμυκητιακή προστασία στα αμφίβια-ξενιστές (Brucker et al. 2008; Harris et al. 2009). Η βιολασεΐνη έχει αντιβακτηριακές ιδιότητες με αποτέλεσμα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντιβιοτικό εναντίον των *S. aureus, Klebsiella pneumoniae, P. aeruginosa, Vibrio cholerae* και *Salmonella typhi*. Ακόμη, όταν χορηγήθηκε σε συνδυασμό με άλλα αντιβιοτικά, όπως γενταμυκίνη ή κεφαδροξίλη, η δράση της ήταν πολύ πιο αποτελεσματική έναντι του *S. aureus*, ενώ σε συνδυασμό με αζιθρομυκίνη ή καναμυκίνη παρουσίασε καλύτερη δράση κατά του *S. typhi* (Subramaniam et al. 2014). Η βιολογική δράση της βιολασεΐνης δεν περιορίζεται σε προκαρυώτες, αλλά και σε πρωτόζωα και μετάζωα. Οι Matz et al. (2008) μελέτησαν την δράση καθαρής βιολασεΐνης και βιοφίλμ που παράγουν βιολασεΐνη σε διάφορα πρωτόζωα (μαστιγοφόρα, βλεφαριδοφόρα) και στην αμοιβάδα *Acanthamoeba castellanii*, η οποία παρουσίασε μειωμένη σίτιση συνοδευόμενη από μορφολογικές αλλαγές, όπως στρογγυλοποίηση των κυττάρων.

Συμπληρωματικά, στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η βιολασεΐνη διαθέτει αντιικές και αντικαρκινικές ιδιότητες και μπορεί να βρει πιθανή εφαρμογή κατά της λεϊσμανίασης και της μαλάριας (Leon et al. 2001; Nakamura et al. 2003; Kodach et al. 2006; Lopes et al. 2009; Masuelli et al. 2016). Η δράση της βιολασεΐνης κατά της μαλάριας έχει μελετηθεί *in vitro* και *in vivo*. Έχει αποδειχθεί πως μικρομοριακές συγκεντρώσεις βιολασεΐνης προκαλούν θανάτωση των ευάλωτων και ανθεκτικών σε χλωροκίνη στελεχών *Plasmodium falciparum in vitro*, αναστέλλουν την παρασιταιμία *in vivo*, ακόμη και μετά την εγκαθίδρυση παρασίτων στο αίμα και στην περίπτωση ποντικιών μολυσμένων με *Plasmodium chabaudi* συμβάλλουν στην αποφυγή θανάτωσης τους (Lopes et al. 2009, Costa et al., 2005). Κλινικές μελέτες απέδειξαν πως ο δευτερογενής μεταβολίτης βιολασεΐνη έχει τοξική δράση έναντι άλλων οργανισμών. Η βιολασεΐνη εξαιτίας αυτής της δράσης μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη ως θεραπευτική ουσία έναντι διαφόρων παθογόνων και ενδογενών κυτταρικών προσβολών. Η βιολασεΐνη έχει εξεταστεί έναντι ποικίλων καρκινικών κυτταρικών σειρών και έχει δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Μελέτη έχει δείξει πως η χρήση βιολασεΐνης προκάλεσε απόπτωση κυττάρων HL60, τα οποία αποτελούν σειρά καρκινικών κυττάρων-μοντέλο για τη μελέτη της λευχαιμίας, χωρίς, ωστόσο, να επηρεαστούν τα φυσιολογικά λεμφοκύτταρα στις δοκιμασμένες συγκεντρώσεις (Ferreira et al. 2004). Οι Bromberg et al. (2010) ανέλυσαν την προαποπτωτική δράση της βιολασεΐνης από τον *C. violaceum* CCT 3496 κατά του όγκου Ehrlich ascites *in vivo*

και *in vitro*, ενώ σε άλλη επιστημονική μελέτη παρουσίασε ενεργότητα κατά της λευχαιμίας MOLT-4 (Melo et al. 2000).

Επιπρόσθετα, πρόσφατα μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης της βιολασεΐνης σε κρέμες αντιηλιακής προστασίας, καθώς αυξάνει τον βαθμό SPF (Suryawanshi et al. 2015), ενώ η εν λόγω μοβ χρωστική έχει χρησιμοποιηθεί και ως βαφή φυσικών και συνθετικών υφασμάτων (Shirata et al. 2000).

Ακόμη η βιολασεΐνη διαθέτει αντιοξειδοτική δράση. Μελέτες σχετικές με την ικανότητα της βιολασεΐνης και των συμπλοκών με την β-κυκλοδεξτρίνη να προλαμβάνουν το γαστρικό έλκος σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα, αναφέρουν πως μπορεί να σχετίζεται με την προστασία από υπεροξειδωτική βλάβη σε συνδυασμό με πιθανή διεγερτική δράση των βλεννογόνων αμυντικών μηχανισμών. Η βιολασεΐνη από τον *Pseudoalteromonas sp.* (DSM 13623) έχει προταθεί για οικονομική παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα και εφαρμογή σε φιλικά προς το περιβάλλον προϊόντα, στα τρόφιμα, στα υφάσματα και στη βιομηχανία παιχνιδιών (Πατέντα: Tan et al. 2002). Επιπρόσθετα, εφόσον η βιολασεΐνη έχει επιδείξει αντιμυκητιακές ιδότητες και δράση κατά εντόμων, έγινε παρασκευή εντομοκτόνου που περιέχει την μοβ ουσία ή παράγωγά της, το οποίο απέτρεψε την μυκητίαση φυτών και την προσβολή φυτών από παράσιτα, όπως το *Meloidogyne sp.* που προσβάλλει τα καρπούζια (Πατέντα: Baek et al. 2007). Μικροσωματίδια πολυκαπρολακτόνης (PCL) που περιείχαν εγκλεισμένη βιολασεΐνη παρασκευάστηκαν για χρήση σε φαρμακευτικά και καλλυντικά σκευάσματα (Duran et al. 2004). Ακόμη έχει μελετηθεί η εφαρμογή της βιολασεΐνης ή παραγώγων της σε καλλυντικά προϊόντα, για περιποίηση του δέρματος και των μαλλιών (σαπούνια, αντιιδρωτικά, κραγιόν, μακιγιάζ των ματιών) (Πατέντα: Meiring et al. 2007). Τέλος, η Sigma-Aldrich (ΗΠΑ) εμπορροποίησε την βιολασεΐνη από τον *J. lividum* (≥85%) (Durán et al. 2012).

2.6.3 Οικονομική Βιωσιμότητα

Η αγορά των βιολογικά παραγόμενων μικροβιακών χρωστικών είναι δύσκολο να εκτιμηθεί, είτε λόγω έλλειψης στατιστικών δεδομένων και της διεσπαρμένης παραγωγής των χρωστικών από πολλές μικρές εταιρείες παγκοσμίως. Αν και υπάρχει μια αυξανόμενη προτίμηση βακτηριακών χρωστικών από τις βιομηχανίες τροφίμων, βαφής υφασμάτων, φαρμακευτικών και καλλυντικών, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι φυσικές χρωστικές πιθανόν να είναι πιο ακριβές από

τα αντίστοιχα συνθετικά ανάλογα. Για παράδειγμα, το β-καροτένιο που παράγεται από βακτήρια κοστίζει περίπου 1000 US$/kg, έναντι 500 US$/kg κόστους των συνθετικών ανάλογων.

Η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών ικανά να αξιοποιήσουν ανανεώσιμα υποστρώματα θα καταστήσει συγκρίσιμη την τιμή των βακτηριακών και συνθετικών χρωστικών. Επομένως, η ανακάλυψη φθηνών υποστρωμάτων για την παραγωγή χρωστικών θα μειώσει το κόστος παραγωγής. Αν και η τιμή των βακτηριακών χρωστικών θα είναι σχετικά υψηλότερη συγκριτικά με τις συνθετικές βαφές, το κόστος παραγωγής μπορεί να μειωθεί μέσω της:

- χρήσης αγροτικών υπολειμμάτων, όπως απόβλητα ανανά, ζαχαροκάλαμου, βαγάσσης και μελάσσας, ως μέσο ανάπτυξης για την καλλιέργεια βακτηρίων
- χρήσης τοπικά απομονωμένων βακτηριακών στελεχών άγριου τύπου (wild type bacterial strains), εξαλείφοντας το κόστος τυχόν γενετικών αλλοιώσεων κ.α.
- χρήσης απλών τεχνικών εκχύλισης

Οι βακτηριακές χρωστικές θα προσφέρουν εξαιρετικές ευκαιρίες λόγω του φιλικού προς το περιβάλλον χαρακτήρα τους, της βιοαποικοδομησιμότητας τους και του τεχνολογικού τρόπου παραγωγής τους.

3 ΦΥΣΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

3.1 Εισαγωγή

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν βιολογικά πολυμερή που απαρτίζονται από μονοσακχαρίτες συνδεδεμένους με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πολυσακχαρίτες ως φυσικά πολυμερή συναντώνται σχεδόν σε όλους τους ζώντες οργανισμούς, όπως είναι είναι τα φύκια (αλγινικό, άγαρ-άγαρ, καραγενάνη), τα φυτά (κυτταρίνη, ημικυτταρίνες, πηκτίνη, κόμμι γκουάρ, γαλακτομαννάνη, γλυκομαννάνη), οι μικροοργανισμοί (δεξτράνη και κόμμι ξανθάνης) και τα ζώα (υαλουρονάνη, χονδροϊτίνη, χιτίνη και ηπαρίνη) (Σχήμα 18). Η βιολογική λειτουργία των πολυσακχαριτών σχετίζεται συνήθως με τη δομή ή την αποθήκευση. Για παράδειγμα, το άμυλο είναι ένας πολυσακχαρίτης αποθήκευσης στα φυτά, ενώ η κυτταρίνη και η χιτίνη είναι δομικοί πολυσακχαρίτες που απαντώνται αντίστοιχα στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών και τον εξωσκελετό των καρκινοειδών. Λόγω της ποικιλομορφίας των δομών και των ιδιοτήτων τους, οι πολυσακχαρίτες αποτελούν ενδιαφέρουσες ανανεώσιμες πηγές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υλικά υψηλής απόδοσης.

Σχήμα 18: Πολυσακχαρίτες στη φύση.

Τα περισσότερα από αυτά είναι βιολογικά αδρανή, ασφαλή για τον άνθρωπο και σε αφθονία στο φυσικό περιβάλλον. Έχουν πολλά άλλα πλεονεκτήματα όπως το χαμηλό κόστος, η βιοαποδομησιμότητα στο οικοσύστημα, η πολυλειτουργικότητα, η χημική δραστικότητα, η χηλική δράση (chelating) και απορροφητική ικανότητα στην επεξεργασία λυμάτων. Ακόμη προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές (Karaki et al. 2016).

Ωστόσο, η χρήση πολυσακχαριτών στην αρχική τους μορφή δεν είναι πάντοτε δυνατή, λόγω μειονεκτημάτων, όπως πιθανή χαμηλή διαλυτότητα, μη κατάλληλη ισορροπία υδροφιλικότητας-υδροφοβικότητας. Γι' αυτό το λόγο έχουν διερευνηθεί ποικίλοι τρόποι τροποποίησης της πολυμερικής τους δομής ώστε να αποκτήσουν τις επιθυμητές φυσικές, χημικές και μηχανικές ιδιότητες. Οι πολυσακχαρίτες έχουν πολλές εξαιρετικά δραστικές ομάδες (ακεταμιδο-, αμινο-, καρβοξυλ- και/ή υδροξυλ-) οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για λειτουργικοποίηση των μακρομορίων. Ακόμη, εξαιτίας της παρουσίας πολλών υδροξυλομάδων στη δομή τους χαρακτηρίζονται από υψηλή υδροφιλικότητα (Liu et al. 2008). Με την πάροδο των χρόνων έχουν διεξαχθεί πολλές χημικές αντιδράσεις τροποποίησης των πολυσακχαριτών, όπως οξείδωση, θείωση, εστεροποίηση, αμίδωση, που περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ομάδες καρβοξυλίου, αμινομάδας ή υδροξυλίου που κατανέμονται κατά μήκος της δομής του πολυσακχαρίτη με στόχο τη δημιουργία παραγώγων με συγκεκριμένες ιδιότητες (D'Ayala et al. 2008; Yang et al. 2011b). Οι χημικές αυτές διεργασίες συνήθως οδηγούν σε υψηλές αποδόσεις μετατροπής. Ωστόσο, τα κύρια μειονεκτήματά τους παραμένουν η τοξικότητα των χρησιμοποιούμενων χημικών αντιδραστηρίων και η έλλειψη εκλεκτικότητας. Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών, η επιστημονική κοινότητα έχει στραφεί στην αναζήτηση βιοτεχνολογικών φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών, όπως είναι οι ενζυμικές διεργασίες. Κύρια πλεονεκτήματα μιας ενζυμικής διεργασίας είναι η υψηλή εκλεκτικότητα και η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, όπως επίσης και οι ήπιες συνθήκες αντίδρασης και η αποφυγή δημιουργίας παραπροϊόντων, σε αντίθεση με τις χημικές διεργασίες όπου οι συνθήκες δεν είναι ήπιες, π.χ. υψηλές θερμοκρασίες και χρήση ισχυρών οξέων για νίτρωση και σουλφόνωση ή χρήση πολύ δραστικών ενώσεων, όπως ο χλωρομεθυλ-μεθυλαιθέρας, το αιθυλενοξείδιο ή όξινα χλωρίδια (McCleary 1986; Gübitz and Paulo 2003; Karaki et al. 2016).

3.2 Σημαντικοί πολυσακχαρίτες

Η γαλακτομαννάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μαννόζες στον κορμό και από γαλακτόζες ως πλευρικές ομάδες. Πιο συγκεκριμένα οι μαννόζες συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 και στις 6 θέσεις τους ενώνονται με τις γαλακτόζες με α-1,6. Αναλόγως την αναλογία μαννόζης γαλακτόζης έχουμε: κόμμι fenugreek (μαννόζη: γαλακτόζη ~ 1: 1), κόμμι γκουάρ (μαννόζη: γαλακτόζη ~ 2: 1), κόμμι τάρα (μαννόζη: γαλακτόζη ~ 3: 1), κόμμι χαρουπιού (μαννόζη: γαλακτόζη ~ 4: 1). Η μαννάνη είναι ένας κοινός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες μαννόζης ενωμένες μεταξύ τους με β-1,4 δεσμό. Η β-γλυκάνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται αποκλειστικά από γλυκόζες ενωμένες με β-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Αναλόγως τη θέση στην οποία ενώνονται οι γλυκόζες αλλάζουν και κάποιες από τις ιδιότητές της γλυκάνης. Οι πιο δραστικές μορφές της είναι εκείνες που περιλαμβάνουν μονάδες γλυκόζης ενωμένες με β-1,3 δεσμούς και β-1,6 πλευρικά. Μια από τις πιο κοινές πηγές γλυκάνης είναι το τοίχωμα του ζυμομύκητα *Saccharomyces cerevisiae*. Γλυκάνη εξάγεται επίσης από τη βρώμη και το κριθάρι και σε πολύ μικρότερο βαθμό από σίκαλη και σιτάρι (Heinze et al. 2006). Η χιτοζάνη είναι ένας φυσικός κατιονικός πολυσακχαρίτης που παράγεται με αλκαλική Ν-απακετυλίωση της χιτίνης, το δεύτερο πιο άφθονο φυσικό πολυμερές μετά την κυτταρίνη (Tharanathan and Kittur 2003). Η χιτοζάνη αποτελείται από β-(1-4)-D-γλυκοζαμίνη συνδεδεμένη σε κατάλοιπα *N*-ακετυλ-D-γλυκοζαμίνης. Η εμπορική χιτοσάνη εξάγεται από βιομηχανικά απόβλητα οστρακοειδών καθώς και από τα μυκήλια διαφόρων μυκήτων, που περιέχουν κυρίως χιτίνη.

Η γλυκομαννάνη κονγιάκ (KGM) αποτελεί έναν φυσικό πολυσακχαρίτη που συναντάται στους κόνδυλους του φυτού κογιάκ *Amorphophallus*. Αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης και D-μαννόζης συνδεδεμένες με β-1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς και μοριακή αναλογία 1.0:1.6. Ακόμη μπορεί να υπάρχουν μικρού μήκους διακλαδώσεις στη C-3 θέση των μονάδων μαννόζης και ακετυλομάδες τυχαία στη θέση C-6 των επανλαμβανόμενων μονάδων. Η συχνότητα των ακετυλομάδων ποικίλει από 1/6 έως 1/20 μονάδες σακχάρων (Smith and Srivastava 1959; Kato and Matsuda 1969; Koroskenyi and McCarthy 2001). Η KGM χαρακτηρίζεται από πολύ καλή βιοαποικοδομησιμότητα, βιοσυμβατότητα και μοναδικές φαρμακολογικές λειτουργίες.

Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που παράγεται από αλυσίδες γλυκάνης που προκύπτουν από τη σύνδεση δακτυλίων ανυδρογλυκόζης με β-(1-4) δεσμό (Klemm et al. 1998). Βασική εμπορική προέλευση της κυτταρίνης είναι το ξύλο. Άλλες πηγές προέλευσης είναι τα

φυτά, τα βακτήρια, τα χιτωνόζωα και τα φύκη (πράσινο, γκρι, κόκκινο, κίτρινο-πράσινο). Η κυτταρίνη χαρακτηρίζεται από υψηλή αντοχή και ευκαμψία, βιοσυμβατότητα, μη τοξικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα. Οι αιθέρες και οι εστέρες κυτταρίνης είναι δύο κύριες ομάδες παραγώγων κυτταρίνης που παρουσιάζουν διάφορες φυσικοχημικές και μηχανικές ιδιότητες. Οι ομάδες υδροξυλίου της κυτταρίνης αποτελούν τις δραστικές θέσεις που στοχεύουν τα ένζυμα στις βιολογικές διαδικασίες.

Η πηκτίνη είναι ένας πολύπλοκος ανιονικός πολυσακχαρίτης που περιέχεται στα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα. Η πηκτίνη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονάδες πολυ-α-1,4-γαλακτουρονικού οξέος (περίπου 70 %), διακοπτόμενες από υπολείμματα L-ραμνόζης με πλευρικές αλυσίδες αποτελούμενες από ουδέτερα σάκχαρα, κυρίως L-ραμνόζη, L-αραβινόζη και D-γαλακτόζη.

Το άμυλο είναι ένα πολυμερές που αποτελείται από μονάδες α-D-γλυκόζης και απαρτίζεται από 20-30 % αμυλόζη και 70-80 % αμυλοπηκτίνη (Karaki et al. 2016). Το άμυλο είναι ένα από τα πιο άφθονα βιοπολυμερή της φύσης και υπάρχει σε φυτά (σιτάρι, ρύζι, αραβόσιτο, ταπιόκα και πατάτα) ως υλικό αποθήκευσης ενέργειας (Young 1984). Είναι βιοσυμβατό, βιοδιασπώμενο, μη τοξικό, χαμηλού κόστους και προέρχεται από ανανεώσιμες πηγές. Επιπλέον, το άμυλο είναι αδιάλυτο σε κρύο νερό, αλλά είναι πολύ υγροσκοπικό και δεσμεύει το νερό αντιστρεπτά. Το φυσικό και τροποποιημένο άμυλο χρησιμοποιείται τόσο για εφαρμογές σε τρόφιμα όσο και για μη διατροφικές χρήσεις, όπως η βιομηχανία χαρτιού και κλωστοϋφαντουργίας, η φαρμακευτική βιομηχανία και τα συστήματα διανομής φαρμάκων (Kumar et al.; Guo et al. 2002; Rajpurohit et al. 2010).

3.3 Ενζυμική τροποποίηση πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες διαθέτουν σημαντικές ιδιότητες, όπως η αμφιφιλική τους φύση, η μη τοξικότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα και συναντώνται στα περισσότερα αγροτικά προϊόντα και υπολείμματα. Οι πολυσακχαρίτες, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ως παράγοντες πηκτωματοποίησης, σταθεροποιητές, κροκιδωτικά, ως υλικά εγκλεισμού/ ενθυλάκωσης σε διάφορες εφαρμογές, όπως τα τρόφιμα, τα φάρμακα, σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας σε προϊόντα χάρτου και κόλλες (Cheng and Gu 2012). Για πολλές από τις εν λόγω εφαρμογές, οι πολυσακχαρίτες χρειάζονται δομικές τροποποιήσεις ώστε να βελτιωθούν ή να αλλάξουν οι ιδιότητές τους. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται πολλά παραδείγματα χημικής

τροποποίησης πολυσακχαριτών. Ενδεικτικά ο εστέρας κυτταρίνης οξικού παράγεται με χρήση ενός μίγματος οξικού οξέος και οξικού ανυδρίτη παρουσία θειικού οξέος ως καταλύτη (March 1992). Ακόμη στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά ακετυλίωσης ινών κυτταρίνης σε αδρανή διαλύτη, όπως το τολουόλιο, με χρήση υπερχλωρικού οξέος ως καταλύτη (Doyle et al. 1986). Οι εμπορικοί εστέρες αμύλου παράγονται σε υδατικό περιβάλλον με χρήση ανυδρίτων και NaOH ως καταλύτη (Tupa et al. 2013),

Ωστόσο, με την πάροδο των χρόνων και την εξέλιξη της βιοτεχνολογίας, η βιοκατάλυση έχει ενταχθεί και στο κομμάτι της σύνθεσης και τροποποίησης πολυσακχαριτών. Ακόμη τα ένζυμα που δρουν ως βιοκαταλύτες παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως τοποεκλεκτικότητα και η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα στο οποίο δρουν και ως εκ τούτου δεν παράγονται ανεπιθύμητα παραπροϊόντα (McCleary 1986; Gübitz and Paulo 2003; Cheng et al. 2005). Επιπρόσθετα, οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται υπό ήπιες συνθήκες με αποτέλεσμα συνήθως τα τελικά προϊόντα να μην έχουν έντονο χρώμα ή μυρωδιά. Ακόμη είναι αξιοσημειώτο πως οι τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες δεν χρειάζεται να έχουν υψηλό βαθμό υποκατάστασης (degree of substitution, DS), δηλαδή mol πρόσθετης ουσίας ανά mol επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας πολυσακχαρίτη, ώστε να αποκτήσουν τις επιθυμητές ιδιότητες. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις τροποποίησης πολυσακχαριτών, όπως είναι η εστεροποίηση, η υδρόλυση, η οξείδωση, η αμιδίωση και η γλυκοζυλίωση. Με αυτές τις αντιδράσεις, είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί προσθήκη συγκεκριμένων λειτουργικών ομάδων επί των πολυσακχαριτών, όπως πολικών, φορτισμένων, υδρόφοβων ή προσαρμοσμένων υποκαταστατών, ή μείωση του μοριακού βάρους του πολυμερούς ή και διάσπαση ανεπιθύμητων δομών (Cheng and Gu 2012).

Η εστεροποίηση πολυσακχαριτών επιτυγχάνεται με βιοκαταλύτες εστεράσες, λιπάσες, κουτινάσες και πρωτεάσες και έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της υδροφοβικότητας του πολυμερούς, τη βελτίωση της κατακράτησης νερού και τη διαπερατότητα πολυμερικών υμενίων. Υπάρχουν πολλές αναφορές ενζυμικής σύνθεσης εστέρων σακχάρων σε οργανικούς διαλύτες, υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SCCO2), ιοντικά υγρά (άλατα σε υγρή μορφή, ILs) ή συστήματα πολλών διαλυτών με στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας της διεργασίας σύνθεσης για εντέλει βιομηχανική εφαρμογή (Chang and Shaw 2009). Η μηχανική διαλυτών και η πρωτεϊνική μηχανική μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την

αποτελεσματικότητα, την εξειδίκευση και τη σταθερότητα των ενζύμων κατά τη διεργασία σύνθεσης των υδατανθρακικών εστέρων.

Ενδεικτικά, έχει πραγματοποιηθεί μελέτη ακυλίωσης αμύλου με σκοπό την μείωση της ευκολίας πέψης τους, την αύξηση του ιξώδους και την αύξηση της υδροφοβικότητάς. Το άμυλο κασάβας και αραβοσίτου ακυλιώθηκε με λιπαρά οξέα που ανακτήθηκαν από έλαιο καρύδας, χρησιμοποιώντας λιπάση από τον *T. lanuginosus* και λιπάσες από μύκητες και βακτήρια (Rajan and Abraham 2006; Rajan et al. 2006; Rajan et al. 2008). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε οργανικούς διαλύτες, υπό ακτινοβολία μικροκυμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το άμυλο ακυλιώνεται στις πρωτοταγείς υδροξυλομάδες του, οδηγώντας σε ένα πιο υδρόφοβο θερμοπλαστικό πολυμερές με χρήση στη βιομηχανία πλαστικών, στη φαρμακευτική βιομηχανία, ως φορέας για συστήματα στοχευμένης χορήγησης φαρμάκων και σε βιοϊατρικές εφαρμογές όπως σε υλικά για σταθεροποίηση και αντικατάσταση οστών. Οι (Chen et al. 2013) μελέτησαν την ακυλίωση του πολυσακχαρίτη lily LP σε οργανικό διαλύτη, σε ILs και σε σύστημα IL-οργανικού διαλύτη, με χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης PSL-C από τον *Burkholderia cepacia*. Ο πιο κατάλληλος οργανικός διαλύτης αποδείχθηκε το φιλικό προς το περιβάλλον 2-μεθυλτετραυδροφουράνιο (MeTHF). Ένα ακόμη παράδειγμα αποτελεί η τροποποίηση κυτταρίνης σε άνυδρη πυριδίνη παρουσία της πρωτεάσης Subtilisin Carsberg. Η αντίδραση ήταν τοποεκλεκτική και έλαβε χώρα στη θέση 1-Ο του δακτυλίου της δομικής μονάδας (Xie and Hsieh 2001). Οι εστέρες κυτταρίνης βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή ινών, πλαστικών, φιλμ, καλλυντικών και φαρμάκων (Fischer et al. 2008; Shokri and Adibki 2013).

Επιπρόσθετα, στη βιβλιογραφία γίνεται αναφορά στη τοποεκλεκτική ακυλίωση της KGM με οξικό βινυλεστέρα σε σύστημα χωρίς διαλύτη, με χρήση του Novozym 435 ως βιοκαταλύτη, όπου εκτιμήθηκε ο βαθμός υποκατάστασης (DS) της τροποποιημένης KGM. Σε αυτή την μελέτη ερευνήθηκε η επίδραση διάφορων παραγόντων, όπως είναι η ενεργότητα νερού (aw), η θερμοκρασία της αντίδρασης, η ανάδευση, το ενζυμικό φορτίο και το μοριακό βάρος της KGM. Οι βέλτισες συνθήκες ακυλίωσης που υπολογίστηκαν είναι ενεργότητα νερού 0.84, θερμοκρασία 50 °C, ανάδευση 200 rpm και ενζυμικό φορτίο 400 U/mL. Ακόμη ο βαθμός υποκατάστασης της τροποποιημένης KGM μειώνεται με αύξηση του μοριακού της βάρους. Τέλος, η ακυλίωση παρουσίασε τοπεκλεκτικότητα με την εστεροποίηση να πραγματοποιείται στη θέση 6-Ο (στο έκτο άτομο άνθρακα της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας (Chen et al. 2006a).

Τροποποιημένες μορφές της KGM έχει αποδειχθεί στη βιβλιογραφία πως μπορεί να βρουν εφαρμογή ως φάρμακα, ως φιλικοί προς το περιβάλλον γαλακτοματοποιητές, ως φορείς φαρμακευτικών ουσιών (Du et al. 2005, Gan et al. 2000, Tian et al. 1998). Ενδεικτικά, η ακετυλιωμένη KGM αποτελεί μία ένωση υποψήφια για χρήση για την μείωση των επιπέδων χοληστερίνης στο αίμα και ως εκ τούτου για την πρόληψη της στεφανιαίας νόσου (Koroskenyi and McCarthy 2001). Ωστόσο, η τροποποίηση της KGM τοποεκλεκτικά καθίσταται δύσκολη με τις συμβατικές μεθόδους και πρέπει να ακολουθηθούν βήματα χρονοβόρα και δαπανηρά. Επιπρόσθετα, οι καταλύτες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση της KGM μπορεί να προκαλέσουν ανησυχία όταν τα τελικά προϊόντα προορίζονται για χρήση σε καλλυντικά, τρόφιμα και φάρμακα. Μία πολύ ελκυστική εναλλακτική οδός αποτελεί η χρήση βιοκαταλυτών που καθιστά τη διεργασία περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον και έχει σαν αποτέλεσμα τοποεκλεκτική τροποποίηση του τελικού υλικού. Στη βιβλιογραφία έχει επιτευχθεί η ενζυμική τροποποίηση διάφορων πολυσακχαριτών. Η ενζυμική σύνθεση εστέρων δεν ευνοείται θερμοδυναμικά σε υδατικά συστήματα. Μία προσέγγιση αποτελεί η αντικατάσταση του νερού με έναν οργανικό διαλύτη, ενώ μπορεί να γίνει χρήση και ενός ενεργοποιημένου εστέρα -συνήθως βινυλεστέρα- ως ακυλο-δότη (Klibanov 2001). Οι βινυλεστέρες είναι γνωστοί για την υψηλή τους δραστικότητα σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης, καθώς η βινυλ-αλκοόλη που σχηματίζεται μέσω ταυτομερισμού μετατρέπεται σε ακεταλδεΰδη, καθιστώντας την αντίδραση μη αντιστρεπτή. Οι λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο παρελθόν για ένα μεγάλο εύρος στερεοεκλεκτικών και τοποεκλεκτικών ακυλιώσεων υποστρωμάτων σε μη υδατικά συστήματα. Οι Chen et al. (2006b) πραγματοποίησαν την ακυλίωση της KGM με χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης Novozym 435 σε τριτοταγής βουτανόλη επιτυγχάνοντας τοποεκλεκτικότητα στη θέση 6-O. Την ίδια περίοδο η ίδια επιστημονική ομάδα πραγματοποίησε την ακυλίωση της KGM με χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης Novozym 435 σε σύστημα χωρίς διαλύτη, ώστε να καθίσταται η διαδικασία λιγότερο δαπανηρή και περισσότερο φιλική προς το περιβάλλον, αποφεύγοντας παράλληλα όποια επιμόλυνση του τελικού προϊόντος (Chen et al. 2006a).

Οι Topakas et al. (2010) μελέτησαν την εξειδίκευση τριών ανασυνδυασμένων CE-2 εστερασών από τους *C. japonicus* και *C. thermocellum* (*Ct*CE2) τόσο ως προς την υδρολυτική όσο και ως προς την συνθετική τους ικανότητα των μονο- και δισακχαριτών γλυκοπυρανόζης και μαννοπυρανόζης. Και τα τρία ένζυμα έδειξαν ισχυρή προτίμηση για υδρόλυση στην 6-O

θέση των αλδοεξοζών. Αυτή η τοποεκλεκτικότητα είναι διαφορετική από εκείνη των τυπικών εστέρων του οξικού οξέος της ξυλάνης (AcXEs). Σε υδατικό μέσο κορεσμένο με οξικό βινυλεστέρα, οι CE-2 εστεράσες καταλύουν την μετεστεροποίηση στην ίδια θέση, δηλαδή στην πρωτοταγή υδροξυλομάδα των μονο- και δισακχαριτών προς παραγωγή ακετυλιωμένης γλυκοπυρανόζης και μαννοπυρανόζης. Η ξυλόζη και οι ξυλοολιγοσακχαρίτες δεν ακετυλιώθηκαν, γι' αυτό το λόγο οι CE-2 εστεράσες που εξετάστηκαν αποτελούν 6-O-απακετυλάσες.

3.4 Μέθοδοι ανάλυσης τροποποίησης πολυσακχαριτών

Ο συνδυασμός νέων τεχνικών εστεροποίησης και κατανόησης της σχέσης δομής-ιδιότητας του πολυσακχαρίτη είναι το κλειδί για την ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας και την ανάπτυξη "έξυπνων" υλικών για διάφορες εφαρμογές.

Η μέθοδος FTIR αποτελεί μία τεχνική που βοηθά στην κατανόνηση των δομικών χαρακτηριστικών των τροποποιημένων πολυσακχαριτών. Ενδεικτικά ο εστερικός δεσμός των εστεροποιημένων πολυμερών αποδίδεται ως μία κορυφή στα 1740–1750 cm^{-1} που οφείλεται στις ισχυρές δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού C=O (Tupa et al. 2013).

Ο προσδιορισμός του DS για διάφορα παράγωγα τροποποιημένων πολυσκχαριτών μπορεί να πραγματοποιηθεί με ογκομετρική τιτλοδότηση, όπως περιγράφεται στις περιπτώσεις ενζυμικής ακυλίωσης αμύλου με ελαϊκό οξύ, ή κυτταρίνης με παλμιτικό, λαυρικό και στεατικό μεθυλεστέρα (Adak and Banerjee 2016; Wang et al. 2017). Επιπρόσθετα στη βιβλιογραφία περιγράφεται έμμεσος προσδιορισμός του DS μέσω μεθανόλυσης ενζυμικά ακυλιωμένου αμύλου και ποσοτικοποίησης των μεθυλεστέρων που προκύπτουν με υγρή χρωματογραφία (GC) (Alissandratos et al. 2010).

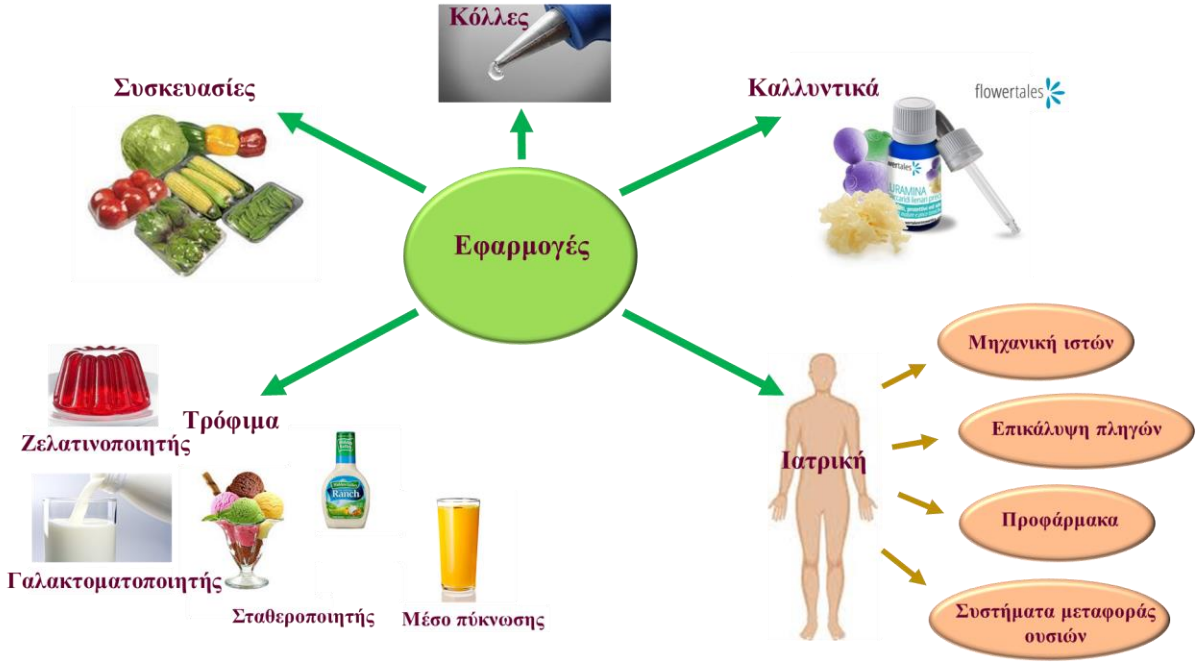
Η μέθοδος NMR (^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR) χρησιμοποιείται συχνά στην βιβλιογραφία για την ανάλυση της δομής τροποποιημένων πολυσακχαριτών, όπως στην περίπτωση της ακετυλιωμένης γαλακτομαννάνης και μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες ανάλογα με τις συνθήκες σύνθεσης και με τη σχέση δομής-ιδιοτήτων (Parvathy et al. 2005; Campestrini et al. 2013; Enomoto-Rogers et al. 2013).

Τέλος, οι τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες μπορούν να μελετηθούν και με πολλές ακόμη τεχνικές. Για παράδειγμα το οξικό και βουτυρικό άμυλο που παράχθηκε μέσω μιας οργανοκαταλυτικής οδού σε σύστημα χωρίς διαλύτη, με DS μεταξύ 0.06 και 1.54, μελετήθηκε

με SEM, θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και περίθλαση ακτίνων X (XRD). Η ανάλυση SEM έδειξε πως η κοκκώδης δομή του πολυσακχαρίτη διατηρήθηκε κατά την ακυλίωση, αν και οι ακυλιωμένοι κόκκοι είχαν σκληρότερες επιφάνειες, ρυτίδες, αυλακώσεις και παραμορφωμένες ζώνες εμφανίστηκαν σε κάποιους κόκκους με υψηλό DS. Η ανάλυση TGA έδειξε σταδιακή μείωση της περιεκτικότητας σε νερό των ακυλιωμένων αμύλων, καθώς και αξιοσημείωτες αλλαγές στις θερμικές τους ιδιότητες συναρτήσει της αύξησης του DS. Σύμφωνα με την ανάλυση XRD η ακετυλίωση οδήγησε σε χαμηλότερη κρυσταλλικότητα με αύξηση του DS, αν και τα χαρακτηριστικά του αμύλου αραβοσίτου A τύπου ήταν εμφανή ακόμη για μέγιστο DS ίσο με 1.23 (Tupa et al. 2013). Τέλος, διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) έχει μελετηθεί

3.5 Εφαρμογές πολυσακχαριτών

Οι πολυσακχαρίτες τροποποιημένοι και μη βρίσκουν εφαρμογή σε πληθώρα εφαρμογών, λόγω των χαρακτηριστικών τους και κυρίως της βιοσυμβατότητάς και βιοαποικοδομησιμότητας τους. Οι κυριότεροι τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή οι πολυσακχαρίτες απεικονίζονται στο Σχήμα 19 και είναι τα τρόφιμα, οι συσκευασίες, τα καλλυντικά και η Ιατρική.



Σχήμα 19: Εφαρμογές πολυσακχαριτών.

Αντίστοιχα στον Πίνακα 5 που ακολουθεί παρουσιάζονται αναλυτικά οι ιδιότητες ορισμένων πολυσακχαριτών που τους καθιστούν κατάλληλους για τα διάφορα πεδία στα οποία εφαρμόζονται (Karaki et al. 2016).

Πίνακας 5: Βιοτεχνολογικές εφαρμογές πολυσακχαριτών.

Πεδίο εφαρμογής	**Πολυσακχαρίτης**	**Ιδιότητες και εφαρμογές**
Τρόφιμα	Χιτοσάνη	Αντιμικροβιακές ιδιότητες, συντηρητική ουσία, βρώσιμο φιλμ, επιταχυντής απορρόφησης ασβεστίου και σιδήρου, εφαρμογής σε προϊόντα διαίτης
	Κυτταρίνη	Μέσο πύκνωσης, γαλακτοματοποιητής, σταθεροποιητής, επιφανειοδραστικές ιδιότητες, σχηματίζει φιλμ, μη θερμιδικός παράγοντας και συνδετικό υλικό σε τρόφιμα, πρόληψη της ανάπτυξης κρυστάλλων πάγου σε κατεψυγμένα
	Πηκτίνη	Σταθεροποιητής, ζελατινοποίηση, μέσο πύκνωσης
	Άμυλο	Μέσο πύκνωσης, σταθεροποιητής κατεψυγμένων, ενθυκάλωση γεύσεων
Βιοϊατρική	Χιτοσάνη	Αντιβακτηριακή δράση, αντιοξειδοτική δράση, αντικαρκινικός παράγοντας, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συτήματος, δράση κατά του έλκους, φορέας για στοχευμένη χορήγηση φαρμάκου
	Κυτταρίνη	Συμπιεσμένα δισκία, σιρόπια, κόκκοι, ημιστερεά παρασκευάσματα, διαδερμικά έμπλαστρα, οσμωτικά επικαλυμμένα συστήματα χορήγησης φαρμάκων, βιοσυγκολλητικά σκευάσματα (στοματικά, ρινικά, διαδερμικά, κολπικά), φάρμακα και λιποσωμικά σκευάσματα
	Πηκτίνη	Παρασκευάσματα επούλωσης τραυμάτων, ιατρικές κόλλες, μείωση χοληστερόλης, αναστολή της οξείδωσης των λιπιδίων, μείωση καρκίνου και μεταστάσεων, ενίσχυση του ανοσοποιητικού συτήματος, φορέας για χορήγηση φαρμάκων
	Άμυλο	Έκδοχο για φαρμακευτικά δισκία, παραγωγή αντιβιοτικών, βιταμινών και διαλυμάτων διαπίδυσης
Περιβάλλον και γεωργία	Χιτοσάνη	Επεξεργασία λυμάτων, επικάλυψη σπόρων ενεργοποιητής για φυτικά κύτταρα
	Πηκτίνη	Βρώσιμα φιλμ, κόλλες, υποκατάστατα χαρτιού, αφροί και πλαστικοποιητές
Καλλυντικά	Χιτοσάνη	Παράγοντας ενυδάτωσης σε κρέμες χεριών και σώματος, σαμπουάν και οδοντόκρεμες
	Κυτταρίνη	Παράγοντας ενυδάτωσης σε κρέμες προσώπου
	Πηκτίνη	Σταθεροποιητής για αντιγηραντική φροντίδα δέρματος

3.5.1 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν σημαντικά συστατικά στα τρόφιμα ως σταθεροποιητές, μέσα πύκνωσης ή παράγοντες διατήρησης υγρασίας σε γαλακτώματα, όπως η μαγιονέζα ή τα παγωτά. Οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται στην φυσική τους μορφή ή ύστερα από τροποποίηση ώστε να βελτιωθούν συγκεκριμένες ιδιότητες τους. Κάθε πολυσακχαρίτης παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες, χαμηλή διαλυτότητα (κυτταρίνη), υψηλή διαλυτότητα ή δυνατότητα διόγκωσης (άμυλο, κόμμι γκουάρ), χαμηλό ιξώδες (αραβική κόμμι), υψηλό ιξώδες (κόμμι γκουάρ), δυνατότητα πήξης (άγαρ) ή μη δυνατότητα πήξης (δεξτράνη). Τα υδροκολλοειδή είναι μία ετερογενής ομάδα πολυμερών μακράς αλυσίδας (πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες) που χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να σχηματίζουν ιξώδεις διασπορές και/ή πηκτές όταν διασπείρονται στο νερό. Στον Πίνακας 6 παρουσιάζονται οι λειτουργίες και οι εφαρμογές γνωστών υδροκολλοειδών (Stephen 1995).

Πίνακας 6: Λειτουργίες και εφαρμογές υδροκολλοειδών στα τρόφιμα.

Υδροκολλοειδές	**Λειτουργία**	**Εφαρμογή**
Γκουάρ ή κόμμι χαρουπιού	Σταθεροποιητής, κατακράτηση νερού	Γαλακτοκομικά, παγωτά, επιδόρπια, αρτοσκευάσματα
Καραγενάνες	Σταθεροποιητής, μέσο πύκνωσης, ζελατινοποίηση	Παγωτά, κρεατικά, σάλτσες, τάρτες
Άγαρ	Ζελατινοποίηση	Γαλακτοκομικά, κρεατικά, είδη ζαχαροπλαστικής
Αραβική κόμμι	Σταθεροποιητής, μέσο πύκνωσης, γαλακτοματοποιητής, παράγοντας ενθυλάκωσης	Είδη ζαχαροπλαστικής, αρτοσκευάσματα, σάλτσες, αναψυκτικά
Πηκτίνες	Σταθεροποιητής, μέσο πύκνωσης, γαλακτοματοποιητής	Μαρμελάδες, αναψυκτικά, είδη ζαχαροπλαστικής, γαλακτοκομικά
Αλγινικό οξύ	Σταθεροποιητής, ζελατινοποίηση	Παγωτά, αναψυκτικά
Κόμμι ξανθάνη	Σταθεροποιητής, μέσο πύκνωσης	Σάλτσες, αναψυκτικά, γαλακτοκομικά, αρτοσκευάσματα
CMC κυτταρίνη	Σταθεροποιητής, μέσο πύκνωσης, κατακράτηση νερού	Παγωτά, σιρόποια, μίγματα κέικ, κρεατικά
Μεθυλική κυτταρίνη	Ζελατινοποίηση, σταθεροποιητής, κατακράτηση νερού	Αρτοσκευάσματα, τρόφιμα διαίτης
Άμυλα	Σταθεροποιητής, γαλακτοματοποιητής	Αρτοσκευάσματα, σούπες, είδη ζαχαροπλαστικής

Ενδεικτικά, στα σορμπέ η έλλειψη λιπαρών ουσιών αντισταθμίζεται από κατάλληλο συνδυασμό υδροκολλοειδών. Η χαμηλότερη ενέργεια των υδροκολλοειδών αποτελεί καθοριστική ιδιότητα για τη χρήση τους σε προϊόντα υγιεινής διατροφής και σε προϊόντα που προορίζονται για διαβητικούς.

Η προσθήκη παραγώγων κυτταρίνης σε τρόφιμα οδηγεί σε προϊόντα προστιθέμενης αξίας. Ενδεικτικά η προσθήκη μεθυλικής κυτταρίνης (0.6–2.0 %) σε μίγμα γαρίδας προσδίδει καλή εκβολή του κρύου προϊόντος και θερμοσταθερότητα κατά το τηγάνισμα (Llorca et al. 2005). Οι σάλτσες, οι σούπες και τα σιρόπια αντιπροσωπεύουν ένα ευρύ φάσμα υγρών προϊόντων διατροφής που γενικά σταθεροποιούνται χρησιμοποιώντας υδροκολλοειδή, όπως τα παράγωγα κυτταρίνης. Η καρβοξυμεθυλ-κυτταρίνη (CMC) αποτελεί ένα μέσο πύκνωσης σε συστήματα όπου η συγκέντρωση διαλυτών στερεών είναι αρκετά υψηλή (45-60 %) και παράγει διαφανή διαλύματα, όπως και απαιτείται αυτή την κατηγορία προϊόντων. Οι κυτταρίνες χρησιμοποιούνται συχνά σε γαλακτωματοποιημένα προϊόντα διατροφής. Τα πιο κοινά γαλακτώματα είναι οι σάλτσες, στις οποίες οι δύο κυτταρίνες που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι οι υδροξυπροπυλ-μεθυλ-κυτταρίνη (HPMC) και μικροκρυσταλλική κυτταρίνη (MCC). Τα κατεψυγμένα επιδόρπια περιλαμβάνουν συχνά υδροκολλοειδή όπως κυτταρίνη, ζελατίνες, άμυλα και καραγενάνες.

Το αρχικό άμυλο παρουσιάζει μειονεκτήματα, όπως ασθενείς μηχανικές ιδιότητες, υδρόφιλο χαρακτήρα και χαμηλή σταθερότητα. Ακόμη η πολικότητα του αμύλου οδηγεί σε υψηλή προσρόφηση νερού. Η εστεροποίηση του αμύλου με αντικατάσταση ομάδων υδροξυλίου με ομάδες εστέρων καθιστά το άμυλο πιο υδρόφοβο, με καλύτερη αντοχή σε εφελκυσμό και με μεγαλύτερη ελαστικότητα, καθώς μειώνεται η τάση για σχηματισμό ισχυρών δεσμών υδρογόνου λόγω των υδροξυλομάδων (Cyras et al. 2006). Τα εστεροποιημένα άμυλα βρίσκουν πολλαπλές εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων (κυρίως το οξικό άμυλο), όπως πρόσθετο που χρησιμοποιείται ως παχυντής, σταθεροποιητής, γαλακτωματοποιητής και συνδετικό υλικό κατεψυγμένων τροφίμων, ξηρά μείγματα, γευστικές γαρνιτούρες και σάλτσες. (Stephen 1995).

Οι γαλακτομαννάνες χρησιμοποιούνται κυρίως σε γαλακτοκομικά προϊόντα, υδατικά πηκτώματα με βάση τα φρούτα, προϊόντα σε σκόνη, διαιτητικά προϊόντα, σάλτσες και σούπες, κονσερβοποιημένα κρέατα και κατεψυγμένα. Η γαλακτομαννάνη γκουάρ ή η LBG (locust bean gum) χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής παγωτών σε συνδυασμό με καραγενάνη ή ξανθάνη. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών ξανθάνης-γαλακτομαννάνης σε τρόφιμα. Ο πιο κοινός

συνδυασμός είναι η ξανθάνη-γαλακτομαννάνη χαρουπιάς, με εφαρμογή σε σάλτσες, προϊόντα ζαχαροπλαστικής, πατέ, πουτίγκες, αρτοσκευάσματα και τροφές για κατοικίδια ζώα. Η καραγενάνη μπορεί επίσης να δράσει ως σταθεροποιητής σε συνδυασμό με το άμυλο, τη γαλακτομαννάνη ή την καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη σε διάφορα συστήματα όπως τα παγωτά (Stephen 1995). Ακόμη κατάλληλο μίγμα ξανθάνη-γαλακτομαννάνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο πήξης τροφίμων για ασθενείς με δυσφαγία (Jo et al. 2018).

3.5.2 Εφαρμογές στην παραγωγή μεμβρανών

Η συσσώρευση συνθετικών πλαστικών, κυρίως από συσκευασίες τροφίμων, προκαλεί ένα σοβαρό περιβαλλοντικό πρόβλημα, με αποτέλεσμα να γίνονται ερευνητικές προσπάθειες για την ανάπτυξη βιοαποικοδομήσιμων μεμβρανών και συσκευασιών. Τα βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για την παρασκευή βιοδιασπώμενων μεμβρανών πρέπει να είναι ανανεώσιμα, σε αφθονία και χαμηλού κόστους, ενώ μπορεί να προέρχονται και από απόβλητα ή παραπροϊόντα. Προς αυτή την κατεύθυνση μεταξύ των υλικών που χρησιμοποιούνται για συσκευασίες μελετήθηκαν πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, η χιτοσάνη, το άμυλο, η πηκτίνη, η καραγενάνη και το άλας αλγινικού οξέος. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες είναι ικανοί να σχηματίζουν μεμβράνες και επικαλύψεις με καλές ιδιότητες φραγμού έναντι αερίων όπως το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα, όπως επίσης και ικανοποιητικές μηχανικές ιδιότητες. Ακόμη οι βρώσιμα και βιοδιασπώμενες μεμβράνες αποτρέπουν την απώλειας υγρασίας, την απώλεια του αρώματος, την μεταφορά διαλυτής ουσίας ή την απορρόφηση νερού από το τρόφιμο (Cazón et al. 2017).

3.5.3 Εφαρμογές σε κόλλες

Τα περισσότερα σκευάσματα κόλλας βασίζονται σε πετροχημικούς πόρους [πολυ(οξικός βινυλεστέρας), φαινολη-φορμαλδεΰδη, πολυουρεθάνη] και τοξικές χημικές ουσίες [επιχλωροϋδρίνη, διφαινυλο-διισοκυανικό μεθυλένιο (MDI), διισοκυανικό τολουόλιο (TDI), φορμαλδεΰδη, πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs)]. Τα σκευάσματα αυτά είναι επιβλαβή για την υγεία και ρυπαίνουν το περιβάλλον. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη οικονομικά αποδοτικών, φιλικών προς το περιβάλλον και μη επιβλαβών για την υγεία συγκολλητικών ουσιών, που βασίζονται σε ανανεώσιμες βιολογικές πηγές, όπως οι πολυσακχαρίτες, αποτελεί μία καλή προοπτική. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες στη φύση αποτελούν φυσικά μέσα

συγκόλλησης σε επιφάνειες, συνεπώς μελετήθηκαν ως βιοσυγκολλητικές ουσίες για την κατασκευή προϊόντων χάρτου, για επισκευή επίπλων και άλλες εφαρμογές. Φυτικές κόλλες μπορούν να αποτελέσουν το αλεύρι σίτου, το άμυλο, το αραβικό κόμμι, η γλυκομανάνη, μεθυλ και καρβοξυμεθυλκυτταρίνη. Από τα ζώα και ειδικότερα από τα θαλάσσια ζώα, η χιτοσάνη παρουσιάζει την καλύτερη συγκολλητική ικανότητα. Οι μικροβιακοί πολυσακχαρίτες και ειδικότερα οι μικροβιακοί εξωπολυσακχαρίτες προσφέρουν μία μεγάλη ποικιλία μακρομορίων για βιομηχανικές εφαρμογές, ιδίως λόγω της συγκολλητικής τους ιδιότητας (Patel et al. 2013).

3.5.4 Εφαρμογές στα καλλυντικά

Επιπρόσθετα πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία καλλυντικών. Πολυσακχαρίτες όπως η χιτοσάνη και η κυτταρίνη χρησιμοποιούνται ως ενυδατικοί παράγοντες σε κρέμες, σαμπουάν οδοντόκρεμες, ενώ η πηκτίνη χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής και αντιγηραντικός παράγοντας (Dodane and Vilivalam 1998; Amnuaikit et al. 2011; Ro et al. 2015). Το προϊόν Hyaluramine της Flowertales® αποτελείται από 20 % γλυκοσαμινογλυκάνες που έχουν ιδιότητες ενυδάτωσης και αναδόμησης των κυττάρων, 5-10 % β-γλυκάνη που έχει αντιοξειδωτική ιδιότητα και 1-5 % κυτταρίνη που χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής.

3.5.5 Εφαρμογές στην Ιατρική

Οι πιο σύγχρονες εφαρμογές εστέρων πολυσακχαριτών είναι: στρώματα επικάλυψης, βιοδιασπώμενα πολυμερή, μεμβράνες, υδρογέλες για συστήματα ελεγχόμενης απελευθέρωσης-μεταφοράς ουσιών, οπτικά φιλμ. Ορισμένοι πολυσακχαρίτες έχουν βιολογική δραστικότητα, όπως φαίνεται στον Πίνακας 7 (Heinze et al. 2006). Επιπρόσθετα στην βιβλιογραφία αναφέρεται πως οι εστέρες αμύλου λιπαρών οξέρων βραχείας αλύσου συνεισφέρουν στην προστασία του παχέως εντέρου (Tupa et al. 2013). Ακόμη οι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται για την παρασκευή βιολογικής κόλλας. Ένα παράδειγμα για χρήση βιολογικής κόλλας σε ιατρική εφαρμογή περιγράφεται από τους Serrero et al. (2011). Η κοιλιακή κήλη είναι μια ασθένεια που απαιτεί συχνά εμφύτευση ενός πλέγματος εντός του κοιλιακού τοιχώματος. Για να ελαχιστοποιηθεί ο πόνος και οι μετεγχειρητικές επιπλοκές, η συγκόλληση του πλέγματος είναι μια βολική μέθοδος. Για το σκοπό αυτό, αναπτύχθηκε ένα βιοσυγκολλητικό σύστημα με βάση διαλύματα χιτοσάνης και τροποποιημένου αμύλου (οξειδωμένη μαλτοδεξτρίνη). Τέλος, τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται σε συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών

ουσιών. Οι Nurunnabi et al. πρόσφατα πραγματοποίησαν μία επισκόπηση όσον αφορά τα στοματικά συστήματα μεταφοράς ουσιών, βασισμένα στους πολυσακχαρίτες χιτοσάνη, ηπαρίνη, υαλουρονικό οξύ και β-γλυκάνη (Nurunnabi et al. 2017). Αντίστοιχα το αλγινικό άλας αποτελεί σύνηθες υλικό για εγκλεισμό β παγκρεατικών κυττάρων προς παραγωγή ινσουλίνης και αποκατάσταση της ευγλυκυμίας σε ασθενείς που πάσχουν από διαβήτη τύπου 1 (Hatziavramidis et al. 2013; Desai and Shea 2017).

Πίνακας 7: Εστέρες πολυσακχαριτών με βιολογική ενεργότητα.

Πολυσακχαρίτες θειϊκού οξέος	**Βιολογική ενεργότητα**
Curdlan	Αντιπηκτικές ιδιότητες, αντικαρκινικές ιδιότητες, δράση κατά του AIDS, δράση κατά της εγκεφαλικής ελονοσίας
Κυτταρίνη	Αντιπηκτικές ιδιότητες, επίδραση στην αρτηριακή πίεση, θεραπεία της περιοδοντίτιδας, δράση κατά του AIDS
Δεξτράνη	Αντιπηκτικές ιδιότητες, δράση κατά του AIDS
Ξυλάνη	Αντιπηκτικές ιδιότητες, αντικαρκινικές ιδιότητες
Σχιζοφυλλάνη	Δράση κατά του AIDS
Χιτίνη/ Χιτοσάνη	Αναστολή κυτταρικού πολλαπλασιασμού
Παλμιτοϋλ-δεξτράνη φωσφορικού	Αντικαρκινικές ιδιότητες
Ξυλάνη φωσφορικού	Αντιπηκτικές ιδιότητες
Δεξτράνη φωσφορικού	Ενίσχυση ανοσοποιητικού συστήματος
Χιτοσάνη φωσφορικού	Αποκατάσταση οστών, αντιφλεγμονώδης δράση

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Ένζυμα

Η εστεράση του οξικού οξέος *Ct*CE2 από το *Clostridium thermocellum* αγοράστηκε από την ZYTech, Lda (Lisbon, Πορτογαλία). Η εμπορική πρωτεάση Alcalase 2.4 L από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* και η λιπάση Lipolase 100T από τον μύκητα *T. lanuginosus* ήταν ευγενική χορηγεία της Novozymes (Bagsvaerd, Δανία). Η ανασυνδυασμένη κουτινάση *Fo*Cut5a από το μύκητα *F. oxysporum* εκφράστηκε ετερόλογα σε κύτταρα *E. coli* BL21 (DE3) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.1. Δύο εστεράσες του φερουλικού οξέος, μία τύπου B από το *Myceliophthora thermophila* (*Mt*faeC) και μία τύπου C από το *F. oxysporum* (*Fo*faeC), όπως επίσης και μία εστεράση του γλυκουρονικού οξέος από το μύκητα *M. thermophila* (*St*GE2) εκφράστηκαν ετερόλογα στη μεθυλότροφη ζύμη *Pichia pastoris* όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.2.

4.2 Μικροοργανισμοί

Ο μικροοργανισμός *Janthinobacterium lividum*, το στέλεχος 1522, χορηγήθηκε από την WAAG Society (TextileLab, Άμστερνταμ, Ολλανδία) και διατηρήθηκε στους -80 ºC σε Luria Bertani (LB) θρεπτικό μέσο που περιείχε 20 % γλυκερόλη. Οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* MRSA ATCC 43300, *Micrococcus luteus* ATCC 379, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* NCTC11994, *Enterobacter faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ATCC 47085, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258 και *Candida parapsilosis* ATCC 22019 αποκτήθηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC).

4.3 Υλικά

Οι μονοσακχαρίτες D-γλυκόζη (Glc), D-μαννόζη (Man), D-γαλακτόζη (Gal), L-αραβινόζη (Ara) και D-ξυλόζη (Xyl) και ο δισακχαρίτης D-κελλοβιόζη (Celb) αγοράστηκαν από την εταιρία Fluka Chemical (Buchs, Ελβετία). Η 1,4-β-μαννοβιόζη (β-Manb) και οι πολυσακχαρίτες γλυκομαννάνη κονγιάκ, γαλακτομαννάνη χαρουπιάς, 1,4-β-D-μαννάνη και β-γλυκάνη κριθής αποκτήθηκαν από την Megazyme (Wicklow, Ιρλανδία).

Τα μοντέλα-υποστρώματα τερεφθαλικός δις-2-υδροξυαιθυλεστέρας (bis(2-hydroxyethyl) terephthalate) (BHET), αδιπικός διμεθυλαιθέρας, και πολυκαπρολακτόνη (polycaprolactone) (PCL) αγοράστηκαν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Το πλεκτό PET και το πλεκτό και υφαντό PA 6.6 ύφασμα χορηγήθηκαν από την Colora SA (Θεσσαλονίκη, Ελλάδα). Το πλεκτό PET ύφασμα έχει τα εξής χαρακτηριστικά: πυκνότητα 50 στήλες/cm και 23 σειρές/cm, βάρος 52.90 g/m^2 και πάχος 42 μm. Το υφαντό PA ύφασμα διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: απλή ύφανση με 12 στημόνια/cm και 11 υφάδια/cm, 912.9 Denier, βάρος 238.67 g/m^2 και πάχος 359 μm. Το πλεκτό PA ύφασμα έχει απλή πλέξη με βάρος 12 g/m^2, 154.7 Denier με 15 σειρές/cm και 23 στήλες/cm και πάχος 309 μm. Τα συνθετικά υφάσματα πλύθηκαν με το απορρυπαντικό Felosan NFG (CHT Bezema, Tübingen, Γερμανία) για την απομάκρυνση παραφινών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πλέξη. Το ημικρυσταλλικό πολυγαλακτικό οξύ (PLA) 4042D αγοράστηκε από την NatureWorks® (Minnetonka, ΗΠΑ).

Τα αντιδραστήρια τερεφθαλικό οξύ (TPA), βενζοϊκό οξύ, βενζοϋλοχλωρίδιο, 2-χλωροαιθανόλη, διμεθυλφορμαμίδιο, τριαιθυλαμίνη, εξυλαμίνη, αδιπικός διμεθυλεστέρας, 2,4,6-τρινιτροβενζολοσουλφονικό οξύ (TNBS), 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH) και ισοπροπυλ-1-β-D-θειογαλακτοπυρανοζίτης (IPTG), το τριχλωροοξικό οξύ (TCA), η παρανιτροφαινόλη (pNPh), ο λαυρικός και βουτυρικός παρα-νιτροφαινυλεστέρας (pNPhL, pNPhB), όπως επίσης και οι βινυλεστέρες του οξικού, προπιονικού, βουτυρικού, δεκανικού, λαυρικού και κινναμικού και ο οξικός, προπιονικός και βουτυρικός μεθυλεστέρας αποκτήθηκαν από την Sigma (St. Louis, MO).

Οι δραστικές βαφές που χρησιμοποιήθηκαν για την βαφή των συνθετικών υφασμάτων είναι οι: Novacron Deep Cherry S–D, Novacron Yellow S-3R, Jakazol Black 133 % (Huntsman, Everberg, Βέλγιο) και Remazol Brilliant Blue R Special (CI Reactive Blue 19) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO).

Ο οξικός αιθυλεστέρας αγοράστηκε από την Applichem (Darmstadt, Γερμανία). Τα τριφθοροοξικό οξύ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) και τα ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο, τολουόλιο, οξικός αιθυλεστέρας, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη και θειικό οξύ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν βαθμού HPLC (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire). Το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και το μεθοξειδίου του νατρίου προμηθεύτηκε από την Sigma-

Aldrich (St. Louis, MO). Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια και οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού.

4.4 Θρεπτικά μέσα

Για την παραγωγή των επιθυμητών ενζύμων ή της βιολασεΐνης πραγματοποιήθηκαν καλλιέργειες διαφορετικών κυττάρων (*E. coli, P. pastoris* κ.ά.) στα κατάλληλα θρεπτικά μέσα οι συστάσεις τω οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακας 8 και Πίνακας 9.

Πίνακας 8: Συστάσεις θρεπτικών μέσων ανάπτυξης διάφορων μικροοργανισμών.

LB	**YPD**	**NB (NA για τρυβλίο)**	**Sabouraud**
1 % τρυπτόνη	1 % εκχύλισμα ζύμης	0.5 % πεπτόνη	4 % γλυκόζη
0.5 % εκχύλισμα ζύμης	2 % πεπτόνη	0.3 % εκχύλισμα κρέατος	1 % πεπτόνη
1% NaCl	2% γλυκόζη**	1.5 % άγαρ*	2 % άγαρ
1.5 % άγαρ*	2% άγαρ		pH 5.6

*για παρασκευή τρυβλίου, ** η γλυκόζη αποστειρώνεται ξεχωριστά για να αποφευχθεί η κρυστάλλωση της

Πίνακας 9: Συστάσεις θρεπτικών μέσων ανάπτυξης *P. pastoris.*

	BMGY (300 mL)		**BMMY** (1 L)	
εκχύλισμα ζύμης	3 g	30 mL νερό	10 g	100 mL νερό
πεπτόνη	6 g		20 g	
απιον. νερό	210 mL		800 mL	
ρυθμιστικό δ/μα φωσφορικού καλίου pH 6	30 mL		100 mL	
Yeast nitrogen base YNB	1.02 g		3.4 g	
Θειϊκό αμμώνιο	3 g		10 g	
γλυκερόλη 10 %	30 mL			
*βιοτίνη 0.02 %	600 μL		2 mL	
*μεθανόλη	-		0.5 % v/v	

*δεν αποστειρώνονται

4.5 Παραγωγή ενζύμων

4.5.1 Ετερόλογη έκφραση της κουτινάσης *Fo*Cut5a

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την έκφραση της κουτινάσης έχει προσδεθεί στον πλασμιδιακό φορέα pET22b(+), στον οποίο είχε απομακρυνθεί προηγουμένως η σηματοδοτική αλληλουχία pelB με τη χρήση κατάλληλου περιοριστικού ενζύμου (NcoI), ώστε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη που εκφράζει να παραμένει εσωκυτταρικά. Αρχικά 1 μL ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο έκφρασης της κουτινάσης προστίθεται σε 100 μL καλλιέργειας δεκτικών σε μετασχηματισμό BL21 (DE3) κυττάρων και παραμένουν στον πάγο για 30 min. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 ºC για 1 min και επιστροφή στον πάγο για 5 min. Κατά το θερμικό σοκ η κυτταρική μεμβράνη καθίσταται διαπερατή και επιτρέπει την εισαγωγή εξωγενούς γενετικού υλικού. Τέλος προστίθενται 200 μL LB θρεπτικού, ακολουθεί επώαση στους 37 ºC για 1 h και εμβολιασμός τρυβλίων με LB θρεπτικό με άγαρ και αμπικιλλίνη 0.1 mg/mL για την αποφυγή ανάπτυξης αποικιών που δεν φέρουν το γονίδιο έκφρασης της κουτινάσης. Τα τρυβλία επωάζονται για 16-20 h. Ένας κλώνος χρησιμοποιείται για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού μέσου LB+αμπικιλλίνη, τα οποία επωάζονται για 16 h στους 37 ºC υπό ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια σε κωνική φιάλη Erlenmeyer του 1 L εμβολιάζονται 500 mL θρεπτικού LB+αμπικιλλίνη με 1 % v/v προκαλλιέργεια, και επωάζονται στους 37 ºC, 180 rpm έως ότου η οπτική τους πυκνότητα (OD_{600}) να φτάσει την τιμή 0.6 (2-4 h). Ακολούθως, μειώνεται η θερμοκρασία στους 16 ºC, προστίθεται IPTG (0.1 mM) και η καλλιέργεια επωάζεται για 16-18 h. Το IPTG προσδένεται στον καταστολέα του οπερονίου lac του πλασμιδιακού φορέα pET22b(+) και ενεργοποιώντας τον επάγει την έκφραση της κουτινάσης. Έπειτα τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000xg, 20 min, 4 ºC), επαναιωρούνται σε Talon buffer 100 mM pH 8, διαρρηγνύονται με χρήση υπερήχων στη συσκευή Vibra Cell$^{T.M.}$ (Sonics & Materials Inc.). Η αρχή των υπερήχων στηρίζεται στο φαινόμενο της σπηλαίωσης (cavitation) κατά το οποίο με εφαρμογή υπερήχων σχηματίζονται και εκρήγνυνται φυσαλίδες κατά τόπους μέσα στο υγρό, η ηχητική ενέργεια μετατρέπεται σε μηχανική και στη συνέχεια σε κινητική ενέργεια των κυττάρων. Όταν η κινητική ενέργεια υπερβεί την ανθεκτικότητα του κυτταρικού τοιχώματος, το κύτταρο λύεται και απελευθερώνονται τα εσωκυτταρικά προϊόντα. Το σύστημα διατηρείται σε πάγο για αποφυγή υψηλών θερμοκρασιών, εφαρμόζονται υπέρηχοι έντασης 40 %, με εφαρμογή 3 κύκλων του 1 min, με παύση ανά 8 s, ώστε να απελευθερωθούν οι

εσωκυτταρικές πρωτεΐνες στο υπερκείμενο και με φυγοκέντρηση απομακρύνονται τα κυτταρικά θραύσματα. Το υπερκείμενο υγρό είναι έτοιμο για καθαρισμό και απομόνωση της κουτινάσης.

4.5.2 Ετερόλογη έκφραση των εστερασών *Mt*faeC, *Fo*faeC, *St*GE2

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια pPICZaC που φέρουν τα γονίδια που κωδικοποιούν την έκφραση των εστερασών *Mt*faeC, *Fo*faeC και *St*GE2 έχουν ενταχθεί σε μετασχηματισμένα κύτταρα *P. Pastoris* X33 με ηλεκτροδιάτριση με εφαρμογή ηλεκτρικού παλμού (2 kV για 4 ms) στη συσκευή Micropulser^{TM} της Biorad (Καλιφόρνια, ΗΠΑ) και φυλάσσονται σε stock YPD με 50 % γλυκερόλη στους -80 ^{o}C. Από αυτό το stock πραγματοποιείται εμβολιασμός τρυβλίων YPD με ζεοσίνη (0.1 mg/mL) και επωάζονται στους 30 ^{o}C για 72 h. Στη συνέχεια γίνεται εμβολιασμός κωνικών Erlenmeyer των 250 mL που περιέχουν από 50 mL BMGY και επωάζονται στους 30 ^{o}C, υπό ανάδευση, για 18-20 h. Στη συνέχεια γίνεται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των προκαλλιεργειών (OD_{600nm}) και υπολογίζεται η ποσότητα του εμβολίου που χρειάζεται ώστε οι κύριες καλλιέργειες των 250 mL BMMY που περιέχονται σε 2L Erlenmeyer φιάλες την χρονική στιγμή 0 να έχουν OD_{600nm}=1. Η ποσότητα αυτή απομονώνεται, φυγοκεντρείται (1500xg) και τα ανασυνδυασμένα κύτταρα επαναιωρούνται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Οι κύριες καλλιέργειες εμβολιάζονται και ακολουθεί καθημερινή προσθήκη μεθανόλης (0.5 % v/v) για 5 ημέρες προς επαγωγή των επιθυμητών ενζύμων. Οι εστεράσες *Mt*faeC, *Fo*faeC και *St*GE2 παράγονται στο εξωκυτταρικό υπερκείμενο υγρό της καλλιέργειας. Μετά το πέρας των 5 ημερών οι καλλιέργειες φυγοκεντρούνται (1500xg, 15 min, 4 ^{o}C) και το υπερκείμενο περνά από τα εξής στάδια φιλτραρίσματος: φίλτρο διήθησης Whatman και έπειτα φίλτρα διαμέτρου πόρων 0.8, 0.45 και 0.2 μm (Pall Supor Membrane Disc Fliters). Ακολουθεί υπερσυμπύκνωση του υπερκείμενου, χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη Diaflo PM-10 της Millipore (ΗΠΑ). Στη συνέχεια πραγματοποιείται εξισορρόπηση του συμπυκνωμένου υπερκείμενου στο ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x σε μεμβράνη διαπίδυσης για 20 h, ώστε να ακολουθήσει ο καθαρισμός των ενζύμων σε στήλη συγγένειας ιόντων μετάλλου Talon, όπως περιγράφεται στην ακόλουθη παράγραφο.

4.5.3 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) και

βασίζεται στα κατάλοιπα ιστιδίνης (His-tag) που έχουν προστεθεί στο καρβοξυτελικό τους άκρο κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης και τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσδένονται σε κατιόντα μετάλλου (Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}). Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιείται στήλη βαρύτητας (Biorad, ΗΠΑ) εσωτερικής διαμέτρου 1.0 cm όγκου 20 mL, επιφορτισμένη με 3 mL ρητίνη ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Co^{2+}, Talon®, (Clontech, Η.Π.Α) από την οποία η έκλουση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με εφαρμογή διαλύματος ιμιδαζολίου, το οποίο δρα ανταγωνιστικά ως προς τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους των ιστιδινών όσον αφορά την πρόσδεση στα κατιόντα Co^{2+}. Προετοιμάζεται stock ρυθμιστικού διαλύματος Talon 10x (500 mM Tris-HCl, 3 M NaCl). Τα βήματα του καθαρισμού είναι τα εξής:

- Εξισορρόπηση της ρητίνης της στήλης με 3xV mL ρυθμιστικού διαλύματος Talon 1x, όπου V ο όγκος της στήλης
- Φόρτωση του δείγματος για πρόσδεση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα ιόντα Co^{2+}
- Έκπλυση της στήλης με 10 mL διαλύματος Talon 1x για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που δεν προσδέθηκαν στη στήλη
- Απομάκρυνση ελαφρά προσδεμένων πρωτεϊνών με εφαρμογή 5 mL διαλύματος Talon 1x με 5 mM ιμιδαζόλιο
- Έκλουση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με 7 mL διαλύματος Talon 1x με 100 mM ιμιδαζόλιο (x2)
- Έκπλυση της ρητίνης της στήλης με 4xV mL απιονισμένο νερό και αποθήκευση της ρητίνης σε διάλυμα αιθανόλης 20 % στους 4 ^{o}C

Τέλος, γίνεται απομάκρυνση του ιμιδαζολίου από το διάλυμα της πρωτεΐνης και φύλαξη στο επιθυμητό ρυθμιστικό διάλυμα (20 mM Tris-HCl pH 8) με αφαλάτωση με την μέθοδο της διαπίδυσης από μεμβράνες κυτταρίνης.

4.5.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Ο βαθμός καθαρότητας μιας πρωτεΐνης και το μοριακό της βάρος προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), κατά την οποία πραγματοποιείται αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων με αναγωγή των δισουλφιδικών δεσμών. Με την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακριλαμιδίου επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός πρωτεϊνικών μορίων λόγω διαφορετικού μεγέθους. Η σύσταση του πηκτώματος φαίνεται στον

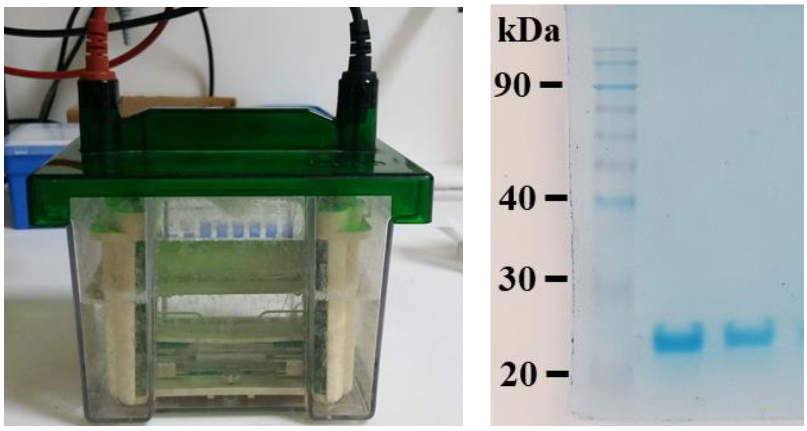
Πίνακας 10. Το πήκτωμα προκύπτει από τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και τις διακλαδώσεις των αλυσίδων που δημιουργούνται (cross-linking). Η ένωση Η N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED) δρα ως ενεργοποιητής και το υπερθειϊκό αμμώνιο (APS) ως καταλύτης.

Τα δείγματα προς ανάλυση υφίστανται την εξής διαδικασία: σε 20 μL πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθενται 5 μL διαλύματος φόρτωσης (1 g SDS, 5 mL 0.25 M Tris pH 6.8, 2.5 mL 50 % w/w γλυκερόλη, 2.5 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 4 mL 0.1 % w/v κυανούν βρωμοφαινόλη) και ακολουθεί βρασμός για 10 min ώστε να αποδιαταχθεί η πρωτεϊνική δομή.

Αρχικά παρασκευάζεται το μίγμα πηκτής διαχωρισμού (resolving gel), τοποθετείται ανάμεσα σε δυο γυάλινες πλάκες διαστάσεων 10x7 cm^2 και 10x8 cm^2 που συγκρατούνται ενωμένες με σφικτήρες, τόσο ώστε να καλύψει περίπου τα ¾ του όγκου, προστίθεται μία στοιβάδα νερό με προσοχή για την εξομάλυνση της επιφάνειας του πηκτώματος και αφήνεται να πήξει. Στη συνέχεια αποχύνεται το νερό, παρασκευάζεται το μίγμα πηκτής επιστοίβασης (stacking gel), το οποίο τοποθετείται πάνω από το μίγμα διαχωρισμού, τοποθετείται ειδικό χτενάκι για την δημιουργία των θηκών φόρτωσης (pockets) και αφήνεται να πήξει. Όταν είναι έτοιμο απομακρύνεται το χτενάκι και οι σφικτήρες και το πήκτωμα πολυακριλαμιδίου τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean 3 της Biorad (Καλιφόρνια, ΗΠΑ), προστίθενται 600 mL ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (30.3 g/L Tris, 144 g/L γλυκίνη, 10 g/L SDS, pH 8.3) και γίνεται φόρτωση των βρασμένων δειγμάτων στις ειδικές θήκες. Επίσης σε μία θήκη προστίθεται 7-10 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Pink prestained protein marker, Nippon Genetics Europe, Dueren, Γερμανία). Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων με ένταση ηλεκτρικού ρεύματος 35 mA/πήκτωμα για περίπου 1-1.5 h. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα απομακρύνεται από τις γυάλινες πλάκες και εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρωματισμού (40 % v/v μεθανόλη, 10 % v/v οξικό οξύ, 50 % νερό, 0.4 % w/v Coomassie R) υπό ήπια ανάδευση για 20 min και έπειτα αποχρωματίζεται με πλύσεις σε διάλυμα αποχρωματισμού (20 % μεθανόλη, 10 % οξικό οξύ, 70 % νερό και εμφανίζονται οι μπάντες των πρωτεϊνών. Στο Σχήμα 20 παρουσιάζεται η γέλη SDS-PAGE όπου φαίνεται η ανασυνδυασμένη κουτινάση *Fo*Cut5a.

Πίνακας 10: Σύσταση πηκτώματος πολυακριλαμιδίου.

Πηκτή διαχωρισμού 12.5 %		**Πηκτή επιστοίβασης 4 %**	
Απιονισμένο νερό	1.75 mL	Απιονισμένο νερό	1.5 mL
0.75 M Tris/ SDS 0.2 % (pH 8.8)	4.7 mL	0.25 % Tris/ SDS 0.2 % pH 6.8	1.9 mL
40 % bis-acrylamide (30:1)	2.9 mL	40 % bis-acrylamide (30:1)	0.38 mL
TEMED	15 μL	TEMED	10 μL
10 % APS (w/v) φρέσκο	90 μL	10 % APS (w/v) φρέσκο	30 μL



α) β)

Σχήμα 20: α) Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, β) Γέλη όπου φαίνεται η ανασυνδυασμένη κουτινάση FoCut5a στα 23 kDa, ύστερα από απομόνωση σε στήλη συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC).

4.5.5 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και ενζυμικής συγκέντρωσης

Η συγκέντρωση της καθαρής κουτινάσης *Fo*Cut5a υπολογίστηκε μέσω απορρόφησης στα 280 nm, με χρήση του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας 16180 $(M \cdot cm)^{-1}$ και εφαρμογή του νόμου Lambert-Beer:

$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot c$,

όπου Abs η απορρόφηση στα 280 nm, ε ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας, b το μήκος της κυψελίδας με την οποία γίνεται η μέτρηση και c η συγκέντρωση του ενζύμου (Stoscheck 1990). Η ενεργότητα της κουτινάσης υπολογίστηκε με χρήση του υποστώματος pNPhB (0.96 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών 0.1 M, pH 6.0, στους 40 °C,

για 10 min και μέτρηση της απελευθέρωσης του pNPh φωτομετρικά στα 410 nm. 1 U ενζυμικής ενεργότητας ορίζεται ως η ποσότητα ενζύμου που χρειάζεται για την απελευθέρωση 1 μmol pNPh ανά λεπτό.

Η συγκέντρωση των ακατέργαστων (crude) ενζύμων μετρήθηκε με την μέθοδο Bradford, με χρήση αλβουμίνης βόειου ορού ως πρότυπο και φωτομέτρηση στα 595 nm (Bradford 1976). Κατά τη μέτρηση Bradford η βαφή Coomassie Brilliant Blue G-250 δημιουργεί σύμπλοκο με τις καρβοξυλομάδες της πρωτεΐνης με δυνάμεις Van der Waals και τις αμινομάδες με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και αλλάζει το χρώμα της από καφέ σε μπλε. Για τον υπολογισμό της ενζυμικής ενεργότητας του Alcalase 2.4 L σε διάλυμα αζοκαζεΐνης 0.2 % w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8, έγινε προσθήκη ενζύμου 2.5 % v/v και ακολούθησε επώαση στους 40 ^{o}C για 10 min (Kocabıyık and Erdem 2002). Στη συνέχεια προστέθηκε 1:1 0.1 M TCA 0.1 M και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε προς απομάκρυνση της πρωτεΐνης. Στο υπερκείμενο της αντίδρασης προστέθηκε 1:1 NaOH 0.5 M και ακολούθησε επώαση για 5 min και φωτομέτρηση στα 440 nm. 1 Unit (U) ενεργότητας ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για αύξηση της απορρόφησης στα 440 nm κατά 0.1 στις δεδομένες συνθήκες pH και θερμοκρασίας.

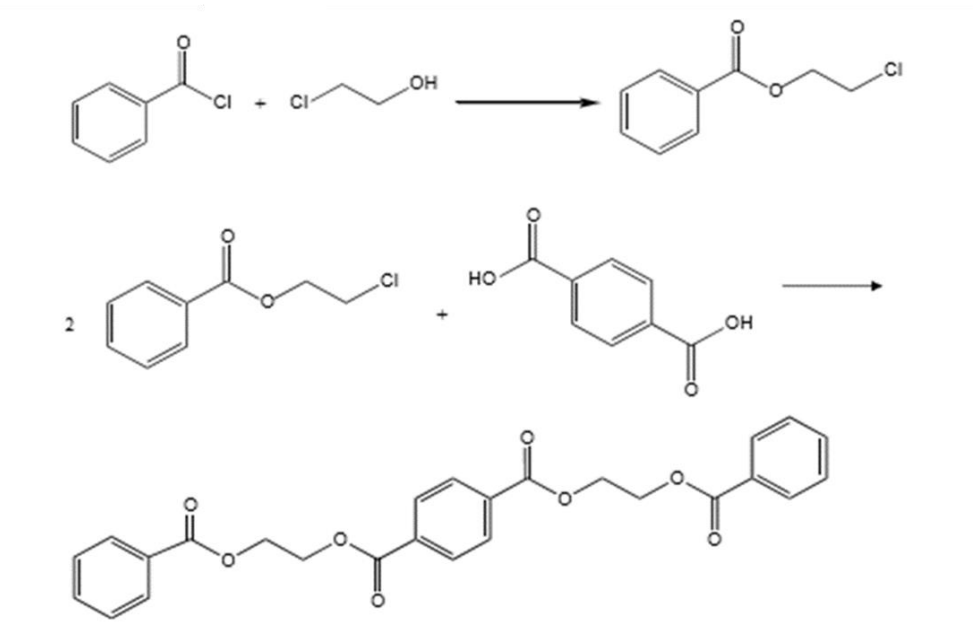
Η ενζυμική ενεργότητα του Lipolase 100T προσδιορίζεται μέσω υδρόλυσης του pNPhL 0.4 M στους 40 ^{o}C, σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών φωσφορικών pH 6.

4.6 Σύνθεση των μοντέλων υποστρωμάτων του PET και του PA 6.6

4.6.1 Χημική σύνθεση του 3PET

Η σύνθεση του μοντέλου υποστρώματος τερεφθαλικός δις-βενζοϋλοξυαιθυλεστέρας (bis(benzoyloxyethyl)terephthalate), 3PET, πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια και η διαδικασία που ακολουθήθηκε παρατίθεται στη συνέχεια στο Σχήμα 21 (Heumann et al. 2006).

Κατά το 1° στάδιο αρχικά προστέθηκαν σε μία σφαιρική φιάλη των 100 mL βενζοϋλοχλωρίδιο και 1,2 περίσσεια 2-χλωροαιθανόλης και αφέθηκαν να αντιδράσουν υπό ανάδευση στους 110 ^{o}C για 24 ώρες, με αναρροή, ώστε να σχηματιστεί το ενδιάμεσο προϊόν 2-χλωροαιθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος. Την επόμενη ημέρα σε περιστροφικό εξατμιστήρα εξατμίστηκε η περίσσεια της χλωροαιθανόλης σε θερμοκρασία 110 ^{o}C και πίεση 20 mbar.



Σχήμα 21: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σχηματισμού του μοντέλου 3PET.

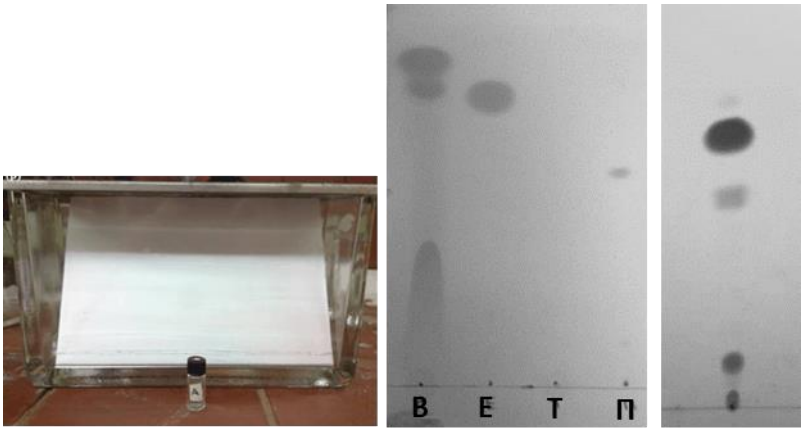
Κατά το 2° στάδιο από το ενδιάμεσο προϊόν προστέθηκαν 10 g σε σφαιρική των 100 mL. Σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκε τερεφθαλικό οξύ (1 mol ανά 2 mol ενδιάμεσου με την παραδοχή ότι έχουμε 100 % απόδοση) και 30 mL διμεθυλοφορμαμιδίου υπό ανάδευση. Έπειτα το περιεχόμενο του ποτηριού αποχύθηκε στη σφαιρική φιάλη, ξεπλένεται το ποτήρι με άλλα 10 mL διμεθυλοφορμαμιδίου και αποχύνονται κι αυτά στη φιάλη. Ακόμη προστέθηκαν τριαιθυλαμίνη ισομοριακά με το προκύπτον υδροχλώριο. Το σύστημα αφέθηκε να αντιδράσει στους 140 ^{o}C, υπό ανάδευση για 24 ώρες, με αναρροή. Την επόμενη ημέρα, αφού το σύστημα απέκτησε θερμοκρασία δωματίου προστέθηκαν άλλα 10 mL διμεθυλοφορμαμιδίου υπό ανάδευση και πραγματοποιήθηκε διήθηση για την απομάκρυνση του παραπροϊόντος τριαθυλαμινο-υδροχλωρίδιο. Ο διαλύτης απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 110 ^{o}C και πίεση 20 mbar και το υπόλειμμα επαναιωρήθηκε σε 40 mL τολουολίου. Η περίσσεια τερεφθαλικού έμεινε αδιάλυτη και απομακρύνθηκε με διήθηση και ο διαλύτης τολουόλιο απομακρύνθηκε σε περιστροφικό εξατμιστήρα σε θερμοκρασία 85 ^{o}C και πίεση 20 mbar. Το τελικό προϊόν επανακρυσταλλώθηκε σε μεθανόλη και πραγματοποιήθηκε διήθηση για την παραλαβή του. Στο Σχήμα 22 παρουσιάζονται διάφορα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά την αντίδραση σύνθεσης του μοντέλου υποστρώματος 3PET.

α) β) γ) δ)

ε) στ)

Σχήμα 22: α) Περιστροφικός εξατμιστήρας, β) παραγωγή του ενδιάμεσου προϊόντος 2-χλωροαιθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος μετά το 1^{ο} στάδιο σύνθεσης του 3PET, γ) εξάτμιση DMF μετά το 2^{ο} στάδιο σύνθεσης του 3PET μετά την απομάκρυνση του παραπροϊόντος τριαιθυλοαμινο-υδροχλωρίδιο, δ) επαναδιάλυση υπολείμματος από περιστροφικό εξατμιστήρα σε τολουόλιο και ε) παραλαβή αδιάλυτου τερεφθαλικού οξέος, στ) επανακρυστάλλωση σε μεθανόλη του τελικού 3PET.

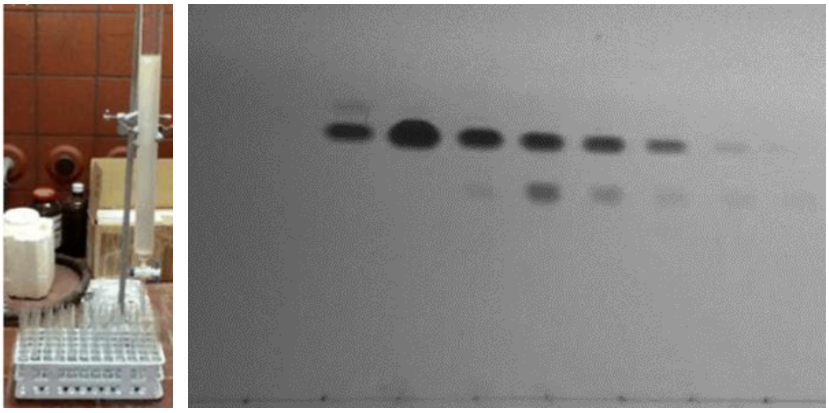
Έπειτα το μοντέλο υφίσταται ξήρανση σε διάταξη κενού και τελικά παραλαμβάνεται ποσότητα 4.7422 g (τελική σταθμική απόδοση 35 %). Ακολούθως, στο Σχήμα 23 γίνεται έλεγχος των σταδίων σύνθεσης του 3PET με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC) σε φύλλο διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) με διαλύτη έκλουσης τολουολίου:οξικού αιθυλεστέρα 5:1 v/v. Στο φύλλο χαράσσεται με μολύβι μία γραμμή βάσης 1 cm από την κάτω πλευρά του φύλλου και πάνω σε αυτήν φορτώνονται τα δείγματα προς ανάλυση σε απόσταση 1.5 cm μεταξύ τους. Έπειτα το φύλλο βυθίζεται στο διαλύτη έκλουσης σε ειδικό δοχείο με κορεσμένη την ατμόσφαιρα στο διαλύτη έκλουσης και σε τέτοια στάθμη ώστε να μην διαβρέχεται η γραμμή βάσης και τα δείγματα “τρέχουν” μέσω τριχοειδών δυνάμεων κατά μήκος της επιφάνειας του φύλλου προς τα πάνω με διαφορετικές ταχύτητες ανάλογα με την συγγένεια πολικότητας κάθε προϊόντος με τον διαλύτη έκλουσης.



(α) (β) (γ)

Σχήμα 23: (α) TLC: Έλεγχος καθαρότητας μοντέλου PET και ταυτοποίηση, (β) Β=βενζοϊκό οξύ, Ε=ενδιάμεσο προϊόν, Τ=τερεφθαλικό οξύ, Π=τελικό προϊόν-μοντέλο, (γ) Τελικό προϊόν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση.

Εν συνεχεία το τελικό προϊόν καθαρίζεται σε στήλη διαμέτρου 2.5 cm και ύψους 50 cm διοξειδίου του πυριτίου (~200 mL) (silica gel) (Merck, Whitehouse Station, New Jersey), όπως φαίνεται στο Σχήμα 24 με διαλύτη τολουόλιο/οξικός αιθυλεστέρας 5/1 (v/v) με τη μέθοδο της χρωματογραφίας στήλης με πίεση (flash column chromatography).



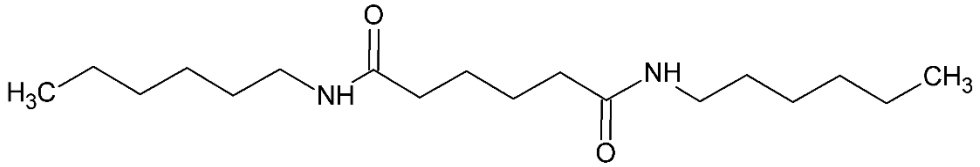
(α) (β)

Σχήμα 24: (α) Καθαρισμός μοντέλου 3PET με χρωματογραφίας στήλης με πίεση, (β) Κλάσματα που προκύπτουν από τη στήλη καθαρισμού.

Διαλύονται 150 mg σε 6 mL διαλύτη έκλουσης, φορτώνονται στη στήλη και με παροχή αέρα πραγματοποιείται εξαναγκασμένη ροή του διαλύτη έκλουσης, ενώ συλλέγονται κλάσματα των 10 mL σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ελέγχονται με TLC. Τα κλάσματα που φέρουν το καθαρό προϊόν ενώνονται, απομακρύνεται ο διαλύτης σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 80 ^{o}C, 140 mbar και ακολουθεί ξήρανση σε διάταξη κενού Edwards για 2 h.

4.6.2 Χημική σύνθεση του αδιπικού δις-εξυλαμιδίου

Η σύνθεση του μοντέλου του PA 6.6 αδιπικό δις-εξυλαμίδιο (adipic acid bishexyl-amide) (Σχήμα 25) πραγματοποιείται σε ένα στάδιο (Heumann et al. 2006). Αναλυτικά, 10 mL εξυλαμίνης αναμίχθηκαν με 5 mL αδιπικού διμεθυλεστέρα υπό ανάδευση στους 85 ^{o}C για 24 ώρες. Έπειτα αφού απέκτησε θερμοκρασία δωματίου το προϊόν ξεπλύθηκε με 40 mL θειικού οξέος 50 mM για να απομακρυνθεί η περίσσεια εξυλαμίνης και τέλος πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό για παραλαβή του. Στη συνέχεια το προϊόν ξεπλύθηκε με 100 mL νερού και 100 mL ακετόνης και υπέστη ξήρανση σε περιστροφικό εξατμιστήρα και έπειτα σε διάταξη υψηλού κενού για 1 ώρα. Παραλήφθηκαν 3.1437 g καθαρού προϊόντος που αντιστοιχούν σε 19 % σταθμική απόδοση.

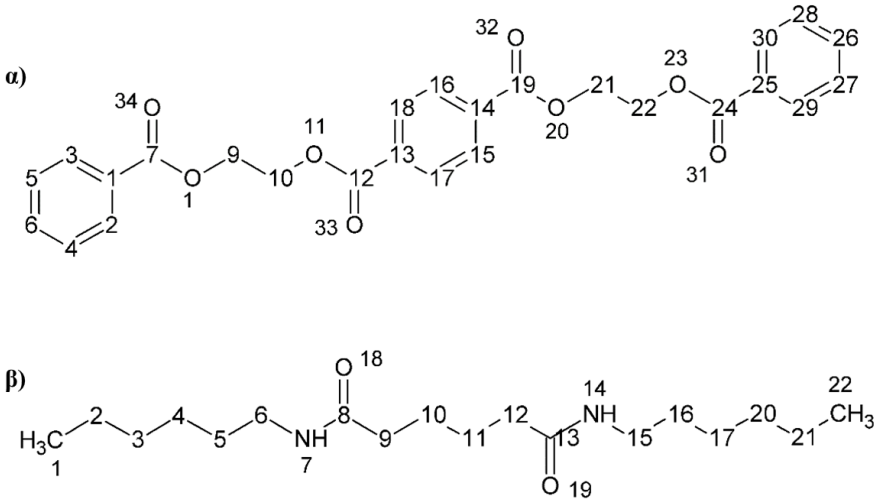


Σχήμα 25: Δομή μοντέλου υποστρώματος αδιπικό δις-εξυλαμίδιο.

4.6.3 Ταυτοποίηση των μοντέλων υποστρωμάτων

Τα δυο μοντέλα που συντέθηκαν ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός είναι ένα φυσικό φαινόμενο στο οποίο οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η χημική μετατόπιση που περιγράφει τη θέση μιας κορυφής NMR σε σχέση με το σήμα που δίνουν τα πρωτόνια του TMS συμβολίζεται ως δ (ppm). Η ανάλυση ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR των μοντέλων του PET και PA πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Bruker DRX 400 στη συχνότητα των ραδιοκυμάτων 400 MHz. Στο Σχήμα 26 παρουσιάζεται η αρίθμηση των ατόμων των ενώσεων-μοντέλων. Οι προς ανάλυση ουσίες διαλύθηκαν σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl3). Από την ανάλυση ^{1}H-NMR για το 3PET προέκυψαν:

δ=4.68 (s, 9,10,21,22), δ=8.06 (t, 2,3,15,16,17,18,29,30), δ=7.57 (t, 6,26), δ=7.44 (t, 4,5,27,28). Από την ανάλυση ^{13}C-NMR για το 3PET προέκυψαν: δ=166.06 (7,12,19,24), δ=133.91 (13,14), δ=133.34 (1,25), δ=129.84 (2,3,4,5,6,15,16,17, 18,26,27,28,29,30) και δ=63.01 (9,10,22,23). Από την ανάλυση ^{1}H-NMR για το αδιπικό δις-εξυλαμίδιο προέκυψαν: δ=5.82 (s, 7,14), δ=3.23 (q, 6,15), δ=2.19 (s, 9,12), δ=1.47 (m, 2,3,4,5,10,11,16,17,20,21). Από την ανάλυση ^{13}C-NMR για το αδιπικό δις-εξυλαμίδιο προέκυψαν: δ=172.84 (8,13), δ=31.20 (2,3,4,5,6,9,10,11,12,15,16,17,20,21) και δ=14.13 (1,22). Τα φάσματα ^{1}H-NMR και ^{13}C-NMR παρατίθενται στο Σχήμα Π1 (Παράρτημα).



Σχήμα 26: Αρίθμηση των ατόμων των δομών α) 3PET, β) αδιπικό δις-εξυλαμίδιο.

4.7 Ενζυμική υδρόλυση των μοντέλων υποστρωμάτων

4.7.1 Υδρόλυση των μοντέλων του PET

Η υδρόλυση των μοντέλων 3PET και BHET πραγματοποιήθηκε ως εξής: 2 mg και 10 mg από κάθε μοντέλο αντίστοιχα αφέθηκαν να αντιδράσουν με 1 mL ενζυμικού διαλύματος (0.07 mg/mL καθαρή *Fo*Cut5a, 2.23 mg/mL Lipolase, 1.15 mg/mL *St*GE2, 2.14 mg/mL ακατέργαστη *Mt*faeC, 2.88 mg/mL ακατέργαστη *Fo*faeC) αραιωμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.0, στους 30 ^{o}C για 18 ώρες. Μετά την επώαση η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη 20 μL πυκνού θειικού οξέος. Τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και έπειτα υπέστησαν φιλτράρισμα με φίλτρο Whatman Puradisc 25, Nylon, 0.2 μm μέγεθος πόρων,

σε κατάλληλα δοχεία για να γίνει εν συνεχεία η ανάλυσή τους με τη μέθοδο HPLC στη συσκευή SHIMADZU LC-20AD, με ανιχνευτή τον Jasco UV-975 που ρυθμίστηκε να καταγράφει στα 241 nm. Η στήλη διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αντίστροφης φάσης Eurospher-100 C18 της KNAUER (Γερμανία) η οποία παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον διαχωρισμό των προϊόντων υδρόλυσης εφαρμόστηκε μία μέθοδος γραμμικής βαθμίδωσης που περιελάμβανε 1% τριφθοροοξικό οξύ (A) και ακετονιτρίλιο (B) ως διαλύτες έκλουσης με ροή 0.8 mL/min. Το πρόγραμμα έκλουσης ρυθμίστηκε ως εξής: 100% A (t=0 min), 10% A και 90% B ως τα 30 min και 100 % A ως τα 35 min (Vertommen et al. 2005).

4.7.2 Υδρόλυση των μοντέλου του PA

Η υδρόλυση του μοντέλου του PA πραγματοποιήθηκε ως εξής: 50 mg του μοντέλου αφέθηκαν να αντιδράσουν με 4.65 mg Alcalase 2.4 L, κουτινάσης *Fo*Cut5a και λιπάσης Lipolase 100T σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 8.0, στους 40 ^{o}C για 24 h. Έπειτα τα δείγματα φιλτραρίστηκαν και το υπερκείμενο της αντίδρασης αναλύθηκε με την μέθοδο TNBS (Morçöl et al. 1997). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση των ελεύθερων αμινομάδων με το άλας νατρίου του TNBS και το προκύπτον προϊόν μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά στα 420 nm. Από το υπερκείμενο κάθε αντίδρασης 1mL επωάζεται με 110 μL τριχλωροοξικού οξέος (TCA) 4.7 M για 10 min στους 8 ^{o}C και φυγοκεντρείται. Σε 500 μL του δείγματος προστίθενται 750 μL ρυθμιστικού βορικού pH 8.5, 200 mM και 20 μL NaOH 10 M. Σε 1 mL του τελικού δείγματος προστίθενται 25 μL TNBS 30 mM και αφήνονται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Ακολουθεί φωτομέτρηση του δείγματος στα 420 nm. Για τον προσδιορισμό των αμινομάδων που αποτελούν ένδειξη του βαθμού υδρόλυσης του μοντέλου, προετοιμάζονται και φωτομετρούνται δυο δείγματα ελέγχου, ένα χωρίς ένζυμο και ένα χωρίς υπόστρωμα. Το δείγμα ελέγχου με το ένζυμο χωρίς το υπόστρωμα παρουσίασε και αυτό υψηλή απορρόφηση λόγω της μη καθαρής κατάστασης του ενζύμου, ωστόσο το δείγμα της αντίδρασης του υποστρώματος με το ένζυμο σημείωσε αυξητική τάση, υποδηλώνοντας την υδρόλυση του μοντέλου σε κάποιο βαθμό.

4.8 Ενζυμική τροποποίηση πολυεστερικών υφασμάτων PET

Αρχικά, έγινε έλεγχος της υδρολυτικής ικανότητας των ενζύμων *Fo*Cut5a, Lipolase, *St*GE2, *Mt*faeC και *Fo*faeC επί των μοντέλων υποστρωμάτων 3PET και BHET τα οποία προσομοιάζουν την πολυεστερική επιφάνεια του PET.

Πολυεστερικά υφάσματα 0.5 g επωάστηκαν σε φιάλες Erlenmeyer των 100 mL σε λουτρό ρυθμιστικού διαλύματος με αναλογία μάζα υφάσματος προς μάζα λουτρού 1:50, υπό ανάδευση (170 rpm) για 24 h. Όσον αφορά την ενζυμική τροποποίηση μελετήθηκαν διάφορες παράμετροι συμπεριλαμβανομένου της θερμοκρασίας (25–50 ^{o}C), του pH (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM με εύρος pH 5.8–8.0 και γλυκίνης-NaOH 100 mM με εύρος pH 9.0–10.0), του χρόνου επώασης (0–24 h) και της συγκέντρωσης του ενζύμου (0.096–3.840 mg/$g_{υφάσματος}$). Μετά το πέρας της ενζυμικής υδρόλυσης τα υφάσματα πλύθηκαν με 2 g/L Na_2CO_3 στους 60 ^{o}C για 1 h και στη συνέχεια πλύθηκαν εις διπλούν με απιονισμένο νερό για 1 h (Araújo et al. 2007).

Κατά την ενζυμική υδρόλυση απελευθερώνεται τερεφθαλικό οξύ (TPA) και παράγωγά του τα οποία μπορούν να ανιχνευθούν φωτομετρικά στο εύρος 240-244 nm (Vertommen et al. 2005). Από τα υπερκείμενα των εκάστοτε αντιδράσεων λαμβάνονται δείγματα 0.6 mL και γίνεται προσθήκη 1:1 μεθανόλης προκειμένου να καταβυθιστεί το ένζυμο. Ύστερα από φυγοκέντρηση σε 1 mL κάθε υπερκείμενου γίνεται προσθήκη θειϊκού οξέος (18 mM) με σκοπό την εξουδετέρωση των ιόντων των παραγώγων TPA. Ο βαθμός υδρόλυσης του PET προσδιορίστηκε μέσω φωτομέτρησης των TPA προϊόντων στο υπερκείμενο της αντίδρασης στα 241 nm (BOECO S-20 Spectrophotometer, Hamburg, Γερμανία). Επίσης προετοιμάστηκαν και μετρήθηκαν δείγματα ελέγχου (από αντιδράσεις χωρίς προσθήκη ενζύμου ή υφάσματος). Πιθανά προϊόντα υδρόλυσης είναι τα TPA, BHET και ο μονο-τερεφθαλικός 2-υδροξυαιθυλεστέρας (MHET). Το TPA χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή μιας καμπύλης αναφοράς για τον υπολογισμό της συνολικής απορρόφησης των τριών πιθανών προϊόντων υδρόλυσης εφόσον παρουσιάζουν την ίδια μοριακή απορρόφηση εξαιτίας των ίσων ομάδων καρβονυλίου που διαθέτουν και του βενζολικού τους δακτυλίου (Vertommen et al. 2005).

Το υπερκείμενο της υδρόλυσης υφάσματος PET στις βέλτιστες συνθήκες συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με HPLC, κατά πώς περιγράφεται στην παράγραφο 4.7.1.

4.9 Ενζυμική τροποποίηση υφαντών PA 6.6 υφασμάτων

Από το αρχικό υφαντό PA 6.6 ύφασμα κόπηκαν δείγματα βάρους 0.5 g (4.5 × 4.5 cm^2) τα οποία επωάστηκαν σε φιάλες Erlenmeyer σε 25 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου pH 8.0 στο θερμοκρασιακό εύρος 40–60 ºC (όπως προτείνεται από Novozymes®), υπό ανάδευση (170 rpm) με διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου. Ακόμη προετοιμάστηκαν δείγματα ελέγχου χωρίς ένζυμο ή με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο (βρασμένο 30 min). Μετά την ενζυμική τροποποίηση τα υφάσματα πλύθηκαν με 2 g/L Na_2CO_3 στους 60 ºC για 1 h και έπειτα πραγματοποιήθηκε πλύσιμο εις διπλούν με απιονισμένο νερό 1 h. Η αξιολόγηση των συνθηκών τροποποίησης πραγματοποιήθηκε μέσω των παραμέτρων της βαφής των τροποποιημένων και ατροποποίητων υφασμάτων.

4.10 Βαφή ενζυμικά τροποποιημένων συνθετικών υφασμάτων

Η αρχή της χρωματομετρίας είναι η έκθεση του δείγματος σε συγκεκριμένο φωτισμό και η μέτρηση της ανάκλασης του φωτός από το δείγμα. Τα δεδομένα αυτά επεξεργάζονται από διάφορα συστήματα και περιγράφουν ένα χρώμα, εκφράζοντάς το με μαθηματικές εξισώσεις. Το σύστημα CIE (Commission International de l' Eclairage) χρησιμοποιεί πρότυπες πηγές φωτισμού και πρότυπο "παρατηρητή" προκειμένου να μετρηθεί το χρώμα, του οποίου η όραση των χρωμάτων να είναι αντιπροσωπευτική κατά μέσο όρο του συνόλου των ανθρώπων με κανονική όραση. Οι πιο διαδεδομένες πηγές φωτός είναι:

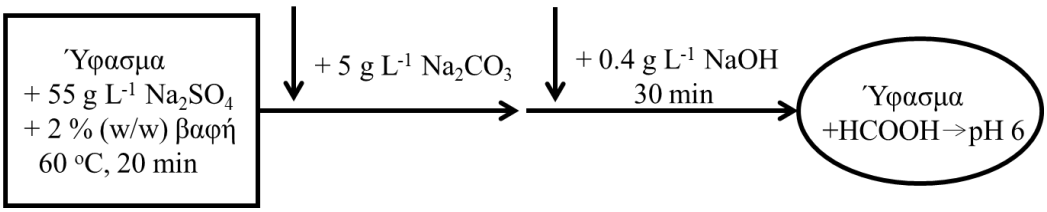
• A Λάμπα πυρακτώσεως βολφραμίου 2854K

• D65 Εξομοίωση κατά μέσο όρο ηλιακού φωτός 6500K

• TL 84 Λάμπα φθορίου 4000K

Η βαφή τόσο των πλεκτών πολυεστερικών όσο και των υφαντών και πλεκτών πολυαμιδικών υφασμάτων πραγματοποιήθηκε σε γυάλινα κυλινδρικά δοχεία όγκου 390 cm^3 στη μηχανή Ahiba Texomat (Datacolor, Lawrenceville, NJ, ΗΠΑ), που φαίνεται στο Σχήμα 28α. Κατά τη διαδικασία βαφής διαλύματα που περιείχαν 55 g/L Na_2SO_4 και 2 % w/w βαφής Novacron Deep Cherry S–D, Novacron Yellow S-3R ή Jakazol Black 133% εισήχθησαν στους κυλινδρικούς υποδοχείς μαζί με τα υφάσματα. Το λουτρό βαφής θερμάνθηκε στους 60 ºC και ύστερα από 20 min προστέθηκαν 5 g/L Na_2CO_3. Τέλος, 30 min πριν το πέρας της βαφικής διαδικασίας προστέθηκαν 0.4 g/L NaOH. Η εξουδετέρωση του υφάσματος σε pH 6 λαμβάνει χώρα στους 90 °C με προσθήκη μικρής ποσότητας HCOOH. Προκειμένου να απομακρυνθεί το

χρώμα που δεν έχει αντιδράσει, γίνεται πλύση του υφάσματος στους 95 ^{o}C με σαπούνι (Cibapon R) για 1-2 h. Τέλος, γίνεται έκπλυση με ζεστό νερό και το ύφασμα αφήνεται να στεγνώσει. Η διαδικασία της βαφής παρουσιάζεται συνοπτικά στο Σχήμα 27.



Σχήμα 27: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας βαφής συνθετικών υφασμάτων.

Οι διαφορές στο χρώμα αξιολογήθηκαν με χρήση του χρωματόμετρου Data Color International, Spectraflash SF450 (Lawrenceville, NJ, ΗΠΑ), που φαίνεται στο Σχήμα 28β. Το φασματοφωτόμετρο καλιμπραρίστηκε βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή με χρήση του μαύρου και άσπρου προτύπου. Οι αλλαγές στο χρώμα υπολογίστηκαν βάσει του συστήματος CIE L*a*b* System, όπως αυτό έχει καθοριστεί από την CIE σύμφωνα με την μέθοδο ASTM D 2244-68. Για κάθε δείγμα λήφθηκαν τέσσερις μετρήσεις ώστε να προκύψουν οι συντεταγμένες χρώματος L, a, b. Το "L" αντιπροσωπεύει την φωτεινότητα, το "a" περιγράφει τη διαφορά κόκκινου/πράσινου και το "b" περιγράφει τη διαφορά μπλε/κίτρινου. Η διαφορά χρώματος υπολογίζεται από την εξίσωση (1):

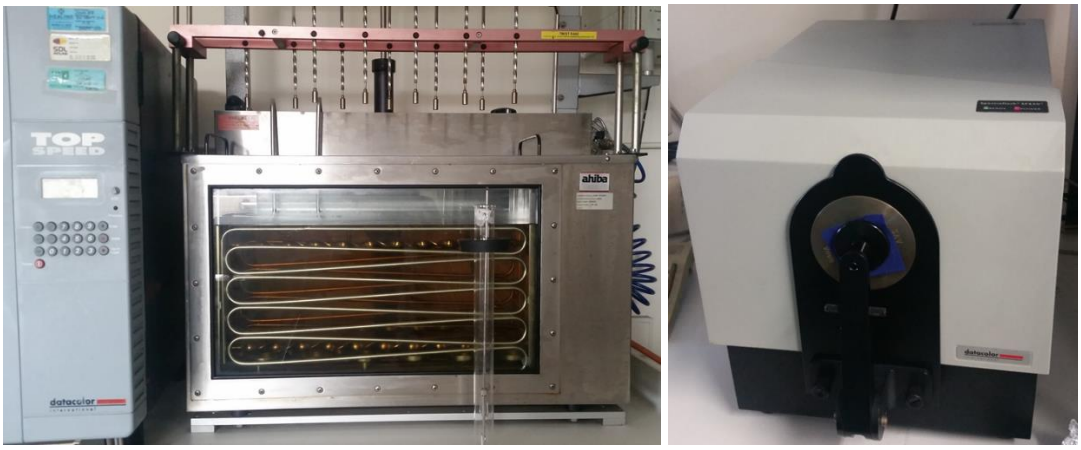
$$\Delta E = \sqrt{(L_2 - L_1)^2 + (a_2 - a_1)^2 + (b_2 - b_1)^2} \qquad (1)$$

Μελέτες έχουν δείξει πως η διαφορά χρώματος ΔΕ=1.0 μπορεί να γίνει αντιληπτή κατά 50 % από το ανθρώπινο μάτι, ενώ η διαφορά χρώματος ΔΕ=2.0 γίνεται αντιληπτή 100 %. Η ένταση χρώματος (K/S) των βαμμένων υφασμάτων μετρήθηκε στο μήκος κύματος της ελάχιστης ανάκλασης σύμφωνα με τη εξίσωση Kubelka-Munk (2):

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R)^2}{2R} \qquad (2)$$

όπου R ο συντελεστής, K ο συντελεστής απορρόφησης, S ο συντελεστής σκέδασης. Πρακτικά, η τιμή ΔΕ χρησιμοποιείται όταν είναι επιθυμητή η σύγκριση δύο αποχρώσεων. Η ένταση του χρώματος, δηλαδή ο λόγος K/S, είναι η παράμετρος που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των

διεργασιών βαφής και της βαφικής ικανότητας, αφού έχει διαπιστωθεί πως είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του χρώματος στο δείγμα.



α) β)

Σχήμα 28: α) Μηχανή Ahiba Texomat βαφής υφασμάτων, β) Χρωματόμετρου Spectraflash SF450 προς υπολογισμό των L, a, b και K/S. Τα μηχανήματα που απεικονίζονται βρίσκονται στην εταιρία MIRTEC S.A-ΕΒΕΤΑΜ.

4.11 Μηχανικές ιδιότητες συνθετικών υφασμάτων

Οι μηχανικές ιδιότητες που μελετήθηκαν είναι η αντοχή σε εφελκυσμό, κάμψη, συμπίεση, διάτμηση και pilling. Όσον αφορά την μελέτη αντοχής σε εφελκυσμό όλα τα διαγράμματα τάσης–παραμόρφωσης έχουν το κοινό γνώρισμα, πως για μικρές τιμές τάσης και παραμόρφωσης, δηλαδή πολύ κοντά στην αρχή των αξόνων, οι τάσεις είναι ανάλογες των παραμορφώσεων. Η περιοχή στην οποία συμβαίνει αυτό ονομάζεται ελαστική περιοχή και σε αυτή η σχέση μεταξύ τάσης και παραμόρφωσης αποδίδεται από το νομό του Hooke που είναι γραμμικός και ανεξάρτητος από το χρόνο. Η σταθερά αναλογίας ονομάζεται μέτρο ελαστικότητας ή μέτρο του Young. Στην περίπτωση μονοαξονικής φόρτισης, δηλαδή στην περίπτωση του εφελκυσμού ή θλίψης, ισχύει: $\sigma=E\varepsilon$, όπου E το μέτρο ελαστικότητας.

Το σύστημα αξιολόγησης Kawabata (Kawabata Evaluation System, KES) χρησιμοποιείται για τη διενέργεια αντικειμενικών μετρήσεων, μέσω των οποίων προσδιορίζονται οι μηχανικές ιδιότητες των υφασμάτων που σχετίζονται με το επίπεδο ιδιοτήτων υφής και άνεσης. Στις τέσσερις μετρητικές συσκευές που απαρτίζουν το KES προσδιορίζονται οι μηχανικές ιδιότητες που συναρτώνται με τις παραμορφώσεις που υφίστανται τα υφάσματα κατά την πραγματική και

καθημερινή τους χρήση. Στις μετρήσεις των μηχανικών ιδιοτήτων συμπεριλαμβάνονται τα ακόλουθα τεστ:

- Κάμψη (Bending)

Το τεστ αυτό μετράει τη δύναμη που απαιτείται για την κάμψη του υφάσματος στις 150°. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε διάγραμμα ροπής κάμψης (gf.cm/cm) - κυρτότητας (cm^{-1}). Οι παράμετροι που μετρούνται είναι οι εξής :

1-B: σκληρότητα στην κάμψη ανά μονάδα πλάτους υφάσματος. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή τηςπαραμέτρου αυτής τόσο μεγαλύτερη αντίσταση παρουσιάζει το ύφασμα στην κάμψη.

-2HB: υστέρηση της ροπής κάμψης.

- Συμπίεση (Compression)

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε διάγραμμα πίεσης (P) - πάχους δείγματος (T) (καμπύλη θλίψης). Οι παράμετροι που μετρούνται είναι οι εξής:

-LC: γραμμικότητα της καμπύλης θλίψης.

-WC: ενέργεια της συμπίεσης υφάσματος. Υψηλή τιμή της μεταβλητής αυτής εκφράζει μεγάλη συμπιεστότητα του υφάσματος.

-RC: ελαστικότητα συμπίεσης %. Εκφράζει το βαθμό επαναφοράς μετά τη συμπίεση. Υψηλή τιμή της μεταβλητής αυτής εκφράζει μεγάλη συμπιεστότητα.

- Εφελκυσμός (Tensile)

Στο δείγμα ασκείται τάση προς μία κατεύθυνση ενώ ταυτόχρονα η άλλη πλευρά του είναι ακινητοποιημένη. Η τιμή της τάσης αυξάνει με συγκεκριμένο, σταθερό ρυθμό από τη μηδενική μέχρι μία μέγιστη τιμή και στη συνέχεια μηδενίζεται πάλι ελαττούμενη με τον ίδιο ρυθμό. Προκύπτει ένα διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης μέσω του οποίου προσδιορίζονται οι παράμετροι που περιγράφονται παρακάτω:

-LT: γραμμικότητα της καμπύλης φορτίου-επιμήκυνσης.

-WT: ενέργεια της επιμήκυνσης υφάσματος. Υψηλή τιμή της μεταβλητής αυτής εκφράζει μεγάλη επεκτασιμότητα αλλά πρέπει πάντα να ερμηνεύεται σε συνδυασμό με την τιμή της μεταβλητής LT.

-RT: ελαστικότητα εφελκυσμού, % επαναφορά μετά την παραμόρφωση. Εκφράζει το βαθμό επαναφοράς στο αρχικό σχήμα μετά την παραμόρφωση ή την ικανότητα για επαναφορά μετά τον εφελκυσμό όταν η ασκούμενη τάση μηδενίζεται.

-EMT: % επιμήκυνση υφάσματος υπό φορτίο.

- Διάτμηση (Shearing)

Ασκούνται στο δείγμα παράλληλες δυνάμεις αντίθετης φοράς μέχρι να γίνει η γωνία απόκλισης 8°. Το δείγμα, αφού επανέλθει στην αρχική του θέση, υφίσταται την ίδια τάση στην αντίθετη κατεύθυνση (-8°). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ένα διάγραμμα τάσης-γωνίας απόκλισης και από αυτό προκύπτουν οι τιμές των μεταβλητών που περιγράφονται παρακάτω. Γενικά, η αντίσταση στη διάτμηση εκφράζει την ευκολία με την οποία τα νήματα ή οι ίνες «γλιστρούν» μεταξύ τους δίνοντας έτσι είτε μαλακές και εύκαμπτες δομές είτε σκληρές και δύσκαμπτες. Οι παράμετροι που μετρούνται είναι οι εξής:

-G: σκληρότητα διάτμησης. Είναι στην ουσία η κλίση της καμπύλης που προκύπτει και στις θετικές (G+) και στις αρνητικές (G-) γωνίες απόκλισης. Υψηλές τιμές G εκφράζουν μεγαλύτερη ακαμψία και αντίσταση στη διατμητική τάση. Αντίθετα, όσο μικρότερη είναι η τιμή της μεταβλητής αυτής, τόσο μαλακότερο είναι το ύφασμα και κατά συνέπεια επιτρέπει το καλό «πέσιμο» ή εφαρμογή του ρούχου στο σώμα.

-2HG: υστέρηση του φορτίου διάτμησης υπό γωνία διάτμησης 0.5^{o}.

-2HG5: υστέρηση του φορτίου διάτμησης υπό γωνία διάτμησης 5.0^{o}.

Το σύστημα Kawabata διαθέτει επίσης μετρητική συσκευή για τον χαρακτηρισμό των επιφανειακών ιδιοτήτων υφασμάτων και συγκεκριμένα των εξής χαρακτηριστικών:

-MIU: συντελεστής τριβής.

-SMD: συντελεστής γεωμετρικής τραχύτητας.

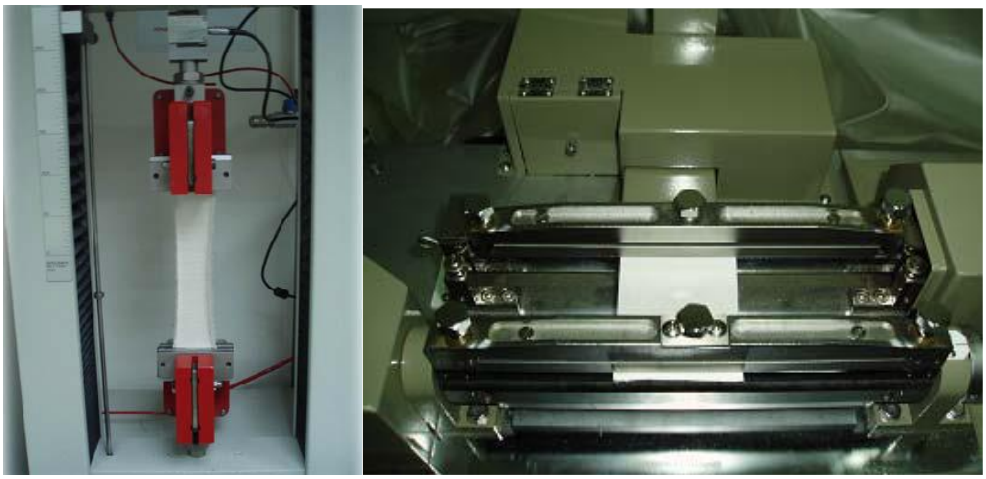
- Pilling

Pilling είναι τα κομπαλίδια ινών τα οποία δημιουργούνται στα κλωστοϋφαντουργικά προϊόντα τα οποία υπόκεινται σε συνθήκες τριβής. Η ανάπτυξη pilling δίνει στο προϊόν την εικόνα του πολυκαιρισμένου και κακοδιατηρημένου, επιπλέον σε προϊόντα όπως τα σεντόνια ή παπλωματοθήκες είναι δυνατό να μειώσει την συμβολή του προϊόντος στην ποιότητα της ανάπαυσης του χρήστη. Η αξιολόγηση της αντίστασης στο pilling πραγματοποιείται με συσκευές διαφόρων τύπων, που σκοπό έχουν να επιταχύνουν την ανάπτυξη του pilling πάνω στα δοκίμια. Η πιο συνηθισμένη μέθοδος ελέγχου εφαρμόζεται στη συσκευή ICI Pilling Box. Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιούνται τέσσερα δοκίμια υφάσματος τα οποία ράβονται και εφαρμόζονται σε ελαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια οι σωλήνες τοποθετούνται στο εσωτερικό περιστρεφόμενου κουτιού. Το εσωτερικό του κουτιού είναι επενδεδυμένο με φύλλα φελλού. Η ταχύτητα περιστροφής του κουτιού είναι καθορισμένη και ο αριθμός των στροφών (κατά

συνέπεια ο χρόνος διάρκειας του ελέγχου) καθορίζεται συνήθως με κριτήριο τη δομή και την σύνθεση του προϊόντος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση πραγματοποιήθηκαν 36.000 στροφές.

Για την μελέτη των υφασμάτων PET πραγματοποιήθηκαν δοκιμές εφελκυσμού σύμφωνα με την πρότυπη μέθοδο EN ISO 13934. Η μελέτη αντοχής σε εφελκυσμό πραγματοποιήθηκε με χρήση του εξοπλισμού SDL Atlas (Rock Hill, SC, ΗΠΑ) (Σχήμα 29α) που λειτουργεί με ταχύτητα εφελκυσμού 50 mm/min. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25 ^{o}C με διαστάσεις δειγμάτων 5 × 20 cm^2, σύμφωνα με την πιστοποίηση EN ISO 13934.

Το σύστημα Kawabata (KES), που παρουσιάζεται στο Σχήμα 29β, χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση των μηχανικών ιδιοτήτων των υφαντών PA 6.6 υφασμάτων σε ήπιες καταπονήσεις οι οποίες προσομοιάζουν την παραμόρφωση που υφίστανται τα υφάσματα λόγω καθημερινής χρήσης και περιλαμβάνει πέντε ευαίσθητα όργανα που μετρούν την αντοχή σε εφελκυσμό, κάμψη, συμπίεση, διάτμηση, όπως επίσης και την ομαλότητα και την συμπεριφορά στην τριβή της επιφάνειας του υφάσματος. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα διαστάσεων 20×20 cm^2 και όλες οι μετρήσεις πλην της συμπίεσης πραγματοποιήθηκαν και προς την κατεύθυνση των στημονίων και των υφαδίων. Το Pilling box και η συσκευή Martindale M235, SDL Atlas (Rock Hill, SC, ΗΠΑ) (Σχήμα 29γ,δ) χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της συμπεριφοράς του υφάσματος στο pilling και την αντίσταση στην τριβή, αντίστοιχα. Η φθορά από τριβή μπορεί να εμφανιστεί τοπικά σε επίπεδα τμήματα του προϊόντος ή σε ακμές (π.χ. στην άκρη μιας μανσέτας) ή σε δίπλωμα του υφάσματος και μπορεί να αλλοιώσει την εμφάνιση του προϊόντος μέσω της παραμόρφωσης της επιφάνειας ή και τη δημιουργία κομπαλιδίων. Εκτός από τα εγγενή χαρακτηριστικά των προϊόντων και την επίδραση των συνθηκών χρήσης, η φθορά επηρεάζεται και από τις συνθήκες καθαρισμού και περιποίησης των ειδών. Άλλοι παράγοντες οι οποίοι είναι δυνατό να επηρεάσουν την αντίσταση στη φθορά ενός κλωστοϋφαντουργικού προϊόντος είναι η λεπτότητα των ινών, η χρήση δίκλωνων (ή πολύκλωνων νημάτων), η πυκνότητα της ύφανσης (πλέξης) καθώς και η ύφανση και το πάχος του προϊόντος. Στη συσκευή Martindale Abrasion τέσσερα δοκίμια από το προϊόν τοποθετούνται σε ειδικές θήκες με την καλή όψη προς τα κάτω. Οι θήκες ακουμπούν πάνω σε πρότυπο μάλλινο ύφασμα τριβής και βρίσκονται υπό συγκεκριμένο βάρος. Οι θήκες κινούνται με ελλειψοειδή κίνηση επάνω στο ύφασμα τριβής. Η ολοκλήρωση του ελέγχου σχετίζεται με την αξιολόγηση της εμφάνισης ή την απώλεια μάζας του δοκιμίου έπειτα από κάποιο συγκεκριμένο αριθμό στροφών.



α) β)

γ) δ)

Σχήμα 29: α) Δυναμόμετρο για προσδιορισμό της αντοχής στον εφελκυσμό, β) Μετρητική συσκευή του συστήματος αξιολόγησης Kawabata για διεξαγωγή δοκιμών εφελκυσμού & διάτμησης, γ) Μέτρηση κομπαλιδίων ινών λόγω τριβής στη συσκευή Pilling box, δ) Έλεγχος αντοχής στη φθορά λόγω τριβής στη συσκευή Martindale. Τα μηχανήματα που απεικονίζονται βρίσκονται στην εταιρία MIRTEC S.A-ΕΒΕΤΑΜ.

4.12 Αντοχή χρωματισμού στο οικιακό πλύσιμο, στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα

Η αντοχή χρωματισμού στο οικιακό πλύσιμο μπορεί να ελεγχθεί σύμφωνα με τα οριζόμενα στο πρότυπο Textiles–Tests for colour fastness Part C06: Colour fastness to domestic and commercial laundering. Η δοκιμή πραγματοποιείται σε μικροπλυντήριο σε θερμοκρασίες από 30°C έως και 95 °C με χρήση πρότυπου απορρυπαντικού. Στην προκειμένη περίπτωση η δοκιμή πραγματοποιήθηκε στους 95 °C για 30 min. Το προς εξέταση δοκίμιο υφάσματος ενώνεται με

πολυμάρτυρα (πρότυπο ύφασμα ελέγχου το οποίο αποτελείται από ζώνες μαρτύρων με τις εξής συνθέσεις: μαλλί, ακρυλικό, πολυεστέρας, νάυλον, βαμβάκι, ασετάτ). Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αξιολογείται τόσο η αλλαγή χρωματισμού του δοκιμίου όσο και το λέκιασμα των μαρτύρων με βάση τις κλίμακες των γκρι για αλλαγή χρωματισμού και για λέκιασμα μαρτύρων. Η κλίμακα των γκρι για αλλαγή χρωματισμού είναι από 1 έως 5, όπου 5 απόλυτη χρωματική ταύτιση δοκιμίου και αρχικού δείγματος. Αντίστοιχη είναι και η κλίμακα των γκρι για λέκιασμα όπου 5 δεν υπάρχει λέκιασμα.

Η αντοχή χρωματισμού στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα πραγματοποιείται σύμφωνα με τη μέθοδο EN ISO 105 E04, όπου τα δοκίμια διαβρέχονται πλήρως σε διάλυμα όξινου και αλκαλικού ιδρώτα αντίστοιχα και κατόπιν τοποθετούνται ανάμεσα σε ειδικά πλακίδια υπό πίεση, όπου και παραμένουν για 4 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C (προσομοίωση ανθρώπινης θερμοκρασίας). Μετά το πέρας των 4 ωρών πραγματοποιείται αξιολόγηση της αλλαγής του χρωματισμού του δείγματος όσο και του λεκιάσματος που έχει προκληθεί. Η εκτίμηση των δοκιμίων πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση με βάση τις κλίμακες των γκρι μαρτύρων για λέκιασμα και αλλαγή χρωματισμού.

4.13 Αντοχή χρωματισμού στην ξηρή και υγρή τριβή

Για τον προσδιορισμό της αντοχής χρωματισμού στην τριβή, βάσει της μεθόδου EN ISO 105-X12, χρησιμοποιείται ειδική συσκευή μέτρησης που λέγεται crockmeter και φέρει ένα κινητό και ένα σταθερό τμήμα. Στη θέση του κινητού εξαρτήματος τοποθετείται λευκό βαμβακερό ύφασμα το οποίο τρίβεται πάνω στο δείγμα του βαμμένου υφάσματος που πρόκειται να ελεγχθεί εκτελώντας ορισμένους κύκλους και υπό ορισμένη πίεση. Μετά το πέρας της δοκιμής το λευκό ύφασμα απομακρύνεται και αξιολογείται ως προς το λέκιασμα σε κλίμακα από 1-5 (όπου 5 σημαίνει καθόλου λέκιασμα). Ομοίως προσδιορίζεται η αντοχή χρωματισμού στην υγρή τριβή (σε αυτήν την περίπτωση βρέχεται το λευκό βαμβακερό ύφασμα).

4.14 Αντοχή βαφής σε ακτινοβολία ΧΕΝΟΝ

Η αντοχή χρωματισμού σε τεχνητό φως (λάμπα ΧΕΝΟΝ) αξιολογήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου EN ISO 105-B02:2013. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικό θάλαμο όπου εφαρμόστηκαν οι εξής συνθήκες: θερμοκρασία 45 ^{o}C, υγρασία 40 % και ακτινοβολία 42 W/m^2 σε εύρος μηκών κύματος 300-400 nm.

4.15 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων συνθετικών υφασμάτων

4.15.1 Ανάλυση FTIR-ATR

Κατά τη φασματοσκοπία υπερύθρου η ύλη αλληλεπιδρά με το υπέρυθρο φως και προκαλούνται δονήσεις των μορίων. Οι δονήσεις αυτές καταγράφονται σε ένα φάσμα υπερύθρου το οποίο αποτελεί δαχτυλικό αποτύπωμα/ ταυτότητα της ένωσης που εξετάζεται. Η χημική δομή της επιφάνειας ενζυμικώς τροποποιημένου και μη πλεκτού PET και υφαντού PA 6.6 υφάσματος εξετάστηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Fourier Transform Infrared Spectroscopy-Attenuated Total Reflectance, FTIR-ATR), με χρήση του φασματομέτρου Bruker Tensor 27 FTIR, εξοπλισμένο με ένα διαμάντι μονής ανάκλασης με βάθος διείσδυσης ~2 μm.

4.15.2 Ανάλυση SEM

Οι διαφορές επί της επιφάνειας των τροποποιημένων υφασμάτων μελετήθηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (scanning electron microscopy, SEM), με την χρήση ηλεκτρονικής δέσμης, στο FEI Quanta 200 (Hillsboro, Oregon, ΗΠΑ) με ανιχνευτή δειγμάτων στερεάς κατάστασης και ευρέως πεδίου. Η επιφάνεια του υφάσματος επικαλύφθηκε αρχικά με ένα λεπτό στρώμα χρυσού (~23 nm) με την μέθοδο απόθεσης φυσικών ατμών (physical vapor deposition method, PVD) με χρήση του SC7620 Sputter Coater (Laughton, Αγγλία).

4.15.3 Ανάλυση XPS

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) χρησιμοποιείται εκτενώς για την ταυτοποίηση της χημικής σύστασης και της χημικής κατάστασης των στοιχείων που βρίσκονται στην επιφάνεια, δηλαδή τον σχηματισμό δεσμών. Η χημική σύσταση της επιφάνειας προσδιορίζεται από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα XPS. Οι θέσεις και το σχήμα των γραμμών δίνουν πληροφορίες για την χημική κατάσταση των στοιχείων που ανιχνεύονται. Όσον αφορά αυτήν την μελέτη δείγματα ατροποποίητου και τροποποιημένου υφάσματος διαστάσεων 1x1 cm^2 τοποθετήθηκαν στο υποδοχέα του Leybold-Specs MAX200 (Cologne, Γερμανία) και προσδέθηκαν στην ειδική θέση του δειγματοφορέα MAX200 Al. Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία δωματίου και πίεση 10^{-8} mbar, με χρήση μη μονοχρωματικής MgK_{α} ακτινοβολίας ακτίνων X (ενέργεια

φωτονίων 1253.6 eV) και ενός ημισφαιρικού αναλυτή ενέργειας ηλεκτρονίων (SPECS EA200) με ανιχνευτή πολλών καναλιών, καλιμπραρισμένο σύμφωνα με τις πιστοποιήσεις ISO15472 και ISO24237. Ο αναλυτής χρησιμοποιήθηκε με συνεχόμενη παροχή ενέργειας 100 eV. Την περιοχή μελέτης αποτέλεσε ένα ορθογώνιο διαστάσεων ήταν ένα 4×7 στο κέντρο κάθε δείγματος. Από τα αποτελέσματα έχει αφαιρεθεί το εκτιμώμενο σήμα των στοιχείων C και O που αντιστοιχεί στην επιφάνεια του δειγματοφορέα και του στρώματος επιμόλυνσης (~0.8 nm), λόγω έκθεσης στην ατμόσφαιρα.

4.15.4 Ανάλυση DSC και TGA

Τέλος πραγματοποιήθηκε διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC) στο Mettler DSC 1 STAReSystem υπό ροή αζώτου 10 mL/min, με εφαρμογή ενός κύκλου θέρμανσης-ψύξης-θέρμανσης από τους 20 έως τους 350 ºC με βήμα 10 ºC/min, ώστε να βρεθούν η θερμοκρασία πρώτης τήξης, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης και η θερμοκρασία δεύτερης τήξης. Η θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis, TGA) έγινε στη συσκευή Mettler TGA/DSC1 thermobalance με ρυθμό θέρμανσης 10 ºC/min από 30 έως 600 ºC, υπό ροή αζώτου 10 mL/min. Η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης σημειώνεται όταν μεγιστοποιείται ο ρυθμός απώλειας βάρους του δείγματος.

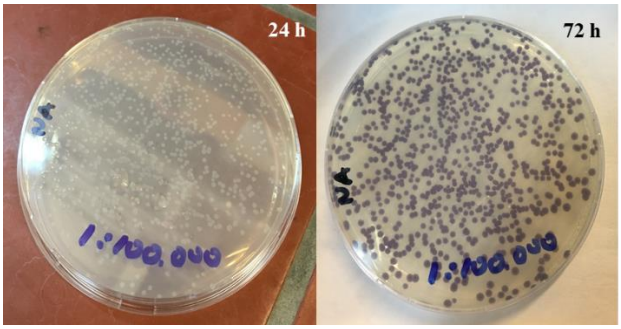
4.16 Μέτρηση υδροφιλικότητας ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων

Η μέτρηση της υδροφιλικότητας τροποποιημένου και ατροποποίητου υφαντού PA 6.6 υφάσματος βασίστηκε στην μέθοδο DIN 53924. Αναλυτικά λωρίδα υφάσματος (200×5 mm^2) εμβαπτίζεται κάθετα σε ένα δοχείο που περιέχει 1 % βαφή σε απιονισμένο νερό, ώστε το κάτω μέρος του υφάσματος ύψους 30 mm να είναι βυθισμένο στο λουτρό βαφής, και παρακολουθείται η αναρρίχηση του νερού σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

4.17 Παραγωγή και απομόνωση βιολασεΐνης από το βακτήριο *J. lividum*

4.17.1 Βελτιστοποίηση παραγωγής σε φιάλες Erlenmeyer

Αρχικά παρασκευάστηκαν τρυβλία NA τα οποία εμβολιάστηκαν με τον μικροοργανισμό *J. lividum* που φυλάσσεται σε stock γλυκερόλης 20 % στους -80 ºC και επωάστηκαν στους 25 ºC για 18 h (Σχήμα 30).



Σχήμα 30: Αποικίες βακτηριακού στελέχους *J. lividum* σε θρεπτικό NA σε 24 και 72 h επώαση.

Στη συνέχεια, από αυτά τα τριβλία εμβολιάστηκαν 20 mL θρεπτικού NB σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 100 mL και επωάστηκαν στους 25 ^{o}C, υπό ανάδευση 180 rpm. Τελικά όταν οι προκαλλιέργειες απέκτησαν οπτική πυκνότητα OD_{600} ίση με 3, εμβόλιο 1% μεταφέρθηκε σε 100 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου NB σε φιάλες Erlenmeyer των 250 mL. Διάφορες παράμετροι μελετήθηκαν προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή της βιολασεΐνης που προκύπτει ως δευτερογενής μεταβολίτης. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του αρχικού pH της καλλιέργειας σε ένα εύρος από 5.0 έως 9.0 σε διάφορα συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων: 15.6 g/L NaH_2PO_4•$2H_2O$ για pH 5.0, 13.25 g/L NaH_2PO_4•$2H_2O$ and 2.67 g/L Na_2HPO_4•$2H_2O$ για pH 6.0, 5.72 g/L NaH_2PO_4•$2H_2O$ και 11.3 g/L Na_2HPO_4•$2H_2O$ για pH 7.0, 0.85 g/L NaH_2PO_4•$2H_2O$ και 16.8 g/L Na_2HPO_4•$2H_2O$ για pH 8.0 και 17.8 g/L Na_2HPO_4•$2H_2O$ και 10 % w/v Na_2CO_3 για pH 9.0. Έπειτα μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας στο εύρος 20-35 ^{o}C. Στη συνέχεια εξετάστηκε η παραγωγή βιομάζας και βιολασεΐνης σε NB παρουσία των πηγών άνθρακα γλυκόζη (NB-G), γλυκερόλη (NB-GY) ή ξυλόζη (NB-X) σε συγκέντρωση 1 % (w/v). Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση παρουσίας αντιβιοτικού (αμπικιλλίνη, καναμυκίνη, στρεπτομυκίνη ή τρετρακυκλίνη) σε συγκέντρωση 0.1 mg/mL. Η αμπικιλλίνη ειδικότερα μελετήθηκε στο εύρος συγκεντρώσεων από 0.05 έως 0.4 mg/mL. Όλες οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν υπό ανάδευση 180 rpm.

Η παραγωγή βιομάζας υπολογίζεται σε καθημερινή βάση επί ξηρού (dry weight basis, d.w.), όπως φαίνεται στο Σχήμα 31.

Σχήμα 31: Συλλογή δειγμάτων βιομάζας J. lividum και ζύγιση ύστερα από ξήρανση.

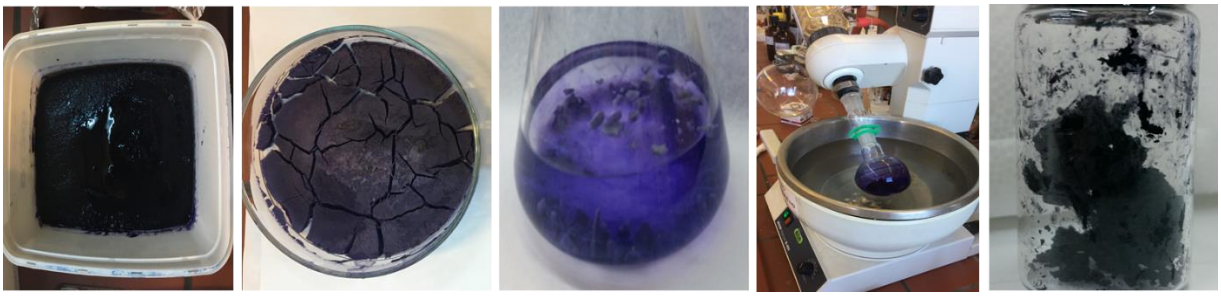
Δείγμα των 2 mL της καλλιέργειας φυγοκεντρείται και η ακατέργαστη βιολασεΐνη εκχυλίζεται από τα κύτταρα με 1.5 mL μεθανόλης ύστερα από επώαση 15 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια η εκχυλισμένη βιολασεΐνη φυγοκεντρείται για απομάκρυνση των κυτταρικών θραυσμάτων και φωτομετρείται στα 580 nm. Ακόμη το υπερκείμενο της καλλιέργειας φωτομετρείται και αυτό στα 580 nm ώστε να εκτιμηθεί η ακατέργαστη βιολασεΐνη που έχει διαρρεύσει από τα κύτταρα. Στη συνέχεια από καλλιέργιες που επωάστηκαν στις βέλτιστες τιμές pH και θερμοκρασίας απομονώθηκε βιομάζα με φυγοκέντρηση (10000xg) για 20 min, λυοφιλιώθηκε και η βιολασεΐνη εκχυλίστηκε με 80 mL μεθανόλη, ύστερα από επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και 150 rpm. Η μεθανόλη εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα και στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε ξήρανση και ζύγιση. Η βιολασεΐνη που είχε απελευθερωθεί στο υπερκείμενο αυτών των καλλιεργειών εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα σε αναλογία 1:1, τέσσερις φορές, ο διαλύτης εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα και στο εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε ξήρανση και ζύγιση.

4.17.2 Παραγωγή βιολασεΐνης σε Βιοαντιδραστήρα

Καλλιέργεια των 50 mL σε κωνική φιάλη Erlenmeyer των 250 mL εμβολιάστηκε με τον μικροοργανισμό *J. lividum* σε θρεπτικό μέσο NB και επωάστηκε στους 25 ^{o}C, υπό ανάδευση 180 rpm, για 18 h. Από αυτή την προκαλλιέργεια εμβόλιο μεταφέρθηκε σε 1.5 L φρέσκο μέσο NB pH 7.0, ώστε η οπτική πυκνότητα OD_{600} να είναι ίση με 0.2. Η καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα 2 L Bioflo® & Celligen® 310 Fermentor (New Brunswick Scientific, New Jersey, ΗΠΑ). Επιπρόσθετα, μελετήθηκε και η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου, όπου κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης που η οπτική πυκνότητα OD_{600nm} ήταν ίση με 1.7, προστέθηκε γλυκερόλη 1 % v/v ώστε να ενισχυθεί η παραγωγή βιομάζας και συνεκδοχικά η παραγωγή της βιολασεΐνης. Η

θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 25 °C και το pH στην τιμή 7.0 με χρήση του πεχάμετρου ELEC-405-DPAS-SC-K8S/200/NBS και διαλύματος 2.0 M υδροχλωρίου. Ο αερισμός ρυθμίστηκε στα 0.75 vvm. Το επίπεδο διαλυμένου οξυγόνου διατηρήθηκε σταθερό στο 20±10 % και μετρήθηκε με το οξυγονόμετρο Sen, Inpro 6830/12/220/NBS (Mettler Toledo). Δείγματα λαμβάνονταν κατά την ζύμωση ώστε να μετρηθεί η ανάπτυξη της βιομάζας, η παραγωγή της βιολασεΐνης και η κατανάλωση της γλυκερόλης.

Μετά το πέρας της καλλιέργειας η βιομάζα που παράχθηκε ύστερα από φυγοκέντρηση (10000xg) για 20 min, λυοφιλιώθηκε και η βιολασεΐνη εκχυλίστηκε με 1 L μεθανόλη, ύστερα από επώαση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και 150 rpm. Η μεθανόλη εξατμίστηκε σε περιστρεφόμενο εξατμιστήρα και το εκχύλισμα που περιέχει την βιολασεΐνη φυλάχθηκε στο σκοτάδι στους 4 ^{o}C (Σχήμα 32). Για τον υπολογισμό του περιεχομένου καθαρής βιολασεΐνης στο εκχύλισμα, η βιολασεΐνη διαλύθηκε σε αιθανόλη και έγινε εφαρμογή του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας (extinction coefficient, ε) 56.01 mL/(mg•cm) στα 575 nm που αντιστοιχεί στην καθαρή βιολασεΐνη σε διάλυμα αιθανόλης (Mendes et al. 2001a).



α) β) γ) δ) ε)

Σχήμα 32: Απομόνωση βιολασεΐνης από βιοαντιδραστήρα: α) συλλογή βιομάζας, β) λυοφιλίωση βιομάζας, γ) εκχύλιση βιολασεΐνης από το εσωκυτταρικό με μεθανόλη, δ) και ε) εξάτμιση μεθανόλης και συλλογή ακατέργαστης βιολασεΐνης

4.18 Τροποποίηση πλεκτών PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη

Τα πλεκτά PA 6.6 υφάσματα βάφτηκαν με βιολασεΐνη μέσω τριών διαφορετικών διαδικασιών: α) ταυτόχρονη ζύμωση-ανάπτυξη του *J. lividum* και βαφή των υφασμάτων (SFD), β) βαφή υφασμάτων με το υπερκείμενο της καλλιέργειας, ύστερα από εμπλουτισμό με βιολασεΐνη που απελευθερώθηκε από τα κύτταρα, ύστερα από εφαρμογή υπερήχων (DAFS) γ)

άμεση βαφή των υφασμάτων με ακατέργαστη εσωκυτταρική βιολασεΐνη που έχει εκχυλιστεί με μεθανόλη (DD) (Σχήμα 33α). Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Στην περίπτωση του SFD, αποστειρωμένα υφάσματα διαστάσεων 5×5 cm^2 επωάστηκαν με τον μικροοργανισμό *J. lividum* υπό τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης θερμοκρασίας και pH σε 100 mL καλλιέργειας σε φιάλες Erlenmeyer των 250 mL σε τελικό όγκο 100 Ml για 6 ημέρες. Μετά το πέρας της επώασης τα υφάσματα αποστειρώθηκαν για 20 min και ακολούθως πλύθηκαν με 0.4 % Triton X 100 για 1 h στους 80 ^oC και τέλος με απιονισμένο νερό.

Στην περίπτωση του DAFS, μετά τη ζύμωση του *J. Lividum* για 6 ημέρες, στην καλλιέργεια εφαρμόστηκαν υπέρηχοι (40 % amplitude, 20 min, pulse 2 min on, 2 min off) για απελευθέρωση της εσωκυτταρικής βαφής. Τα κυτταρικά θραύσματα απομακρύνθηκαν, προστέθηκε αζίδιο του νατρίου 0.02 % (w/v) και υφάσματα 5×5 cm^2 επωάστηκαν για 48 h. Τα βαμμένα υφάσματα αποστειρώθηκαν και πλύθηκαν με 0.4 % Triton X 100 για 1 h στους 80 ^oC και τέλος με απιονισμένο νερό (Σχήμα 33β).

Στην περίπτωση της άμεσης βαφής με την εκχυλισμένη βιολασεΐνη (DD), από καλλιέργειες που επωάστηκαν για 6 ημέρες απομονώθηκε η ακατέργαστη εσωκυτταρική βιολασεΐνη ακολούθησε επώαση υφασμάτων διαστάσεων 5×5 cm^2 σε τελικό όγκο 30 mL μεθανόλη:νερό 1.7:10.0 (v/v) (συγκέντρωση εκχυλίσματος που περιέχει βιολασεΐνη 1.02 mg/Ml), για 48 h. Τα δείγματα στη συνέχεια πλύθηκαν με απιονισμένο νερό.

α) β)

Σχήμα 33: α) Βαφή υφάσματος με την εκχυλισμένη βιολασεΐνη, β) πλύση υφασμάτων βαμμένων με SFD μετά από αποστείρωση.

4.19 Προετοιμασία φύλλων PLA με βιολασεΐνη με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος

Τα φύλλα (foils) PLA κατασκευάστηκαν με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος (casting). Πραγματοποιήθηκε παραγωγή δυο φύλλων (πάχος>100 μm), το Α και Β, με έγκλειστη ακατέργαστη βιολασεΐνη και ένα φύλλο PLA που αποτέλεσε δείγμα ελέγχου. Για την παραγωγή του PLA Α 0.43 g βιολασεΐνης διαλύθηκαν σε 20 mL αιθανόλης και έπειτα αναμίχθηκαν με 180 mL χλωροφορμίου με 10 % διαλυμένα σωματίδια PLA σε γυάλινη κωνική Erlenmeyer φιάλη των 250 mL με εσμύρισμα. Για την παραγωγή του PLA Β 4.04 g βιολασεΐνης διαλύθηκαν σε 40 mL αιθανόλης και έπειτα αναμίχθηκαν με 260 mL χλωροφορμίου με 10 % διαλυμένα σωματίδια PLA σε γυάλινη κωνική Erlenmeyer φιάλη των 500 mL με εσμύρισμα. Τα PLA Α και Β απλώθηκαν σε γυάλινο δοχείο διαστάσεων 30x20 cm^2 και αφέθηκαν σε απαγωγό προς εξάτμιση των διαλυτών, οδηγώντας στο σχηματισμό του φύλλου Α με βάρος 41 mg/cm^2 και μέσο πάχος 328 μm και του φύλλου Β με βάρος 65 mg/cm^2 και μέσο πάχος 718 μm και σύσταση 0.002 g_{Vio}/g_{PLA} και 0.135 g_{Vio}/g_{PLA} για τα Α και Β, αντίστοιχα (Σχήμα 34).

Σχήμα 34: Κατασκευή φύλλων PLA με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος με ή χωρίς βιολασεΐνη.

4.20 Μελέτη αντιμικροβιακής ιδιότητας τροποποιημένων PA υφασμάτων και φύλλων PLA με βιολασεΐνη

Η αντιβακτηριακή ιδιότητα των φύλλων PLA και των πλεκτών PA υφασμάτων εξετάστηκε σε ένα φάσμα βακτηρίων: *E. coli*, *S. aureus*, *S. aureus* MRSA, *B. subtilis*, *M. luteus* και *P. Aeruginosa*, *L. monocytogenes* και *E. faecalis* βάσει της μεθόδου AATCC 100-1993 (Shahmoradi Ghaheh et al., 2014). Η αντιμυκητιακή δράση των εξεταζόμενων πολυμερών περιορίστηκε στους εξής μικροοργανισμούς: *C. albicans*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. Οι *Candida* spp φυλάσσονταν σε θρεπτικό Sabouraud. Κάθε μικροοργανισμός καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο για 18 h και έπειτα 2 mL θρεπτικού μέσου NB εμβολιάστηκαν από τις προαναφερθείσες καλλιέργειες ώστε να επιτευχθεί οπτική πυκνότητα OD_{600} ίση με 0.1. Δείγματα ατροποποίητων και τροποποιημένων PLA και PA υλικών (100 mg/mL) εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 70 % v/v, ώστε να αποστειρωθούν και στη συνέχεια προστέθηκαν σε καλλιέργειες των 2 mL στους 37 °C για 24 h, υπό ανάδευση 180 rpm. Αντίστοιχα, εκχυλισμένη βιολασεΐνη διαλύθηκε σε DMSO (50 mg/mL, stock διαλύματα) και προστέθηκε στις καλλιέργειες σε τελικές συγκεντρώσεις 2, 1, 0.5 and 0.1 mg/mL. Κατάλληλα δοχεία εμβολιάστηκαν στους 37°C και επωάστηκαν στους 24 h, 180 rpm. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (έως 10^{-6} φορές) και τρυβλία NB εμβολιάστηκαν με 0.1 mL κάθε δείγματος. Κατάλληλα δείγματα ελέγχου κατασκευάστηκαν με ή χωρίς την προσθήκη πολυμερούς και εξετάστηκαν για κάθε μικροοργανισμό αντίστοιχα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε αρίθμηση των κυτταρικών αποικιών (c.f.u.) στα τρυβλία έπειτα από 24 h επώαση. Το ποσοστό παρεμπόδισης ανάπτυξης των μικροοργανισμών υπολογίστηκε από την σχέση:

$$R\ (\%)=\frac{A-B}{A}*100,$$

όπου R είναι το ποσοστό παρεμπόδισης του μικροοργανισμού, A είναι ο αριθμός των αποικιών στο δείγμα ελέγχου (control-ατροποποίητο ύφασμα) και B ο αριθμός των αποικιών στα τροποποιημένα υφάσματα.

4.21 Μελέτη αντιοξειδωτικής ιδιότητας τροποποιημένων PA υφασμάτων και φύλλων PLA με βιολασεΐνη

Δείγματα PA πλεκτών υφασμάτων διαστάσεων και φύλλων PLA 2.5x2.5 cm^2 επωάστηκαν σε 5 mL διαλύματος DPPH σε αιθανόλη ($5.07 \cdot 10^{-5}$ M) για 1 h στους 25 ^{o}C. Η αντιοξειδωτική

επιφάνεια αντιδρά με τις σταθερές ελεύθερες ρίζες του DPPH προς παραγωγή της άχρωμης ένωσης 1,1-διφαινυλ-πικρυλ-υδραζίνη (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazine) και ακολουθεί φωτομέτρηση του υπερκείμενου στα 517 nm (Konzen et al. 2006) Ακόμη πραγματοποιείται φωτομέτρηση υπερκείμενου αντίδρασης ελέγχου που περιλαμβάνει ατροποποίητο ύφασμα ή PLA σε DPPH διάλυμα. Η ικανότητα δέσμευσης DPPH ριζών υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

Ικανότητα δέσμευσης ριζών DPPH %= $(1-\frac{ABS\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma}{ABS\tau\upsilon\varphi\lambda o\acute{\upsilon}})\bullet 100$

όπου τυφλό είναι το διάλυμα DPPH ριζών σε αιθανόλη.

4.22 Ενζυμική μετεστεροποίηση μονομερών και διμερών φυσικών υποστρωμάτων

Η ενζυμική ακυλίωση των μονοσακχαριτών Glc, Man, Gal, Ara, Xyl (400 mM) και των δισακχαριτών Celb και β-Manb (50 mM) πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS-NaOH 100 mM pH 6.0 κορεσμένο με τους βινυλεστέρες του οξικού, προπιονικού, βουτυρικού, δεκανοϊκού, κιναμικού και λαυρικού οξέος, με προσθήκη ενζύμου *Ct*CE2 (0.1 mg/mL ή 17.5 U/mL), στους 30 ºC σε Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, Γερμανία), υπό ανάδευση 900 rpm για 24 h. Ακόμη πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης σύνθεσης του ενζύμου σαγια την προπυλίωση του υποστρώματος Man. Οι παράμετροι που εξετάστηκαν ήταν η συγκέντρωση του ενζύμου, ο χρόνος αντίδρασης, η ανάδευση, η θερμοκρασία και η αναλογία όγκων νερού-βινυλεστέρα. Αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιήθηκαν χωρίς ένζυμο ή βινυλεστέρα για όλες τις δοκιμές.

4.23 Ενζυμική μετεστεροποίηση πολυσακχαριτών

Οι αντιδράσεις μετεστεροποίησης των πολυσακχαριτών συγκέντρωσης 0.75% w/v έλαβαν χώρα σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL σε ρυθμιστικό διάλυμα MOPS-NaOH 100 mM pH 7.0 με προσθήκη ενζύμου *Ct*CE2 6.67 mg/$g_{\pi o\lambda\upsilon\sigma\alpha\kappa\chi}$ (0.05 mg/mL ή 8.75 U/mL), στους 30 ºC για 72 h, 1000 rpm. Μετά το πέρας των αντιδράσεων τα δείγματα βράστηκαν προς απενεργοποίηση της εστεράσης για 10 min και για να απομκαρυνθεί η περίσσεια βινυλεστέρα. Στη συνέχεια ακολούθησε καταβύθιση με αιθανόλη των ακυλιωμένων πολυσκαχαριτών οι οποίοι ξεπλύθηκαν τρεις φορές με αιθανόλη. Τα δείγματα στη συνέχεια αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για

16-18 h και έπειτα έγινε η ξήρανση τους σε φούρνο 40 ºC για 2 h. Αντιδράσεις ελέγχου πραγματοποιήθηκαν χωρίς ένζυμο ή βινυλεστέρα για όλες τις δοκιμές.

4.24 Ανάλυση μετεστεροποιημένων μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και πολυσακχαριτών με μεθόδους χρωματομετρίας

4.24.1 Ανάλυση TLC

Η ποιοτική ανάλυση των ακυλιωμένων μνοσακχαριτών και δισακχαριτών πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography, TLC). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν TLC φύλλα αλουμινίου επικαλυμμένα με Silica gel 60 (Merck, Γερμανία), και ο διαλύτης έκλουσης 1 βουτανόλη:αιθανόλη:νερό 10:8:6 (v/v/v) (Kremnický and Biely 2005). Σε απόσταση 1 cm από τη βάση του TLC φύλλου σχεδιάστηκε μία γραμμή κατά μήκος της οποίας σε ίσες αποστάσεις τοποθετήθηκαν κλάσματα των 3 μL πρώτα οι αντιδράσεις ελέγχου χωρίς ένζυμο και έπειτα οι αντιδράσεις ακυλίωσης για κάθε βινυλεστέρα. Στη συνέχεια το φύλλο εμβαπτίζεται σε ειδικό γυάλινο δοχείο κορεσμένο με τον διαλύτη έκλουσης, η στάθμη του οποίου πρέπει να βρίσκεται κάτω από την γραμμή που φέρει τα κλάσματα των δειγμάτων προς ανάλυση. Όταν ο διαλύτης τρέξει απόσταση ίση με 11 cm το φύλλο στεγνώνεται και τα σάκχαρα ανιχνεύονται με διαβροχή του φύλλου με βαφή 6.5 mM N(1-ναφθυλ)αιθυλενοδιαμινοδιυδροχλωρίδιο (N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride) σε μεθανόλη 3 % θειικό οξύ (Bounias 1980) και θέρμανση στους 110 ºC για 10 min.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκε ημιποσοτική ανάλυση με TLC των ακυλιωμένων δισακχαριτών, ώστε να εκτιμηθεί το ποσοτό μονοακυλίωσης και διακυλίωσης. Μετά το τρέξιμο του διαλύτη και αφού στεγνώσει το φύλλο, βάφεται με 0.93 % w/v ανιλίνη και 1.66 % w/v φθαλικό οξύ σε κορεσμένη σε νερό βουτανόλη, ένα σύστημα βαφής ιδιαίτερα ευαίσθητο ως προς τα αναγωγικά σάκχαρα (Partridge 1949) και αφήνεται στους 105 ºC για 10 min. Τα προϊόντα έκλουσης ποσοτικοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος TLC Gene Tools v3.06. program (Syngene).

Για την ποιοτική ανάλυση των ακυλιωμένων πολυσακχαριτών όλα τα δείγματα υδρολύθηκαν με κατάλληλα ένζυμα και αναλύθηκαν με εις διπλούν τρέξιμο σε φύλλα TLC επικαλυμμένα με Silica gel 60 και χρήση ακετονιτρίλιο:νερό 8:2 (v/v) ως διαλύτη έκλουσης ώστε να γίνει σύγκριση των ακυλιωμένων θραυσμάτων με τα αντίστοιχα θραύσματα των αντιδράσεων ελέγχου στα οποία δεν είχε προστεθεί η εστεράση *Ct*CE2 (Kremnický et al. 2004).

Οι πολυσακχαρίτες προς ανάλυση διαλύθηκαν σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών φωσφορικών 100 mM pH 6.0 και η αντίδραση υδρόλυσης εκκινήθηκε με την προσθήκη 0.086 mg μιας ανασυνδυασμένης *ενδο*-β-μαννανάσης (*Mt*Man26a) από τον μικροοργαμισμό *M. thermophile για την υδρόλυση των πολυσακχαριτών* γλυκομαννάνη κονγιάκ, γαλακτομαννάνη χαρουπιάς και 1,4-β-D-μαννάνη στους 50 ºC για 18 h με δεύτερη ισόποση προσθήκη ενζύμου μετά τις πέντε πρώτες ώρες αντίδρασης (Katsimpouras et al. 2016). Για την περίπτωση της β-γλυκάνης κριθής, χρησιμοποιήθηκαν 0.086 mg μιας ενασυνδυασμένης ενδογλουκανάσης (MtEG7a) από τον *M. thermophila* στους 50 ºC για 18 h με δεύτερη ισόποση προσθήκη ενζύμου μετά τις πέντε πρώτες ώρες αντίδρασης (Karnaouri et al. 2014). Όλα τα δείγματα αραιώθηκαν δυο φορές και 2 μL από κάθε δείγμα εναποτέθηκαν πάνω στα φύλλα TLC.

4.24.2 Ανάλυση HPLC

Η ποσοτικοποίηση των μονοσακχαριτών και των δισακχαριτών έλαβε χώρα με HPLC στη συσκευή Shimadzu LC-20AD με ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (refractor index) RI-Shimadzu RID 10A και χρήση της στήλης NH2-Macherey Nagel 250/4.6 100-5. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο/νερό (85:15, v/v) σε ισοκρατικό σύστημα με ροή 1 mL/min. Για κάθε σάκαχαρο ή δισακχαρίτη κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς. Οι αποδόσεις σύνθεσης των ακυλιωμένων σακχάρων υπολογίστηκαν από την ποσότητα κάθε σακχάρου που δεν έχει αντιδράση ως προς την αρχική του ποσότητα πριν την ακυλίωση.

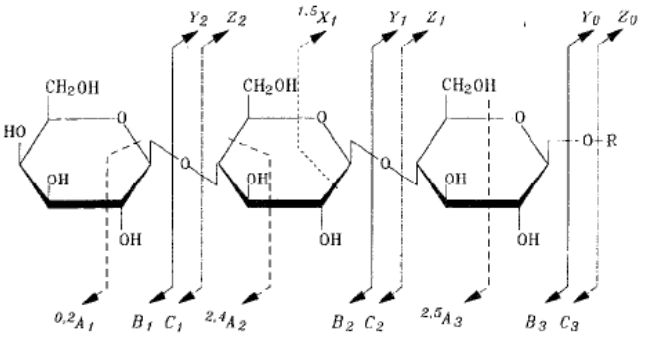
Η ποσοτικοποίηση των ακυλιωμένων πολυσακχαριτών έλαβε χώρα μιας μέσω μιας διαφορετικής οδού. Τα δείγματα των πολυσακχαριτών διαλύθηκαν σε 0.25 mL DMSO ακολούθησε μεθανόλυση των ακυλιωμένων προϊόντων με την προσθήκη 0.5 mL 0.07 M μεθοξειδίου του νατρίου στους 50 ºC για 1 h προς παραγωγή των αντίστοιχων μεθυλεστέρων (Alissandratos et al. 2010). Ακολούθως, προστέθηκαν 0.5 mL νερού και 0.5 mL εξανίου, ενώ οι μεθυλεστέρες εκχυλίστηκαν στην οργανική φάση. Η ποσοτικοποίηση τους έγινε με HPLC στη συσκευή Shimadzu LC-20AD, με στήλη αντίστροφης φάσης HS C18 5 μm 25 cm × 4.6 mm. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα μεθανόλη/νερό (70:30 v/v) με ροή 0.8 mL/ min και η ανίχνευση στο υπεριώδες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Varian ProStar photodiode array στα 210 nm. Οι καμπύλες αναφοράς κατασκευάστηκαν με χρήση εμπορικών μεθυλεστέρων ως πρότυπα.

4.25 Φασματοσκοπική ανάλυση μετεστεροποιημένων μονοσακχαριτών, δισακχαριτών και πολυσακχαριτών

4.25.1 Ανάλυση ESI- MS

Τα κλάσματα των ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών απομονώθηκαν κατά την ανάλυση τους στο HPLC και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας (mass spectrometry MS) με απευθείας εισαγωγή στο φασματόμετρο Varian500 MS IT Mass Spectrometer. Η ανάλυση MS είναι μία τεχνική προσδιορισμού της δομής ενώσεων που βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο m/z. Τα δείγματα βρίσκονται διαλυμένα στο διαλύτη έκλουσης του HPLC 85:15 ακετονιτρίλιο/νερό (v/v) και πριν την ανάλυση MS προστίθεται 0.05 % οξικό οξύ ως δότης πρωτονίων. Η λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε θετικό και αρνητικό mode, με εφαρμογή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization, ESI), ενώ ρυθμίστηκαν οι παράμετροι capillary voltage και RF loading προς βελτίωση του σήματος.

Η ανάλυση και ταυτοποίηση των θραυσμάτων που προέκυψαν από τα φάσματα μαζών MS^n των εστεροποιημένων σακχάρων της παρούσας εργασίας βασίστηκε στη συστηματική ονοματολογία των Domon and Costello (1988) με κάποιες παραλλαγές. Η ονοματολογία αυτή περιγράφει συνοπτικά τους τύπους ιόντων που προκύπτουν από τη φασματοσκοπία μαζών με βομβαρδισμό ιόντων (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry, FIB-MS) και τα φάσματα MS^2 που προκύπτουν από αποδόμηση σύγκρουσης (Collision induced decomposition, CID) ουσιών που περιέχουν μονάδες σακχάρων (γλυκοφωσφολιπίδια, γλυκοπεπτίδια, γλυκοζίτες και υδατάνθρακες). Τα σύμβολα Ai, Bi και Ci χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό θραυσμάτων που περιέχουν τελική σακχαρική μονάδα (μη αναγωγικό άκρο), ενώ τα σύμβολα Xj, Yj και Zj προσδιορίζουν ιόντα που περιέχουν το άγλυκον (αναγωγικό άκρο του σακχάρου). Οι δείκτες i και j υποδηλώνουν τη σχετική θέση με το μη αναγωγικό άκρο των σακχάρων και οι εκθέτες δηλώνουν τις θέσεις διάσπασης των σακχαρικών δακτυλίων (Σχήμα 35).



Σχήμα 35: Τύποι θραυσματοποίησης σακχάρων βάσει των Domon and Costello (1988).

4.25.2 Ανάλυση FTIR

Η πιστοποίηση παραγωγής ακυλιωμένων πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε με FTIR στη συσκευή FTIR Excalibur Series FTS3000 MX, με χρήση του λογισμικού Bio-Rad FTIR 3.0 Merlin στο εύρος 4000-500 cm^{-1}. Το φασματόμετρο υπερύθρου (FT-IR) MAGNA-IR 560 της Nicolet ήταν εφοδιασμένο με ανιχνευτή DTGS KBr και διασχιστή ακτίνας Kbr (beam splitter). Για την ανάλυση στερεών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το εξάρτημα DRIFT (Diffuse Reflectance), της εταιρείας Spectra Tech Inc. (Shelton, CT, USA). Τα δείγματα προς ανάλυση αφού παραλήφθηκαν με καταβύθιση σε 4 mL και ακολούθως 2 mL και 2 mL αιθανόλης, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, τοποθετήθηκαν για ξήρανση στους 40 ^{o}C για 2 h και συμπιέστηκαν σε μήτρα βρωμιούχου καλίου.

5 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΛΕΚΤΩΝ ΥΦΑΣΜΑΤΩΝ PET

Η επιφανειακή υδρόλυση πολυεστερικών υφασμάτων έχει ως στόχο την αύξηση της υδροφιλικότητάς τους, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη πλύση, αναπνοή του ιδρώτα, πιο ευχάριστη αίσθηση κατά την ένδυση και πιο αποτελεσματική βαφή με δραστικές βαφές. Η χρήση εξειδικευμένων βιοκαταλυτών για την τροποποίηση των κλωστοϋφαντουργικών ινών αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, χωρίς επικίνδυνα απόβλητα οργανικών διαλυτών. Ωστόσο για την αποτελεσματική ενζυμική τροποποίηση πολυεστερικών υφασμάτων από PET είναι αναγκαία η επιλογή των κατάλληλων βιακαταλυτών. Προκειμένου να απλουστευτεί η διαδικασία σάρωσης και διαλογής των κατάλληλων ενζύμων έχουν αναπτυχθεί μοντέλα υποστρωμάτα από ολιγομερή του PET. Τέτοια μοντέλα χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή για την επιλογή ενζύμων από την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας προς τροποποίηση πλεκτών PET υφασμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης ενζυμικής επιφανειακής επεξεργασίας πλεκτών PET υφασμάτων και τα τροποποιημένα υφάσματα μέσω φασματοσκοπικής ανάλυσης, ενώ εξετάστηκαν και οι θερμικές και μηχανικές ιδιότητες των υφασμάτων και η βελτίωση τους ως προς την βαφική τους ικανότητα.

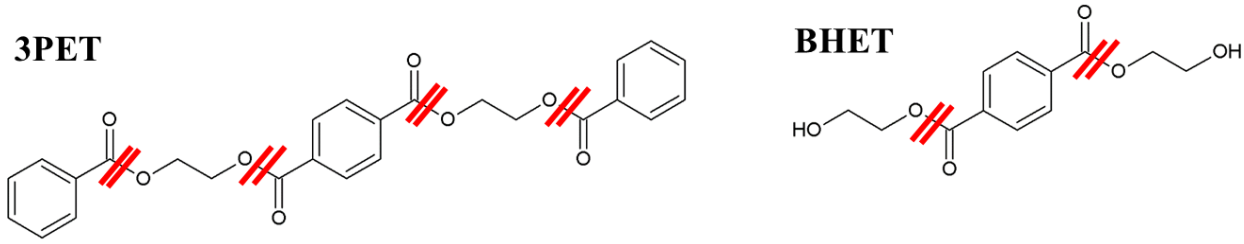
5.1 Ενζυμική υδρόλυση μοντέλων υποστρωμάτων του PET

Η παραγωγή και χρήση μοντέλων υποστρωμάτων που μιμούνται χημικά πολυμερικές επιφάνειες στοχεύει στην άμεση εύρεση ενζύμων που έχουν το δυναμικό να τροποποιήσουν επιφανειακά πολυμερικά υλικά. Η ανίχνευση της υδρολυτικής ικανότητας διάφορων ενζύμων απέναντι στα μόρια αυτά αποτελεί μία αποδοτική και γρήγορη μέθοδο επιλογής των κατάλληλων βιοκαταλυτών, οι οποίοι θα επιταχύνουν ουσιαστικά την έρευνα γύρω από την ενζυμική τροποποίηση συνθετικών ινών, όπως το PET και το PA 6.6.

Στη σχετικά πρόσφατη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ της τάξης των ενζύμων ή της πηγής προέλευσής τους και της δραστικότητας που εμφανίζουν αυτά για την τροποποίηση πολυμερών, όπως οι ίνες PA ή PET. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαία η μελέτη πολλών και διαφορετικών ενζύμων, τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών αλλά στην ίδια οικογένεια των υδρολασών σερίνης για τη δυνατότητα

επιφανειακής τροποποίησης ινών. Επομένως, πραγματοποιήθηκε μελέτη εμπορικών αλλά και μη εμπορικά διαθέσιμων καινοτόμων ενζύμων για την επιφανειακή τροποποίηση πολυμερών, τα οποία προέρχονται από τους μύκητες *F. oxysporum* και *M. thermophila*. Τα καινοτόμα αυτά ένζυμα παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες από εκείνες των λιπασών και πρωτεασών όσον αφορά την εξειδίκευση υποστρώματος, αναγνωρίζοντας είτε μικρότερου μεγέθους αλειφατικές αλυσίδες είτε φαινολικούς δακτυλίους.

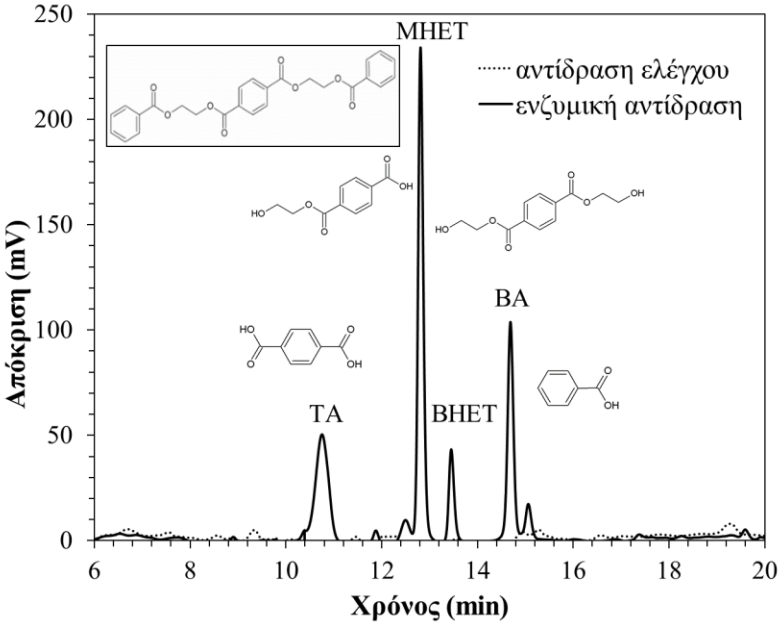
Η επιφανειακή υδρόλυση υφασμάτων PET έχει ως στόχο την αύξηση της υδροφιλικότητας τους και την βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Γενικά οι κουτινάσες έχουν τη δυνατότητα να σπάνε τις πολυμερικές δομές του PET, ωστόσο το προφίλ των προϊόντων υδρόλυσης διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο δράσης και την εκλεκτικότητα κάθε κουτινάσης. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δυο μοντέλα υποστρώματα για την διαλογή των κατάλληλων ενζύμων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την τροποποίηση PET ινών. Τα μοντέλα αυτά είναι το 3PET το οποίο κατασκευάστηκε και το εμπορικό BHET, τα οποία μπορούν να υδρολυθούν σε διαφορετικές θέσεις προς παραγωγή διαφορετικών υδατοδιαλυτών θραυσμάτων στο υπερκείμενο της αντίδρασης (Σχήμα 36). Κατά την ενζυμική υδρόλυση η δομή του μοντέλου μπορεί να υποστεί ρήξη σε διάφορα σημεία με αποτέλεσμα να προκύψουν τα προϊόντα υδρόλυσης που είναι τα αρχικά μονομερή από τα οποία έγινε η σύνθεση του υποστρώματος. Στο ακόλουθο σχήμα παρατίθεται ενδεικτικά η δομή του μοντέλου 3PET και τα πιθανά μοτίβα υδρόλυσης τα οποία μπορεί να υποστεί, απελευθερώνοντας BA, TA, BHET, μονο-2-υδροξυαιθυλενίου (MHET) ή αιθυλενογλυκόλη.



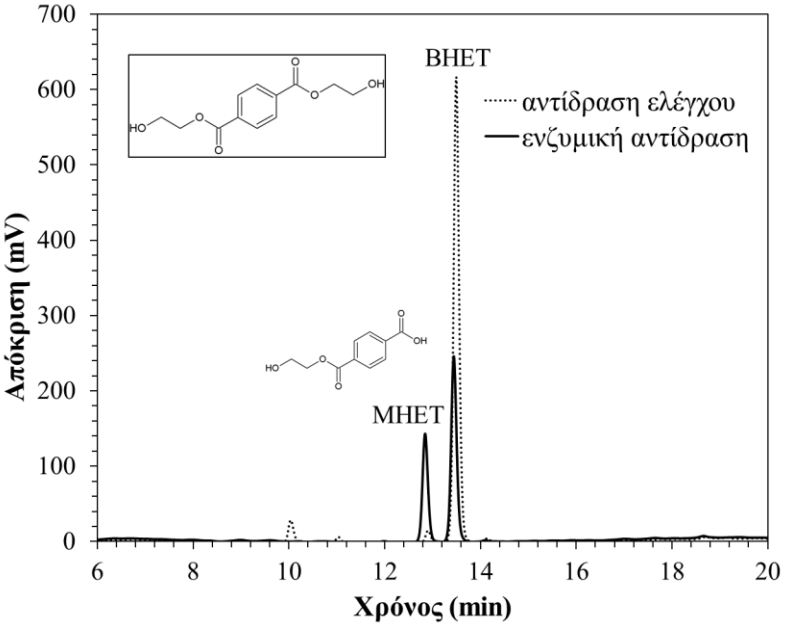
Σχήμα 36: Μοντέλα-υποστρώματα του PET: 3PET και BHET. Με κόκκινες γραμμές αναπαριστώνται τα πιθανά μοτίβα υδρόλυσης των δομών.

Τα μοντέλα 3PET και BHET υδρολύθηκαν μόνο από την *Fo*Cut5a και τη Lipolase 100T, ενώ τα ένζυμα *St*GE2, *Mt*faeC και *Fo*faeC δεν προκάλεσαν υδρόλυση των μοντέλων. Στο Σχήμα 37 και στο Σχήμα 38 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα μοτίβα υδρόλυσης των μοντέλων 3PET και BHET, αντίστοιχα, από την κουτινάση *Fo*Cut5a. Η κουτινάση υδρολύει το μοντέλο 3PET και

παράγονται τα εξής προϊόντα: TA, BHET και BA με συγκεντρώσεις 0.19, 0.20 και 1.09 mM, αντίστοιχα. Το προϊόν BHET φαίνεται να υδρολύεται περαιτέρω προς παραγωγή πιθανώς MHET κατά 46 %. Αυτή η υπόθεση επαληθεύτηκε με τη χρήση εμπορικού BHET ως μοντέλο προς υδρόλυση από την κουτινάση *Fo*Cut5a και την εμπορική λιπάση Lipolase 100T, όπου παράγεται MHET ως κύριο προϊόν. Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται ποσοτικά η απελευθέρωση των προϊόντων υδρόλυσης του μοντέλου 3PET, ύστερα από επιφανειακή τροποποίηση με την *Fo*Cut5a και τη λιπάση Lipolase, ως βιοκαταλύτες. Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν πως κουτινάσες από τους μικροοργανισμούς *T. fusca* και *F. solani* υδρολύουν το μοντέλο 3PET απελευθερώνοντας TA, MHET, BHET, βενζοϊκού 2-υδροξυαιθυλενίου (HEB) και BA. Ωστόσο η σχεδόν απόλυτη μετατροπή του BHET σε MHET και η σημαντική παραγωγή του HEB υποδεικνύουν διαφορετικό τρόπο δράσης των δυο ενζύμων συγκριτικά με την κουτινάση *Fo*Cut5a (Brueckner et al. 2008).



Σχήμα 37: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης του μοντέλου 3PET με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a ως βιοκαταλύτη, ύστερα από επώαση σε pH 7, στους 30 ^{o}C.



Σχήμα 38: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης του μοντέλου BHET με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a ως βιοκαταλύτη, ύστερα από επώαση σε pH 7, στους 30 ºC.

Ακολούθως παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των προϊόντων υδρόλυσης, όπως προκύπτουν από τις καμπύλες αναφοράς που καταστρώθηκαν:

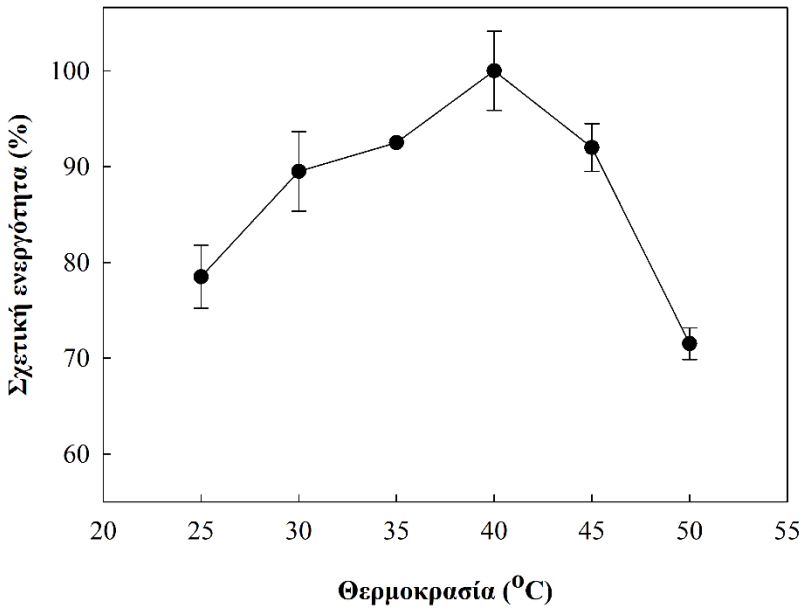
- Για το TPA: C (mM)=0.0247•x
- Για το BHET: C (mM)=0.062•x
- Για το BA: C (mM)=0.121•x

Πίνακας 11: Πίνακας απελευθέρωσης προϊόντων υδρόλυσης του μοντέλου 3PET, ύστερα από επιφανειακή τροποποίηση με την *Fo*Cut5a και τη λιπάση Lipolase, ως βιοκαταλύτες.

	Μοντέλο 3PET			**Μοντέλο BHET**
	$TPA_{12.13\ min}$ (mM)	$BHET_{13.57\ min}$ (mM)	$BA_{14.91\ min}$ (mM)	$MHET_{12.91\ min}$ Area (mAU*s)
*Fo*Cut5a	0.013	0.033	0.033	0.370
Lipolase			0.504	1138

5.2 Βελτιστοποίηση ενζυμικής διεργασίας

Από την μελέτη υδρόλυσης των μοντέλων υποστρωμάτων του PET έγινε επιλογή της κουτινάσης *Fo*Cut5a και της εμπορικής λιπάσης Lipolase 100T για την επιφανειακή τροποποίηση υφασμάτων PET, καθώς οι εστέρασες *Mt*faeC και *Fo*faeC δεν υδρόλυσαν τα αντίστοιχα μοντέλα υποστρώματα του PET. Η λιπάση, ενώ υδρόλυσε τα δυο μοντέλα υποστρώματα, δεν φάνηκε να υδρολύει το ύφασμα PET. Αντιθέτως, η επεξεργασία με την κουτινάση οδήγησε στην αποκάλυψη καρβοξυλομάδων και υδροξυλομάδων επί της επιφάνειας του PET και στην απελευθέρωση TPA και ισοδύναμων TPA στο υπερκείμενο της αντίδρασης. Αρχικά μελετήθηκε το θερμοκρασιακό εύρος 25–50 ^{o}C της αντίδρασης με προσθήκη ενζύμου *Fo*Cut5a 0.94 mg/$g_{υφάσματος}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 7.0 για αντίδραση 24 h. Η μέγιστη παραγωγή ισοδύναμων TPA (29.2 μM) παρατηρήθηκε στους 40 ^{o}C, ενώ άνω των 45 ^{o}C σημειώθηκε μείωση της ενζυμικής τροποποίησης (Σχήμα 39), λόγω χαμηλής θερμοσταθερότητας του ενζύμου. Ομοίως στη βιβλιογραφία η χρήση μιας εμπορικής λιπάσης του *T. lanuginosus* οδήγησε σε υδρόλυση ημικρυσταλλικών PET ινών με παραγωγή TPA ισοδύ-

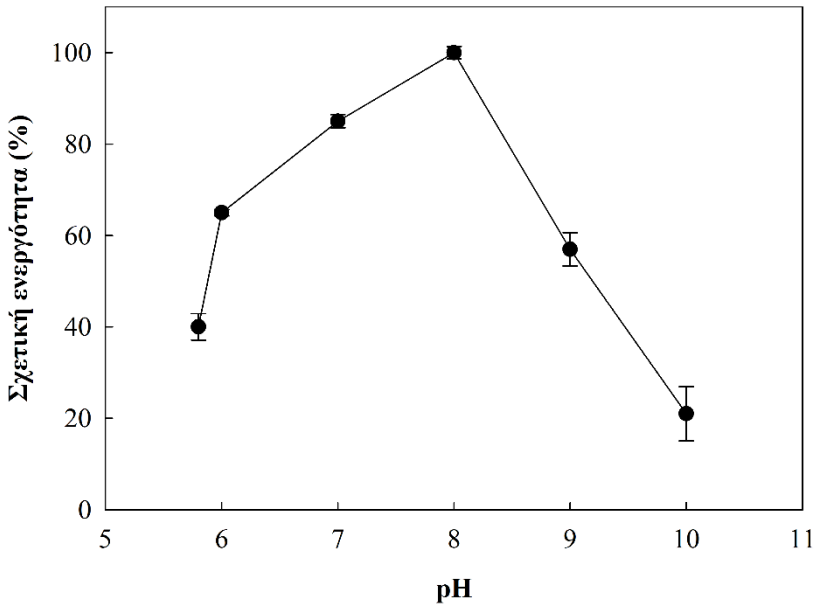


Σχήμα 39: Μελέτη θερμοκρασίας της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 0.94 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης FoCut5a, σε pH 7, για 24 h.

μων συγκέντρωσης ~34 μM, ενώ η αντίδραση έλαβε χώρα στους 37 ^{o}C με συγκέντρωση ενζύμου 1.13 g/$g_{υφάσματος}$ (Brueckner et al. 2008). Η θερμοκρασία των 40 ^{o}C ή των 37 ^{o}C έχει

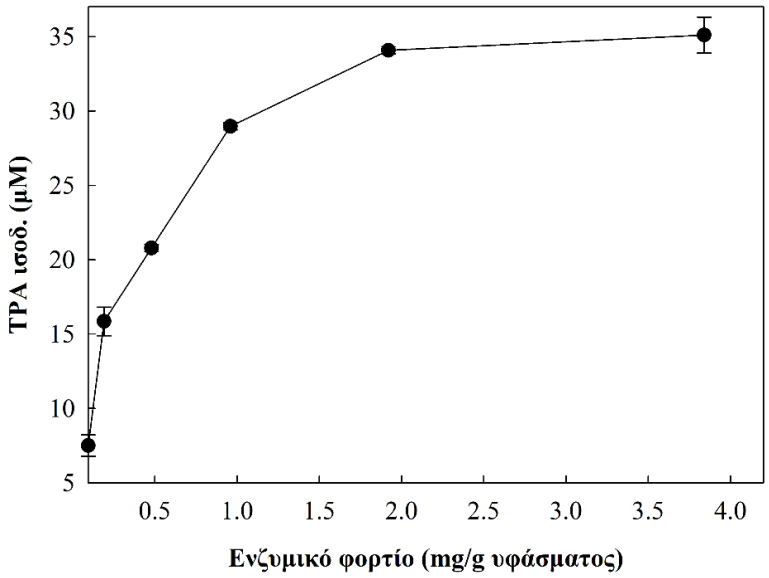
επιλεγεί στη βιβλιογραφία για την μελέτη της δράσης άλλων ενζύμων σε PET υφάσματα ή φιλμς. Ενδεικτικά έχει πραγματοποιηθεί η ενζυμική τροποποίηση πολυεστερικών ινών στους 37 ^{o}C με μία κουτινάση από τον *F. solani pisi*, όπως επίσης και η υδρόλυση PET μεμβρανών στους 40 ^{o}C με χρήση του εμπορικού σκευάσματος TEXAZYM EM (Silva et al. 2005; Donelli et al. 2009).

Η μελέτη του βέλτιστου αρχικού pH της ενζυμικής τροποποίησης των PET ινών πραγματοποιήθηκε στο εύρος pH 5.8–10.0 σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικού καλίου και γλυκίνης-NaOH, με συγκέντρωση ενζύμου 0.94 mg/ $g_{υφάσματος}$ στους 40 ^{o}C για 24 h. Η μέγιστη συγκέντρωση ισοδύναμων TPA στο υπερκείμενο ίση με 30 μM σημειώθηκε σε pH 8.0 με αμέσως υψηλότερη απελευθέρωση σε pH 7.0, ενώ υψηλότερες τιμές pH μείωσαν την ενζυμική ενεργότητα (Σχήμα 40). Επιπρόσθετα υψηλότερες τιμές pH μπορεί να προκαλέσουν χημική υδρόλυση των ινών PET σε βάθος, οδηγώντας σε σημαντική υποβάθμιση του τελικού προϊόντος, όπως συμβαίνει κατά την αλκαλική επεξεργασία (Vertommen et al. 2005). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για την τροποποίηση PET φιλμ ή υφασμάτων με κουτινάσες συχνά εφαρμόζεται pH 8.0, όπως στην περίπτωση της κουτινάσης του *Thermomonospora fusca* που χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης για την επιφανειακή υδρόλυση PET υφασμάτων στους 50 ^{o}C (Ye et al. 2013).



Σχήμα 40: Μελέτη pH της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 0.94 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης FoCut5a, στους 40°C για 24 h.

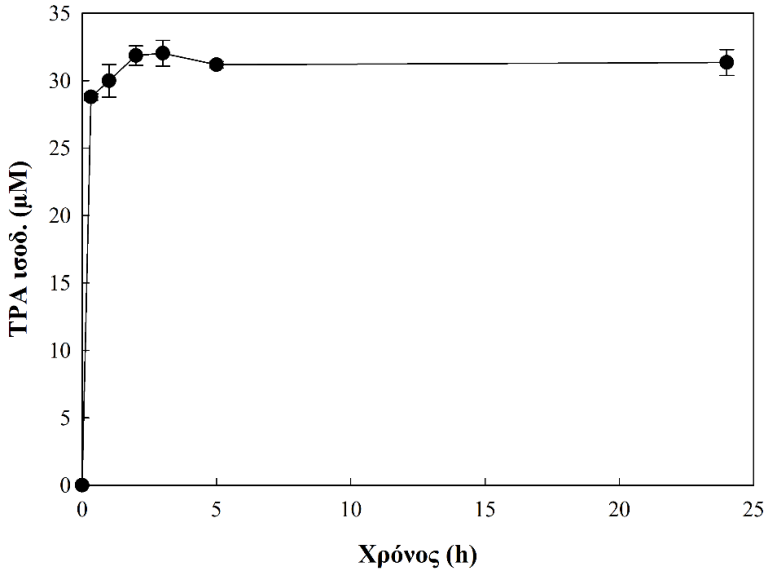
Η συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιείται σε μία διεργασία αποτελεί μία κρίσιμη παράμετρο για την βιωσιμότητα της, εξαιτίας του υψηλού κόστους του βιοκαταλύτη. Η κουτινάση μελετήθηκε σε συγκεντρώσεις από 0.096 έως 3.840 mg/$g_{υφάσματος}$. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 41, η συγκέντρωση του ενζύμου δεν οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της απελευθέρωσης ισοδύναμων TPA για συγκεντρώσεις ενζύμου πάνω από 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, με μέγιστη απελευθέρωση TPA ισοδύναμων ~35 μM. Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η υδρολυτική ικανότητα μιας κουτινάσης από τον *T. fusca* στους 60 ^{o}C, pH 7.0 και συγκέντρωση ενζύμου 11.30 mg/$g_{υφάσματος}$ με απελευθέρωση ισοδύναμων TPA 12 mM για άμορφες και 200 μM για ημικρυσταλλικές ίνες PET (Brueckner et al. 2008).



Σχήμα 41: Μελέτη ενζυμικού φορτίου της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a, σε pH 8, στους 40°C για 24 h.

Όσον αφορά τη μελέτη χρόνου της αντίδρασης, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 42, η υδρόλυση παύει μετά τις πρώτες 2-3 h πιθανώς λόγω της σταδιακής απενεργοποίησης του ενζύμου στους 40 ^{o}C. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τους Silva et al. (2011), οι οποίοι χρησιμοποίησαν μια άγριου τύπου και μία γενετικά τροποποιημένη *T. fusca* κουτινάση και η απελευθέρωση TPA έπαυε τις πρώτες 3-5 h, για αντιδράσεις στους 60 ^{o}C, pH 7.5 και διάφορες συγκεντρώσεις ενζύμων. Η θεωρία της απενεργοποίησης της *Fo*Cut5a υποστηρίζεται από το γεγονός πως δεύτερη ισόποση προσθήκη ενζύμου την 3^{η} ώρα της αντίδρασης της υδρόλυσης

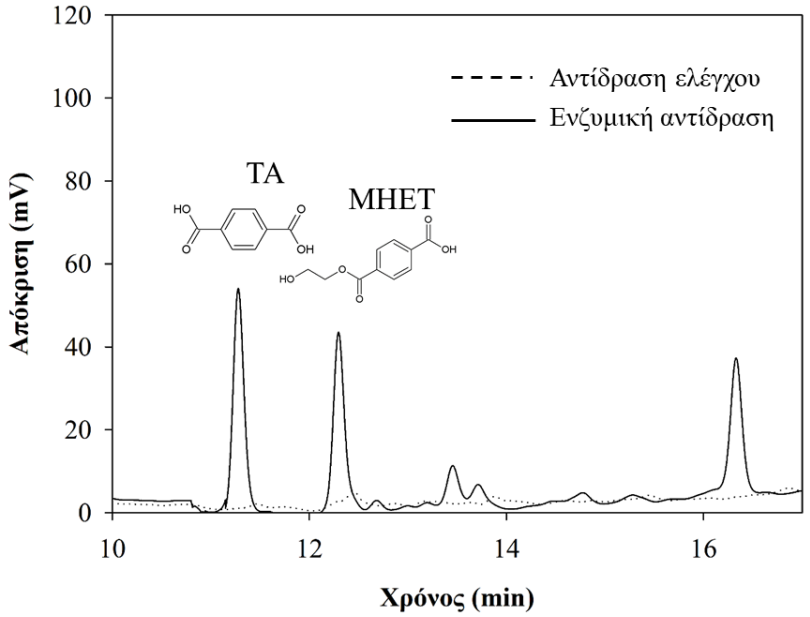
οδήγησε σε αύξηση των προϊόντων κατά 26 %. Η πολυεστερική επιφάνεια συνέχισε να υδρολύεται με αργό ρυθμό και έπειτα από επιπλέον 2 h η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί.



Σχήμα 42: Μελέτη χρόνου της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης *Fo*Cut5a, στους 40ºC και pH 8.

5.3 Ταυτοποίηση των προϊόντων υδρόλυσης

Η ενζυμική υδρόλυση PET υφασμάτων οδηγεί στην απελευθέρωση TPA ισοδύναμων μέσω σχάσης των εστερικών δεσμών κατά μήκος των πολυμερικών αλυσίδων της επιφάνειας. Εφόσον βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της ενζυμικής υδρόλυσης πραγματοποιήθηκε HPLC ανάλυση στο μέσο της αντίδρασης, ύστερα από συμπύκνωση του δέκα φορές ώστε να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα υδρόλυσης. Τα πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εμπορικά διαθέσιμα με χρόνους απόκρισης 11.3 και 13.1 min για το TPA και το BHET, αντίστοιχα. Η ενζυμική υδρόλυση του PET με την κουτινάση *Fo*Cut5a οδήγησε σε απελευθέρωση TPA, ενώ δεν ανιχνεύτηκε BHET (Σχήμα 43). Μολοταύτα, παρατηρήθηκαν διάφορες μη ταυτοποιήσιμες κορυφές με μία εξ αυτών στα 12.3 min, η οποία βάσει βιβλιογραφίας αντιστοιχεί στο MHET (Vertommen et al. 2005). Η απελευθέρωση μόνο TPA και MHET έχει αναφερθεί στο παρελθόν κατά την υδρόλυση PET με ανασυνδυασμένες κουτινάσες των *Thermobifida cellulosilytica* και *T. fusca* (Herrero Acero et al. 2011).

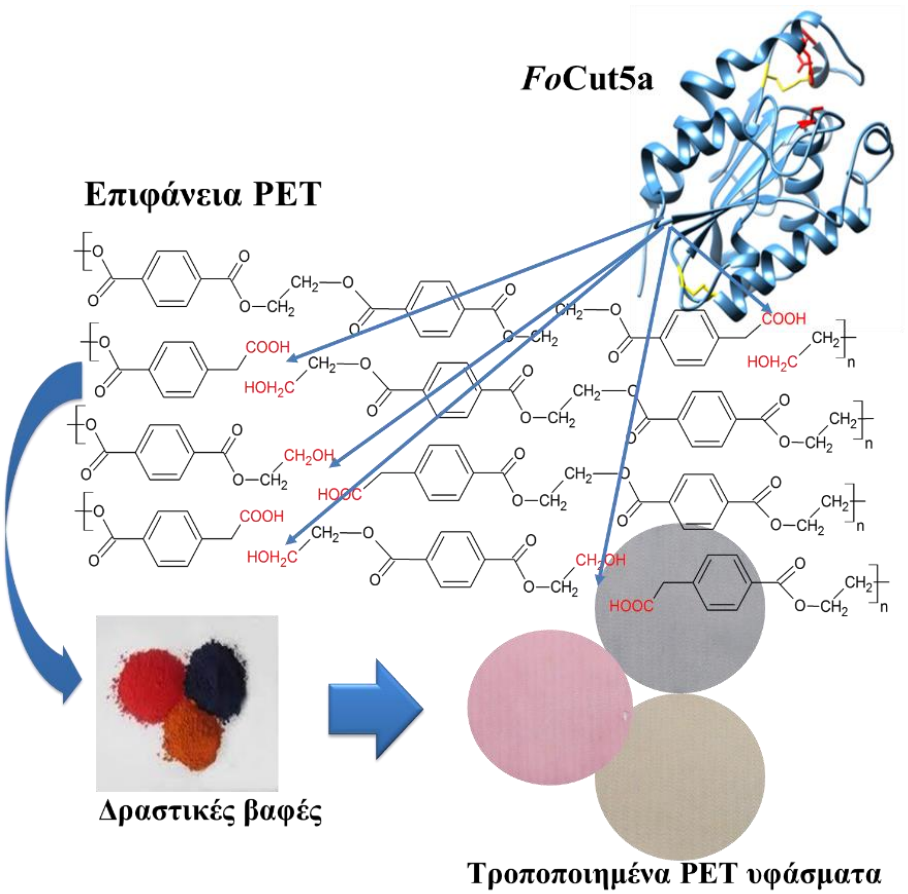


Σχήμα 43: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης υφασμάτων PET, ύστερα από επώαση με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης *Fo*Cut5a, σε pH 8, στους 40 ^{o}C.

5.4 Βαφή των ενζυμικά τροποποιημένων PET υφασμάτων

Ύστερα από την ενζυμική τροποποίηση των πολυεστερικών υφασμάτων ακολούθησε η βαφή τους με δραστικές βαφές και η αξιολόγησή τους. Οι δραστικές βαφές περιέχουν δραστικές ακραίες ομάδες, όπως –Cl, -Br, -SH, -OCH, και συνδέονται χημικά επί του υφάσματος με πρόσδεση στις ελεύθερες υδροξυλομάδες της επιφάνειας. Εξαιτίας αυτού χρησιμοποιούνται κατά κόρον για την βαφή βαμβακερών υφασμάτων. Στην περίπτωση ενζυμικής επιφανειακής υδρόλυσης των συνθετικών υφασμάτων δύνανται να συνδεθούν χημικά με τις ελεύθερες υδροξυλομάδες που προκύπτουν από την ενζυμική θραύση των εστερικών δεσμών της επιφάνειας. Οι δραστικές βαφές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα πως, λόγω ομοιοπολικής σύνδεσης, έχουν υψηλή σταθερότητα, με αποτέλεσμα τα υφάσματα να μην ξεβάφουν με τον καιρό και τις πλύσεις.

Η συνολική διεργασία τροποποίησης των PET υφασμάτων συνοψίζεται στο Σχήμα 44. Τα μη τροποποιημένα και ενζυμικά τροποποιημένα στις βέλτιστες συνθήκες υφάσματα βάφτηκαν με τις τρεις δραστικές βαφές: Black Jakazol 133%, Deep Cherry S–D και Novacron Yellow S-3R. Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται η διαφορά χρώματος και η ένταση χρώματος για όλα τα ζεύγη υφασμάτων και για τις τρεις βαφές υπό μελέτη.



Σχήμα 44: Ενζυμική τροποποίηση υφασμάτων PET για αύξηση υδροφιλικότητας και βελτίωση βαφικής ικανότητας.

Πίνακας 12*:* Αποτελέσματα δοκιμών βαφής. Τα L, a, και b αποτελούν τις συντεταγμένες των βαμμένων υφασμάτων, ο λόγος K/S είναι η ένταση χρώματος και η τιμή ΔΕ είναι η διαφορά χρώματος μεταξύ τροποποιημένων και ατροποποίητων υφασμάτων. Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (40 ^{o}C, pH 8, ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, 3 h).

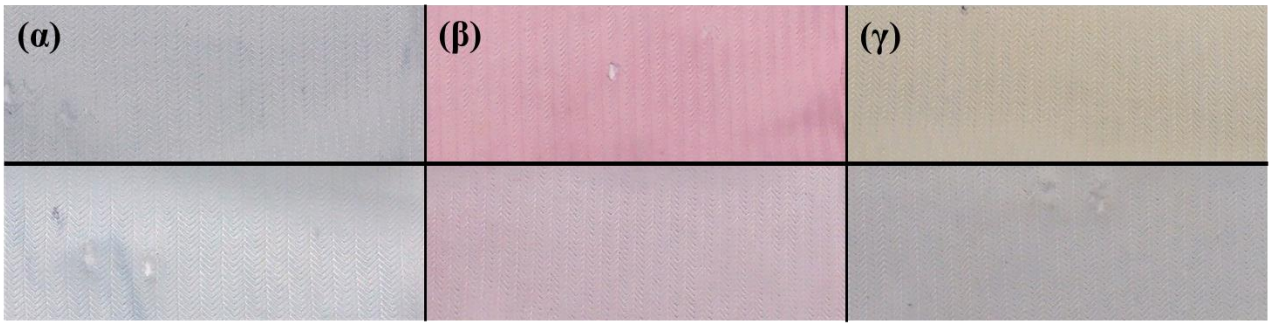
D65/10	L	a	b	K/S	ΔΕ
Black Jakazol 133%[1]	82.39	1.81	-8.90	0.15	1.75
Black Jakazol 133%[2]	81.17	1.73	-10.15	0.17	
Deep Cherry S-D [1]	82.01	9.80	-7.75	0.18	11.13
Deep Cherry S-D [2]	74.81	18.09	-5.94	0.45	
Novacron Yellow S-3R [1]	85.65	2.92	-1.62	0.10	11.27
Novacron Yellow S-3R [2]	83.49	3.79	9.41	0.24	

[1] Ατροποποίητο ύφασμα, [2] Ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα

Όπως φαίνεται από τις τιμές ΔΕ υφίσταται σημαντική διαφορά στο χρώμα των ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων σε σύγκριση με τα αντίστοιχα μη τροποποιημένα. Οι αυξημένες τιμές K/S των επιφανειακά υδρολυμένων υφασμάτων σχετίζεται με την παρουσία περισσότερων ακραίων υδροξυλομάδων επί της επιφάνειας μετά την υδρόλυση, οι οποίες σε επόμενο στάδιο διατίθεται προς αντίδραση με το χρώμα. Για τα υδρολυμένα υφάσματα οι τιμές K/S για τις βαφές Black Jakazol 133%, Deep Cherry και Novacron Yellow βρέθηκαν 0.02, 0.27 and 0.14, αντίστοιχα ύστερα από αφαίρεση των τιμών των ατροποποίητων υφασμάτων.

Στη βιβλιογραφία οι τιμές K/S που αναφέρονται για PET υφάσματα βαμμένα με Reactive Black 5 που έχουν τροποποιηθεί στους 60 ^{o}C, pH 7.5 και με συγκέντρωση ενζύμου 12.5 mg/$g_{υφάσματος}$, παρουσίασαν αύξηση από 240-270 % για 2 h αντίδρασης, για τροποποίηση με ανασυνδυασμένη κουτινάση (Tfu 0883) και με την ίδια κουτινάση ύστερα από διπλή μετάλλαξη (Q 132A/T101A) (Silva et al. 2011).

Η τροποποίηση PET υφασμάτων με μία κουτινάση του *T. fusca* και μία λιπάση του *T. lanuginosus* στους 60 και 37 ^{o}C, pH 7 και συγκέντρωση ενζύμου 0.2 and 20 g/L, αντίστοιχα, οδήγησε σε τιμές K/S 0.32 και 0.12, όταν τα υφάσματα βάφτηκαν με την βαφή Astrazone Blue BG (Brueckner et al. 2008). Επιπλέον, η υδρόλυση PET υφασμάτων με *T. fusca* και *F. solani f. sp* υδρολάσες στους 35 ^{o}C, pH 7.2 και ποσότητα ενζύμου 16 U για 8 h, αντίστοιχα, οδήγησε σε τιμές K/S 0.07 και 0.45 (100 % και 250 % αύξηση), όταν τα υφάσματα βάφτηκαν με την βαφή Reactive Red 2 (Alisch-Mark et al. 2006). Τα ενζυμικά τροποποιημένα υφάσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 45 βαμμένα με τις τρεις βαφές Black Jakazol 133%, Deep Cherry S–D και Novacron Yellow S-3R σε σύγκριση με βαμμένα ατροποποίητα PET δείγματα.



Σχήμα 45: Απεικόνιση υφασμάτων PET ατροποποίητων (κάτω) και ενζυμικά τροποποιημένων (πάνω) με χρήση των βαφών: Jakazol Black 133% (α), Novacron Deep Cherry S-D (β) and Novacron Yellow S-3R.

Οι συγκεντρώσεις της κάθε χρωστικής πριν και μετά τη βαφή των υφασμάτων αναφέρονται στον Πίνακα 13. Οι αναφερόμενες τιμές υποδεικνύουν αυξημένη δέσμευση βαφής επί της επιφάνειας των ενζυμικά επεξεργασμένων υφασμάτων σε όλες τις περιπτώσεις που συνεπάγεται μείωση της βαφής στο λουτρό βαφής. Η αύξηση της απορρόφησης βαφής είναι οριακή για την περίπτωση της βαφής Deep Cherry dye και υψηλότερη για τις βαφές Black Jakazol και Novacron Yellow. Παρόλο που τα ενζυμικά τροποποιημένα υφάσματα φαίνονται να απορροφούν περισσότερη Black Jakazol βαφή από το λουτρό βαφής σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο δείγμα, αυτή η διαφορά δεν αντικατοπτρίζεται στις τιμές ΔΕ. Η αντίφαση αυτή οφείλεται στο γεγονός πως κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βαφής περίσσεια μόρια βαφής αγκιστρώνονται πάνω στην ενζυμικά τροποποιημένη επιφάνεια, χωρίς ωστόσο να συγκρατούνται χημικά επί της επιφάνειας. Τα μόρια αυτά που δεν έχουν συνδεθεί με χημικό δεσμό με τις ελεύθερες υδροξυλομάδες στην επιφάνεια του υφάσματος PET απομακρύνονται κατά τα στάδια πλύσης και οξίνισης.

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις χρωστικών σε κάθε λουτρό βαφής πριν και μετά την διαδικασία βαφής των PET υφασμάτων. Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (40 ^{o}C, pH 8, ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/gυφάσματος, 3 h).

Λουτρό βαφής	Πριν (mg/mL)	Μετά (mg/mL)	Μείωση βαφής %
Black Jakazol 133%[1]	3.786	3.462	8.57
Black Jakazol 133%[2]	3.737	2.788	25.41
Deep Cherry S-D[1]	3.169	1.653	47.84
Deep Cherry S-D [2]	3.321	1.689	49.15
Novacron Yellow S-3R[1]	2.749	1.867	32.09
Novacron Yellow S-3R[2]	2.747	1.693	38.36

[1] Λουτρό βαφής ατροποποίητου υφάσματος, [2]Λουτρό βαφής ενζυμικά τροποποιημένου υφάσματος

5.5 Μηχανικές ιδιότητες των PET υφασμάτων

Οι μηχανικές ιδιότητες, όπως είναι η αντοχή σε εφελκυσμό, των PET υφασμάτων είναι πολύ σημαντικές και καθορίζουν τις εφαρμογές του κάθε υλικού. Για αυτό το λόγο η ενζυμική επεξεργασία δεν πρέπει να προκαλεί υποβάθμιση του προϊόντος, καθώς έτσι μπορεί να καταστεί ακατάλληλο για χρήση. Σύμφωνα με τον Πίνακα 14, δεν παρατηρείται εμφανής επίδραση στην αντοχή σε εφελκυσμό του πολυεστερικού υφάσματος.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μελέτης αντοχής σε εφελκυσμό σε ατροποποίητο και τροποποιημένο ύφασμα PET στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης**.** Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης.

	Μέγιστη δύναμη κατά τη θραύση (kgf)	Μέγιστη επιμήκυνση κατά τη θραύση (mm)	Μέγιστη παραμόρφωση κατά τη θραύση (%)
Ατροποποίητο	21.52±1.10	17.52±1.60	34.32±1.65
Τροποποιημένο	20.26±0.70	17.43±1.10	33.88±2.16

Το αποτέλεσμα αυτό είναι επιθυμητό και συμφωνεί με την βιβλιογραφία στην οποία αναφέρεται πως η τροποποίηση PET υφασμάτων με μία εμπορική λιπάση (EC 3.1.1.3) του *C. antarctica* και μία κουτινάση (EC 3.1.1.74) δεν επηρέασε αρνητικά την αντοχή των ινών (Lee and Song 2010). Επιπρόσθετα, από άλλη ερευνητική ομάδα δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στην αντοχή στη διαξονική πίεση/ διάρρηξη μεταξύ μη τροποποιημένων και επεξεργασμένων PET υφασμάτων με μία κουτινάση ως βιοκαταλύτη (Wu et al. 2014).

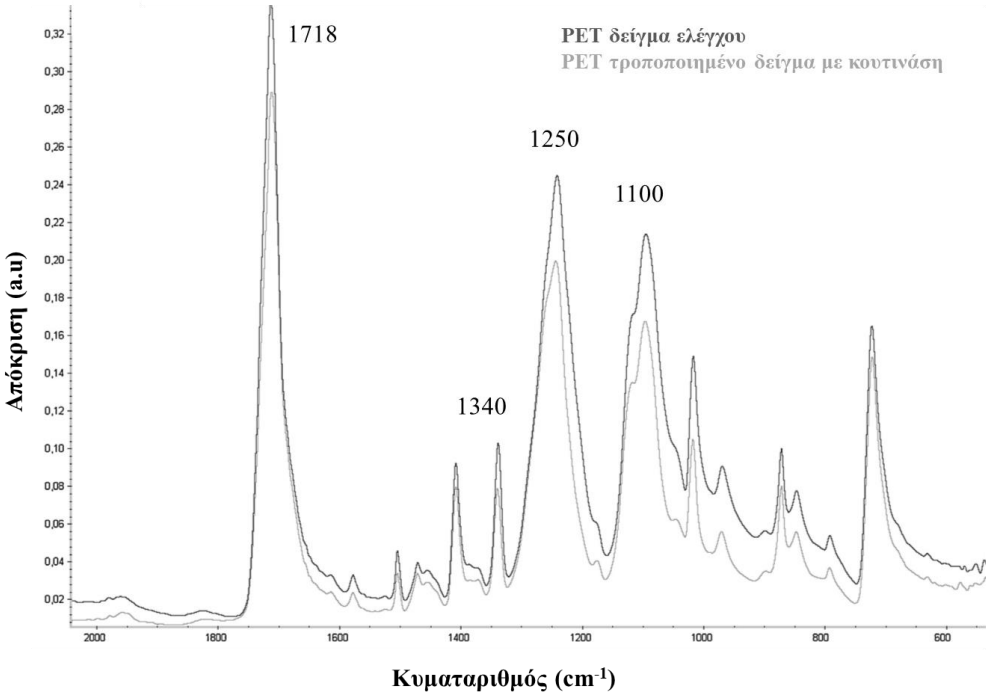
5.6 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων PET

Με σκοπό την μελέτη του αποτελέσματος της επιδερμικής ενζυμικής υδρόλυσης επί του PET υφάσματος πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπική ανάλυση, η οποία προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την θραύση των εστερικών δεσμών και την αύξηση των καρβοξυλομάδων και των υδροξυλομάδων επί της επιφάνειας. Εν συνεχεία, η θερμική ανάλυση αποδεικνύει την μη μεταβολή των χαρακτηριστικών της κύριας μάζας του πολυμερικού υλικού.

5.6.1 Ανάλυση FTIR-ATR

Η φασματοσκοπική ανάλυση FTIR-ATR συμβάλλει στον ποιοτικό έλεγχο της στερεής πολυμερικής επιφάνειας και στην διεξαγωγή συμπεράσματος για το αν είναι ή όχι επιτυχής η ενζυμική υδρόλυση του πολυμερούς. Το φάσμα FTIR αποτελεί δαχτυλικό αποτύπωμα της υπό εξέταση ένωσης, ωστόσο με την τεχνική ATR γίνεται φανερή η μεταβολή της έντασης συγκεκριμένων κορυφών, λόγω υδρόλυσης των εστερικών δεσμών επί της επιφάνειας.

Στο Σχήμα 46 παρουσιάζεται η φασματοσκοπική ανάλυση των ενζυμικά τροποποιμένων και μη PET υφασμάτων. Ο εστερικός δεσμός του PET αποτελεί μία ισχυρή κορυφή που εμφανίζεται στο εύρος 1710–1750 cm^{-1} και αντιστοιχεί στο δεσμό καρβονυλίου C=O λόγω δονήσεων επιμήκυνσης. Η ένταση των κορυφών των δεσμών C=O (στα 1718 cm^{-1}) και C-O στα 1250 cm^{-1} και 1100 cm^{-1} παρουσιάζει μείωση όσον αφορά τα ενζυμικά τροποποιημένα υφάσματα, λόγω της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των πολυεστερικών αλυσίδων. Ακόμη η ένταση της κορυφής στα 1340 cm^{-1} παρουσιάζει μείωση λόγω των δονήσεων των δεσμών CH_2 της αιθυλενογλυκόλης.



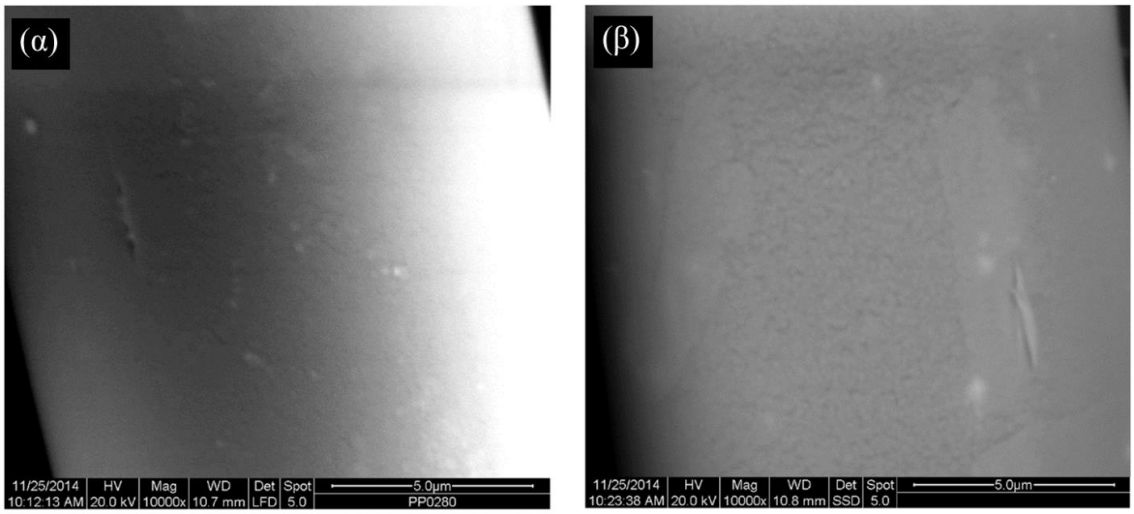
Σχήμα 46: FT-IR ATR φάσμα ατροποποίητου (μαύρη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (γκρι γραμμή). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 $mg/g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης.

Ομοίως η ανάλυση FTIR-ATR άμορφων και κρυσταλλικών PET μεμβρανών υπέδειξε μία αναμφίβολη μείωση των κορυφών στα 1720 και 1260–1246 cm^{-1}, ύστερα από τροποποίησή τους με το εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα TEXAZYM EM (Donelli et al. 2009). Το γεγονός αυτό αποδεικνύεται από τους Du et al. (2014), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ένα λογισμικό που τους επέτρεψε να καθορίσουν το φάσμα δεύτερης παραγώγου υδροθερμικά υποβαθμισμένου PET και στο οποίο παρατηρήθηκε πως η κορυφή από 1640 έως 1780 cm^{-1} αποτελείται από

επικαλυπτόμενες κορυφές οι οποίες ανήκουν είτε στην κύρια εστερική αλυσίδα είτε στις ακραίες καρβοξυλομάδες των αλυσίδων. Κατά την αποικοδόμηση του πολυμερούς οι εστερικοί δεσμοί μειώνονταν με παράλληλη αύξηση των ακραίων ομάδων, προκαλώντας μια μικρή μείωση της συνολικής κορυφής ύστερα από 30 ημέρες υδρόλυσης.

5.6.2 Ανάλυση SEM

Με την ανάλυση SEM εξετάζεται η μορφολογία της στερεής επιφάνειας με την χρήση ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου με υψηλή διακριτική ικανότητα. Η ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση φέρει το πλεονέκτημα πως διατηρούνται τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας και οι ιδιότητες του υλικού, καθώς το ένζυμο δεν επηρεάζει την κύρια μάζα του πολυμερούς. Αντιθέτως η αλκαλική τροποποίηση πολυεστερικού υφάσματος οδηγεί σε αυξημένη υδροφιλικότητα, ωστόσο επηρεάζει την αντοχή του υλικού. Οι SEM απεικονίσεις μη τροποποιημένων και ενζυμικά τροποποιημένων PET ινών παρουσιάζονται στο Σχήμα 47.



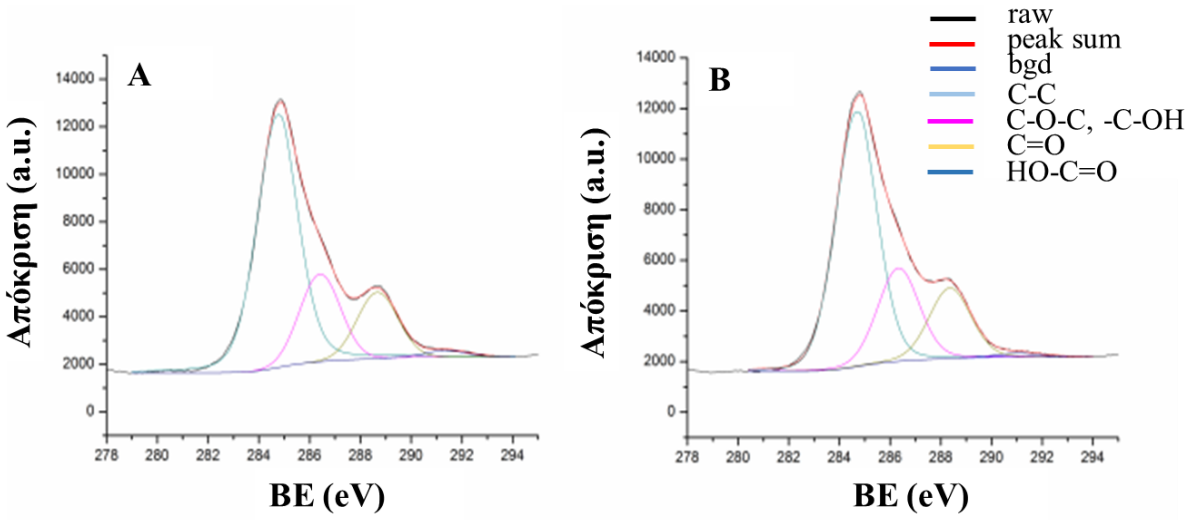
Σχήμα 47: SEM απεικονίσεις της επιφάνειας ατροποποίητου (α) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (β). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης.

Στις ενζυμικά τροποποιημένες ίνες διακρίνονται μικρές οπές και χαραγές, παρ' όλ' αυτά δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται ομοιογένεια μεταξύ των τροποποιημένων ενζυμικά ινών, καθώς σημάδια υδρόλυσης παρατηρούνται πιο έντονα σε κάποια σημεία και καθόλου σε άλλα. Ωστόσο, η εικόνα είναι πολύ διαφορετική όταν η

πολυεστερική επιφάνεια τροποποιείται με NaOH, όπου επέρχεται έντονη υποβάθμιση/ αποικοδόμηση της ίνας, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία (Brueckner et al. 2008).

5.6.3 Ανάλυση XPS

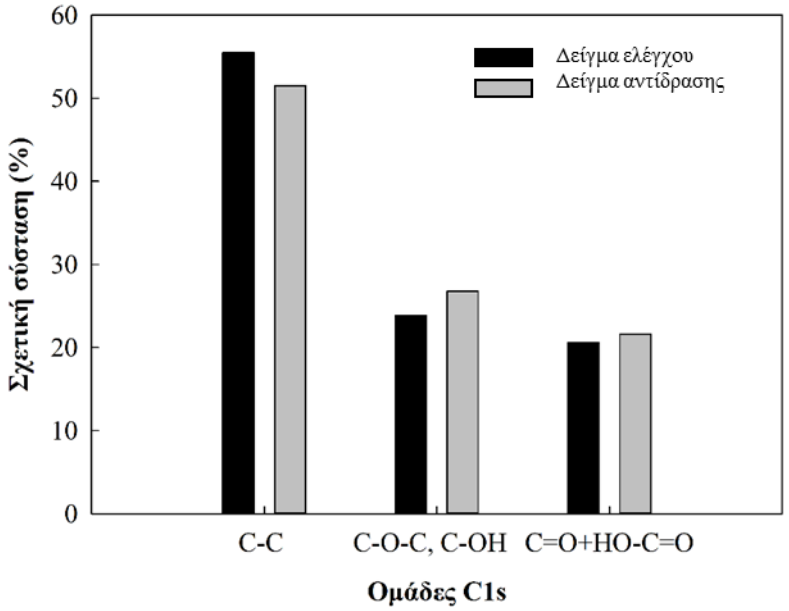
Η ανάλυση XPS είναι μια ποιοτική και ποσοτική, επιφανειακά ευαίσθητη τεχνική που δίνει πληροφορίες για την χημική κατάσταση της επιφάνειας του στερεού υλικού. Στο φάσμα XPS ενός στοιχείου, όπως ο άνθρακας (C), αποτυπώνονται διάφορες φωτοκορυφές ανάλογα με τους δεσμούς που σχηματίζει και τις ενέργειες σύνδεσης. Εκτός από τις χαρακτηριστικές κορυφές του O και του C, τα PET δείγματα, κυρίως τα ενζυμικά τροποποιημένα, παρουσίασαν και ένα μικρό περιεχόμενο σε N, πιθανώς λόγω επιφανειακής επικάθησης/ απορρόφησης μέρους του ενζύμου στην επιφάνεια του υφάσματος. Το σχήμα της περιοχής των επικρατέστερων C κορυφών σε όλα τα δείγματα υποδεικνύουν την παρουσία πολλών χημικών καταστάσεων των C1s, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές διακριτές λειτουργικές ομάδες στην πολυμερική αλυσίδα. Με στόχο την απάλειψη των συνεισφορών των διάφορων καταστάσεων εφαρμόστηκε ένα “fitting”, μία προσαρμογή, βάσει πληροφοριών και δεδομένων από τη βιβλιογραφία για τις ενέργειες σύνδεσης (binding energies, BEs) και χρησιμοποιώντας το ίδιο εύρος κορυφών για όλες τις ομάδες (Σχήμα 48) (Brueckner et al. 2008).



Σχήμα 48: Κορυφές ομάδων άνθρακα από ανάλυση XPS (A) ατροποποίητου και (B) τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. Η ανάλυση και λήψη των φασμάτων

πραγματοποιήθηκε από τον καθηγητή Σπύρο Λαδά, στο Εργαστήριο Επιστήμης Επιφανειών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, στο Πανεπιστήμιο Πατρών.

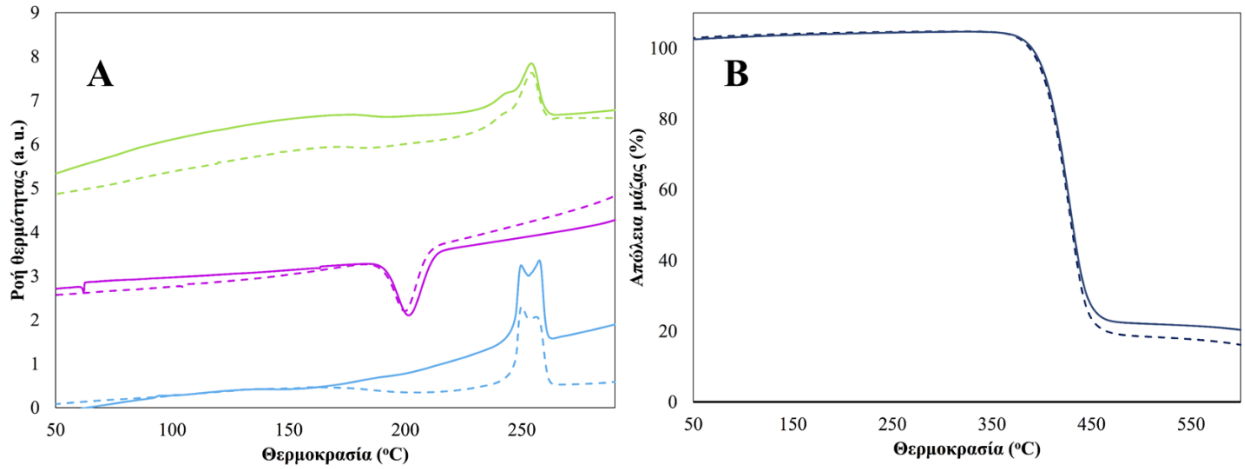
Η επίδραση της επιφανειακής ενζυμικής τροποποίησης υποδεικνύεται από τις αλλαγές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών που συνεκδοχικά αποδίδονται στη σχετική σύσταση (abundance) συγκεκριμένων C1s ομάδων, αφού αφαιρεθεί η συμβολή στο σήμα του δειγματοφορέα και της περιβαλλοντικής επιμόλυνσης, όπως φαίνεται στο Σχήμα 49. Είναι φανερό πως η ενζυμική τροποποίηση οδήγησε σε μικρή σχετική αύξηση των υδρολυμένων ομάδων (12 και 5% για C-O-C, C-OH και C=O + HO-C=O αντίστοιχα) έναντι των αλειφατικών/ αρωματικών ομάδων (C-C) που μειώθηκαν κατά 7%. Το ίδιο μοτίβο έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία κατά την XPS ανάλυση υδρολυμένου με μία λιπάση του *T. lanuginosus* και μία κουτινάση του *T. Fusca* (Eberl et al. 2009).



Σχήμα 49: Σχετική σύσταση (%) διαφορετικών C1s ομάδων, όπως προέκυψαν από ανάλυση XPS ατροποποίητου (μαύρο) και τροποποιημένου (γκρι) PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (C-C~285 eV, C-O-C, C-OH~286 eV, C=O~289 eV και OH-C=O~291 eV). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης.

5.6.4 Ανάλυση DSC-TGA

Προκειμένου να μελετηθούν οι θερμικές ιδιότητες των τροποποιημένων υφασμάτων και οι τυχόν διαφορές τους από τα ατροποποίητα υφάσματα PET πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις DSC και TGA. Ο θερμοκρασιακός κύκλος θέρμανσης-ψύξης–θέρμανσης που εφαρμόστηκε κατά την ανάλυση DSC επέτρεψε τον προσδιορισμό του πρώτου σημείου τήξης (256 ^{o}C), της θερμοκρασίας κρυστάλλωσης (211 ^{o}C) και του δεύτερου σημείου τήξης (254 ^{o}C) του πολυεστερικού υφάσματος. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 50α δεν σημειώθηκαν διαφορές στις θερμικές ιδιότητες μεταξύ τροποποιημένων και ατροποποίητων υφασμάτων PET. Η θερμοκρασία κρυστάλλωσης και το δεύτερο σημείο τήξης αποτελούν εγγενή χαρακτηριστικά του υλικού. Από την ανάλυση TGA η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης, όπου σημειώνεται μέγιστη απώλεια μάζας του υλικού, βρέθηκε 426 ^{o}C για το μη τροποποιημένο και 424 ^{o}C για το ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα (Σχήμα 50β). Γενικά εξάγεται το συμπέρασμα πως δεν υφίστανται σημαντικές διαφορές στις θερμικές ιδιότητες των PET υφασμάτων, γεγονός που αποδεικνύει την αποφυγή υποβάθμισης του πολυμερικού υλικού, ωστόσο σημειώνονται μικρές διαφορές που είναι ενδεικτικές της ενζυμικής τροποποίησης.



Σχήμα 50: Αποτελέσματα α) DSC και β) TGA ατροποποίητου (διακεκομμένη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος (συνεχής γραμμή). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης Στο Σχήμα Α η πρώτη τήξη αναπαριστάται με μπλε χρώμα, η κρυστάλλωση με ροζ και η δεύτερη τήξη με πράσινο χρώμα.

6 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΥΦΑΝΤΩΝ ΥΦΑΣΜΑΤΩΝ PA 6.6

Όπως και στην περίπτωση των πολυεστερικών υφασμάτων, η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πολυαμιδικών υφασμάτων αποσκοπεί στην αύξηση της υδροφιλικότητάς τους για βελτίωση της πλύσης, της εξάτμισης του ιδρώτα και της βαφής τους με δραστικές βαφές. Για την επιλογή του κατάλληλου βιοκαταλύτη από την βιβλιοθήκη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την επιφανειακή υδρόλυση υφαντών υφασμάτων PA 6.6 συντέθηκε και χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο υπόστρωμα βραχείας αλύσου που προσομοιάζει την επιφάνεια του PA. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενζυμική επιφανειακή επεξεργασία υφαντών υφασμάτων PA 6.6, μέσω της βελτίωσης της βαφικής τους ικανότητας. Τα υφάσματα, ακόμη εξετάστηκαν μέσω φασματοσκοπικής και θερμικής ανάλυσης, ενώ μελετήθηκαν και οι μηχανικές τους ιδιότητες και η αύξηση της υδροφιλικότητας τους.

6.1 Ενζυμική υδρόλυση μοντέλου υποστρώματος του PA 6.6

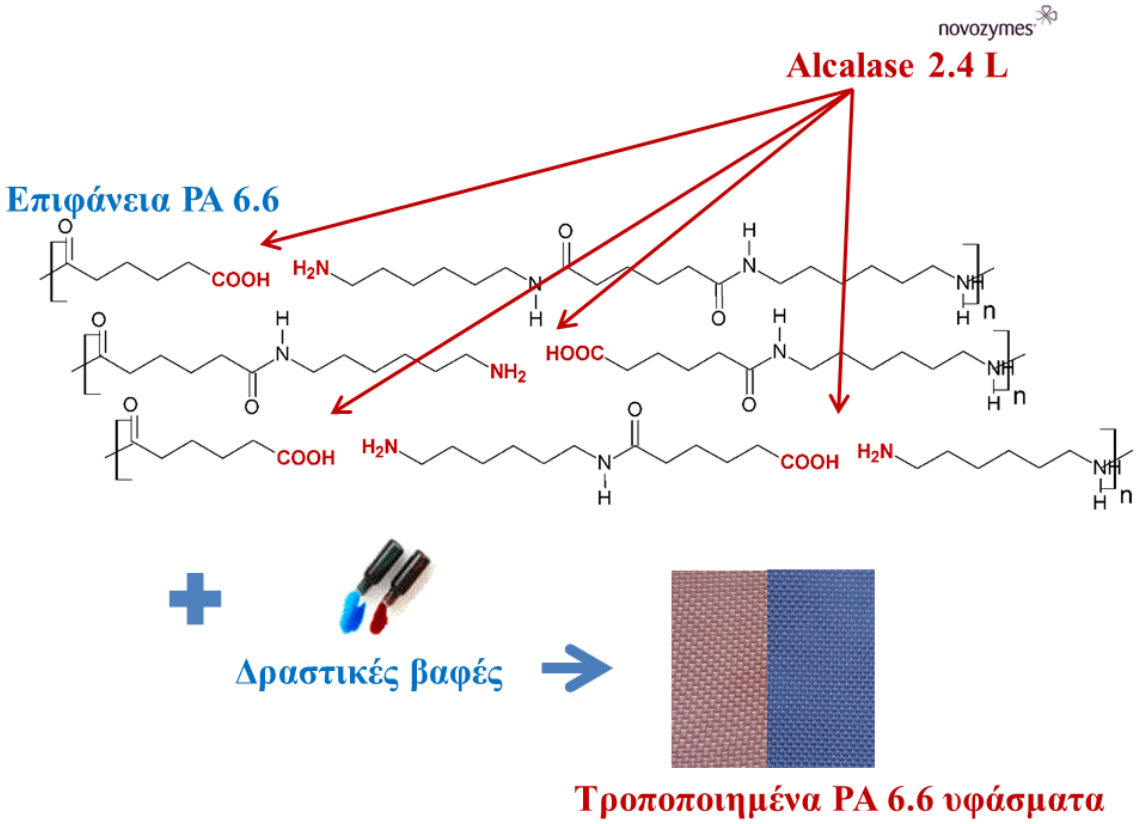
Το μοντέλο αδιπικό δις-εξυλαμίδιο συντέθηκε με σκοπό να εξεταστεί η υδρολυτική ικανότητα της πρωτεάσης Alcalase 2.4 L για την μετέπειτα τροποποίηση PA υφασμάτων. Η υδρολυτική ικανότητα μετρήθηκε με την μέθοδο TNBS. Η ενζυμική υδρόλυση του μοντέλου με την Alcalase 2.4 L ήταν επιτυχής, καθώς οδήγησε στην απελευθέρωση αμονιμάδων στο υπερκείμενο της αντίδρασης σε συγκέντρωση 0.98 mM σε σύγκριση με άλλες υδρολάσες σερίνης που εξετάστηκαν όπως η *Fo*Cut5a, η *Mt*faeC, η *Fo*faeC και η εμπορική λιπάση Lipolase 100T που δεν παρουσίασαν καθόλου ενεργότητα.

6.2 Επιφανειακή υδρόλυση και βαφή υφασμάτων PA 6.6

Η ενζυμική υδρόλυση PA 6.6 υφασμάτων οδηγεί στην απελευθέρωση καρβοξυλομάδων και αμινομάδων τόσο στο υπερκείμενο της αντίδρασης όσο και στην πολυαμιδική επιφάνεια, οι οποίες προκύπτουν από την θραύση των πεπτιδικών δεσμών κατά μήκος των πολυμερικών αλυσίδων. Αυτές οι νεοσχηματισμένες ακραίες ομάδες επί της επιφάνειας συνδέονται χημικά με δραστικές βαφές. Οι δραστικές βαφές παρουσιάζουν το πλεονέκτημα πως, λόγω ομοιοπολικής σύνδεσης, έχουν υψηλή σταθερότητα, με αποτέλεσμα τα υφάσματα να μην ξεβάφουν με τον καιρό και τις πλύσεις. Τα επιφανειακώς τροποποιημένα υφάσματα PA 6.6 αξιολογήθηκαν

εμμέσως μέσω βαφής με μία δραστική βαφή και υπολογισμό της έντασης του χρώματος και της διαφοράς χρώματος σε σύγκριση με μη ενζυμικά τροποποιημένα υφάσματα.

Αρχικά 0.5 g των PA υφασμάτων επωάστηκαν με 18.6 mg πρωτεάσης Alcalase 2.4L σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 8, για 24 h στο θερμοκρασιακό εύρος 40-60 ^{o}C. Τα υφάσματα στη συνέχεια βάφτηκαν με την βαφή Novacron Deep Cherry S-D και υπολογίστηκε η ένταση χρώματος K/S για κάθε δείγμα. Η συνολική διεργασία τροποποίησης των PA υφασμάτων συνοψίζεται στο Σχήμα 51.



Σχήμα 51: Ενζυμική τροποποίηση υφασμάτων PA 6.6 για αύξηση υδροφιλικότητας και βελτίωση βαφικής ικανότητας.

Οι τιμές K/S που βρέθηκαν για κάθε θερμοκρασία τροποποίησης παρουσίασαν αύξηση κατά 1.21, 1.24 και 1.24-φορές με τυπική απόκλιση ±0.06 και διαφορές χρώματος ΔΕ 14.05, 14.54 και 11.44 για τους 40, 50 και 60 ^{o}C αντίστοιχα (Πίνακας 15). Συμπερασματικά η ενζυμική τροποποίηση δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό για το θερμοκρασιακό εύρος που εξετάστηκε.

Πίνακας 15: Αποτελέσματα δοκιμών βαφής με την χρωστική Novacron Deep Cherry S-D σε ενζυμικά τροποποιημένα PA υφάσματα. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40-60 ^{o}C με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ (για μελέτη θερμοκρασίας) και στους 40 ^{o}C, με ενζυμικό φορτίο στο εύρος 3.7-74.4 mg/$g_{υφάσματος}$ (για μελέτη ενζυμικού φορτίου).

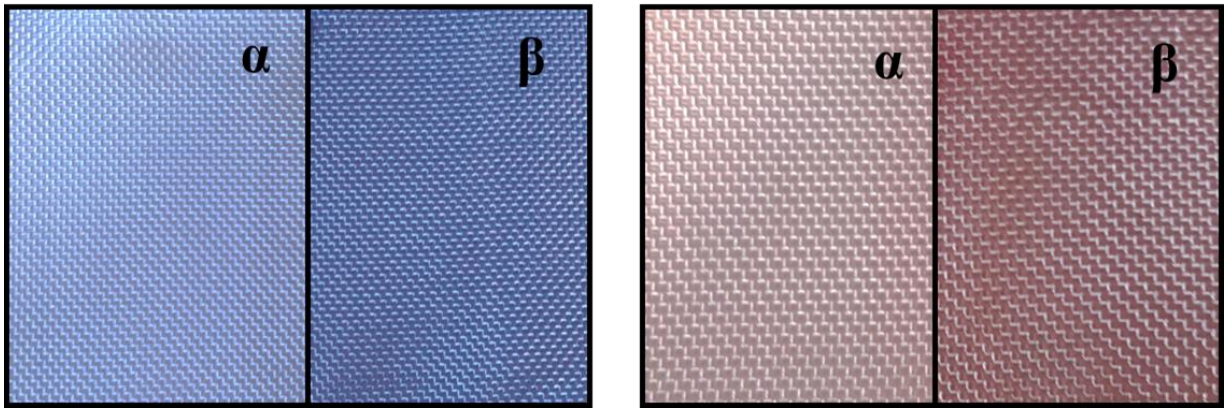
	D65/10	L	a	b	K/S	ΔE
Θερμοκρασία (^{o}C)	Control*	79.89±0.57	11.57±0.66	3.36±0.11	0.26±0.02	
	Control**	79.14±0.16	12.89±0.36	3.10±0.07	0.29±0.01	2.63±1.15
	40	77.31±0.30	14.83±0.40	2.49±0.11	0.35±0.01	14.05±3.11
	50	77.2±0.72	14.97±0.52	2.96±0.02	0.36±0.02	14.54±2.21
	60	77.07±0.56	14.47±0.49	3.39±0.40	0.36±0.02	11.44±3.16
Ενζυμικό φορτίο (mg/$g_{υφάσματος}$)	3.7	78.73±0.40	13.00±0.55	2.76±0.06	0.29±0.01	3.73±2.05
	18.6	77.78±0.76	13.83±0.94	3.03±0.33	0.33±0.03	7.82±2.15
	37.2	77.31±0.30	14.83±0.40	2.49±0.11	0.35±0.01	14.05±3.11
	74.4	76.76±0.03	14.62±0.18	3.86±0.22	0.37±0.00	12.72±0.89

*Δείγμα ελέγχου χωρίς Alcalase 2.4L, **Δείγμα ελέγχου με απενεργοποιημένη Alcalase 2.4L

Εν συνεχεία δοκιμάστηκε μία άλλη δραστική βαφή, η CI Reactive Blue 19, η οποία χρησιμοποιείται για την βαφή βαμβακερών υφασμάτων, και η οποία αναμένεται να αντιδράσει με τις ελεύθερες καρβοξυλομάδες της επιφάνειας των τροποποιημένων PA υφασμάτων. Η διεργασία της βαφής έλαβε χώρα στους 60 ^{o}C, με συγκέντρωση ενζύμου 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ για επώαση 5 h. Η τιμή K/S σημείωσε 1.17 φορές αύξηση με διαφορά χρώματος ΔE ίση με 5.39, χαμηλότερες συγκριτικά αποδόσεις σε σχέση με την κόκκινη βαφή. Στο Σχήμα 52, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βαφής των ατροποποίητων και των ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η τροποποίηση PA υφασμάτων με λέιζερ CO_2 με αποτέλεσμα την σχετική αύξηση της τιμής K/S κατά 20-100 %, με χρήση της βαφής Reactive Red 66 (Bahtiyari 2011). Ωστόσο, η επεξεργασία των ινών με λέιζερ προκαλούν υποβάθμιση της κρυσταλλικότητας και της αντοχής στη διαξονική πίεση/διάρρηξη. Εν αντιθέσει, η χημική τροποποίηση υφασμάτων PA 6.6 με 3M HCl προκάλεσε εντυπωσιακή βελτίωση της βαφής των υφασμάτων (~6.0 και ~8.5-φορές αύξηση), με χρήση των χρωστικών Reactive Black 5 και

Lanasol Red 5B, όμως η υδρόλυση δεν περιορίστηκε σε επιφανειακό επίπεδο (Kisner et al. 2013).



Σχήμα 52: Αποτελέσματα βαφής ατροποποίητων (α) και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων (β), ύστερα από βαφή με CI Reactive Blue 19 (αριστερά) και Deep Cherry S-D (δεξιά). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

Από την άλλη, η ενζυμική τροποποίηση PA 6.6 υφάσματος έχει μελετηθεί με χρήση του εμπορικού σκευάσματος μιας κουτινάσης (κουτινάση GCI 2002/1410; 12.98 U/mL) στους 30 ^{o}C, pH 8.5, για 70 h αντίδρασης. Το τροποποιημένο ύφασμα βάφτηκε με την βαφή Lanasol Red 5B, ενώ σημειώθηκε 1.1-φορές αύξηση της K/S (Silva and Cavaco-Paulo 2004), η οποία είναι όμοια με την παρούσα μελέτη όταν χρησιμοποιήθηκε η βαφή CI Reactive Blue 19. Επιπρόσθετα, μία εμπορική υδρολάση του μικροοργανισμού *Aspergillus melleus* (acylase I) έχει μελετηθεί στη βιβλιογραφία για την τροποποίηση PA 6 στους 50 ^{o}C, pH 8.0, 60 min και 10 % ένζυμο επί του βάρους του υφάσματος (over weight of fabric, owf). Το τροποποιημένο PA 6 βάφτηκε με τη βαφή Reactive Blue 69, και σημειώθηκε 1.33-φορές αύξηση της τιμής K/S, η οποία είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιφανειακής τροποποίησης με το ενζυμικό παρασκεύασμα πρωτεάσης Alcalase 2.4L (Kim and Seo 2013).

Σε επόμενο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του ενζυμικού παρασκευάσματος Alcalase 2.4L στην τροποποίηση των PA υφασμάτων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Μελετήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις ενζύμου: 3.72, 18.6, 37.2 and 74.4 mg/$g_{υφάσματος}$. Η ενζυμική συγκέντρωση 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ απεδείχθη η πιο αποτελεσματική, καθώς μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου δεν οδήγησε σε αύξηση της τιμής K/S. Στη βιβλιογραφία η βέλτιστη ενζυμική συγκέντρωση μιας πρωτεάσης από το γένος *Bacillus*

που παρήχθη με ζύμωση στερεάς κατάστασης ήταν η συγκέντρωση 2.5 mg/$g_{υφάσματος}$ για την τροποποίηση PA 6 στους 30 ^{o}C, pH 8 και 30 min αντίδρασης (El-ola et al. 2014). Οι Parvinzadeh et al. (2009) τροποποίησαν υφάσματα PA 6.6 με τέσσερα εμπορικά πρωτεολυτικά ένζυμα στους 30 ^{o}C, pH 6.5, με χρήση διαφορετικών ενζυμικών συγκεντρώσεων 3, 6 και 9 % owf. Όπως περιγράφεται, αυξάνοντας την ενζυμική συγκέντρωση αυξανόταν η εξάντληση της βαφής στο λουτρό βαφής, ωστόσο δεν βρέθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση των βιοκαταλυτών.

Όσον αφορά τον χρόνο αντίδρασης, η ενζυμική τροποποίηση των PA υφασμάτων στην παρούσα μελέτη φαίνεται να ολοκληρώνεται στις πρώτες 5 h εξαιτίας της σταδιακής απενεργοποίησης της πρωτεάσης για αντιδράσεις που εξετάστηκαν ως και 24 h. Η ενζυμική ενεργότητα εξετάστηκε με χρήση αζοκαζεΐνης ως υπόστρωμα και η μέτρηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Bradford. Ενδεικτικά, η ενεργότητα και η συγκέντρωση του ενζύμου παρουσίασαν μείωση 95 και 92 %, αντίστοιχα στις 5 ώρες αντίδρασης στους 40 ^{o}C και 100 % στους 50 ^{o}C και 60 ^{o}C. Στη βιβλιογραφία, αναφέρονται σύντομοι χρόνοι επώασης για την τροποποίηση PA υφασμάτων με την εμπορική κουτινάση GCI 2002/1410 στους 30 ^{o}C και pH 8.5, όπου η απελευθέρωση αμινομάδων στο υπερκείμενο της αντίδρασης ολοκληρώνεται τις πρώτες 4 h (Silva and Cavaco-Paulo 2004). Οι Kim και Seo (2013) αναφορικά με την τροποποίηση του PA 6 με χρήση του ενζύμου acylase I του *A. melleus* στους 50 ^{o}C, pH 8 και 10 % owf ενζυμική συγκέντρωση, παρατήρησαν την ολοκλήρωση της αντίδρασης στη μία ώρα επώασης.

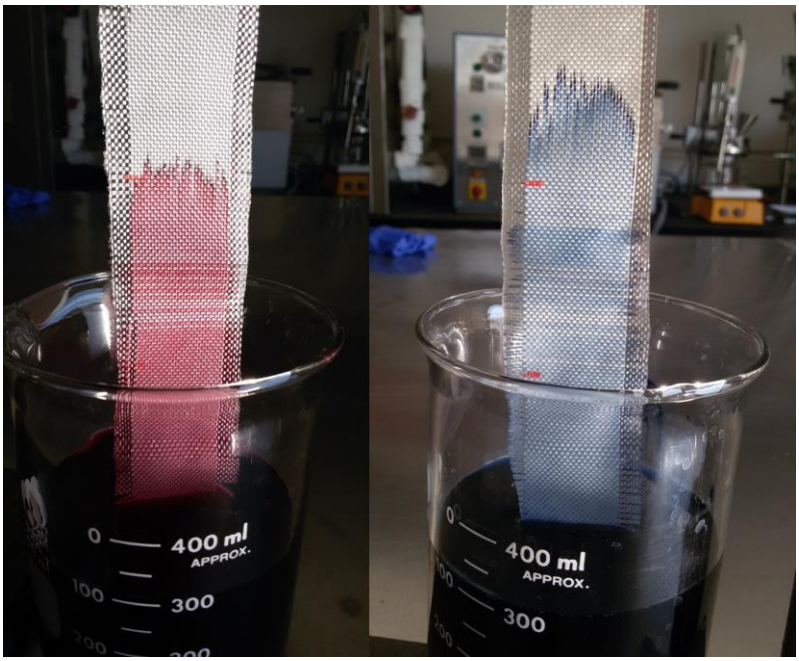
6.3 Μέτρηση υδροφιλικότητας

Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση του PA οδηγεί σε αύξηση της υδροφιλικότητας του υφάσματος και της απορροφητικότητας του σε νερό, διευρύνοντας το πεδίο εφαρμογών. Αναλυτικά στο ενζυμικά τροποποιημένο PA ύφασμα παρατηρήθηκε απορρόφηση του νερού σε ύψος 5.0 cm κατά 10 s πιο γρήγορα και σε ύψος 10.0 cm κατά 1369 s πιο γρήγορα συγκριτικά με το μη τροποποιημένο ύφασμα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως επιτεύχθηκε 2.69-φορές μείωση του χρόνου απορρόφησης/αναρρίχησης του νερού κατά μήκος των υφασμάτων μέχρι το ύψος των 10.0 cm, ενώ το νερό δεν απορροφήθηκε περαιτέρω στο ατροποποίητο ύφασμα. Αντιθέτως στο ενζυμικά υδρολυμένο PA ύφασμα το νερό έφτασε το ύψος των 12.5 cm στα 3960 s. Στο Σχήμα 53 παρουσιάζεται το τελικό αποτέλεσμα της απορροφητικής ικανότητας των υφασμάτων, ενώ στον Πίνακα 16 αναγράφονται οι αντίστοιχοι χρόνοι αναρρίχησης. Οι Song et

al. (2012), εφαρμόζοντας τη μέθοδο ASTSM D79-1992, αναφέρουν πως ο χρόνος απορρόφησης του νερού σε ίνες τροποποιημένες με βρομελίνη μειώθηκε κατά 1.43 έως 1.57 φορές, ύστερα από αντίδραση στους 50 ^{o}C, pH 6, για 120 min, με συγκέντρωση ενζύμου 10 % owf.

Πίνακας 16: Μέτρηση υδροφιλικότητας υφασμάτων PA 6.6.

DIN 53924	**Ύψος αναρρίχησης (cm)**		
	5 cm	10 cm	12.5 cm
	Χρόνος αναρρίχησης (s)		
Ατροποποίητο ύφασμα	95	2180	-
Ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα	85	811	3960



Σχήμα 53: Εμβάπτιση PA υφάσματος σε λουτρό βαφής και παρακολούθηση χρόνου αναρρίχησης βαφής. Ατροποποίητο ύφασμα (αριστερά), ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα (δεξιά).

6.4 Μηχανικές ιδιότητες ενζυμικά τροποποιημένων PA 6.6 υφασμάτων

Η ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση των υφασμάτων δεν πρέπει να επηρεάζει σημαντικά τις μηχανικές ιδιότητες της κύριας μάζας. Σύμφωνα με τον Πίνακα 17 η ενζυμική τροποποίηση επηρεάζει σε μικρό βαθμό όλες τις παραμέτρους της αντοχής σε εφελκυσμό (μέγιστη δύναμη

κατά την θραύση, μέγιστη επιμήκυνση κατά την θραύση, μέγιστη παραμόρφωση κατά την θραύση) του PA υφάσματος. Γενικά παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της αντοχής όλων των εξεταζόμενων μηχανικών ιδιοτήτων κατά τα στημόνια, ενώ σημειώθηκε οριακή μείωση (1.35-φορές) κατά την κατεύθυνση των υφαδίων. Παρόμοια μείωση στην αντοχή σε εφελκυσμό έχει παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία κατά την τροποποίηση ινών με βρομελίνη παρουσία και μη 70 mM L-κυστεΐνης ως ενεργοποιητής (1.04 και 1.08 φορές, αντίστοιχα) στους 50 ^{o}C, pH 6, για 120 min, και συγκέντρωση ενζύμου 10 % owf (Song et al. 2012).

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μελέτης αντοχής σε εφελκυσμό ατροποποίητων και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

Στημόνια	Μέγιστη δύναμη κατά τη θραύση (kgf)	Μέγιστη επιμήκυνση κατά τη θραύση (mm)	Μέγιστη παραμόρφωση κατά τη θραύση (%)
Ατροποποίητο	377.72±2.63	56.155±2.73	27.961±1.37
Τροποποιημένο	391.21±3.24	59.207±2.11	29.39±1.12
Υφάδια			
Ατροποποίητο	339.70±7.65	65.05±1.08	32.19±0.56
Τροποποιημένο	252.15±4.78	59.12±7.79	29.24±3.81

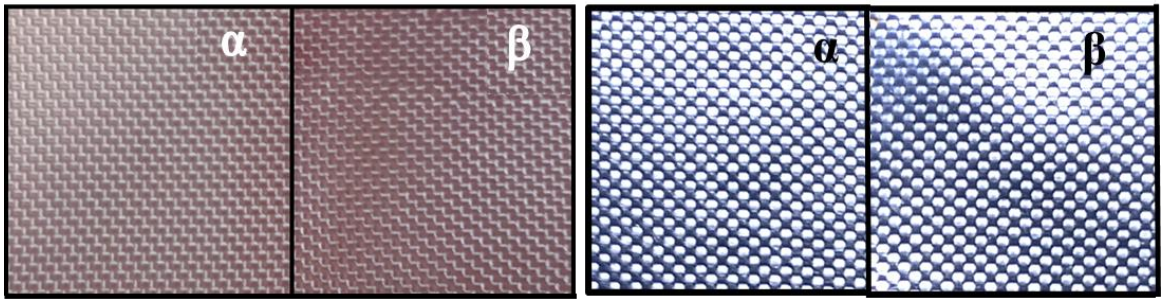
Από την άλλη πλευρά, λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα Kawabata, παρατηρήθηκε μείωση στην αντοχή στην κάμψη τόσο κατά τα στημόνια όσο και κατά τα υφάδια, αλλά και μικρή μείωση στη διατμητική ακαμψία, απόρροια της ενζυμικής τροποποίησης (Πίνακας 18). Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως τα ενζυμικά επεξεργασμένα υφάσματα είναι μαλακότερα και προσφέρουν εντονότερα την αίσθηση του “άνετου” ρούχου. Μη καταστρεπτικές δοκιμές αντοχής σε εφελκυσμό Kawabata παρουσίασαν παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα των δοκιμών που έγιναν στη συσκευή STL Atlas, παρουσιάζοντας αύξηση της αντοχής κατά τα στημόνια και μείωση κατά τα υφάδια. Παράλληλα, Η συμπιεστότητα του υφάσματος αυξήθηκε κατά 47 % με την ενζυμική τροποποίηση. Επιπλέον, για τα ενζυμικά τροποποιημένα υφάσματα ο συντελεστής τριβής μειώθηκε και προς τις δυο

κατευθύνσεις, γεγονός που υποδηλώνει θετική επίδραση όσον αφορά την τριβή μεταξύ υφάσματος και του δέρματος μας.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μελέτης κάμψης, διάτμησης, εφελκυσμού και τριβής (Kawabata) ατροποποίητων και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

		Ατροποποίητο		**Τροποποιημένο**	
		Στημόνια	Υφάδια	Στημόνια	Υφάδια
Κάμψη	**B** (σκληρότητα στην κάμψη/πλάτος υφάσματος)	0.376	0.468	0.144	0.439
	2HB (υστέρηση της ροπής κάμψης)	0.273	0.252	0.307	0.192
Διάτμηση	**G** (σκληρότητα διάτμησης)	0.70	0.65	0.73	0.70
	2HG (υστέρηση του φορτίου διάτμησης υπό γωνία 0.5^{o})	3.50	3.55	3.35	3.75
	2HG5 (υστέρηση του φορτίου διάτμησης υπό γωνία 5.0^{o})	5.10	5.00	4.78	5.18
Εφελκυσμός	**LT** (γραμμικότητα φορτίου-επιμήκυνσης)	0.889	0.653	0.854	0.839
	WT (κατανάλωση ενέργειας για επιμήκυνση υφάσματος)	3.8	6.5	3.8	6.8
	RT (ελαστικότητα εφελκυσμού, % επαναφορά μετά από εφαρμογή τάσης)	57.89	50.00	55.26	54.07
	EMT (% επιμήκυνση υφάσματος σε δεδομένο φορτίο)	1.71	3.98	1.78	3.22
Τριβή	**μ** (συντελεστής τριβής)	0.227	0.179	0.197	0.177
Συμπίεση	EMC % (Συμπιεστότητα %)	14.28		20.93	

Τέλος, η ενζυμική υδρόλυση των υφασμάτων δεν επηρέασε τη δημιουργία κομπαλιδίων ινών (pilling) με εφαρμογή 36000 στροφών. Τα αποτελέσματα pilling φαίνονται στο Σχήμα 54. Παρόμοια συμπεριφορά διαπιστώθηκε με μελέτη της αντοχής στην τριβή στη συσκευή Martindale, όπου δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα υφάσματα με εφαρμογή 50000 στροφών.



Σχήμα 54: Αποτελέσματα pilling α) ατροποποίητου και β) ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (αριστερά) και αντοχής στην τριβή στη συσκευή Martindale. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

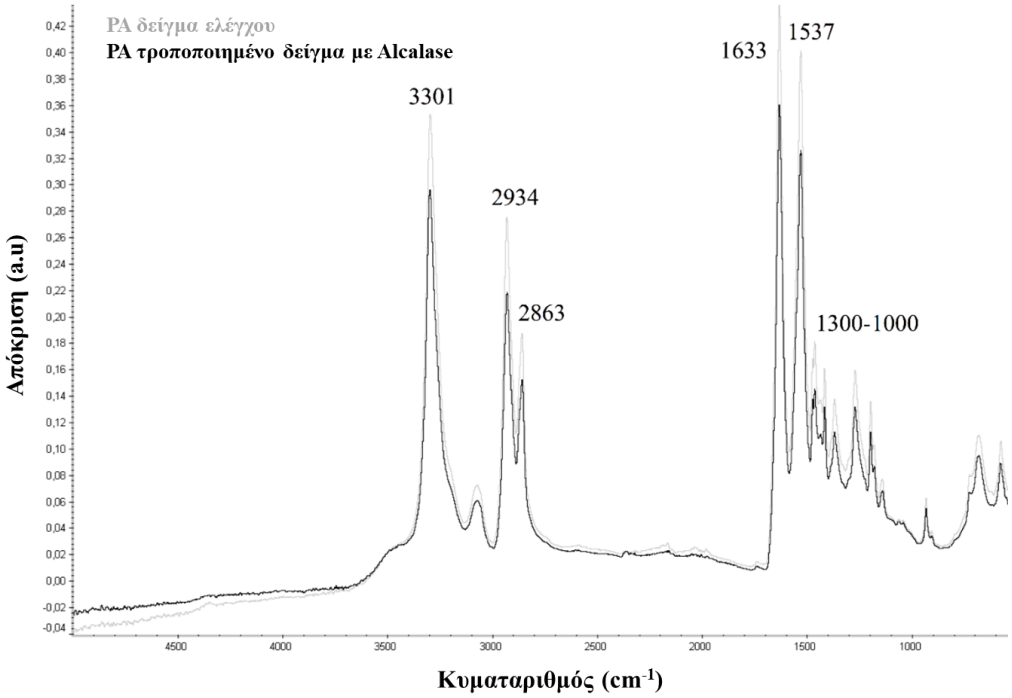
6.5 Φασματοσκοπική και θερμική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων υφασμάτων PA 6.6

Η επιφανειακή τροποποίηση των PA 6.6 υφασμάτων επιβεβαιώθηκε και μέσω φασματοσκοπίας. Η ανάλυση FTIR-ATR προσφέρει πληροφορίες σχετικά με την θραύση των εστερικών δεσμών και την αύξηση των καρβοξυλομάδων και των αμινομάδων επί της επιφάνειας, ενώ η θερμική ανάλυση αποδεικνύει πως η ενζυμική κατεργασία δεν επηρεάζει την κύρια μάζα του πολυμερούς.

6.5.1 Ανάλυση FTIR-ATR

Τα ενζυμικά τροποποιημένα PA υφάσματα αναλύθηκαν με FTIR-ATR, προκειμένου να ανιχνευτούν πιθανόν δομικές αλλαγές επί της επιφάνειας. Το φάσμα υπερύθρου ατροποποίητων και τροποποιημένων PA 6.6 υφασμάτων, τα οποία υδρολύθηκαν στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με προσθήκη ενζύμου 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ παρουσιάζεται στο Σχήμα 55. Ο αμιδικός δεσμός του αποτελεί μία ισχυρή κορυφή στα 1633 cm^{-1} που αντιστοιχεί στο δεσμό καρβονυλίου C=O, λόγω δονήσεων επιμήκυνσης και στα 3301 cm^{-1} που αντιστοιχεί στο δεσμό N-H, λόγω δονήσεων κάμψης. Οι δονήσεις επιμήκυνσης και κάμψης των δεσμών C-H των ομάδων $-CH_2$, όπως επίσης και οι δονήσεις των ομάδων $-CH_3$ στα άκρα των πολυαμιδικών αλυσίδων προβάλλονται στους κυματαριθμούς 2863 και 2934 cm^{-1}, αντίστοιχα. Η κορυφή στα 1537 cm^{-1} αντιστοιχεί στη N-μονο-υποκατεστημένη αμιδική ομάδα της PA αλυσίδας στη στερεή κατάσταση, ενώ οι δεσμοί C-N του αμιδίου εμφανίζονται στα 1000-1300 cm^{-1}. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 55, η ένταση των

κορυφών των λειτουργικών ομάδων του αμιδικού δεσμού C=O και N-H στα 1633 cm^{-1} και 3301 cm^{-1}, αντίστοιχα, παρουσιάζει μείωση στο τροποποιημένο δείγμα, λόγω της ενζυμικής υδρόλυσης των αμιδικών δεσμών που έχει προηγηθεί. Ομοίως στη βιβλιογραφία ενζυμικά υδρολυμένα υφάσματα PA 6.6 με χρήση εμπορικών πρωτεασών και μιγμάτων πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά στα φάσματα FTIR-ATR (Parvinzadeh et al. 2009; Gashti et al. 2013).

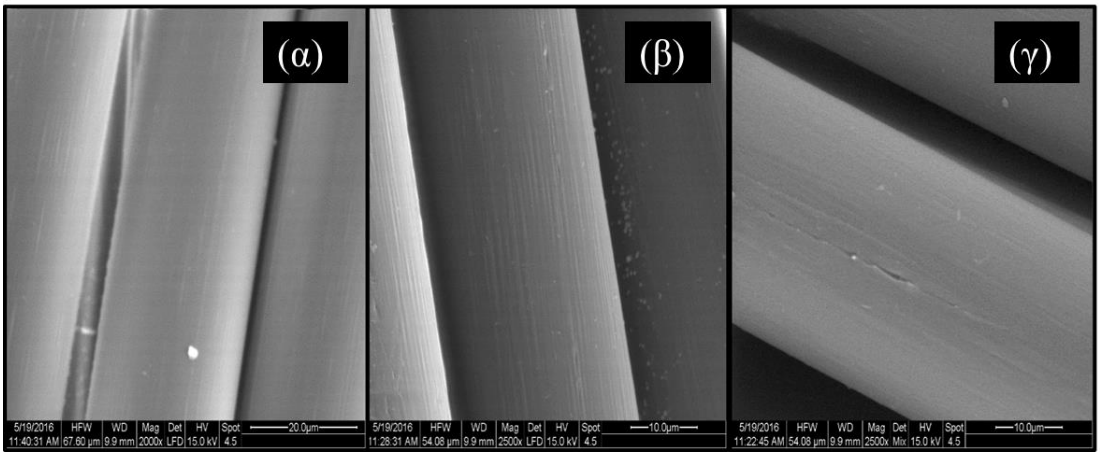


Σχήμα 55: FTIR-ATR φάσμα υφάσματος ελέγχου (επώαση με ενζυμικά απενεργοποιημένο ένζυμο) (γκρι γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (μαύρη γραμμή). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

6.5.2 Ανάλυση SEM

Συμπληρωματικά, η ενζυμική τροποποίηση της πολυαμιδικής επιφάνειας μπορεί να αναλυθεί μακροσκοπικά, με ανάλυση SEM. Τα προς μελέτη υφάσματα τροποποιήθηκαν στις βέλτιστες συνθήκες 60 ^{o}C, pH 8, 5 h αντίδρασης, με ενζυμική προσθήκη 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ και η εικόνα που προέκυψε από την ανάλυση SEM παρατίθεται στο Σχήμα 56 συγκριτικά πάντα με ατροποποίητο ύφασμα. Στις ενζυμικά τροποποιημένες ίνες διακρίνονται μικρές οπές και χαραγές, παρ' όλ' αυτά δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται

ομοιογένεια μεταξύ των τροποποιημένων ενζυμικά ινών, καθώς σε κάποια σημεία της τροποποιημένης επιφάνειας παρατηρούνται σημάδια υδρόλυσης και σε άλλα όχι.

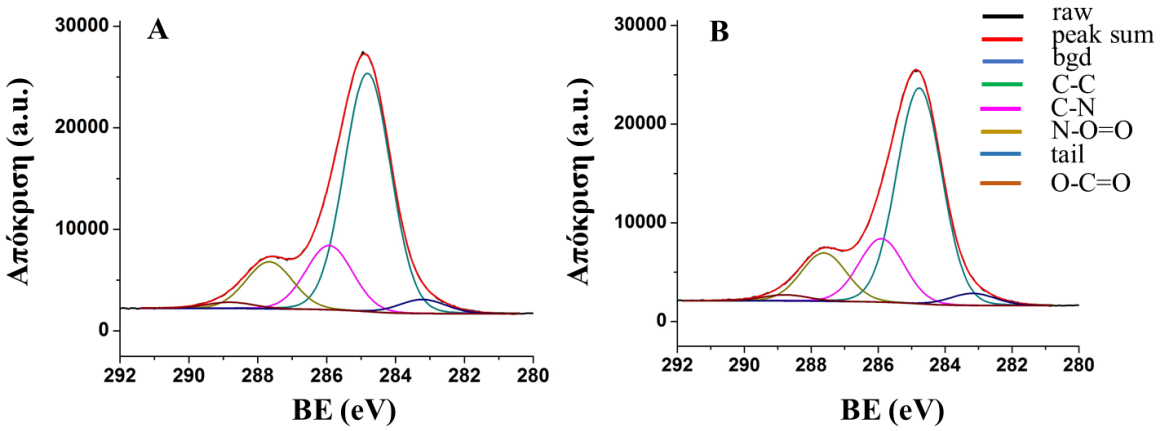


Σχήμα 56: SEM απεικονίσεις, μεγενθυμένες κατά 2000× και 2500×, της επιφάνειας υφασμάτων ελέγχου, όπου η επώαση πραγματοποιήθηκε χωρίς ένζυμο (α), ή με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο (β), αντίστοιχα, και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (γ) : Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

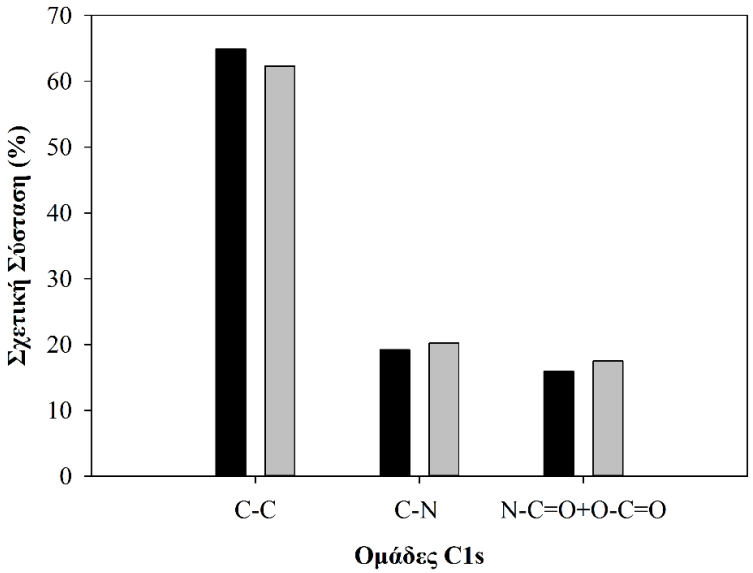
6.5.3 Ανάλυση XPS

Η ανάλυση XPS αποτελεί μία τεχνική επιφανειακού χημικού χαρακτηρισμού του στερεού υλικού, ενώ μέσω κατάλληλης επεξεργασίας με ειδικό πρόγραμμα λαμβάνονται δεδομένα σχετικά με τους δεσμούς και τις ενέργειες σύνδεσης. Επίσης, με ολκλήρωση των φωτοκορυφών του φάσματος εξάγονται ποσοτικά συμπεράσματα για την αυξομείωση ή αλλαγή των δεσμών. Με την ανάλυση XPS πραγματοποιήθηκε επιφανειακή στοιχειακή ανάλυση των πολυαμιδικών ινών τροποποιημένων ενζυμικά και μη. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως δεν έχει γίνει αναφορά ανάλυσης XPS ενζυμικά υδρολυμένων πολυαμιδικών υφασμάτων στη βιβλιογραφία έως σήμερα. Οι χαρακτηριστικές XPS κορυφές των πολυαμιδικών δειγμάτων είναι των: O, N και C. Η ποσοτική ανάλυση έλαβε χώρα αξιοποιώντας τις περιοχές των κορυφών των C1s, O1s and N1s αφού αφαιρέθηκε από τις ομάδες C1s και O1s η συμβολή στο σήμα του δειγματοφορέα και της περιβαλλοντικής επιμόλυνσης. Με χρήση κατάλληλου λογισμικού προέκυψε πως η αναλογία C:O:N είναι 1:0.13:0.14 για το ατροποποίητο δείγμα και 1:0.14:0.16 για το ενζυμικά τροποποιημένο.

Το σχήμα της περιοχής των επικρατέστερων C κορυφών (Σχήμα 57) σε όλα τα δείγματα υποδεικνύουν την παρουσία πολλών χημικών καταστάσεων των C1s, που αντιστοιχούν στις διαφορετικές διακριτές λειτουργικές ομάδες στην πολυμερική αλυσίδα. Με στόχο την απάλειψη των συνεισφορών των διάφορων καταστάσεων εφαρμόστηκε ένα "fitting", μία προσαρμογή, βάσει πληροφοριών και δεδομένων από τη βιβλιογραφία για τις ενέργειες σύνδεσης (binding energies, BEs) και χρησιμοποιώντας το ίδιο εύρος κορυφών για όλες τις ομάδες (Σχήμα 57). Οι βασικές ομάδες βρέθηκαν να είναι: C-C (284.8 eV), C-N (285.9 eV), N-C=O(287.6 eV) και O-C=O (288.8 eV). Η επίδραση της ενζυμικής δράσης υποδεικνύεται από μικρές, ωστόσο διακριτές αλλαγές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών, οι οποίες αποδίδονται ως σχετική σύσταση των ομάδων των C1s, όπως παρουσιάζονται στο Σχήμα 58. Η ενζυμική τροποποίηση οδηγεί σε σχετική αύξηση των υδρολυμένων ομάδων (5.2 και 10.1 % για τις ομάδες C-N και N-C=O+HO-C=O, αντίστοιχα) έναντι των αλειφατικών ομάδων (C-C) που μειώθηκαν κατά 4.0 %.



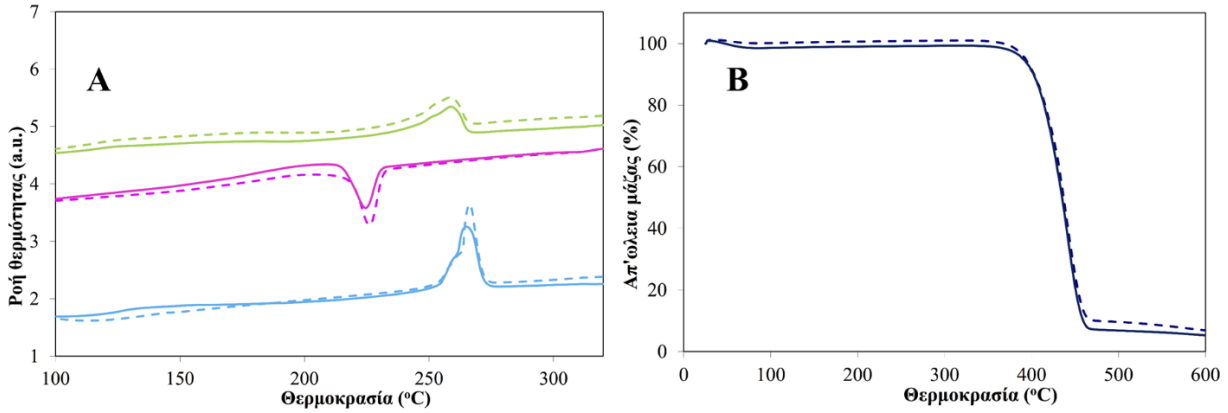
Σχήμα 57: Κορυφές ομάδων άνθρακα από ανάλυση XPS (A) ατροποποίητου και (B) τροποποιημένου PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.



Σχήμα 58: Σχετική σύσταση (%) διαφορετικών C1s ομάδων, όπως προέκυψαν από ανάλυση XPS ατροποποίητου (μαύρο) και τροποποιημένου (γκρι) PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (C-C~284.8 eV, C-N~285.9 eV, N-C=O~287.6 eV και O-C=O~288.8 eV). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$.

6.5.4 Ανάλυση DSC και TGA

Οι θερμικές ιδιότητες των PA υφασμάτων αποτελούν ιδιότητες της κύριας μάζας του πολυμερικού υλικού και δεν θα έπρεπε να μεταβάλλονται κατά την επιφανειακή ενζυμική τροποποίηση. Ο θερμοκρασιακός κύκλος θέρμανσης-ψύξης–θέρμανσης που εφαρμόστηκε κατά την ανάλυση DSC επέτρεψε τον προσδιορισμό του πρώτου σημείου τήξης (264 ^{o}C), της θερμοκρασίας κρυστάλλωσης (225 ^{o}C) και του δεύτερου σημείου τήξης (257 ^{o}C) του πολυαμιδικού υφάσματος. Από το Σχήμα 59α γίνεται φανερό πως δεν σημειώθηκαν διαφορές στις θερμικές ιδιότητες μεταξύ τροποποιημένων και ατροποποίητων υφασμάτων PA. Από την ανάλυση TGA η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης, όπου σημειώνεται μέγιστη απώλεια μάζας του υλικού, βρέθηκε 453 ^{o}C τόσο για το μη τροποποιημένο όσο και για το ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα (Σχήμα 59β).



Σχήμα 59: Αποτελέσματα α) DSC και β) TGA ατροποποίητου (διακεκομμένη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (συνεχής γραμμή). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ºC, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. Στο Σχήμα Α η πρώτη τήξη αναπαριστάται με μπλε χρώμα, η κρυστάλλωση με ροζ και η δεύτερη τήξη με πράσινο χρώμα.

7 ΒΙΟΛΑΣΕΪΝΗ: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

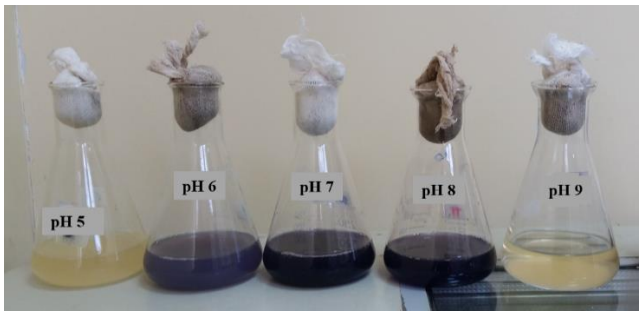
Η βιολασεΐνη αποτελεί μία ένωση με πολύ σημαντικές ιδιότητες και χρήζει μελέτης για εφαρμογή σε τομείς, όπως η Ιατρική, οι συσκευασίες, τα καλλυντικά και η κλωστοϋφαντουργία. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης της παραγωγής της βιολασεΐνης σε φιάλες Erlenmeyer και σε βιοαντιδραστήρα. Στη συνέχεια έλαβε χώρα βαφή πολυαμιδικών υφασμάτων με βιολασεΐνη, καθώς και παραγωγή φύλλων PLA με βιολασεΐνη, μέσω χύτευσης, και ακολούθησε εξέταση των αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των πολυμερών.

7.1 Βελτιστοποίηση παραγωγής βιολασεΐνης

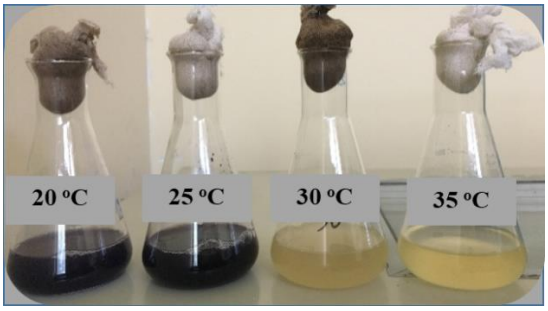
Το βακτήριο *J. lividum* από ένα ψυχροτροπικό είδος το οποίο συναντάται σε παγετούς και στο δέρμα αμφίβιων, όπως οι βάτραχοι ή η σαλαμάνδρα *Plethodon cinereus*, όπου η βιολασεΐνη παράγεται ως βακτηριακός μεταβολίτης σε συγκεντρώσεις που δυσχαεραίνουν την επιβίωση του παθογόνου *Batrachochytrium dendrobatidis* που προκαλεί μια ασθένεια στα αμφίβια γνωστή ως χυτριδιομυκητίαση (Brucker et al. 2008; Lu et al. 2009; Harris et al. 2009, Valdes et al., 2015). Η βιολετί αυτή ουσία μπορεί να αξιοποιηθεί για τη βαφή υφασμάτων προς απόκτηση αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων.

Η μικροβιακή παραγωγή βιολασεΐνης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, από το είδος και το στέλεχος του μικροοργανισμού έως τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός. Γι’ αυτό το σκοπό είναι συχνά απαραίτητη η βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης ώστε να αυξηθεί η παραγωγικότητα ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη.

Στην παρούσα διατριβή αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών που θα μεγιστοποιήσουν την παραγωγή βιομάζας και βιολασεΐνης από το βακτήριο *J. lividum*. Μελετήθηκαν το αρχικό pH, η θερμοκρασία, το θρεπτικό μέσο και η προσθήκη αντιβιοτικού (Σχήμα 60).

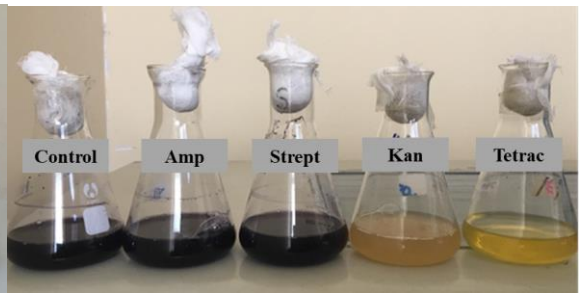


α)

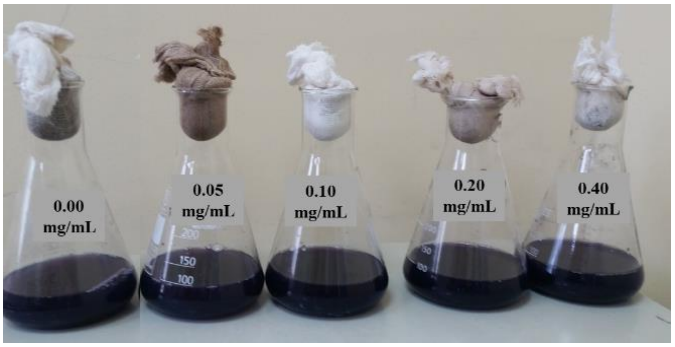


β)

γ)



δ)

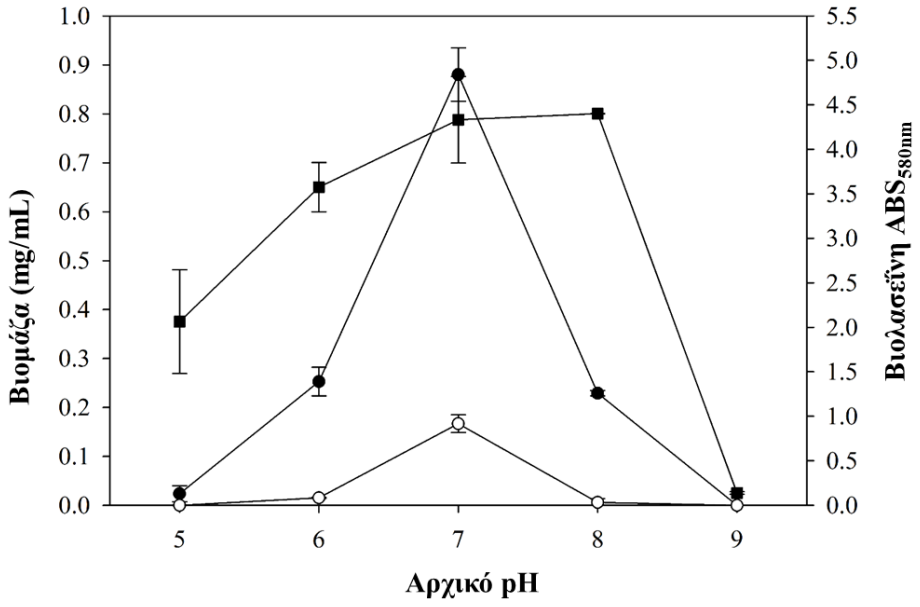


ε)

Σχήμα 60: Καλλιέργειες *J. lividum* για μελέτη α) pH, β) θερμοκρασίας, γ) επιπρόσθετης πηγής άνθρακα, δ) προσθήκης 0.1 mg/mL αντιβιοτικού, ε) προσθήκης αμπικιλλίνης. Οι καλλιέργειες απεικονίζονται ύστερα από 6 ημέρες επώασης.

Στο Σχήμα 61 παρατίθεται η επίδραση του αρχικού pH από 5.0 έως 9.0. όπως γίνεται φανερό η βιομάζα επί ξηρού βάρους (ξ. β.) μεγιστοποιήθηκε για αρχικά pH 7.0 και 8.0, ωστόσο η παραγωγή βιολασεΐνης ήταν 3.8 φορές υψηλότερη σε σχέση με τις τιμές pH 6.0 και 8.0. Χαμηλή παραγωγή βιομάζας (ξ. β.) παρατηρήθηκε ακόμη και σε pH 5.0 χωρίς να σημειωθεί παραγωγή βιολασεΐνης, ενώ το pH 9.0 απεδείχθη εχθρικό περιβάλλον για την ευημερία του *J. lividum*. Γενικά οι μικροοργανισμοί που παράγουν βιολασεΐνη στη βιβλιογραφία αναφέρεται να

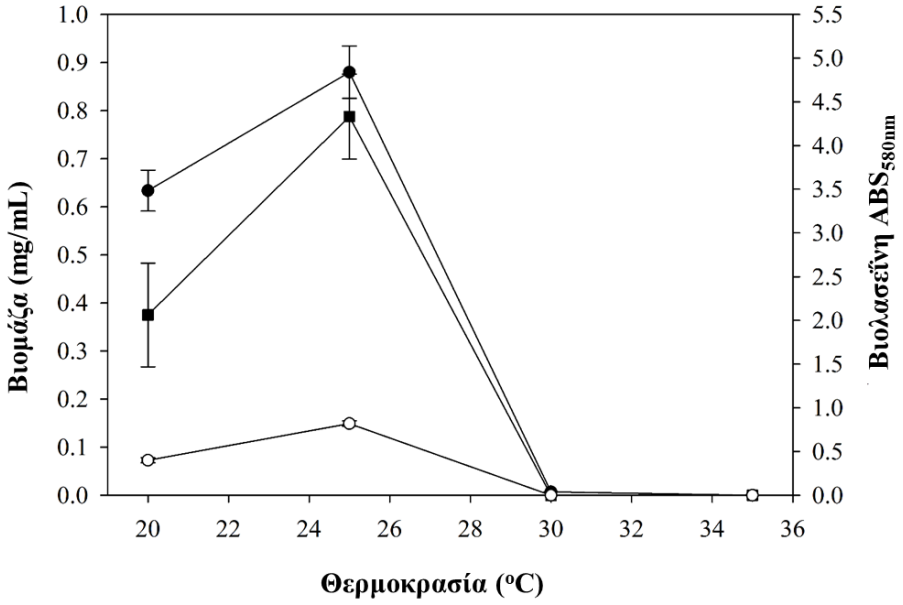
καλλιεργούνται σε θρεπτικά μέσα όπως το NB και το LB. Στην παρούσα μελέτη όσον αφορά το αρχικό pH στην ανάπτυξη του *J. lividum*, το pH 7.0 βρέθηκε να είναι το βέλτιστο. Το ψυχροτροπικό βακτηριακό στέλεχος RT102, ένα είδος συγγενικό του *J. lividum*, αναπτύχθηκε σε pH 6 στους 25 ^{o}C (Nakamura et al. 2003).



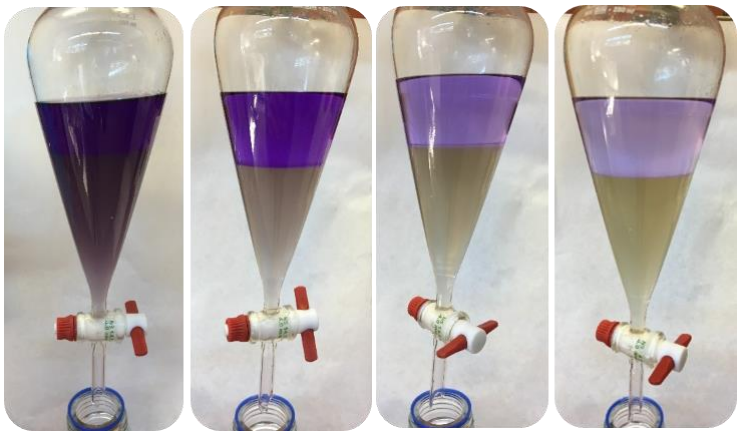
Σχήμα 61: Επίδραση αρχικού pH στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η θερμοκρασία ζύμωσης μεταξύ 20-35 ^{o}C (Σχήμα 62). Το βακτήριο *J. lividum* αναπτύχθηκε ικανοποιητικά στο εύρος 20-25 ^{o}C, ενώ στους 30 και 35 ^{o}C δεν σημειώθηκε ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η μέγιστη βιομάζα παράχθηκε στους 25 ^{o}C με μέση συγκέντρωση 0.79 mg/mL και μέγιστη παραγωγή βιολασεΐνης. Στις υψηλότερες θερμοκρασίες των 30 και 35 ^{o}C δεν σημειώθηκε παραγωγή βιομάζας, ενώ στους 20 ^{o}C η βιομάζα είχε συγκέντρωση 0.38 mg/mL με την δεύτερη καλύτερη παραγωγή βιολασεΐνης, όπως διακρίνεται και στο Σχήμα 62 δικαιολογώντας τον ψυχροτροπικό χαρακτήρα του *J. lividum*. Οι ψυχροτροπικοί μικροοργανισμοί έχουν σχετικά χαμηλή βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, εξαιτίας της θερμοευαισθησίας ενός ή περισσότερων κυτταρικών συστατικών, κυρίως ενζύμων (Gounot 1986). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *J. lividum* βρέθηκε να είναι οι 25 ^{o}C, σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Rodrigues et al. 2012; Masuelli et al. 2016) και όμοια με το στέλεχος *J. lividum* IAM13948 (Shirata et al. 2000). Από την άλλη το στέλεχος *J. lividum* XT1

αναφέρεται να μεγαλώνει καλύτερα στους 15 ^{o}C (Lu et al. 2009). Στους 25 ^{o}C και για αρχικό pH 7.0, η μέση παραγωγή εκχυλίσματος που περιέχει βιολασεΐνη μετά από 6 ημέρες επώασης σε 100 mL καλλιέργειας βρέθηκε 0.305 mg/mL βάσει σταθμικής μέτρησης. Επιπρόσθετα, το εκχύλισμα που περιέχει βιολασεΐνη στο υπερκείμενο, ύστερα από εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα, εξάτμιση και ζύγιση βρέθηκε να είναι 0.215 mg/mL, υποδηλώνοντας απώλεια 41 % από την ακατέργαστη βιολασεΐνη που παράγεται στα κύτταρα (Σχήμα 63).

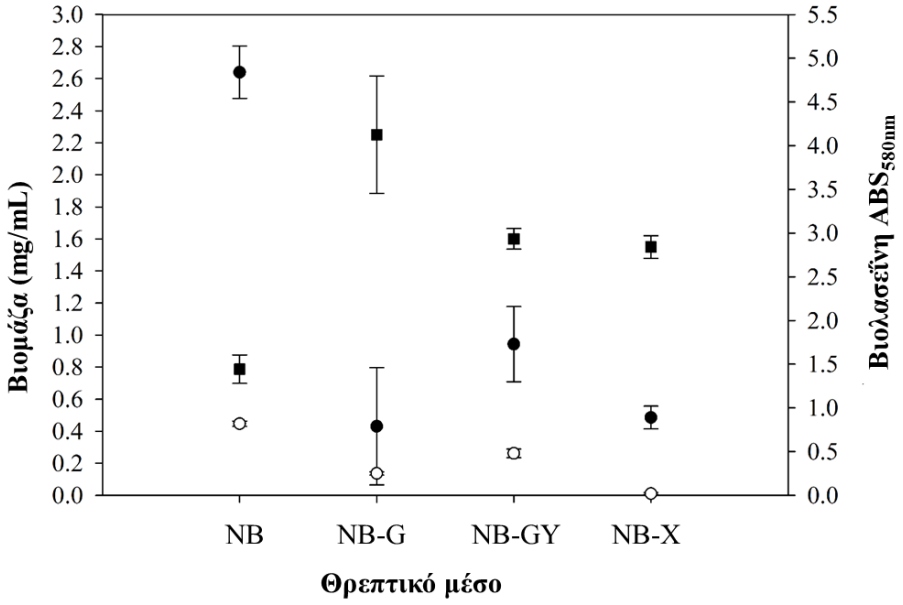


Σχήμα 62: Επίδραση θερμοκρασίας στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο).



Σχήμα 63: Εκχύλιση βιολασεΐνης από υπερκείμενο καλλιέργειας με οξικό αιθυλεστέρα.

Σε επόμενο στάδιο αξιολογήθηκε η συμπεριφορά του *J. lividum* σε καλλιέργειες με διάφορες πηγές άνθρακα. Η γλυκόζη (G), η γλυκερόλη (GY) και η ξυλόζη (X) επιλέχθηκαν ως οι πιο κοινές και φτηνές πηγές άνθρακα ως τροφή για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η γλυκόζη, η ξυλόζη και η γλυκερόλη μπορούν να προέλθουν από την αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχας βιομάζας και τα απόβλητα βιοντίζελ, αντίστοιχα, μέσω διεργασιών ζύμωσης (Kumar et al. 2009; Yang et al. 2012). Τα τρία θρεπτικά μέσα G-NB, GY-NB, X-NB βελτίωσαν την παραγωγή βιομάζας, ωστόσο η παραγωγή βιολασεΐνης δεν ακολουθεί την ίδια τάση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 64.

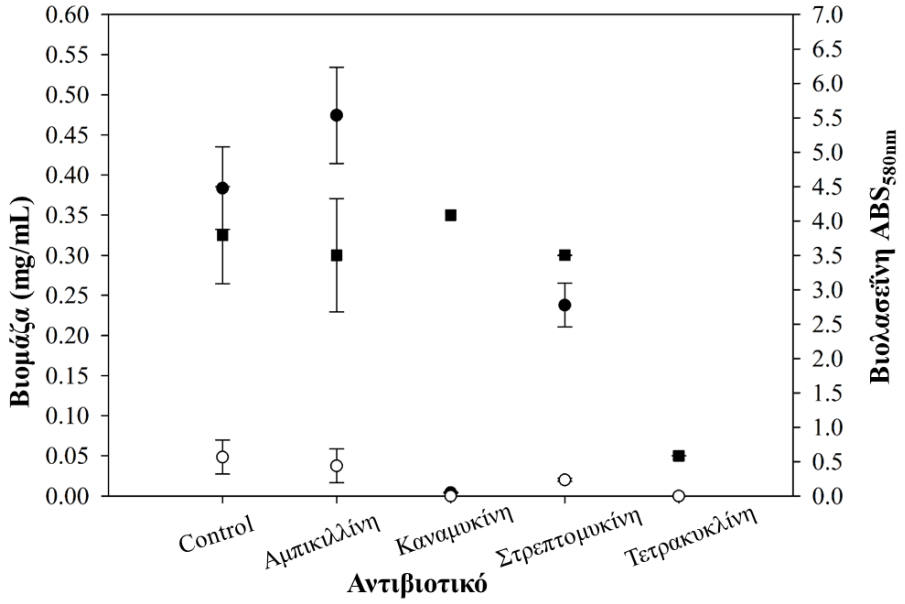


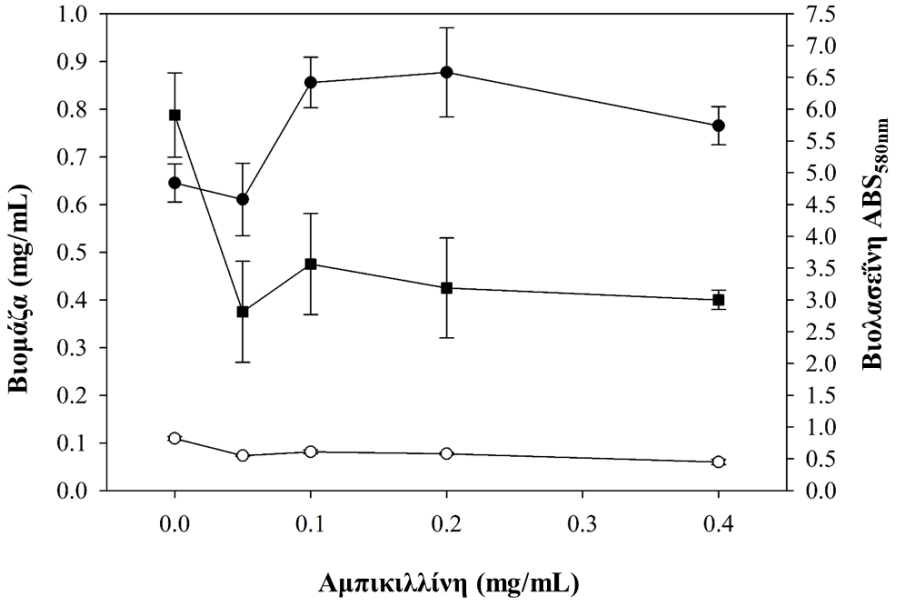
Σχήμα 64: Επίδραση προσθήκης πηγής άνθρακα στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο).

Η υψηλότερη συγκέντρωση βιομάζας (2.25 mg/mL) σημειώθηκε με χρήση του μέσου NB-G, ωστόσο η γλυκόζη φαίνεται να παρεμποδίζει την παραγωγή βιολασεΐνης, σε αντίθεση με το απλό θρεπτικό μέσο NB. Τα θρεπτικά μέσα NB-GY και NB-X οδήγησαν σε αυξημένη παραγωγή βιομάζας (1.60 και 1.55 mg/mL, αντίστοιχα), ωστόσο όχι τόσο υψηλή όσο το μέσο NB-G. Η παραγωγή βιολασεΐνης γίνεται μέγιστη στο μέσο NB, ενώ το μέσο NB-GY παρουσίασε την αμέσως επόμενη υψηλότερη παραγωγή της χρωστικής. Η δοκιμή των μέσων NB-G, NB-GY και NB-X οδήγησαν σε αύξηση παραγωγής βιομάζας, μολοταύτα είχαν αρνητική

επίπτωση στην παραγωγή βιολασεΐνης, αποδεικνύοντας πως η εκάστοτε πηγή άνθρακα ρυθμίζει το μεταβολικό μονοπάτι προς την παραγωγή βιολασεΐνης. Συγκεκριμένα, στο μέσο NB-GY σημειώθηκε διπλάσια παραγωγή βιολασεΐνης συγκριτικά με το NB-G. Στη βιβλιογραφία το ίδιο στέλεχος έχει αναπτυχθεί σε θρεπτικό μέσο LB broth, LB-G και LB-GY. Σε αυτή την περίπτωση σημειώθηκε μεγαλύτερη παραγωγή βιολασεΐνης παρουσία γλυκερόλης και σε μικρότερο βαθμό σε απλό LB, σε αντίθεση με τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, ενώ η παραγωγή της βαφής παρεμποδίστηκε στην περίπτωση της γλυκόζης, όπως και στην παρούσα μελέτη (Pantanella et al. 2007).

Τέλος, εφόσον η βιολασεΐνη αποτελεί δευτερογενή μεταβολίτη που παράγεται σε συνθήκες στρες εξετάστηκε η επίδραση προσθήκης αντιβιοτικού στην καλλιέργεια *J. lividum*. Από τα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν, στην αμπικιλλίνη ο μικροοργανισμός παρουσίασε ανθεκτικότητα και παρήγαγε περισσότερη βιολασεΐνη (Σχήμα 65). Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν καλλιέργειες παρουσία αμπικιλλίνης συγκεντρώσεων 0.05-0.40 mg/mL (Σχήμα 65). Είναι εμφανές πως η προσθήκη αμπικιλλίνης από 0.1 έως 0.4 mg/mL οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης βιολασεΐνης ως αντίδραση σε συνθήκες στρες, ενώ η παραγωγή βιομάζας μειώθηκε.





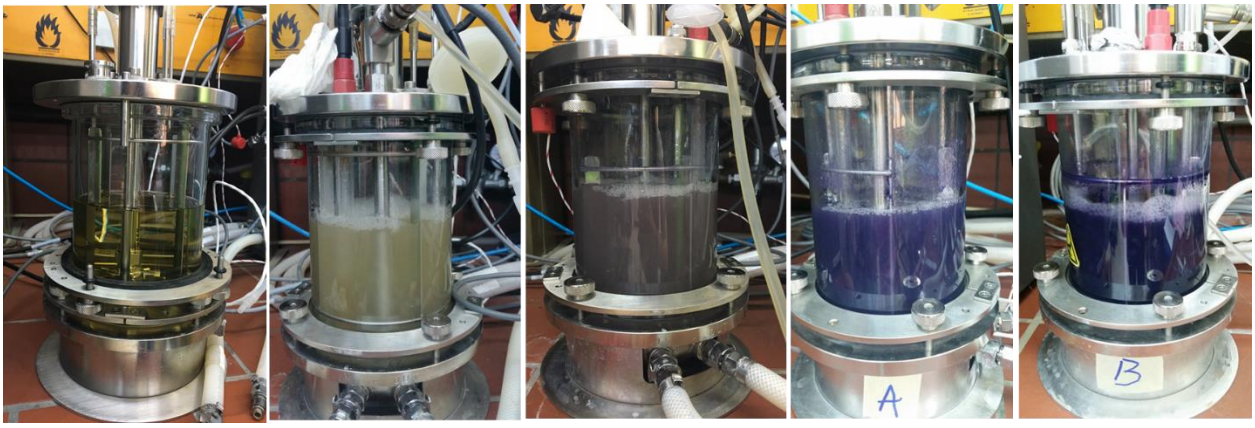
Σχήμα 65: Επίδραση προσθήκης αντιβιοτικού 0.1 mg/mL (πάνω) και ειδικότερα αμπικιλλίνης (κάτω) στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο).

Η προσθήκη αμπικιλλίνης 0.1-0.2 mg/mL μεγιστοποίησε την παραγωγή βιολασεΐνης με αύξηση 33-36 % συγκριτικά με τις καλλιέργειες που δεν περιείχαν αντιβιοτικό. Αναφορικά στη βιβλιογραφία η προσθήκη αμπικιλλίνης σε καλλιέγεια *J. lividum* οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης βιολασεΐνης κατά 25 % (Pantanella et al. 2007). Παρ' ότι η προσθήκη αμπικιλλίνης οδήγησε σε αύξηση της παραγόμενης βιολασεΐνης, η χρήση της δεν ενδείκνυται, λόγω κόστους και επιμόλυνσης του περιβάλλοντος με αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου δεν χρησιμοποιήθηκε αντιβιοτική ουσία στη μελέτη παραγωγής βιολασεΐνης σε βιοαντιδραστήρα που ακολουθεί.

7.2 Παραγωγή βιολασεΐνης σε Βιοαντιδραστήρα

Η βιολασεΐνη αποτελεί μία ουσία με αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μπορεί να βρει εφαρμογή στην κλωστοϋφαντουργία, στις συσκευασίες και στην Βιοϊατρική. Μολοταύτα είναι δύσκολο να εκχυλιστεί και να καθαριστεί και γι' αυτό το λόγο η βιολασεΐνη αποτελεί μία ακριβή εμπορική ουσία. Με σκοπό την μελέτη της παραγωγής βιολασεΐνης υπό ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού, θερμοκρασίας και μηχανικής ανάδευσης πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε 2-L βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου στις βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Η ζύμωση του *J. lividum* σε βιοαντιδραστήρα οδήγησε σε μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 0.77 g/L, με οπτική πυκνότητα 4.75 στα 600 nm, μετά από επώαση 24 h, όπως διακρίνεται στο Σχήμα 67α. Πρέπει να σημειωθεί πως παρόμοια συγκέντρωση επετεύχθη σε σύγκριση με τις καλλιέργειες που έλαβαν χώρα σε φιάλες Erlenmeyer. Η παραγωγή βιολασεΐνης μεγιστοποιήθηκε στις 24 h επώασης με τελική συγκέντρωση 0.368 g/L, η οποία όμως είναι 2.7 φορές μικρότερη σε σχέση με την παραγωγή στις καλλιέργειες σε φιάλες Erlenmeyer, βάσει των απορροφήσεων στα 580 nm (Σχήμα 67β). Είναι αξιοσημείωτο πως τόσο στα πειράματα στις φιάλες Erlenmeyer όσο και στο βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου φαίνεται να παράγεται παρόμοια ποσότητα ακατέργαστης βιολασεΐνης ανά μονάδα όγκου καλλιέργειας βάσει της σταθμικής μέτρησης σε αντίθεση με τις μετρήσεις απορρόφησης της βιολασεΐνης στα 580 nm. Πιθανόν λόγω καλύτερης παροχής οξυγόνου και σταθερού pH και ως εκ τούτου λιγότερο έντονων συνθηκών στρες, η παραγωγή βιομάζας είναι μεγαλύτερη, ωστόσο η παραγωγή βιολασεΐνης παρουσιάζει μείωση. Το εκχύλισμα που παραλαμβάνεται παρουσιάζει 4.5 % καθαρότητα, ως εκ τούτου η μειωμένη παραγωγή της καθαρής βιολασεΐνης δεν αντικατοπτρίζεται στην σταθμική μέτρηση, αλλά γίνεται φανερή μέσω φωτομετρίας στα 580 nm.

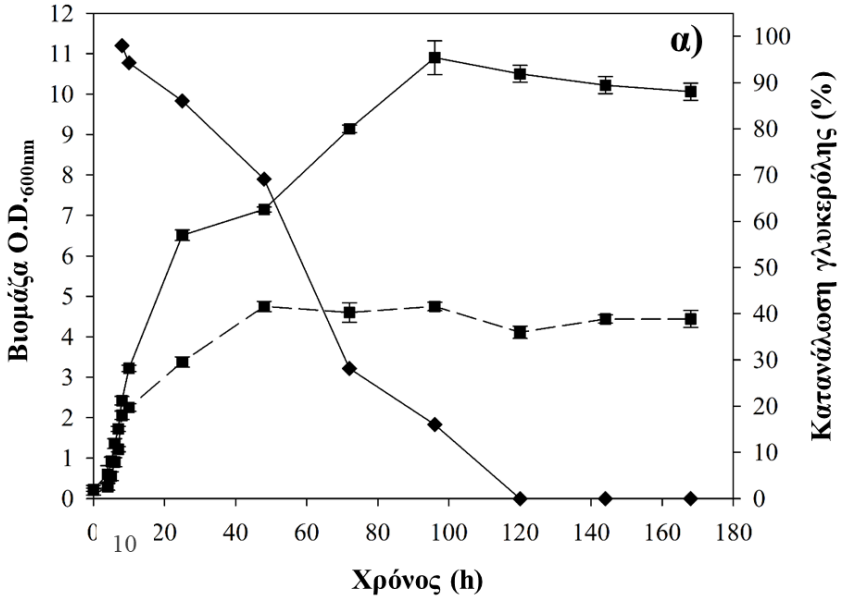
Στη συνέχεια με σκοπό την αύξηση της παραγωγής βιολασεΐνης, πραγματοποιήθηκε προσθήκη γλυκερόλης στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης της βιομάζας, όταν τα επίπεδα οξυγόνου κυμαίνονταν σε χαμηλά επίπεδα ~20 % στον (βιοαντιδραστήρας ημιδιαλείποντος έργου). Στο Σχήμα 66 απεικονίζεται η αλλαγή του χρώματος της καλλιέργειας, στους δύο βιοαντιδραστήρες με την πάροδο του χρόνου, λόγω παραγωγής της βιολασεΐνης.

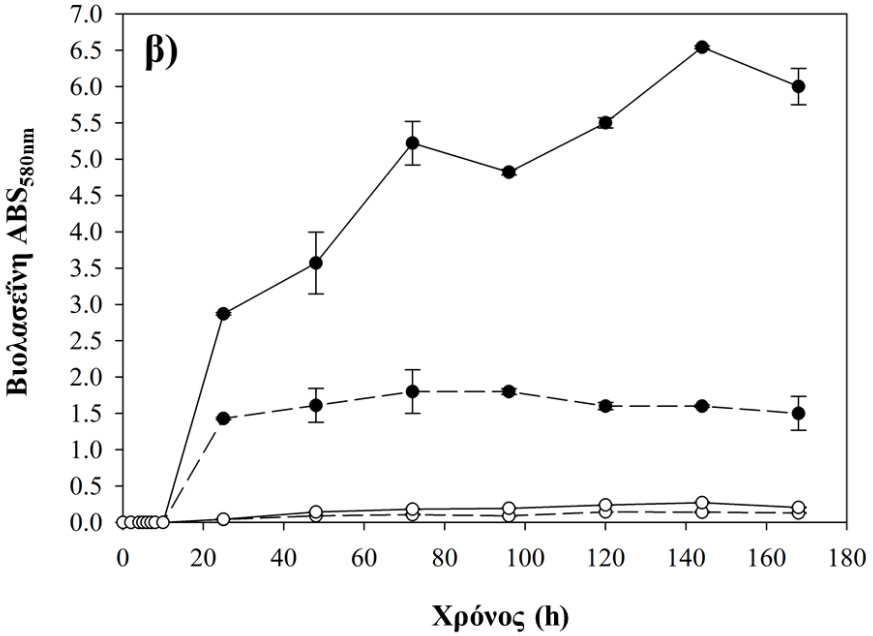


α) β) γ) δ) ε)

Σχήμα 66: Παραγωγή βιολασεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Βιοαντιδραστήρας: α) τη στιγμή του εμβολιασμού, β), γ) κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, δ) ύστερα από 5 ημέρες επώασης, ε) ύστερα από 5 ημέρες επώασης και μετά την προσθήκη γλυκερόλης κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης.

Όπως διακρίνεται στο Σχήμα 67α, η προσθήκη γλυκερόλης οδήγησε σε παραγωγή βιομάζας (3.17 g/L) σε 96 h επώασης, επιτυγχάνοντας διπλάσια αύξηση σε σύγκριση με την ζύμωση στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Ακόμη στο Σχήμα 67α παρουσιάζεται η κατανάλωση γλυκερόλης συναρτήσει του χρόνου. Η γλυκερόλη συνεχίζει να καταναλώνεται μέχρι τις 120 h. Με την προσθήκη γλυκερόλης ο λόγος C/N θεωρητικά αυξάνεται και η παραγωγή της βιολασεΐνης ως δευτερογενής μεταβολίτης ευνοείται. Η αύξηση της βιομάζας είχε σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ακατέργαστης βιολασεΐνης με συγκέντρωση 5 φορές μεγαλύτερη (1.828 g/L) στις 144 h επώασης σε σύγκριση με τον βιοαντιδραστήρα όπου δεν προστίθεται γλυκερόλη, όπως φαίνεται στο Σχήμα 67β. Ακόμη η παραγωγή βιολασεΐνης στον αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου είναι 35 % μεγαλύτερη από την παραγωγή στις φιάλες Erlenmeyer. Η βιολασεΐνη που απομονώνεται με εκχύλιση από το εσωκυτταρικό δεν είναι καθαρή, αλλά ένα μίγμα βιολασεΐνης και άλλων πιθανόν μεταβολιτών. Το εκχύλισμα που προκύπτει, βάσει του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας της καθαρής βιολασεΐνης, ύστερα από διάλυση σε αιθανόλη και φωτομέτρηση στα 575 nm, παρουσιάζει 4.5 % καθαρότητα.





Σχήμα 67: α) Συγκέντρωση βιομάζας *J. lividum* επί ξηρού (■) και κατανάλωση γλυκερόλης (♦) με το χρόνο, β) παραγωγή βιολασεΐνης με το χρόνο (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο) σε βιοαντιδραστήρα, στους 25 ^{o}C, pH 7, υπό ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού. Οι διεργασίες διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου αναπαριστώνται με διακεκομμένη και συνεχής γραμμή, αντίστοιχα.

Η βιομάζα επί ξηρής βάσης και η συγκέντρωση βιολασεΐνης σημείωσαν 2.03 και 4.97-φορές αύξηση σε σύγκριση με τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Σε προηγούμενες μελέτες η συγκέντρωση της βιολασεΐνης υπολογίζεται με φωτομέτρηση ύστερα από διάλυση σε αιθανόλη και γι' αυτό τα αποτελέσματα δεν είναι άμεσα συγκρίσιμα Ενδεικτικά, στη βιβλιογραφία αναφέρεται παραγωγή βιολασεΐνης 1.75 g/L από ανασυνδυασμένα κύτταρα *E. coli* σε βιοαντιδραστήρα 5-L ύστερα από έλεγχο του βιοσυνθετικού μονοπατιού της βιολασεΐνης (Fang et al. 2015). Η καλλιέργεια ενός ψυχρότροπου βακτηριακού στελέχους RT102 σε βιοαντιδραστήρα 3 L οδήγησε σε συγκέντρωση βιομάζας 15 g/L και βιολασεΐνης 3.5 g/L σε 30 h επώασης. Σε αυτήν την περίπτωση η βιολασεΐνη εκχυλίστηκε από το υπερκείμενο της καλλιέργειας (Nakamura et al. 2003). Επιπρόσθετα οι Lu et al. (2009) παρήγαγαν 0.8 g βιολασεΐνης ανά g βιομάζας από καλλιέργειες του στελέχους *J. lividum* XT1 ύστερα από μελέτη βελτιστοποίησης.

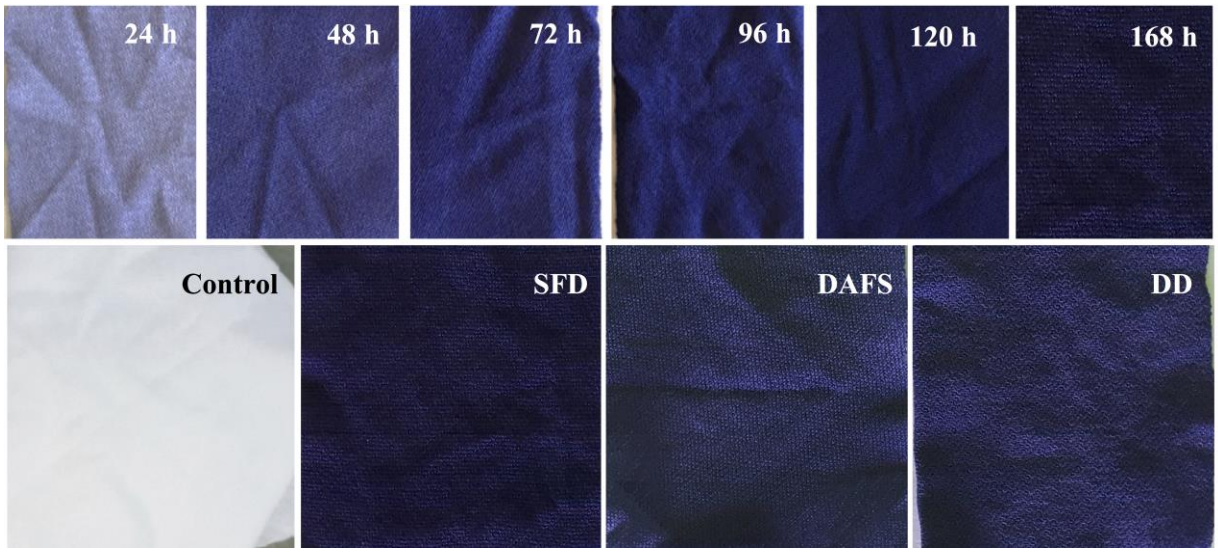
7.3 Βαφή πλεκτών PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη

Η βιολασεΐνη αποτελεί μία μικροβιακή βαφή που έχει ελεγχθεί για πολλές εφαρμογές, ακόμη και για τη βαφή διαφορετικών ειδών υφασμάτων (Choi et al. 2015b). Η μικροβιακή βαφή μεταφέρεται από το υδατικό μέσο και απορροφάται από συγκεκριμένες δραστικές ομάδες του υφάσματος. Τα πολυαμιδικά υφάσματα στην παρούσα διατριβή βάφτηκαν με βιολασεΐνη μέσω τριών διαδικασίων, των SFD, DAFS και DD (Σχήμα 68). Σε όλες τις περιπτώσεις προσδιορίστηκαν οι συντεταγμένες χρώματος οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 19**Πίνακας 19**. Οι διεργασίες βαφής DAFS και DD για 48 h προσέδωσαν στα υφάσματα διαφορά χρώματος ΔΕ 63.83 και 67.88 και ένταση χρώματος K/S 7.89 και 10.67, αντίστοιχα. Η διεργασία SFD παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα ύστερα από επώαση 4-6 ημέρες με τα ΔΕ και K/S να κυμαίνονται στα εύρη 71.72-74.81 και 16.48-22.01, αντίστοιχα. Πολυαμιδικά υφάσματα έχουν βαφτεί στη βιβλιογραφία με διάλυμα βιολασεΐνης σε οργανικούς διαλύτες ή σε αποστειρωμένο υπερκείμενο καλλιέργειας για 20 min, ωστόσο δεν δίνονται συντεταγμένες χρώματος για σύγκριση (Shirata et al. 2000).

Πίνακας 19: Συντεταγμένες χρώματος πολυαμιδικών υφασμάτων βαμμένων μέσω των διεργασιών SFD, DAFS και DD. Οι διεργασίες DAFS και DD έλαβαν χώρα για 48 h. Τα αποτελέσματα βαφής μέσω SFD παρουσιάζονται για διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Διεργασία βαφής	L	a	b	ΔE	K/S
Control	89.90	0.14	2.09		0.36
SFD	21.31	9.16	-26.39	74.81	22.01
DAFS	34.71	7.75	-29.07	63.83	7.89
DD	30.98	9.06	-30.43	67.88	10.67
Χρόνος επώασης (h)			SFD		
0	89.90	0.14	2.09	0.36	
24	60.04	3.17	-18.97	36.67	1.26
48	40.71	5.77	-24.53	56.21	4.85
72	30.34	7.71	-26.63	66.55	10.61
96	24.74	8.69	-26.63	71.72	16.48
120	23.1	8.78	-25.47	72.78	18.31
168	21.31	9.16	-26.39	74.81	22.01

Ακόμη, ανάλογα με τον χρόνο επώασης κατά τη διεργασία SFD προκύπτουν διάφορες αποχρώσεις (Σχήμα 68). Βάσει όλων των προαναφερόμενων η αξιοποίηση του *J. lividum*, μέσω της διεργασίας SFD, για την βαφή υφασμάτων αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη προοπτική, λόγω του χαμηλού περιβαλλοντικού αντίκτυπου με την αποφυγή οργανικών διαλύτων και την εφαρμογή ήπιων συνθηκών. Οι καλλιέργειες του *J. lividum* ακόμη θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν προς βαφή υφασμάτων και παράλληλη παραγωγή βιολασεΐνης. Με αυτόν τον τρόπο τα υφάσματα μπορούν να βάφονται μέσω SFD και η εκχυλισμένη βιολασεΐνη να χρησιμοποιηθεί για διαφορετικές εφαρμογές, ύστερα από περαιτέρω καθαρισμό. Τα δείγματα που βάφονται μέσω SFD είναι απαραίτητο να αποστειρώνονται και να πλένονται πριν τη χρήση, ώστε να εξουδετερώνεται το μικροβιακό φορτίο και να πληρούν τις προδιαγραφές για εφαρμογές στην κλωστοϋφαντουργία, την Βιοϊατρική κ.ά.



Σχήμα 68: α) Διαφορετικές αποχρώσεις ανάλογα με τον χρόνο επώασης βαμμένων πολυαμιδικών υφασμάτων μέσω SFD (πάνω), β) ατροποποίητο/control και τροποποιημένα πολυαμιδικά υφάσματα με SFD, DAFS και DD (κάτω).

Για τα δείγματα που βάφτηκαν μέσω SFD δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη σταθερότητα και τη χρώση στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα και στο νερό (Πίνακας 20), ενώ αποδείχθηκε αντοχή του χρωματισμού σε υγρή και ξηρή τριβή βαθμού 5. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μελέτη αντοχής βαμμένων PA υφασμάτων μέσω SFD σε φως ΧΕΝΟΝ που προσομοιάζει την ηλιακή ακτινοβολία. Τα βαμμένα υφάσματα με βιολασεΐνη απεδείχθη πως έχουν πολύ χαμολή αντοχή στο φως, καθώς ύστερα από έκθεση 165 h είχαν αποχρωματιστεί σε μεγάλο βαθμό, όπως διακρίνεται στον Πίνακα 21 και στο Σχήμα 69. Ωστόσο, η χαμηλή αντοχή στο φως δεν αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για εφαρμογές εσωτερικής χρήσης, όπως είναι οι νοσοκομιακές μάσκες.

Πίνακας 20: Αντοχή χρωματισμού στον όξινο/αλκαλικό ιδρώτα και σε οικιακή πλύση.

	C.C (αλλαγή χρώματος)	WO (μαλλί)	PAC (πολυακρι-λικό)	PES (πολυεστέ-ρας)	PA (πολυαμί-διο)	CO (βαμ-βάκι)	CA (ασε-τατ)
Όξινος ιδρώτας	5	5	5	5	5	5	5
Αλκαλικός ιδρώτας	5	5	5	5	5	5	5
Οικιακή πλύση	5	5	5	5	5	5	5

Πίνακας 21: Αποτελέσματα βαφής υφασμάτων SFD 24 h και SFD 96 h ύστερα από έκθεση σε λάμπα XENON για 165 h.

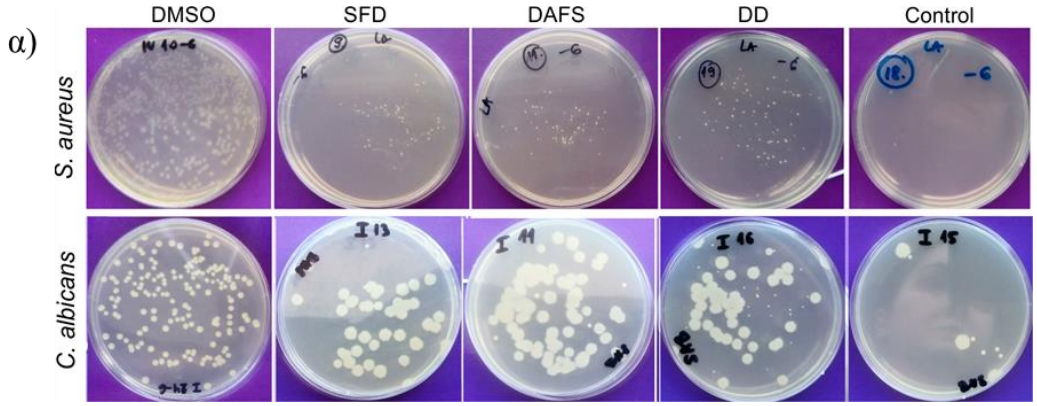
SFD	L	a	b	ΔE	K/S
Control	89.90	0.14	2.09		0.36
24 πριν	50.48	5.23	-26.65	49.05	2.6
24 μετά	70.67	0.45	-11.14	23.34	0.53
96 πριν	24,3	8.46	-25.32	71.58	16.33
96 μετά	24.74	8.69	-26.63	30.22	1.01

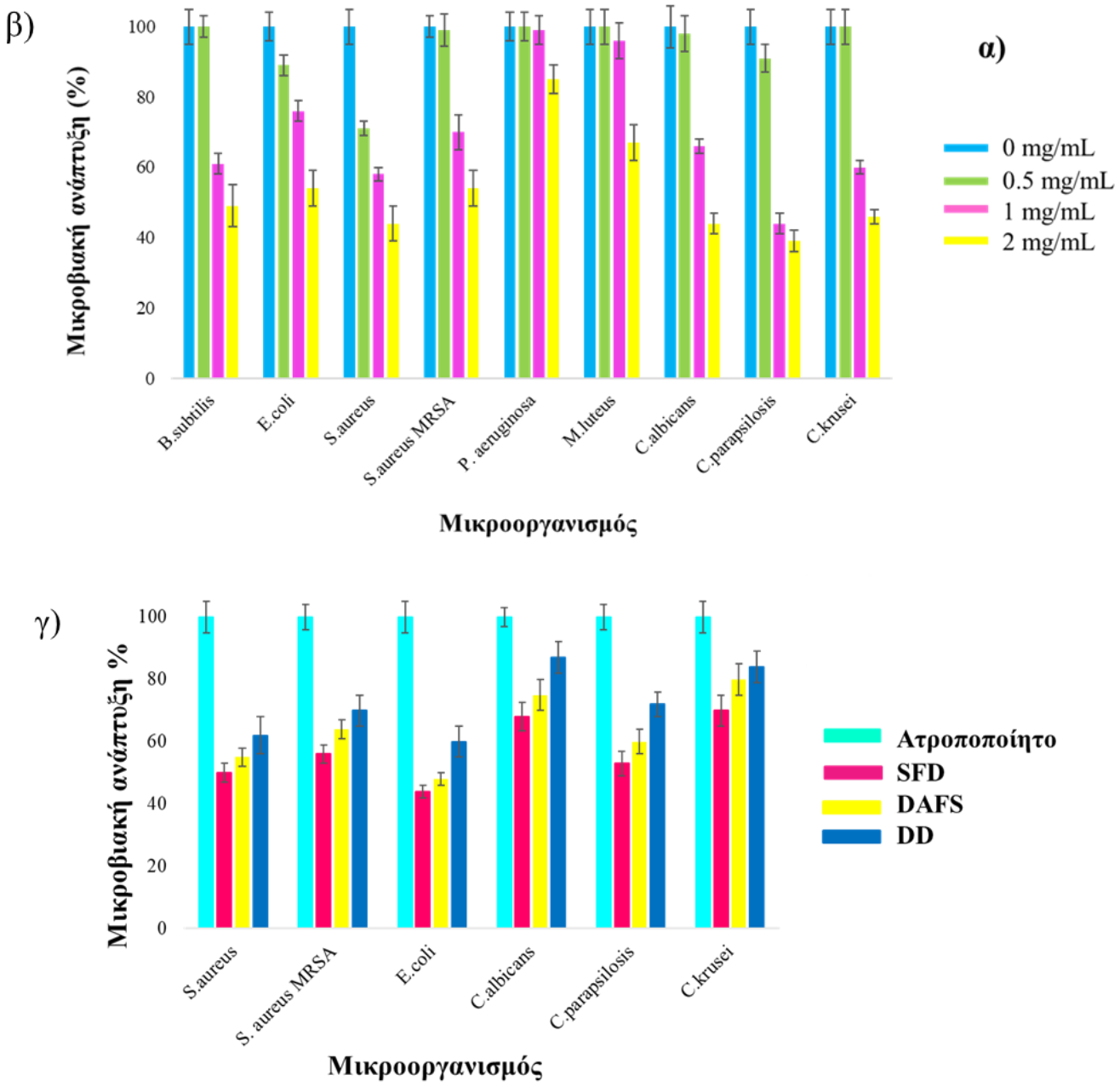
Σχήμα 69: Έκθεση βαμμένων PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη σε τεχνητό φως (XENON) για 165 h.

7.3.1 Αντιμικροβιακή ιδιότητα τροποποιημένων PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη

Ο κλάδος της κλωστοϋφαντουργίας έχει εξελιχθεί και παράγει προϊόντα με πολλά πλεονεκτήματα, όπως πρόσθετη άνεση και προστασία, βελτίωση της υγιεινής και υποστήριξης της υγειονομικής περίθαλψης, καθώς έχει δείξει μεγάλο ενδιαφέρον για την κατασκευή έξυπνων πολυλειτουργικών υφασμάτων με προσανατολισμό για ιατρικές εφαρμογές (Carosio and Monero 2004; Marques et al. 2014; Armstrong et al. 2017). Πιο συγκεκριμένα, η κλωστοϋφαντουργική βιομηχανία έχει δείξει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την κατασκευή υφασμάτων ανθεκτικών ενάντια σε συγκεκριμένους επιβλαβείς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των υπερβακτηρίων, ένα αναδυόμενο πρόβλημα της σύγχρονης εποχής. Στην παρούσα διατριβή ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση της ακατέργαστης εκχυλισμένης βιολασεΐνης από τον *J. lividum* ενάντια στα παθογόνα βακτηριακά στελέχη Gram αρνητικά *P. aeruginosa* και *E. coli*,

στα Gram θετικά *S aureus, S aureus* MRSA, *M. luteus* και *B. subtilis*, όπως επίσης και ενάντια στους μύκητες *C. albicans, C. krusei* και *C. parapsilosis* (Σχήμα 70α). Στη βιβλιογραφία η ελάχιστη παρεμποδιστική συγκέντρωση καθαρής βιολασεΐνης που αναφέρεται κυμαίνεται από 2 μg/mL έως 50 μg/mL, που είναι σε συμφωνία με τις συγκεντρώσεις ακατέργαστης βιολασεΐνης που δοκιμάστηκαν σε αυτήν την διατριβή, καθώς έχει υπολογιστεί πως το ποσοστό καθαρής βιολασεΐνης είναι περίπου 5 %. Η εξεταζόμενη μικροβιακή βαφή παρεμπόδισε την ανάπτυξη των επικίνδυνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών κατά 15 % έως 60 % σε συγκέντρωση of 2 mg/L ακατέργαστης βιολασεΐνης. Από την άλλη η ανάπτυξη του *S. aureus* παρεμποδίστηκε κατά 30 % ακόμη και για συγκέντρωση βιολασεΐνης 0.5 mg/L. Ο μικροοργανισμός που επηρεάστηκε λιγότερο ήταν ο *P. aeruginosa* PAO-1. Ο μύκητας *C. parapsilosis* αποδείχθη ο πιο ευαίσθητος μεταξύ των μυκητιακών στελεχών με παρεμπόδιση ανάπτυξης 55 % και 10 % για συγκεντρώσεις 1 mg/L και 0.5 mg/L, αντίστοιχα. Τα τρία *Candida* στελέχη, όπως επίσης και τα βακτήρια *S. Aureus, S aureus* MRSA, και *E. coli* χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των βαμμένων πολυαμιδικών υφασμάτων με βιολασεΐνη μέσω των τριών διαδικασιών SFD, DAFS και DD. (Σχήμα 70β). Τα τροποποιημένα υφάσματα παρεμπόδισαν την μικροβιακή ανάπτυξη από 10 % έως 55 %, ανάλογα με το στέλεχος και την διαδικασία βαφής. Ακόμη, τα πολυαμιδικά τροποποιημένα υφάσματα παρουσίασαν και αντιμικροβιακή δράση κατά του στελέχους *S. aureus* MRSA, το οποίο αποτελεί υπερβακτήριο και προσβάλλει συνήθως ασθενείς σε νοσκομειακές εγκαταστάσεις. Αντιθέτως, δεν παρουσιάστηκε παρεμποδιστική δράση κατά των *L. monocytogenes* και *E. fecalis*. Καταληκτικά, τα πολυαμιδικά υφάσματα που βάφτηκαν μέσω SFD παρουσίασαν την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση, ενώ η προσέγγιση DD έδωσε υφάσματα με την χαμηλότερη αντιμικροβιακή δραστικότητα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα έντασης χρώματος, όπως φαίνονται και στο Σχήμα 68.



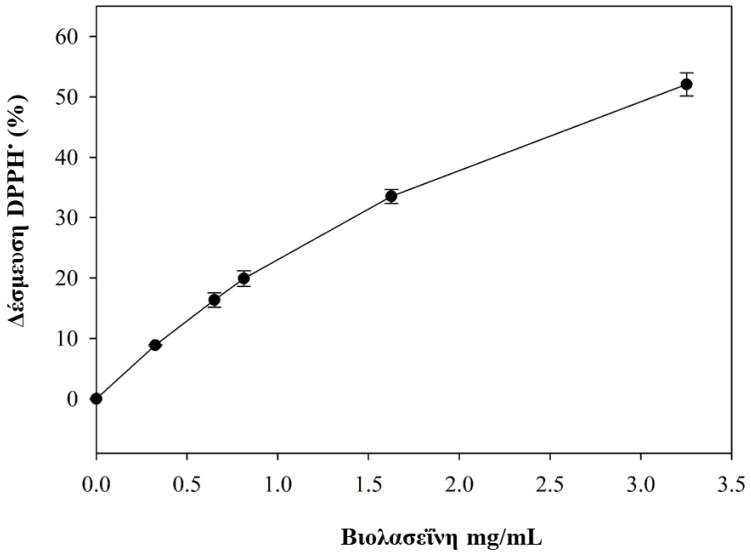


Σχήμα 70: α) Σχηματισμός αποικιών (CFU), ύστερα από έκθεση των καλλιεργειών *S. aureus* και *C. albicans* σε DMSO, σε αποστειρωμένο control ύφασμα και σε βαμμένα υφάσματα PA 6.6 μέσω SFS, DAFS, DD, β) Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμένης βιολασεΐνης, γ) Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από PA υφάσματα ατροποποίητα ή βαμμένα με SFD, DAFS και DD.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα υφάσματα μπορούν να αποκτήσουν αντιμικροβιακή ιδιότητα μέσω πρόσδεσης φαινολικών ενώσεων, παραγώγων φορμαλδεΰδης κ. ά. επί της επιφάνειας, ωστόσο η τοξικότητα και μη βιοαποικοδομησιμότητα αυτών των ενώσεων τις καθιστούν ακατάλληλες προς χρήση (Gupta and Bhaumik, 2007; Iyigundogdu et al., 2017). Η βιολασεΐνη και άλλες μικροβιακές βαφές έχουν μελετηθεί για εφαρμογή στην κλωστοϋφαντουργία, καθώς δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον και το υδάτινο οικοσύστημα και προσδίδουν αντιμικροβιακές ιδιότητες στο τελικό προϊόν (Yusuf et al. 2017). Η βιολασεΐνη έχει παρουσιάσει αντιβακτηριακή ιδιότητα ενάντια σε μικροοργανισμούς, όπως είναι οι *S. aureus, B. licheniformis, B. subtilis, Bacillus megaterium* και *P. aeruginosa,* όπως επίσης και αντιμυκητιακή ιδιότητα ενάντια στους *Colletotrichum demantium, F. solani f. sp. mori, Bipolaris leersiae a.o.* (Shirata et al. 2000; Nakamura et al. 2003; Cazoto et al. 2011; Martins et al. 2011). Τα SFD υφάσματα αναχαίτησαν την ανάπτυξη των *S. aureus* και *S. aureus* MRSA κατά 50 % και 44 %, σε σύγκριση με την παρεμπόδιση που προκάλεσε κατά 56 % και 46 % τα 2 mg mL^{-1} εκχυλίσματος που περιέχουν βιολασεΐνη. Ωστόσο, στην περίπτωση των *E. coli* και των στελεχών *Candida* τα υφάσματα παρουσίασαν χαμηλότερη παρεμποδιστική δράση σε σχέση με τα 2 mg mL^{-1} εκχυλίσματος. Στη βιβλιογραφία δεν γίνεται αναφορά σε αντιμικροβιακούς ελέγχους υφασμάτων που να έχουν βαφτεί με βιολασεΐνη. Μία ερευνητική ομάδα παρήγαγε αντιμιρκοβιακά PA 6.6 υφάσματα με επικάλυψη νανοσωματιδίων σιδήρου (AgNPs), ύστερα από προκατεργασία με πλάσμα. Τα επικαλυμμένα υφάσματα με 20 και 100 nm διαμέτρου AgNPs παρουσίασαν 100 % και 20 % παρεμπόδιση της ανάπτυξης του *E. coli* και 82 % και 19 % έναντι του *S. aureus* (Zille et al., 2015). Η χρήση νανοσωματιδίων για επικάλυψη υφασμάτων και πρόσδωση αντιμικροβιακών ιδιοτήτων περιγράφεται εκτενώς στη βιλιογραφία (Palza and Humberto, 2015), ωστόσο στην παρούσα διατριβή προτείνεται μια φιλικότερη προς το περιβάλλον διαδικασία. Βαμβακερά υφάσματα επικαλυμμένα με χιτοσάνη παρουσίασαν 76-96 % παρεμποδιστική δράση κατά του *S. aureus* και 72-94 % κατά του *E. coli* (Rahman Bhuiyan et al., 2017). Μία ακόμη μελέτη περιλαμβάνει την αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης βαμβακερών υφασμάτων μέσω επικάλυψης με φυτικά νανοσωματίδια από το φυτό Azadirachta (Subramani et al., 2017).

7.3.2 Αντιοξειδωτική ιδιότητα PA 6.6 υφασμάτων τροποποιημένων με βιολασεΐνη

Όσον αφορά τα υφάσματα τα οποία προορίζονται για ιατρικές εφαρμογές είναι σημαντικό να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες μαζί με το αντιμικροβιακό τους προφίλ, ειδικά στην περίπτωση των υφασμάτων που προορίζονται για καλλυντική χρήση και αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως 'cosmetotextiles' (Zemljič et al. 2014). Τα cosmetotextiles προκύπτουν μέσω της διεργασίας του μικροεγκλεισμού κάποιας καλλυντικής ουσίας σε ένα ύφασμα, η οποία ουσία απελευθερώνεται με έναν συγκεκριμένο ρυθμό. Τα αντιοξειδωτικά είναι φυσικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τη ρύθμιση διαδικασιών που προκαλούνται από εξωτερικά ερεθίσματα, αποτρέποντας έτσι το οξειδωτικό στρες. Η βιολασεΐνη διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες, γεγονός που εξηγείται στη βιβλιογραφία βάσει της θεωρίας συναρτησιοειδούς πυκνότητας (density functional theory) (Cao et al. 2007). Εν συντομία εκτιμήθηκε πως ένας δεδομένος δεσμός N-H της δομής της βιολασεΐνης διαθέτει ενέργεια διάσπασης δεσμού (bond dissociation energy, BDE) ελαφρώς χαμηλότερη από εκείνη του δεσμού N–H στην ένωση DPPH-H, και για αυτό το λόγο η βιολασεΐνη μπορεί να δεσμεύσει ρίζες DPPH. Στη βιβλιογραφία η αντιοξειδωτική ιδιότητα καθαρής βιολασεΐνης έχει μελετηθεί μέσω αντίδρασης με ρίζες DPPH, με νιτρικό οξύ, και με ρίζες υπεροξειδίου. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα βαμμένων υφασμάτων με βιολασεΐνη μέσω της μεθόδου ριζών DPPH. Αρχικά εξετάστηκε η δυνατότητα δέσμευσης ριζών DPPH της ακατέργαστης βιολασεΐνης (Σχήμα 71), όπου βρέθηκε πως 50 % δέσμευση σημειώνεται (IC_{50}) για συγκέντρωση ακατέργαστης βιολασεΐνης 0.16 mg/mL, ενώ η δέσμευση αυτή στην πραγματικότητα οφείλεται και σε άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες με αντιοξειδωτική συμπεριφορά.



Σχήμα 71: Δέσμευση DPPH• από ακατέργαστη βιολασεΐνη.

Στη βιβλιογραφία όταν η βιολασεΐνη προστέθηκε σε 200 μM DPPH και επωάστηκε για 1 h στους 37 ^{o}C βρέθηκε πως η τιμή IC_{50} είναι ίση με 0.087 mg/mL (30 μM), 1.8 φορές μικρότερη από την ακατέργαστη, όπως και αναμενόταν (Konzen et al. 2006). Στη συνέχεια εξετάστηκε η δυνατότητα δέσμευσης ριζών DPPH από βαμμένα υφάσματα μέσω διαδικασίας SFD, DAFS και DD (Πίνακας 22).

Πίνακας 22: Δέσμευση DPPH• από βαμμένα υφάσματα μέσω διαδικασίας SFD, DAFS και DD.

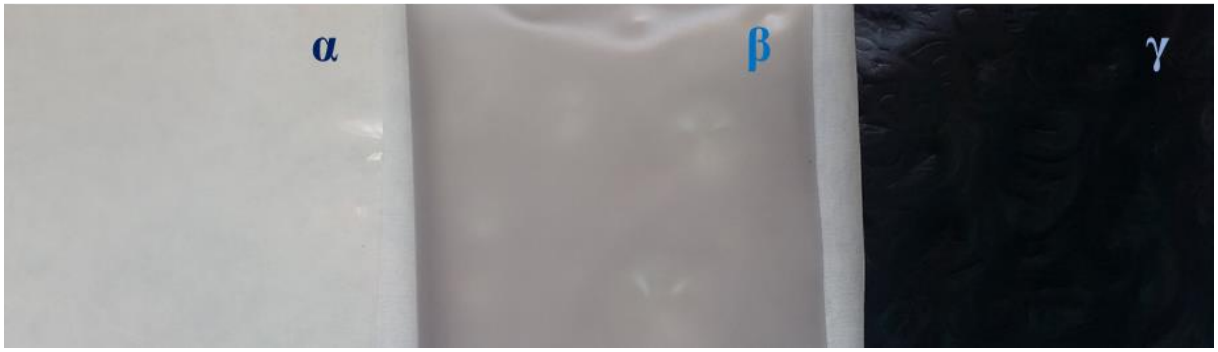
	Δείγμα	Αντιοξειδωτική δράση
PA 6.6	Control	0±0.10 %
	SFD 24 h	10±0.11 %
	SFD 48 h	12±1.13 %
	SFD 168 h	12±1.07 %
	DAFS 48 h	8±0.12 %
	DD 48 h	14±1.9 %

Η αντιοξειδωτική ικανότητα βαμμένων υφασμάτων με βιολασεΐνη δεν έχει εξετασθεί στο παρελθόν, οπότε η άμεση σύγκριση με την βιβλιογραφία δεν είναι δυνατή. Ενδεικτικά, η επεξεργασία βαμβακερών υφασμάτων με εκχύλισμα gallnut οδήγησε σε 100 % δέσμευση ριζών DPPH (Hong, 2014). Αντιθέτως, η επικάλυψη βαμβακερών υφασμάτων με χιτοσάνη που

περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες από το Viola Tricolor δεν παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση (Mocanu et al., 2013).

7.4 Τροποποίηση φύλλων PLA με βιολασεΐνη

Επιπρόσθετα με στόχο την εφαρμογή και αξιοποίηση των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων της βιολασεΐνης πραγματοποιήθηκε δοκιμή παραγωγής φύλλων ημικρυσταλλικού PLA με την τεχνική της επίστρωσης. Τέτοια φύλλα, φιλμ ή μεμβράνες από PLA θα μπορούσαν να βρουν εφαρμογή στις συσκευασίες τροφίμων και καλλυντικών, εφόσον διατηρούν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, εξαιτίας του συστατικού της βιολασεΐνης. Ωστόσο για τις εφαρμογές που αναφέρθηκαν θα πρέπει να προηγηθούν οι κατάλληλοι έλεγχοι τοξικότητας. Στο Σχήμα 72 που ακολουθεί παρουσιάζονται τα PLA φύλλα, όπως αυτά προέκυψαν με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος και ακολούθως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μελετών αντιμικροβιακής και αντιοξειδωτικής δράσης.

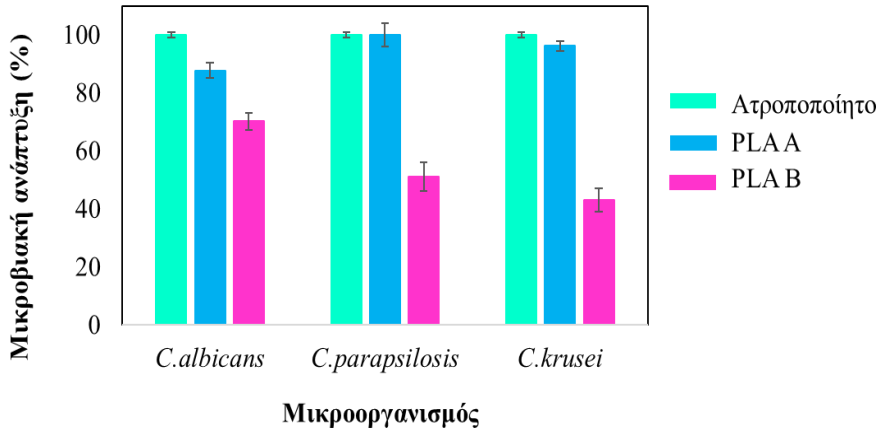


Σχήμα 72: α) Ατροποποίητο/control, β) τροποποιημένο PLA A, γ) τροποποιημένο PLA B, όπου PLA A=(0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B=(0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη.

7.4.1 Αντιμικροβιακή ιδιότητα τροποποιημένων φύλλων PLA με βιολασεΐνη

Στο Σχήμα 73 παρουσιάζονται οι αντιμυκητιακές ιδιότητες φύλλων ατροποποίητου PLA, PLA A και PLA B. Γίνεται φανερό πως η περιεκτικότητα του PLA A δεν επαρκεί ώστε να παρουσιάσει αντιμικροβιακή δράση, ενώ η περιεκτικότητα του PLA B οδηγεί σε 30-55 % παρεμπόδιση της μικροβιακής ανάπτυξης. Στη βιβλιογραφία δεν έχει δοκιμαστεί από άλλους ερευνητές η χύτευση PLA με βιολασεΐνη, ώστε να μελετηθεί στη συνέχεια η αντιμικροβιακή συμπεριφορά τους. Ωστόσο, έχουν συντεθεί συμπολυμερή νανοσωματίδια πολυ(D,L-λακτιδίου-γλυκολιδίου) (lactide-co-glycolide) στα οποία έχει εγκλειστεί βιολασεΐνη και τα οποία έχουν

παρουσιάσει αντιβακτηριακή δράση κατά του *S. aureus*, ενώ δεν επέδειξαν σημαντική δράση κατά των στελεχών *E. coli* και *Salmonella enterica* (Martins et al. 2011).



Σχήμα 73: Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από ατροποποίητο PLA και τροποποιημένο PLA A ή PLA B. όπου PLA A= (0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B= (0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη.

7.4.2 Αντιοξειδωτική ιδιότητα τροποποιημένων φύλλων PLA με βιολασεΐνη

Όπως προαναφέρθηκε δεν έχει πραγματοποιηθεί στην βιβλιογραφία επίστρωση PLA με βιολασεΐνη με αποτέλεσμα να μην έχουν μελετηθεί οι αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες παρόμοιων προϊόντων. Στον Πίνακα 23 παρουσιάζεται η αντιοξειδωτική δράση των φύλλων PLA μέσω δέσμευσης ριζών DPPH.

Πίνακας 23: Δέσμευση DPPH• από τροποποιημένα φύλλα PLA με βιολασεΐνη. όπου PLA A=(0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B=(0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη.

	Δείγμα	Αντιοξειδωτική δράση
PLA	Control	10±0.1 %
	A	15±1.1 %
	B	56±3.9 %

8 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν φυσικές μακρομοριακές ενώσεις με σημαντικές ιδιότητες, όπως η αμφιφιλική τους φύση, η μη τοξικότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα και συναντώνται στα περισσότερα αγροτικά προϊόντα και υπολείμματα. Οι πολυσακχαρίτες, λόγω των ιδιαίτερων ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται ως παράγοντες πηκτωματοποίησης, σταθεροποιητές, κροκιδωτικά, ως υλικά εγκλεισμού/ ενθυλάκωσης σε διάφορες εφαρμογές, όπως στα τρόφιμα, σε προϊόντα χάρτου, συγκόλλησης, σε φάρμακα, σε επιθέματα, σε συστήματα μεταφοράς ουσιών και άλλες εφαρμογές. Για πολλές από τις εν λόγω εφαρμογές, οι πολυσακχαρίτες χρειάζονται δομικές τροποποιήσεις ώστε να βελτιωθούν ή να αλλάξουν οι ιδιότητές τους. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά η ενζυμική ακυλίωση μαννο-πολυσακχαριτών και της β-γλυκάνης σε διφασικό σύστημα νερού/βινυλεστέρα, αφήνοντας πίσω την συνήθη διεργασία εστεροποίησης σε οργανικό διαλύτη που συναντάται κατά κόρον στη βιβλιογραφία. Το σύστημα αυτό διασφαλίζει την καταλυτική δράση του ενζύμου και είναι φιλικότερο προς το περιβάλλον. Για τον σκοπό αυτό έγινε χρήση μίας εστεράσης του οξικού οξέος της οικογένειας CE2 από τον *C. thermocellum,* η τοποεκλεκτικότητα της οποίας αξιολογήθηκε και επιβεβαιώθηκε.

8.1 Ενζυμική μετεστεροποίηση αναγωγικών σακχάρων

Αρχικά μελετήθηκε η δυνατότητα εστεροποίησης της εστεράσης του οξικού οξέος *Ct*CE2 σε μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες αλδοεξοζών, ως απλά και οικονομικά μοντέλα υποστρώματα προκειμένου να μελετηθεί η συμπεριφορά του ενζύμου και οι συνθήκες τις αντίδρασης σε διφασικό σύστημα νερού/βινυλεστέρα.

8.1.1 Βελτιστοποίηση προπυλίωσης της D-μαννόζης

Προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες ακυλίωσης σε διφασικό σύστημα με την εστεράση του οξικού οξέος *Ct*CE2 η μελέτη αρχικά επικεντρώθηκε στην αλδοεξόζη D-μαννόζη (Man) με χρήση του προπιονικού βινυλεστέρα ως δότη ακυλομάδας. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν για τη σύνθεση της προπυλιωμένης μαννόζης είναι η θερμοκρασία, η αναλογία υδατικής φάσης-βινυλεστέρα, η ανάδευση και η ενζυμική συγκέντρωση (Πίνακας 24). Όλα τα αποτελέσματα προέκυψαν με ανάλυση HPLC. Για το συγκεκριμένο σύστημα η θερμοκρασία έπαιξε τον πιο καθοριστικό ρόλο, καθώς πάνω από τους 50 ^{o}C το ένζυμο φαίνεται να

απενεργοποιείται. Η αναλογία νερού:βινυλεστέρα επηρέασε την απόδοση μετατροπής με καλύτερα αποτελέσματα για αναλογία 80:20, που συμφωνεί με την βιβλιογραφία (Kremnický et al. 2004; Kremnický and Biely 2005). Επιπρόσθετα η ανάδευση δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα, εκτός της περίπτωσης μη ανάδευσης του συστήματος, ενώ η συγκέντρωση του ενζύμου παίζει σημαντικό ρόλο στο ρυθμό της αντίδρασης, όπως αναμένεται. Η αντίδραση φαίνεται να φτάνει σε ισορροπία τις πρώτες 24 h, στους 30 ^{o}C, με συγκέντρωση ενζύμου 0.1 mg/mL, καθώς δεύτερη ισόποση προσθήκη ενζύμου δεν οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης της ακυλίωσης.

Πίνακας 24: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της προπυλίωσης της μαννόζης (Man). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι η θερμοκρασία, η αναλογία υδατικής φάσης-βινυλεστέρα, η ανάδευση και η ενζυμική συγκέντρωση.

Συνθήκες	***Υδατική φάση/βινυλεστέρας***	Σχετική ενεργότητα σύνθεσης (%)
30 ^{o}C, 1000 rpm, 1 h, 0.1 mg/mL	90:10	42
	80:20	60
	70:30	51
30 ^{o}C, 1 h, 0.1 mg/mL 80:20	***rpm***	Σχετική ενεργότητα σύνθεσης (%)
	0	46
	500	54
	1000	60
1 h, 1000 rpm 0.1 mg/mL 80:20	***Θερμοκρασία (^{o}C)***	Σχετική ενεργότητα σύνθεσης (%)
	20	50
	30	60
	40	57
	50	38
	60	27

		Ενζυμικό φορτίο (mg/mL)			
	χρόνος (h)	0.02	0.05	0.1	0.2
		Σχετική ενεργότητα σύνθεσης (%)			
30 ^{o}C, 1000 rpm, 80:20	0.25	20	36	36	41
	0.5	24	39	48	43
	1	30	40	57	56
	4	45	68	79	77
	24	67	86	100	100
	48*	-	-	100	-

*2η προσθήκη ενζύμου ύστερα από 24 h αντίδρασης.

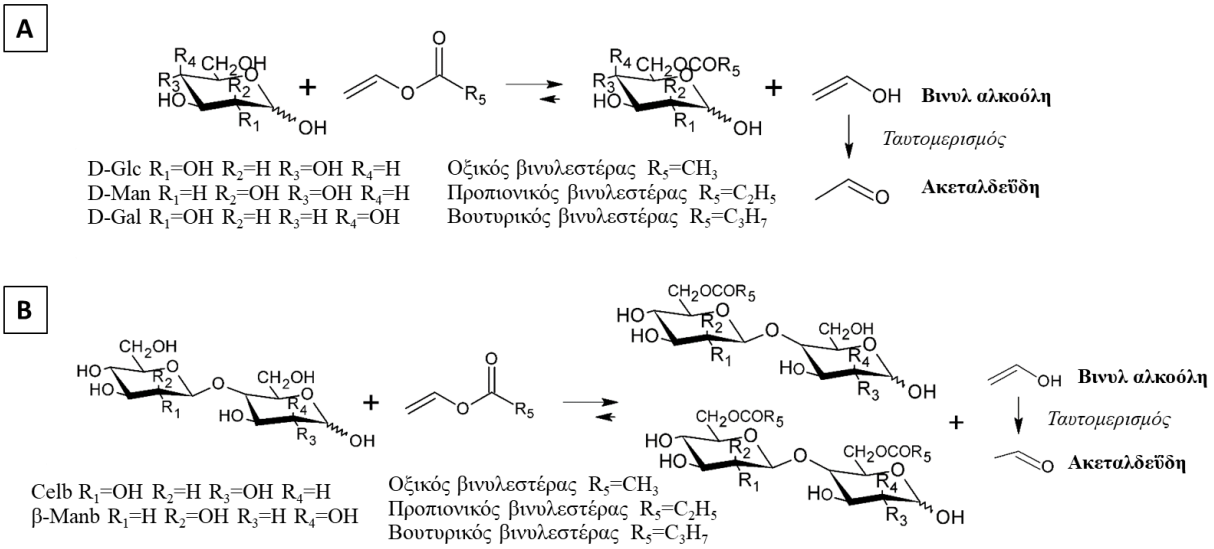
Τελικά έγινε επιλογή των παρακάτω συνθηκών και την διεξαγωγή όλων των υπόλοιπων αντιδράσεων μετεστεροποίησης με την εστεράση *Ct*CE2 ως βιοκαταλύτη: θερμοκρασία 30 ºC, αναλογία νερό:βινυλεστέρας 80:20, ανάδευση 900 rpm, ενζυμικό φορτίο 0.1 mg/mL.

8.1.2 Χρωματογραφική ανάλυση μετεστεροποιημένων σακχάρων

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η μετεστεροποίηση των υπό μελέτη αλδοεξόζων εφαρμόστηκαν δύο χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης γρήγορου και αποτελεσματικού ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού των ακυλιωμένων προϊόντων. Με την ανάλυση TLC λαμβάνει χώρα διαχωρισμός λόγω πολικότητας των προϊόντων εστεροποίησης από τα μη ακυλιωμένα σάκχαρα, ενώ με την ανάλυση HPLC γίνεται ποστικοποίηση των αλδοεξόζων πριν και μετά την ακυλίωση.

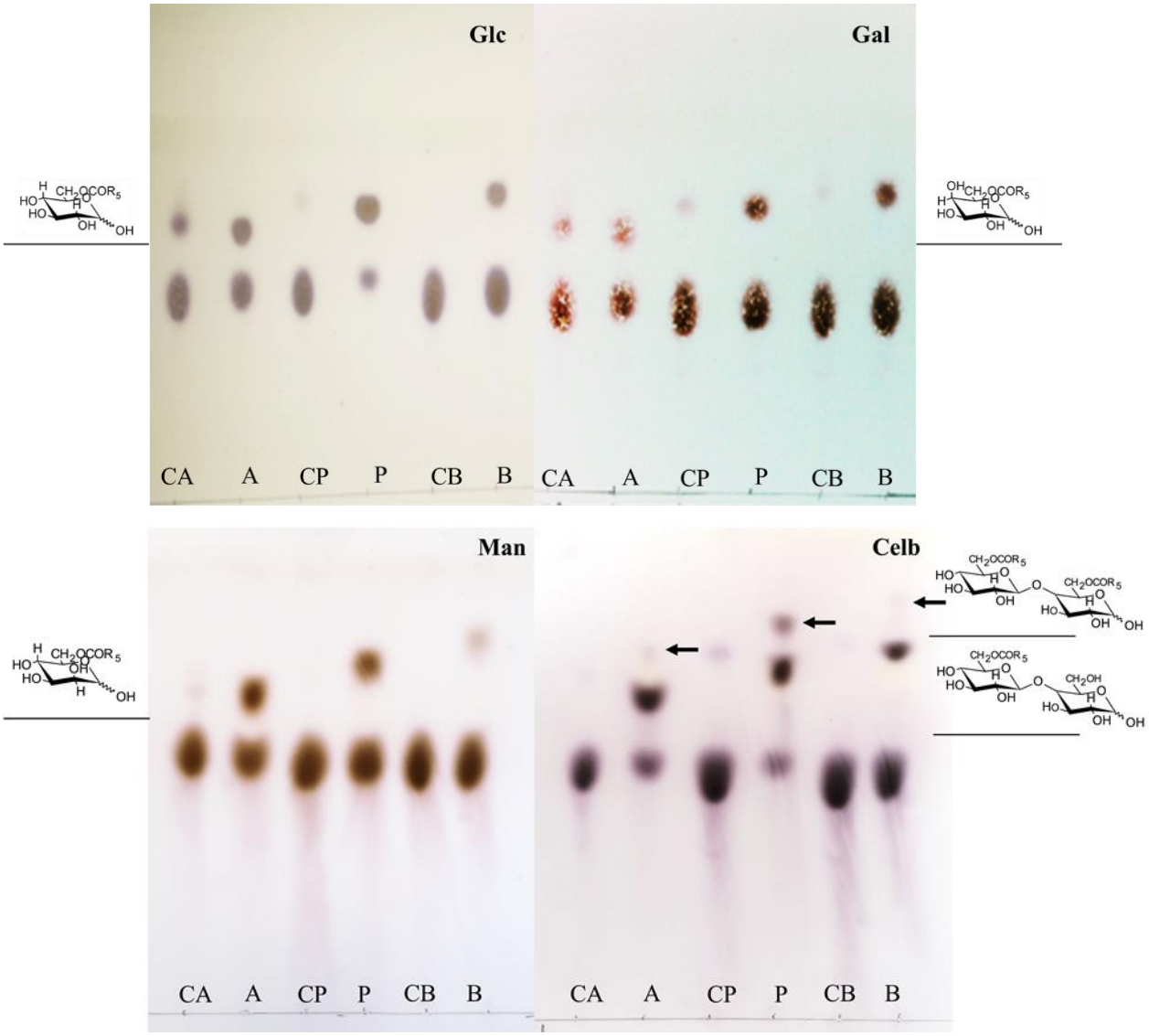
8.1.2.1 Ανάλυση TLC

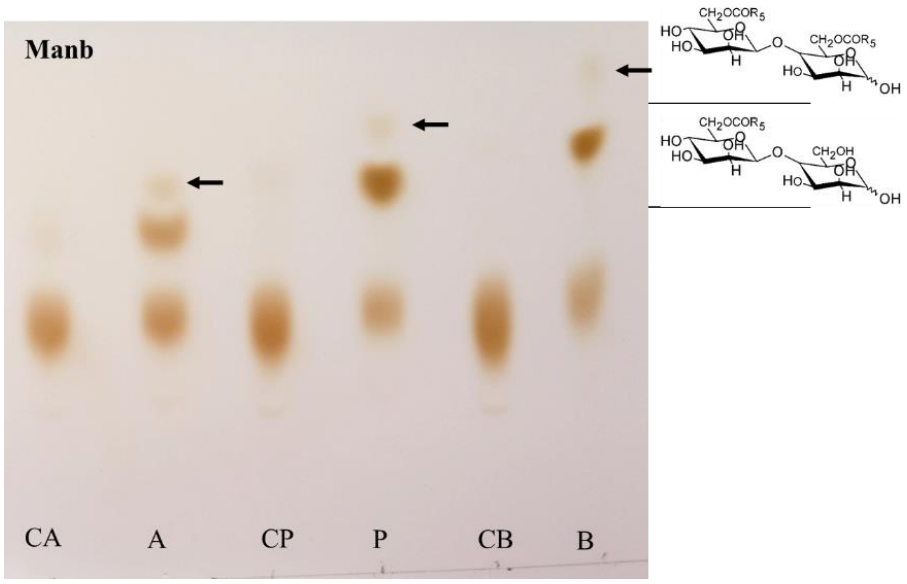
Οι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες ακυλιώθηκαν με χρήση βινυλέστερων ως δότες ακυλομάδων. Οι βινυλεστέρες χρησιμοποιούνται συχνά στις αντιδράσεις εστεροποίησης, λόγω της αντίδρασης ταυτομερισμού του παραπροϊόντος της βινυλ-αλκοόλης που μετατρέπεται σε ακεταλδεΰδη, καθιστώντας την αντίδραση αναντίστρεπτη (Degueil-Castaing et al. 1987). Η αντίδραση αυτή των υπό μελέτη αλδοεξοζών παρουσιάζεται στο Σχήμα 74.



Σχήμα 74: Σχηματική απεικόνηση της μετεστεροποίησης των μονοσακχαριτών D-Glc, D-Man, D-Gal και των δισακχαριτών Celb και β-Manb.

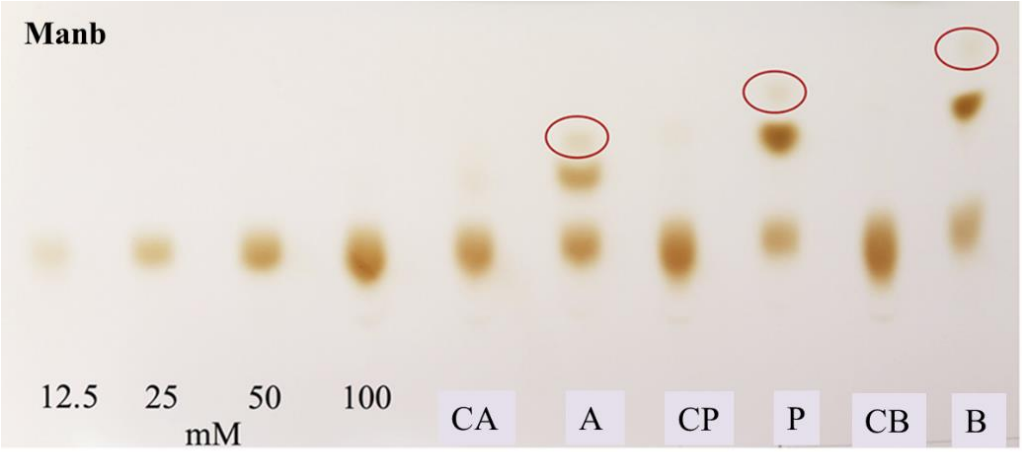
Η ποιοτική ανίχνευση των ενζυμικά ακυλιωμένων σακχάρων πραγματοποιήθηκε με TLC. Ενδεικτικά, στο Σχήμα 75 παρατίθενται τα χρωματογραφήματα λεπτής στιβάδας των ακυλιωμένων μονοσακχαριτών Glc, Man, Gal, Ara, Xyl και δισακχαριτών Celb, β-Manb. Στα δείγματα ελέγχου, όπου δεν είχε προστεθεί ένζυμο, διακρίνονται μόνο τα μη ακυλιωμένα σάκχαρα, ενώ στα δείγματα των αντιδράσεων μετεστεροποίησης τα ακυλιωμένα προϊόντα εμφανίζονται ψηλότερα στο γράφημα λόγω πιο γρήγορης έκλουσης, ως πιο άπολα μόρια σε σχέση με τον πολικό διαλύτη έκλουσης.

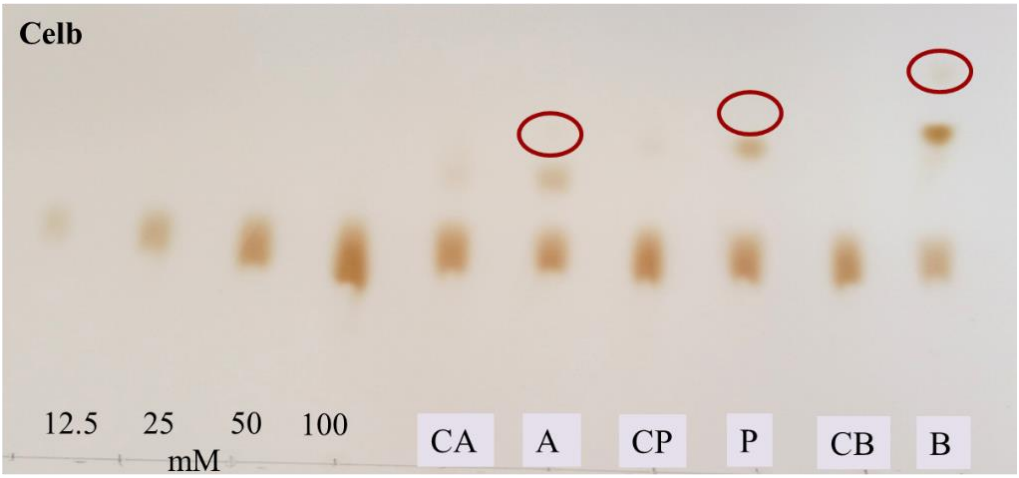




Σχήμα 75: Αποτελέσματα TLC των αντιδράσεων μετεστεροποίησης των Glc, Gal, Man, Celb, Manb με οξικό βινυλεστέρα (A), προπιονικό βινυλεστέρα (P) και βουτυρικό βινυλεστέρα (B), καταλυόμενες από την εστεράση CtCE2 και διαλύτη έκλουσης 1-βουτανόλη:αιθανόλη:νερό 10:8:6 (v/v/v). Οι αντιδράσεις ελέγχου συμβολίζονται ως CA, CP και CB, αντίστοιχα. Με βελάκια υποδεικνύονται τα διακυλιωμένα προϊόντα.

Η ακυλίωση των δισακχαριτών Celb και β-Manb με τους ακετυλ, προπυλ και βουτυλ δότες είχε σαν αποτέλεσμα την σύνθεση δυο ακυλιωμένων προϊόντων, ένα μονο-υποκατεστημένο και ένα δι-υποκατεστημένο, με προτίμηση στη μονο-υποκατάσταση βάσει της ημιποσοτικής ανάλυσης TLC με βαφή των χρωματογραφημάτων με ανιλίνη (Σχήμα 76) και ακολούθησε ολοκλήρωση των υπό ανάλυση ουσιών μέσω του λογισμικού TLC Gene Tools v3.06. (Syngene).





Σχήμα 76: Αποτελέσματα TLC των αντιδράσεων μετεστεροποίησης των Manb και Celb με οξικό βινυλεστέρα (A), προπιονικό βινυλεστέρα (P) και βουτυρικό βινυλεστέρα (B), καταλυόμενες από την εστεράση CtCE2 και διαλύτη έκλουσης 1-βουτανόλη:αιθανόλη:νερό 10:8:6 (v/v/v). Τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με διάλυμα ανιλίνης με στόχο τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των υπό ανάλυση ουσιών. Οι αντιδράσεις ελέγχου συμβολίζονται ως CA, CP και CB, αντίστοιχα, και παρατίθενται τέσσερις συγκεντρώσεις πρότυπου δισακχαρίτη προς σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς. Με κυκλάκια υποδεικνύονται τα διακυλιωμένα προϊόντα.

Ο σχηματισμός των δι-ακυλιωμένων δισακχαριτών πιθανόν να παρεμποδίζεται στερεοχημικά, λόγω της προσθήκης μιας ακυλομάδας είτε στο αναγωγικό είτε στη μη αναγωγική μονάδα του δισακχαρίτη. Η ημιποσοτική ανάλυση TLC προφέρει τη δυνατότητα εκτίμησης των αποδόσεων μετατροπής με ικανοποιητική αξιοπιστία και είναι κατάλληλη για τη σάρωση (screening) πολλών αντιδράσεων ακυλίωσης παράλληλα. Όπως έχει αναφερθεί και στη βιβλιογραφία δεν υφίσταται γραμμική σχέση μεταξύ της πυκνότητας του σποτ ενός σακχάρου και της συγκέντρωσης του σακχάρου, γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες αραιώσεις για ορθή εκτίμηση της ποσότητας των ακυλιωμένων προϊόντων (Biely et al. 2003). Οι δισακχαρίτες Celb και β-Manb ακυλιώθηκαν σε ποσοστό μεταξύ των τιμών 21-67 %, όπως φαίνεται στον Πίνακας 25 με τις τιμές μέσα σε παρένθεση.

Η Celb παρουσίασε ισχυρή προτίμηση προς την μονο-ακυλίωση έναντι της δι-ακυλίωσης, ωστόσο η ανάλυση MS που περιγράφεται παρακάτων απέδειξε την παρουσία διακυλιωμένης Celb, έστω και σε ίχνη. Συγκριτικά, στην περίπτωση της β-Manb, οι λόγοι των μονοακυλιωμένων προϊόντων έναντι των διακυλιωμένων ήταν 2.8, 3.1 και 2.7 για τους δότες ακετυλομάδας, προπυλομάδας και βουτυλομάδας, αντίστοιχα. Η ακετυλίωση των Celb και β-

Manb μεταξύ άλλων ολιγοσακχαριτών έχει μελετηθεί στο παρελθόν, με χρήση της εστεράσης του οξικού *T. reesei* RUT C-30 (0.75 U/mL) σε διφασικό σύστημα νερού-οξικού βινυλεστέρα (Kremnický and Biely 2005). Σε αυτήν την μελέτη οι ολιγοσακχαρίτες κυρίως μονοακετυλιώθηκαν, ωστόσο το ένζυμο έδειξε προτίμηση στη *O*-3 θέση της μη αναγωγικής μονάδας των γλυκο-, ξυλο- και μαννο-ολιγοσακχαριτών και μικρότερη προτίμηση στη *O*-2 θέση της αναγωγικής μονάδας των γλυκο- και ξυλο-ολιγοσακχαριτών (Kremnický and Biely 2005).

8.1.3 Ανάλυση HPLC

Η ποσοτικοποίηση των ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών έλαβε χώρα με ανάλυση HPLC. Οι μονοσακχαρίτες ακυλιώθηκαν σε μεγάλο βαθμό με αποδόσεις από 11 έως 65 %, με την μετατροπή να σημειώνει αύξηση με την μείωση του μήκους του ακυλο-δότη (Πίνακας 25), ενώ οι μονοσακχαρίτες Xyl και Ara δεν εστεροποιήθηκαν, όπως υπέδειξαν και τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα TLC.

Πίνακας 25: Αποδόσεις ακυλίωσης μονο- και δισακχαριτών, ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με χρήση δοτών ακετυλ-, προπυλ- και βουτυλ-ομάδων, όπως προέκυψαν από HPLC ανάλυση και ημιποσοτική TLC (σε παρένθεση) ανάλυση.

		% ακετυλίωση	% προπυλίωση	% βουτυλίωση
Μονο-σακχαρίτες	Glc	80	64	20
	Gal	24	16	15
	Man	66	41	27
Δι-σακχαρίτες	Celb	23 (28)	29 (21)	53 (44)
	β-Manb	54 (53)	53 (67)	58 (47)

Η αδυναμία της εστεράσης *Ct*CE2 να ακυλιώσει την Xyl είναι σύμφωνη με παλαιότερα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία μέλη της CE2 καταλύουν την ακυλίωση, αλλά και την υδρόλυση στη θέση 6-*O* των σακχάρων Glc, Gal και Man (Topakas et al. 2010). Η ενζυμική ακετυλίωση των προαναφερόμενων μονοσακχαριτών στη βιβλιογραφία έχει οδηγήσει σε άνω

του 50 % μετατροπή, με χρήση της εστεράσης του οξικού *T. reesei* RUT-C30 (0.052 mg/mL^{-1}) για ακυλίωση 20 mg υποστρώματος σε νερό για χρόνο αντίδρασης 24 ή 48 h. Ωστόσο στην εν λόγω μελέτη οι μονοσακχαρίτες Glc, Gal και Man ακυλιώθηκαν σε ένα μίγμα δυο ή τριών προϊόντων, εξαιτίας της χαμηλής ενζυμικής εξειδίκευσης ή φαινόμενα μετανάστευσης του οξικού (Kremnický et al. 2004). Στην παρούσα μελέτη η εστεράση *Ct*CE2 ακυλίωσε τους δισακχαρίτες Celb και β-Manb σε ποσοστό 23 έως 58 %, ωστόσο παρατηρήθηκε προτίμηση για τον δότη της βουτυλομάδας κυρίως στην περίπτωση του Celb (Πίνακας 25). Είναι φανερό πως η εστεράση του οξικού παρουσίασε προτίμηση ως προς την ακετυλίωση των μονοσακχαριτών, χωρίς ωστόσο να σημειώνει την ίδια τάση στην ακυλίωση των δισακχαριτών και, όπως θα δούμε στη συνέχεια, των πολυσακχαριτών. Σε ένα διφασικό σύστημα η τελική απόδοση μετατροπής είναι ένα συγκερασμός της ενζυμικής εξειδίκευσης όσον αφορά το υπόστρωμα και της διαλυτότητας του προϊόντος στη φάση του βινυλεστέρα (οργανική φάση), όπου το προϊόν προστατεύεται από την υδρόλυση. Είναι πιθανόν πως όταν το μοριακό βάρος του σακχάρου αυξάνεται, και επομένως η διαλυτότητα του στο νερό μειώνενται, η προσθήκη ενός πιο υδροφοβικού ακυλο-δότη, όπως είναι ο βουτυρικός βινυλεστέρας, οδηγεί στη σύνθεση ενός τελικού προϊόντος που είναι περισσότερο διαλυτό στην οργανική φάση. Επομένως η ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς τη σύνθεση προπυλιωμένων ή βουτυλιωμένων δισακχαριτών σε αντίθεση με την συνήθη εξειδίκευση των CE2 εστερασών του οξικού. Οι βινυλεστέρες του δεκανοϊκού, του λαυρικού και του κινναμικού δεν οδήγησαν σε ακυλίωση των μονοσακχαριτών και των δισακχαριτών που μελετήθηκαν.

8.1.4 Ταυτοποίηση μετεστεροποιημένων σακχάρων

Η ενζυμική τροποποίηση των υπό εξέταση αλδοεξόζων σε διφασικό σύστημα οδήγησε στην παραγωγή θεωρητικά ακυλιωμένων ενώσεων, ο σχηματισμός των οποίων επιβεβαιώθηκε μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης. Εν συνεχεία καθίσταται απαραίτητη η ταυτοποίηση των μετεστεροποιημένων προϊόντων μέσω κατανόησης των δομικών τους χαρακτηριστικών και η διευκρίνηση και κατανόηση της τοποεκλεκτικότητας του ενζύμου. Εξαιτίας αυτού πραγματοποιήθηκε ανάλυση ESI-MS και NMR.

8.1.4.1 Ανάλυση ESI-MS

Με την ανάλυση MS τα προϊόντα μετεστεροποίσης ιοντίζονται και από του λόγους m/z που προκύπτουν εξάγονται συμπεράσματα ως προς την χημική δομή της υπό μελέτη ένωσης. Με ανάλυση MS δευτέρου βαθμού το προκύπτον ιόν θραυσματοποιείται και από τα ιοντισμένα θραύσματα μπορεί να γίνει επαλήθευση των δομικών χαρακτηριστικών και δυνητικά να σχηματιστεί μία βάσιμη θεωρία ως προς την τοποεκλεκτικότητα του ενζύμου. Όλοι οι ακυλιωμένοι μονοσακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες που παράχθηκαν στην παρούσα διατριβή απομονώθηκαν κατά την ανάλυση HPLC και ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση MS. Η ανάλυση ESI-MS σε θετικό ιοντικό mode οδήγησε σε μονά φορτισμένα σύμπλοκα ιόντων$[M+Na]^+$ με τις τιμές m/z να παρατίθενται στον Πίνακα 26.

Πίνακας 26: Πρώτης τάξης MS σε θετικό mode ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με χρήση του οξικού βινυλεστέρα, του προπιονικού βινυλεστέρα και βουτυρικού βινυλεστέρα ως δότες ακυλομάδας, αποδίδοντας θετικά ψευδομοριακά ιόντα $[M+Na]^+$ ως (m/z).

	ακετυλιωμένο		προπυλιωμένο		βουτυλιωμένο	
			$[M+Na]^+$ *m/z*			
Glc, Gal, Man	245		259		273	
Celb, Manb	407[1]	449[2]	421[1]	477[2]	435[1]	505[2]

[1] Μονουποκατεστημένο προϊόν, [2] Διυποκατεστημένο προϊόν

Στη συνέχεια έγινε εφαρμογή MS δευτέρου βαθμού των μονά φορτισμένων ιόντων $[M+Na]^+$, απ΄ όπου λήφθηκαν ιοντικά θραύσματα (ιοντικών θραυσμάτων) με σκοπό την ταυτοποίηση των ακυλιωμένων προϊόντων με βεβαιότητα. Τα πιο κοινά-συνήθη θραύσματα (ψευδομοριακά ιόντα) για κάθε μονοσακχαρίτη και δισακχαρίτη που μελετήθηκε παρουσιάζονται στον Πίνακα 27.

Πίνακας 27: Κύρια m/z ψευδομοριακά ιόντα-θραύσματα, όπως προέκυψαν από δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με χρήση του οξικού βινυλεστέρα, του προπιονικού βινυλεστέρα και βουτυρικού βινυλεστέρα ως δότες ακυλομάδας, αποδίδοντας θετικά ιόντα $[M+Na]^+$.

	Μονοσακχαρίτες								
Κύρια MS-ESI θραύσματα	Ακετυλιωμένα			Προπυλιωμένα			Βουτυλιωμένα		
	Glc	Gal	Man	Glc	Gal	Man	Glc	Gal	Man
-W (-18)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$^{0.1}A_2$ (-30)		+		+			+	+	+
$^{0.2}A_2$ (-60)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$^{0.3}A_2$ (-90)	+	+	+	+	+	+	+	+	

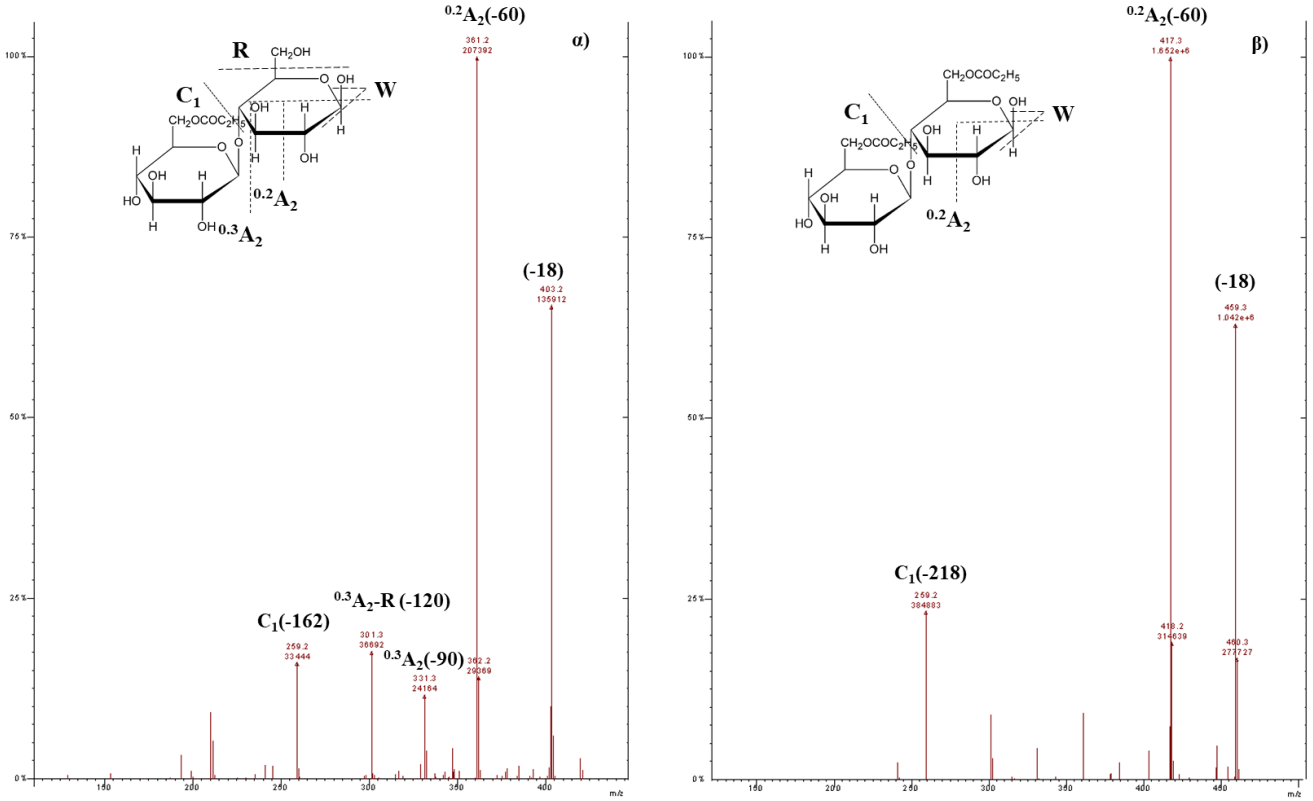
	Δισακχαρίτες $R_5=COC_vH_{v+1}$ ή H, R_6=H ή COC_vH_{v+1}, v=1-3					
	Μονοακετυλιωμένα		Μονοπροπυλιωμένα		Μονοβουτυλιωμένα	
	Celb	β-Manb	Celb	β-Manb	Celb	β-Manb
-W (-18)	+		+	+	+	+
$^{0.2}A_2$ (-60)	+	+	+	+	+	+
$^{0.3}A_2$ (-90)			+		+	
$^{0.3}A_2$-R (-120)			+	+	+	+
C_1	+	+	+	+	+	+
C'1		+		+		+

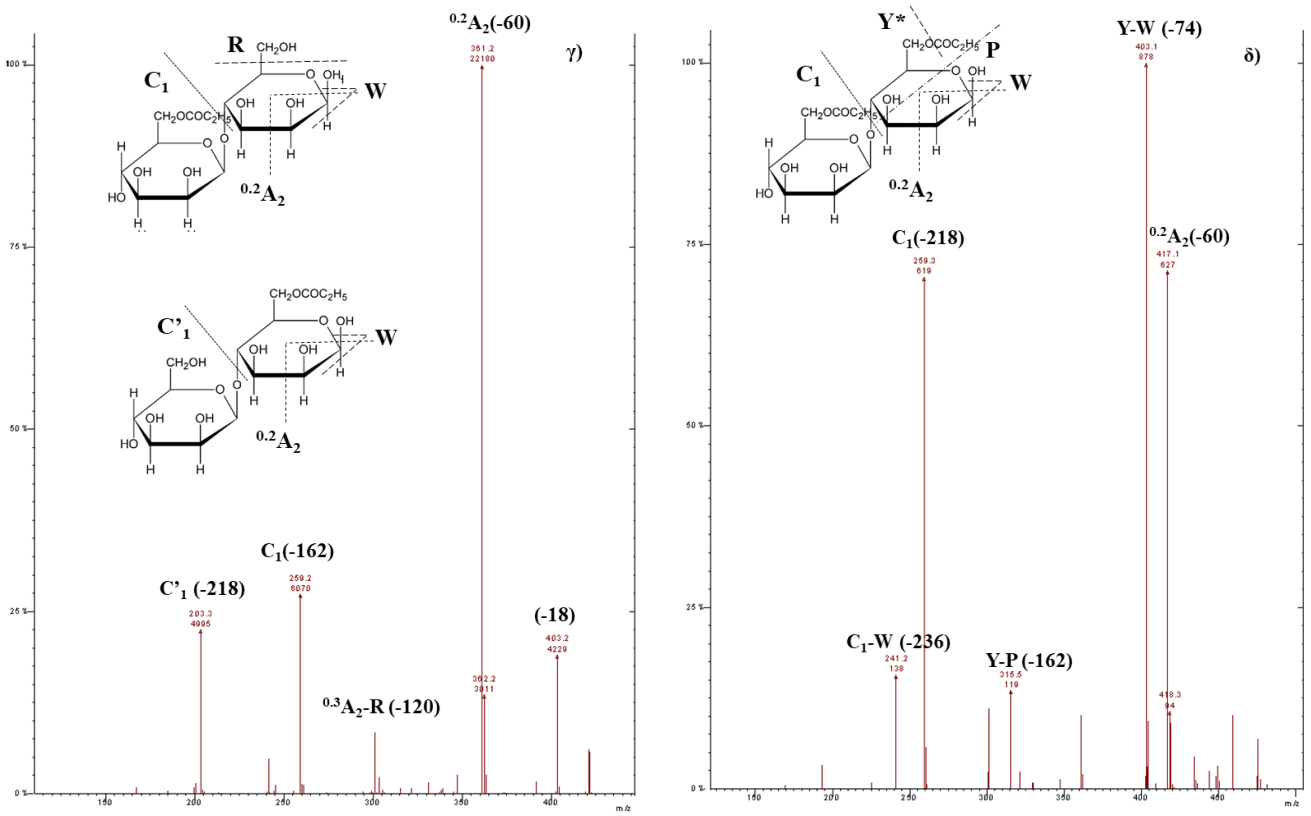
	Δισακχαρίτες R_5, $R_6=COC_vH_{v+1}$, v=1-3					
	Διακετυλιωμένα		Διπροπυλιωμένα		Διβουτυλιωμένα	
	Celb	β-Manb	Celb	β-Manb	Celb	β-Manb
-W (-18)	+	+	+		+	+
$^{0.1}A_2$ (-30)	+					
$^{0.2}A_2$ (-60)	+	+	+	+	+	+
C_1		+	+	+	+	+

Ενδεικτικά στο Σχήμα 77 προβάλλονται τα φάσματα MS δεύτερης τάξης των μονοπροπυλιωμένων και διπροπυλιωμένων Celb και β-Manb σε m/z 421 και 477, αντίστοιχα. Στο Σχήμα αυτό τα ιόντα $^{0.2}A_2$, $^{0.3}A_2$ σε m/z 361 και 331 αποτελούν χαρακτηριστικά θραύσματα που οφείλονται στη διάσπαση διασταυρωμένου δακτυλίου με απώλεια 60 και 90 Da, ενώ το ιόν που αντιστοιχεί σε m/z 403 προκύπτει από την απώλεια ενός μορίου νερού (W). Το πρωτονιωμένο ιόν C_1 για m/z 259 (απώλεια 162 Da) αντιστοιχεί θραύσμα πρωτονιωμένης γλυκόζης $[M+Na]^+$ και το πρωτονιωμένο ιόν για m/z 301 απορρέει από την απώλεια 90 Da και την πιθανή αποσύνδεση του 6^{ου} ατόμου C από την αναγωγική μονάδα (R), που συμβολίζεται ως $^{0.3}A_2$-R. Η ακυλίωση των δισακχαριτών με την εστεράση *Ct*CE2 παρουσιάζει υψηλή, αλλά όχι απόλυτη προτίμηση ως προς την μη αναγωγική μονάδα-δακτύλιο του διασακχαρίτη. Στην περίπτωση του μονοπροπυλιωμένου δισακχαρίτη β-Manb (Σχήμα 77γ) διακρίνονται τα ίδια ιόντα, ωστόσο παρατηρείται η ανίχνευση του θραύσματος C'_1 για m/z 203, γεγονός που αποδεικνύει μονοακυλίωση και των δύο *O*-6 θέσεων των δακτυλίων του δισακχαρίτη και συνεκδοχικά μη αυστηρή εκλεκτικότητα του ενζύμου για την αναγωγική ή μη αναγωγική μονάδα του διασακχαρίτη. Στο Σχήμα 77β της διπροπυλιωμένης Celb,τα ιόντα $^{0.2}A_2$ και C_1 για m/z 417 και 259, αντιστοιχούν στη διάσπαση διασταυρωμένου δακτυλίου με απώλεια 60 Da και στο θραύσμα της πρωτονιωμένης προπυλιωμένης γλυκόζης με απώλεια 218 Da. Το ιόν για m/z 459 οφείλεται στην απώλεια ενός μορίου νερού (W). Τέλος το ιόν $^{0.2}A_2$ για m/z 417 της διπροπυλιωμένης β-Manb αντιστοιχεί στη διάσπαση διασταυρωμένου δακτυλίου με απώλεια 60 Da (Σχήμα 77δ). Στο m/z 403 εμφανίζεται ένα πρωτονιωμένο ιόν με την απομάκρυνση ενός μορίου νερού και της ακυλομάδας από οποιαδήποτε από τις δυο μονάδες του δισακχαρίτη και συμβολίζεται ως Y-W (απώλεια 74 Da). Στο m/z 315 εμφανίζεται ένα πρωτονιωμένο ιόν πιθανόν λόγω της απομάκρυνσης την ακυλομάδας με απώλεια 56 Da και την ταυτόχρονη διάσπαση διασταυρωμένου δακτυλίου με απώλεια 106 Da που συμβολίζεται ως Y-P. Το ιόν C_1 στο m/z 259 (απώλεια 218 Da) αντιστοιχεί στο θραύσμα προπυλιωμένης γλυκόζης $[M+Na]^+$ και το ιόν στο m/z 241 προκύπτει από την απομάκρυνση ενός μορίου νερού W από το C_1.

Τα φάσματα MS δεύτερης τάξης των ακετυλιωμένων και βουτυλιωμένων δισακχαριτών παρουσιάζονται στο Παράρτημα (Σχήμα Π2, Σχήμα Π3). Τα ψευδομοριακά ιόντα των ακυλιωμένων προϊόντων παρουσιάζονται στον Πίνακας 27. Επιπρόσθετα όσον αφορά τη διβουτυλιωμένη Celb τα πρωτονιωμένα ιόντα $^{0.1}Y_2$, $^{0.2}Y_2$, $^{0.3}Y_2$ προκύπτουν από τη διάσπαση διασταυρωμένου δακτυλίου με απώλεια μάζας 30, 60 και 90 Da μαζί με απώλεια 100 Da loss

του 6^{ου} ατόμου άνθρακα της αναγωγικής μονάδας μαζί με την ακυλομάδα (B). Στην περίπτωση της διβουτυλιωμένης β-Manb, το πρωτονιωμένο ιόν με m/z 417, που συμβολίζεται ως Y-W, πιθανόν προκύπτει από την απομάκρυνση μιας ακυλομάδας μαζί με ένα μόριο νερού (W).





Σχήμα 77: Δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode του ψευδομοριακού ιόντος $[M+Na]^+$ με m/z 421 για τα μονοπροπυλιωμένα Celb (α) και β-Manb (γ) και με m/z 477 για τα διπροπυλιωμένα Celb (β) και β-Manb (δ), ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση CtCE2. Η πιθανή απώλεια ιόντος από κάθε μονάδα ενός δισακχαρίτη συμβολίζεται με (*).

8.1.5 Ανάλυση NMR

Με στόχο την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του MS και την πλήρη αποσαφήνιση των δομικών χαρακτηριστικών των μετεστεροποιημένων προϊόντων και ειδκότερα της θέσης σύνδεσης της ακυλομάδας στον δακτύλιο της εκάστοτε υπό μελέτη αλδοεξόζης πραγματοποιήθηκε ανάλυση ^{1}H-NMR. Μέσω αυτής της τεχνικής δομικού χαρακτηρισμού ταυτοποιήθηκε η ακυλίωση των εξεταζόμενων αλδοεξόζων στην 6-*O* θέση, επιδεικνύοντας την τοποεκλεκτικότητα του βιοκαταλύτη *Ct*CE2 (Πίνακας 28). Η τοποεκλεκτικότηττα της εστεράσης *Ct*CE2 ως προς τη θέση 6 του δακτυλίου του αναγωγικού σακχάρου κατά την αντίδραση της ακετυλίωσης έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη (Topakas et al. 2010), όπου τα ακετυλιωμένα προϊόντα απομονώθηκαν με χρωματογραφία πηκτής πυριτίου και

ταυτοποιήθηκαν με ανάλυση NMR, και είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Πίνακας 28: Δεδομένα ^{1}H-NMR προπυλιωμένης και βουτυλιωμένης Glc και Man. Η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR πραγματοποιήθηκε στο Bruker DRX 600, τα δείγματα διαλύθηκαν σε CD_3OD και χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) ως εσωτερικό πρότυπο. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm. [a] Δύο κορυφές λόγω μίγματος ανωμερών.

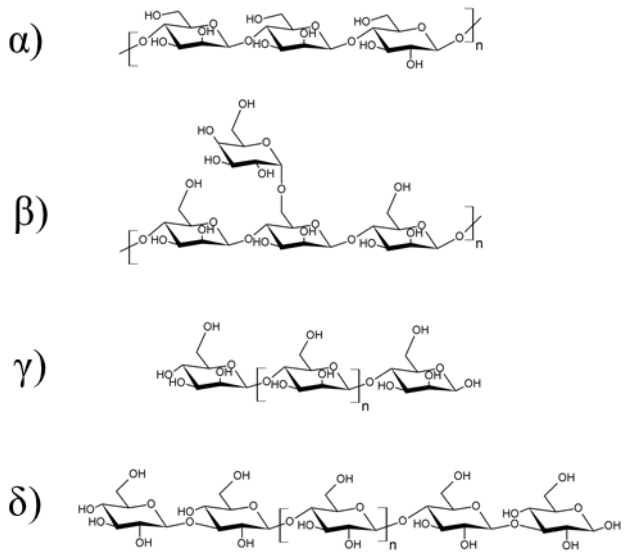
	H1[a]	H2 – H5	H6	$CH_3(CH_2)_nCOO$ -
6-*O*-προπυλ-D-γλυκοπυρανόζη	5.13 (d, *J*= 3.60 Hz, 0.6H), 4.53 (d, *J*= 7.80 Hz, 0.4H)	3.53 - 3.19 (m, 4H)	4.42 (dd, *J*= 11.9, 2.1 Hz), 4.37 (dd, *J*= 11.8, 2.2 Hz), 4.22 (ddd, *J*= 14.5, 11.8, 5.7 Hz)	1.13 (s, 3H), 2.39 (q, 2H)
6-*O*-πρόπυλ-D-μαννοπυρανόζη	5.08 (s, 0.8H), 4.78 (s, 0.2H)	3.64 – 3.96 (m, 4H)	4.44 (dd, *J*= 11.9, 2.2 Hz), 4.40 (dd, *J*= 11.8, 2.3 Hz), 4.24 (td, *J*= 12.9, 12.5, 6.4 Hz)	1.14 (s, 3H), 2.39 (q, 2H)
6-*O*-βουτυλ-D-γλυκοπυρανόζη	5.16 (d, *J*= 3.7 Hz, 0.4H), 4.57 (d, *J*= 7.8 Hz, 0.6H)	3.54 - 3.21 (m, 4H)	4.40 (dd, *J*= 11.8, 2.0 Hz), 4.36 (dd, *J*= 11.8, 2.0 Hz), 4.18 (ddd, *J*= 17.9, 11.8, 6.0 Hz)	0.93 (td, 3H), 1.62 (m, 2H), 2.32 (m, 2H)
6-*O*-βουτυλ-D-μαννοπυρανόζη	5.08 (d, *J*= 1.8 Hz, 0.9H), 4.78 (d, *J*= 1.1 Hz, 0.1H)	3.63 – 3.96 (m, 4H)	4.44 (dd, *J*= 11.8, 2.1 Hz), 4.41 (dd, *J*= 11.7, 2.2 Hz), 4.23 (ddd, *J*= 13.6, 11.7, 6.4 Hz)	0.97 (s, 3H), 1.67 (m, 2H), 2.35 (q, 2H)

Μία ακόμη υδρολάση σερίνης που παρουσιάζει την ίδια 6-*O* τοποεκλεκτικότητα είναι η λιπάση CAL-B. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται η ακυλίωση του υποστρώματος Glc στην 6-*O* θέση με λιπαρά οξέα (C_6-C_{16}), και καταλύτη τη λιπάση CAL-B σε σύστημα δύο διαλυτών, των 1-βουτυλ-3-μεθυλ εξαφθοροφωσφορικό ιμαδόλιο και 40 % τεταρτοταγούς βουτανόλης, στους 60 ^{o}C, επιτυγχάνοντας 60 % μετατροπή προς παραγωγή λαυρικής γλυκόζης (Ganske and Bornscheuer 2005). Επιπρόσθετα, οι Zhao et al. (2016) μελέτησαν την ακυλίωση του α-D-μεθυλ-γλυκοζίτη με λιπαρά οξέα (C_{10}-C_{18}), με καταλύτη το CAL-B σε 2-μεθυλ-2-βουτανόλη ή σε σύστημα δύο διαλυτών, των 1-εξυλ-3-μεθυλ-τριφθορομεθυλ-θειϊκού ιμιδαζολίου και 2-μεθυλ-2-βουτανόλης (0.05:0.95, v/v), όπου σημειώθηκαν υψηλότερες αποδόσεις για τα μεγαλύτερης αλυσίδας λιπαρά οξέα, 50 and 80 % αντίστοιχα για κάθε σύστημα διαλυτών. Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερόμενα οι δυο βιοκαταλύτες CAL-B και *Ct*CE2 είναι κατάλληλοι για την ακυλίωση αναγωγικών σακχάρων στην 6-*O* θέση και η επιλογή του επικρατέστερου θα πρέπει να γίνεται ανάλογα με το απαιτούμενο μέσο αντίδρασης και των

δεδομένων ακυλομάδων που είναι επιθυμητό να εστεροποιηθούν στο τελικό προϊόν. Η λιπάση εφαρμόζεται για την ακυλίωση πολυσακχαριτών με μακριάς αλυσίδας ακυλομάδες, ενώ η εστεράση καταλύει την εστεροποίηση πολυσακχαρίτων με πρόσδεση ακυλομάδας βραχείας αλύσου.

8.2 Ποιοτική ανίχνευση μετεστεροποιημένων πολυσακχαριτών

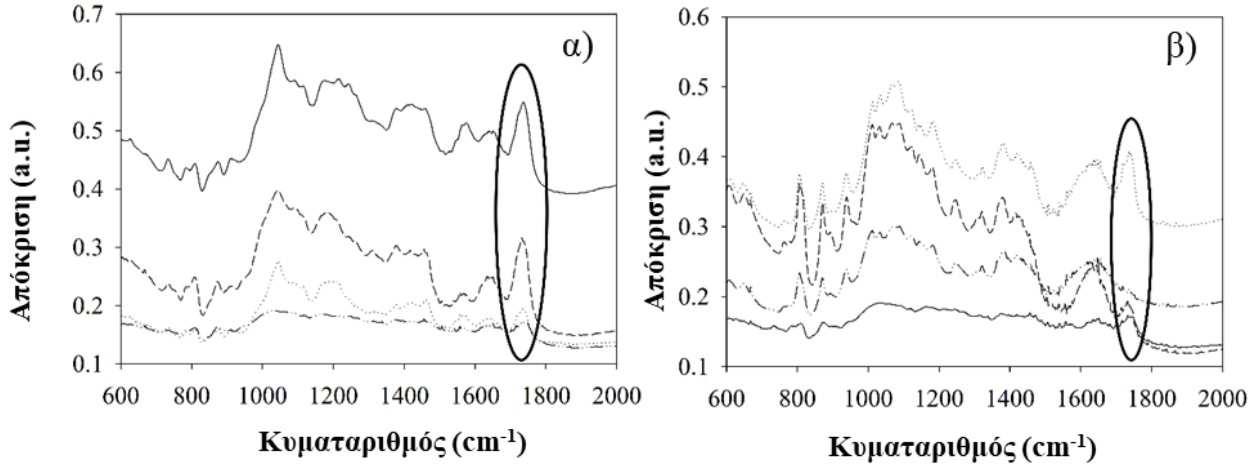
Οι τροποποιημένοι πολυσακχαρίτες αποτελούν μακρομοριακές πολυμερικές ενώσεις με βελτιωμένες ιδιότητες που τις καθιστούν κατάλληλες για ευρύ πεδίο εφαρμογών. Η ακυλίωση μαννο-πολυσακχαριτών και της β-γλυκάνης προσδίδει στα πολυμερικά αυτά υποστρώματα έναν αμφιφιλικό χαρακτήρα, υψηλής προστιθέμενης αξίας σε τομείς, όπως τα Τρόφιμα, η Βιοϊατρική και οι βιομηχανίες φαρμάκων και καλλυντικών. Οι αντιδράσεις μετεστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν με χρήση της εστεράσης του οξικού *Ct*CE2 ως βιοκαταλύτη σε διφασικό σύστημα νερού-βινυλεστέρων μικρής αλυσίδας και στόχο την τροποποίηση των: γλυκομαννάνη κονγιάκ, γαλακτομαννάνη χαρουπιάς, 1,4-β-D-μαννάνη και β-γλυκάνη κριθής (Σχήμα 78). Η ενζυμική ακυλίωση των πολυσακχαριτών αναμένεται να λάβει χώρα στην θέση 6-*O* των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων, των αλδοεξοζών, εκμεταλλευομένης της ισχυρής τοπεκλεκτικότητας της εστεράσης του οξικού *Ct*CE2. Για την ακυλίωση των πολυμερικών αυτών μακρομορίων εφαρμόστηκαν διάφορες τεχνικές ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης.

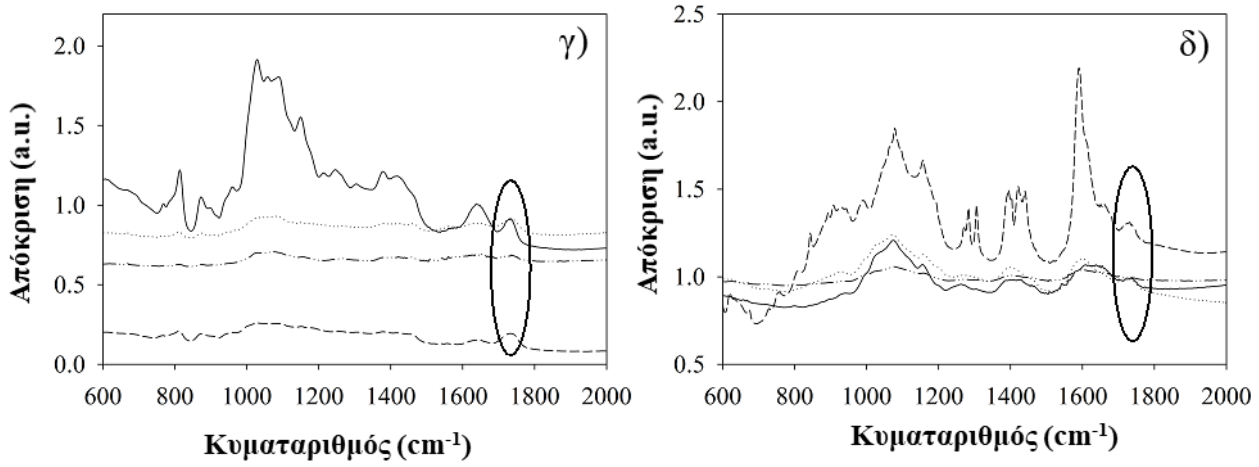


Σχήμα 78: Δομές των πολυσακχαριτών: α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς, γ) 1,4-β-D-μαννάνη και δ) β-γλυκάνη κριθής.

8.2.1 Ανάλυση FTIR

Η εξακρίβωση της ενζυμικής μετεστεροποίησης των υπό εξέταση πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε αρχικά με ανάλυση FTIR, προκειμένου να ελεγχθεί ταχεία και με ευκολία η παρουσία ή μη κορυφής που να αντιστοιχεί στον νεοσχηματισμένο εστερικό δεσμό. Οι ακυλιωμένοι πολυσακχαρίτες καταβυθίστηκαν με μεθανόλη και αφέθηκαν προς ξήρανση ώστε να αναλυθούν φασματοσκοπικά με FTIR, με στόχο την ανίχνευση κορυφής που να αντιστοιχεί στις συχνότητες απορρόφησης των εστερικών δεσμών. Τα φάσματα FTIR όλων των ακυλιωμένων πολυσακχαριτών παρουσιάζουν μία κορυφή στα 1735 cm^{-1} που αντιστοιχεί στο δεσμό καρβονυλίου του εστερικού δεσμού, λόγω δονήσεων επιμήκυνσης. Ενδεικτικά στο Σχήμα 79 παρουσιάζονται τα φάσματα της ακετυλιωμένης, προπυλιωμένης και βουτυλιωμένης γλυκομαννάνης, 1,4- β-D-μαννάνης, γαλακτομαννάνης και β-γλυκάνης, αντίστοιχα. Στη βιβλιογραφία έχει σημειωθεί η εμφάνιση της ίδιας κορυφής για εστεροποιημένο άμυλο με ολεϊκό οξύ (Adak and Banerjee 2016). Η φασματοσκοπική αυτή ανάλυση επιβεβαίωσε το σχηματισμό εστερικών δεσμών και επέτρεψε την περαιτέρω ανάλυση ακυλίωσης των υπό μελέτη πολυσακχαριτών.





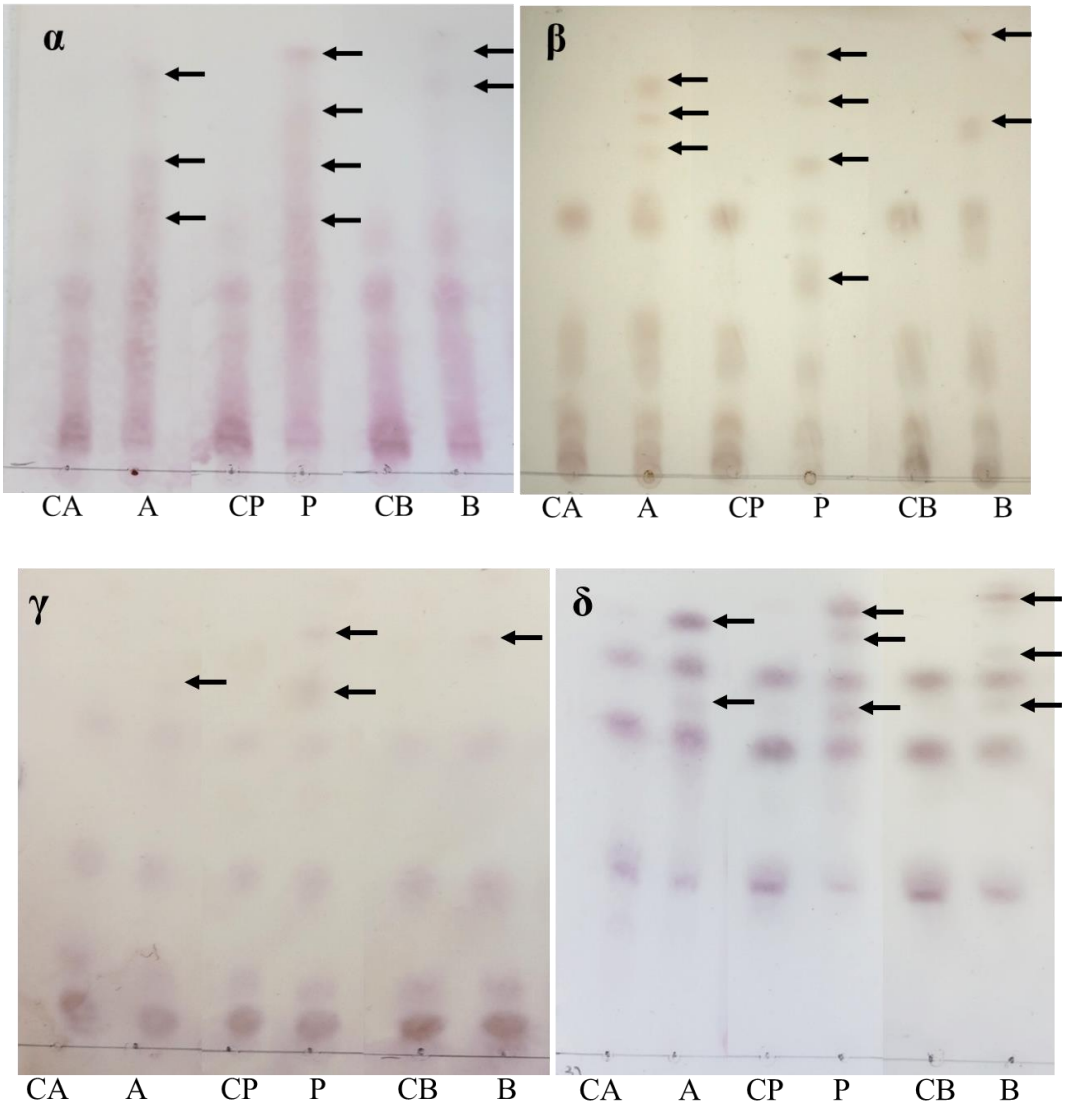
Σχήμα 79: FTIR φάσματα ακετυλιωμένης (συνεχής γραμμή), προπυλιωμένης (γραμμή με κουκίδες), βουτυλιωμένης (γραμμή με παύλες) α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) 1,4- β-D-μαννάνης, γ) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς και δ) β-γλυκάνη κριθής, ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση *Ct*CE2. Οι ατροποποίητοι πολυσακχαρίτες συμβολίζονται με γραμμή με παύλες και κουκίδες.

8.2.2 Ανάλυση TLC

Σε επόμενο στάδιο, με στόχο την επιβεβαίωση της ενζυμικής μετεστεροποίησης των μαννο-πολυσακχαριτών και της β-γλυκάνης πραγματοποιήθηκε ανάλυση TLC, μία ακόμη μέθοδος ποιοτικού ελέγχου. Τόσο τα ακυλιωμένα όσο και τα μη ακυλιωμένα υποστρώματα υδρολύθηκαν ενζυμικά. Τα προϊόντα που προέκυψαν λόγω διαφορετικού μεγέθους και πολικότητας διαχωρίστηκαν επί της TLC πλάκας, όπου ανιχνεύτηκαν καινούρια θραύσματα που αντιστοιχούν σε ακυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες των αποδομημένων υπό μελέτη πολυσακχαριτών.

Οι μαννο-πολυσακχαρίτες, που περιέχουν μαννόζη ως επαναλαμβανόμενη δομική ομάδα, όπως είναι η γλυκομαννάνη κονγιάκ, η γαλακτομαννάνη χαρουπιάς, και η 1,4-β-D-μαννάνη υδρολύθηκαν με χρήση της ενδομαννανάσης *Mt*Man26a, ενώ η β-γλυκάνη κριθής, που περιέχει μόνο γλυκόζη ως δομική μονάδα υδρολύθηκε με την ενδογλουκανάση *Mt*EG7a. Τα δυο αυτά ένζυμα αποτελούν ανασυνδυασμένες γλυκοζιτικές υδρολάσες από τον θερμόφιλο μύκητα *M. thermophile,* οι οποίες έχουν εκφραστεί ετερόλογα σε *P. pastoris*. Στο Σχήμα 80 γίνεται φανερό πως η ενζυμική υδρόλυση οδηγεί σε ακυλιωμένους ολιγοσακχαρίτες, καθώς η έκλουσή τους επί της TLC πλάκας διαφέρει από τους ολιγοσακχαρίτες που προήλθαν από την υδρόλυση των

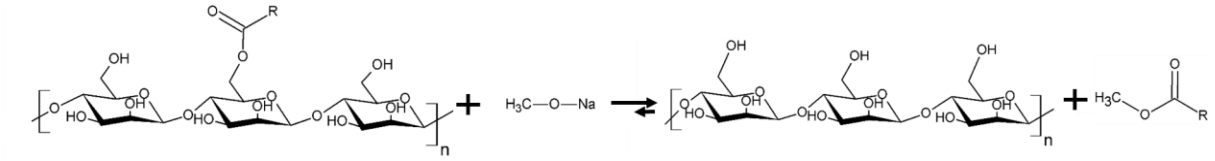
δειγμάτων ελέγχου (μη ακυλιωμένοι πολυσακχαρίτες) υπό τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης. Η παρουσία καινούριων spots-προϊόντων που αντιστοιχούν στους ακυλιωμένους πολυσακχαρίτες, αντιπροσωπεύουν επιπρόσθετη απόδειξη της δυνατότητας σύνθεσης-ακυλίωσης των υπό μελέτη διαλυτών πολυσακχαριτών με την εστεράση *Ct*CE2 υπό τις κατάλληλες συνθήκες.



Σχήμα 80: TLC αποτελέσματα της ενζυμικής υδρόλυσης ατροποποίητων (CA, CP, CB), ακετυλιωμένων (A), προπυλιωμένων (P) και βουτυλιωμένων (B) πολυσακχαριτών με διαλύτη έκλουσης ακετονιτρίλιο:νερό 8:2 (v/v). Απεικόνιση των προϊόντων υδρόλυσης της α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς, γ) 1,4- β-D-μαννάνης και δ) β-γλυκάνης κριθής. Με βελάκια συμβολίζονται τα θραύσματα των ακυλιωμένων ολιγοσακχαριτών για κάθε υδρολυμένο πολυσακχαρίτη, αντίστοιχα.

8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των μετεστεροποιημένων προϊόντων

Η ποσοτικοποίηση των ακυλομάδων που εστεροποιήθηκαν στη θέση 6-*O* των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων Glc, Gal και Man των υπό μελέτη πολυσακχαριτών πραγματοποιήθηκε μέσω μιας έμμεσης μεθοδολογίας. Οι ακυλομάδες των τροποποιημένων πολυσακχαριτών εξαναγκάστηκαν σε μεθανόλυση και οι προκύπτοντες μεθυλεστέρες αναλύθηκαν με HPLC. Η αντίδραση μεθανόλυσης ενδεικτικά του πολυσακχαρίτη 1,4-β-D-μαννάνη παρουσιάζεται στο ακόλουθο.



Σχήμα 81: Αντίδραση μεθανόλυσης της 1,4-β-D-μαννάνης επαν προς παραγωγή του αντίστοιχου μεθυλεστέρα. R=CH_3 για τον οξικό μεθυλεστέρα, C_2H_5 για τον προπιονικό μεθυλεστέρα, C_3H_7 για τον βουτυρικό μεθυλεστέρα.

Η εστεράση *Ct*CE2 παρουσίασε ίδιες αποδόσεις ακετυλίωσης και προπυλίωσης ως προς την τροποποίηση της γλυκομαννάνης, της γαλακτομαννάνης και της β-γλυκάνης με εύρη 0.022-0.046 και 0.106-0.367 $mmol_{ακυλομάδων}/g_{πολυσακχαρίτη}$, αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, η εστεροποίηση της 1,4 β-D-μαννάνης mannan επέδειξε περισσότερο εντυπωσιακά αποτελέσματα με τρεις έως πέντε φορές καλύτερες αποδόσεις ακετυλίωσης και προπυλίωσης (Πίνακας 29). Η χρήση του βινυλικού βουτυλέστέρα ως δότη ακυλομάδας οδήγησε σε αποδόσεις εστεροποίησης από 0.236 έως 0.767 $mmol_{ακυλομάδων}/g_{πολυσακχαρίτη}$. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων εκτιμήθηκε ο βαθμός υποκατάστασης DS, λαμβάνοντας υπόψη πως το μέγιστο DS ισούται με 1, λόγω της αυστηρής τοποεκλεκτικότητας του ενζύμου στη θέση *O*-6.

Όλοι οι πολυσακχαρίτες βρέθηκαν να έχουν ένα εύρος DS 0.004-0.040 $mol_{ακυλ-δότη}/mol_{δομικής\ ομάδας}$ (άνυδρου μονοσακχαρίτη) για τις αντιδράσεις ακετυλίωσης, 0.042-0.177 για τις αντιδράσεις προπυλίωσης και 0.039-0.126 για τις αντιδράσεις βουτυλίωσης. Επίσης, είναι εμφανές πως οι πολυσακχαρίτες, όπως και στην περίπτωση των δισακχαριτών, δείχνουν προτίμηση για τους δότες προπυλομάδας και βουτυλομάδας. Εξαιτίας αυτού διεξάγεται το συμπέρασμα πως η τελική απόδοση μετατροπής επηρεάζεται από την εξειδίκευση του ενζύμου προς το υπόστρωμα σε συνδυασμό με την διανομή του παραγόμενου προϊόντος στο διφασικό σύστημα.

Πίνακας 29: Έμμεσος προσδιορισμός μετεστεροποίησης, -ακυλομάδων ανά πολυσακχαρίτη-, μέσω μεθανόλυσης των ακυλιωμένων πολυσακχαριτών.

	$mmol_{ακυλομάδας}/g_{πολυσακχαρίτη}$		
	ακετυλ-	προπυλ-	βουτυλ-
γλυκομαννάνη	0.026 ± 0.001	0.256 ± 0.007	0.725 ± 0.011
γαλακτομαννάνη	0.046 ± 0.006	0.367 ± 0.002	0.628 ± 0.036
1,4-β-D-μαννάνη	0.243 ± 0.016	1.083 ± 0.000	0.767 ± 0.078
β-γλυκάνη	0.022 ± 0.003	0.106 ± 0.006	0.236 ± 0.021
	$mol_{ακυλομάδας}/mol_{επαναλαμβανόμενης\ μονάδας}$		
γλυκομαννάνη	0.004 ± 0.000	0.042 ± 0.001	0.119 ± 0.002
γαλακτομαννάνη	0.008 ± 0.001	0.060 ± 0.000	0.103 ± 0.006
1,4-β-D-μαννάνη	0.040 ± 0.003	0.177 ± 0.000	0.126 ± 0.013
β-γλυκάνη	0.004 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.039 ± 0.003

Στη βιβλιογραφία έχει πραγματοποιηθεί η ακετυλίωση της γλυκομαννάνης κονγιάκ σε οργανικό διαλύτη με χρήση της λιπάσης Novozym 435 (250 U mL^{-1}), ως βιοκαταλύτη, η οποία παρουσίασε την ίδια τοποεκλεκτικότητα ως προς την εστεροποίηση στη θέση *O*-6. Στην εργασία εκείνη 0.4 g γλυκομαννάνης αντέδρασαν με 7.5 mmol οξικού βινυλεστέρα σε τεταρτοταγή βουτανόλη, στους 50 ^{o}C, a_w 0.75, για 24 h, επιτυγχάνοντας DS ίσο με 0.71, βάσει τιτλοδότησης (Chen et al. 2006b). Οι Alissandratos et al. (2010) εφάρμοσαν ποσοτικοποίηση ακυλιωμένου άμυλου μέσω μεθανόλυσης, μολοταύτα δεν υπάρχουν δεδομένα έως τώρα όσον αφορά τους μαννο-πολυσακχαρίτες και τη β-γλυκάνη. Στη μελέτη του άμυλου διάφοροι τύποι πολυσακχαρίτη αντέδρασαν με δεκανοϊκό οξύ με χρήση μιας λιπάσης του μικροοργανισμού *T. lanuginosus*, όπου οι προκύπτοντες μεθυλεστέρες αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC) και οι λόγοι DS που επιτεύχθηκαν κυμαίνονται μεταξύ 0.0025 και 0.0093 για DS_{max} ίσο με 3. Γενικότερα οι ενζυμικές τροποποιήσεις πολυσακχαριτών καθιστούν αντιδράσεις ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος, ωστόσο αποτελούν ένα δύσκολο εγχείρημα όσον αφορά την επιλογή του συστήματος της αντίδρασης και των μεθόδων ανάλυσης που θα αξιοποιηθούν και δεν υπάρχουν πολλές σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές κυρίως για τους πολυσακχαρίτες που μελετώνται στην παρούσα διατριβή σε διφασικό σύστημα. Οι Yang

and Wang (2004) μελέτησαν και βελτιστοποίησαν την ακετυλίωση της καρβοξυ-μεθυλ κυτταρίνης (CMC) με οξικό βινυλεστέρα και χρήση της λιπάσης A12 του *Aspergillus niger* σε διφασικό σύστημα, ενώ ανέλυσαν τα προϊόντα με την χρωματομετρική μέθοδο των McComb και McCready για τον προσδιορισμού του περιεχομένου σε ακετυλομάδες και με χρωματογραφία διαχωρισμού μεγέθους υψηλής πίεσης (high pressure size exclusion chromatography, HPSEC). Συμπληρωματικά, οι Stepan et al. (2013) πραγματοποίησαν την επιφανειακή ακυλίωση φιλμ αραβινοξυλάνης σικάλεως χωρίς την παρουσία διαλύτη, με οξικό βινυλεστέρα και χρήση μιας λυοφιλιωμένης κουτινάσης του *F. solani pisi* και με στεατικό βινυλεστέρα και χρήση λιπασών των μικροοργανισμών *Mucor javanicus, Rhizopus oryzae* και *Candida rugosα.* Καταλήγοντας, είναι πολύ σημαντικό να αναδειχθεί η σημαντικότητα της διεξαγωγής των αντιδράσεων μετεστεροποίησης σε διφασικό σύστημα, σε υδατικό σύστημα κορεσμένο σε βινυλεστέρα/ακυλοδότη, καθώς η παρουσία του νερού διασφαλίζει την καταλυτική δράση του ενζύμου, ενώ η διεργασία καταλύεται υπό ήπιες συνθήκες και είναι φιλικότερη προς το περιβάλλον.

9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ

9.1 Ενζυμική τροποποίηση συνθετικών πολυμερών

Τα συνθετικά υφάσματα αποτελούν σημαντικό κομμάτι της κλωστοϋφαντουργίας, καθώς παρουσιάζουν πλεονεκτήματα, όπως το μειωμένο ζάρωμα, το γρήγορο στέγνωμα, η αυξημένη αντοχή, η πιο οικονομική μαζική τους παραγωγή. Ωστόσο η υψηλή υδροφοβικότητα τους αποτελεί βασική τους αδυναμία, όπως επίσης και η μη καλή απορροφητικότητα και διαπερατότητα του ιδρώτα, με αποτέλεσμα να χρήζουν περαιτέρω επεξεργασίας. Η ενζυμική επεξεργασία αυτών των πολυμερικών υλικών είναι μια σύγχρονη και φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση που αποσκοπεί στην αύξηση της υδροφιλικότητας. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά έγινε έλεγχος της υδρολυτικής ικανότητας της λιπάσης Lipolase 100T, της κουτινάσης από τον *F. oxysporum* (*Fo*Cut5a) και των εστερασών *Mt*faeC, *Fo*faeC και *St*GE2 και της πρωτεάσης Alcalase 2.4L επί των μοντέλων υποστρωμάτων τερεφθαλικό δις-βενζοϋλοξυαιθυλεστέρα (3PET) και τον εμπορικό τερεφθαλικό 2-υδροξυαιθυλεστέρα (BHET), τα οποία προσομοιάζουν την πολυμερική επιφάνεια του πολυ(τερεφθαλικού αιθυλεστέρα) (PET) και επί του αδιπικού δις-εξυλαμιδίου, που μιμείται την πολυαμιδική (PA) επιφάνεια. Στα μοντέλα του PET πραγματοποιήθηκε HPLC για μελέτη του προφίλ της υδρόλυσης, ενώ στο μοντέλο του PA η απελευθέρωση αμινομάδων στο υπερκείμενο υπολογίστηκε με την μέθοδο TNBS.

Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν για την υδρόλυση των πολυμερών PET και PA 6.6 ήταν η κουτινάση *Fo*Cut5a και η πρωτεάση Alcalase 2.4L, αντίστοιχα. Η υδρόλυση του PET ποσοτικοποιήθηκε για πρώτη φορά με υπολογισμό της συγκέντρωσης παραγώγων του τερεφθαλικού οξέος (TPA) που απελευθερώνονται στο υπερκείμενο της αντίδρασης με φωτομέτρηση στα 241 nm. Η μέγιστη παραγωγή ισοδύναμων TPA στην αντίδραση του PET (~35 μM) παρατηρήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8.0, και 1.92 $mg_{ενζυμικού\ φορτίου}/g_{υφάσματος}$, ενώ η υδρόλυση παύει μετά τις πρώτες 2-3 h πιθανώς λόγω της σταδιακής απενεργοποίησης του ενζύμου στους 40 ^{o}C, ενώ με HPLC ανάλυση ταυτοποιήθηκε η απελευθέρωση TPA και MHET στο υπερκείμενο. Οι νεοσχηματισμένες ακραίες ομάδες επί της επιφάνειας του πολυμερούς μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με δραστικές βαφές. Με βαφή ατροποποίητων και τροποποιημένων PET υφασμάτων με τρεις δραστικές βαφές (Black Jakazol 133%, Deep Cherry και Novacron Yellow), προέκυψε διαφορά χρώματος ΔΕ μεταξύ 1.75-11.27 και αύξηση της έντασης χρώματος K/S από 13 έως 150 %, αποτελέσματα ιδιαίτερα ικανοποιητικά συγκριτικά με

τη βιβλιογραφία. Η επιφανειακή ενζυμική υδρόλυση του PA 6.6 υφάσματος έλαβε χώρα με χρήση της πρωτεάσης Alcalase 2.4 L στο βέλτιστο pH 8 και 24 h χρόνο αντίδρασης και μελετήθηκαν η θερμοκρασία και το ενζυμικό φορτίο. Τα τροποποιημένα PA υφάσματα μελετήθηκαν μέσω βαφής με την δραστική βαφή Novacron Deep Cherry S-D και αξιολογήθηκαν οι τιμές K/S και ΔΕ. Οι τιμές K/S που βρέθηκαν για κάθε θερμοκρασία τροποποίησης παρουσίασαν αύξηση κατά 1.21-1.24-φορές και διαφορές χρώματος ΔΕ~14. Η ενζυμική υδρόλυση παράλληλα μείωσε τον χρόνο απορρόφησης νερού σε απόσταση 10 cm κατά 2.7 φορές, αποδεικνύοντας την αύξηση της υδροφιλικότητας του τελικού προϊόντος.

Οι θερμικές και μηχανικές ιδιότητες, όπως είναι η αντοχή σε εφελκυσμό, των PET υφασμάτων είναι πολύ σημαντικές και καθορίζουν τις εφαρμογές του κάθε υλικού. Για αυτό το λόγο η ενζυμική επεξεργασία δεν πρέπει να προκαλεί υποβάθμιση του προϊόντος, καθώς έτσι μπορεί να καταστεί ακατάλληλο για χρήση. Οι θερμικές ιδιότητες τήξης, κρυστάλλωσης και θερμικής αποικοδόμησης των PET και PA δεν παρουσίασαν μεταβολές βάσει των αναλύσεων DSC και TGA. Ύστερα από μελέτη αντοχής σε εφελκυσμό σε ατροποποίητο και τροποποιημένο PET και PA ύφασμα δεν παρατηρήθηκε εμφανής επίδραση στο φορτίο και στην μέγιστη επιμήκυνση που απαιτείται μέχρι το σκίσιμο του υφάσματος. Ακόμη στα υφαντά PA υφάσματα παρατηρήθηκε μείωση στην αντοχή στην κάμψη, αλλά και μικρή μείωση στη διατμητική ακαμψία, απόρροια της ενζυμικής τροποποίησης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως τα ενζυμικά επεξεργασμένα υφάσματα είναι μαλακότερα και προσφέρουν εντονότερα την αίσθηση του “άνετου” ρούχου. Ακόμη η συμπιεστότητα του PA υφάσματος αυξήθηκε κατά 47 % με την ενζυμική τροποποίηση, ενώ ο συντελεστής τριβής μειώθηκε και προς τις δυο κατευθύνσεις, γεγονός που υποδηλώνει θετική επίδραση όσον αφορά την τριβή μεταξύ υφάσματος και του δέρματος μας.

Η ανάλυση FTIR-ATR των ενζυμικά τροποιημένων πολυμερών στο PET επέδειξε μείωση της έντασης των κορυφών των δεσμών C=O (στα 1718 cm^{-1}) και C-O στα 1250 cm^{-1} και 1100 cm^{-1}, λόγω της θραύσης των εστερικών δεσμών ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης των πολυεστερικών αλυσίδων. Ακόμη η ένταση της κορυφής στα 1340 cm^{-1} παρουσιάζει αύξηση λόγω των δονήσεων των δεσμών CH_2 της ομάδας της αιθυλενογλυκόλης. Αντίστοιχα στο ενζυμικά τροποποιημένο PA 6.6 παρατηρείται μείωση των κορυφών του καρβονυλίου C=O στα 1633 cm^{-1}, και του δεσμού N-H στα 3301 cm^{-1} λόγω υδρολύσης του αμιδικού δεσμού.

Επιπρόσθετα μέσω ανάλυσης XPS επιδεικνύεται η επίδραση της ενζυμικής δράσης στα πολυμερικά υφάσματα με μικρές, ωστόσο διακριτές αλλαγές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών, οι οποίες αποδίδονται ως σχετική σύσταση των ομάδων των C1s. Η ενζυμική τροποποίηση στο PET οδήγησε σε μικρή σχετική αύξηση των υδρολυμένων ομάδων (12 και 5% για C-O-C, C-OH και C=O + HO-C=O αντίστοιχα) έναντι των αλειφατικών/ αρωματικών ομάδων (C-C) που μειώθηκαν κατά 7%. Στο PA 6.6 η ενζυμική τροποποίηση οδηγεί σε σχετική αύξηση των υδρολυμένων ομάδων (5.2 και 10.1 % για τις ομάδες C-N και N-C=O + HO-C=O, αντίστοιχα) έναντι των αλειφατικών ομάδων (C-C) που μειώθηκαν κατά 4.0 %. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως δεν έχει γίνει αναφορά ανάλυσης XPS ενζυμικά υδρολυμένων πολυαμιδικών υφασμάτων στη βιβλιογραφία έως σήμερα.

Η ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση φέρει το πλεονέκτημα πως διατηρούνται τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες του υλικού, καθώς το ένζυμο δεν επηρεάζει την κύρια μάζα του πολυμερούς. Στις ενζυμικά τροποποιημένες πολυεστερικές και πολυαμιδικές ίνες διακρίνονται μικρές οπές και χαραγές, παρ' όλ' αυτά δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές μέσω ανάλυσης SEM. Επιπρόσθετα, δεν παρατηρείται ομοιογένεια μεταξύ των τροποποιημένων ινών, καθώς σημάδια υδρόλυσης παρατηρούνται πιο έντονα σε κάποια σημεία και καθόλου σε άλλα.

Η ενζυμική υδρόλυση πολυμερών αποτελεί μία βιώσιμη διεργασία επιφανειακής τροποποίησης και προσδίδει στα υλικά-υφάσματα βελτιωμένες ιδιότητες με αυξημένη υδροφιλικότητα και συνεκδοχικά καλύτερη βαφή, πλύση και διαπερατότητα και εξάτμιση του ιδρώτα. Παράλληλα δεν επηρεάζεται η κύρια μάζα των πολυμερών και δεν υποβαθμίζεται η ποιότητά τους. Η αντίδραση τελείται υπό ήπιες συνθήκες χωρίς τη χρήση χημικών καταλυτών και οργανικών διαλυτών με αποτέλεσμα να αποτελεί μία φιλική προς το περιβάλλον οδό επεξεργασίας με μικρότερο αντίκτυπο στο οικοσύστημα. Παρόμοιες μέθοδοι τροποποίησης μπορούν να εφαρμοστούν για την επιφανειακή επεξεργασία βιοπολυμερών και βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, όπως το PLA για εφαρμογές στη Βιοϊατρική σε συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, στη μηχανική ιστών, στις συσκευασίες στη βιομηχανία τροφίμων, όπως επίσης και στην κλωστοϋφαντουργία.

9.2 Μικροβιακή παραγωγή βιολασεΐνης και εφαρμογή σε συνθετικό ύφασμα για αντιμικροβιακή δράση

Η παραγωγή φυσικών βαφών από βιολογικές πηγές, όπως βακτήρια και μύκητες και η χρήση τους σε διάφορες εφαρμογές, όπως κλωστοϋφαντουργία αποτελεί μία φιλική προς περιβάλλον διεργασία, λόγω της βιοαποικοδομησιμότητάς τους και της αποφυγής οργανικών διαλυτών και ενώσεων που επιβαρύνουν το οικοσύστημα. Ακόμη, ορισμένες βιολογικές βαφές προσδίδουν στο ύφασμα σημαντικές ιδιότητες, όπως η αντιοξειδωτικότητα ή η αντιμικροβιακή δράση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η παραγωγή της χρωστικής βιολασεΐνης από τον *J. lividum* και η χρήση της για την βαφή πολυαμιδικών υφασμάτων. Οι βέλτιστες συνθήκες για μέγιστη παραγωγή βιομάζας και συνεκδοχικά βιολασεΐνης βρέθηκαν να είναι οι 25 ^{o}C, pH 7.0, ενώ η προσθήκη αμπικιλλίνης 0.2 mg/mL οδήγησε σε 1.3 φορές αύξηση της βιολασεΐνης.

Η βιολασεΐνη είναι δύσκολο να εκχυλιστεί και να καθαριστεί και γι' αυτό το λόγο αποτελεί μία ακριβή εμπορική ουσία. Με σκοπό την αύξηση της παραγωγή βιολασεΐνης πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου, υπό ελεγχόμενες συνθήκες pH, θερμοκρασίας, μηχανικής ανάδευσης και αερισμού, στις βέλτιστες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Η ζύμωση του *J. lividum* σε βιοαντιδραστήρα οδήγησε σε μέγιστη συγκέντρωση βιομάζας 0.77 g/L, μετά από επώαση 48 h, διπλάσια παραγωγή σε σχέση με τις καλλιέργειες στις φιάλες Erlenmeyer. και μέγιστη παραγωγή ακατέργαστης βιολασεΐνης στις 72 h με τελική συγκέντρωση 0.368 g/L. Η συγκέντρωση βιολασεΐνης βάσει των μετρήσεων απορρόφησεις στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου ήταν μειωμένη σε σύγκριση με τις φιάλες πιθανόν λόγω καλύτερης παροχής οξυγόνου και σταθερού pH και ως εκ τούτου λιγότερο έντονων συνθηκών στρες στον βιοαντιδραστήρα.

Προς βελτίωση της παραγωγής βιολασεΐνης, πραγματοποιήθηκε προσθήκη γλυκερόλης 1 % (v/v) στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης της βιομάζας σε βιοαντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου. Η προσθήκη γλυκερόλης οδήγησε σε παραγωγή βιομάζας μεγαλύτερη (3.6 g/L) σε 48 h επώασης, επιτυγχάνοντας διπλάσια. Με την προσθήκη γλυκερόλης ο λόγος C/N αυξάνεται και η παραγωγή της βιολασεΐνης ως δευτερογενής μεταβολίτης ευνοείται. Η αύξηση της βιομάζας οδήγησε σε παραγωγή βιολασεΐνης με συγκέντρωση 5 φορές μεγαλύτερη (1.83 g/L) στις 144 h επώασης. Ακόμη η παραγωγή βιολασεΐνης στον αντιδραστήρα ημιδιαλείποντος έργου είναι 35 % μεγαλύτερη από την παραγωγή σε μικρής κλίμακας καλλιέργειες. Η καθαρή βιολασεΐνη αποτελεί το 4.5 % της ακατέργαστης ουσίας που εκχυλίζεται με μεθανόλη.

PA 6.6 υφάσματα βάφτηκαν μέσω τριών διεργασιών: μέσω παράλληλης ζύμωσης και βαφής του υφάσματος (SFD), μέσω επώασης του υφάσματος σε βακτηριακή καλλιέργεια μετά τη ζύμωση και ύστερα από εφαρμογή υπερήχων και τέλος με χρήση της εκχυλισμένης βιολασεΐνης από το εσωκυτταρικό διάλυμα. Οι μέγιστες τιμές ΔΕ και K/S που σημειώθηκαν ήταν 74.81 και 22.01, αντίστοιχα, για υφάσματα που βάφτηκαν μέσω της διεργασίας SFD. Ακόμη τα SFD βαμμένα δείγματα δεν επέδειξαν υποβάθμιση της αντοχής του χρώματος στον όξινο και αλκαλικό ιδρώτα και στο νερό, ωστόσο παρουσίασαν χαμηλή αντοχή που δεν αποτελεί πρόβλημα για εφαρμογή εσωτερικής χρήσης, όπως είναι οι νοσοκομιακές μάσκες, ιατρικές ποδιές, επιθέματα κ.ά. Τα βαμμένα υφάσματα παρουσίασαν αντιοξειδωτική και σημαντική αντιμικροβιακή δράση κατά των μυκήτων *C. albicans, C. parapsilosis* και *C. krusei,* όπως επίσης και κατά των βακτηριακών στελεχών *E. coli* και *S. aureus*, όπως επίσης και του υπερβακτηρίου *S. aureus* MRSA. Επομένως, μία καλλιέργεια *J. lividum* μπορεί να αξιοποιηθεί για παράλληλη παραγωγή βιολασεΐνης και βαφή υφασμάτων μέσω SFD με αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Η βαφή υφασμάτων με μικροβιακή βιολασεΐνη αποτελεί μία βιώσιμη και φιλική προς το περιβάλλον λύση, ενώ η ανάπτυξη βακτηριακών στελεχών τα οποία θα παράγουν βιολασεΐνη και τα οποία θα είναι ικανά να αξιοποιήσουν ανανεώσιμα υποστρώματα για την ανάπτυξή τους, όπως αγροτικά υπολείμματα θα καταστήσει βιώσιμη την διεργασία παραγωγής της μικροβιακής βαφής. Ακόμη η τροποποίηση αυτή προσδίδει στα κλωστοϋφαντουργικά υλικά αντιμικροβιακές ιδιότητες ενάντια σε παθογόνους και επικίνδυνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς που έχουν αποκτήσει ανθεκτικότητα απέναντι σε πληθώρα φαρμάκων και αντιβιοτικών (υπερβακτήρια). Οι αντιμικροβιακές αυτές ιδιότητες των υφασμάτων τα καθιστούν κατάλληλα για χρήση σε ιατρικά ή καθαριστικά υφάσματα, σακούλες φύλαξης και επικαλυπτικά εσωτερικής χρήσης και θα πρέπει να γίνει περαιτέρω μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση.

9.3 Ενζυμική τροποποίηση φυσικών πολυμερών

Τα φυσικά πολυμερή αποτελούν βιοσυμβατές και βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις με ευρύ πεδίο εφαρμογών στα τρόφιμα, σε συσκευασίες, σε κόλλες και σε πολλές ιατρικές εφαρμογές, όπως στα συστήματα μεταφοράς ουσιών, στη μηχανική ιστών και σε επιθέματα. Η τροποποίηση των πολυσακχαριτών, όπως μέσω εστεροποίησης οδηγεί σε βελτίωση κάποιων ιδιοτήτων τους ή πρόσδωση νέων. Προς αυτή την κατεύθυνση μελετήθηκε η δυνατότητα μιας CE2 εστεράσης του

οξικού οξέος από τον *C. thermocellum* να καταλύει την σύνδεση ακυλομάδων σε πολυσακχαρίτες σε συστήματα δύο φάσεων νερού/βινυλεστέρων (οξικού, προπιονικού, βουτυρικού). Αρχικά πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις μετεστεροποίησης μοντέλων υποστρωμάτων, υδατοδιαλυτών μονοσακχαριτών και δισακχαριτών αλδοεξόζων, ώστε να μελετηθεί η συμπεριφορά του ενζύμου και οι συνθήκες τις αντίδρασης. Από αρχικές δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στη D-μαννόζη (Man) με χρήση του προπιονικού βινυλεστέρα ως δότη ακυλομάδας ως βέλτιστες συνθήκες αντίδρασης ορίστηκαν οι: θερμοκρασία 30 ^{o}C, αναλογία νερό:βινυλεστέρας 80:20, ανάδευση 900 rpm, ενζυμικό φορτίο 0.1 mg/mL. Οι ακυλιωμένοι μονοσακχαρίτες και δισακχαρίτες, έπειτα από θετική ποιοτική ανίχνευση με TLC, ποσοτικοποιήθηκαν με HPLC και στη συνέχεια απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ESI–MS. Οι τροποποιημένοι μονοσακχαρίτες παρουσίασαν αποδόσεις ακυλίωσης από 11 έως 65 %, με προτίμηση σε ακυλοδότες βραχείας αλύσου, ενώ οι δισακχαρίτες επέδειξαν αποδόσεις από 23 έως 58 %, με προτίμηση στην μονοακυλίωση. Με NMR ταυτοποιήθηκε η τοποεκλεκτικότητα της εστεράσης στην 6-Ο θέση του δακτυλίου των μονοσακχαριτών που εξετάστηκαν.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενζυμική μετεστεροποίηση τεσσάρων πολυσακχαριτών, των γλυκομαννάνη κονγιάκ, γαλακτομαννάνη χαρουπιάς, 1,4-β-D-μαννάνη και β-γλυκάνη κριθής, τω οποίων οι επαναλαμβανόμενες δομικές μονάδες αποτελούνται από γλυκόζη, γαλακτόζη ή/και μαννόζη. Η μετεστεροποίηση των πολυσακχαριτών επιβεβαιώθηκε με TLC, ύστερα από υδρόλυση ατροποποίητων και τροποποιημένων πολυσακχαριτών με κατάλληλα ένζυμα και FTIR όπου εντοπίστηκε η δημουργία εστερικού δεσμού στα 1735 cm^{-1} και στους τέσσερις πολυσακχαρίτες και για τους τρεις ακυλοδότες. Τέλος η ποσοτικοποίηση των πολυσακχαριτών έλαβε χώρα έμμεσα με μεθανόλυση και ανάλυση HPLC των σχηματιζόμενων μεθυλεστέρων. Ο βαθμός ακυλίωσης αξιολογήθηκε στο εύρος 0.022-1.083 mmol ακυλομάδας ανά g πολυσακχαρίτη, ή αντίστοιχα 0.004-0.177 mol ακυλομάδας ανά mol επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας ανάλογα τη δομή και την σύσταση του πολυσακχαρίτη-στόχου, με την προπυλιωμένη 1,4-β-D-μαννάνη να παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα. Τόσο οι πολυσακχαρίτες όσο και οι δισακχαρίτες παρουσίασαν μία τάση προς τη βουτυλίωση σε σχέση με την ακυλίωση. Σε ένα διφασικό σύστημα η τελική απόδοση μετατροπής είναι ένα συγκερασμός της ενζυμικής εξειδίκευσης όσον αφορά το υπόστρωμα και της διαλυτότητας του προϊόντος στη φάση του βινυλεστέρα (οργανική φάση), όπου το προϊόν προστατεύεται από την υδρόλυση. Όσο το μοριακό βάρος του σακχάρου αυξάνεται, η διαλυτότητα στο νερό μειώνεται

και η προσθήκη ενός πιο υδροφοβικού ακυλο-δότη, όπως είναι ο βουτυρικός βινυλεστέρας, οδηγεί στη σύνθεση ενός τελικού προϊόντος που είναι περισσότερο διαλυτό στην οργανική φάση. Επομένως η ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς τη σύνθεση προπυλιωμένων ή βουτυλιωμένων δισακχαριτών σε αντίθεση με την συνήθη εξειδίκευση των CE2 εστερασών του οξικού. Η διεξαγωγή της ενζυμικής μετεστεροποίησης σε διφασικό σύστημα, δηλαδή σε υδατικό σύστημα κορεσμένο σε βινυλεστέρα/ακυλοδότη, πλεονεκτεί, καθώς η παρουσία του νερού διασφαλίζει την καταλυτική δράση του ενζύμου, ενώ η διεργασία καταλύεται υπό ήπιες συνθήκες και είναι φιλικότερη προς το περιβάλλον.

Οι εξεταζόμενοι πολυσακχαρίτες δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία ως προς την δυνατότητα μετεστεροποίησης τους, ενώ παράλληλα από την έμμεση ποσοτικοποίηση μέσω μεθανόλυσης διαπιστώθηκε πως ο βαθμός υποκατάστης/ακυλίωσης των εξεταζόμενων πολυσακχαριτών είναι από τους υψηλότερους που σημειώνονται στη βιβλιογραφία σε διαφορετικά ωστόσο συστήματα ως προς το υπόστρωμα, τον διαλύτη, το ένζυμο και άλλα.
Ακόμη πρέπει να σημειωθεί πως δεν είναι απαραίτητο να προκύπτουν υψηλοί βαθμοί ακυλίωσης για να θεωρηθεί η διεργασία τροποποίησης επιτυχής, καθώς με διαφορετικούς βαθμούς υποκατάστασης παράγονται τελικά προϊόντα με διαφοροποιημένες ιδιότητες. Περαιτέρω έρευνα μπορεί να εξετάσει τη χρήση των μετεστεροποιμένων αυτών πολσακχαριτών σε εφαρμογές τροφίμων ως σταθεροποιητές, σε καλλυντικά και βιοϊατρικά υλικά.

9.4 Μελλοντικές προκλήσεις

Τα συνθετικά υφάσματα καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέλος της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ινών. Παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα, με πιο σημαντικό από όλα το μειωμένο κόστος παραγωγής τους, ωστόσο η μειωμένη αναπνοή του ιδρώτα και η μη ευχάριστη αίσθηση κατά την ένδυση αποτελούν θέματα προς επίλυση. Ως εκ τούτου η αύξηση της υδροφιλικότητας τους μέσω ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον βιοτεχνολογική οδό βελτίωσης των ιδιοτήτων τους. Η μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να επικεντρωθεί στην λειτουργικοποίηση της επιφάνειας συνθετικών ινών μέσω ενζυμικών ή χημικό-ενζυμικών διεργασιών με την πρόσδεση ευεργετικών για την επιδερμίδα ενώσεων επί της επιφάνειας για καλλυντική ή φαρμακευτική χρήση. Ενδεικτικά θα μπορούσε να εξεταστεί η πρόσδεση βιολογικών μορίων, όπως πρωτεΐνες ή βιταμίνες. Ακόμη θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η επιφανειακή τροποποίηση με χρήση λακκασών για την πρόσδεση αντιοξειδωτικών μορίων, όπως

η κατεχόλη, η τυροσόλη και το γαλλικό ή φερουλικό οξύ. Η επιφανειακή τροποποίηση επίσης μπορεί να αποσκοπεί στην αναβάθμιση του κλωστοϋφαντουργικού προϊόντος για νοσοκομιακή χρήση με την μετέπειτα πρόσδεση αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως φαινολικά παράγωγά, ή την ακινητοποποίηση επί της επιφάνειας αντιμικροβιακών ενζύμων (λυσοζύμη). Επιπρόσθετα, η ενζυμική τροποποίηση μπορεί να αποσκοπεί στην καλύτερη προσκόλληση μικροκάψουλων που περιέχουν κάποια ευεργετική ουσία, όπως η αλόη, ενώ υπάρχει και η ανάγκη καλύτερης προσκόλλησης συνθετικών ινών στην επιφάνεια άλλων υλικών. Χαρακτηριστκά έχει αναφερθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία η ενζυμική τροποποίηση HMLS-PET (high modulus low shrinkage –PET) ινών για καλύτερη πρόσφυση σε λάστιχα αυτοκινήτων.

Η βιολασεΐνη αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη χημική ένωση με πολύ καλές αντιμικροβιακές ιδιότητες. Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε η παραγωγή της από το άγριο στέλεχος *J. lividum* σε βιοαντιδραστήρα. Στο μέλλον θα μπορούσε να εξεταστεί η βελτίωση της απόδοσης παραγωγής βιομάζας και της εκκρινόμενης βιολασεΐνης σε βιοαντιδραστήρα με συνεχή προσθήκη γλυκερόλης, ενώ θα ήταν δόκιμη και η αξιοποίηση οικιακών αποβλήτων ή παραπροϊόντων λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας ως θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη του *J. lividum* που την παράγει. Η βιολασεΐνη στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την βαφή πολυαμιδικών υφασμάτων τα οποία απέκτησαν αντιμικροβιακές ιδιότητες. Στα βαμμένα πολυαμιδικά υφάσματα θα πρέπει να γίνει έλεγχος πιθανής αλλεργιογόνου δράσης ή πρόκλησης ερεθισμού στο δέρμα. Ακόμη θα μπορούσε να εξεταστεί η βαφή μεγαλύτερης γκάμας συνθετικών και φυσικών υφασμάτων. Σε επόμενο στάδιο θα μπορούσε να δοκιμαστεί ο εγκλεισμός της βιολασεΐνης σε πολυμερικές μήτρες και η μελέτη απελευθέρωσης της, με σκοπό τη εφαρμογή σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκου, σε συσκευασίες τροφίμων ή σε αντιηλιακά για αύξηση του βαθμού UPF.

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν βιοπολυμερή που βρίσκουν εφαρμογή σε βιομηχανικές εφαρμογές στα τρόφιμα, σε κόλλες, σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα και στην Ιατρική. Πολλές φορές ωστόσο η εφαρμογή τους μπορεί να περιορίζεται λόγω ακατάλληλης ισορροπίας υδροφιλικού/ υδροφοβικού χαρακτήρα. Η ενζυμική τροποποίηση αποτελεί μία πράσινη λύση για εξειδικευμένη και τοποεκλεκτική δράση με αποτέλεσμα την βελτίωση των ιδιοτήτων τους και την διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών. Πολυσακχαρίτες, όπως η β-γλυκάνη χρησιμοποιείται στην παρασκευή καλλυντικών και στα τρόφιμα. Σε αυτούς τους πολυσακχαρίτες θα παρουσίαζε ενδιαφέρον η ενζυμική πρόσδεση βιταμινών και πρωτεϊνικών

μορίων, όπως το κολλαγόνο, και αντιοξειδωτικών παραγόντων. Ακόμη, η μελέτη πρόσδεσης πρωτεϊνών, όπως η λαμινίνη και το κολλαγόνο, και βιοενεργών ουσιών, όπως η ηπαρίνη σε πολυσακχαρίτες είναι πολύ σημαντική για εφαρμογή σε συσκευές εγκλεισμού φαρμάκων ή νησίδων κυττάρων για θεραπεία διάφορων ασθενειών. Η τροποποίηση των πολυσακχαριτών μπορεί επίσης να αποσκοπεί στην αποτελεσματική προσκόλληση άλλων υλικών, όπως κάποιου συνθετικού πολυμερούς.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Adak S, Banerjee R (2016) A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactant. Carbohydr Polym 150:359–368.

Ahmad WA, Ahmad WYW, Zakaria ZA, Zulaikha YN (2012a) Application of Bacterial Pigments as Colorant. SpringerBriefs in Molecular Science

Ahmad WA, Yusof NZ, Nordin N, Zakaria ZA, Rezali MF (2012b) Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated Chromobacterium violaceum Grown in Agricultural Wastes. Appl Biochem Biotechnol 167:1220–1234.

Ahmetagic A, Pemberton JM (2010) Stable high level expression of the violacein indolocarbazole anti-tumour gene cluster and the Streptomyces lividans amyA gene in E. coli K12. Plasmid 63:79–85.

Alihosseini F, Ju K-S, Lango J, Hammock BD, Sun G (2008) Antibacterial Colorants: Characterization of Prodiginines and Their Applications on Textile Materials. Biotechnol Prog 24:742–747.

Alisch-Mark M, Herrmann A, Zimmermann W (2006) Increase of the hydrophilicity of polyethylene terephthalate fibres by hydrolases from Thermomonospora fusca and Fusarium solani f. sp. pisi. Biotechnol Lett 28:681–685.

Alisch M, Feuerhack A, Müller H, Mensak B, Andreaus J, Zimmermann W (2004) Biocatalytic modification of polyethylene terephthalate fibres by esterases from actinomycete isolates. Biocatal Biotransformation 22:347–351.

Alissandratos A, Baudendistel N, Flitsch SL, Hauer B, Halling PJ (2010) Lipase-catalysed acylation of starch and determination of the degree of substitution by methanolysis and GC. BMC Biotechnol 10:82.

Almansa E, Heumann S, Eberl A, Kaufmann F, Cavaco-paulo A, Gübitz GM (2008) Surface hydrolysis of polyamide with a new polyamidase from *Beauveria brongniartii*. Biocatal Biotransformation 26:371–377.

Alpert PT (2017) Superbugs: Antibiotic Resistance Is Becoming a Major Public Health Concern. Home Health Care Manag Pract 29:130–133.

Alves SP, Brum DM, Branco de Andrade ÉC, Pereira Netto AD (2008) Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. Food Chem 107:489–496.

Ambrožič Avguštin J, Žgur Bertok D, Kostanjšek R, Avguštin G (2013) Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis sp. nov*. Antonie Van Leeuwenhoek 103:763–769.

Amnuaikit T, Chusuit T, Raknam P, Boonme P (2011) Effects of a cellulose mask synthesized by a bacterium on facial skin characteristics and user satisfaction. Med Devices (Auckl) 4:77–81.

Andersen BK, Borch K, Abo M, Damgaard B (1998) Method of treating polyester fabrics. US Patent: US5997584A

Andrighetti-Fröhner C, Antonio R, Creczynski-Pasa T, Barardi C, Simões C (2003) Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. Mem Inst Oswaldo Cruz 98:843–848.

Aranda S, Montes-Borrego M, Landa BB (2011) Purple-Pigmented Violacein-Producing *Duganella spp.* Inhabit the Rhizosphere of Wild and Cultivated Olives in Southern Spain. Microb Ecol 62:446–459.

Araújo R, Silva C, O'Neill A, Micaelo N, Guebitz G, Soares CM, Casal M, Cavaco-Paulo A (2007) Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6,6 fibers. J Biotechnol 128:849–857.

Armstrong DG, Najafi B, Shahinpoor M (2017) Potential Applications of Smart Multifunctional Wearable Materials to Gerontology. Gerontology 63:287–298.

Aruguete DM, Kim B, Hochella MF, Ma Y, Cheng Y, Hoegh A, Liu J, Pruden A (2013) Antimicrobial nanotechnology: its potential for the effective management of microbial drug resistance and implications for research needs in microbial nanotoxicology. Environ Sci Process Impacts 15:93–102.

August PR., Grossman TH., Minor C, Draper MP., Macneil IA, Pemberton JM, Call KM, Holt D, Osburne MS. (2000). Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum.* JMMB Research Article. J. Mol. Microbiol. Biotechnol 2(4):513–519.

Baek SH, Kang HS, Jang IH, Lee JS, Kim SY, Baek JH, Kang JG, Ahn JM (2007) Insecticide and fungicide containing violacein, and their preparation method. Repub Korean Kongkae Taeho Kongbo KR 2007088150 A

Bahtiyari MI (2011) Laser modification of polyamide fabrics. Opt Laser Technol 43:114–118.

Baker PJ, Poultney C, Liu Z, Gross R, Montclare JK (2012) Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. Appl Microbiol Biotechnol 93:229–240.

Baker RA, Tatum JH (1998) Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. J Ferment Bioeng 85:359–361.

Baldani, J. I., Rouws, L., Cruz, L. M., Olivares, F. L., Schmid, M., & Hartmann, A. (2014). The Family *Oxalobacteraceae*. In The Prokaryotes (pp. 919–974). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Biely P, Wong KKY, Suckling ID, Špániková S (2003) Transacetylations to carbohydrates catalyzed by acetylxylan esterase in the presence of organic solvent. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1623:62–71.

Bishop PA, Balilonis G, Davis JK, Zhang Y (2013) Ergonomics and Comfort in Protective and Sport Clothing : A Brief Review. J Ergonomics.

Borreguero I, Carvalho CML, Cabral JMS, Sinisterra JV, Alcántara AR (2001) Enantioselective properties of Fusarium solani pisi cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. J Mol Catal B Enzym 11:613–622.

Bounias M (1980) Silica gel-precoated sheets (Merck Ref. 5748) are buffered by dipping the plates into a 0.3. Anal Biochem 295:291–295.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254.

Bromberg N, Dreyfuss JL, Regatieri C V, Palladino M V, Durán N, Nader HB, Haun M, Justo GZ (2010) Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. Chem Biol Interact 186:43–52.

Brucker RM, Harris RN, Schwantes CR, Gallaher TN, Flaherty DC, Lam BA, Minbiole KPC (2008) Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander Plethodon cinereus. J Chem Ecol 34:1422–1429.

Brueckner T, Eberl A, Heumann S, Rabe M, Guebitz GM (2008) Enzymatic and Chemical Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate) Fabrics. J Polym Sci Part A Polym Chem 46:6435–6443.

Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: a review. Can J Microbiol 44:1115–1136.

Calado CR., Ferreira BS, da Fonseca MM., Cabral JM., Fonseca LP (2004) Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. J Biotechnol 109:147–158.

Campestrini LH, Silveira JLM, Duarte MER, Koop HS, Noseda MD (2013) NMR and rheological study of Aloe barbadensis partially acetylated glucomannan. Carbohydr Polym 94:511–519.

Cao W, Chen W, Sun S, Guo P, Jirong S, Tian C (2007) Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. J Mol Struct THEOCHEM 817:1–4.

Carosio S, Monero A (2004) Smart and Hybrid Materials: Perspectives for their Use in Textile Structures for Better Health Care. In: Wearable eHealth Systems for Personalised Health Management. IOS Press, pp 335–354

Cazón P, Velazquez G, Ramírez JA, Vázquez M (2017) Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. Food Hydrocoll 68:136–148.

Cazoto LL, Martins D, Ribeiro MG, Durán N, Nakazato G (2011) Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. J Antibiot (Tokyo) 64:395–397.

Chang SW, Shaw JF (2009) Biocatalysis for the production of carbohydrate esters. N Biotechnol 26:109–116.

Chaudhari V, Gosai H, Raval S, Kothari V (2014) Effect of certain natural products and organic solvents on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum.* Asian Pac J Trop Med 7:S204–S211.

Chen Z-G, Zong M-H, Li G-J (2006a) Lipase-catalyzed modification of konjac glucomannan. J Appl Polym Sci 102:1335–1340.

Chen Z-G, Zong M-H, Li G-J (2006b) Lipase-catalyzed acylation of konjac glucomannan in organic media. Process Biochem 41:1514–1520.

Chen ZG, Zhang DN, Han Y Bin (2013) Lipase-catalyzed acylation of lily polysaccharide in ionic liquid-containing systems. Process Biochem 48:620–624.

Cheng HN, Gu Q-M (2012) Enzyme-Catalyzed Modifications of Polysaccharides and Poly(ethylene glycol). Polymers (Basel) 4:1311–1330.

Cheng HN, Gu QM, Qiao L (2005) Reactions of enzymes with non-substrate polymers. Polym Biocatal Biomater 900:267–278.

Choi SY, Kim S, Lyuck S, Kim SB, Mitchell RJ (2015a) High-level production of violacein by the newly isolated Duganella violaceinigra str . NI28 and its impact on Staphylococcus aureus. Sci Rep 1–12.

Choi SY, Yoon K, Lee J Il, Mitchell RJ (2015b) Violacein: Properties and Production of a Versatile Bacterial Pigment. BioMed Res Int Type 1–8.

Chung K-T, Stevens SE, Cerniglia CE (1992) The Reduction of Azo Dyes by the Intestinal Microflora. Crit Rev Microbiol 18:175–190.

Clinton SK (2009) Lycopene: Chemistry, Biology, and Implications for Human Health and Disease. Nutr Rev 56:35–51.

Cristea D, Vilarem G (2006) Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. Dye Pigment 70:238–245.

Costa FTM, Justo GZ, Durán N, Nogueira PA, Lopes SCP (2005) The use of violacein in its free and encapsulated form in polymeric systems against malaria. Brazilian Patent PIBr 056399-0

Cristea D, Vilarem G (2006) Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. Dye Pigment 70:238–245.

Cyras VP, Tolosa Zenklusen MC, Vazquez A (2006) Relationship between structure and properties of modified potato starch biodegradable films. J Appl Polym Sci 101:4313–4319.

D'Ayala G, Malinconico M, Laurienzo P (2008) Marine Derived Polysaccharides for Biomedical Applications: Chemical Modification Approaches. Molecules 13:2069–2106.

Dang HT, Yotsumoto K, Enomoto K (2014) Draft Genome Sequence of Violacein-Producing Marine *Bacterium Pseudoalteromonas sp*. 520P1. Genome Announc. 2(6) e01346-14.

Deguchi T, Kitaoka Y, Kakezawa M, Nishida T (1998) Purification and characterization of a nylon-degrading enzyme. Appl Environ Microbiol 64:1366–71.

Degueil-Castaing M, De Jeso B, Drouillard S, Maillard B (1987) Enzymatic reactions in organic synthesis: 2-ester interchange of vinyl esters. Tetrahedron Lett 28:953–954.

Demain AL (1980) Microbial production of primary metabolites. Naturwissenschaften 67:582–587.

Demmig-Adams B, Adams WW (2002) Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. Science 298:2149–2153.

DeMoss RD, Happel ME (1959) Nutritional requirements of *Chromobacterium violaceum.* J Bacteriol 77:137–41.

Desai T, Shea LD (2017) Advances in islet encapsulation technologies. Nat Rev Drug Discov 16:338–350.

Djordjevic D, Petronijevic Z, Cvetkovic D (2005) Polyester fabric modification by some lipases. Chem Ind Chem Eng Q 11:183–188.

Dodane V, Vilivalam VD (1998) Pharmaceutical applications of chitosan. Pharm Sci Technolo Today 1:246–253.

Domon B, Costello CE (1988) A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. Glycoconj J 5:397–409.

Donelli I, Taddei P, Smet PF, Poelman D, Nierstrasz V a., Freddi G (2009) Enzymatic surface modification and functionalization of PET: A water contact angle, FTIR, and fluorescence spectroscopy study. Biotechnol Bioeng 103:845–856.

Doyle S, Pethrick RA, Harris RK, Lane JM, Packer KJ, Heatley F (1986) ^{13}C nuclear magnetic resonance studies of cellulose acetate in the solution and solid states. Polymer 27:19–24.

Du B, Yang R, Xie XM (2014) Investigation of hydrolysis in poly(ethylene terephthalate) by FTIR-ATR. Chinese J Polym Sci 32:230–235.

Du J, Sun R, Zhang S, Zhang L-F, Xiong C-D, Peng Y-X (2005) Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. I. Physicochemical characterization of the carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles. Biopolymers 78:1–8.

Dufossé L (2006) Microbial Production of Food Grade Pigments. Food Technol Biotehnol 44:313–321.

Durán M, Ponezi AN, Faljoni-Alario A, Teixeira MFS, Justo GZ, Durán N (2012) Potential applications of violacein: A microbial pigment. Med Chem Res 21:1524–1532.

Duran N, De Azevedo MMM (2004) Compound incorporated in a polymeric nanoparticle with pharmaceutical or a cosmetic, its preparation process and cosmetic or pharmaceutical formula- tions. Brazilian Patent PIBr 0404306-5

Durán N, Justo GZ, Ferreira C V, Melo PS, Cordi L, Martins D (2007) Violacein : properties and biological

activities. Biotechnol Appl Biochem 48:127–133.

Eberl A, Heumann S, Brückner T, Araujo R, Cavaco-Paulo A, Kaufmann F, Kroutil W, Guebitz GM (2009) Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. J Biotechnol 143:207–212.

Eichlerová I, Homolka L, Nerud F (2006) Synthetic dye decolorization capacity of white rot fungus *Dichomitus squalens.* Bioresour Technol 97:2153–2159.

El-ola SMA, Moharam ME, Eladwi MM, El-bendary MA (2014) Optimum conditions for polyamide fabric modification by protease enzyme produced by *Bacillus sp*. IJFTR 39(1):65–71.

Enomoto-Rogers Y, Ohmomo Y, Iwata T (2013) Syntheses and characterization of konjac glucomannan acetate and their thermal and mechanical properties. Carbohydr Polym 92:1827–1834.

Fang M-Y, Zhang C, Yang S, Cui J-Y, Jiang P-X, Lou K, Wachi M, Xing X-H (2015) High crude violacein production from glucose by *Escherichia coli* engineered with interactive control of tryptophan pathway and violacein biosynthetic pathway. Microb Cell Fact 14:8.

Ferreira CV, Bos CL, Versteeg HH, Justo GZ, Durán N, Peppelenbosch MP (2004) Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. Blood 104:1459–64. doi: 10.1182/blood-2004-02-0594

Firn RD, Jones CG (2003) Natural products-a simple model to explain chemical diversity. Nat Prod Rep 20:382.

Fischer-Colbrie G, Herrmann M, Heumann S, Puolakka A, Wirth A, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM (2006) Surface modification of polyacrylonitrile with nitrile hydratase and amidase from *Agrobacterium tumefaciens*. Biocatal Biotransformation 24:419–425.

Fischer S, Thümmler K, Volkert B, Hettrich K, Schmidt I, Fischer K (2008) Properties and Applications of Cellulose Acetate. Macromol Symp 262:89–96.

Forgacs E, Cserháti T, Oros G (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. Environ Int 30:953–971.

Frandsen RJN, Nielsen NJ, Maolanon N, Sorensen JC, Olsson S, Nielsen J, Giese H (2006) The biosynthetic pathway for aurofusarin in *Fusarium graminearum* reveals a close link between the naphthoquinones and naphthopyrones. Mol Microbiol 61:1069–1080.

Friedrich J, Zalar P, Mohorčič M, Klun U, Kržan A (2007) Ability of fungi to degrade synthetic polymer nylon-6. Chemosphere 67:2089–2095.

Galaup P, Flamin C, Carlet E, Dufossé L (2005) HPLC analysis of the pigments produced by the microflora isolated from the “Protected Designation of Origin” French red-smear soft cheeses Munster, Epoisses, Reblochon and Livarot. Food Res Int 38:855–860.

Gamerith C, Gajda M, Ortner A, Acero EH, Guebitz GM, Ulbricht M (2017) Enzymatic hydrolysis of poly(ethyleneterephthalate) used for and analysed by pore modification of track-etched membranes. N Biotechnol 39:42–50.

Ganske F, Bornscheuer UT (2005) Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. J Mol Catal B Enzym 36:40–42.

Gao Y, Katsuraya K, Kaneko Y, Mimura T, Nakashima H, Uryu T (1998) Synthesis of Azidothymidine-Bound Sulfated Alkyl Oligosaccharides and Their Inhibitory Effects on AIDS Virus Infection in vitro. Polym J 30:243–248.

Gashti MP, Assefipour R, Kiumarsi A, Gashti MP (2013) Enzymatic surface hydrolysis of polyamide 6,6 with mixtures of proteolytic and lipolytic enzymes. Prep Biochem Biotechnol 43:798–814.

Goddard JM, Hotchkiss JH (2007) Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. Prog Polym Sci 32:698–725.

Goodwin TW (1965) Chemistry and biochemistry of plant pigments. CABI

Costa FTM, Justo GZ, Durán N, Nogueira PA, Lopes SCP (2005) The use of violacein in its free and encapsulated form in polymeric systems against malaria. Brazilian Patent PIBr 056399-0.

Gounot AM (1986) Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. Experientia 42:1192–7.

Gübitz GM, Paulo AC (2003) New substrates for reliable enzymes: Enzymatic modification of polymers. Curr Opin Biotechnol 14:577–582.

Guebitz GM, Cavaco-Paulo A (2008) Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. Trends Biotechnol 26:32–38.

Guo H., Heinämäki J, Yliruusi J (2002) Amylopectin as a subcoating material improves the acidic resistance of enteric-coated pellets containing a freely soluble drug. Int J Pharm 235:79–86.

Gupta, D., and Bhaumik, S. (2007). Antimicrobial treatments for textiles. *Indian J. Fibre Text. Res.* 32, 254–263.

Hakvåg S, Fjærvik E, Klinkenberg G, Borgos SEF, Josefsen KD, Ellingsen TE, Zotchev SB (2009) Violacein-Producing *Collimonas sp.* from the Sea Surface Microlayer of Costal Waters in Trøndelag, Norway. Mar Drugs 7:576–588.

Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, Minbiole KPC (2009) Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. ISME J 3:818–824.

Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb Technol 39:235–251.

Hatziavramidis DT, Karatzas TM, Chrousos GP (2013) Pancreatic islet cell transplantation: An update. Ann Biomed Eng 41:469–476.

Heinze T, Liebert T, Koschella A (2006) Esterification of Polysaccharides. Springer Laboratory

Hendry GAF, Houghton JD (1996) Natural food colorants. Blackie Academic & Professional

Herrero Acero E, Ribitsch D, Steinkellner G, Gruber K, Greimel K, Eiteljoerg I, Trotscha E, Wei R, Zimmermann W, Zinn M, Cavaco-Paulo A, Freddi G, Schwab H, Guebitz G (2011) Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida.* Macromolecules 44:4632–4640.

Heumann S, Eberl A, Pobeheim H, Liebminger S, Fischer-Colbrie G, Almansa E, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (2006) New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres. J Biochem Biophys Methods 69:89–99.

Hiraishi T, Hirahara Y, Doi Y, Maeda M, Taguchi S (2006) Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] (PHB) depolymerase from Ralstonia pickettii T1 on PHB degradation. Appl Environ Microbiol 72:7331–8.

Hong, K. H. (2014). Preparation and properties of multi-functional cotton fabric treated by gallnut extract.

Text. Res. J. 84, 1138–1146.

Hsieh Y-L, Cram LA (1998) Enzymatic Hydrolysis to Improve Wetting and Absorbency of Polyester Fabrics. Text Res J 68:311–319.

Hu T-L (2001) Kinetics of azoreductase and assessment of toxicity of metabolic products from azo dyes by Pseudomonas luteola. Water Science and Technology 43(2):261-269.

Iyigundogdu, Z. U., Demir, O., Asutay, A. B., and Sahin, F. (2017). Developing Novel Antimicrobial and Antiviral Textile Products. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 181, 1155–1166.

Jaworska M, Szulińska Z, Wilk M, Anuszewska E (2005) Separation of synthetic food colourants in the mixed micellar system: Application to pharmaceutical analysis. J Chromatogr A 1081:42–47.

Jiang P, Wang H, Xiao S, Fang M, Zhang R, He S, Lou K, Xing X-H (2012) Pathway redesign for deoxyviolacein biosynthesis in *Citrobacter freundii* and characterization of this pigment. Appl Microbiol Biotechnol 94:1521–1532.

Jiang P, Wang H, Zhang C, Lou K, Xing X-H (2010) Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella sp.* B2 in different heterologous hosts. Appl Microbiol Biotechnol 86:1077–1088.

Jo W, Bak JH, Yoo B (2018) Rheological characterizations of concentrated binary gum mixtures with xanthan gum and galactomannans. Int J Biol Macromol 114:263–269.

Kamel MM, El-Shishtawy RM, Yussef BM, Mashaly H (2005) Ultrasonic assisted dyeing: III. Dyeing of wool with lac as a natural dye. Dye Pigment 65:103–110.

Karaki N, Aljawish A, Humeau C, Muniglia L, Jasniewski J (2016) Enzymatic modification of polysaccharides: Mechanisms, properties, and potential applications: A review. Enzyme Microb Technol 90:1–18.

Karnaouri AC, Topakas E, Christakopoulos P (2014) Cloning, expression, and characterization of a thermostable GH7 endoglucanase from Myceliophthora thermophila capable of high-consistency enzymatic liquefaction. Appl Microbiol Biotechnol 98:231–242.

Kato H, Hayase F (2002) An approach to estimate the chemical structure of melanoidins. Int Congr Ser 1245:3–7.

Kato K, Matsuda K (1969) Studies on the Chemical Structure of Konjac Mannan. Agric Biol Chem 33:1446–1453.

Katsimpouras C, Dimarogona M, Petropoulos P, Christakopoulos P, Topakas E (2016) A thermostable GH26 endo-β-mannanase from *Myceliophthora thermophila* capable of enhancing lignocellulose degradation. Appl Microbiol Biotechnol 100(19):8385-97.

Khoddami A, Morshed M, Tavanai H (2001) Effects of Enzymatic Hydrolysis on Drawn Polyester Filament Yarns. Polym. J. 10:363–370.

Kim H-A, Choi J-H, Takizawa S (2007) Comparison of initial filtration resistance by pretreatment processes in the nanofiltration for drinking water treatment. Sep Purif Technol 56:354–362.

Kim H, Han S, Lee C, Lee K, Park S, Kim Y (2003) Use of prodigiosin for treating diabetes mellitus. US Patent: US6638968B1

Kim HR, Seo HY (2013) Enzymatic hydrolysis of polyamide fabric by using acylase. Text Res J 83(11).

Kisner A, Rainert KT, Ferrari F, Nau CT, Barcellos IO, Pezzin SH, Andreaus J (2013) Chemical

functionalization of polyamide 6.6 fabrics. React Funct Polym 73:1349–1356.

Kiumarsi A, Parvinzadeh M (2010) Enzymatic Hydrolysis of Nylon 6 Fiber Using Lipolytic Enzyme. J ofAppliedPolymer Sci 116:3140–3147.

Klemm D, Philipp B, Heinze T, Heinze U, Wagenknecht W General Considerations on Structure and Reactivity of Cellulose: Section 2.1–2.1.4. In: Comprehensive Cellulose Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, pp 9–29

Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature 409:241–246.

Kocabıyık S, Erdem B (2002) Intracellular alkaline proteases produced by thermoacidophiles : detection of protease heterogeneity by gelatin zymography and polymerase chain reaction (PCR). 84:29–33.

Kodach LL, Bos CL, Durán N, Peppelenbosch MP, Ferreira C V., Hardwick JCH (2006) Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. Carcinogenesis 27:508–516.

Konzen M, De Marco D, Cordova CAS, Vieira TO, Antonio R V, Creczynski-Pasa TB (2006) Antioxidant properties of violacein : Possible relation on its biological function. Bioorg Med Chem 14:8307–8313.

Koroskenyi B, McCarthy SP (2001) Synthesis of Acetylated Konjac Glucomannan and Effect of Degree of Acetylation on Water Absorbency. Biomacromolecules 2:824–826.

Kremnický L, Biely P (2005) Unique mode of acetylation of oligosaccharides in aqueous two-phase system by *Trichoderma reesei* acetyl esterase. J Mol Catal B Enzym 37:72–78.

Kremnický LL, Mastihuba VV, Côté GL (2004) *Trichoderma reesei* acetyl esterase catalyzes transesterification in water. J Mol Catal B Enzym 30:229–239.

Kumar P, Kumar P, Barrett DM, Barrett DM, Delwiche MJ, Delwiche MJ, Stroeve P, Stroeve P (2009) Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. Ind Eng Chem (Analytical Ed 48:3713–3729.

Kumar R, Patil MB, Patil SR, Paschapur MS Polysaccharides Based Colon Specific Drug delivery: A Review. Int J PharmTech Res 1:334–346.

Kwon A, Kato M, Kawamura H, Yanai Y, Tokura H (1998) Physiological significance of hydrophilic and hydrophobic textile materials during intermittent exercise in humans under the influence of warm ambient temperature with and without wind. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 78:487–493.

Laatsch H, Thomson RH, Cox PJ (1984) Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. J Chem Soc Perkin Trans 2 0:1331.

Laskarakis A, Logothetidis S, Kassavetis S, Papaioannou E (2008) Surface modification of poly(ethylene terephthalate) polymeric films for flexible electronics applications. Thin Solid Films 516:1443–1448.

Lee SH, Song WS (2010) Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment. Fibers Polym 11:54–59.

Leon LL, Miranda CC, De Souza AO, Durán N (2001) Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. J Antimicrob Chemother J Antimicrob Chemother 48:445–458.

Li JX, Wang J, Shen LR, Xu ZJ, Li P, Wan GJ, Huang N (2007) The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior. Surf Coatings Technol 201:8155–8159.

Li M, Deng T, Liu S, Zhang F, Zhang G (2014) Superhydrophilic surface modification of fabric via coating with nano-TiO2 by UV and alkaline treatment. Appl Surf Sci 297:147–152.

Li W-J, Zhang Y-Q, Park D-J, Li C-T, Xu L-H, Kim C-J, Jiang C-L (2004) *Duganella violaceinigra sp.* nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. Int J Syst Evol Microbiol 54:1811–1814.

Lichstein HC, Van De Sand VF (1945) Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium Violaceum*. J. Infect. Dis. 76:47–51.

Liebminger S, Eberl A, Sousa F, Heumann S, Fischer-Colbrie G, Cavaco-Paulo A, Guebitz GM (2007) Hydrolysis of PET and bis-(benzoyloxyethyl) terephthalate with a new polyesterase from *Penicillium citrinum*. Biocatal Biotransformation 25:171–177.

Liu GY, Nizet V (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. Trends Microbiol 17:406–413.

Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z (2008) Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev 60:1650–1662.

Llorca E, Hernando I, Pérez-Munuera I, Quiles A, Larrea V, Fiszman SM, Lluch MÁ (2005) Microstructural study of frozen batter-coated squid rings prepared by an innovative process without a pre-frying step. Food Hydrocoll 19:297–302.

Lopes SCP, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira PA, Rodrigues FLS, Goelnitz U, Wunderlich G, Facchini G, Brocchi M, Durán N, Costa FTM (2009) Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits Plasmodium growth in vitro and in vivo. Antimicrob Agents Chemother 53:2149–52.

Lorquin J, Molouba F, Dreyfus BL (1997) Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic bradyrhizobium strains. Appl Environ Microbiol 63:1151–4.

Lu Y, Wang L, Xue Y, Zhang C, Xing X-H, Lou K, Zhang Z, Li Y, Zhang G, Bi J, Su Z (2009) Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang , China. Biochem Eng J 43:135–141.

Gustavsson M,Persson P, Iversen T, Hult K, Martinelle M (2003) Polyester Coating of Cellulose Fiber Surfaces Catalyzed by a Cellulose-Binding Module-Candida Antarctica Lipase B Fusion Protein. Biomacromolecules 5(1):106-112

Mapari SA, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U (2005) Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. Curr Opin Biotechnol 16:231–238.

March J (1992) Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure. Wiley

Marques C, Ferreira JMF, Andronescu E, Ficai D, Sonmez M, Ficai A (2014) Multifunctional materials for bone cancer treatment. Int J Nanomedicine 9:2713–25.

Martins D, Costa FTM, Brocchi M, Durán N (2011) Evaluation of the antibacterial activity of poly- (D , L -lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. J Nanoparticle Res 13:355–363.

Masuelli L, Pantanella F, La Regina G, Benvenuto M, Fantini M, Mattera R, Di Stefano E, Mattei M, Silvestri R, Schippa S, Manzari V, Modesti A, Bei R (2016) Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. Tumor Biol 37:3705–3717.

Matamá T, Vaz F, Gübitz GM, Cavaco-Paulo A (2006) The effect of additives and mechanical agitation in surface modification of acrylic fibres by cutinase and esterase. Biotechnol J 1:842–849.

Matz C, Deines P, Boenigk J, Arndt H, Eberl L, Kjelleberg S, Jurgens K (2004) Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. Appl Environ Microbiol 70:1593–1599.

Matz C, Webb JS, Schupp PJ, Phang SY, Penesyan A, Egan S, Steinberg P, Kjelleberg S (2008) Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. PLoS One 3:e2744.

McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GSAB, Williams P (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum:* exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology 143:3703–3711.

McCleary B V. (1986) Enzymatic modification of plant polysaccharides. Int J Biol Macromol 8:349–354.

McCord MG, Hwang YJ, Hauser PJ, Qiu Y, Cuomo JJ, Hankins OE, Bourham MA, Canup LK (2002) Modifying Nylon and Polypropylene Fabrics with Atmospheric Pressure Plasmas. Text Res J 72:491–498.

Medentsev AG, Akimenko VK (1998) Naphthoquinone metabolites of the fungi. Phytochemistry 47:935–959.

Meiring U, Lanzendoerfer G, Riedel H, Kallmayer V, Viala S, Mocigemba N, Schaefer J (2007) Cosmetic preparations con- taining violacein as dye. Ger Offen DE 102005051869:A1

Melo P da S, Maria SS, Vidal B de C, Haun M, Durán N (2000) Violacein Cytotoxicity and Induction of Apoptosis in V79 Cells. Vitr Cell Dev Biol 36:539–543.

Mendes AS, de Carvalho JE, Duarte MCT, Durán N, Bruns, Roy E (2001a) Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. Biotechnol Lett 23 23:1963–1969.

Mendes AS, De Carvalho JE, Duarte MCT, Durán N, Bruns RE (2001b) Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. Biotechnol Lett 23:1963–1969.

Mocanu, G., Nichifor, M., Mihai, D., and Oproiu, L. C. (2013). Bioactive cotton fabrics containing chitosan and biologically active substances extracted from plants. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 72–77.

Michels A, Pütz A, Maurer KH, Eggert T, Jäger KE (2006) Esterases for separating plastics. US Patent: US8580549B2

Morçöl T, Subramanian A, Velander WH (1997) Dot-blot analysis of the degree of covalent modification of proteins and antibodies at amino groups. J Immunol Methods 203:45–53.

Moss MO, Ryall C, Logan NA (1978) The classification and characterization of chromobacteria from a lowland river. J Gen Microbiol 105:11–21.

Mueller R-J (2006) Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. Process Biochem 41:2124–2128.

Müller RJ, Schrader H, Profe J, Dresler K, Deckwer WD (2005) Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. Macromol Rapid Commun 26:1400–1405.

Nagia FA, EL-Mohamedy RSR (2007) Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. Dye Pigment 75:550–555.

Nakamura Y, Asada C, Sawada T (2003) Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium

RT102 strain. Biotechnol Bioprocess Eng 8:37–40.

Nakamura A, Magae J, Tsuji RF, Yamasaki M, Nagai K (1989) Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. Transplantation 47:1013–1016

Nakamura Y, Sawada T, Morita Y, Tamiya E (2002) Isolation of a psychrotrophic bacterium from the organic residue of a water tank keeping rainbow trout and antibacterial effect of violet pigment produced from the strain. Biochem Eng J 12:79–86.

Negoro S, Ohki T, Shibata N, Sasa K, Hayashi H, Nakano H, Yasuhira K, Kato DI, Takeo M, Higuchi Y (2007) Nylon-oligomer Degrading Enzyme/Substrate Complex: Catalytic Mechanism of 6-Aminohexanoate-dimer Hydrolase. J Mol Biol 370:142–156.

Nimchua T, Punnapayak H, Zimmermann W (2007) Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani f. sp.pisi*. Biotechnol J 2:361–364.

Nurunnabi M, Revuri V, Huh KM, Lee Y (2017) Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system. In: Nanostructures for Oral Medicine. Elsevier, pp 409–433

O'Neill A, Cavaco-Paulo A (2004) Monitoring biotransformations in polyesters. Biocatal Biotransformation 22:353–356.

Ohtaki S, Maeda H, Takahashi T, Yamagata Y, Hasegawa F, Gomi K, Nakajima T, Abe K (2006) Novel hydrophobic surface binding protein, HsbA, produced by Aspergillus oryzae. Appl Environ Microbiol 72:2407–13.

Ozergin-Ulgen K, Mavituna F (1994) Comparison of the activity of immobilised and freely suspended Streptomyces coelicolor A3(2). Appl Microbiol Biotechnol 41:197–202.

Pandey R, Chander R, Sainis KB (2007) Prodigiosins: A Novel Family of Immunosuppressants with Anti-cancer Activity. IJBB 44:295–302.

Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S (2007) Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. J Appl Microbiol 102:992–999.

Papaspyrides CD, Pavlidou S, Vouyiouka SN (2009) Development of advanced textile materials: Natural fibre composites, anti-microbial, and flame-retardant fabrics. Proc Inst Mech Eng Part L J Mater Des Appl 223:91–102.

Pappas D, Bujanda A, Demaree JD, Hirvonen JK, Kosik W, Jensen R, McKnight S (2006) Surface modification of polyamide fibers and films using atmospheric plasmas. Surf Coatings Technol 201:4384–4388.

Partridge SM (1949) Aniline Hydrogen Phthalate as a Spraying Reagent for Chromatography of Sugars. Nature 164:443–443.

Parvathy KS, Susheelamma NS, Tharanathan RN, Gaonkar AK (2005) A simple non-aqueous method for carboxymethylation of galactomannans. Carbohydr Polym 62:137–141.

Parvinzadeh M, Assefipour R, Kiumarsi A (2009) Biohydrolysis of nylon 6,6 fiber with different proteolytic enzymes. Polym Degrad Stab 94:1197–1205.

Patel AK, Mathias J-D, Michaud P (2013) Polysaccharides as Adhesives. Rev Adhes Adhes 1:312–345.

Palza, H., and Humberto (2015). Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 2099–2116.

Pellis A, Acero EH, Weber H, Obersriebnig M, Breinbauer R, Srebotnik E, Guebitz GM (2015) Biocatalyzed approach for the surface functionalization of poly(L-lactic acid) films using hydrolytic enzymes. Biotechnol J 10:1739–1749.

Pellis A, Haernvall K, Pichler CM, Ghazaryan G, Breinbauer R, Guebitz GM (2016) Enzymatic hydrolysis of poly(ethylene furanoate). J Biotechnol 235:47–53. Pelz A, Wieland K-P, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Götz F (2005) Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus.* J Biol Chem 280:32493–8.

Pelz A, Wieland K-P, Putzbach K, Hentschel P, Albert K, Götz F (2005) Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from Staphylococcus aureus. J Biol Chem 280:32493–8.

Pio TF, Macedo GA (2009) Chapter 4 Cutinases:: Properties and Industrial Applications, Advances in Applied Microbiology 66:77-95.

Pisal DS, Lele SS (2005) Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina.* Council of Scientific and Industrial Research (CSIR):476-483.

Rahman Bhuiyan, M. A., Hossain, M. A., Zakaria, M., Islam, M. N., and Zulhash Uddin, M. (2017). Chitosan Coated Cotton Fiber: Physical and Antimicrobial Properties for Apparel Use. *J. Polym. Environ.* 25, 334–342.

Rahul S, Chandrashekhar P, Hemant B, Bipinchandra S, Mouray E, Grellier P, Satish P (2015) Parasitology International In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. Parasitol Int 64:353–356.

Rajan A, Abraham TE (2006) Enzymatic modification of cassava starch by bacterial lipase. Bioprocess Biosyst Eng 29:65–71.

Rajan A, Prasad VS, Emilia Abraham T (2006) Enzymatic esterification of starch using recovered coconut oil. Int J Biol Macromol 39:265–272.

Rajan A, Sudha JD, Abraham TE (2008) Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. Ind Crops Prod 27:50–59.

Rajpurohit H, Sharma P, Sharma S, Bhandari A (2010) Polymers for colon targeted drug delivery. Indian J Pharm Sci 72:689–96.

Rettori D, Durán N (1998) Production, extraction and purification of violacein: An antibiotic pigment produced by Chromobacterium violaceum. World J Microbiol Biotechnol 14:685–688.

Ribitsch D, Acero EH, Greimel K, Eiteljoerg I, Trotscha E, Freddi G, Schwab H, Guebitz GM (2012) Characterization of a new cutinase from Thermobifida alba for PET-surface hydrolysis. Biocatal Biotransformation 30:2–9.

Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, Applegate LA, Offord EA (2002) A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. J Nutr 132:404–8.

Riveros R, Haun M, Durán N (1989) Effect of growth conditions on production of violacein by Chromobacterium violaceum (BB-78 strain). Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol 22:569–77.

Ro J, Kim Y, Kim H, Park K, Lee K-E, Khadka P, Yun G, Park J, Chang ST, Lee J, Jeong JH, Lee J (2015) Pectin Micro- and Nano-capsules of Retinyl Palmitate as Cosmeceutical Carriers for Stabilized Skin Transport. Korean J Physiol Pharmacol 19:59.

Rodrigues AL, Gocke Y, Bolten C, Brock NL, Dickschat JS, Wittmann C (2012) Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein : analytical development and strain comparison. Biotechnol ogy Lett 34:717–720.

Rodrigues AL, Trachtmann N, Becker J, Lohanatha AF, Blotenberg J, Bolten CJ, Korneli C, de Souza Lima AO, Porto LM, Sprenger GA, Wittmann C (2013) Systems metabolic engineering of Escherichia coli for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. Metab Eng 20:29–41.

Ronkvist ÅM, Xie W, Lu W, Gross R a. (2009) Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). Macromolecules 42:5128–5138.

Roshan Paul (2015) Functional fi nishes for textiles: an overview. In: Paul R (ed) Functional Finishes for Textiles Improving Comfort, Performance and Protection, Woodhead P. Woodhead Publishing, pp 1–14

Rowe KS, Rowe KJ (1994) Synthetic food coloring and behavior: A dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. J Pediatr 125:691–698.

Sabater-Vilar M, Maas RF., Fink-Gremmels J (1999) Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen 444:7–16.

Sakaki H, Nakanishi T, Satonaka K-Y, Miki W, Fujita T, Komemushi S (2000) Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. J Biosci Bioeng 89:203–205.

Sánchez C, Braña AF, Méndez C, Salas JA (2006) Reevaluation of the Violacein Biosynthetic Pathway and its Relationship to Indolocarbazole Biosynthesis. ChemBioChem 7:1231–1240.

Serrero A, Trombotto S, Bayon Y, Gravagna P, Montanari S, David L (2011) Polysaccharide-based adhesive for biomedical applications: Correlation between rheological Behavior and Adhesion. Biomacromolecules 12:1556–1566.

Shahmoradi Ghaheh, F., Mortazavi, S. M., Alihosseini, F., Fassihi, A., Shams Nateri, A., and Abedi, D. (2014). Assessment of antibacterial activity of wool fabrics dyed with natural dyes. J. Clean. Prod. 72, 139–145.

Shirata A, Tsukamoto T, Kato H, Hata T, Yasui T, Kojima A (1998) Blue purple pigment manufacture with microorganism and applications of the pigment.

Shirata A, Tsukamoto T, Yasui H, Hata T, Hayasaka S, Atsushi K, Kato H (2000) Isolation of Bacteria Producing Bluish-Purple Pigment and Use for Dyeing. Japan Agric Res Q 140:131–140.

Shokri J, Adibki K (2013) Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. In: Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications. InTech.

Silva C, Araújo R, Casal M, Gübitz GM (2007) Influence of mechanical agitation on cutinases and protease activity towards polyamide substrates. Enzyme Microb Technol 40:1678–1685.

Silva C, Cavaco-Paulo A (2004) Monitoring biotransformations in polyamide fibres. Biocatal Biotransformation 22:357–360.

Silva C, Da S, Silva N, Matamá T, Araújo R, Martins M, Chen S, Chen J, Wu J, Casal M, Cavaco-Paulo A (2011) Engineered Thermobifida fusca cutinase with increased activity on polyester substrates. Biotechnol J 6:1230–1239.

Silva CM, Carneiro F, O'Neill A, Fonseca LP, Cabral JSM, Guebitz G, Cavaco-Paulo A (2005) Cutinase - A new tool for biomodification of synthetic fibers. J Polym Sci Part A Polym Chem 43:2448–2450.

Smith F, Srivastava HC (1959) Constitutional Studies on the Glucomannan of Konjak Flour. J Am Chem Soc

81:1715–1718. Song AR, Kim HR, Song WS (2012) Optimization of enzymatic treatment of polyamide fabrics by bromelain. Fibers Polym 13:282–288.

Soane D, Millward D, Linford M, Lau R, Green E, Ware W (2002) Hydrophilic finish for fibrous substrates. US20030101518A1

Song M-J, Bae J, Lee D-S, Kim C-H, Kim J-S, Kim S-W, Hong S-I (2006) Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia sp.* KH-95. J Biosci Bioeng 101:157–161.

Stepan a. M, Anasontzis GE, Matama T, Cavaco-Paulo a., Olsson L, Gatenholm P (2013) Lipases efficiently stearate and cutinases acetylate the surface of arabinoxylan films. J Biotechnol 167:16–23.

Stephen AM (1995) Food polysaccharides and their applications. Marcel Dekker, Inc

Stoscheck CM (1990) Quantitation of protein. Methods Enzymol 182:50–68.

Subramaniam S, Ravi V, Sivasubramanian A (2014) Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. Pharm Biol 52:86–90.

Subramani, K., Murugan, V., Kolathupalayam Shanmugam, B., Rangaraj, S., Palanisamy, M., Venkatachalam, R., et al. (2017). An ecofriendly route to enhance the antibacterial and textural properties of cotton fabrics using herbal nanoparticles from Azadirachta indica (neem). *J. Alloys Compd.* 723, 698–707.

Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, Kim JJ, Koga Y, Takano K, Kanaya S (2012) Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. Appl Environ Microbiol 78:1556–1562.

Suryawanshi RK, Patil CD, Borase HP, Narkhhede CP, Stevenson A, Hallsworth JE, Patil S V. (2015) Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. Int J Cosmet Sci 37:98–107.

Takahashi T, Maeda H, Yoneda S, Ohtaki S, Yamagata Y, Hasegawa F, Gomi K, Nakajima T, Abe K (2005) The fungal hydrophobin RolA recruits polyesterase and laterally moves on hydrophobic surfaces. Mol Microbiol 57:1780–1796.

Takwa M, Simpson N, Malmström E, Hult K, Martinelle M (2006) One-Pot Difunctionalization of Poly(ω-pentadecalactone) with Thiol-Thiol or Thiol-Acrylate Groups, Catalyzed byCandida antarctica Lipase B. Macromol Rapid Commun 27:1932–1936.

Tan T-L, Montforts F-P, Meyer D (2002) Microbiological method for the biosynthesis of natural blue-violet colorants violacein and desoxyviolacein and the utilization thereof. PCT Int. Appl. WO 2002050299 A2

Tauber MM, Cavaco-Paulo A, Robra K-H, Gübitz GM (2000) Nitrile Hydratase and Amidase from *Rhodococcus rhodochrous* Hydrolyze Acrylic Fibers and Granular Polyacrylonitriles. Appl Environ Microbiol 66:1634–1638.

Tharanathan RN, Kittur FS (2003) Chitin — The Undisputed Biomolecule of Great Potential. Crit Rev Food Sci Nutr 43:61–87.

Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL (2005) Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. Process Biochem 40:2551–2557. doi: 10.1016/J.PROCBIO.2004.11.005

Tobie WC (1934) The pigment of Bacillus violaceus I. The production, extraction, and purification of violacein. J Bacteriol 29:223–227.

Topakas E, Kyriakopoulos S, Biely P, Hirsch J, Vafiadi C, Christakopoulos P (2010) Carbohydrate esterases of family 2 are 6-O-deacetylases. FEBS Lett 584:543–548.

Tupa M, Maldonado L, Vázquez A, Foresti ML (2013) Simple organocatalytic route for the synthesis of starch esters. Carbohydr Polym 98:349–57. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.094

Uttam D (2013) Active Sportswear Fabrics. IJIEASR 2:34–40.

Valdes N, Soto P, Cottet L, Alarcon P, Gonzalez A, Castillo A, Corsini G, Tello M. (2015). Draft genome sequence of *Janthinobacterium lividum* strain MTR reveals its mechanism of capnophilic behavior. Standards in Genomic Sciences, 10, 110.

Vecchiato S, Ahrens J, Pellis A, Scaini D, Mueller B, Herrero Acero E, Guebitz GM (2017) Enzymatic Functionalization of HMLS-Polyethylene Terephthalate Fabrics Improves the Adhesion to Rubber. ACS Sustain Chem Eng 5:6456–6465.

Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA (2013) Bacterial pigments and their applications. Process Biochem 48:1065–1079.

Vertommen M a ME, Nierstrasz V a., Veer M Van Der, Warmoeskerken MMCG (2005) Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). J Biotechnol 120:376–386.

Vynne NG, Mansson M, Gram L (2012) Gene Sequence Based Clustering Assists in Dereplication of *Pseudoalteromonas luteoviolacea* Strains with Identical Inhibitory Activity and Antibiotic Production. Mar Drugs 10:1729–1740.

Wang F, Zhao G, Lang X, Li J, Li X (2017) Lipase-catalyzed synthesis of long-chain cellulose esters using ionic liquid mixtures as reaction media. J Chem Technol Biotechnol 92:1203–1210.

Wang H, Jiang P, Lu Y, Ruan Z, Jiang R, Xing XH, Lou K, Wei D (2009) Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella sp.* B2. Biochem Eng J 44:119–124.

Wang HL, Hesseltine CW (1979) Mold-Modified Foods. In: Microbial Technology. Elsevier, pp 95–129

Wieland B, Feil C, Gloria-Maercker E, Thumm G, Lechner M, Bravo JM, Poralla K, Götz F (1994) Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 176:7719–26.

Wong PK, Yuen PY (1996) Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. Water Res 30:1736–1744.

Wu J, Cai G, Liu J, Ge H, Wang J (2014) Eco-friendly surface modification on polyester fabrics by esterase treatment. Appl Surf Sci 295:150–157.

Xie J, Hsieh Y-L (2001) Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids. J Polym Sci Part A Polym Chem 39:1931–1939.

Yada S, Wang Y, Zou Y, Nagasaki K, Hosokawa K, Osaka I, Arakawa R, Enomoto K (2008a) Short Communication Isolation and Characterization of Two Groups of Novel Marine Bacteria Producing Violacein. Mar Biotechnol 10:128–132.

Yada S, Wang Y, Zou Y, Nagasaki K, Hosokawa K, Osaka I, Arakawa R, Enomoto K (2008b) Isolation and Characterization of Two Groups of Novel Marine Bacteria Producing Violacein. Mar Biotechnol 10:128–132.

Yang C, Jiang P, Xiao S, Zhang C, Lou K, Xing XH (2011a) Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein

production from glycerol. Biochem Eng J 57:55–62.

Yang F, Hanna MA, Sun R (2012) Value-added uses for crude glycerol--a byproduct of biodiesel production. Biotechnol Biofuels 5:13.

Yang J-S, Xie Y-J, He W (2011b) Research progress on chemical modification of alginate: A review. Carbohydr Polym 84:33–39.

Yang K, Wang YJ (2004) Lipase-catalyzed transesterification in aqueous medium under thermodynamic and kinetic control using carboxymethyl cellulose acetylation as the model reaction. Enzyme Microb Technol 35:223–231.

Yang LH, Xiong H, Lee OO, Qi S-H, Qian P-Y (2007) Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. Lett Appl Microbiol 44:625–630.

Ye R, Wang Q, Fan X, Yu Y, Yuan J, Wang P (2013) A new model substrate for cutinase hydrolyzing polyethylene terephthalate. Fibers Polym 14:1128–1133.

Yoon MY, Kellis J, Poulose AJ (2002) Enzymatic Modification of Polyester. AATCC Review 2(6):33-36.

Young AH (1984) Fractionation Of Starch. In: Starch: Chemistry and Technology. Elsevier, pp 249–283

Yu M, Wang Z, Lv M, Hao R, Zhao R, Qi L, Liu S, Yu C, Zhang B, Fan C, Li J (2016) Antisuperbug Cotton Fabric with Excellent Laundering Durability. ACS Appl Mater Interfaces 8:19866–19871.

Yusuf M, Shabbir M, Mohammad F (2017) Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. Nat Products Bioprospect 7:123–145.

Zemljič LF, Volmajer J, Ristić T, Bracic M, Sauperl O, Kreže T (2014) Antimicrobial and antioxidant functionalization of viscose fabric using chitosan–curcumin formulations. Text Res J 84:819–830.

Zeronian SH, Collins MJ (1989) Surface Modification Of Polyester By Alkaline Treatments. Text Prog 20:1–26.

Zhang H, Zhan J, Su K, Zhang Y (2006) A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor:* Characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ-actinorhodin. Food Chem 95:186–192.

Zhao K-H, Cai Y-Z, Lin X-S, Xiong J, Halling P, Yang Z (2016) Enzymatic Synthesis of Glucose-Based Fatty Acid Esters in Bisolvent Systems Containing Ionic Liquids or Deep Eutectic Solvents. Molecules 21:1294.

Zollinger H (2003) Color chemistry : syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments. Verlag Helvetica Chimica Acta.

Zille, A., Fernandes, M. M., Francesko, A., Tzanov, T., Fernandes, M., Oliveira, F. R., et al. (2015). Size and Aging Effects on Antimicrobial Efficiency of Silver Nanoparticles Coated on Polyamide Fabrics Activated by Atmospheric DBD Plasma. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 13731–13744.

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Επιφανειακή τροποποίηση συνθετικών πολυμερών. 8

Πίνακας 2: Χρωστικές ουσίες τροφίμων από βακτήρια. 33

Πίνακας 3: Πιθανές εφαρμογές μικροβιακών χρωστικών στη φαρμακευτική βιομηχανία. 34

Πίνακας 4: Μικροοργανισμοί που παράγουν βιολασεΐνη. 41

Πίνακας 5: Βιοτεχνολογικές εφαρμογές πολυσακχαριτών. 56

Πίνακας 6: Λειτουργίες και εφαρμογές υδροκολλοειδών στα τρόφιμα. 57

Πίνακας 7: Εστέρες πολυσακχαριτών με βιολογική ενεργότητα. 61

Πίνακας 8: Συστάσεις θρεπτικών μέσων ανάπτυξης διάφορων μικροοργανισμών. 65

Πίνακας 9: Συστάσεις θρεπτικών μέσων ανάπτυξης *P. pastoris.* 65

Πίνακας 10: Σύσταση πηκτώματος πολυακριλαμιδίου. 70

Πίνακας 11: Πίνακας απελευθέρωσης προϊόντων υδρόλυσης του μοντέλου 3PET, ύστερα από επιφανειακή τροποποίηση με την *Fo*Cut5a και τη λιπάση Lipolase, ως βιοκαταλύτες. 104

Πίνακας 12*:* Αποτελέσματα δοκιμών βαφής. Τα L, a, και b αποτελούν τις συντεταγμένες των βαμμένων υφασμάτων, ο λόγος K/S είναι η ένταση χρώματος και η τιμή ΔΕ είναι η διαφορά χρώματος μεταξύ τροποποιημένων και ατροποποίητων υφασμάτων. Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (40 ^{o}C, pH 8, ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, 3 h). 110

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις χρωστικών σε κάθε λουτρό βαφής πριν και μετά την διαδικασία βαφής των PET υφασμάτων. Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε στις βέλτιστες συνθήκες (40 ^{o}C, pH 8, ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/gυφάσματος, 3 h). 112

Πίνακας 14: Αποτελέσματα μελέτης αντοχής σε εφελκυσμό σε ατροποποίητο και τροποποιημένο ύφασμα PET στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης**.** Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. 113

Πίνακας 15: Αποτελέσματα δοκιμών βαφής με την χρωστική Novacron Deep Cherry S-D σε ενζυμικά τροποποιημένα PA υφάσματα. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40-60 ^{o}C με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$ (για μελέτη θερμοκρασίας) και στους 40 ^{o}C, με ενζυμικό φορτίο στο εύρος 3.7-74.4 mg/$g_{υφάσματος}$ (για μελέτη ενζυμικού φορτίου). 121

Πίνακας 16: Μέτρηση υδροφιλικότητας υφασμάτων PA 6.6. 124

Πίνακας 17: Αποτελέσματα μελέτης αντοχής σε εφελκυσμό ατροποποίητων και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 125

Πίνακας 18: Αποτελέσματα μελέτης κάμψης, διάτμησης, εφελκυσμού και τριβής (Kawabata) ατροποποίητων και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 126

Πίνακας 19: Συντεταγμένες χρώματος πολυαμιδικών υφασμάτων βαμμένων μέσω των διεργασιών SFD, DAFS και DD. Οι διεργασίες DAFS και DD έλαβαν χώρα για 48 h. Τα αποτελέσματα βαφής μέσω SFD παρουσιάζονται για διαφορετικούς χρόνους επώασης. 144

Πίνακας 20: Αντοχή χρωματισμού στον όξινο/αλκαλικό ιδρώτα και σε οικιακή πλύση. 145

Πίνακας 21: Αποτελέσματα βαφής υφασμάτων SFD 24 h και SFD 96 h ύστερα από έκθεση σε λάμπα ΧΕΝΟΝ για 165 h. 146

Πίνακας 22: Δέσμευση DPPH• από βαμμένα υφάσματα μέσω διαδικασίας SFD, DAFS και DD. 151

Πίνακας 23: Δέσμευση DPPH• από τροποποιημένα φύλλα PLA με βιολασεΐνη. όπου PLA A=(0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B=(0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη. 153

Πίνακας 24: Αποτελέσματα βελτιστοποίησης της προπυλίωσης της μαννόζης (Man). Οι παράμετροι που μελετήθηκαν είναι η θερμοκρασία, η αναλογία υδατικής φάσης-βινυλεστέρα, η ανάδευση και η ενζυμική συγκέντρωση. 156

Πίνακας 25: Αποδόσεις ακυλίωσης μονο- και δισακχαριτών, ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με χρήση δοτών ακετυλ-, προπυλ- και βουτυλ-ομάδων, όπως προέκυψαν από HPLC ανάλυση και ημιποσοτική TLC (σε παρένθεση) ανάλυση. 161

Πίνακας 26: Πρώτης τάξης MS σε θετικό mode ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με χρήση του οξικού βινυλεστέρα, του προπιονικού βινυλεστέρα και βουτυρικού βινυλεστέρα ως δότες ακυλομάδας, αποδίδοντας θετικά ψευδομοριακά ιόντα $[M+Na]^+$ ως (m/z). 163

Πίνακας 27: Κύρια m/z ψευδομοριακά ιόντα-θραύσματα, όπως προέκυψαν από δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode ακυλιωμένων μονοσακχαριτών και δισακχαριτών με χρήση του οξικού βινυλεστέρα, του προπιονικού βινυλεστέρα και βουτυρικού βινυλεστέρα ως δότες ακυλομάδας, αποδίδοντας θετικά ιόντα $[M+Na]^+$. 164

Πίνακας 28: Δεδομένα ^{1}H-NMR προπυλιωμένης και βουτυλιωμένης Glc και Man. Η φασματοσκοπία ^{1}H-NMR πραγματοποιήθηκε στο Bruker DRX 600, τα δείγματα διαλύθηκαν σε CD_3OD και χρησιμοποιήθηκε τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) ως εσωτερικό πρότυπο. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) εκφράζονται σε ppm. ^{a} Δύο κορυφές λόγω μίγματος ανωμερών. 168

Πίνακας 29: Έμμεσος προσδιορισμός μετεστεροποίησης, -ακυλομάδων ανά πολυσακχαρίτη-, μέσω μεθανόλυσης των ακυλιωμένων πολυσακχαριτών. 174

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Συνθετικές υφάνσιμες ίνες..... 1

Σχήμα 2: Συνολική παγκόσμια κατανάλωση συνθετικών και φυσικών ινών (Lenzing AG, 2015). 2

Σχήμα 3: Χημική δομή των επαναλαμβανόμενων δομικών ομάδων των PA 6.6 και PA 6. 3

Σχήμα 4: Ενζυμική υδρόλυση συνθετικών πολυμερών (Guebitz and Cavaco-Paulo 2008). 7

Σχήμα 5: Χημική δομή PET 14

Σχήμα 6: Η τροποποίηση των αμινοξέων μιας κουτινάσης από *F. solani* (a) οδηγεί σε διεύρυνση της δραστικής θέσης και καλύτερη σύνδεση με το PET υπόστρωμα μοντέλο, όπως φαίνεται στον κόκκινο κύκλο στο (b). Η L182A μετάλλαξη είναι υπεύθυνη για την καλύτερη σταθεροποίηση του τετραεδρικού ενδιάμεσου 1,2-διβενζοϊκού αιθυλεστέρα και για την πέντε φορές υψηλότερη ενεργότητα ως προς το PET..... 21

Σχήμα 7: Φυσικές χρωστικές..... 24

Σχήμα 8: Καλλιέργεια *J. lividum* με παραγωγή βιολασείνης, *S. Aureus* με παραγωγή σταφυλοξανθίνης, *P aeruginosa* με παραγωγή πυοκυανίνης (από αριστερά προς τα δεξιά)..... 27

Σχήμα 9: Διαφορετικές αποχρώσεις της προδιγιοσίνης από τον *S. marcescens* για τιμές pH 2.0 (α), 7.0 (β) και 9.0 (γ). 29

Σχήμα 10: Χημικές δομές χρωστικών από μικροβιακά παθογόνα: α) σταφυλοξανθίνη, *S.aureus,* β) αιματίνη, *Porphyromonas gingivalis* γ) βιολασεΐνη, *C. violaceum* δ) γρεναδίνη, *Streptococcus agalactiae* ε) πυοκυανίνη, *P. aeruginosa* στ) προδιγιοσίνη, *Serratia marcescens* ζ) μελανίνη, *Cryptococcus neoformans.*..... 30

Σχήμα 11: Εφαρμογή βακτηριακών χρωστικών κατά τη βαφή βαμβακερών υφασμάτων με τη μέθοδο "batik": α) σχεδίαση μοτίβων με μολύβι, β) εφαρμογή κεριού πάνω από το σχέδιο με την μέθοδο ''canting'', γ) βαφή υφάσματος με βακτηριακή χρωστική, δ) αποκήρωση και σταθεροποίηση χρώματος υφάσματος, ε) στέγνωμα υφάσματος, στ) τελικό προϊόν..... 36

Σχήμα 12: Βαφή υφασμάτων με προδιγιοσίνη από το *Vibrio spp*. και αντοχή χρώματος σε ιδρώτα α) πριν και (b) μετά το τεστ. P-πολυεστέρας, A-ακρυλικό, C-βαμβακερό, Pm-πολυεστερική μικροΐνα, S-μεταξωτό. 36

Σχήμα 13: Βαφή ινών από α) PLA, β) κυτταρίνη από φλούδα πορτοκαλιού, γ, δ) μετάξι με προδογιοσίνη. ε) Βαφή μεταξωτού υφάσματος με βιολασεΐνη. 37

Σχήμα 14: Χημική δομή βιολασεΐνης. 38

Σχήμα 15: Απεικόμιση των *C. violaceum* και *J. lividum* στο μικροσκόπιο. 39

Σχήμα 16: Εύρεση του *J. lividum* στο δέρμα της σαλαμάνδρας *Plethodon cinereus*, στο δέρμα του βάτραχου *Rana muscosa* και σε παγετούς στην Κίνα. 40

Σχήμα 17: Χημική δομή δεοξυβιολασεΐνης (αριστερά) και οξυβιολασεΐνης (δεξιά)..... 42

Σχήμα 18: Πολυσακχαρίτες στη φύση..... 47

Σχήμα 19: Εφαρμογές πολυσακχαριτών..... 55

Σχήμα 20: α) Συσκευή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, β) Γέλη όπου φαίνεται η ανασυνδυασμένη κουτινάση FoCut5a στα 23 kDa, ύστερα από απομόνωση σε στήλη συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC)..... 70

Σχήμα 21: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων σχηματισμού του μοντέλου 3PET. 72

Σχήμα 22: α) Περιστροφικός εξατμιστήρας, β) παραγωγή του ενδιάμεσου προϊόντος 2-χλωροαιθυλεστέρας βενζοϊκού οξέος μετά το 1^{ο} στάδιο σύνθεσης του 3PET, γ) εξάτμιση DMF μετά το 2^{ο} στάδιο σύνθεσης του 3PET μετά την απομάκρυνση του παραπροϊόντος τριαιθυλοαμινο-υδροχλωρίδιο, δ) επαναδιάλυση υπολείμματος από περιστροφικό εξατμιστήρα σε τολουόλιο και ε) παραλαβή αδιάλυτου τερεφθαλικού οξέος, στ) επανακρυστάλλωση σε μεθανόλη του τελικού 3PET..... 73

Σχήμα 23: (α) TLC: Έλεγχος καθαρότητας μοντέλου PET και ταυτοποίηση, (β) Β=βενζοϊκό οξύ, Ε=ενδιάμεσο προϊόν, Τ=τερεφθαλικό οξύ, Π=τελικό προϊόν-μοντέλο, (γ) Τελικό προϊόν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση..... 74

Σχήμα 24: (α) Καθαρισμός μοντέλου 3PET με χρωματογραφίας στήλης με πίεση, (β) Κλάσματα που προκύπτουν από τη στήλη καθαρισμού..... 74

Σχήμα 25: Δομή μοντέλου υποστρώματος αδιπικό δις-εξυλαμίδιο. 75

Σχήμα 26: Αρίθμηση των ατόμων των δομών α) 3PET, β) αδιπικό δις-εξυλαμίδιο. 76

Σχήμα 27: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας βαφής συνθετικών υφασμάτων..... 80

Σχήμα 28: α) Μηχανή Ahiba Texomat βαφής υφασμάτων, β) Χρωματόμετρου Spectraflash SF450 προς υπολογισμό των L, a, b και K/S. Τα μηχανήματα που απεικονίζονται βρίσκονται στην εταιρία MIRTEC S.A-EBETAM. 81

Σχήμα 29: α) Δυναμόμετρο για προσδιορισμό της αντοχής στον εφελκυσμό, β) Μετρητική συσκευή του συστήματος αξιολόγησης Kawabata για διεξαγωγή δοκιμών εφελκυσμού & διάτμησης, γ) Μέτρηση κομπαλιδίων ινών λόγω τριβής στη συσκευή Pilling box, δ) Έλεγχος αντοχής στη φθορά λόγω τριβής στη συσκευή Martindale. Τα μηχανήματα που απεικονίζονται βρίσκονται στην εταιρία MIRTEC S.A-EBETAM. 85

Σχήμα 30: Αποικίες βακτηριακού στελέχους *J. lividum* σε θρεπτικό ΝΑ σε 24 και 72 h επώαση. 89

Σχήμα 31: Συλλογή δειγμάτων βιομάζας J. lividum και ζύγιση ύστερα από ξήρανση..... 90

Σχήμα 32: Απομόνωση βιολασεΐνης από βιοαντιδραστήρα: α) συλλογή βιομάζας, β) λυοφιλίωση βιομάζας, γ) εκχύλιση βιολασεΐνης από το εσωκυτταρικό με μεθανόλη, δ) και ε) εξάτμιση μεθανόλης και συλλογή ακατέργαστης βιολασεΐνης 91

Σχήμα 33: α) Βαφή υφάσματος με την εκχυλισμένη βιολασεΐνη, β) πλύση υφασμάτων βαμμένων με SFD μετά από αποστείρωση. 92

Σχήμα 34: Κατασκευή φύλλων PLA με την τεχνική επίστρωσης διαλύματος με ή χωρίς βιολασεΐνη..... 93

Σχήμα 35: Τύποι θραυσματοποίησης σακχάρων βάσει των Domon and Costello (1988). 99

Σχήμα 36: Μοντέλα-υποστρώματα του PET: 3PET και BHET. Με κόκκινες γραμμές αναπαριστώνται τα πιθανά μοτίβα υδρόλυσης των δομών..... 102

Σχήμα 37: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης του μοντέλου 3PET με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a ως βιοκαταλύτη, ύστερα από επώαση σε pH 7, στους 30 ^{o}C.. 103

Σχήμα 38: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης του μοντέλου BHET με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a ως βιοκαταλύτη, ύστερα από επώαση σε pH 7, στους 30 ^{o}C. 104

Σχήμα 39: Μελέτη θερμοκρασίας της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 0.94 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης FoCut5a, σε pH 7, για 24 h. 105

Σχήμα 40: Μελέτη pH της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 0.94 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης FoCut5a, στους 40°C για 24 h..... 106

Σχήμα 41: Μελέτη ενζυμικού φορτίου της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με χρήση της κουτινάσης *Fo*Cut5a, σε pH 8, στους 40°C για 24 h..... 107

Σχήμα 42: Μελέτη χρόνου της επιφανειακής τροποποίησης PET υφασμάτων με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης *Fo*Cut5a, στους 40°C και pH 8. 108

Σχήμα 43: HPLC χρωματογράφημα του υπερκείμενου της υδρόλυσης υφασμάτων PET, ύστερα από επώαση με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$ της κουτινάσης *Fo*Cut5a, σε pH 8, στους 40 ^{o}C..... 109

Σχήμα 44: Ενζυμική τροποποίηση υφασμάτων PET για αύξηση υδροφιλικότητας και βελτίωση βαφικής ικανότητας. 110

Σχήμα 45: Απεικόνιση υφασμάτων PET ατροποποίητων (κάτω) και ενζυμικά τροποποιημένων (πάνω) με χρήση των βαφών: Jakazol Black 133% (α), Novacron Deep Cherry S-D (β) and Novacron Yellow S-3R..... 111

Σχήμα 46: FT-IR ATR φάσμα ατροποποίητου (μαύρη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (γκρι γραμμή). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. 114

Σχήμα 47: SEM απεικονίσεις της επιφάνειας ατροποποίητου (α) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (β). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. 115

Σχήμα 48: Κορυφές ομάδων άνθρακα από ανάλυση XPS (A) ατροποποίητου και (B) τροποποιημένου PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης. Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. Η ανάλυση και λήψη των φασμάτων πραγματοποιήθηκε από τον καθηγητή Σπύρο Λαδά, στο Εργαστήριο Επιστήμης Επιφανειών, της Σχολής Χημικών Μηχανικών, στο Πανεπιστήμιο Πατρών. 116

Σχήμα 49: Σχετική σύσταση (%) διαφορετικών C1s ομάδων, όπως προέκυψαν από ανάλυση XPS ατροποποίητου (μαύρο) και τροποποιημένου (γκρι) PET υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (C-C~285 eV, C-O-C, C-OH~286 eV, C=O~289 eV και OH-C=O~291 eV). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης. 117

Σχήμα 50: Αποτελέσματα α) DSC και β) TGA ατροποποίητου (διακεκομμένη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PET υφάσματος (συνεχής γραμμή). Η υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 40 ^{o}C, pH 8, με ενζυμικό φορτίο 1.92 mg/$g_{υφάσματος}$, για 3 h επώασης Στο Σχήμα A η πρώτη τήξη αναπαριστάται με μπλε χρώμα, η κρυστάλλωση με ροζ και η δεύτερη τήξη με πράσινο χρώμα. 118

Σχήμα 51: Ενζυμική τροποποίηση υφασμάτων PA 6.6 για αύξηση υδροφιλικότητας και βελτίωση βαφικής ικανότητας. 120

Σχήμα 52: Αποτελέσματα βαφής ατροποποίητων (α) και ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων (β), ύστερα από βαφή με CI Reactive Blue 19 (αριστερά) και Deep Cherry S-D (δεξιά). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 122

Σχήμα 53: Εμβάπτιση PA υφάσματος σε λουτρό βαφής και παρακολούθηση χρόνου αναρρίχησης βαφής. Ατροποποίητο ύφασμα (αριστερά), ενζυμικά τροποποιημένο ύφασμα (δεξιά). 124

Σχήμα 54: Αποτελέσματα pilling α) ατροποποίητου και β) ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (αριστερά) και αντοχής στην τριβή στη συσκευή Martindale. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 127

Σχήμα 55: FTIR-ATR φάσμα υφάσματος ελέγχου (επώαση με ενζυμικά απενεργοποιημένο ένζυμο) (γκρι γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (μαύρη γραμμή). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 128

Σχήμα 56: SEM απεικονίσεις, μεγενθυμένες κατά 2000× και 2500×, της επιφάνειας υφασμάτων ελέγχου, όπου η επώαση πραγματοποιήθηκε χωρίς ένζυμο (α), ή με θερμικά απενεργοποιημένο ένζυμο (β), αντίστοιχα, και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (γ) : Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 129

Σχήμα 57: Κορυφές ομάδων άνθρακα από ανάλυση XPS (A) ατροποποίητου και (B) τροποποιημένου PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης. Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 130

Σχήμα 58: Σχετική σύσταση (%) διαφορετικών C1s ομάδων, όπως προέκυψαν από ανάλυση XPS ατροποποίητου (μαύρο) και τροποποιημένου (γκρι) PA υφάσματος στις βέλτιστες συνθήκες υδρόλυσης (C-C~284.8 eV, C-N~285.9 eV, N-C=O~287.6 eV και O-C=O~288.8 eV). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. 131

Σχήμα 59: Αποτελέσματα α) DSC και β) TGA ατροποποίητου (διακεκομμένη γραμμή) και ενζυμικά τροποποιημένου PA υφάσματος (συνεχής γραμμή). Η ενζυμική επιφανειακή υδρόλυση πραγματοποιήθηκε στους 60 ^{o}C, pH 8, για 5 h, με ενζυμικό φορτίο 37.2 mg/$g_{υφάσματος}$. Στο Σχήμα A η πρώτη τήξη αναπαριστάται με μπλε χρώμα, η κρυστάλλωση με ροζ και η δεύτερη τήξη με πράσινο χρώμα. 132

Σχήμα 60: Καλλιέργειες *J. lividum* για μελέτη α) pH, β) θερμοκρασίας, γ) επιπρόσθετης πηγής άνθρακα, δ) προσθήκης 0.1 mg/mL αντιβιοτικού, ε) προσθήκης αμπικιλλίνης. Οι καλλιέργειες απεικονίζονται ύστερα από 6 ημέρες επώασης. 134

Σχήμα 61: Επίδραση αρχικού pH στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο). 135

Σχήμα 62: Επίδραση θερμοκρασίας στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο). 136

Σχήμα 63: Εκχύλιση βιολασεΐνης από υπερκείμενο καλλιέργειας με οξικό αιθυλεστέρα. 136

Σχήμα 64: Επίδραση προσθήκης πηγής άνθρακα στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο). 137

Σχήμα 65: Επίδραση προσθήκης αντιβιοτικού 0.1 mg/mL (πάνω) και ειδικότερα αμπικιλλίνης (κάτω) στη βιομάζα του *J. lividum* επί ξηρού (■) και στην παραγωγή βιολασεΐνης (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο). 139

Σχήμα 66: Παραγωγή βιολασεΐνης σε μεγάλη κλίμακα. Βιοαντιδραστήρας: α) τη στιγμή του εμβολιασμού, β), γ) κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης, δ) ύστερα από 5 ημέρες επώασης, ε) ύστερα από 5 ημέρες επώασης και μετά την προσθήκη γλυκερόλης κατά τη λογαριθμική φάση ανάπτυξης. 141

Σχήμα 67: α) Συγκέντρωση βιομάζας *J. lividum* επί ξηρού (■) και κατανάλωση γλυκερόλης (♦) με το χρόνο, β) παραγωγή βιολασεΐνης με το χρόνο (● εκχυλισμένη εσωκυτταρική βιολασεΐνη με μεθανόλη, ○ βιολασεΐνη στο υπερκείμενο) σε βιοαντιδραστήρα, στους 25 ^{o}C, pH 7, υπό

ελεγχόμενες συνθήκες αερισμού. Οι διεργασίες διαλείποντος και ημιδιαλείποντος έργου αναπαριστώνται με διακεκομμένη και συνεχής γραμμή, αντίστοιχα. 142

Σχήμα 68: α) Διαφορετικές αποχρώσεις ανάλογα με τον χρόνο επώασης βαμμένων πολυαμιδικών υφασμάτων μέσω SFD (πάνω), β) ατροποποίητο/control και τροποποιημένα πολυαμιδικά υφάσματα με SFD, DAFS και DD (κάτω). 145

Σχήμα 69: Έκθεση βαμμένων PA 6.6 υφασμάτων με βιολασεΐνη σε τεχνητό φως (XENON) για 165 h..... 146

Σχήμα 70: α) Σχηματισμός αποικιών (CFU), ύστερα από έκθεση των καλλιεργειών *S. aureus* και *C. albicans* σε DMSO, σε αποστειρωμένο control ύφασμα και σε βαμμένα υφάσματα PA 6.6 μέσω SFS, DAFS, DD, β) Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από διάφορες συγκεντρώσεις εκχυλισμένης βιολασεΐνης, γ) Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από PA υφάσματα ατροποποίητα ή βαμμένα με SFD, DAFS και DD. 148

Σχήμα 71: Δέσμευση DPPH• από ακατέργαστη βιολασεΐνη..... 151

Σχήμα 72: α) Ατροποποίητο/control, β) τροποποιημένο PLA A, γ) τροποποιημένο PLA B, όπου PLA A=(0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B=(0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη. 152

Σχήμα 73: Παρεμπόδιση μικροβιακής ανάπτυξης από ατροποποίητο PLA και τροποποιημένο PLA A ή PLA B. όπου PLA A= (0.002 g_{Vio}/g_{PLA}) και PLA B= (0.135 g_{Vio}/g_{PLA}), Vio=βιολασεΐνη. 153

Σχήμα 74: Σχηματική απεικόνηση της μετεστεροποίησης των μονοσακχαριτών D-Glc, D-Man, D-Gal και των δισακχαριτών Celb και β-Manb..... 157

Σχήμα 75: Αποτελέσματα TLC των αντιδράσεων μετεστεροποίησης των Glc, Gal, Man, Celb, Manb με οξικό βινυλεστέρα (A), προπιονικό βινυλεστέρα (P) και βουτυρικό βινυλεστέρα (B), καταλυόμενες από την εστεράση CtCE2 και διαλύτη έκλουσης 1-βουτανόλη:αιθανόλη:νερό 10:8:6 (v/v/v). Οι αντιδράσεις ελέγχου συμβολίζονται ως CA, CP και CB, αντίστοιχα. Με βελάκια υποδεικνύονται τα διακυλιωμένα προϊόντα. 159

Σχήμα 76: Αποτελέσματα TLC των αντιδράσεων μετεστεροποίησης των Manb και Celb με οξικό βινυλεστέρα (A), προπιονικό βινυλεστέρα (P) και βουτυρικό βινυλεστέρα (B), καταλυόμενες από την εστεράση CtCE2 και διαλύτη έκλουσης 1-βουτανόλη:αιθανόλη:νερό 10:8:6 (v/v/v). Τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με διάλυμα ανιλίνης με στόχο τον ημιποσοτικό προσδιορισμό των υπό ανάλυση ουσιών. Οι αντιδράσεις ελέγχου συμβολίζονται ως CA, CP και CB, αντίστοιχα, και παρατίθενται τέσσερις συγκεντρώσεις πρότυπου δισακχαρίτη προς σχηματισμό της καμπύλης αναφοράς. Με κυκλάκια υποδεικνύονται τα διακυλιωμένα προϊόντα. 160

Σχήμα 77: Δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode του ψευδομοριακού ιόντος $[M+Na]^+$ με m/z 421 για τα μονοπροπυλιωμένα Celb (α) και β-Manb (γ) και με m/z 477 για τα διπροπυλιωμένα Celb (β) και β-Manb (δ), ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση CtCE2. Η πιθανή απώλεια ιόντος από κάθε μονάδα ενός δισακχαρίτη συμβολίζεται με (*). 167

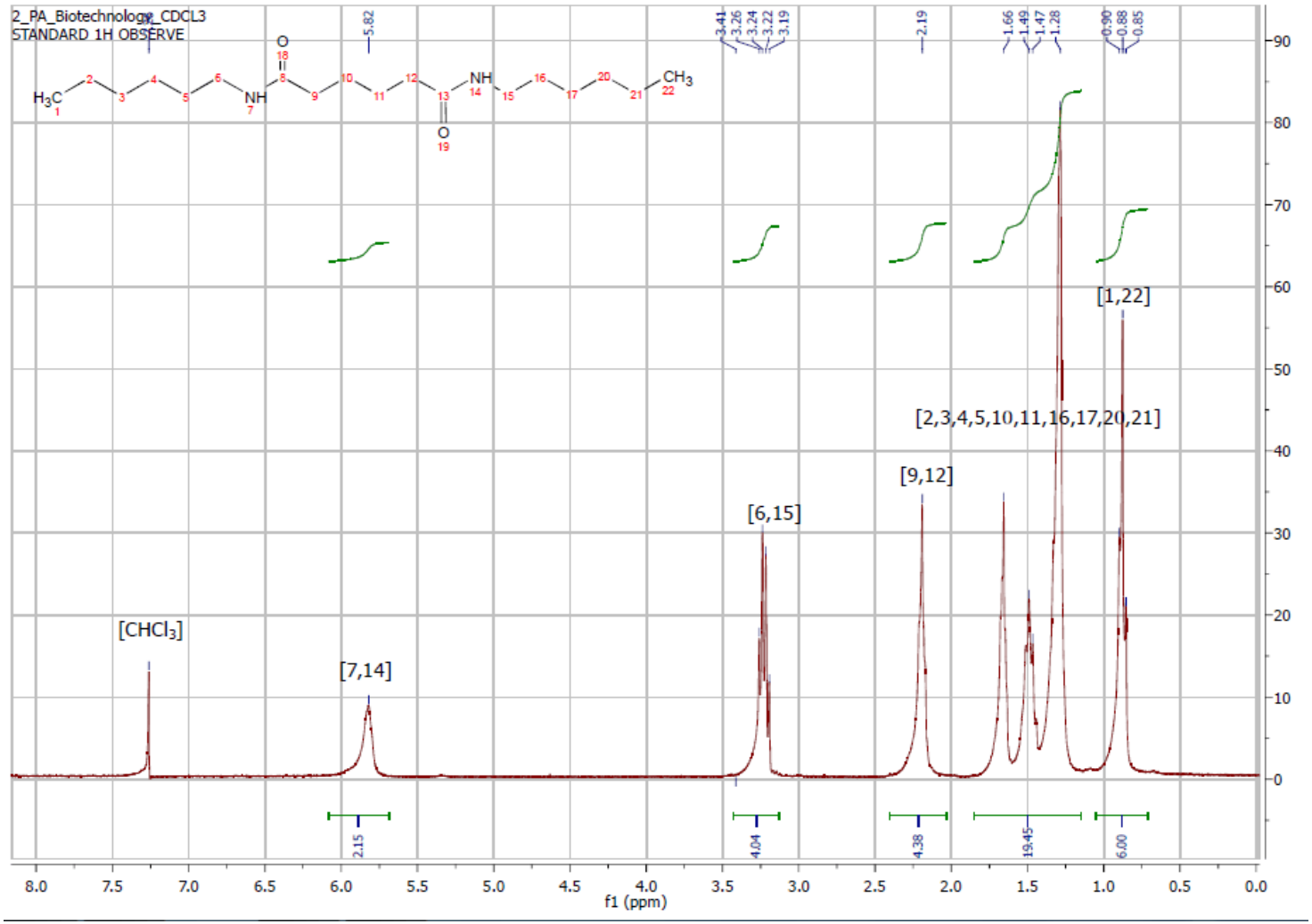
Σχήμα 78: Δομές των πολυσακχαριτών: α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς, γ) 1,4-β-D-μαννάνη και δ) β-γλυκάνη κριθής. 169

Σχήμα 79: FTIR φάσματα ακετυλιωμένης (συνεχής γραμμή), προπυλιωμένης (γραμμή με κουκίδες), βουτυλιωμένης (γραμμή με παύλες) α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) 1,4- β-D-μαννάνης, γ) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς και δ) β-γλυκάνη κριθής, ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση *Ct*CE2. Οι ατροποποίητοι πολυσακχαρίτες συμβολίζονται με γραμμή με παύλες και κουκίδες. 171

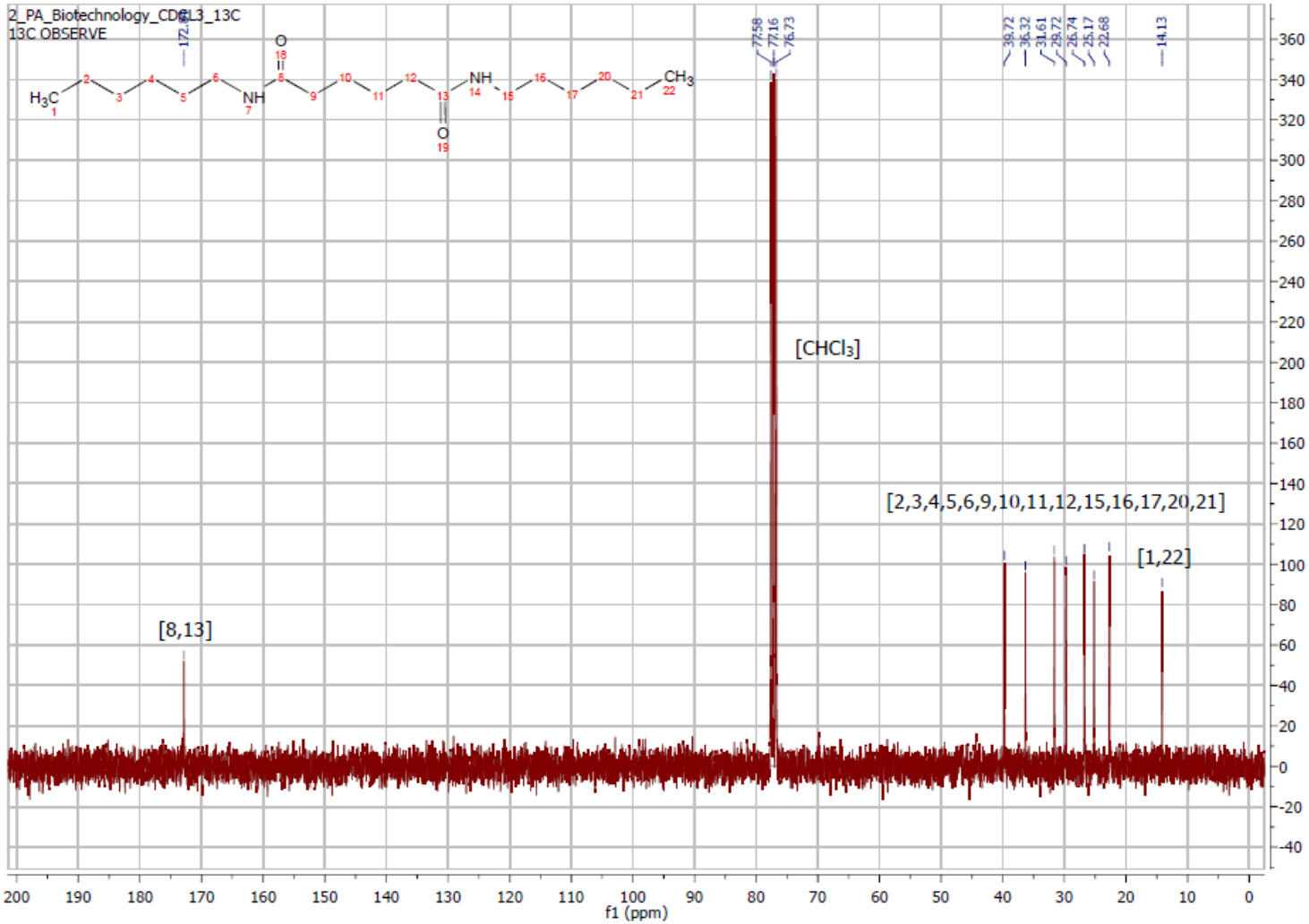
Σχήμα 80: TLC αποτελέσματα της ενζυμικής υδρόλυσης ατροποποίητων (CA, CP, CB), ακετυλιωμένων (A), προπυλιωμένων (P) και βουτυλιωμένων (B) πολυσακχαριτών με διαλύτη έκλουσης ακετονιτρίλιο:νερό 8:2 (v/v). Απεικόνιση των προϊόντων υδρόλυσης της α) γλυκομαννάνης κονγιάκ, β) γαλακτομαννάνης χαρουπιάς, γ) 1,4- β-D-μαννάνης και δ) β-γλυκάνης κριθής. Με βελάκια συμβολίζονται τα θραύσματα των ακυλιωμένων ολιγοσακχαριτών για κάθε υδρολυμένο πολυσακχαρίτη, αντίστοιχα. 172

Σχήμα 81: Αντίδραση μεθανόλυσης της 1,4-β-D-μαννάνης επαν προς παραγωγή του αντίστοιχου μεθυλεστέρα. R=CH_3 για τον οξικό μεθυλεστέρα, C_2H_5 για τον προπιονικό μεθυλεστέρα, C_3H_7 για τον βουτυρικό μεθυλεστέρα. 173

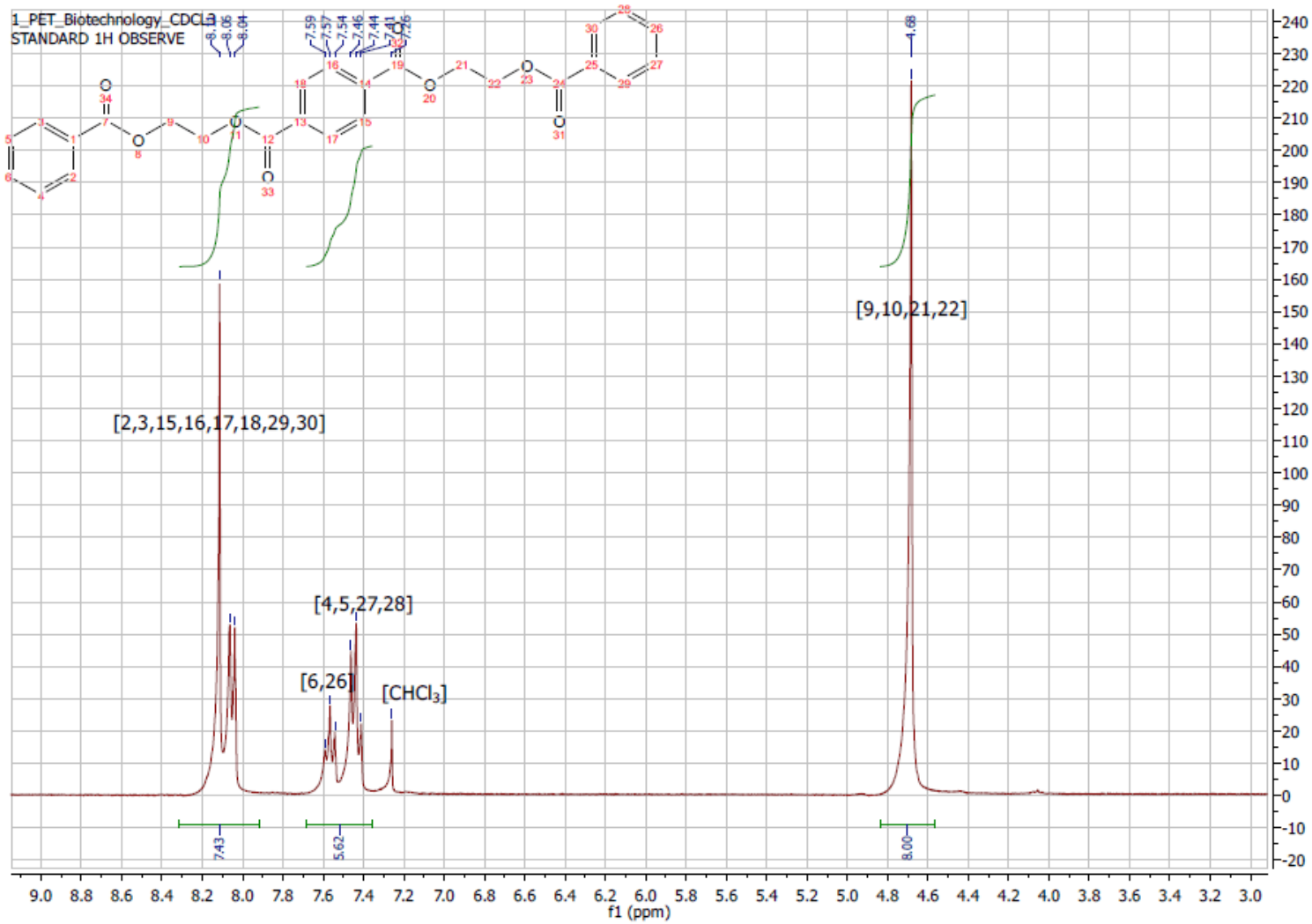
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ


2_PA_Biotechnology_CDCL3
STANDARD 1H OBSERVE
[CHCl3]
[7,14]
[6,15]
[9,12]
[2,3,4,5,10,11,16,17,20,21]
[1,22]
f1 (ppm)

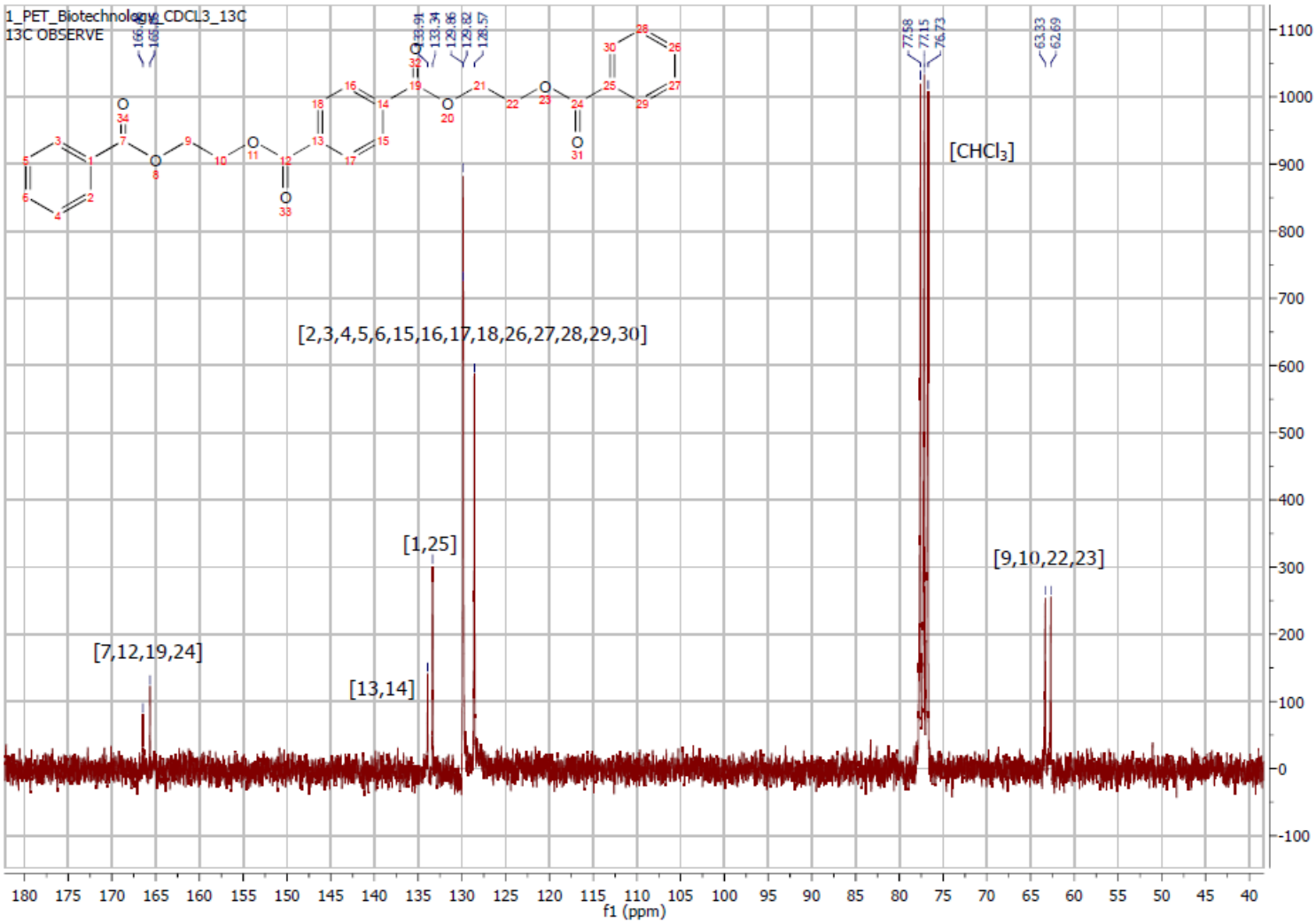
α)


2_PA_Biotechnology_CDCL3_13C
13C OBSERVE
[CHCl3]
[2,3,4,5,6,9,10,11,12,15,16,17,20,21]
[1,22]
[8,13]
f1 (ppm)

β)

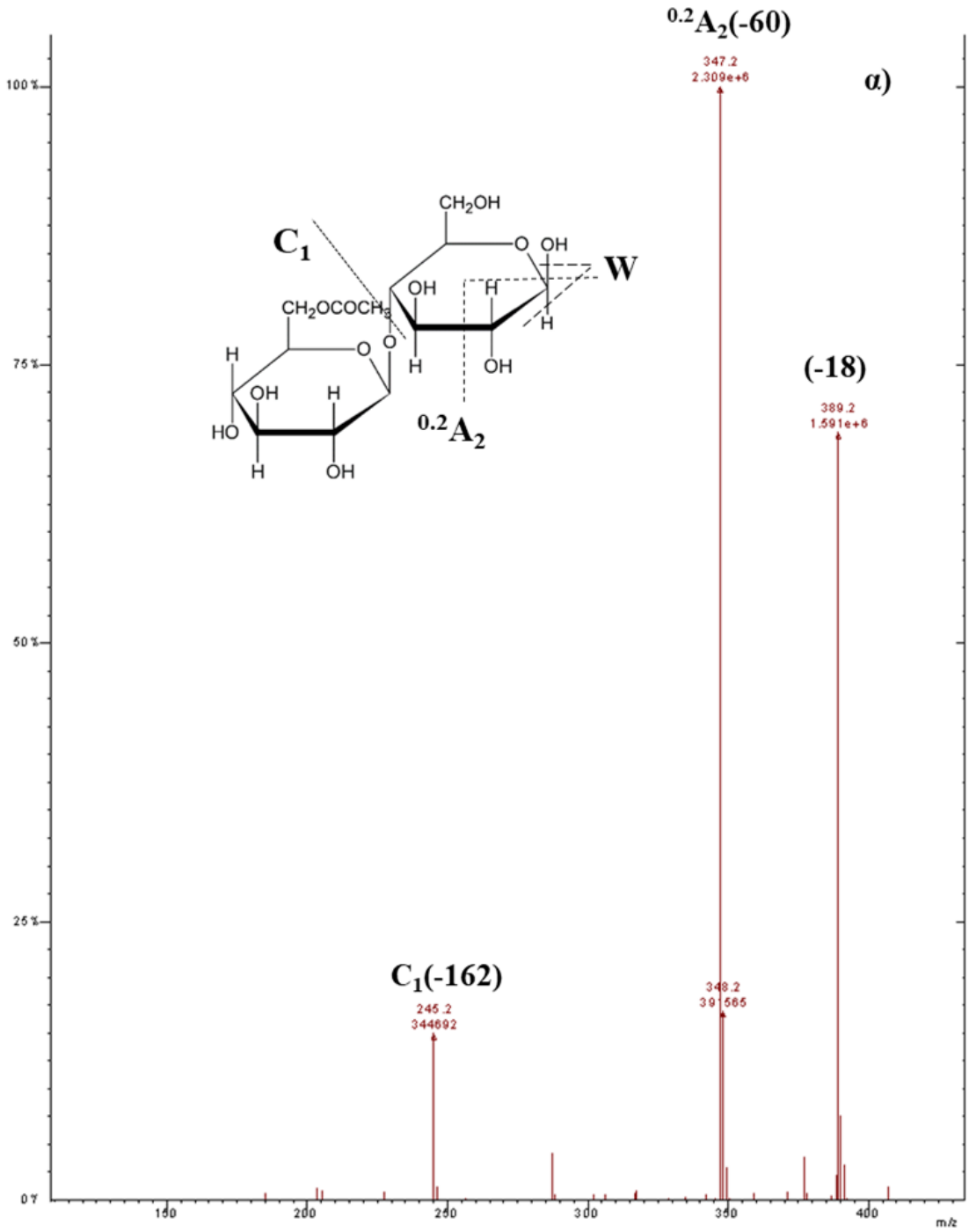

1_PET_Biotechnology_CDCL3
STANDARD 1H OBSERVE
[2,3,15,16,17,18,29,30]
[4,5,27,28]
[6,26]
[CHCl3]
[9,10,21,22]
7.43
5.62
8.00
f1 (ppm)

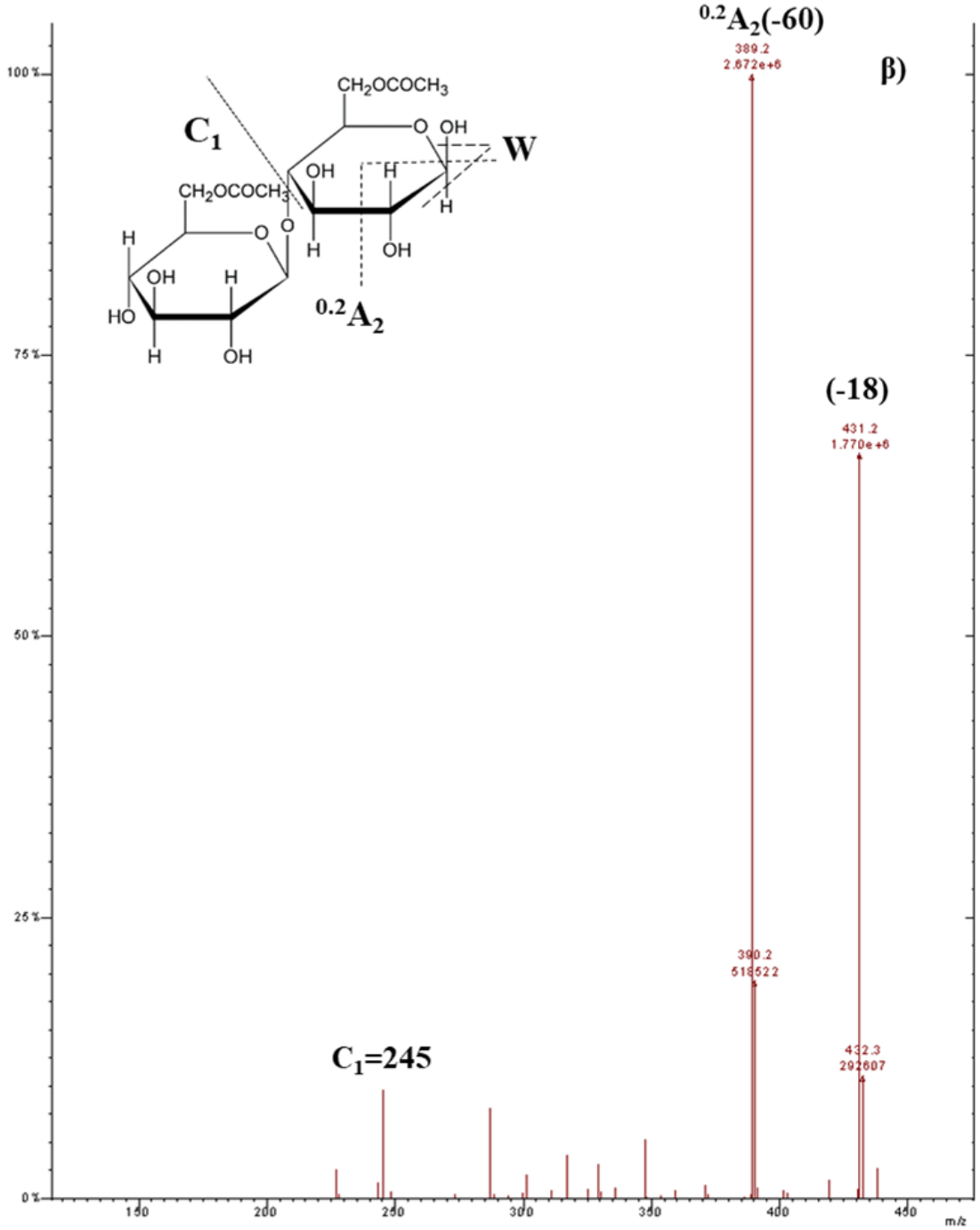
γ)

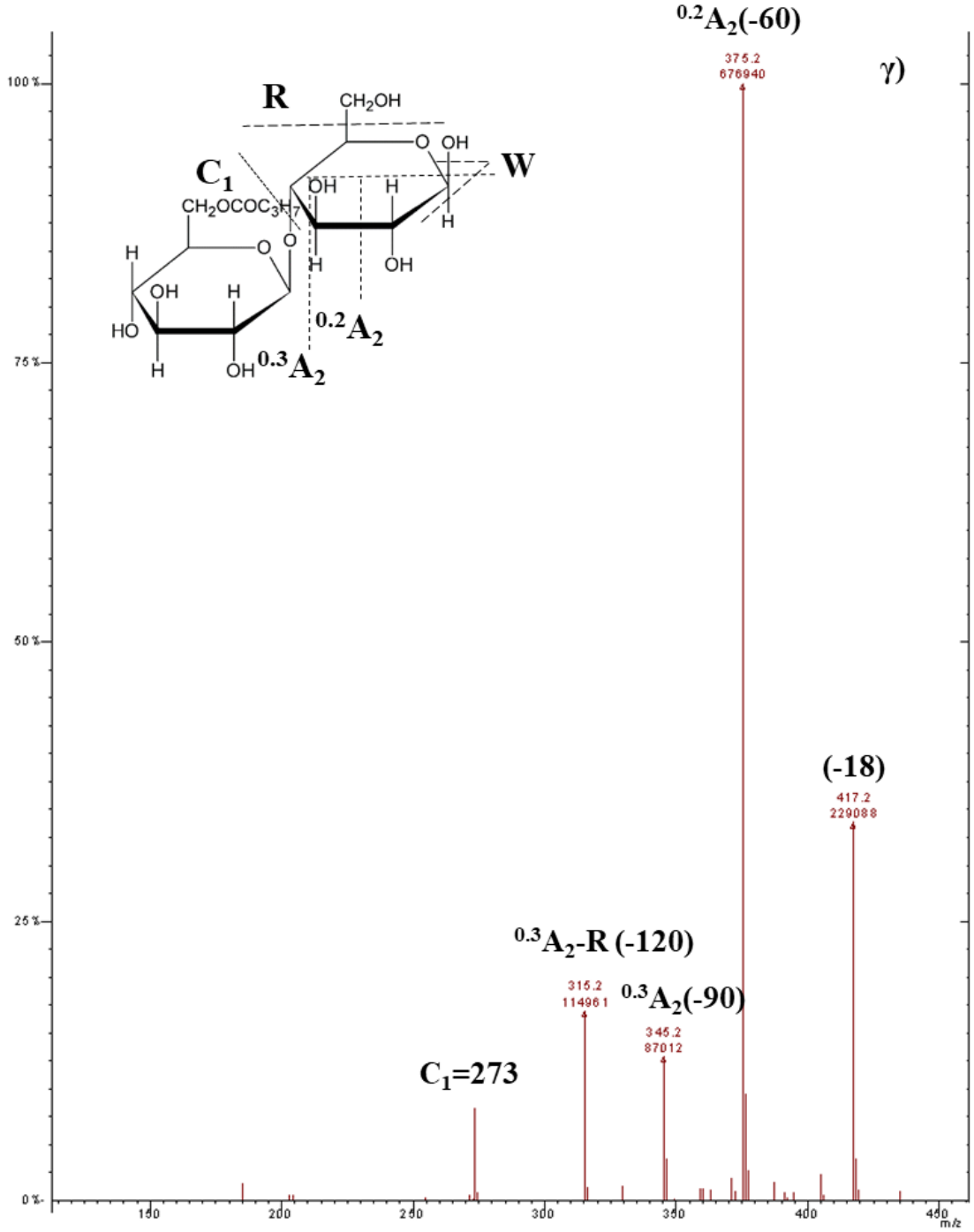


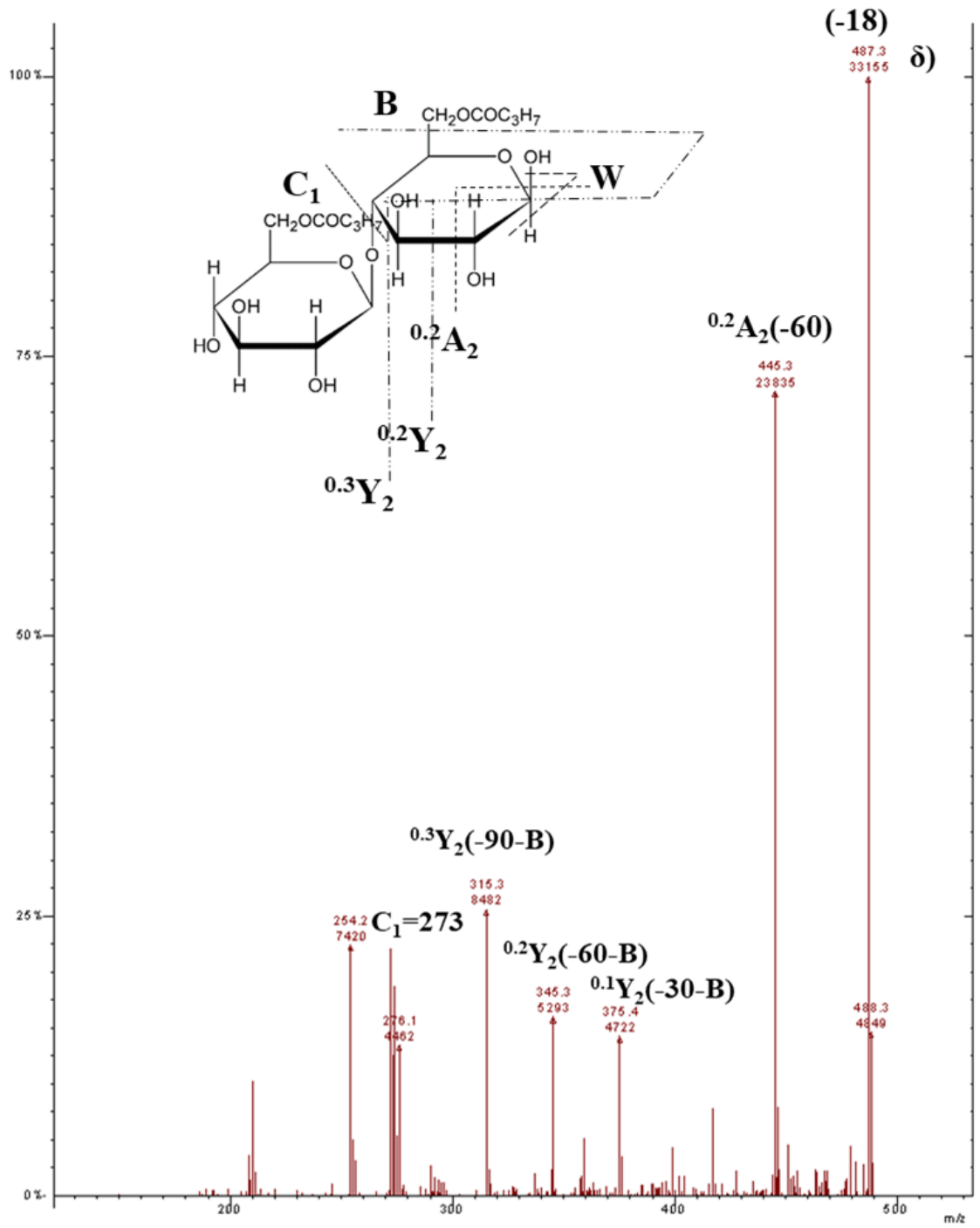
δ)

Σχήμα Π1: (α) ^{1}H-NMR για μοντέλο PA, (β) ^{13}C-NMR για μοντέλο PA, (γ) ^{1}H-NMR για μοντέλο 3PET, (δ) ^{13}C-NMR για μοντέλο 3PET.

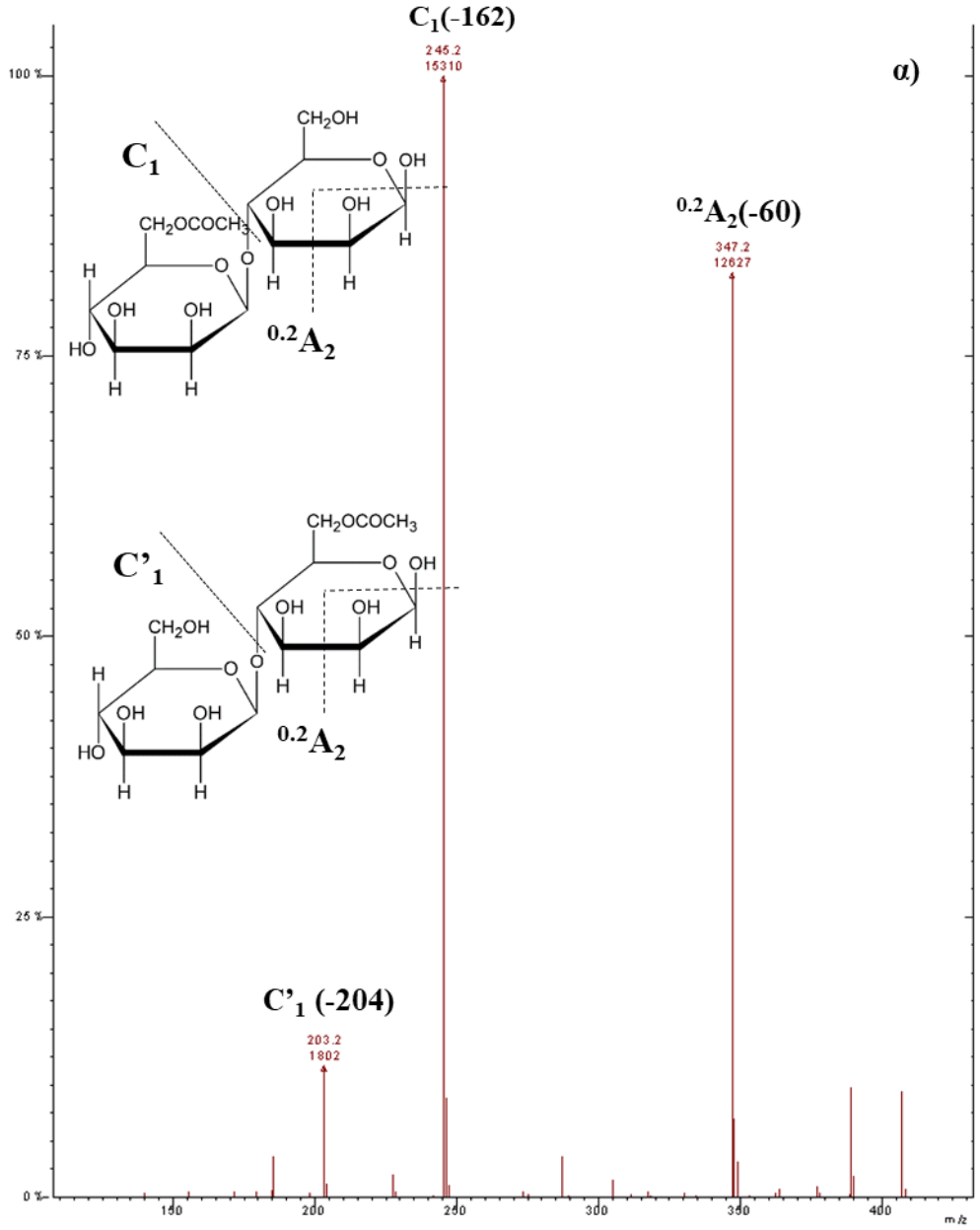

α)
$^{0.2}A_2$(-60)
347.2
2.309e+6
(-18)
389.2
1.591e+6
C_1(-162)
245.2
344692
348.2
391565
C_1
W
$^{0.2}A_2$
100 %
75 %
50 %
25 %
0 %
100
200
250
300
350
400
m/z

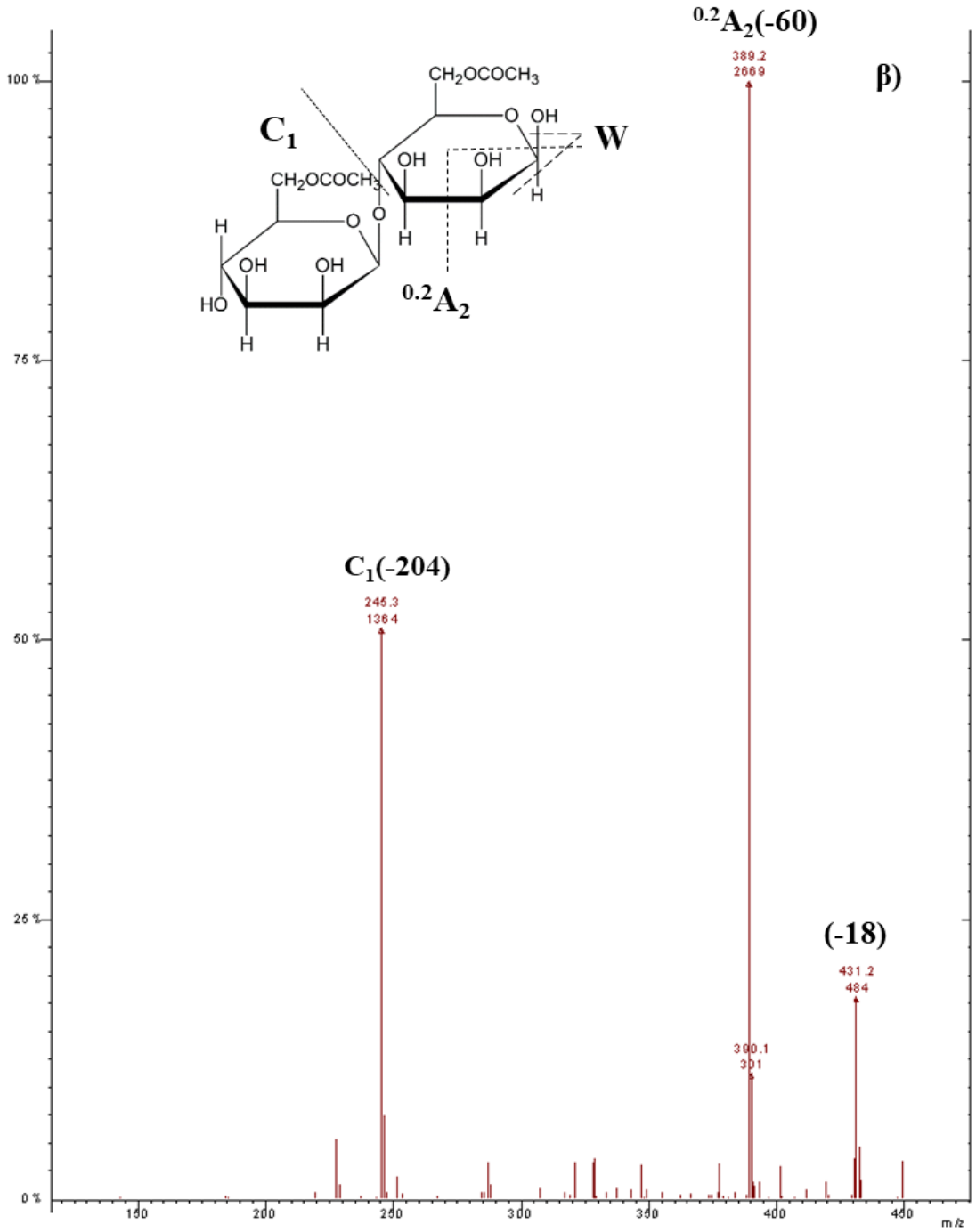

0.2A2(-60)
389.2
2.672e+6
β)
C1
W
0.2A2
(-18)
431.2
1.770e+6
390.2
518522
432.3
292607
C1=245
100%
75%
50%
25%
0%
150
200
250
300
350
400
450
m/z

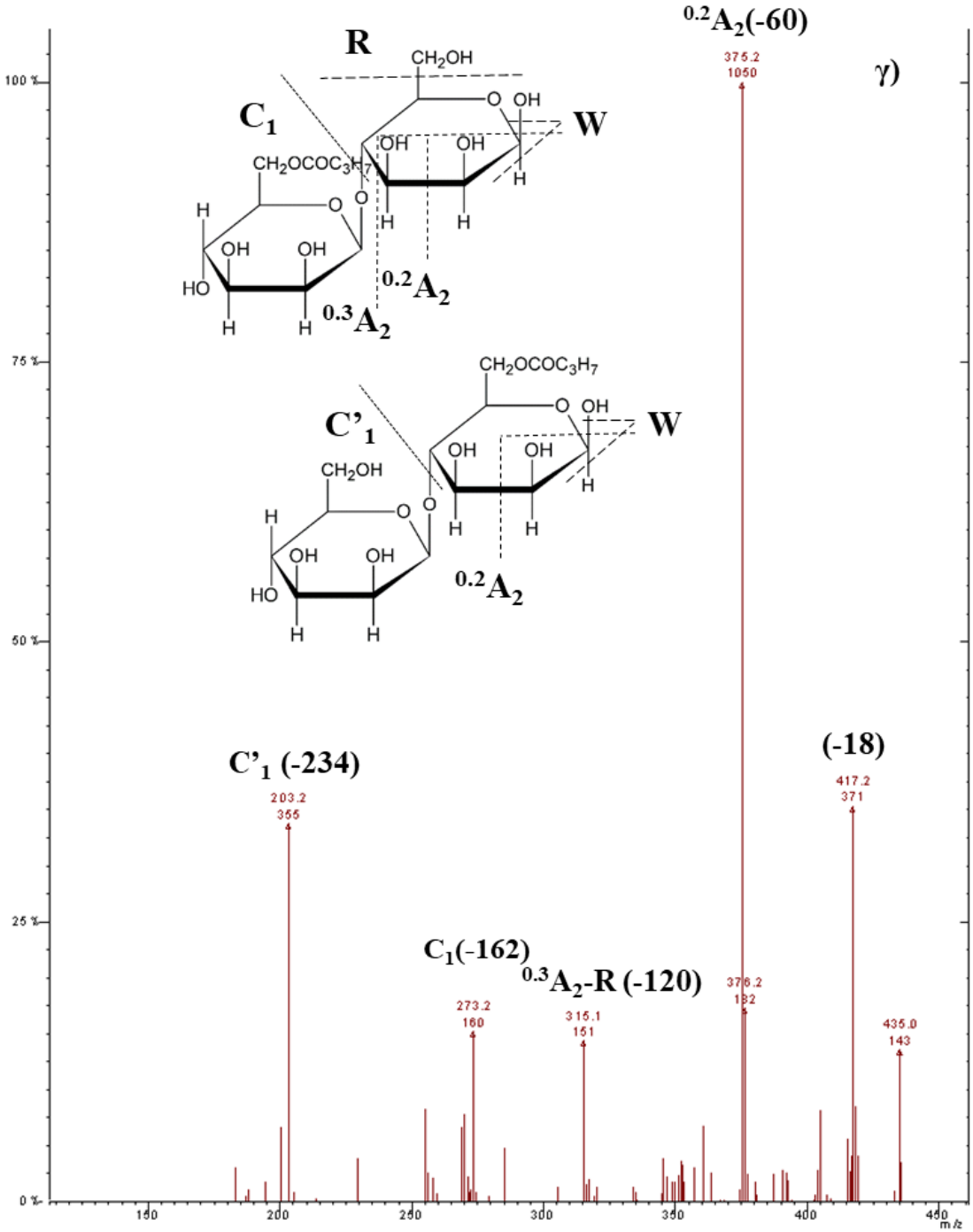

γ)
0.2A2(-60)
375.2
676940
(-18)
417.2
229088
0.3A2-R (-120)
315.2
114961
0.3A2(-90)
345.2
87012
C1=273
R
W
C1
CH2OH
CH2OCOC3H7
0.2A2
0.3A2
100 %
75 %
50 %
25 %
0 %
150
200
250
300
350
400
450
m/z

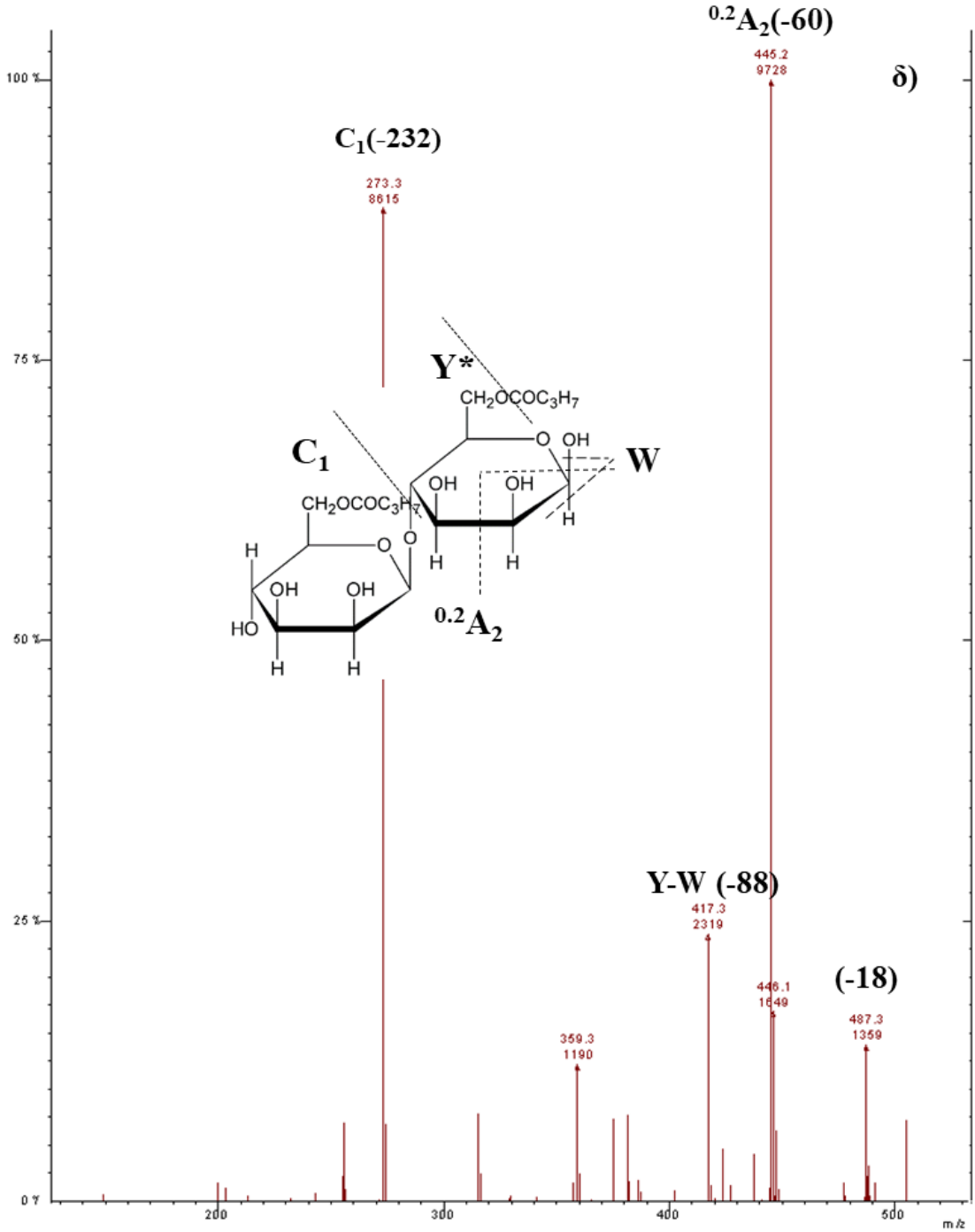


Σχήμα Π2: Δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode του ψευδομοριακού ιόντος [M+Na]+ της α) μονοακετυλιωμένης (m/z 407), β) της διακετυλιωμένης (m/z 449), γ) της μονοβουτυλιωμένης (m/z 435) και της διβουτυλιωμένης (m/z 505) Celb ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση *Ct*CE2.


C1(-162)
245.2
15310
α)
C1
0.2A2(-60)
347.2
12627
0.2A2
C'1
0.2A2
C'1 (-204)
203.2
1802
100 %
75 %
50 %
25 %
0 %
150
200
250
300
350
400
m/z


β)
0.2A2(-60)
389.2
2669
C1(-204)
245.3
1364
(-18)
431.2
484
390.1
301
C1
W
0.2A2
CH2OCOCH3
OH
H
HO
O
100 %
75 %
50 %
25 %
0 %
100
200
250
300
350
400
450
m/z


γ)
R
W
C1
C'1
0.2A2
0.3A2
0.2A2(-60)
C'1 (-234)
(-18)
C1(-162)
0.3A2-R (-120)
375.2
1050
203.2
355
417.2
371
273.2
160
315.1
151
376.2
132
435.0
143
100 %
75 %
50 %
25 %
0 %
150
200
250
300
350
400
450
m/z



Σχήμα Π3: Δεύτερης τάξης MS σε θετικό mode του ψευδομοριακού ιόντος [M+Na]+ της α) μονοακετυλιωμένης (m/z 407), β) της διακετυλιωμένης (m/z 449), γ) της μονοβουτυλιωμένης (m/z 435) και της διβουτυλιωμένης (m/z 505) β-Manb ύστερα από αντίδραση μετεστεροποίησης με την εστεράση *Ct*CE2. Η πιθανή απώλεια ιόντος από κάθε μονάδα ενός δισακχαρίτη συμβολίζεται με (*).