



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

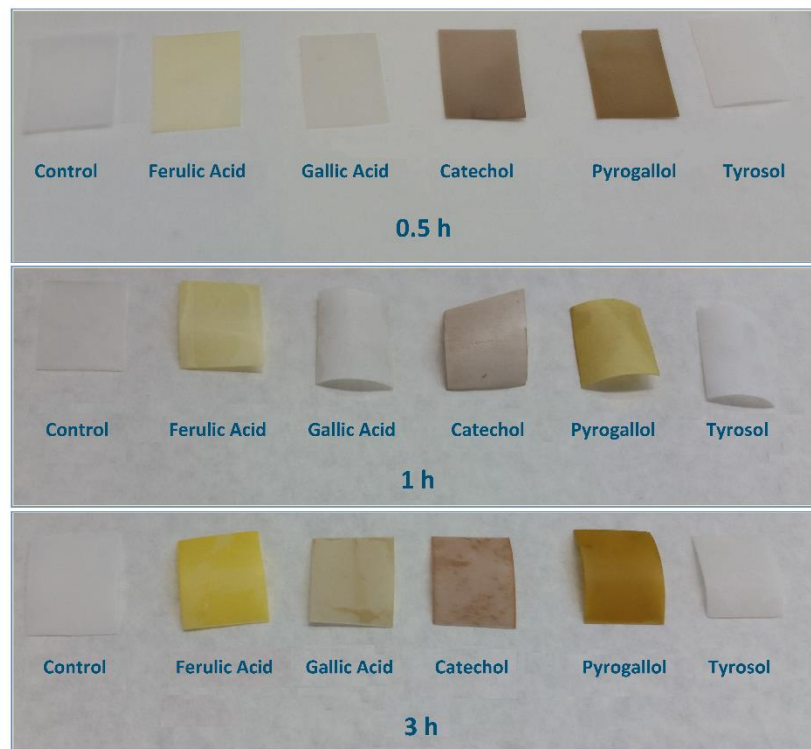
Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση συνθετικών πολυμερών



Δεσденάκη Αθηνά

Επιβλέπων: Ευάγγελος Τόπακας (Αναπληρωτής Καθηγητής Ε.Μ.Π.)

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου (Ε.Μ.Π.), υπό την επίβλεψη του αναπληρωτή καθηγητή κ. Ευάγγελου Τόπακα στο πλαίσιο ολοκλήρωσης των σπουδών μου στη σχολή.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Τόπακα για την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου πρόσφερε κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής, καθώς και για την κατανόηση που έδειξε κατά το στάδιο της συγγραφής της.

Θέλω, επίσης, να ευχαριστήσω την διδάκτορα Μαρία Κανελλή για τη συνεχή παρουσία και τη βοήθεια της, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε, καθώς και για τις εμπειρίες που μοιραστήκαμε τις «αμέτρητες» ώρες που περάσαμε παρέα στο εργαστήριο. Με βοήθησε να προσαρμοστώ στην καθημερινότητα του ερευνητή, να επεκτείνω τις γνώσεις μου και τα όρια μου και αποτελούσε την ακούραστη δύναμη του εργαστηρίου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω, επίσης, στο Εργαστήριο Μικροβιακής Μοριακής Γενετικής και Οικολογίας του Institute Of Molecular Genetics And Genetic Engineering (IMGGE) στο Βελιγράδι για τη βοήθεια που παρείχαν με τα αντιμικροβιακά tests που πραγματοποιήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Φυσικά δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την στήριξη και τη συμπαράστασή της σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Αλλά και τις φίλες μου, για την παρέα τους, τις όμορφες στιγμές που μοιραστήκαμε και τη βοήθεια τους σε στιγμές που ήταν πραγματικά απαραίτητη. Ιδιαίτερα την Αγγελική, γιατί χωρίς την συνεχή παρότρυνση και επιμονή της δεν θα ήταν εφικτό να ολοκληρωθεί και να παραδοθεί αυτή η εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	d
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ	1
2.1 PLA.....	3
2.2 PA.....	5
3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ	6
3.1 Ενζυμική τροποποίηση συνθετικών πολυμερών	7
4 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	10
4.1 Φερουλικό οξύ.....	11
4.2 Γαλλικό οξύ.....	11
4.3 Κατεχόλη.....	12
4.4 Πυρογαλόλη	13
4.5 Τυροσόλη.....	14
5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	15
5.1 Ένζυμα	15
5.2 Μικροοργανισμοί.....	15
5.3 Υλικά.....	15
5.4 Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).....	15
5.5 Συσκευές και Όργανα.....	16
5.6 Σύνθεση φύλλων PLA	16
5.7 Θερμική ανάλυση των ατροποποίητων πολυμερικών υλικών	17
5.7.1 Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC).....	17
5.7.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)	18
5.8 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και ενζυμικής συγκέντρωσης.....	18
5.8.1 Alcalase 2.4 L.....	18
5.8.2 Laccase Novozym® 51003	19
5.9 Προεπεξεργασία πολυμερικών υλικών.....	19
5.9.1 Ενζυμική υδρόλυση PA 6.6 υφασμάτων	19
5.9.2 Προεπεξεργασία των PA 6.6 υφασμάτων με DCC και EDA.....	20
5.9.3 Προεπεξεργασία των PLA films με EDA.....	21

5.10	Επιφανειακή ενζυμική τροποποίηση <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις.....	22
5.10.1	PLA <i>films</i>	22
5.10.2	PA υφάσματα.....	23
5.11	Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	24
5.12	Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	25
5.13	Φασματοσκοπική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις – Ανάλυση FTIR-ATR	25
5.14	Μέτρηση της μεταβολής χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	26
6	Θερμική ανάλυση/χαρακτηρισμός των μη επεξεργασμένων πολυμερικών υλικών....	27
6.1	Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC).....	27
6.1.1	PLA.....	28
6.1.2	PA.....	29
6.2	Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA).....	30
6.2.1	PLA.....	30
6.2.2	PA.....	31
7	Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενζυμικώς επιφανειακά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	32
7.1	PLA.....	33
7.1.1	1 ^{ος} κύκλος.....	33
7.1.2	2 ^{ος} κύκλος.....	38
7.1.3	3 ^{ος} κύκλος.....	40
7.2	PA.....	46
7.2.1	1 ^{ος} κύκλος.....	46
7.2.2	2 ^{ος} κύκλος.....	48
8	Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	51
8.1	PLA.....	51
8.2	PA.....	53
9	Φασματοσκοπική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων <i>films</i> PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις – Ανάλυση FTIR-ATR	58
9.1	PLA.....	58
9.2	PA.....	62

10	Μεταβολή χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις	64
10.1	PLA.....	64
10.2	PA.....	66
11	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	70
12	ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	73
13	ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται μια βιοτεχνολογική, φιλικότερη προς το περιβάλλον διεργασία για την τροποποίηση συνθετικών πολυμερών, με στόχο την αύξηση της λειτουργικότητάς τους και την διεύρυνση του πεδίου εφαρμογών τους.

Τα συνθετικά πολυμερή αποτελούν σημαντικό κομμάτι της βιομηχανίας - τα πολυαμίδια (PA) στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας και οι πολυεστέρες (στους οποίους ανήκει το PLA) στον τομέα της συσκευασίας τροφίμων και φαρμάκων - υπάρχει όμως ανάγκη για βελτίωση των ιδιοτήτων τους ώστε να γίνουν πιο ανταγωνιστικά και καταλληλότερα για χρήση σε αυτούς τους τομείς, καθώς και για την χρήση τους σε άλλες εφαρμογές. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας εργασίας είναι να εφαρμοστεί μια νέα, φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος που θα προσδώσει στα πολυμερή αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ικανότητες.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε δύο στάδια: το στάδιο της προεπεξεργασίας και το στάδιο της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης με τις φαινολικές ενώσεις. Τα PLA films προεπεξεργάστηκαν με 8% v/v EDA σε αιθανόλη στους 25 °C και έγινε μελέτη για τον χρόνο προεπεξεργασίας με δοκιμαζόμενες διάρκειες: 30 min, 1 h και 3 h. Επιλέχθηκε σαν βέλτιστος χρόνος προεπεξεργασίας η **1 h** σύμφωνα με τα αποτελέσματα απώλειας μάζας και αντιοξειδωτικότητας. Τα PA υφάσματα υδρολύθηκαν πρώτα με 37,2 mg_{ενζύμου}/g_{υφάσματος} του ενζύμου **Alcalase 2.4 L**, προεπεξεργάστηκαν με 4% w/w DCC σε αιθανόλη για 3 h στους 25°C και στη συνέχεια με 8% v/v EDA σε αιθανόλη για 3 h στους 25 °C. Στο δεύτερο στάδιο, όλα τα δείγματα τροποποιήθηκαν ενζυμικά, κάνοντας χρήση του ενζυμικού σκευάσματος λακάσης **Laccase Novozym® 51003**, με τις φαινολικές ενώσεις φερούλικό οξύ, γαλλικό οξύ, κατεχόλη, πυρογαλόλη και τυροσόλη με συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων 40 mM, χρόνο αντίδρασης 3 h, σε pH 6, στους 60 °C.

Για τα PLA films την καλύτερη αντιοξειδωτική δράση την έδειξαν τα δείγματα της κατεχόλης και της πυρογαλόλης με **EC₅₀ 0,89 cm²** και **0,94 cm²** αντίστοιχα (για την προεπεξεργασία 1 h με EDA). Το ίδιο προέκυψε και για τα υφάσματα PA με τιμές **EC₅₀ 1,14 cm²** για το δείγμα της κατεχόλης και **1,12 cm²** για το δείγμα της πυρογαλόλης. Για τα PLA πραγματοποιήθηκε, επίσης, μελέτη χρόνου της ενζυμικής τροποποίησης (ελεγχόμενες διάρκειες της αντίδρασης: 30 min, 1.5h, 3h, 6h) και μελέτη συγκέντρωσης της χρησιμοποιούμενης λακάσης (ελεγχόμενες συγκεντρώσεις λακάσης: 1, 4, 8 U). Από αυτές τις μελέτες προέκυψε ότι η τροποποίηση για όλες τις συγκεντρώσεις λακάσης ολοκληρωνόταν εντός της 1,5 h, εκτός από τη συγκέντρωση 8 U όπου διαπιστώθηκε περαιτέρω τροποποίηση και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για τις 6 h αντίδρασης. Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου (8 U) έδειξε καλύτερα αποτελέσματα και βελτίωση στην αντιοξειδωτικότητα του δείγματος μόνο για μεγάλους χρόνους αντίδρασης (6 h).

Τη μεγαλύτερη (και μόνη σημαντική) αντιμικροβιακή ιδιότητα, για τα PLA films, την έδειξε το δείγμα της πυρογαλόλης έναντι του *P. Aeruginosa*, με **44 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 30 min και **79 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 1 h. Τα πολυαμιδικά υφάσματα έδειξαν την μεγαλύτερη

αντιμικροβιακή ιδιότητα έναντι του *E. coli* με **82 %** και **57 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για το προεπεξεργασμένο δείγμα της πυρογαλόλης και το προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης αντίστοιχα.

Η ελεγχόμενη ενζυμική τροποποίηση των PLA films και PA υφασμάτων εξετάστηκε και μέσω της φασματοσκοπικής μεθόδου FTIR-ATR.

Τέλος, με στόχο τον έλεγχο της παρουσίας των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των πολυμερών μετρήθηκε η παρατηρούμενη διαφορά χρώματος ΔΕ. Για τα PLA films την μεγαλύτερη διαφορά στο χρώμα παρουσίασε το δείγμα της πυρογαλόλης με ΔΕ **50,03 ± 2,08** και δεύτερο ήταν το δείγμα της κατεχόλης με ΔΕ **32,69 ± 3,38**. Στα πολυαμιδικά υφάσματα, αντίθετα, την μεγαλύτερη μεταβολή την εμφάνισε το προεπεξεργασμένο δείγμα του φερουλικού οξέος με ΔΕ **57,63 ± 0,71** με αμέσως επόμενο το προεπεξεργασμένο δείγμα της πυρογαλόλης με ΔΕ **55,70 ± 0,68**.

ABSTRACT

The present diploma thesis examines a biotechnological, eco-friendly procedure that aims to increase the functionality of synthetic polymers and expand their field of applications.

Synthetic polymers are an important part of the industry – polyamides (PA) in the textile sector and polyesters (PLA is one of them) in the food packaging and drug sector - but there is a need to improve their properties to make them more competitive against other polymers and more suitable for use in these sectors, as well as other applications. The aim of the present thesis is to develop a new, eco-friendly method that will supply the polymers with antioxidant and antimicrobial properties.

This method consists of two stages: stage one is the pretreatment of the polymers and stage two is the enzymatic surface modification of the polymers with the phenolic compounds. PLA films were pretreated with 8 % v/v EDA in ethanol at 25 °C and the effect of the pretreatment duration was studied. Examined pretreatment durations: 30 min, 1 h και 3 h. According to the weight loss and antioxidant test results **1 h** was selected as the optimal duration. PA fabrics were hydrolyzed with 37,2 mg_{enzyme}/g_{fabric} of the commercial protease **Alcalase 2.4 L**, then pretreated with 4% w/w DCC in ethanol for 3 h at 25°C and finally with 8% v/v EDA in ethanol for 3 h at 25°C. In stage two, all samples were enzymatically modified, using the commercial laccase **Laccase Novozym® 51003** and the phenolic compounds ferulic acid, gallic acid, catechol, pyrogallol and tyrosol. The used phenolic compound concentration was 40 mM, the duration of the reaction was 3 h, pH 6 and temperature 60 °C.

For PLA films the best antioxidant activity was achieved for the samples of catechol and pyrogallol with **EC₅₀ 0,89 cm²** and **0,94 cm²** respectively (for 1 h of pretreatment with EDA). Likewise, for PA fabrics **EC₅₀** was found to be **1,14 cm²** for the catechol sample and **1,12 cm²** for the pyrogallol sample. For the polyester films the duration of the enzymatic surface modification and the laccase concentration (expressed in activity units) were studied. (Examined reaction durations: 30 min, 1.5h , 3h , 6h. Examined laccase concentrations: 1, 4, 8 U.) It was found that for all the examined laccase concentrations the reaction was completed in 1.5h, except for 8 U where further modification and greater antioxidant activity was found for the 6 h reaction. In addition, it was found that the higher enzyme concentration (8 U) showed better results and improvement in the antioxidant activity of the samples only for long reaction duration (6 h).

The best (and only important) antimicrobial activity for PLA films was achieved for the sample of pyrogallol against *P. Aeruginosa*, with **44 %** reduction in cell growth for 30 min of pretreatment with EDA and **79 %** reduction in cell growth for 1 h of pretreatment with EDA. PA fabrics exhibited the best antimicrobial activity against *E. coli* with **82 %** and **57 %** reduction in cell growth for the pretreated samples of pyrogallol and catechol respectively.

The studied enzymatic modification of PLA films and PA fabrics was also examined by the FTIR-ATR spectroscopic method.

Finally, in order to confirm the presence of the functional groups on the surface of the polymers the observed color difference (ΔE) was measured. For PLA films the biggest difference

in color was found for the sample of pyrogallol with ΔE **50,03 \pm 2,08** followed by the catechol sample with ΔE **32,69 \pm 3,38**. For the PA fabrics, on the contrary, the biggest difference in color was observed for the pretreated sample of ferulic acid with ΔE **57,63 \pm 0,71** followed by the pretreated sample of pyrogallol with ΔE **55,70 \pm 0,68**.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα συνθετικά πολυμερή έχουν τραβήξει την προσοχή για διάφορες εφαρμογές όπως η κλωστοϋφαντουργία, η συσκευασία τροφίμων, ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές κ.α., για διάφορους λόγους. Ένα μεγάλο εύρος φυσικών και χημικών ιδιοτήτων μπορεί να επιτευχθεί με βάση το χρησιμοποιούμενο μονομερές, την αντίδραση πολυμερισμού και το σχηματισμό συμπολυμερών που αποτελούνται από διαφορετικά συστατικά σε ρυθμιζόμενες συγκεντρώσεις, καθιστώντας τα κατάλληλα για την παρασκευή υλικών με προσαρμοσμένες ιδιότητες αναλόγως της εφαρμογής. Επίσης, εξαιτίας της περιεκτικότητας τους σε άνθρακα τα πολυμερή είναι πιο συμβατά με το βιολογικό ιστό από τα ανόργανα υλικά και αυτό τα καθιστά καταλληλότερα για χρήση σε ιατροφαρμακευτικές και βιοϊατρικές εφαρμογές.

Τα συνθετικά υφάσματα, όπως τα πολυαμιδικά, παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως αυξημένη αντοχή, υψηλή ελαστικότητα, μειωμένο ζάρωμα και γρήγορο στέγνωμα, ενώ παράλληλα ευνοούν την οικονομική μαζική παραγωγή. Έτσι αποτελούν σημαντικό κομμάτι της κλωστοϋφαντουργίας. Αντίστοιχα, πολυμερή, όπως το PLA, που είναι βιοαποικοδομήσιμα και μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμες πηγές προτιμώνται, εφόσον κατέχουν τις κατάλληλες ιδιότητες, σε εφαρμογές όπως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, σε συσκευασίες τροφίμων αλλά και για την παραγωγή ινών με σκοπό τη χρήση τους στην βιομηχανία υφάσματος. Η βελτίωση των ιδιοτήτων τους είναι επιθυμητή για να γίνουν καταλληλότερα για αυτούς τους τομείς καθώς και για την χρήση τους σε άλλες εφαρμογές. Οι τεχνικές επιφανειακής τροποποίησης επιτρέπουν την ανεξάρτητη βελτιστοποίηση των μηχανικών ιδιοτήτων του κύριου όγκου του υλικού και των ιδιοτήτων της επιφάνειας. (Maitz, 2015)

Σε αυτήν την βάση, επιλέχθηκε για την παρούσα διπλωματική να εφαρμοστεί μία νέα ενζυμική διεργασία, με σκοπό την επιφανειακή τροποποίηση των πολυμερών με φαινολικές ενώσεις, που παρέχουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες, ενώ ταυτόχρονα αποτελεί και μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο, καθώς διεξάγεται σε πιο ήπιες συνθήκες.

2 ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

Τα συνθετικά πολυμερή παρουσιάζουν μοναδικές ιδιότητες, όπως η υψηλή ομοιομορφία, η καλή μηχανική και χημική αντοχή, όμως η υψηλή υδροφοβικότητά τους, η συσσώρευση στατικών φορτίων και η αδυναμία «αναπνοής» τους αποτελούν ανεπιθύμητες ιδιότητες, ειδικά για τη βιομηχανία υφάσματος. (Guebitz and Cavaco-Paulo, 2008)

Στον τομέα της κλωστοϋφαντουργίας γίνεται εκτενής χρήση συνθετικών πολυμερών για την παραγωγή ινών και υφασμάτων υποκαθιστώντας σε μεγάλο βαθμό τα φυσικά προϊόντα (μαλλί, βαμβάκι, λινάρι). Οι συνθετικές ίνες σε σύγκριση με τις φυσικές παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι δεν είναι βιοαποικοδομήσιμες, αποτελούν εύφλεκτα υλικά με χαμηλή αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, απαιτούν πιο πολύπλοκες διαδικασίες

επεξεργασίας, 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 διαδικασία του πλυσίματος. (Kiumarsi and Parvinzadeh, 2010) Η χαμηλή υδροφιλικότητά τους δυσκολεύει τις διεργασίες βαφής, δεν είναι άνετα στην ένδυση και δεν επιτρέπουν την εξάτμιση του ιδρώτα προκαλώντας δυσσομία και δυσχέρεια στο δέρμα. (Bishop, 2014),(Lee and Song, 2010) 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, ανθεκτικότητα σε επιθέσεις εντόμων και παράσιτων, όπως ο σκώρος, ζαρώνουν πιο λίγο, στεγνώνουν πιο γρήγορα, έχουν χαμηλό κόστος παραγωγής και δυνατότητα για μαζική παραγωγή σε ελάχιστο χρόνο (Djordjević, Petronijević and Cvetković, 2005),(Uttam, 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. (βλέπε **Εικόνα 4** και **Εικόνα 5**)

Τα συνθετικά πολυμερή χρησιμοποιούνται, όμως, και σε πληθώρα άλλων εφαρμογών. Μεγάλη σημασία έχει για την βελτίωση της ποιότητας της ανθρώπινης ζωής, για την προστασία του περιβάλλοντος καθώς και για την μείωση της εξάρτησης από τα ορυκτά αποθέματα, η χρήση βιοαποικοδομήσιμων υλικών. Σ' αυτή την προσπάθεια συμβάλλει η χρήση βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, με εκτενή χρήση στον ιατροφαρμακευτικό αλλά και στον τομέα της συσκευασίας. Μάλιστα, τα συνθετικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή έχουν βρει περισσότερες και πιο ευέλικτες εφαρμογές στον βιοϊατρικό τομέα σε σύγκριση με τα φυσικά βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή λόγω του προσαρμοζόμενου σχεδιασμού τους ή των τροποποιήσεων που επιδέχονται. Ενώ τα περισσότερα βιολογικά προερχόμενα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή κατέχουν καλή βιοσυμβατότητα μπορεί να προκαλέσουν αντίδραση του ανοσοποιητικού στο ανθρώπινο σώμα, που μπορεί να αποφευχθεί με τη χρήση του κατάλληλου συνθετικού βιοπολυμερούς. Παράλληλα, η χημική τροποποίηση βιολογικά προερχόμενων πολυμερών είναι δύσκολη και προκαλεί συνήθως μεταβολές του κύριου όγκου του υλικού.

Καθώς οι αλειφατικοί πολυεστέρες περιέχουν εύκαμπτους εστερικούς δεσμούς και μπορούν να αποδομηθούν σε μη τοξικά προϊόντα σε διαλύματα διαφορετικού pH, μπορεί να είναι τα πιο υποσχόμενα βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή για αυτές τις εφαρμογές. Έτσι, οι πολυλακτόνες (όπως το PLA), βάση της βιοαποικοδομησιμότητά τους αλλά και άλλων σημαντικών ιδιοτήτων όπως η διαφάνεια, η εξαιρετική δυνατότητα σχηματισμού film μέσω χύτευσης για επιστρώσεις, οι καλές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες, η επιλεκτική διαπερατότητα και η ευκολία στην επεξεργασία, τα καθιστούν κατάλληλα για τον τομέα της συσκευασίας. (Cheng *et al.*, 2009),(Tian *et al.*, 2012)

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τις ιδιότητες των πολυμερών, περιλαμβάνουν τα χημικά συστατικά, τις συνθέσεις, τη μορφολογική δομή κλπ. Οι επιφανειακές ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των εφαρμογών τους, ειδικά στα βιοϋλικά. Συνεπώς, η τροποποίηση είναι αναπόφευκτη για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των παραδοσιακών

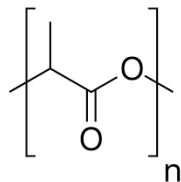
συνθετικών πολυμερών αναλόγως της εφαρμογής για την οποία προορίζονται και έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτενούς μελέτης πολλών ερευνητών.

2.1 PLA

Τα βιοπολυμερή προτιμώνται για κάποιες ιδιότητες τους που τα καθιστούν κατάλληλα να αντικαταστήσουν τα άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα πλαστικά. Οι κυριότερες από αυτές είναι η **βιοδιασπασιμότητα** και η **βιοσυμβατότητα** τους. Μια από τις μεγαλύτερες κατηγορίες των βιοδιασπασίμων πολυμερών είναι οι πολυεστέρες, η παραγωγή των οποίων όλο και αυξάνεται εξαιτίας την νομοθεσίας σχετικά με την ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών και οικονομικά βιώσιμων μεθόδων παρασκευής και ανακύκλωσης των πολυμερών. Κατέχουν κυρίαρχη θέση στα βιοαποικοδομήσιμα υλικά, καθώς τα προϊόντα από την υδρολυτική και ενζυμική τους υποβάθμιση μπορούν να μεταβολιστούν φυσικά σε μη τοξικές ουσίες. Ταυτόχρονα διαθέτουν ισορροπημένες θερμικές και μηχανικές ιδιότητες που εξαρτώνται από την επαναλαμβανόμενη μονάδα.

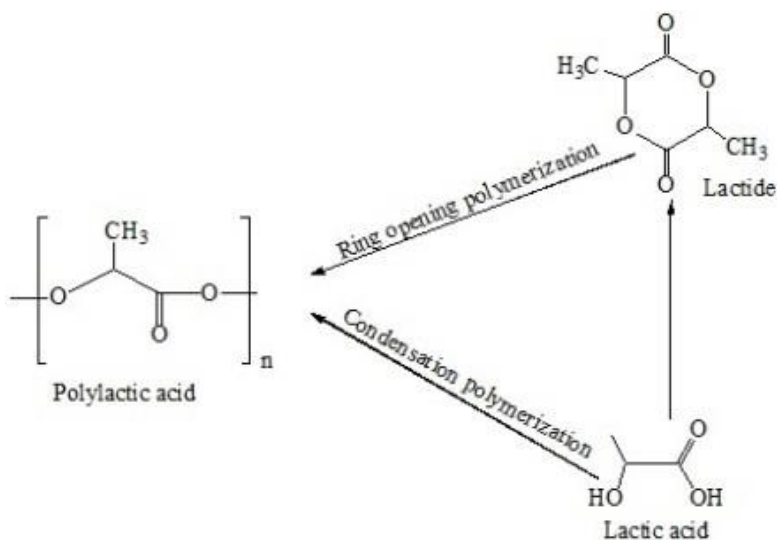
Το **πολύ(γαλακτικό) οξύ [poly(lactic acid) - PLA]** είναι ένα από αυτά τα βιοπολυμερή, καθώς μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πηγές, και ανήκει στην οικογένεια των αλειφατικών πολυεστέρων. Είναι ένας βιοδιασπώμενος θερμοπλαστικός πολυεστέρας με υψηλή μηχανική δύναμη, που ανάλογα με την επεξεργασία και το πάχος της τελικής μορφής του μπορεί να είναι διαφανής. Μπορεί να ανακυκλωθεί, να υποβληθεί σε κομποστοποίηση και η παραγωγή του συμβάλλει στην κατανάλωση διοξειδίου του άνθρακα. Χρησιμοποιείται σε ιατρικές και βιοϊατρικές εφαρμογές για ιατρικά υλικά (όπως αποικοδομήσιμα χειρουργικά ράμματα) και συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκου, λόγω της βιοσυμβατότητας και της μη τοξικότητάς του, για την παραγωγή ινών, καθώς και σαν υλικό συσκευασίας. (Khoo, Ismail and Chow, 2016),(Mofokeng *et al.*, 2012),(Farah, Anderson and Langer, 2016)

Παρά το ότι είναι ένα βιοπλαστικό φιλικό προς το περιβάλλον με εξαιρετική επεξεργασιμότητα, το PLA είναι χημικά αδρανές χωρίς αντιδραστικές ομάδες πλευρικής αλυσίδας, καθιστώντας έτσι τις τροποποιήσεις του μια δύσκολη εργασία (Yu *et al.*, 2018). Στα μειονεκτήματά του περιλαμβάνονται, επίσης, η μικρή σκληρότητα (είναι ένα πολύ εύθραυστο υλικό με επιμήκυνση μικρότερη από 10% στο σπάσιμο), ο αργός βαθμός αποδόμησης (αποικοδομείται μέσω της υδρόλυσης των εστερικών ομάδων του σκελετού του πολυμερούς και ο ρυθμός αποδόμησης εξαρτάται από την κρυσταλλικότητα του PLA, το μοριακό βάρος και την κατανομή του, τη μορφολογία, τη διάχυση του νερού στο πολυμερές και το περιεχόμενο του στερεοϊσομερών), η υδροφοβικότητα (είναι σχετικά υδρόφοβο, με αποτέλεσμα την χαμηλή συγγένεια με τα κύτταρα και την πρόκληση σε ορισμένες περιπτώσεις φλεγμονώδους απόκρισης από τον ξενιστή). (Farah, Anderson and Langer, 2016)



Εικόνα 1: Χημική δομή της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας του PLA

Οι συνθετικές οδοί για την παραγωγή του PLA είναι είτε με απευθείας συμπύκνωση του ελεύθερου γαλακτικού οξέος ή με πολυμερισμό μέσω διάνοιξης του δακτυλίου εστέρων του γαλακτικού οξέος. Σε σύγκριση με τον πολυμερισμό διάνοιξης του δακτυλίου, η απευθείας συμπύκνωση έχει λιγότερα βήματα παρασκευής και χαμηλότερο κόστος, όμως βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι το μικρό μοριακό βάρος του προκύπτοντος πολυμερούς. (Cheng *et al.*, 2009)



Εικόνα 2: Μέθοδος παραγωγής PLA μέσω πολυμερισμού του μονομερούς του λακτιδίου (κυκλικός διεστέρας προερχόμενος από το γαλακτικό οξύ) ή μέσω πολυμερισμού του μονομερούς του γαλακτικού οξέος.

Μπορεί να επεξεργαστεί με τη μέθοδο χύτευσης με έγχυση, χύτευσης με εμφύσηση και εξώθησης μεμβράνης καθώς η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του PLA είναι 50 - 60 °C και η θερμοκρασία τήξης είναι 168 - 172 °C. Μπορεί, επίσης, να παραχθεί χημικά και βιοτεχνολογικά αλλά οι βιοτεχνολογικές μέθοδοι προτιμώνται λόγω των περιβαλλοντικών ανησυχιών και της περιορισμένης φύσης των πετροχημικών αποθεμάτων. Παγκόσμιες προσπάθειες έχουν γίνει για την παραγωγή του PLA με καλή απόδοση και χαμηλού κόστους διαχείριση. Η παραγωγή του απαιτεί 25 – 55 % λιγότερη ενέργεια σε σχέση με πολυμερή που έχουν βάση το πετρέλαιο και οι εκτιμήσεις δείχνουν ότι μπορεί στο μέλλον να μειωθεί περαιτέρω σε λιγότερο από 10%.

Έχουν γίνει μελέτες για την επεξεργασία του κύριου όγκου του υλικού με σκοπό τη βελτίωση της σκληρότητάς του και του ρυθμού αποικοδόμησης, ενώ για την τροποποίηση της επιφάνειάς του σκοπός είναι ο έλεγχος της υδροφιλικότητας, της τραχύτητας και η προσθήκη σ' αυτήν αντιδραστικών ομάδων. (Choksi and Desai, 2017), (Farah, Anderson and Langer, 2016)

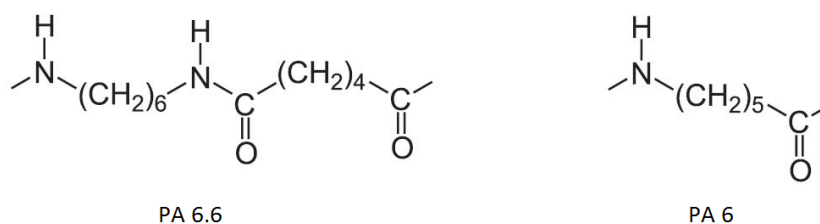
Στην ανάγκη που υπάρχει για συνθετικά βιοπολυμερή με ρυθμιζόμενες ιδιότητες, όπως η υδροφιλικότητα, η ταυτόχρονη προσκόλληση στο φάρμακο και στον στοχευόμενο ιστό, αλλά στη βελτίωση των ρυθμών αποικοδόμησης οι τροποποιημένοι με αντιδρώσες ομάδες πολυεστέρες έχουν τραβήξει την προσοχή.

2.2 PA

Το πολυαμίδιο είναι μία από τις σημαντικότερες ίνες μετά τους πολυεστέρες με παραγωγή περίπου 4 εκατομμύρια τόνους το 2009 και μερίδιο αγοράς 8,2%. Από την ανακάλυψη των πολυαμιδίων μέχρι σήμερα έχει παρατηρηθεί σταθερή αύξηση στην χρήση τους για διάφορες εφαρμογές λόγω των εξαιρετικών ιδιοτήτων τους όπως η ευκολία στην επεξεργασία, η χημική αντίσταση, οι μηχανικές ιδιότητες και η ευκολία στη βαφή. Οι ιδιότητές τους αυτές προέρχονται από τους ισχυρούς διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των αμιδικών ομάδων και των γειτονικών αλυσίδων.

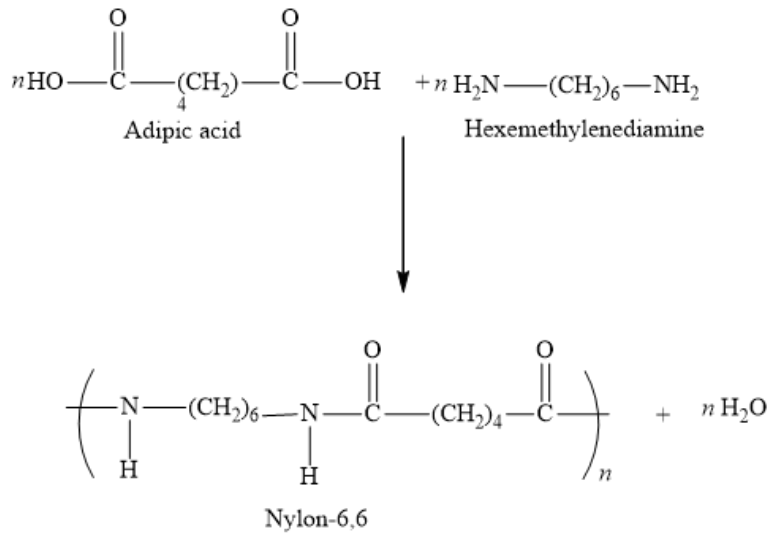
Κάποιες από τις τρέχουσες εφαρμογές των πολυαμιδίων είναι στη βιομηχανία υφάσματος, αθλημάτων, επίπλων και ψαρέματος. Έχουν, επίσης, πολλές εφαρμογές ως μεμβράνες (υπερ)διήθησης, στα ρούχα μίας χρήσης για τη βιομηχανία υγειονομικής περίθαλψης και ως δομικό υλικό πολλών εξαρτημάτων αυτοκινήτων όπως ζώνες ασφαλείας. Όπως συνοψίζεται από το Brehmer, περίπου το 76% του παραγόμενου PA χρησιμοποιείται για ανταλλακτικά αυτοκινήτων και συσκευών (παραγωγή με έγχυση σε καλούπι), και το 23 % χρησιμοποιείται για την παραγωγή films, επικαλυμμένων καλωδίων, ενώ μόνο το 1% θα ακολουθήσει διαφορετική διεργασία.

Πολλές ποιότητες PA παράγονται σήμερα, όμως πριν την ανάπτυξη στην χημεία του πολυμερισμού, τα PA 6 και PA 6.6 ήταν τα δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα. Πλέον, λόγω της μεγάλης ζήτησης για ελαφρύτερα και υψηλότερης απόδοσης υλικά και της μείωσης των ορυκτών αποθεμάτων, οι επιστήμονες οδηγούνται να ερευνήσουν και να αναπτύξουν πολυαμίδια από βιώσιμες εναλλακτικές πηγές.

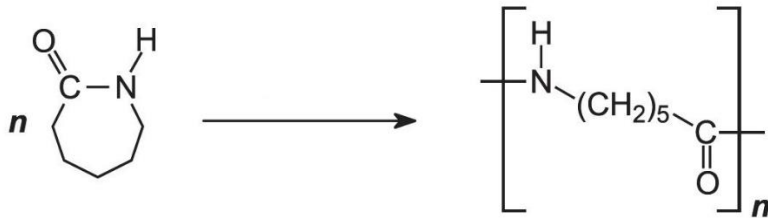


Εικόνα 3: Χημική δομή των επαναλαμβανόμενων δομικών ομάδων των PA 6.6 και PA 6

Ως προς τη **σύνθεση** τους, μπορούν να παραχθούν μέσω πολυμερισμού ενός ή δύο μονομερών. Τα PA που παράγονται από δύο μονομερή, ένα διοξύ και μία διαμίνη, έχουν ονομασία PA X,Y , ενώ αυτά που παράγονται από τη διάνοιξη του δακτυλίου ενός διπλά λειτουργικού μονομερούς (όπως η καπρολακτάμη), που περιέχει μία λειτουργική ομάδα αμίνης και μία οξέος, ονομάζονται ως PA Z. Στις παραπάνω ονομασίες το X αναφέρεται στον αριθμό των ατόμων άνθρακα που αποτελούν το μονομερές της διαμίνης, το Y είναι ο αριθμός ατόμων άνθρακα του μονομερούς του οξέος, ενώ το Z αφορά τον αριθμό των ατόμων άνθρακα του μονομερούς με τον δακτύλιο. (Acero *et al.*, 2012),(Ogunsona *et al.*, 2019),(Douka *et al.*, 2018)



Εικόνα 4: Μέθοδος παραγωγής PA 6.6 μέσω πολυμερισμού των μονομερών αδιπικού οξέος και εξαμεθυλενοδιαμίνης



Εικόνα 5: Μέθοδος παραγωγής PA 6 μέσω πολυμερισμού του μονομερούς της καπρολακτάμης

3 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

Για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των συνθετικών πολυμερών υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις, αναλόγως της επιθυμητής ιδιότητας και της εφαρμογής τους. Τα συνθετικά πολυμερή επικαλύπτονται με βιοενεργές ενώσεις για εφαρμογές στην παρασκευή υφάνσιμων προϊόντων, μικροηλεκτρονικών προϊόντων, σε διάφορες βιοδιεργασίες, στη Βιοϊατρική και στη συσκευασία τροφίμων. Η αύξηση της υδροφιλικότητας αποτελεί ένα σημαντικό βήμα προς την διαδικασία της επικάλυψης και μπορεί να επιτευχθεί πλέον με την επιφανειακή ενζυμική υδρόλυση, αντικαθιστώντας τις χημικές διαδικασίες που διεξάγονται σε πιο ακραίες συνθήκες, δεν είναι φιλικές προς το περιβάλλον και από τις οποίες συχνά προκύπτουν τοξικά απόβλητα.

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, Choi and Takizawa, 2007)).

Υφάσματα που κατασκευάζονται από PA 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 PA και PAN (Guebitz and Cavaco-Paulo, 2008), καθώς και για να επαχθεί έλξη με τα κύτταρα στην επιφάνεια πολυ(γαλακτικό συν-γλυκολικού οξέος) (PLGA) (Cheng *et al.*, 2009) Επιπροσθέτως, η αυξημένη υδροφιλικότητα καθιστά την επεξεργασία των πολυμερών πιο αποτελεσματική. 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.

Η ενεργή συσκευασία πραγματοποιεί ορισμένες εξαιρετικές και ζωτικές λειτουργίες εκτός από την παροχή αδρανούς εμποδίου μεταξύ προϊόντος και εξωτερικών συνθηκών. Οι δραστικές ουσίες που είναι σημαντικές και λαμβάνονται υπόψη για νέες βιοδραστικές συσκευασίες περιλαμβάνουν αντιμικροβιακά, βιταμίνες, φυτοχημικά, πρεβιοτικά, θαλάσσια έλαια και ακινητοποιημένα ένζυμα. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί ευρέως τάσεις αντιμικροβιακής συσκευασίας. Η καινοτόμος ισχύς της αντιμικροβιακής συσκευασίας PLA έχει άμεσο αντίκτυπο στην υγεία των καταναλωτών με τη δημιουργία ασφαλέστερων και πιο υγιεινά συσκευασμένων τροφίμων, καθώς παρατείνει και τη διάρκεια ζωής των συσκευασμένων τροφίμων, επιβραδύνοντας ή αναστέλλοντας αυτούς τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την ακαταλληλότητα των συσκευασμένων τροφίμων. Έτσι, ένα εύρος ενεργών προσθέτων έχει χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση του PLA με σκοπό την παραγωγή αντιμικροβιακής ενεργής συσκευασίας. (Farah, Anderson and Langer, 2016)

3.1 Ενζυμική τροποποίηση συνθετικών πολυμερών

Η ενζυμική τροποποίηση της επιφάνειας των πολυμερών ελκύει την προσοχή πολλών ερευνητικών ομάδων και είναι μία προσέγγιση για την βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Οι ενζυμικές διεργασίες πραγματοποιούνται σε ήπιες συνθήκες (χαμηλές θερμοκρασίες, pH που προσεγγίζει το ουδέτερο, συνήθως σε υδατικό περιβάλλον και όχι σε οργανικούς διαλύτες) και αυτό τις καθιστά φιλικότερες προς το περιβάλλον. Παράλληλα η επιφανειακή τροποποίηση, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, επιτρέπει την ανεξάρτητη βελτιστοποίηση των επιφανειακών ιδιοτήτων χωρίς να επηρεάζονται οι φυσικο-μηχανικές ιδιότητες του κύριου όγκου του υλικού.

Αυτό είναι εφικτό λόγω του μεγάλου μεγέθους των ενζύμων που τα αποτρέπει από τη διάχυση στο εσωτερικό του υπό επεξεργασία υλικού.

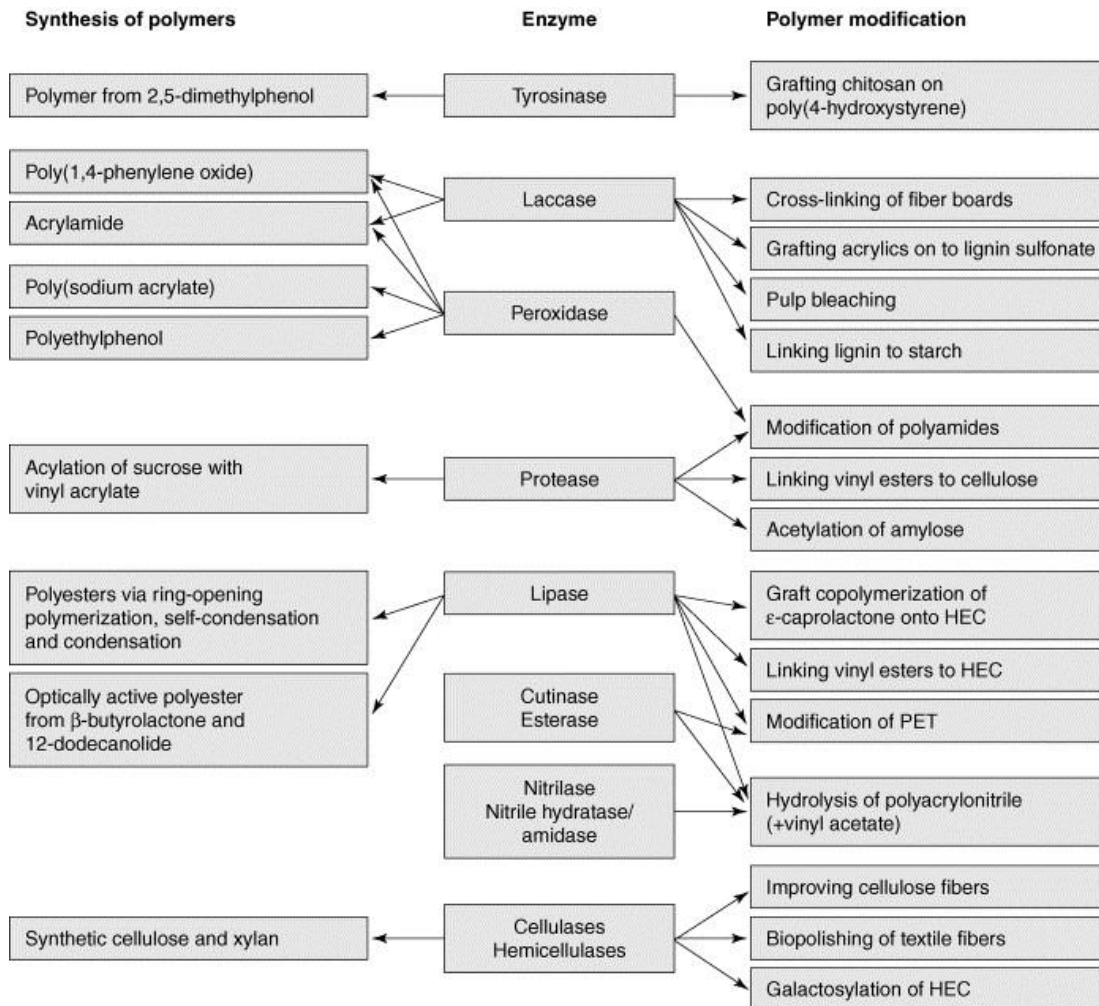
Σε αυτό το πλαίσιο, μία προτεινόμενη και χρησιμοποιούμενη από τη βιβλιογραφία οδός είναι η ενζυμική υδρόλυση της επιφάνειας των συνθετικών πολυμερών για την παραγωγή ελεύθερων πάνω σ' αυτή καρβοξυ- και υδροξυλομάδων που αυξάνουν την υδροφιλικότητά τους και συνεπώς τα κάνουν πιο συμβατά για πολλές εφαρμογές (ιδίως σε υφάσματα, συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκου και ιατρικά υλικά με εφαρμογή στον ανθρώπινο οργανισμό), καθώς προσφέρουν επίσης δυνατότητα για περαιτέρω τροποποίηση του υλικού.

Για την περαιτέρω αυτή τροποποίηση, έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία η ενζυμικά καταλυόμενη πρόσδεση φαινολικών ουσιών πάνω στην επιφάνεια των πολυμερών με σκοπό της παροχή αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι δεν υπάρχει καμία σχέση μεταξύ της τάξης των ενζύμων ή της πηγής προέλευσής τους και της δραστηριότητας που εμφανίζουν αυτά για την τροποποίηση των πολυμερών. 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.

Ως προς την τάξη των υδρολασών, τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ένζυμα για την τροποποίηση πολυμερών είναι οι γλυκοζιδάσες, οι πρωτεάσες και οι λιπάσες, ενώ στην τάξη των οξειδοαναγωγασών είναι οι τυροσινάσες, οι λακάσες και οι υπεροξειδάσες. Οι τυροσινάσες και οι υπεροξειδάσες προτείνονται για την κατάλυση του πολυμερισμού φαινολικών υποστρωμάτων και την πρόσδεση οξειδωμένων φαινολών σε πολυμερή. Στην **Εικόνα 6**, απεικονίζονται οι κατηγορίες ενζύμων που έχουν χρησιμοποιηθεί από τη βιβλιογραφία τόσο στην τροποποίηση όσο και στη σύνθεση πολυμερών. (Božič, Gorgieva and Kokol, 2012),(Gübitz and Paulo, 2003)

Η τροποποίηση του PA εστιάζεται στην επιφανειακή υδρόλυση των αμιδικών δεσμών, δημιουργώντας ελεύθερες καρβοξυλο- και αμινο- ομάδες στην επιφάνεια των ινών. Τα συνθετικά πολυαμίδια μοιράζονται αμιδικούς δεσμούς παρόμοιους με τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και έτσι αναμένεται οι πρωτεάσες να υδρολύουν τους αμιδικούς τους δεσμούς. Όμως, οι πρωτεάσες δεν φαίνεται να είναι τα πιο αποτελεσματικά ένζυμα για την υδρόλυση των PA, ενώ οι οξειδοαναγωγάσες και οι αμιδάσες έχει αναφερθεί πως καταλύουν την αποικοδόμηση τους. Τα ένζυμα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στη διεθνή βιβλιογραφία για την τροποποίηση ινών πολυαμιδίου, είναι εστεράσες, κουτινάσες, αμιδάσες και λιπάσες πέρα από τις πρωτεάσες. (Acero *et al.*, 2012),(Heumann *et al.*, 2006)



Current Opinion in Biotechnology

Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των ενζύμων που εμπλέκονται στην ενζυμική τροποποίηση και σύνθεση των πολυμερών (Gübitz and Paulo, 2003)

Οι **λακάσες** είναι οξειδάσες πολυφαινολών που περιέχουν χαλκό και οξειδώνουν πολυφαινόλες, μεθοξυ-υποκατεστημένες φαινόλες, διαμίνες και ένα υπολογίσιμο εύρος άλλων ενώσεων χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο σαν δέκτη ηλεκτρονίων. Έχουν, επίσης, χρησιμοποιηθεί για πολυμερισμό διάφορων φαινολικών, για την βαφή μάλλινου υφάσματος μέσω πολυμερισμού, για την ενζυμική τροποποίηση κυτταρίνης και λιγνίνης με υδατο-διαλυτές φαινόλες και φαινολικά οξέα ή για τον συμπολυμερισμό λιγνίνης με φαινόλες. (Schroeder *et al.*, 2007). Η οξείδωση των φαινολικών ενώσεων από μία λακάση μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό αντιδραστικών ειδών, που μπορούν με τη σειρά τους να αντιδράσουν μη ενζυμικά (προσθήκη Michaels) με τις ομάδες $-NH_2$ στην επιφάνεια του πολυμερούς. (Brzonova *et al.*, 2011) Όπως αναφέρεται από τους Muzzarelli, Littarru, Muzzarelli, & Tosi (2003), η λακάση μπορεί να οξειδώσει φαινόλες και να τις μετατρέψει σε αντιδραστικές *o*-κινόνες, οι οποίες υπόκεινται σε αντιδράσεις σχηματισμού oligομερών με άλλες κινόνες, καθώς και μια σύνθετη σειρά από μη ενζυμικές αντιδράσεις με πυρηνόφιλες αμινομάδες της χιτοζάνης.

Έχει αποδειχτεί ότι η καταλυόμενη από λακάση σύζευξη φαινολικών πάνω σε αμινοτροποποιημένο πολυπροπυλένιο μπορεί να οδηγήσει σε αντιμικροβιακές ιδιότητες και αύξηση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Από την άλλη, το ίδιο ένζυμο (η λακάση) έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύζευξη αμινών σε φαινολικά πολυμερή (πχ λιγνοκυτταρίνη) (Acero *et al.*, 2012)

4 ΦΑΙΝΟΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Οι φαινόλες και οι πολυφαινόλες αποτελούν σημαντική τάξη φυσικών αντιοξειδωτικών και έχουν αμέτρητες βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντικαρκινικές, αντιμυκητιασικές, αντιβακτηριδιακές και αντιϊκές.

Τα φυσικά αντιοξειδωτικά έχουν τη δυνατότητα να προστατεύσουν τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες μέσω διάφορων οδών και καθώς το οξειδωτικό στρες είναι υπεύθυνο για ένα εύρος εκφυλιστικών ασθενειών, αυτά τα αντιοξειδωτικά μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στην ανθρώπινη ευημερία. Η δημιουργία ελεύθερων ριζών, μία αναπόφευκτη και συνεχής διεργασία, είναι μέρος του μεταβολισμού μας. Όμως, η υπερπαραγωγή και συσσώρευση δραστικών ειδών οξυγόνου, εξαιτίας εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων, μπορεί να δημιουργήσει μία ανισορροπία με κατάληξη το οξειδωτικό στρες. Ένας μεγάλος αριθμός φαινολικών ενώσεων διαθέτει την ικανότητα να δεσμεύει αυτά τα είδη.

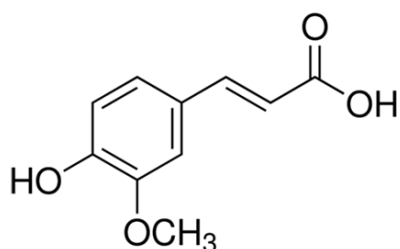
Η διάταξη του φαινολικού δακτυλίου εντός της οποιασδήποτε φαινολικής ένωσης επηρεάζει σημαντικά την αντιοξειδωτική της δράση. Συνεπώς, αρκετοί παράγοντες όπως ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων, η παρουσία άλλων λειτουργικών ομάδων και η θέση τους σε σχέση με τις υδροξυλομάδες έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την αντιοξειδωτική δράση και τη δυνατότητα δέσμευσης ριζών. Οι Galato *et al.* έχουν αποδείξει, μελετώντας οκτώ φαινολικές και ανάλογες ενώσεις, ότι η αντιοξειδωτική δράση ενός μορίου αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των ομάδων υδροξυλίου που συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο. (Badhani, Sharma and Kakkar, 2015)

Ως προς την εφαρμογή για την τροποποίηση των πολυμερών να αναφερθεί ενδεικτικά, σύμφωνα με βιβλιογραφία (Schroeder *et al.*, 2007), πως ίνες και υφάσματα από λινάρι τροποποιήθηκαν με διάφορες φαινολικές ενώσεις όπως guaiacol, βανιλίνη, φερουλικό οξύ, 2-μεθοξυ-5-νιτροφαινόλη και ελέγχθηκε η δυνατότητα να έχουν επίδραση στις αντιβακτηριδιακές τους ιδιότητες έναντι στα *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Όλες οι φαινολικές ενώσεις, με εξαίρεση το guaiacol και τη βανιλίνη που είχαν πολύ ασθενή δράση, έδειξαν κάποια αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι των *B. Subtilis*, *S. Aureus* ενώ μόνο η 2-μεθοξυ-5-νιτροφαινόλη μπορούσε να μειώσει την ανάπτυξη του *K. Pneumoniae*, αν και όχι σε μεγάλο βαθμό. Τη μεγαλύτερη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα την έδειξαν σε όλες τις περιπτώσεις τα υφάσματα σε σχέση με τις ίνες.

4.1 Φερουλικό οξύ

Το φερουλικό οξύ [(2E)-3-(4-υδροξυ-3-μεθοξυφαινυλ) προπ-2-ενοϊκό οξύ] έχει χαμηλή τοξικότητα και κατέχει ιδιότητες όπως αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές και αντιδιαβητική δράση. Θεωρείται ανώτερο αντιοξειδωτικό και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών. Κατέχει τη δυνατότητα να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες, αλλά και να αναστέλλει τη λειτουργία ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή ελεύθερων ριζών και να ενισχύει τη δράση ενζύμων που δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Χρησιμοποιείται εκτενώς σε προϊόντα προστασίας του δέρματος σαν φωτοπροστατευτικός παράγοντας αλλά η χρήση του είναι περιορισμένη λόγω της τάσης του να οξειδώνεται ραγδαία.

Ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας του φερουλικού οξέος σχετίζεται με τη δυνατότητά του να σχηματίζει σταθερές ρίζες φαινοξυλίου, μέσω της αντίδρασης των ριζών με τα μόρια του αντιοξειδωτικού. Αυτό καθιστά δύσκολο το ξεκίνημα μιας αλυσιδωτής αντίδρασης που θα οδηγήσει στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Μπορεί, επίσης, να δράσει και σαν δότης υδρογόνου παρέχοντας άτομα απευθείας στις ρίζες. (Zduńska *et al.*, 2018)



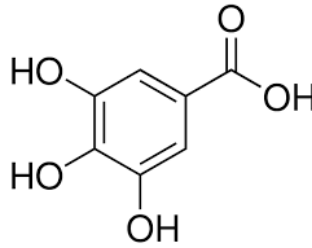
Εικόνα 7: Χημική δομή φερουλικού οξέος

4.2 Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ [3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ], μία φυσική τριφαινολική ένωση χαμηλού μοριακού βάρους, έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή ή σαν παράγωγο σε διάφορες τροφές όπως οι ξηροί καρποί, το τσάι, το ρόδι, τα σταφύλια και άλλα φρούτα και λαχανικά. Πιθανές εφαρμογές του είναι σαν αντικαρκινικός παράγοντας (λόγω της προοξειδωτικής του δράσης), σαν αντιμυκητιασικό, αντιβακτηριδιακό, αντιικό, αντιαλλεργικό και αντιφλεγμονώδες μεταξύ άλλων. Χρησιμοποιείται, επίσης, σαν πρόσθετο σε φαγητά και καλλυντικά, αλλά και σαν μη τοξικός αναστολέας της διάβρωσης μεταλλικών επιφανειών. Κάποια από τα εστερικά παράγωγά του χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά, στα επεξεργασμένα τρόφιμα και στη συσκευασία τροφίμων για την αποτροπή του οξειδωτικού ταγγισμού και της αλλοίωσης.

Αποτελείται από έναν αρωματικό δακτύλιο, τρεις ομάδες φαινολικού υδροξυλίου και μια ομάδα καρβοξυλικού οξέος, όπως φαίνεται και από την **Εικόνα 8**. Οι τρεις υδροξυλομάδες συνδέονται με τον αρωματικό δακτύλιο σε ορθο- θέση ο ένας σε σχέση με τον άλλο. Αυτή η

διάταξη είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας για την ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων. (Badhani, Sharma and Kakkar, 2015)

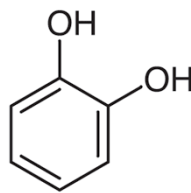


Εικόνα 8: Χημική δομή του γαλλικού οξέος

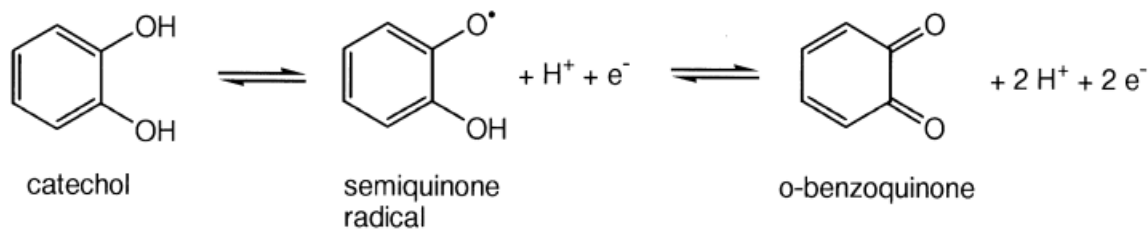
4.3 Κατεχόλη

Η κατεχόλη [1,2-διυδροξυβενζόλιο] προκύπτει φυσικά σε φρούτα, λαχανικά, στο τσάι, χρησιμοποιείται ευρέως στην σύνθεση τροφίμων, φαρμακευτικών ή αγροχημικών συστατικών, αλλά και σαν σταθεροποιητικό πρόσθετο. Οι κατεχόλες γενικότερα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν αντιοξειδωτικοί παράγοντες και για την ακινητοποίηση ριζών, σαν βαφές καθώς και για την παραγωγή πλαστικών. Είναι ενδιάμεσα προϊόντα από την αποικοδόμηση αρωματικών ενώσεων και λιγνίνης από μικροοργανισμούς. Οι κατεχόλες μπορούν επίσης να υποστούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, ισορροπώντας μεταξύ κατεχολών, ριζών ημι-κινόνης και ορθοβενζοκινόνης. (**Εικόνα 10**)

Αρκετά ένζυμα σε φυτά, ζώα και βακτήρια μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση της κατεχόλης σε βενζοκινόνη, όπως οι προερχόμενες από μύκητες λακάσες που περιέχουν χαλκό. Όταν η κατεχόλη οξειδώνεται ενζυμικά ή υπό την παρουσία οξυγόνου και βαρέων μετάλλων, ένα ηλεκτρόνιο μεταφέρεται στο μοριακό οξυγόνο, με συνέπεια τον σχηματισμό υπεροξειδίου (O_2^-). Υπό την παρουσία βαρέων μετάλλων (π.χ. χαλκού, σιδήρου), το υπεροξείδιο ανάγεται περαιτέρω σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ρίζες υδροξυλίου (-OH). Αυτά τα δραστικά είδη οξυγόνου, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω μπορούν να είναι επιβλαβή για τα κύτταρα και τους οργανισμούς, αν δεν εξαλειφθούν. Αξίζει να αναφερθεί ότι στη βιβλιογραφία μπορούν να βρεθούν διάφορες ερμηνείες για την αντιοξειδωτική δραστικότητα των κατεχολικών ενώσεων στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (η οξειδωτική τροποποίηση πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων, υπεύθυνη για την καταστροφή μεμβρανών και συνεπώς αιτία για πολλές παθολογικές διεργασίες). (Schweigert, Zehnder and Eggen, 2001)



Εικόνα 9: Χημική δομή της κατεχόλης

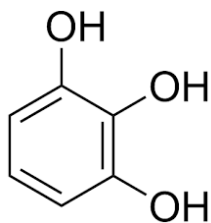


Εικόνα 10: Οξειδοαναγωγικός κύκλος της κατεχόλης

4.4 Πυρογαλόλη

Η πυρογαλόλη είναι [1,2,3-Τριυδροξυβενζόλιο] είναι μία πολυφαινόλη που βρίσκεται σε διάφορα φρούτα και λαχανικά όπως το αβοκάντο και το βερίκοκο, αλλά και σε φυτά όπως ο ευκάλυπτος. Χρησιμοποιείται για την ενεργή μείωση αλάτων χρυσού, αργύρου και υδραργύρου αλλά και στην κατασκευή φαρμακευτικών και φυτοφαρμάκων, όπως και για τοπική αντιψωριακή χρήση, στη βιομηχανία βαφής μαλλιών αλλά και ως αντισηπτικό. Επίσης, λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων της έχει χρησιμοποιηθεί και για την αναστολή της διάβρωσης μετάλλων, καθώς και σαν πρόσθετο σε βιοντήζελ για τη μείωση της οξειδωτικής του αστάθειας κατά την αποθήκευση λόγω του περιεχομένου του σε ακόρεστα λιπαρά οξέα. (Ozturk Sarikaya, 2015)

Σαν φαινολική ένωση είναι ένα οργανικό πολικό μόριο. Έχει μερικά αρνητικά και θετικά φορτία που βρίσκονται στα άτομα οξυγόνου του υδροξυλίου και στα άτομα υδρογόνου του υδροξυλίου αντίστοιχα. Έχει τρεις υδροξυλ-ομάδες που συμβάλλουν στην πολικότητά της και σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς (κυρίως δεσμούς υδρογόνου) με άλλα πολικά μόρια, συνεπώς είναι διαλυτή σε πολικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό. (Sutanto, Susanto and Nasikin, 2019)

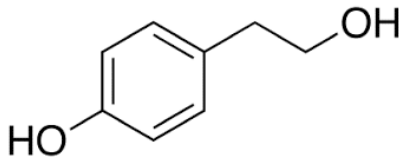


Εικόνα 11: Χημική δομή της πυρογαλόλης

4.5 Τυροσόλη

Η τυροσόλη [2-(4-Υδροξυφαινυλ)αιθανόλη] είναι μία απλή φαινολική φαινολική ένωση φυσικής προελεύσεως που συντίθεται, επίσης, και στο ανθρώπινο σώμα. Στη φύση, παίζει αμυντικό ρόλο κατά των παθογόνων και των φυτοφάγων. Κύριες διατροφικές πηγές της τυροσόλης είναι το ελαιόλαδο και το κρασί, ενώ μπορεί να βρεθεί και σε άλλα αλκοολούχα ροφήματα. Αναμένεται να έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση εξαιτίας των ισχυρών οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των φαινολικών υδροξυλομάδων και των δομικών σχέσεων στη χημική διαμόρφωση του μορίου της. (Rodríguez-Morató *et al.*, 2016)

Σύμφωνα με τους Benedetto *et al.*, αποτελεί αποτελεσματικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό, πιθανώς λόγω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, παρά την γενικά ασθενή αντιοξειδωτική της δράση. Είναι μία σχετικά σταθερή ένωση και συνεπώς συγκρινόμενη με άλλες φαινολικές ενώσεις υπόκειται πολύ λιγότερο σε αυτοοξείδωση. Διατηρεί την αντιοξειδωτικότητά της κάτω από κρίσιμες συνθήκες. Αυτό παρατηρήθηκε όταν, στην παρουσία οξειδωμένης LDL χοληστερίνης, και ενώ τα φαινόμενα αυτοοξείδωσης είχαν ήδη ξεκινήσει, η τυροσόλη διατήρησε αμετάβλητη αντιοξειδωτική δράση, ενώ άλλα, πιο ενεργά φυσικά φλαβονοειδή έδειξαν δραστική μείωση της αντιοξειδωτικής τους δράσης και μερικές φορές έγιναν ακόμη και προ-οξειδωτικά. (Karković Marković *et al.*, 2019)



Εικόνα 12: Χημική δομή της τυροσόλης

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

5 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Ένζυμα

Το ένζυμο **Alcalase 2.4 L** (πρωτεάση από το βακτήριο *B. licheniformis*) ήταν ευγενική χορηγία της Novozymes (Bagsvaerd, Δανία) και χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση του PA 6.6. Για την τροποποίηση των πολυμερών με τις φαινολικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό παρασκεύασμα λακάσης **Novozym® 51003** (Novozymes, Δανία) που παράγεται από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*.

5.2 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 και *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 αποκτήθηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC).

5.3 Υλικά

Το υφαντό PA ύφασμα (100% PA 6.6) χορηγήθηκε από την Colora S.A (Θεσσαλονίκη) με χαρακτηριστικά: 12 στημόνια/cm και 11 υφάδια/cm, 912,9 Denier, βάρος 238,67 g/m² και πάχος 359 μm. Το ημικρυσταλλικό πολυγαλακτικό οξύ (PLA) 4042D αποκτήθηκε από την NatureWorks®.

Τα αντιδραστήρια 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζύλιο (DPPH), πυρογαλόλη, διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) και N, N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο (DCC) αποκτήθηκαν από την Sigma-Aldrich (St. Louis, Η.Π.Α.). Η τυροσόλη αποκτήθηκε από την ACRÖS ORGANICS (Fisher Scientific, Η.Π.Α.). Η αιθυλενοδιαμίνη (EDA, 99% for synthesis) αποκτήθηκε από την PanReac AppliChem. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας αναλυτικού βαθμού.

5.4 Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)

Στη διάρκεια της παρούσας διπλωματικής έγινε χρήση των παρακάτω ρυθμιστικών διαλυμάτων (ΡΔ):

Ρυθμιστικό δ/μα	Σύσταση	Παρατηρήσεις
Potassium Phosphate, pH 6, 0.1M	KH_2PO_4 0.1M, K_2HPO_4 0.1M Αναλογία όγκων: $\frac{V_{\text{KH}_2\text{PO}_4}}{V_{\text{K}_2\text{HPO}_4}} \cong 6.6$	Γίνεται πάντα προσθήκη του όξινου KH_2PO_4 στο βασικό K_2HPO_4 , με ταυτόχρονη μέτρηση του pH έως ότου επιτευχθεί η επιθυμητή τιμή.

5.5 Συσκευές και Όργανα

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα διπλωματική παρουσιάζονται παρακάτω:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Κίνα)
- Επωαστήρας με ελεγχόμενη θερμοκρασία και ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Φασματοφωτόμετρο S-22 UV/Vis (BOECO, Γερμανία)
- Χρωματομέτρο Minolta CR/200
- Φασματοφωτομέτρο FTIR PerkinElmer Spectrum 100 U-ATR , εξοπλισμένο εξοπλισμένο με κρύσταλλο ZnSe Ri 2.4
- Διαφορικό θερμιδόμετρο Mettler DSC 1 STARSystem
- Θερμοσταθμικός αναλυτής Mettler TGA/DSC1 thermobalance

5.6 Σύνθεση φύλλων PLA

Τα φύλλα μεμβράνης PLA κατασκευάστηκαν με την τεχνική χύτευσης με διαλύτη (Solvent cast technology). Τα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας περιλαμβάνουν ομοιόμορφη κατανομή πάχους, μέγιστη οπτική καθαρότητα και εξαιρετικά χαμηλή θολότητα. (Siemann, 2005) Για την παραγωγή του φύλλου PLA, σε 120 mL χλωροφορμίου διαλύθηκαν 10 % w/v σφαιρίδια PLA σε γυάλινη κωνική φιάλη των 250 mL με εσμύρισμα, υπό συνεχή ανάδευση και θέρμανση ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται στους 50 °C. Στη συνέχεια, το διάλυμα απλώθηκε σε δοχείο με αντικολητική επιφάνεια διαστάσεων 42 x 25 cm² και αφέθηκε σε απαγωγό προς εξάτμιση του διαλύτη, οδηγώντας στο σχηματισμό του φύλλου με μέσο πάχος (**0,303 ± 0,017**) mm. Στη συνέχεια το φύλλο μεμβράνης PLA κόβεται σε κομμάτια διαστάσεων (2 x 2,5) cm². **[Εικόνα 13]**



Εικόνα 13: Κατασκευή φύλλων PLA με την τεχνική χύτευσης με διαλύτη.

Στάδια διάλυσης των σφαιριδίων PLA σε χλωροφόρμιο, επίστρωσης στην επιφάνεια – καλούπι και εξαγωγής μετά την εξάτμιση του διαλύτη.

5.7 Θερμική ανάλυση των ατροποποίητων πολυμερικών υλικών

Η γνώση των **θερμικών ιδιοτήτων** των πολυμερών είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Για να εκτιμηθεί η **θερμική συμπεριφορά** τους χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (differential scanning calorimetry – **DSC**), ενώ για την εκτίμηση της **θερμικής αποδόμησης** τους έγινε χρήση της μεθόδου θερμοσταθμικής ανάλυσης (thermogravimetric analysis – **TGA**).

5.7.1 Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC)

Πραγματοποιήθηκε διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (differential scanning calorimetry, DSC) στο Mettler DSC 1 STAReSystem υπό ροή αζώτου 10 mL/min (για την αποφυγή οξειδωτικής αποικοδόμησης), με εφαρμογή ενός κύκλου θέρμανσης-ψύξης-θέρμανσης από τους 20 έως τους 350 °C για το PA και από τους 30 έως τους 200 °C για το PLA με βήμα 10 °C/min, ώστε να βρεθούν η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) η θερμοκρασία πρώτης τήξης (T_{m1}), η θερμοκρασία κρυστάλλωσης (T_c) και η θερμοκρασία δεύτερης τήξης (T_{m2}).

Λίγα λόγια για τη μέθοδο:

Αυξάνεται η θερμοκρασία του δείγματος και μιας ουσίας αναφοράς, σύμφωνα με το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ορίζει ο χρήστης. Προσφέρεται θερμότητα ξεχωριστά στο δείγμα και στην ουσία αναφοράς, ώστε να διατηρείται η θερμοκρασία τους περίπου ίδια. Όταν η απαίτηση της ενέργειας που προσφέρεται στο δείγμα για να συμβεί αυτό μειώνεται/αυξάνεται απότομα, τότε στο διάγραμμα προσφερόμενης στο δείγμα θερμότητας – θερμοκρασίας αναφοράς σχηματίζονται πηγάρια/κορυφές και συμβολίζουν την μεταβολή φάσης του

δείγματος. Συνήθως εφαρμόζονται πολυάριθμοι κύκλοι θέρμανσης – ψύξης, καθώς η θερμοδυναμική συμπεριφορά του υλικού επηρεάζεται από το θερμικό ιστορικό του. Στην προκειμένη περίπτωση, μας ενδιαφέρει μόνο ο πρώτος κύκλος, ώστε να βρεθεί η θερμοκρασία τήξης του υλικού, για να σχεδιαστούν τα πειράματα σε θερμοκρασίες χαμηλότερες από αυτήν.

5.7.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Η θερμοσταθμική ανάλυση (thermogravimetric analysis, TGA) έγινε στη συσκευή Mettler TGA/DSC1 thermobalance με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min από 30 έως 600 °C, υπό ροή αζώτου 10 mL/min. Η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης (T_{max}) σημειώνεται όταν μεγιστοποιείται ο ρυθμός απώλειας βάρους του δείγματος.

Λίγα λόγια για τη μέθοδο:

Η θερμοσταθμική ανάλυση (TGA) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της θερμικής σταθερότητας ενός υλικού και του κλάσματος των πτητικών συστατικών, παρακολουθώντας την αλλαγή βάρους που συμβαίνει καθώς ένα δείγμα θερμαίνεται με σταθερό ρυθμό. Η απώλεια βάρους παρακολουθείται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου και από την πρώτη παράγωγο της καμπύλης βρίσκεται η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας.

5.8 Προσδιορισμός ενζυμικής ενεργότητας και ενζυμικής συγκέντρωσης

5.8.1 Alcalase 2.4 L

Η συγκέντρωση της *Alcalase 2.4 L* μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford, βάσει βιβλιογραφίας (Kanelli *et al.*, 2016). Σαν πρότυπο χρησιμοποιήθηκε αλβουμίνη βόειου ορού. Σε 1,25 mL διαλύματος Bradford προστέθηκαν 0,025 mL διαλύματος αραιωμένου ενζύμου, επαώστηκαν για 10 λεπτά και στη συνέχεια μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά η απορρόφηση στα 595 nm. Η συγκέντρωση της *Alcalase 2.4 L* βρέθηκε ότι ήταν **93 mg/mL**.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της *Alcalase 2.4 L*, σε 1 mL σε διαλύματος αζοκαζεΐνης 0,2% w/v σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8 προστέθηκαν 0,025 mL διαλύματος αραιωμένου ενζύμου και επαώστηκαν στους 40 °C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 mL 0,1M TCA και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε προς απομάκρυνση της πρωτεΐνης. Σε 1 mL του υπερκείμενου της αντίδρασης προστέθηκε 1 mL NaOH 0,5M 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 της *Alcalase 2.4 L* βρέθηκε ότι ήταν **38,21 kU /mL**.

5.8.2 Laccase Novozym® 51003

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της *Laccase Novozym® 51003* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Lowry κάνοντας χρήση αλβουμίνης βόειου ορού σαν πρότυπο. Η εμπορική μορφή του ενζύμου είχε συγκέντρωση $51,57 \pm 2,31 \text{ mg/mL}$ σε πρωτεΐνη.

Η ενεργότητα της *Laccase Novozym® 51003* μετρήθηκε χρησιμοποιώντας 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ) (ABTS) σαν υπόστρωμα (Zerva et al., 2016). Σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6 με 3 mM ABTS προστέθηκε κατάλληλα αραιωμένο δείγμα του ενζύμου και μετά από 10 λεπτά επώασης στους 30 °C μετρήθηκε η απορρόφηση στα 420 nm. Η συγκέντρωση του οξειδωμένου ABTS υπολογίστηκε με χρήση του συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 36.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

1 Unit (U) ενεργότητας της λακκάσης ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την οξείδωση 1 μmol ABTS ανά λεπτό στις παραπάνω συνθήκες.

Η ενεργότητα της *Laccase Novozym® 51003* βρέθηκε ότι ήταν $134,58 \pm 8,8 \text{ U/mL}$.

5.9 Προεπεξεργασία πολυμερικών υλικών

5.9.1 Ενζυμική υδρόλυση PA 6.6 υφασμάτων

Από το αρχικό υφαντό PA 6.6 υφάσμα κόπηκαν δείγματα διαστάσεων (2 x 2,5) cm² τα οποία επώαστηκαν σε φιάλες Erlenmeyer σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (50 mL_{PA}/g_{υφάσματος}) 100 mM pH 8.0 στους 60 °C (όπως προτείνεται από Novozymes®), υπό ανάδευση (170 rpm) με συγκέντρωση του ενζύμου *Alcalase 2.4 L* 37,2 mg_{ενζύμου}/g_{υφάσματος} για 24 h. Μετά την ενζυμική υδρόλυση τα υφάσματα πλύθηκαν με 2 g/L Na₂CO₃ στους 40 °C υπό ανάδευση για 30 min και έπειτα πραγματοποιήθηκε πλύσιμο με απιονισμένο νερό για 30 min (εις διπλούν). (Kanelli et al., 2016)

Η ενζυμική υδρόλυση του PA υφάσματος οδηγεί στην απελευθέρωση καρβοξυλ- και αμινομαδών, που προκύπτουν από το σπάσιμο των πεπτιδικών δεσμών, τόσο στο υπερκείμενο της αντίδρασης όσο και στην επιφάνεια του υφάσματος. Αυτές οι νεοσύστατες ακραίες ομάδες στην υδρολυμένη PA επιφάνεια μπορούν να σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τις φαινολικές ενώσεις καθώς και με το DCC που χρησιμοποιήθηκε για την προεπεξεργασία των υφασμάτων, όπως θα αναφερθεί στην παράγραφο 5.9.2.

Η υδρόλυση PA με μία αμιδάση και στη συνέχεια η επιφανειακή τροποποίηση των αμινομαδών, που προκύπτουν από αυτή, με φαινολικά υποβοηθούμενη από μία λακάση έχει δοκιμαστεί και από τους Acero et al. (2012) [Acero2012](#).

5.9.2 Προεπεξεργασία των PA 6.6 υφασμάτων με DCC και EDA

Ενεργοποίηση της λειτουργικότητας του καρβοξυλικού οξέος

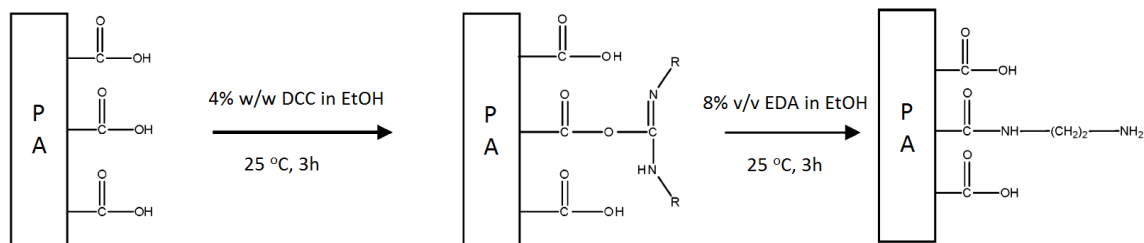
Τα υφάσματα PA, δείγματα που έχουν υποστεί ή όχι ενζυμική υδρόλυση, προστέθηκαν σε 5 mL_{διαλύματος DCC}/δείγμα, περιεκτικότητας 4% w/w DCC σε αιθανόλη και αφέθηκαν για αντίδραση 3 h σε θερμοκρασία 25 °C, υπό ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια, αφού αποχύθηκε το αντιδρών διάλυμα, τα δείγματα καθαρίστηκαν με καθαρή αιθανόλη για να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια DCC και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προς εξάτμιση της υπόλοιπης αιθανόλης.

Σύνδεση της EDA στο ενεργοποιημένο ύφασμα

Επόμενο βήμα ήταν η αντίδραση των υφασμάτων με την EDA, με 5 mL_{διαλύματος EDA}/δείγμα, περιεκτικότητας 8% v/v EDA σε αιθανόλη για 3 h σε θερμοκρασία 25 °C, υπό ανάδευση 180 rpm. Μετά το τέλος της αντίδρασης, αποχύθηκε το αντιδρών διάλυμα και τα δείγματα καθαρίστηκαν με καθαρή αιθανόλη για να απομακρυνθεί τυχόν περίσσεια DCC και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου προς εξάτμιση της υπόλοιπης αιθανόλης.

Σκοπός της προεπεξεργασίας του πολυαμιδικού υφάσματος είναι η ενεργοποίηση της λειτουργικότητας του καρβοξυλικού οξέος (-COOH) με το DCC (N, N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο) (όπως αναφέρθηκε πιο πάνω από την υδρόλυση του υφάσματος προέκυψαν ελεύθερες καρβοξυλ-ομάδες στην επιφάνεια του υφάσματος) και στη συνέχεια η σύζευξη με την EDA (Αιθυλενοδιαμίνη). Αυτό, με σκοπό την αντικατάσταση των καρβοξυλομάδων αλλά και αμινομάδων με τα μόρια της διαμίνης, ώστε να προσδεθούν στην επιφάνεια αμινομάδες που θα εξέχουν από τον κύριο όγκο της επιφάνειας, και συνεπώς θα είναι πιο διαθέσιμες για αντίδραση, καθώς και για να αυξηθεί ο αριθμός των αμινομάδων της επιφάνειας του υφάσματος, που προβλέπεται ότι θα οδηγήσει και σε μεγαλύτερη απόδοση την ενζυμικής τροποποίησης με τις φαινολικές ενώσεις, που θα αναφερθεί παρακάτω. (Janorkar, Luo and Hirt, 2004)

Το σχήμα της αντίδρασης που ακολουθείται κατά την προεπεξεργασία των υφασμάτων εμφανίζεται στην **Εικόνα 14**.



Εικόνα 14: Σχήμα αντίδρασης για την δημιουργία γραμμικών δομών στην επιφάνεια των PA υφασμάτων κατά την προεπεξεργασία.

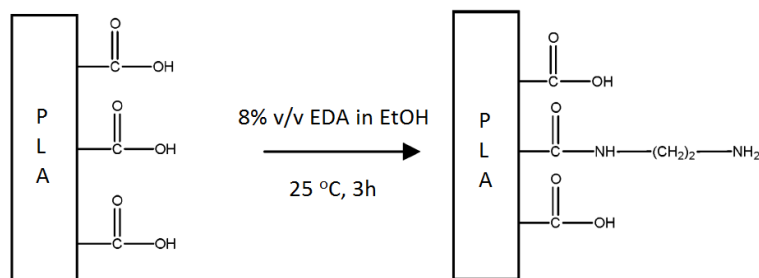
1^ο στάδιο: Ενεργοποίηση της λειτουργικότητας του καρβοξυλικού οξέος με το DCC (Συνθήκες: 4% w/w DCC σε αιθανόλη για 3h στους 25 °C)

2^ο στάδιο: Σύνδεση της EDA στο ενεργοποιημένο ύφασμα (Συνθήκες: 8% v/v EDA σε αιθανόλη για 3h στους 25 °C)

5.9.3 Προεπεξεργασία των PLA films με EDA

Η διαδικασία της αντίδρασης με την EDA για τα PLA films είναι ίδια με αυτήν που ακολουθήθηκε και για τα PA υφάσματα και αναφέρεται στην παράγραφο 5.9.2 (βήμα 2^ο). Επειδή το PLA υφίσταται αμινολυτική αποικοδόμηση σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Yu *et al.*, 2018), έγινε μελέτη για τον χρόνο προεπεξεργασίας του υλικού με την EDA ώστε να μην προκύψει καταστροφή του κύριου όγκου του υλικού, αλλά να γίνει μόνο επιφανειακή τροποποίηση. Δείγματα PLA films αφέθηκαν προς αντίδραση με το διάλυμα EDA για **30 min**, **1 h** και **3 h**. Η κατάλληλη διάρκεια της προεπεξεργασίας επιλέχθηκε βάσει της απώλειας μάζας των film σε συνδυασμό με την απόδοση της ενζυμικής τροποποίησης με τα φαινολικά, η οποία εκτιμήθηκε από την αντιοξειδωτική ικανότητά τους βάσει της μεθόδου που αναφέρεται στην παράγραφο 5.11 .

Η **αμινόλυση** (δηλαδή η αντίδραση του πολυεστερικού υλικού με το διάλυμα αμίνης) είναι μια διεργασία χημικής υποβάθμισης που αναπτύχθηκε για την μετατροπή πολυεστερικών επιφανειών και θεωρείται ως πυρηνόφιλη υποκατάσταση, προσδίδοντας στην επιφάνεια του πολυεστέρα αμινο ($-NH_2$) και υδροξυλ ($-OH$) ομάδες, οι οποίες παρέχουν την ευκαιρία για περαιτέρω τροποποίηση του PLA. (Ως διαλύτης για την EDA επιλέχθηκε η αιθανόλη γιατί η διοξάνη βρέθηκε ότι διαλύει το PLA).



Εικόνα 15: Σχήμα αντίδρασης για την δημιουργία γραμμικών δομών στην επιφάνεια των PLA films κατά την προεπεξεργασία.

Σύνδεση της EDA στο επιφάνεια του film (Συνθήκες: 8% v/v EDA σε αιθανόλη στους 25 °C, για τον χρόνο αντίδρασης έγινε μελέτη και βρέθηκε σαν βέλτιστη διάρκεια η 1 h)

5.10 Επιφανειακή ενζυμική τροποποίηση films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

Μετά την προεπεξεργασία ακολούθησε η επιφανειακή ενζυμική τροποποίηση των πολυμερών με την χρήση του ενζύμου **Laccase Novozym® 51003**. Τα PA υφάσματα και τα PLA films οδηγήθηκαν προς αντίδραση με ποσότητα του ενζύμου εντός διαλύματος φαινολικών σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου (**15 mL_{διαλύματος}/δείγμα**) με **pH 6** στους **60 °C** και υπό ανάδευση στα 180 rpm. Οι φαινολικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση είναι: **το φερούλικό οξύ¹, το γαλλικό οξύ, η κατεχόλη, η πυρογαλόλη και η τυροσόλη**. Μετά την ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση τα υφάσματα πλύθηκαν με 2 g/L Na₂CO₃ στους 40 °C υπό ανάδευση για 30 min, έπειτα πραγματοποιήθηκε πλύσιμο με διάλυμα Triton 0,4 % w/v (χημικό αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό) για 30 min στους 40 °C (εις διπλούν) και τέλος με απιονισμένο νερό για 30 min (εις διπλούν). Κατά το στάδιο πλύσης, τα μόρια αυτά που δεν έχουν συνδεθεί με χημικό δεσμό με τις ελεύθερες ομάδες στην επιφάνεια των υφασμάτων PA και των films PLA απομακρύνονται.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οξειδοαναγωγικά ένζυμα όπως οι λακάσες οξειδώνουν μια ποικιλία φαινολών, παράγοντας ελεύθερες ρίζες που υπόκεινται περαιτέρω σε αυθόρμητο πολυμερισμό. (Zerva et al., 2016),(Schroeder et al., 2007) Αναφέρεται, άλλωστε, και από τον κατασκευαστή του εμπορικού σκευάσματος λακάσης που χρησιμοποιήθηκε, ότι το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται για την οξείδωση φαινολών σε κινόνες ή άλλες οξειδωμένες ενώσεις.

Σκοπός, λοιπόν, της τροποποίησης είναι η χημική πρόσδεση των φαινολικών ενώσεων και των παραγώγων της οξειδωτικής δράσης του ενζύμου στις υδροξυλομάδες και στις αμινομάδες της επιφάνειας των υλικών (στις ήδη υπάρχουσες καθώς και σε όσες έχουν αποδοθεί στην επιφάνεια των υλικών από την προεπεξεργασία). (Acero et al., 2012)

5.10.1 PLA films

Ακολουθήθηκαν και 3 κύκλοι πειραμάτων:

- **1^{ος} κύκλος: Μελέτη για τον χρόνο προεπεξεργασίας των PLA films με την EDA**
Για σταθερές τις συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης (pH 6, 60 °C, 180rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h) παράχθηκαν δείγματα τα οποία είχαν υποστεί προεπεξεργασία με την EDA (βάσει της μεθόδου που αναφέρεται στην παράγραφο 5.9.3) διαφορετικής διάρκειας: **30min / 1 h / 3 h**.
- **2^{ος} κύκλος: Επανάληψη των πειραμάτων με την βέλτιστη διάρκεια προεπεξεργασίας.**
Για τις 2 φαινολικές ενώσεις με την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 1^{ου} κύκλου, έγινε επανάληψη των πειραμάτων και σύγκριση με τα

¹ Το φερούλικό οξύ έχει πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό, οπότε για να διαλυθεί στο χρησιμοποιούμενο ρυθμιστικό διάλυμα που ήταν υδατικό, έπρεπε πρώτα να διαλυθεί σε έναν οργανικό διαλύτη ευδιάλυτο στο νερό. Ο οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DMSO. Αφού διαλύθηκε το φερούλικό οξύ στο DMSO, στην συνέχεια το διάλυμά τους προστέθηκε στάγδην στο ρυθμιστικό διάλυμα.

αντίστοιχα control δείγματα. Τα δείγματα υπέστησαν προεπεξεργασία σύμφωνα με την βέλτιστη χρονική διάρκεια που επιλέχθηκε από τον 1^ο κύκλο.

Συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης:

pH 6, 60 °C, 180 rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, t_{αντίδρασης} = 3 h.

Ο συμβολισμός των δειγμάτων είναι ο εξής:

Control 1: δείγμα αντίδρασης φαινολικής ένωσης με το προεπεξεργασμένο film PLA στις προαναφερθείσες συνθήκες χωρίς την παρουσία της λακάσης.

Control 2: αντίδραση φαινολικής ένωσης (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια **βράσιμο** για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: κροκιδωμένα ολιγο-/πολυμερή φαινολικών και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με PLA (προεπεξεργασμένο με EDA) για 3h στους 60 °C.

R: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PLA προεπεξεργασμένου με EDA με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις προαναφερθείσες συνθήκες.

- **3^{ος} κύκλος: Μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου και χρόνου αντίδρασης**

Για μία από τις δύο φαινολικές ενώσεις του 2^{ου} κύκλου έγινε μελέτη συγκέντρωσης του ενζύμου κρατώντας σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης (pH 6, 60 °C, 180 rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, t_{αντίδρασης} = 3 h). Ελεγχθείσες συγκεντρώσεις λακάσης : **1/4/8 U**

Έγινε, επίσης, μελέτη του χρόνου της αντίδρασης με σταθερές τις υπόλοιπες συνθήκες (pH 6, 60 °C, 180 rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U). Οι χρόνοι που ελέγχθηκαν για τη διάρκεια της αντίδρασης είναι : t_{αντίδρασης} = **30 min/1,5 h/3 h/6 h** .

5.10.2 PA υφάσματα

Ακολουθήθηκαν 2 κύκλοι πειραμάτων:

- **1^{ος} κύκλος: Μελέτη για την αντιοξειδωτική ικανότητα των PA υφασμάτων για τις διάφορες χρησιμοποιούμενες φαινολικές ενώσεις**

Υφάσματα PA που υπέστησαν υδρόλυση (σύμφωνα με την μέθοδο της παραγράφου 5.9.1) και προεπεξεργασία (σύμφωνα με την μέθοδο της παραγράφου 5.9.2), οδηγήθηκαν προς ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση σύμφωνα με την παραπάνω αναφερόμενη μέθοδο για τις 5 διαθέσιμες φαινολικές ενώσεις.

Συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης:

pH 6, 60 °C, 180rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h

- **2^{ος} κύκλος: Επανάληψη των πειραμάτων και σύγκριση με τα αντίστοιχα Control**

Για τις 2 φαινολικές ενώσεις με την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 1^{ου} κύκλου, έγινε επανάληψη των πειραμάτων και σύγκριση με τα αντίστοιχα control δείγματα.

Συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης:

pH 6, 60 °C, 180 rpm, C_{φαινολικών} = 40 mM, t_{αντίδρασης} = 3 h.

Ο συμβολισμός των δειγμάτων είναι ο εξής:

Control 1: δείγμα αντίδρασης φαινολικής ένωσης με μη προεπεξεργασμένο PA ύφασμα στις προαναφερθείσες συνθήκες χωρίς την παρουσία της λακάσης.

Control 2: αντίδραση φαινολικής ένωσης (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PA, στη συνέχεια **βράσιμο** για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρησή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: κροκιδωμένα ολιγο-/πολυμερή φαινολικών και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PA ύφασμα (χωρίς να έχει προηγηθεί υδρόλυση και προεπεξεργασία του) για 3h στους 60 °C.

R1: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA (χωρίς να έχει προηγηθεί υδρόλυση και προεπεξεργασία του) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις προαναφερθείσες συνθήκες.

R2: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA προεπεξεργασμένου (υδρόλυση και προεπεξεργασία σύμφωνα με τις παραγράφους 5.9.1 και 5.9.2) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις προαναφερθείσες συνθήκες.

5.11 Μελέτη αντιοξειδωτικής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

Δείγματα PA πλεκτών υφασμάτων και φύλλων PLA διαφορετικών διαστάσεων, μετά την ενζυμική επιφανειακή τους τροποποίηση, επωάστηκαν σε 5 mL διαλύματος DPPH σε αιθανόλη (5,07·10⁻⁵ M) για 30 min, στους 25 °C, στο σκοτάδι, υπό ανάδευση. 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 υπερκειμένου στα 517 nm (Karaki *et al.*, 2016).

Πραγματοποιείται, επίσης, φωτομέτρηση του υπερκειμένου της αντίδρασης ελέγχου που περιλαμβάνει ατροποποιητό ύφασμα ή PLA film σε DPPH διάλυμα. Η ικανότητα δέσμωσης DPPH ριζών υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{Ικανότητα δέσμωσης ριζών DPPH \%} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}}}{\text{Abs}_{\text{τυφλού}}}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

όπου Abs είναι η απορρόφηση και τυφλό είναι το διάλυμα DPPH ριζών σε αιθανόλη.

Επιλέχθηκε ένα εύρος τιμών επιφάνειας των δειγμάτων (σε cm²), ώστε να μπορούν να κατασκευαστούν διαγράμματα εξάρτησης της ικανότητας δέσμευσης ριζών DPPH % από την επιφάνεια του δείγματος και συνεπώς από την συγκέντρωση των φαινολικών.

5.12 Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των πολυμερικών υλικών (films PLA και ύφασμα PA) ελέγχθηκε σε υγρή καλλιέργεια Luria-Bertani (LB) πάνω σε μια ομάδα οργανισμών που λήφθηκαν από την American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* NCTC11994 και *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Ολονύχτια καλλιέργεια κάθε οργανισμού αραιώθηκε σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB και αφέθηκε για επώαση έως ότου αποκτήσει τελική οπτική πυκνότητα (OD₆₀₀) 0,1. Τα δείγματα πολυμερούς αποστειρώθηκαν με αιθανόλη πριν προστεθούν στις καλλιέργειες (100 mg_{πολυμερούς}/ml_{καλλιέργειας}). Οι σωλήνες με τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες υπό ανάδευση στα 180 rpm. Διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν για κάθε δείγμα και 0,1 ml 10⁻⁶ αραιώσεων απλώθηκε πάνω σε LB - άγαρ θρεπτικό μέσο. Κατάλληλα δείγματα ελέγχου (control samples) περιλάμβαναν θρεπτικό μέσο με ή χωρίς δείγματα πολυμερούς και συμπεριελήφθησαν σε κάθε πείραμα. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (όπου ήταν δυνατόν). Τα κύτταρα απαριθμήθηκαν μετά από 24 ώρες.

5.13 Φασματοσκοπική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις – Ανάλυση FTIR-ATR

Κατά τη φασματοσκοπία υπερύθρου μετριέται το ποσοστό απορρόφησης υπέρυθρης ακτινοβολίας από την εξεταζόμενη ουσία. Η ύλη αλληλεπιδρά με το υπέρυθρο φως και προκαλείται αύξηση στις δονήσεις των μορίων. Οι δονήσεις αυτές καταγράφονται σε ένα φάσμα υπερύθρου το οποίο αποτελεί δαχτυλικό αποτύπωμα/ ταυτότητα της ένωσης που εξετάζεται. (Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, 2001) Η χημική δομή της επιφάνειας των ενζυμικώς τροποποιημένων και μη PLA films και του PA 6.6 υφάσματος εξετάστηκαν με φασματοσκοπία υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier με αποσβένουσα ολική ανάκλαση (Fourier Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance, FTIR-ATR), με χρήση του φασματομέτρου FTIR PerkinElmer Spectrum 100 U-ATR, εξοπλισμένο με το κρύσταλλο ZnSe Ri 2.4.

5.14 Μέτρηση της μεταβολής χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

Οι διαφορές στο χρώμα αξιολογήθηκαν με χρήση του χρωματόμετρου Minolta CR/200, το οποίο βαθμονομήθηκε 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” εκφράζει την φωτεινότητα του χρώματος, το “a” περιγράφει τη διαφορά κόκκινου/πράσινου και το “b” περιγράφει τη διαφορά μπλε/κίτρινου. Η διαφορά χρώματος υπολογίζεται από την εξίσωση (1):

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6 Θερμική ανάλυση/χαρακτηρισμός των μη επεξεργασμένων πολυμερικών υλικών

Οι θερμικές ιδιότητες των PLA films και 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 της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης (T_g), του πρώτου σημείου τήξης (T_{m1}), της θερμοκρασίας κρυστάλλωσης (T_c) και του δεύτερου σημείου τήξης (T_{m2}) των υλικών. Από την ανάλυση TGA βρέθηκε η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης (T_{max}), όπου σημειώνεται μέγιστη απώλεια μάζας του υλικού.

6.1 Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης (DSC)

Τα άμορφα και ημι-κρυσταλλικά πολυμερή υφίστανται αλλαγή φάσης από μία υαλώδη σε μία ελαστική κατάσταση στη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g). Η τιμή της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης είναι, λοιπόν, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό που επηρεάζει τις ιδιοελαστικές ιδιότητες του PLA. Στο T_g η τμηματική κινητικότητα των μοριακών αλυσίδων αυξάνεται και ένα πολυμερές είναι πιο ελαστικό και εύκαμπτο. Άρα, αύξηση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος πάνω από την T_g του PLA προκαλεί την απότομη απώλεια της δυσκαμψίας του. Η τιμή του T_g εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως το μοριακό βάρος του πολυμερούς, την παρουσία υγρασίας, την παρουσία της κρυσταλλικής φάσης (στην περίπτωση των ημικρυσταλλικών πολυμερών) και του ποσοστού κρυσταλλικότητας, του θερμικού ιστορικού κατά την επεξεργασία, του χαρακτήρα των ακραίων ομάδων και της παρουσίας πρόσθετων στη σύνθεση.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η θερμοκρασία τήξης και η θερμότητα σύντηξης πολυμερών επηρεάζονται από το θερμικό ιστορικό που εφαρμόζεται κατά τη σύνθεση ή επεξεργασία του πολυμερούς. Συνεπώς, τα αποτελέσματα DSC που προέρχονται από τον 1^ο κύκλο θέρμανσης δίνουν πληροφορίες σχετικά με την πραγματική κατάσταση των πολυμερικών κρυστάλλων και η εφαρμογή του κύκλου ψύξης διαγράφει το προηγούμενο θερμικό ιστορικό, π.χ. ανόπτηση κατά την επεξεργασία.

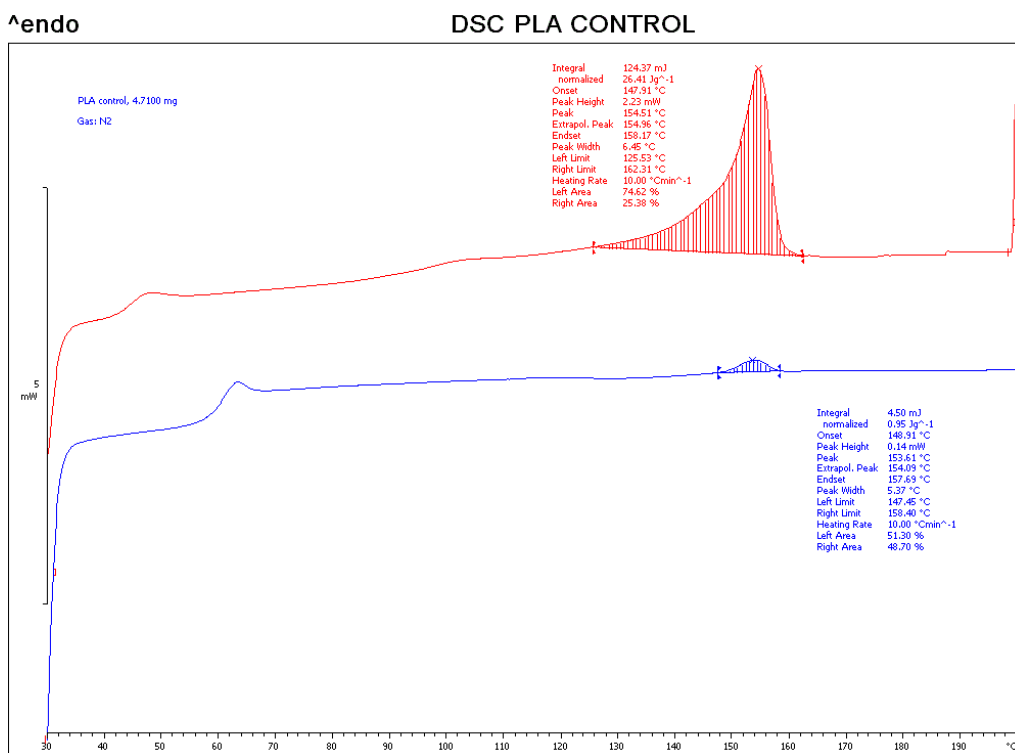
Γενικά, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης προσδιορίζεται από τον 2^ο κύκλο θέρμανσης για να παρέχει τιμή T_g ανεξάρτητη από το θερμικό ιστορικό κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

Το θερμικό ιστορικό είναι ένα πολύ σημαντικό ζήτημα που επηρεάζει τη διάταξη της άμορφης/κρυσταλλικής φάσης και κατά συνέπεια επηρεάζει τις φυσικο-μηχανικές ιδιότητες του πολυ (γαλακτικού οξέος). (Gregorova Adriana, 2013)

6.1.1 PLA

Στο **Σχήμα 1** φαίνεται το γράφημα DSC για το ακατέργαστο film PLA. Η θερμοκρασία τήξης του υλικού βρέθηκε στον 1^ο κύκλο θέρμανσης (μπλε καμπύλη) 154 °C, ενώ στον 2^ο (κόκκινη καμπύλη) 155 °C. Επίσης, η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του υλικού στον 1^ο κύκλο θέρμανσης είναι 60 °C, ενώ στον 2^ο 45 °C.

Καθώς στην παρούσα εργασία δεν μελετήθηκαν οι μηχανικές ιδιότητες των δειγμάτων, αλλά επίκεντρο αποτέλεσε η μελέτη και απόδειξη της τροποποίησης τους και ο έλεγχος των προσφερόμενων αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων, αυτό που αποτελεί ενδιαφέρον από το παρακάτω γράφημα είναι η θερμοκρασία τήξης του υλικού. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία κάτω των 154 °C, όχι μόνο για να μην αρχίσει να τήκεται το υλικό αλλά και γιατί σε τόσο υψηλές θερμοκρασίες το χρησιμοποιούμενο ένζυμο θα καταστρεφόταν.



Σχήμα 1: Γράφημα DSC σε δείγμα PLA.

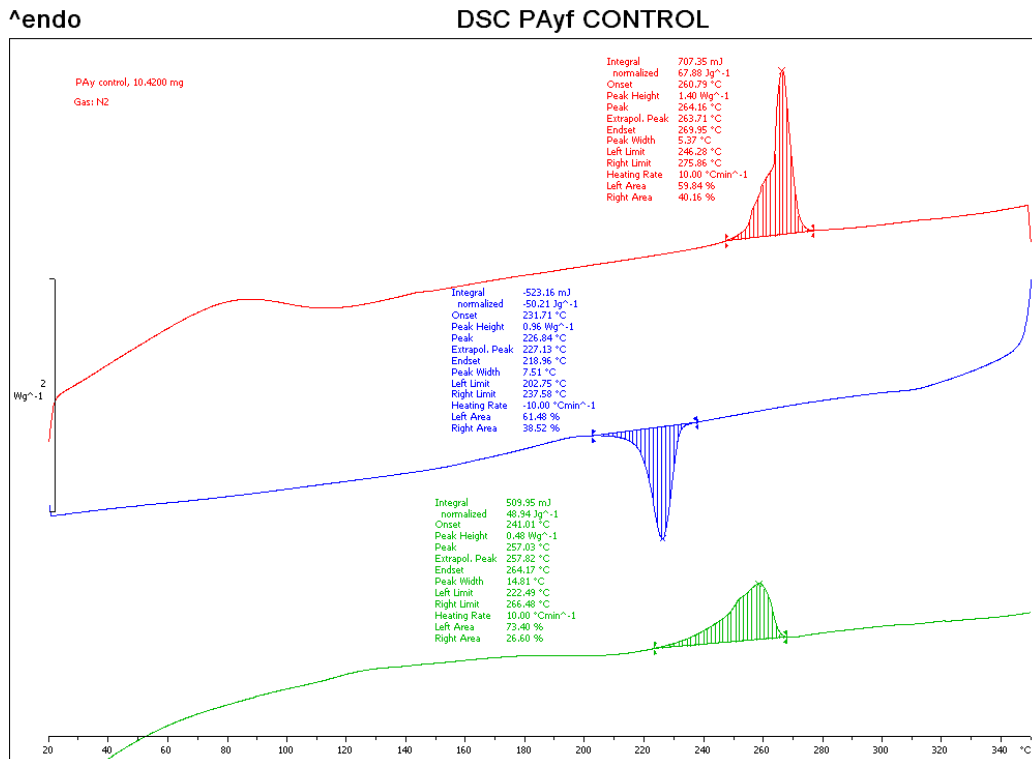
Η θερμοκρασία τήξης του υλικού στον 1^ο κύκλο θέρμανσης (μπλε καμπύλη) είναι 154 °C, ενώ στον 2^ο (κόκκινη καμπύλη) 155 °C.

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης του υλικού στον 1^ο κύκλο θέρμανσης είναι 60 °C, ενώ στον 2^ο 45 °C.

Συνθήκες: μάζα δείγματος 4,71 mg , ατμόσφαιρα N₂ 10 mL/min, 30 - 200 °C με 10 °C/min.

6.1.2 PA

Ο θερμοκρασιακός κύκλος θέρμανσης-ψύξης-θέρμανσης που εφαρμόστηκε κατά την ανάλυση DSC επέτρεψε τον προσδιορισμό του πρώτου σημείου τήξης ($T_{m1} = 264 \text{ }^{\circ}\text{C}$), της θερμοκρασίας κρυστάλλωσης ($T_c = 227 \text{ }^{\circ}\text{C}$) και του δεύτερου σημείου τήξης ($T_{m2} = 257 \text{ }^{\circ}\text{C}$) του πολυαμιδικού υφάσματος.



Σχήμα 2: Γράφημα DSC σε δείγμα PA.

Η θερμοκρασία τήξης του υλικού στον 1^ο κύκλο θέρμανσης (κόκκινη καμπύλη) είναι 264 °C, ενώ στον 2^ο (πράσινη καμπύλη) 257 °C.

Η θερμοκρασία κρυστάλλωσης του υλικού είναι 227 °C.

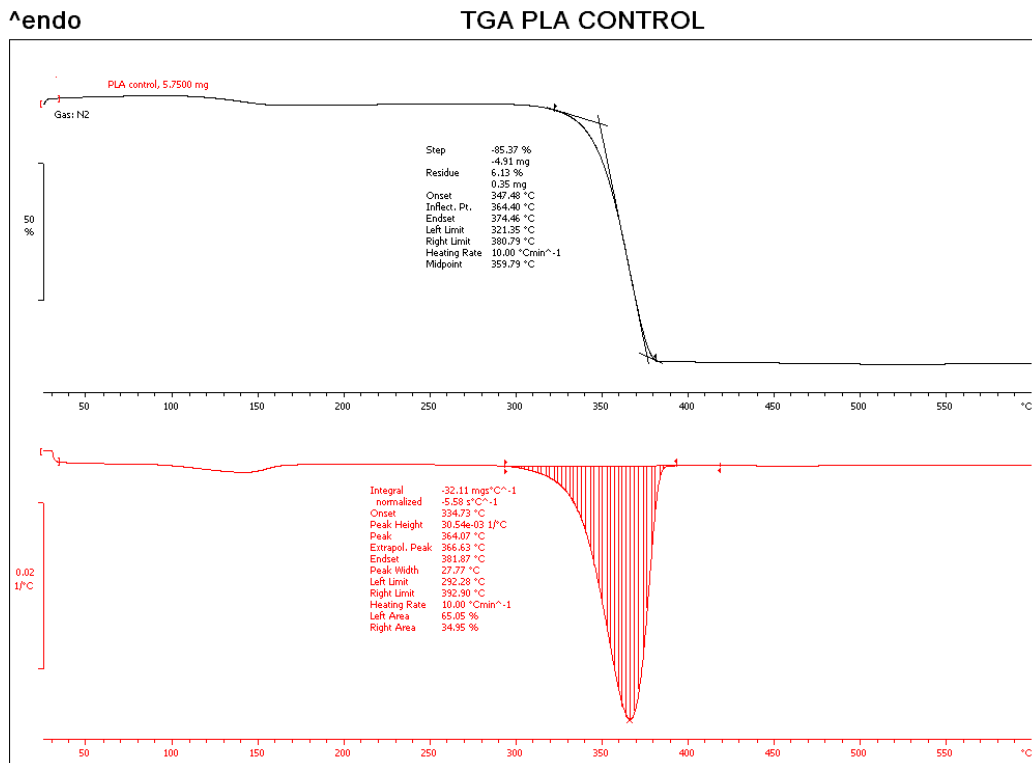
Συνθήκες: μάζα δείγματος 10,42 mg, ατμόσφαιρα N₂ 10 mL/min, 20 - 350 °C με 10 °C/min.

6.2 Θερμοσταθμική ανάλυση (TGA)

Το TGA είναι μια σημαντική μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της θερμικής αποσύνθεσης πολυμερικών υλικών. Η απώλεια βάρους μιας ουσίας που οφείλεται στο σχηματισμό πτητικού προϊόντος μετά την αποικοδόμηση παρακολουθείται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή του χρόνου. Από την πρώτη παράγωγο της καμπύλης βρίσκεται η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας.

6.2.1 PLA

Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3** η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης, όπου σημειώνεται μέγιστη απώλεια μάζας του PLA, βρέθηκε 364 °C.

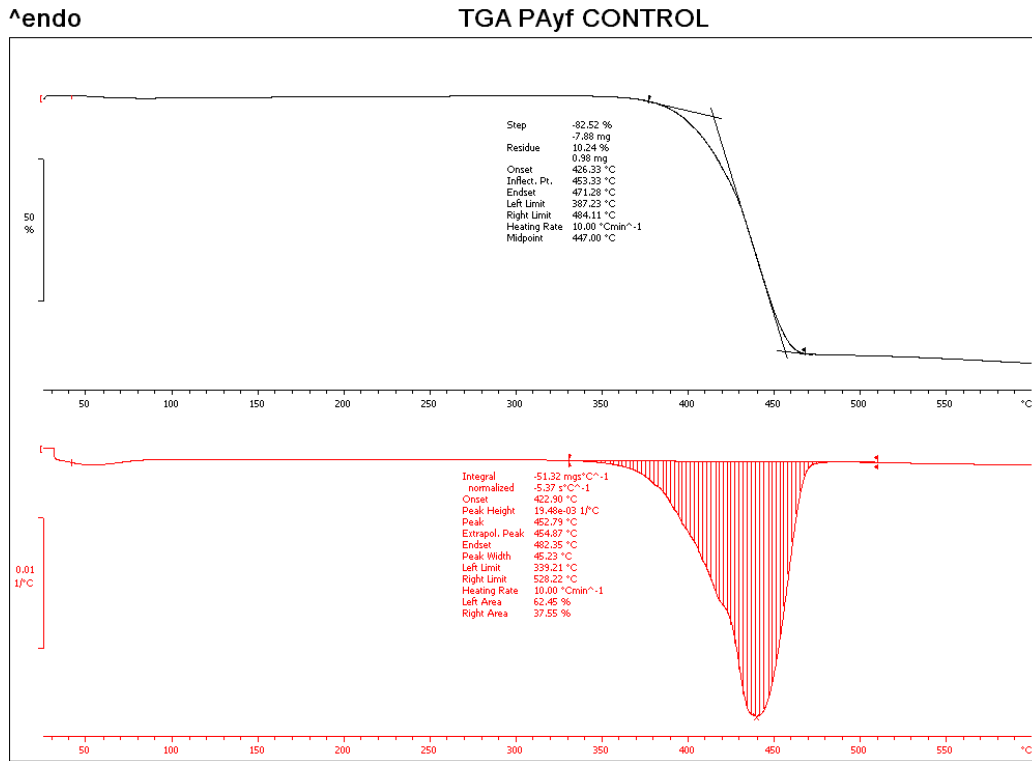


Σχήμα 3: Γράφημα TGA σε δείγμα PLA.

Η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας του υλικού βρέθηκε $T_{max} = 364$ °C

6.2.2 PA

Για το PA η θερμοκρασία θερμικής αποικοδόμησης, όπου σημειώνεται μέγιστη απώλεια μάζας, βρέθηκε 453 °C.



Σχήμα 4: Γράφημα TGA σε δείγμα PA.

Η θερμοκρασία μέγιστης απώλειας μάζας του υλικού βρέθηκε $T_{max} = 453$ °C

7 Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ενζυμικώς επιφανειακά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις.

Η μέθοδος αντιοξειδωτικού test με ελεύθερες ρίζες DPPH* δεν είναι πολύ ακριβής μέθοδος και δεν έχει καλή επαναληψιμότητα. Χρησιμοποιήθηκε, όμως, για τον καθορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας των τελικών προϊόντων καθώς και για τον καθορισμό ορισμένων παραμέτρων της τελικής πειραματικής διαδικασίας. Ένας καλός δείκτης για την ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των προϊόντων είναι το EC_{50} .

Σαν EC_{50} ορίζεται η συγκέντρωση αντιοξειδωτικού που απαιτήθηκε για τη μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%. Εδώ εκφράζεται σε μονάδα επιφάνειας (cm^2) καθώς η πρόσδεση των φαινολικών ενώσεων είναι επιφανειακή.

Εκφράζει, δηλαδή, την απαιτούμενη επιφάνεια του προϊόντος για τη μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% και συνεπώς **όσο μικρότερη η απαιτούμενη επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική δράση**. Το EC_{50} βρέθηκε από προσαρμογή καμπύλης στα πειραματικά δεδομένα.

Πριν την διενέργεια των tests απορρόφησης μετρήθηκαν τα films PLA και τα υφάσματα PA μόνο με αιθανόλη (EtOH) (**θετικά Control**) στα 517nm και η απορρόφηση βρέθηκε μηδενική. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία των στερεών πολυμερών δεν επηρεάζει την απορρόφηση των δειγμάτων με τα φαινολικά στα 517 nm και συνεπώς τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού test. Μετρήθηκε επίσης η απορρόφηση των ατροποποιητών υλικών (προεπεξεργασμένα film PLA και ύφασμα PA) σε διάλυμα DPPH και η απορρόφηση βρέθηκε ίδια με των θετικών Control. Αυτό σημαίνει ότι τα αρχικά υλικά δεν παρουσιάζουν από μόνα τους αντιοξειδωτική ικανότητα.



Εικόνα 16: Ενδεικτική απεικόνιση του διαλύματος του αντιοξειδωτικού test με τις ρίζες DPPH για διαφορετικού μεγέθους (συνεπώς και επιφάνειας) δείγματα PLA films.

Αριστερά είναι το control δείγμα (PLA ατροποποίητο) και πηγαίνοντας προς τα δεξιά αυξάνεται η επιφάνεια του τροποποιημένου PLA film. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια του δείγματος τόσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της φαινολικής ένωσης, με συνέπεια την αυξημένη δέσμευση των ριζών DPPH, όπως είναι αναμενόμενο, που προκαλεί και τον αποχρωματισμό του διαλύματος.

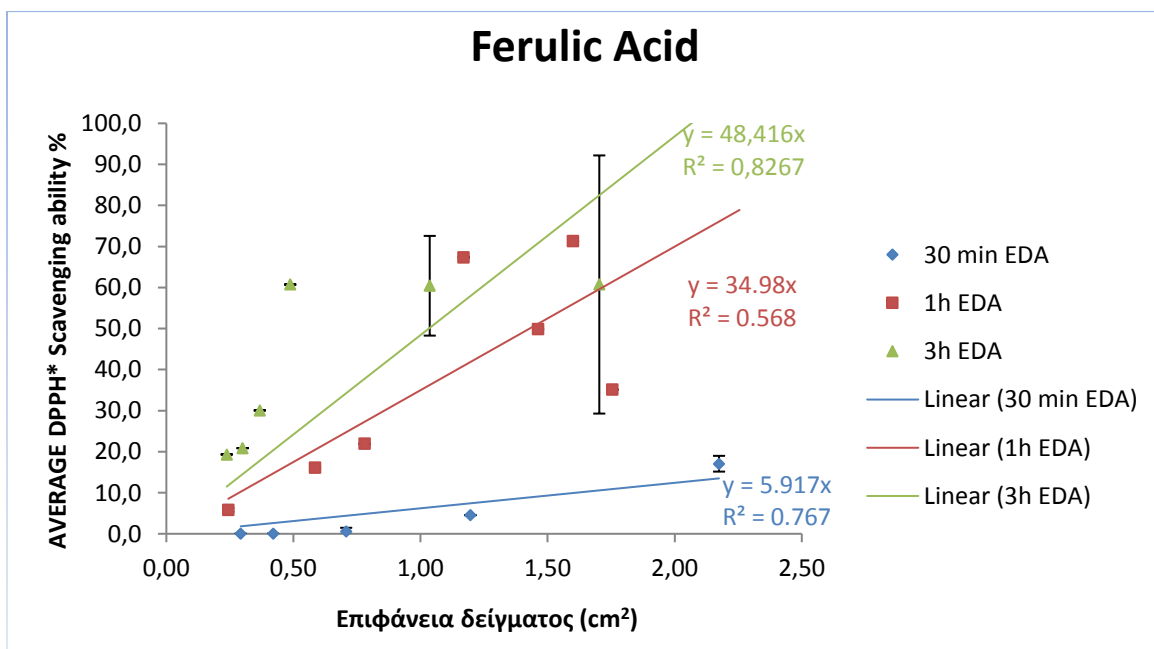
7.1 PLA

7.1.1 1^{ος} κύκλος

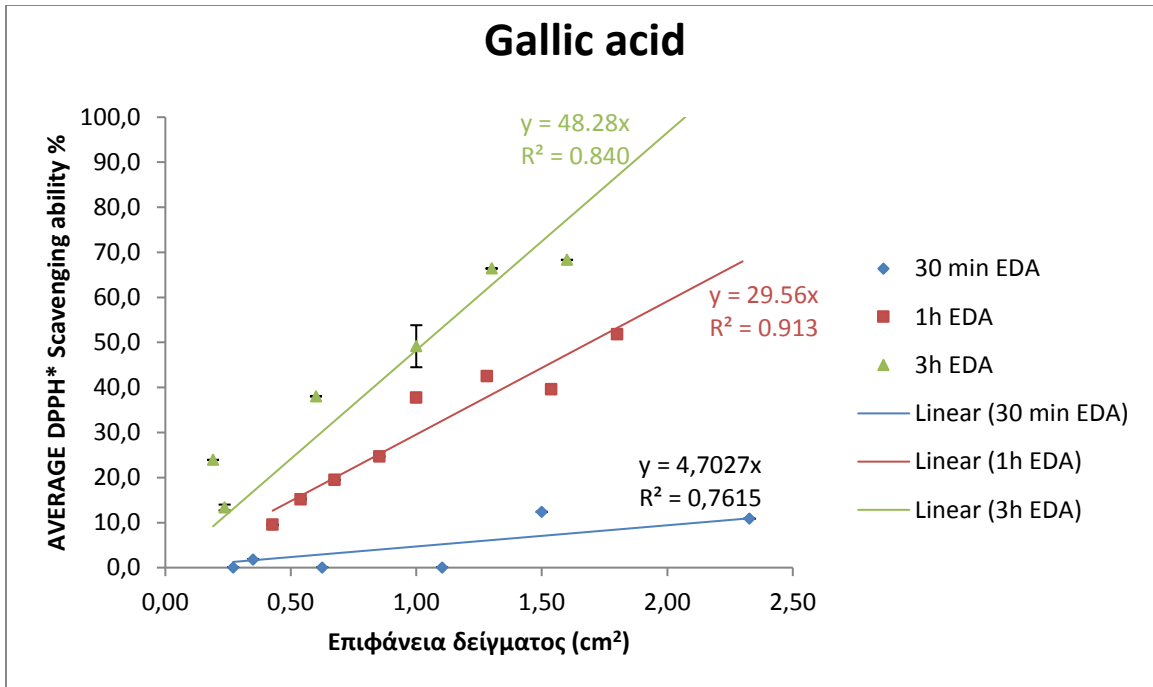
Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση χρόνου προεπεξεργασίας με EDA στα PLA films, κρατώντας σταθερές τις συνθήκες της ενζυμικής αντίδρασης με τα φαινολικά τόσο σε χρόνο όσο και σε συγκέντρωση ενζύμου αλλά και φαινολικών ουσιών. Υπόψιν, για την επιλογή της χρονικής διάρκειας της προεπεξεργασίας των films με την EDA, λήφθηκαν τόσο η αντιοξειδωτική ικανότητα των τελικών προϊόντων όσο και η απώλεια μάζας του αρχικού υλικού μετά την προεπεξεργασία. Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα σε ξεχωριστό διάγραμμα ανά φαινολική ένωση, καθώς και πίνακας με τα EC_{50} ανά περίπτωση. Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2** στα δείγματα της κατεχόλης και της πυρογαλλόλης έγιναν μετρήσεις και για αντίδραση με απενεργοποιημένο ένζυμο (δείγμα Control 2 της παραγράφου 5.10.1), για να βρεθεί τι μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του τελικού προϊόντος οφείλεται και στην μη υποβοηθούμενη από την λακάση τροποποίηση της επιφάνειας των πολυμερών από τις φαινολικές ενώσεις και από τα προϊόντα της οξείδωσης των φαινολικών από τη λακάση.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα απώλειας μάζας των PLA films μετά την προεπεξεργασία με EDA για το αντίστοιχο χρονικό διάστημα.

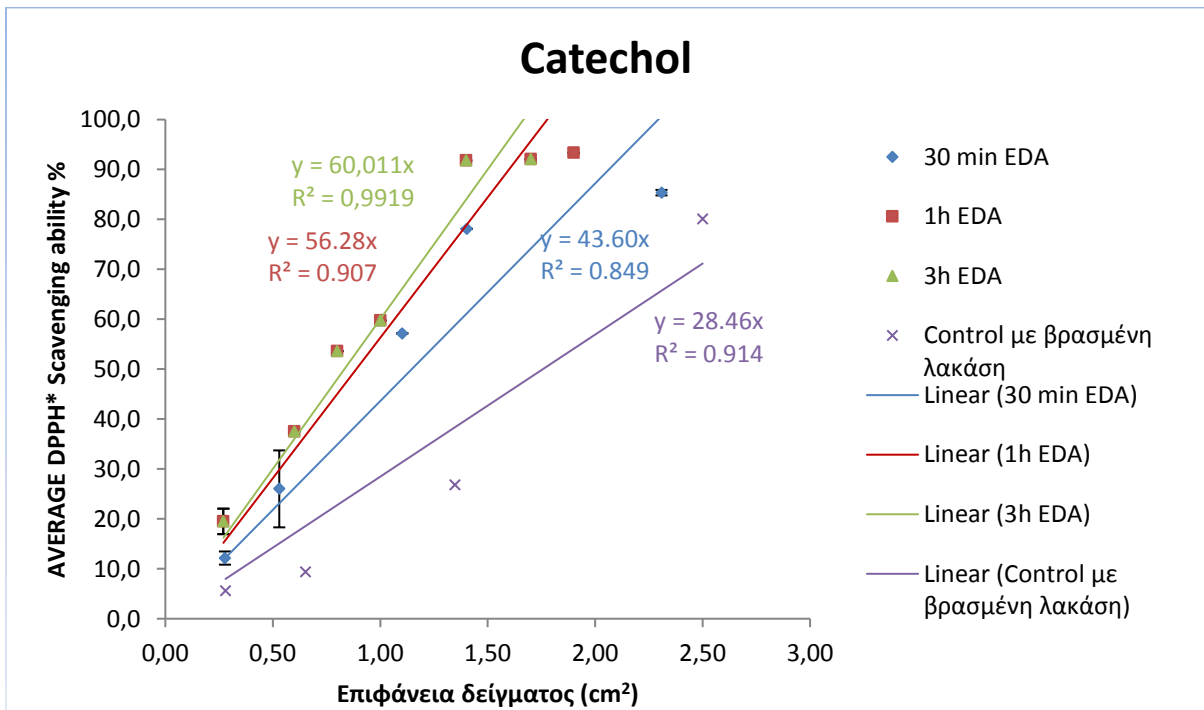
Διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA	Απώλεια μάζας %
30 min	0 - 1
1 h	1
3 h	6 - 7



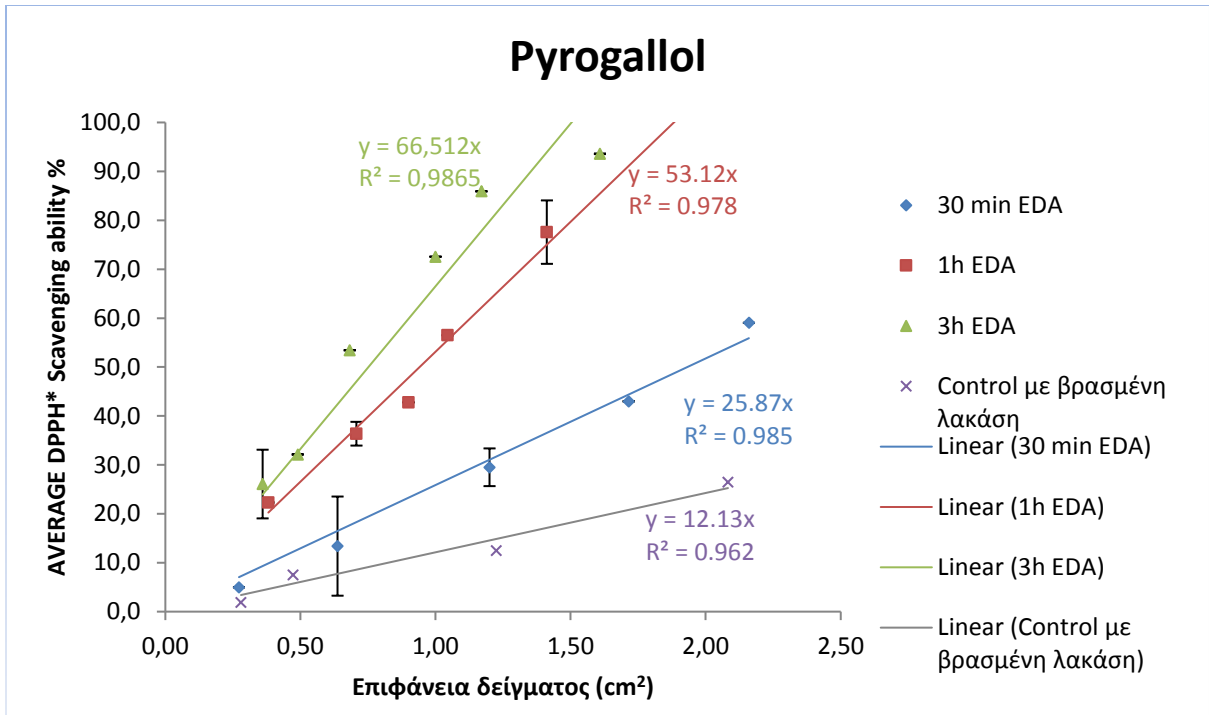
Σχήμα 5: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με ferulic acid - Μελέτη χρόνου προεπεξεργασίας film με EDA
Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{laccase} = 4$ U, $C_{ferulic\ acid} = 40$ mM, pH = 6, T = 60 °C, $t_{αντίδρασης} = 0,5/1/3$ h



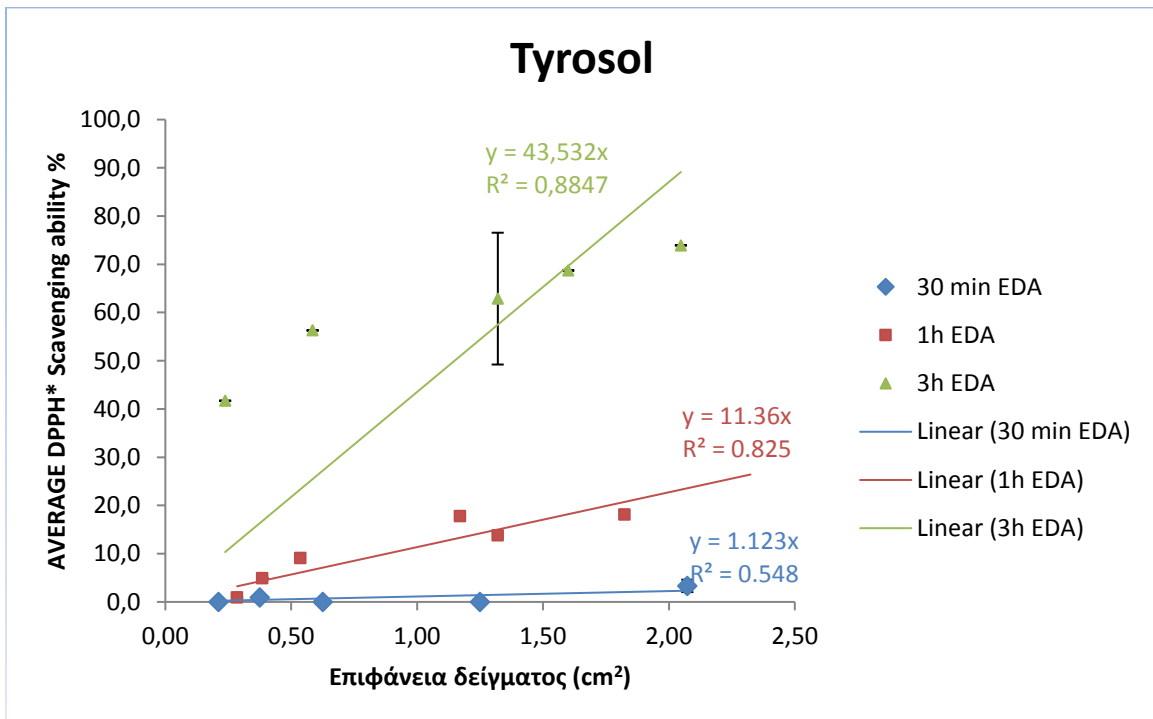
Σχήμα 6: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με gallic acid - Μελέτη χρόνου προεπεξεργασίας film με EDA
 Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{laccase} = 4 \text{ U}$, $C_{gallic \text{ acid}} = 40 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{αντιδρασης} = 0,5/1/3 \text{ h}$



Σχήμα 7: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη χρόνου προεπεξεργασίας film με EDA
 Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{laccase} = 4 \text{ U}$, $C_{catechol} = 40 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{αντιδρασης} = 0,5/1/3 \text{ h}$



Σχήμα 8: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με pyrogallol - Μελέτη χρόνου προεπεξεργασίας film με EDA
 Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{\text{laccase}} = 4 \text{ U}$, $C_{\text{pyrogallol}} = 40 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{αντίδρασης}} = 0,5/1/3 \text{ h}$



Σχήμα 9: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με tyrosol - Μελέτη χρόνου προεπεξεργασίας film με EDA
 Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{\text{laccase}} = 4 \text{ U}$, $C_{\text{tyrosol}} = 40 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{αντίδρασης}} = 0,5/1/3 \text{ h}$

Πίνακας 2: Αποτελέσματα μελέτης χρόνου προεπεξεργασίας με EDA για PLA films, βάσει αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Στον πίνακα εμφανίζονται οι τιμές EC_{50} (cm^2), δηλαδή η επιφάνεια των PLA films που απαιτήθηκε για τη μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%.

Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{laccase} = 4$ U, $C_{φαινολικής\ ένωσης} = 40$ mM, pH = 6, T = 60 °C, $t_{αντίδρασης} = 3$ h

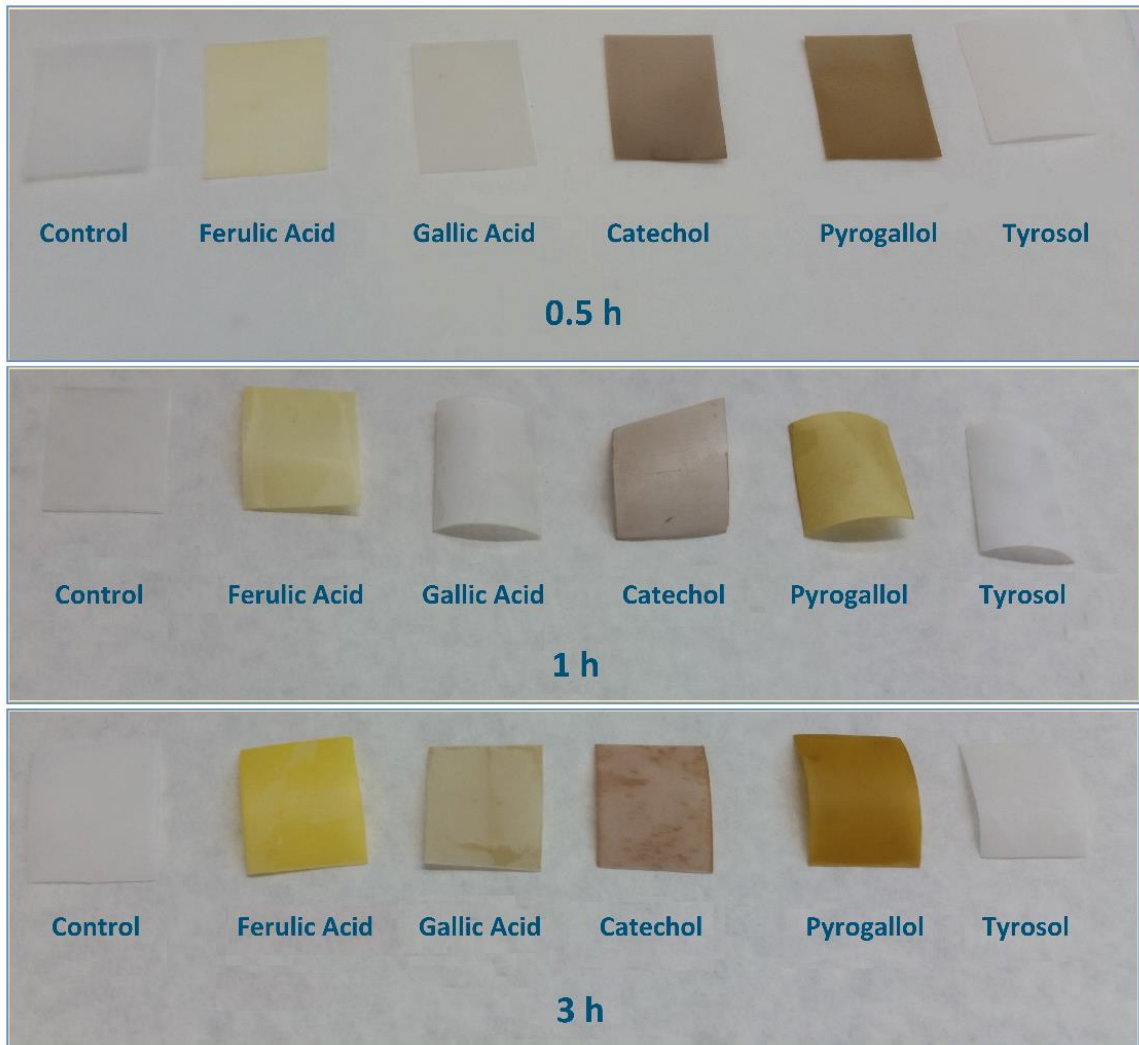
Χρόνος προεπεξεργασίας με EDA	30 min	1 h	3 h	Control με απενεργοποιημένη λακάση (30min)
	EC_{50} (cm^2)			
Δείγμα PLA				
Ferulic acid	8,45	1,43	1,03	-
Gallic acid	10,63	1,69	1,04	-
Catechol	1,15	0,89	0,83	1,76
Pyrogallol	1,93	0,94	0,75	4,12
Tyrosol	44,52	4,40	1,15	-

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων σαν χρόνος προεπεξεργασίας επιλέχθηκε τελικά η **1h** καθώς συνδυάζει μικρό ποσοστό απώλειας μάζας και καλό βαθμό απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης βάσει της αντιοξειδωτικότητας των δειγμάτων (τιμές EC_{50}).

Όπως φαίνεται, τα δείγμα της αντίδρασης με την απενεργοποιημένη λακάση παρουσιάζουν και αυτά αντιοξειδωτική ικανότητα μικρότερη όμως από την αντίστοιχη των δειγμάτων της υποβοηθούμενης από το ένζυμο αντίδρασης, όπως άλλωστε αναμένεται. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, η τροποποίηση της πολυμερικής επιφάνειας με τα φαινολικά, καθώς και η κατάλυση της αντίδρασης από τη λακάση. Αξίζει, επίσης, να παρατηρηθεί ότι για τα περισσότερα δείγματα ο διπλασιασμός του χρόνου προεπεξεργασίας μείωσε αρκετά την τιμή του EC_{50} (με ακραίο παράδειγμα την τυροσόλη που υποδεκαπλασιάστηκε), γεγονός που σημαίνει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της διαμίνης στην επιφάνεια του PLA film αυξάνει και την απόδοση της ενζυμικής τροποποίησης και επιβεβαιώνεται η χημική σύνδεση των φαινολικών ενώσεων και των παραγόμενων κινονών και ολιγο-/πολυμερών, που υποθέτουμε ότι συμβαίνει σύμφωνα και με τη βιβλιογραφία (Zerva *et al.*, 2016) από την οξειδωτική δράση της λακάσης, με τις αμινομάδες που έχουν προστεθεί στην επιφάνεια του film. (Θεωρείται ότι αύξηση του χρόνου αμινόλυσης σημαίνει και αύξηση της συγκέντρωσης των αμινομάδων που προσδένονται στην επιφάνεια του film, δεν μπορεί όμως να εκτιμηθεί βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων ο βαθμός της, καθώς η μικρή διαφορά μεταξύ των δειγμάτων της 1 h και των 3 h μπορεί να οφείλεται στον βαθμό αποικοδόμησης της επιφάνειας ή και του κύριου όγκου του υλικού των films από την αμινόλυση, που συμβαίνει σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό για τις 3 h προεπεξεργασίας όπως υποδηλώνεται και από την απώλεια μάζας.)

Την μικρότερη αντιοξειδωτικότητα από όλες τις φαινολικές ενώσεις την παρουσιάζει η τυροσόλη ανεξαρτήτως του χρόνου προεπεξεργασίας, όμως η διαφορά για προεπεξεργασία 30 min είναι πολύ μεγάλη. Η μικρή αντιοξειδωτικότητα αναφέρεται και σε σχετική βιβλιογραφία (Karković Marković *et al.*, 2019), σύμφωνα με την οποία η τυροσόλη αποτελεί αποτελεσματικό κυτταρικό αντιοξειδωτικό, πιθανώς λόγω ενδοκυτταρικής συσσώρευσης, παρά την ασθενή αντιοξειδωτική του δράση.

Στην **Εικόνα 17** φαίνεται και η μορφή των PLA films μετά την τροποποίηση για όλες τις φαινολικές ενώσεις και τους ελεγχόμενους χρόνους προεπεξεργασίας, όπου είναι προφανής και η καταστροφή του υλικού για τις 3 h προεπεξεργασίας.



Εικόνα 17: Μορφή δειγμάτων μελέτης για τον χρόνο προεπεξεργασίας των PLA films με την EDA

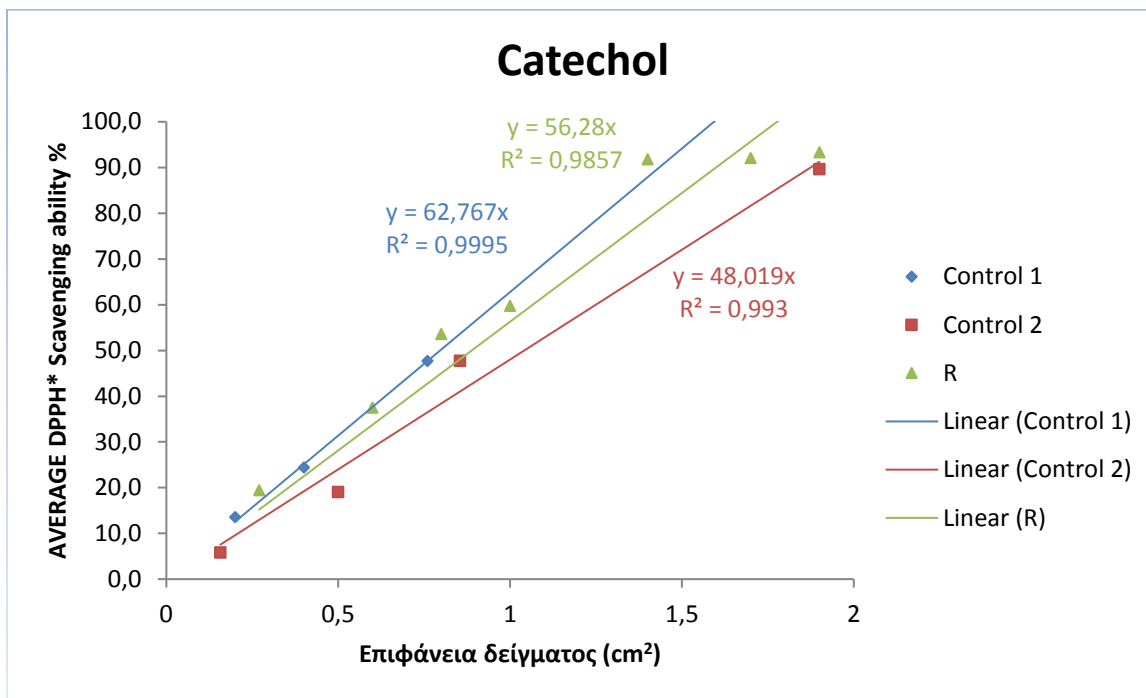
7.1.2 2^{ος} κύκλος

Εφόσον επιλέχθηκε ο χρόνος προεξεργασίας των PLA films με την EDA να είναι 1 h βάσει του 1^{ου} κύκλου, έγινε επανάληψη των πειραμάτων για τις 2 φαινολικές ενώσεις με την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού τεστ του 1ου κύκλου, και σύγκριση με τα αντίστοιχα control δείγματα. Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 2 την καλύτερη απόδοση στο τεστ με τις ρίζες DPPH είχαν η κατεχόλη και η πυρογαλόλη.

Οι συνθήκες της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης ήταν:

(pH 6, 60 °C, 180 grm, C_{φαινολικών} = 40 mM, τ_{αντίδρασης} = 3 h και για το δείγμα R C_{λακάσης} = 4 U).

Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα σε ξεχωριστό διάγραμμα ανά φαινολική ένωση, καθώς και πίνακας με τα EC₅₀ ανά περίπτωση.

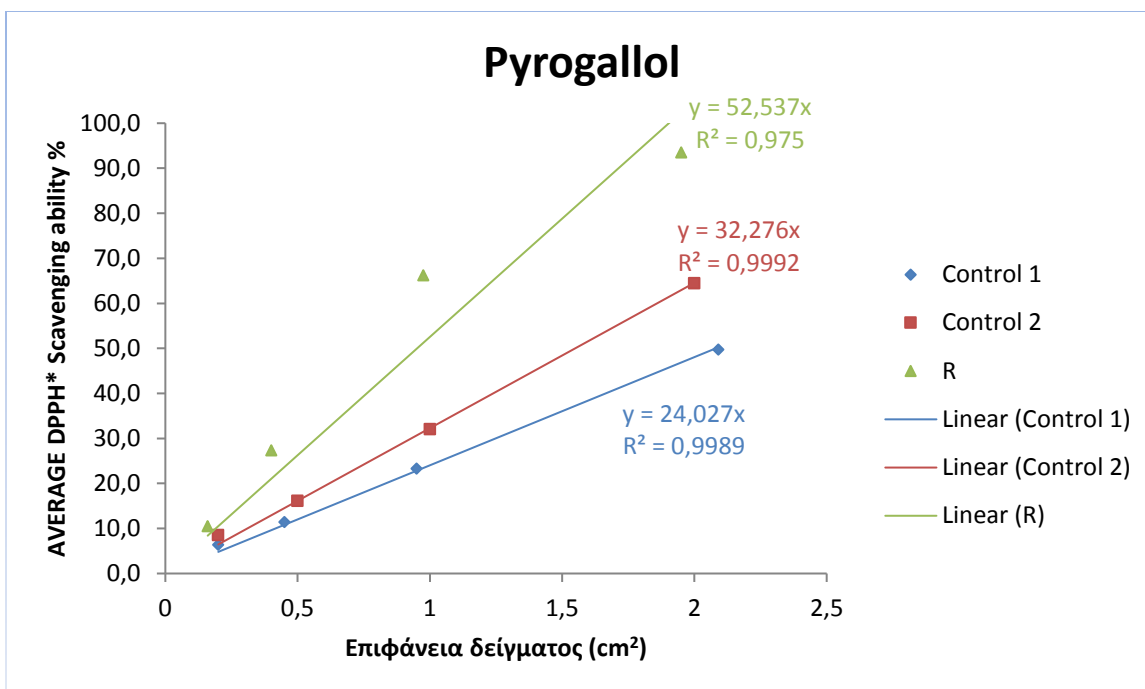


Εικόνα 18: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol – 2^{ος} κύκλος

Control 1: PLA προεπεξεργασμένο με EDA (1h) και στη συνέχεια επιφανειακά τροποποιημένο με catechol (40 mM) για 3h στους 60 °C και pH 6.

Control 2: Αντίδραση catechol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h, σε 60 °C, pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της laccase) και φυγοκέντρησή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: κροκιδωμένα διμερή purpurigallin και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με PLA (προεπεξεργασμένο με EDA για 1 h) για 3h στους 60 °C.

R: Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση PLA προεπεξεργασμένου με EDA (για 1 h) με catechol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h στους 60 °C και pH 6.



Εικόνα 19: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με pyrogallol – 2^{ος} κύκλος

Control 1: PLA προεπεξεργασμένο με EDA (1h) και στη συνέχεια επιφανειακά τροποποιημένο με pyrogallol (40 mM) για 3h στους 60 °C και pH 6.

Control 2: Αντίδραση pyrogallol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h, σε 60 °C, pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της laccase) και φυγοκέντρησή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: κροκιδωμένα διμερή purpurogallin και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με PLA (προεπεξεργασμένο με EDA για 1 h) για 3h στους 60 °C.

R: Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση PLA προεπεξεργασμένου με EDA (για 1 h) με pyrogallol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h στους 60 °C και pH 6.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης 2^{ου} κύκλου για PLA films – εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Σύγκριση των αποτελεσμάτων της αντίδρασης με τα αντίστοιχα control δείγματα.

Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: C_{laccase} = 4 U, C_{φαινολικής ένωσης} = 40 mM, pH = 6, T = 60 °C, t_{αντίδρασης} = 3 h

Δείγμα PLA		EC ₅₀ (cm ²) για 1 h EDA
Catechol	Control 1	0,80
	Control 2	1,04
	R	0,89
Purogallol	Control 1	2,08
	Control 2	1,55
	R	0,95

Όπως, φαίνεται από τον **Πίνακα 3** για την ένωση της πυρογαλόλης, ομοίως με τα αποτελέσματα του 1^{ου} κύκλου, το δείγμα της υποβοηθούμενης από τη λακάση αντίδρασης παρουσίασε μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το δείγμα της αντίδρασης της φαινολικής ένωσης με το PLA film χωρίς την παρουσία του ενζύμου, όπως ήταν αναμενόμενο.

Παρουσίασε, επίσης, μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα και από το Control 2, επίσης αναμενόμενο. Αυτό που αξίζει να παρατηρηθεί είναι ότι το Control 2 παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το Control 1. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε μεγαλύτερη απόδοση της επιφανειακής τροποποίησης της επιφάνειας του PLA film από τα παράγωγα της οξειδωτικής δράσης του ενζύμου στο φαινολικό διάλυμα (κινόνες και ολιγο-/πολυμερή των φαινολικών ενώσεων), είτε μεγαλύτερη αντιοξειδωτικότητα των παραγώγων αυτών που έχουν προσδεθεί στην πολυμερική επιφάνεια, είτε και τα δύο.

Αντίθετα, για την κατεχόλη ενώ παρατηρείται επίσης μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση για το δείγμα της υποβοηθούμενης από τη λακάση αντίδρασης από το δείγμα Control 2, το Control 1 εμφανίζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από το δείγμα R. Αυτό δεν είναι αναμενόμενο αποτέλεσμα και πιθανότατα οφείλεται σε πειραματικό σφάλμα.

Αξίζει, επίσης, να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων του 2^{ου} κύκλου με τις αντίστοιχες τιμές που προέκυψαν από τον 1^ο κύκλο πειραμάτων για 30 min προεπεξεργασίας των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4: Σύγκριση αποτελεσμάτων ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης 1^{ου} και 2^{ου} κύκλου για PLA films, βάσει αντιοξειδωτικής ικανότητας, για προεπεξεργασία με EDA για 30 min και 1 h
Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: C_{laccase} = 4 U, C_{φαινολικής ένωσης} = 40 mM, pH = 6, T = 60 °C, t_{αντίδρασης} = 3 h

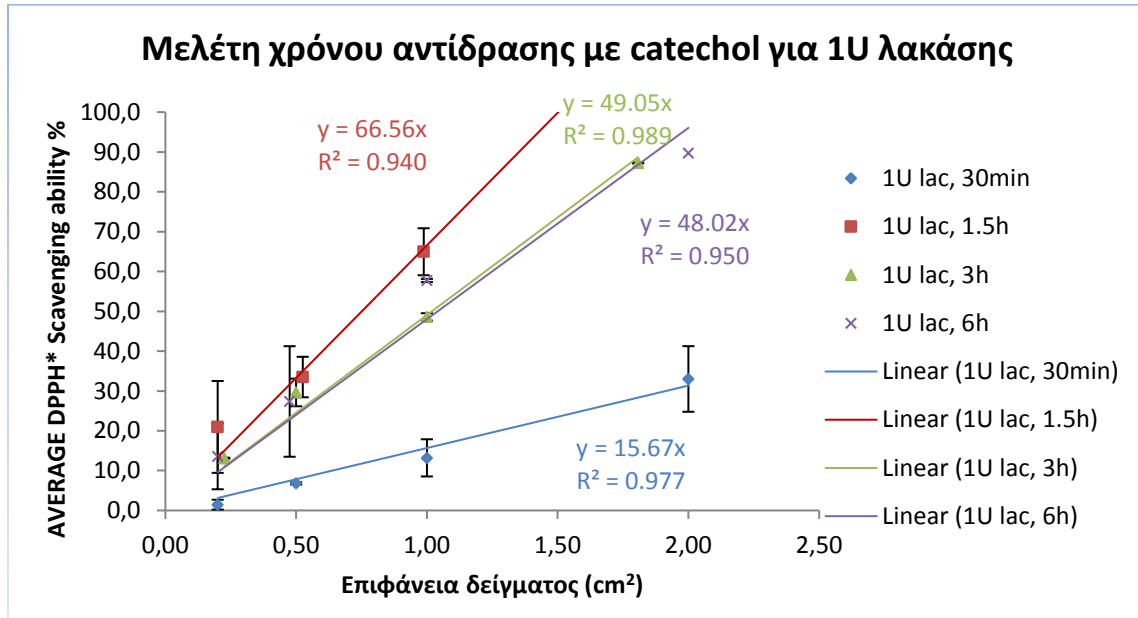
Δείγμα PLA		EC ₅₀ (cm ²)	
		30 min EDA	1 h EDA
Catechol	Control 1	-	0,80
	Control 2	1,76	1,04
	R	1,15	0,89
Purogallol	Control 1	-	2,08
	Control 2	4,12	1,55
	R	1,93	0,95

Έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω ότι η μεγαλύτερη διάρκεια προεπεξεργασίας με την EDA οδηγεί σε μεγαλύτερη τροποποίηση και συνεπώς σε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα. Από τον παραπάνω πίνακα, φαίνεται ότι αυτό ισχύει όχι μόνο για τα δείγματα R αλλά και για τα Control δείγματα και για τις δύο φαινολικές ενώσεις. Επιβεβαιώνεται, λοιπόν, εκ νέου η χημική σύνδεση των φαινολικών (και των παραγώγων τους από τη δράση της λακάσης) με τις προστιθέμενες από την προεπεξεργασία αμινομάδες στην επιφάνεια του film ακόμα και χωρίς την παρουσία του ενζύμου, όπως έχει ήδη αναφερθεί και από την βιβλιογραφία (Brzonova *et al.*, 2011).

7.1.3 3^{ος} κύκλος

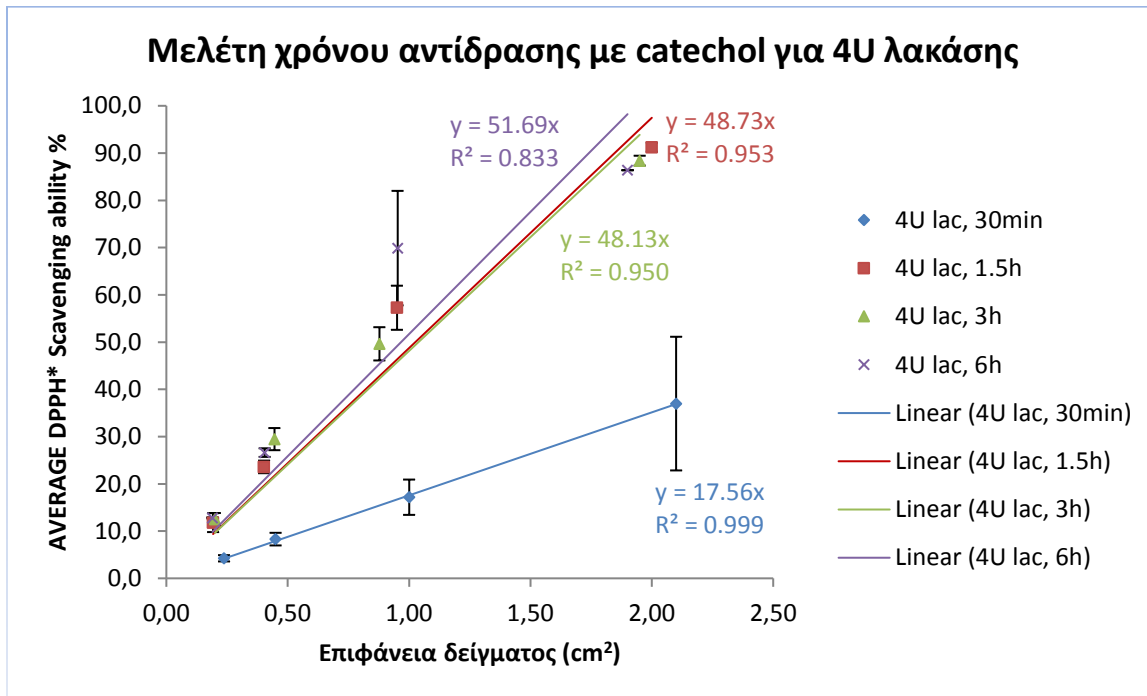
Τέλος, έγινε μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου (εκφρασμένης σε μονάδες ενεργότητας) και μελέτη χρόνου αντίδρασης μόνο για την ένωση της κατεχόλης. Παρακάτω εμφανίζονται τα

αντίστοιχα διαγράμματα και ο πίνακας με τις τιμές του EC_{50} . Οι συνθήκες για κάθε μελέτη έχουν ήδη αναφερθεί στην παράγραφο 5.10.1.



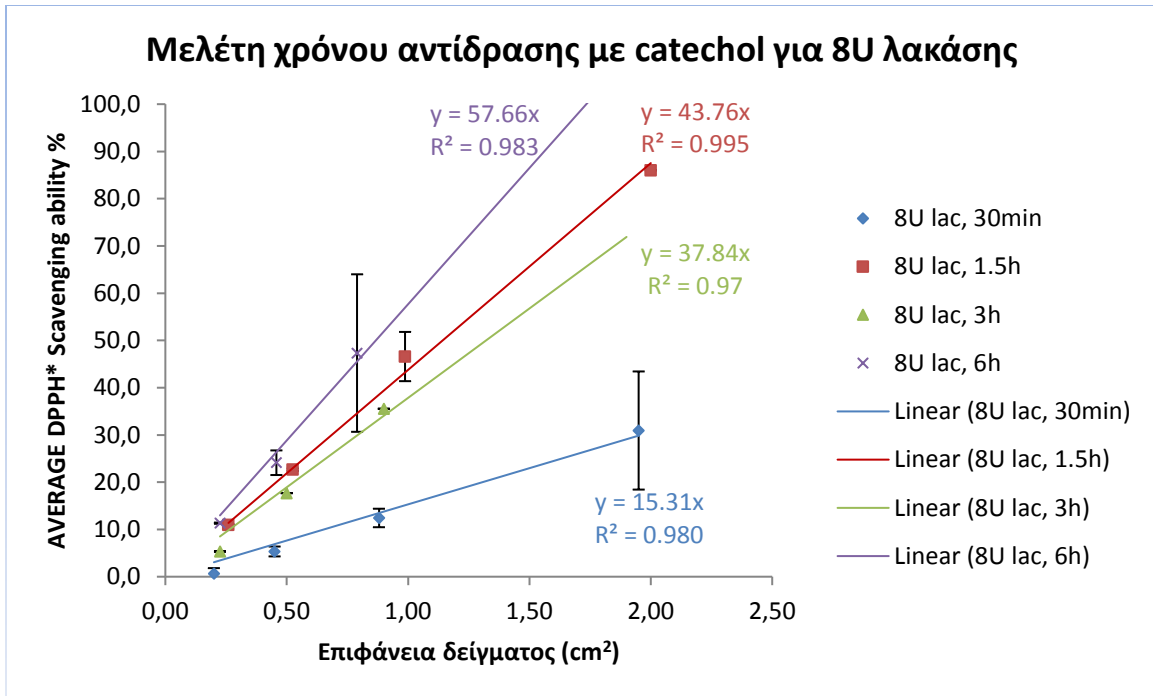
Σχήμα 10: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη χρόνου αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης για $C_{ενζύμου} = 1 U$

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA σε EtOH, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol} = 40$ mM, $C_{ενζ} = 1 U$, $t_{αντιδ.} = 30$ min/1,5 h/3 h/6 h.



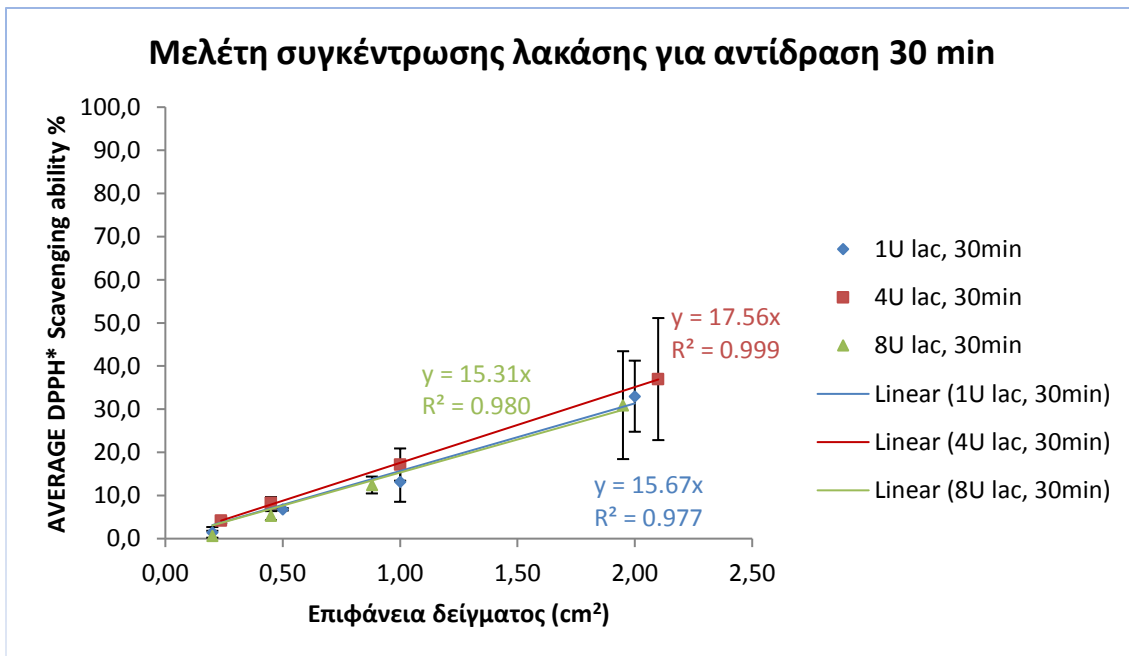
Σχήμα 11: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη χρόνου αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης για $C_{ενζύμου} = 4 U$

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA σε EtOH, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol} = 40$ mM, $C_{ενζ} = 4 U$, $t_{αντιδ.} = 30$ min/1,5 h/3 h/6 h.



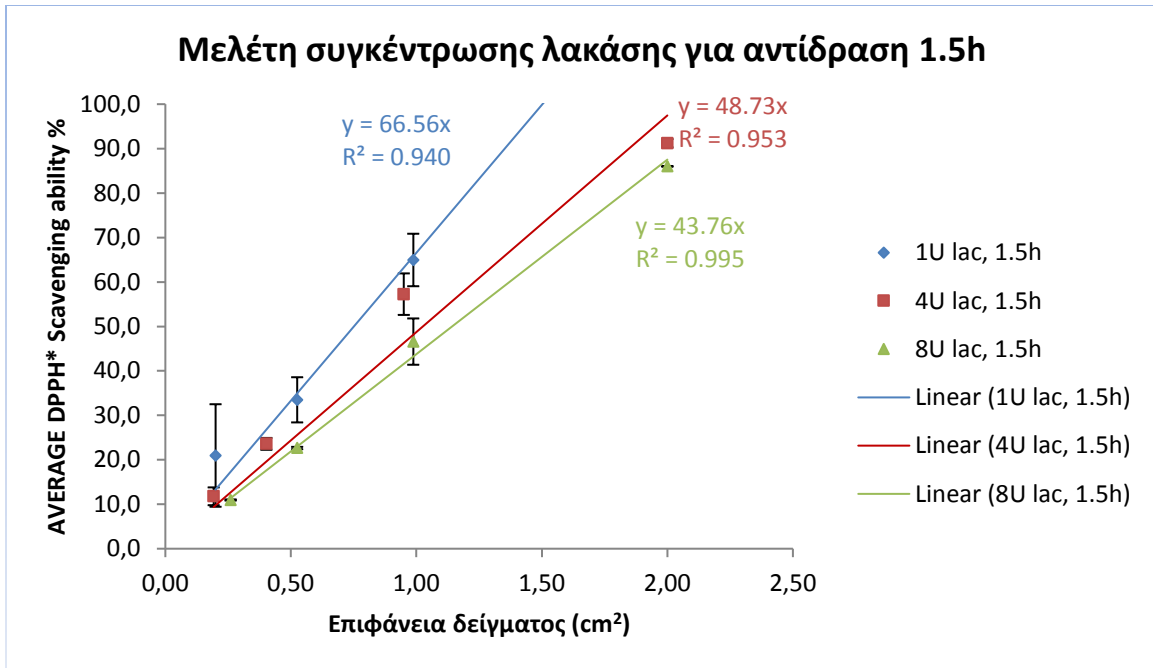
Σχήμα 12: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη χρόνου αντίδρασης της ενζυμικής τροποποίησης για $C_{ενζύμου} = 8 \text{ U}$

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol} = 40 \text{ mM}$, $C_{ενζ} = 8 \text{ U}$, $t_{αντιδ.} = 30 \text{ min}/1,5 \text{ h}/3 \text{ h}/6 \text{ h}$.



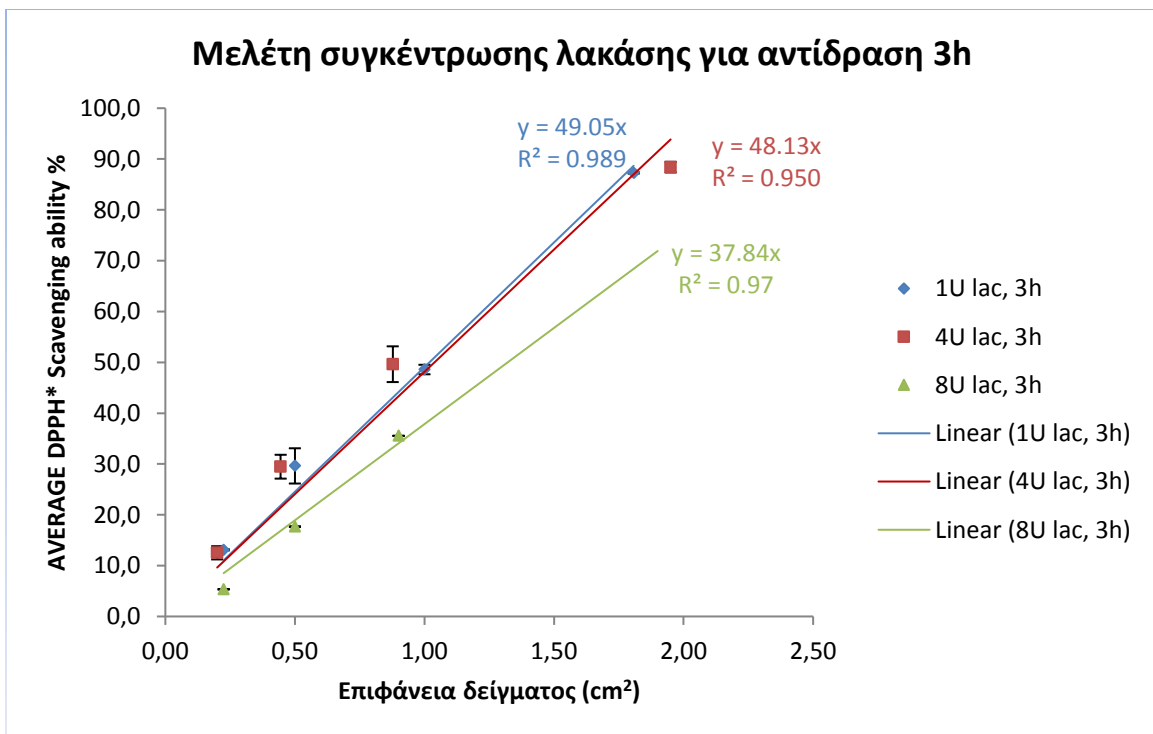
Σχήμα 13: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου (λακάσης) της ενζυμικής τροποποίησης για $t_{αντιδ.} = 30 \text{ min}$

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol} = 40 \text{ mM}$, $C_{ενζ} = 1/4/8 \text{ U}$, $t_{αντιδ.} = 30 \text{ min}$



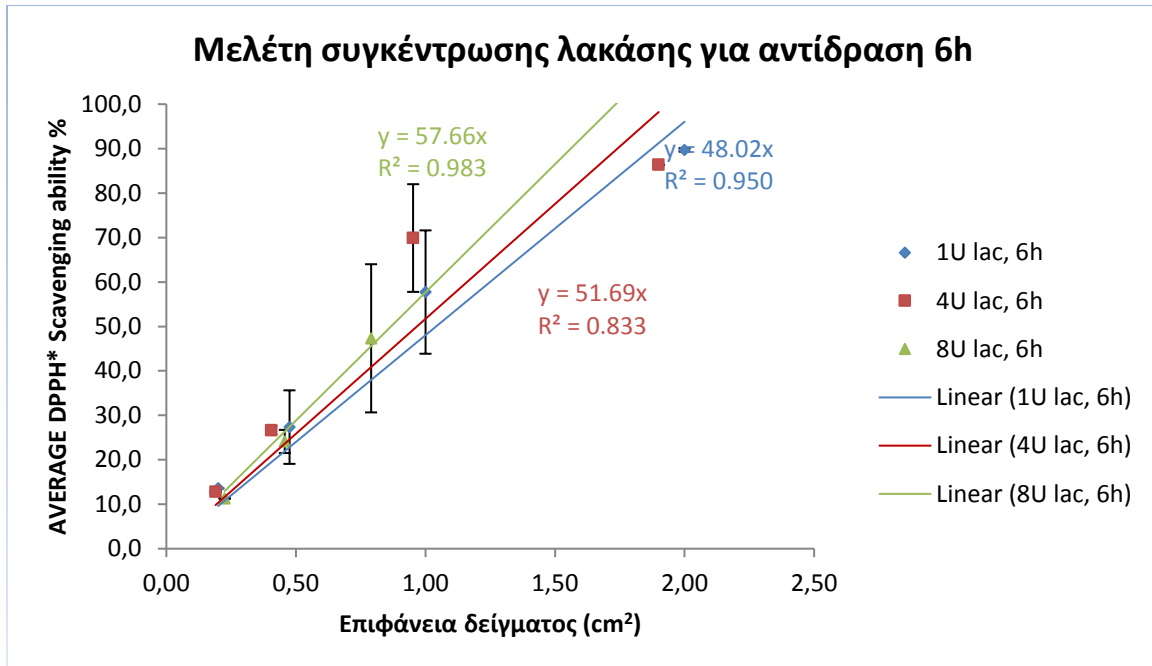
Σχήμα 14: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου (λακάσης) της ενζυμικής τροποποίησης για $t_{αντιδ.} = 1,5$ h

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, C_{catechol.} = 40 mM, C_{ενζ.} = 1/4/8 U, $t_{αντιδ.} = 1,5$ h



Σχήμα 15: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου (λακάσης) της ενζυμικής τροποποίησης για $t_{αντιδ.} = 3$ h

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, C_{catechol.} = 40 mM, C_{ενζ.} = 1/4/8 U, $t_{αντιδ.} = 3$ h



Σχήμα 16: DPPH test σε PLA τροποποιημένο με catechol - Μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου (λακάσης) της ενζυμικής τροποποίησης για $t_{αντιδ.} = 6$ h

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol.} = 40$ mM, $C_{ενζ.} = 1/4/8$ U, $t_{αντιδ.} = 6$ h

Πίνακας 5: Αποτελέσματα μελέτης χρόνου αντίδρασης και συγκέντρωσης ενζύμου για την ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση με catechol, βάσει αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Στον πίνακα εμφανίζονται οι τιμές EC_{50} (cm²), δηλαδή η επιφάνεια των PLA films που απαιτήθηκε για τη μείωση των ριζών του DPPH κατά 50%.

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: προεπεξεργασμένα PLA films για 1 h με 8 % v/v με EDA, pH = 6, T = 60 °C, $C_{catechol} = 40$ mM, $C_{laccase} = 1/4/8$ U, , $t_{αντιδρασης} = 0,5/1,5/3/6$ h.

Χρόνος αντίδρασης $C_{ενζύμου}$	30 min	1,5 h	3 h	6 h
	EC_{50} (cm ²)			
1 U	3,19	0,75	1,02	1,04
4 U	2,85	1,03	1,04	0,97
8 U	3,27	1,14	1,32	0,87

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η μέθοδος αντιοξειδωτικού test με ελεύθερες ρίζες DPPH* δεν είναι πολύ ακριβής μέθοδος και δεν έχει καλή επαναληψιμότητα. Αυτό φαίνεται και στα σφάλματα (στις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων από τη μέση τιμή) των παραπάνω διαγραμμάτων και αποτυπώνεται και στα αποτελέσματα που περιλαμβάνει ο **Πίνακας 5**.

Πρέπει να αναφερθεί, πριν γίνει ανάλυση των παραπάνω αποτελεσμάτων, ότι το ένζυμο με την πάροδο του χρόνου, την επαναχρησιμοποίηση του και την υψηλή θερμοκρασία

απενεργοποιείται. Αυτό αναμένεται να εμφανιστεί και στα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού τεστ.

Όπως φαίνεται από την μελέτη χρόνου για συγκέντρωση ενζύμου 1 U τα αποτελέσματα δείχνουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για το δείγμα της 1,5 h απ' ό,τι για τις 3 και 6 h. Αυτό δεν είναι λογικό, γιατί ακόμα και να έχει απενεργοποιηθεί πλήρως το ένζυμο μετά από τη 1,5 h θα έπρεπε τα δείγματα των 3 και 6 h να έχουν την ίδια τιμή με της 1,5 h. Αυτό δεν συμβαίνει γιατί όπως φαίνεται και από το **Σχήμα 10** το δείγμα της 1,5 h – 1 U παρουσιάζει μεγάλα σφάλματα στις μετρήσεις, συνεπώς επηρεάζεται και το EC_{50} που προκύπτει από την προσαρμοζόμενη καμπύλη. Οι τιμές των δειγμάτων των 3 και 6 h είναι σχεδόν ίδιες (η απόκλιση μεταξύ τους είναι ελάχιστη και μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκει στο όριο του σφάλματος), που σημαίνει ότι μετά τις 3 h δεν προκύπτει περαιτέρω τροποποίηση των films για το 1 U λακάσης, συνεπώς το ένζυμο έχει απενεργοποιηθεί πλήρως (αν δεν υπήρχε το σφάλμα της 1,5 h ίσως μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι αυτό ισχύει από τη 1,5 h).

Για την μελέτη χρόνου για συγκέντρωση ενζύμου 4 U, οι διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της 1,5 των 3 και των 6 h είναι πολύ μικρές και μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκουν στο όριο του σφάλματος. Αυτό σημαίνει ότι για τα 4 U ενζύμου η δραστηριότητα μετά την 1,5 h είναι ελάχιστη έως μηδενική και γι' αυτή τη συγκέντρωση αρκεί 1,5 h για την επίτευξη της δυνατής τροποποίησης.

Για την μελέτη χρόνου για συγκέντρωση ενζύμου 8 U, όπως και για το 1 U, φαίνεται ότι η τιμή της αντιοξειδωτικής ικανότητας για τις 3 h της αντίδρασης έχει προκύψει από σφάλμα (παρ' όλο που οι τιμές δεν παρουσιάζουν μεγάλη τυπική απόκλιση) καθώς δεν είναι λογικό να έχει προκύψει μεγαλύτερη τροποποίηση κατά τη 1,5 h, ακόμα και αν είχε απενεργοποιηθεί πλήρως το ένζυμο. Αν εξαιρεθεί το συγκεκριμένο, μπορούμε να δούμε ότι υπάρχει αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας από τη 1,5 h στις 6 h. Αυτό σημαίνει ότι ενώ στις προηγούμενες συγκεντρώσεις έχει απενεργοποιηθεί πλήρως το ένζυμο μέχρι τις 6 h, για την μεγαλύτερη συγκέντρωση ένα μέρος του ενζύμου συνεχίζει να δρα. Αν και η τιμή των 3 h δεν ήταν εσφαλμένη θα μπορούσε να ελεγχθεί αν η τροποποίηση ολοκληρώνεται στις 3 ή στις 6 h.

Για την μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου για χρόνο αντίδρασης 30 min, η αντιοξειδωτικότητα του δείγματος 4 U είναι μεγαλύτερη από την από την αντίστοιχη του 1 U, συνεπώς η μεγαλύτερη συγκέντρωση έχει και μεγαλύτερη απόδοση στα 30 πρώτα λεπτά της αντίδρασης. Παρ' όλ' αυτά το δείγμα των 8 U δείχνει μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Αυτό μπορεί να σημαίνει παρεμπόδιση της πρόσβασης του ενζύμου στην πολυμερική επιφάνεια λόγω υψηλής συγκέντρωσης του ενζύμου στο διάλυμα αντίδρασης και συνεπώς μία καθυστέρηση/ μικρότερη απόδοση στην επιφανειακή τροποποίηση.

Για την μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου για χρόνο αντίδρασης 1,5 h, παρατηρείται επίσης μικρότερη απόδοση για τα 8 U σε σχέση με τα 4 (αν και η διαφορά δεν είναι τόσο μεγάλη) και μπορεί να ερμηνευτεί όπως και πιο πάνω, δηλαδή λόγω μεγάλης συγκέντρωσης του ενζύμου να παρατηρείται μία καθυστέρηση στην ανάπτυξη της ενζυμικής τροποποίησης, η οποία όμως έχει μειωθεί σε σχέση με την αντίστοιχη των 30 min. (Έχει ήδη αναφερθεί ότι η τιμή του 1 U θεωρείται εσφαλμένη και δεν λαμβάνεται υπόψιν).

Για την μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου για χρόνο αντίδρασης 3 h, εξαιρώντας την εσφαλμένη τιμή των 8 U, φαίνεται ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα είναι ίδια για το 1 U και για τα 4 U (διαφορά στο όριο του σφάλματος). Αυτό σημαίνει ότι για τη συγκεκριμένη διάρκεια αντίδρασης η απόδοση της τροποποίησης είναι ίδια και σύμφωνα και με ότι έχει ειπωθεί για τη μελέτη χρόνου αυτό συμβαίνει λόγω πλήρους απενεργοποίησης του ενζύμου.

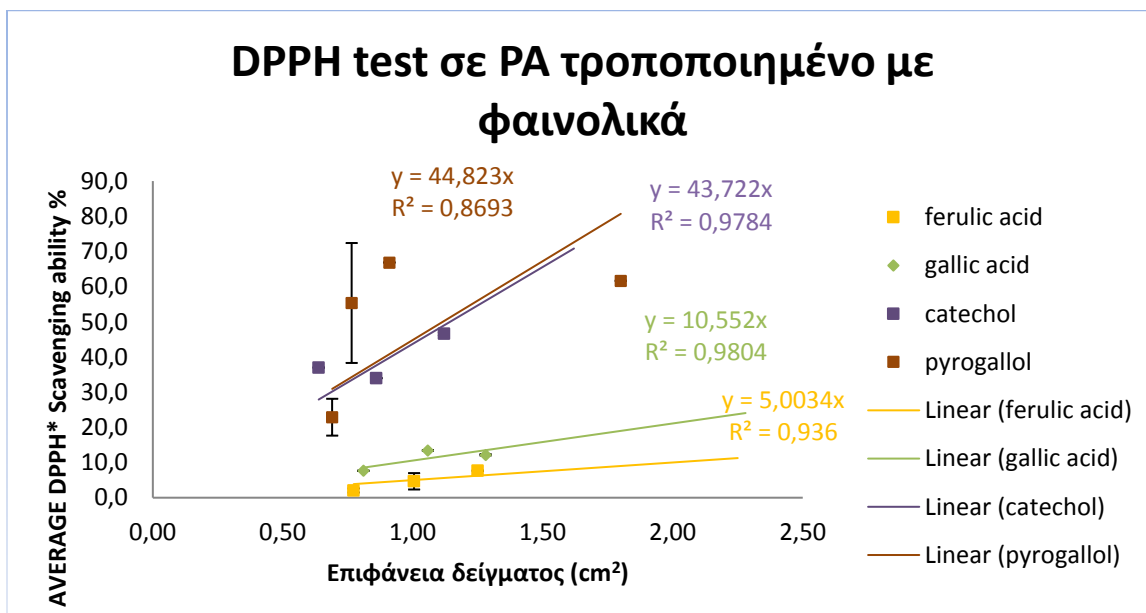
Τέλος, για την μελέτη συγκέντρωσης ενζύμου για χρόνο αντίδρασης 6 h, παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου αυξάνεται και η απόδοση της επιφανειακής τροποποίησης καθώς έχει αυξηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα (αν και οι διαφορές είναι σχετικά μικρές). Αυτό συμβαίνει γιατί, όπως έχει αναφερθεί και πιο πάνω, μεγαλύτερη συγκέντρωση του ενζύμου διατηρεί για περισσότερη ώρα την ενεργότητά της και συνεπώς καταλύει σε μεγαλύτερο βαθμό την αντίδραση.

7.2 PA

7.2.1 1^{ος} κύκλος

Όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 5.10.2 μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα των PA υφασμάτων μετά από υδρόλυση, προεπεξεργασία και επιφανειακή ενζυμική τους τροποποίηση για τις διάφορες χρησιμοποιούμενες φαινολικές ενώσεις.

Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού τεστ σε διάγραμμα, καθώς και πίνακας με τα EC_{50} ανά περίπτωση.



Σχήμα 17: DPPH test σε PA μετά από υδρόλυση, προεπεξεργασία και τροποποίηση με τις φαινολικές ενώσεις

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mg αλκαλάσης/γρ υφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25 °C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακτάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h

***Σημείωση:**

Πρέπει να αναφερθεί ότι υπήρχε περιορισμένη ποσότητα τυροσόλης διαθέσιμη για την διεξαγωγή των πειραμάτων του 1^{ου} κύκλου και επιλέχθηκε τα διαθέσιμα δείγματα να αποσταλούν για τα αντιμικροβιακά τεστ. Συνεπώς δεν διενεργήθηκε αντιοξειδωτικό τεστ για τα δείγματα της τυροσόλης των PA υφασμάτων.

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης 1^{ου} κύκλου για PA υφάσματα – εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mg αλκαλάσης/βυφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h

Δείγμα PA	EC ₅₀ (cm ²)
Ferulic acid	9,99
Gallic acid	4,74
Catechol	1,14
Pyrogallol	1,12
Tyrosol	-

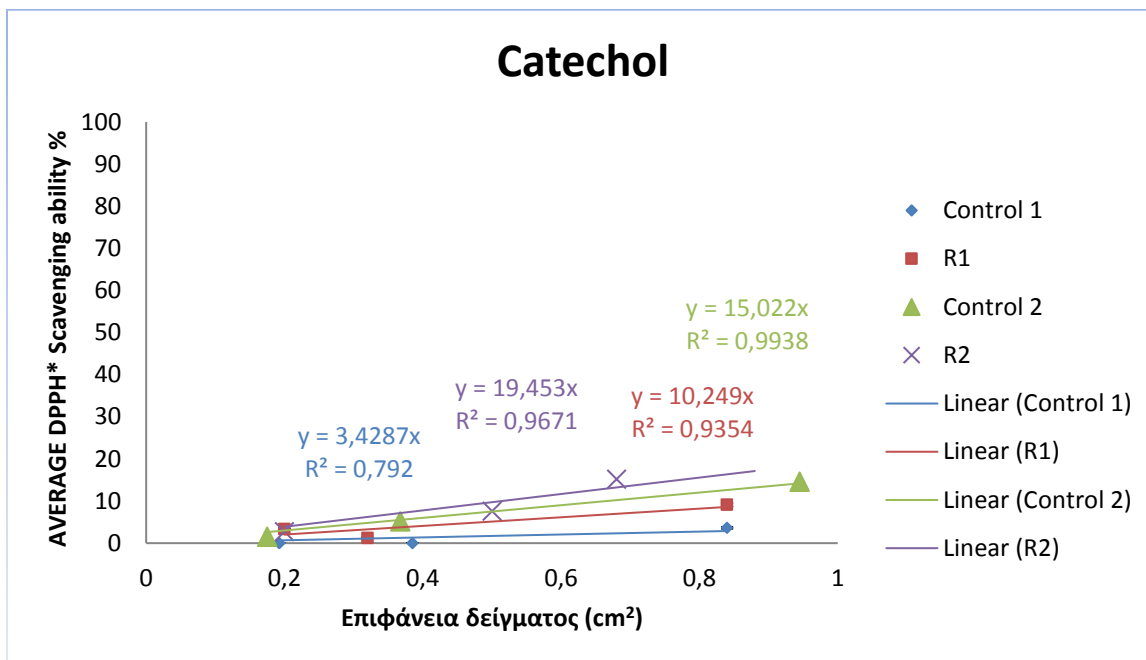
Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 6** και για τα πολυαμιδικά υφάσματα την καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα την εμφανίζουν οι φαινολικές ενώσεις της κατεχόλης και τις πυρογαλόλης, όπως παρατηρήθηκε και για τα PLA films.

Αξίζει να γίνει μία σύγκριση με τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τα PLA films. Αν συγκριθούν με τα δείγματα PLA με προεπεξεργασία 30 min με EDA, φαίνεται ότι για το δείγμα του φερουλικού οξέος το PLA δείχνει καλύτερη αντιοξειδωτικότητα. Αντιθέτως, για το γαλλικό οξύ τα PA δείχνουν καλύτερα αποτελέσματα στο DPPH test (το PLA χρειάζεται παραπάνω από τη διπλάσια επιφάνεια για να επιτευχθεί το ίδιο αποτέλεσμα). Το δείγμα της κατεχόλης παρουσιάζει σχεδόν ίδια τιμή και για τα 2 υλικά, ενώ το δείγμα της πυρογαλόλης παρουσιάζει καλύτερη αντιοξειδωτική δράση για τα PA. Δείγμα σύγκρισης για την τυροσόλη, όπως έχει ήδη αναφερθεί δεν υπάρχει.

Αν γίνει σύγκριση με τα δείγματα PLA προεπεξεργασίας 1 h με EDA, τα πολυεστερικά δείγματα για όλες τις φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτικότητα.

7.2.2 2^{ος} κύκλος

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του 1^{ου} κύκλου επιλέχθηκαν η κατεχόλη και η πυρογαλόλη για την διεξαγωγή των πειραμάτων του 2^{ου}. Παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα του αντιοξειδωτικού τεστ σε διάγραμμα, καθώς και πίνακας με τα EC₅₀ ανά περίπτωση.



Σχήμα 18: DPPH test σε PA τροποποιημένο με catechol – 2^{ος} κύκλος

Control 1: Επιφανειακά τροποποιημένο με catechol μη προεπεξεργασμένο PA ύφασμα χωρίς την παρουσία της λακάσης.

Control 2: αντίδραση catechol (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PA ύφασμα (μη προεπεξεργασμένο) για 3h στους 60 °C.

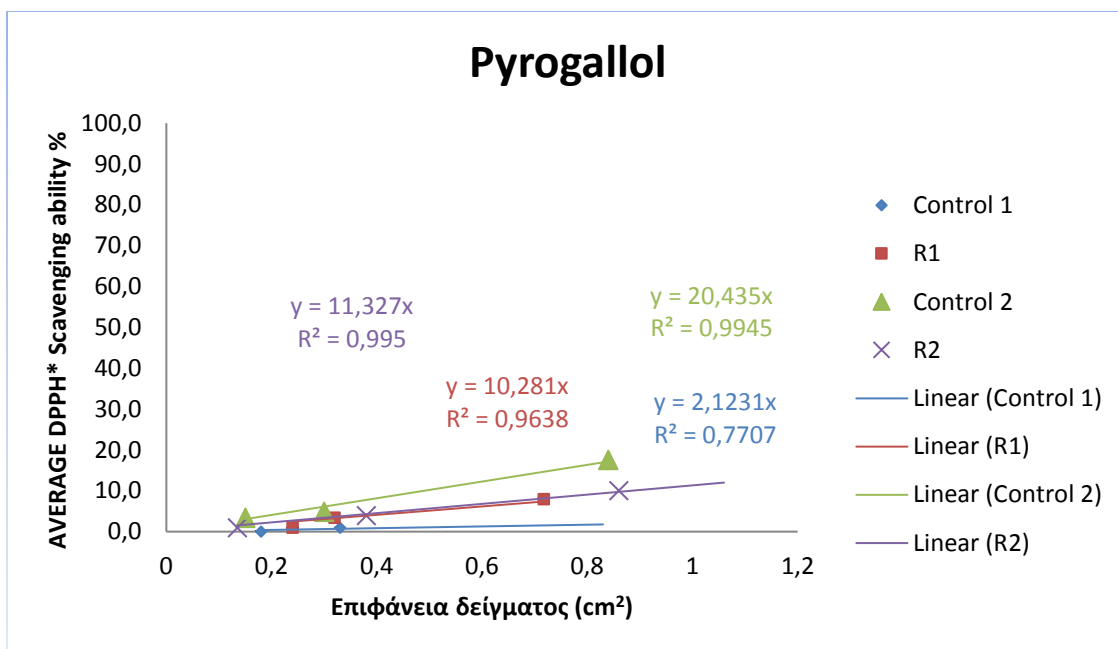
R1: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA (μη προεπεξεργασμένο) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις παρακάτω συνθήκες.

R2: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA προεπεξεργασμένου (υδρόλυση και προεπεξεργασία) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις παρακάτω συνθήκες.

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mg_{λακάσης}/g_{υφάσματος} για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{catechol} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h



Σχήμα 19: DPPH test σε PA τροποποιημένο με pyrogallol – 2^{ος} κύκλος

Control 1: Επιφανειακά τροποποιημένο με pyrogallol μη προεπεξεργασμένο PA ύφασμα χωρίς την παρουσία της λακάσης.

Control 2: αντίδραση pyrogallol (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PA ύφασμα (μη προεπεξεργασμένο) για 3h στους 60 °C.

R1: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA (μη προεπεξεργασμένο) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις παρακάτω συνθήκες.

R2: δείγμα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης PA προεπεξεργασμένου (υδρόλυση και προεπεξεργασία) με την παρουσία της λακάσης (4 U) στις παρακάτω συνθήκες.

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mgαλκαλάσης/γυφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{pyrogallol} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης 2^{ου} κύκλου για PA υφάσματα – εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mgαλκαλάσης/γυφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, t_{αντίδρασης} = 3 h

Δείγμα PA		EC ₅₀ (cm ²)
Catechol	Control 1	14,58
	Control 2	3,33
	R1	4,88
	R2	2,57
Pyrogallol	Control 1	23,55
	Control 2	2,45
	R1	4,86
	R2	4,41

Όπως φαίνεται, τα control 1 δείγματα και για τις δύο φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα. Σε σύγκριση με τα Control 2, και καθώς αυτή η τάξη διαφοράς δεν εμφανίζεται για τα αντίστοιχα δείγματα PLA, μπορεί να υποθεθεί ότι οφείλεται σε φυσική προσρόφηση των κινονών και ολιγο-/πολυμερών που προκύπτουν από την οξειδωτική δράση της λακάσης στο ύφασμα λόγω του μεγαλύτερου όγκου τους από το μονομερές της φαινολικής ένωσης, καθώς και στην ύφανση του υφάσματος που δημιουργεί σημεία κατάλληλα στην επιφάνειά του για να συμβεί κάτι τέτοιο. Ενδεχομένως, να έπρεπε να πραγματοποιηθούν πολύ περισσότερες εκπλύσεις στο ύφασμα για την όσο το δυνατόν μεγαλύτερη (αν όχι πλήρη) απομάκρυνση των μη χημικά συνδεδεμένων μορίων στη επιφάνειά του.

Πολύ σημαντικό είναι να παρατηρηθεί ότι και για τις δύο φαινολικές ενώσεις το δείγμα R1 παρουσιάζει μικρότερη αντιοξειδωτικότητα από το αντίστοιχο Control 2, κάτι που δεν ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν στα PLA. Αυτό μπορεί να υποθεθεί πως οφείλεται στην δράση που καταλύει το ένζυμο στις δύο περιπτώσεις. Καθώς για τα Control 2 το ένζυμο δρα χωρίς την παρουσία του πολυμερούς, καταλύει τις αντιδράσεις οξείδωσης και πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων όπως έχει αναφερθεί σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Zerva *et al.*, 2016). Στην περίπτωση όμως των δειγμάτων R, το ένζυμο καταλύει και τις αντιδράσεις οξείδωσης και πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων (όπως στα Control 2) αλλά και την επιφανειακή τροποποίηση των επιφανειακών υδροξ- και αμινομάδων με τις φαινολικές ενώσεις και τα παράγωγά τους από την παραπάνω αντίδραση (κινόνες και ολιγο-/πολυμερή). Αυτό πιθανότατα οδηγεί σε παραγωγή μικρότερης ποσότητας πολυμερών των φαινολικών ενώσεων ή και σε παραγωγή πολυμερών μικρότερου μεγέθους τα οποία όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω κατά πάσα πιθανότητα παγιδεύονται στο ύφασμα και αυξάνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα που εμφανίζει.

Τέλος, αξίζει να παρατηρηθεί ότι τα δείγματα R2, που έχουν υποστεί υδρόλυση και προεπεξεργασία, εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτικότητα και για τις δύο φαινολικές ενώσεις από τα μη προεπεξεργασμένα. Αυτό είναι αναμενόμενο καθώς, όπως έχει αναφερθεί και στην παράγραφο 5.9.2, με την υδρόλυση και την προεπεξεργασία προστίθενται στην επιφάνεια του υφάσματος αμινομάδες που εξέχουν από τον κύριο όγκο της επιφάνειας, και συνεπώς είναι πιο διαθέσιμες για αντίδραση, καθώς και αυξάνεται ο αριθμός των αμινομάδων της επιφάνειας του υφάσματος. Αυτό σημαίνει και μεγαλύτερη τροποποίηση με τις φαινολικές ενώσεις και τα παράγωγά τους που αποτυπώνεται και στις τιμές του EC_{50} . Βέβαια, δεν φαίνεται ίδιος ο βαθμός μείωσης των EC_{50} και για τις δύο φαινολικές ενώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται τόσο στην παγίδευση των κινονών και ολιγο-/πολυμερών που αναφέρθηκε παραπάνω ότι πιθανότατα συμβαίνει, όσο και στην αντιοξειδωτική ικανότητα ου παρουσιάζουν αυτές οι ενώσεις (μπορεί δηλαδή οι παραγόμενες πολυκατεχόλες να δεσμεύουν περισσότερες ρίζες DPPH από την πουρπουρογαλλίνη – το διμερές παράγωγο της πυρογαλόλης που θεωρείται ότι δημιουργείται από τη δράση της λακάσης (Zerva *et al.*, 2016)).

Όμως, οι τιμές EC_{50} των δειγμάτων R2 του 2^{ου} κύκλου είναι πολύ μεγαλύτερες των αντίστοιχων τιμών του 1^{ου} κύκλου (μικρότερη αντιοξειδωτικότητα), αυτό δεν είναι επιθυμητό και αναμενόμενο και μάλλον οφείλεται σε μη επαρκή έκπλυση των δειγμάτων του 1^{ου} κύκλου και στην συνεπάγουσα προαναφερθείσα παγίδευση.

8 Μελέτη αντιμικροβιακής ικανότητας επιφανειακά ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

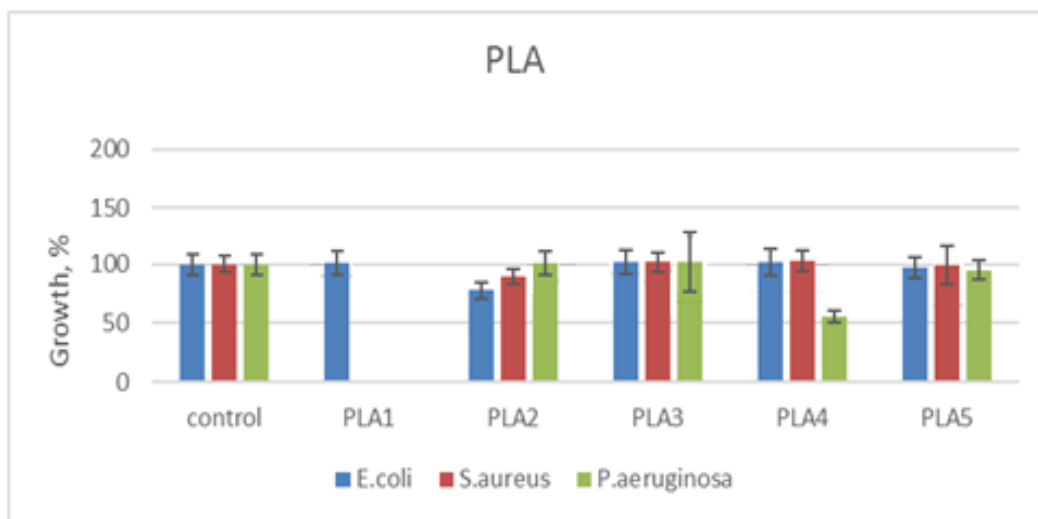
Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των πολυμερικών υλικών (films PLA και ύφασμα PA) ελέγχθηκε πάνω σε μια ομάδα οργανισμών (*Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* NCTC11994 και *Pseudomonas aeruginosa* PAO1). Το πρωτόκολλο του αντιμικροβιακού ελέγχου που ακολουθήθηκε έχει αναφερθεί στην παράγραφο 5.12 και παρακάτω εμφανίζονται τα αποτελέσματα.

8.1 PLA

Για τα πολυεστερικά films έγινε επανάληψη των πειραμάτων του 1^{ου} κύκλου της παραγράφου 5.10.1, για διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 30 min, καθώς και των πειραμάτων του 2^{ου} κύκλου, για διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 1 h, με σκοπό την διεξαγωγή του αντιμικροβιακού τεστ.

*Σημείωση:

Πρέπει να αναφερθεί ότι τα δείγματα Control είχαν αρκετά βακτήρια στην επιφάνειά τους, και ο καθαρισμός με αιθανόλη δεν βοήθησε αρκετά στην εξουδετέρωσή τους. Αυτό λήφθηκε υπόψιν στα αποτελέσματα. Επίσης, να αναφερθεί ότι το δείγμα του φερουλικού οξέος ελέγχθηκε μόνο έναντι του *E. Coli*.



Σχήμα 20: Αντιμικροβιακό test σε τροποποιημένα films PLA έναντι των οργανισμών *E. coli*, *S. aureus* και *P. aeruginosa*

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 30 min με 8 % v/v με EDA σε EtOH, 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: C_{Iaccase} = 4 U, C_{φαινολικής ένωσης} = 40 mM, pH = 6, T = 60 °C, τ_{αντίδρασης} = 3 h

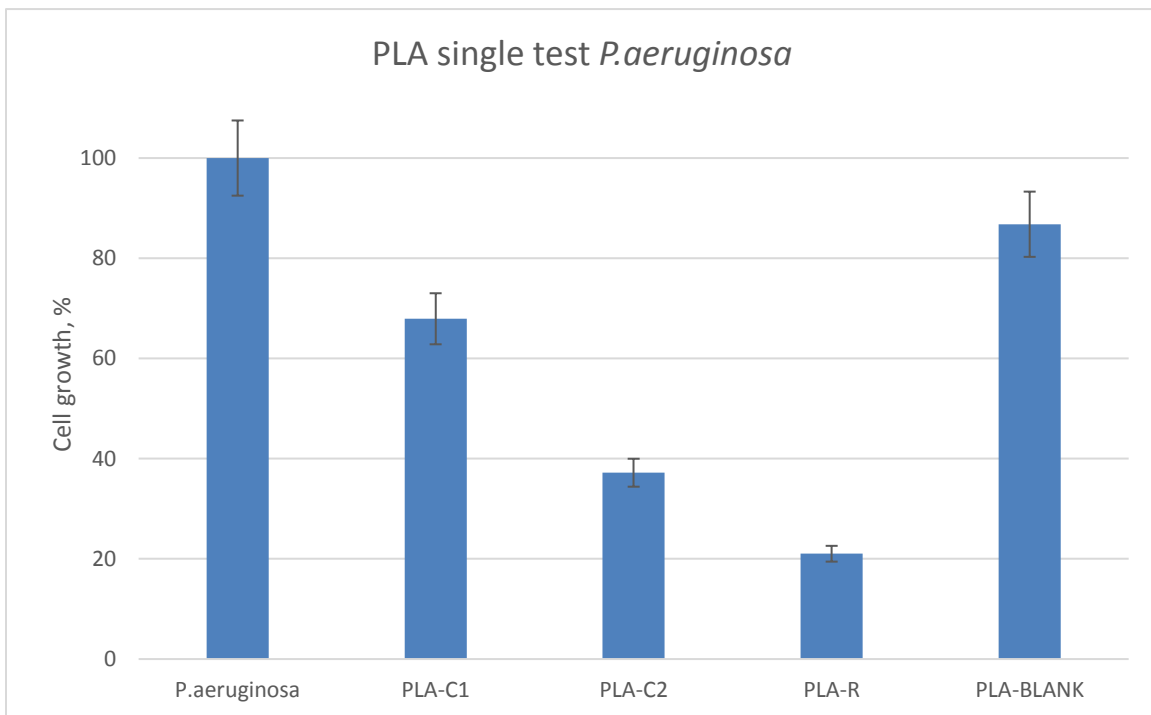
Δείγματα: **PLA1** = τροποποιημένο με ferulic acid, **PLA2** = τροποποιημένο με gallic acid, **PLA3** = τροποποιημένο με catechol, **PLA4** = τροποποιημένο με pyrogallol, **PLA5** = τροποποιημένο με tyrosol

Από το **Σχήμα 20** φαίνεται ότι το δείγμα του γαλλικού οξέος εμφάνισε περίπου 20 % λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για το *E. coli* και 10 % για το *S. aureus*, ενώ το δείγμα της πυρογαλόλης έδειξε **44 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για *P. aeruginosa*.

Εφόσον τη μεγαλύτερη (και μόνη σημαντική) αντιμικροβιακή ιδιότητα δείχνει το δείγμα της πυρογαλόλης έναντι του *P. aeruginosa*, τα πειράματα του 2^{ου} κύκλου που διεξήχθησαν για τον έλεγχο της αντιμικροβιακότητας έγιναν αυτή τη φορά για την ένωση της πυρογαλόλης και όχι της κατεχόλης.

***Σημείωση:**

Τα δείγματα είχαν μερικά βακτήρια. Η γραμμή σφάλματος ορίστηκε αυθαίρετα μεταξύ 5 - 10%.



Σχήμα 21: Αντιμικροβιακό test σε PLA films τροποποιημένα με pyrogallol έναντι του οργανισμού *P. aeruginosa*

PLA-blank = σκέτο PLA film προεπεξεργασμένο με EDA

PLA-C1 = Επιφανειακά τροποποιημένο με pyrogallol προεπεξεργασμένο PLA film χωρίς την παρουσία της λακάσης

PLA-C2 = αντίδραση pyrogallol (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PLA film (προεπεξεργασμένο με EDA) για 3h στους 60 °C.

PLA-R = Ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο PLA με pyrogallol (προεπεξεργασμένο με EDA)

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 1 h με 8 % v/v με EDA σε EtOH, 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφ. τροποποίησης: $C_{\text{laccase}} = 4 \text{ U}$, $C_{\text{pyrogallol}} = 40 \text{ mM}$, $\text{pH} = 6$, $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$, $t_{\text{αντίδρασης}} = 3 \text{ h}$

Όπως φαίνεται από το **Σχήμα 21**, το δείγμα του σκέτου προεπεξεργασμένου film PLA (PLA-blank) προκαλεί και αυτό μια παρεμπόδιση στην ανάπτυξη του *P. aeruginosa* της τάξης του 13%, πιθανότατα λόγω της παρουσίας της EDA. Το PLA-C1² παρουσιάζει μείωση της ανάπτυξης κατά 32 %. Και με αυτόν τον τρόπο αποδεικνύεται ξανά η επιφανειακή τροποποίηση της επιφάνειας του προεπεξεργασμένου PLA film χωρίς την παρουσία της λακάσης. Εξαιτίας της χημικώς προσδεμένης στην επιφάνεια του film πυρογαλόλης παρατηρείται αύξηση στην αντιμικροβιακή ικανότητα του σε σχέση PLA-blank περίπου κατά 20 %. Το PLA-C2 εμφανίζει μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά 63 %, αρκετά καλή αντιμικροβιακή ιδιότητα, που οφείλεται στην πρόσδεση στην επιφάνεια του film πλέον και ολιγο-/πολυμερών της πυρογαλόλης (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αναμένουμε σίγουρα το διμερές της πυρογαλόλης, την πουργουρογαλλίνη) τα οποία όπως φαίνεται εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακότητα. Και τέλος, το δείγμα R της ενζυμικά υποβοηθούμενης επιφανειακής τροποποίησης εμφανίζει την καλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα (όπως είναι αναμενόμενο) με μόλις **21 %** ανάπτυξη των κυττάρων. Αυτό μπορεί να υποτεθεί πως συμβαίνει τόσο γιατί η λακάση αυξάνει την απόδοση της επιφανειακής τροποποίησης όσο και γιατί προσδένονται στην πολυμερική επιφάνεια όχι μόνο μόρια πυρογαλόλης αλλά και πουργουρογαλλίνης ή άλλων παράγωγων κινονών και ολιγο-/πολυμερών της πυρογαλόλης, που ενδεχομένως εμφανίζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακότητα από αυτή.

8.2 PA

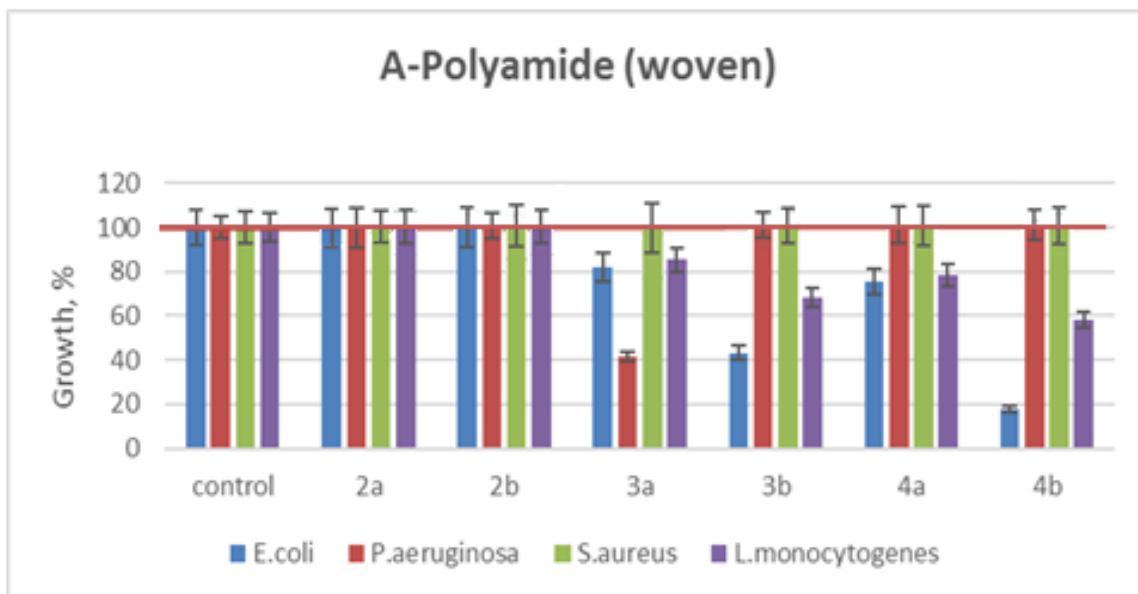
Για τα πολυαμιδικά υφάσματα έγινε επανάληψη των πειραμάτων του 1^{ου} κύκλου της παραγράφου **5.10.2**, καθώς και των πειραμάτων του 2^{ου} κύκλου με σκοπό την διεξαγωγή του αντιμικροβιακού τεστ, τόσο για προεπεξεργασμένα όσο και μη υφάσματα. Να αναφερθεί ότι δεν διενεργήθηκαν λόγω έλλειψης αντιδραστηρίων έλεγχοι για τις ενώσεις του φερουλικού οξέος και της τυροσόλης.

Τα δείγματα του 1^{ου} κύκλου είναι τα εξής :

Δείγμα PA

Control	ατροποιοίτητο ύφασμα
2a	τροποποιημένο με γαλλικό οξύ
2b	Προεπεξεργασμένο και έπειτα ενζυμικά τροποποιημένο με γαλλικό οξύ
3a	τροποποιημένο με κατεχόλη
3b	Προεπεξεργασμένο και έπειτα ενζυμικά τροποποιημένο με κατεχόλη
4a	τροποποιημένο με πυρογαλόλη
4b	Προεπεξεργασμένο και έπειτα ενζυμικά τροποποιημένο με πυρογαλλόλη

² C1 = Control 1 και C2 = Control 2



Σχήμα 22: Αντιμικροβιακό test σε τροποποιημένα PA υφάσματα έναντι των οργανισμών *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* και *L. monocytogenes*

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mg αλκαλάσης/βυφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακτάσης} = 4 U, τ_{αντίδρασης} = 3 h

Δείγματα: **2a** = τροποποιημένο με gallic acid, **2b** = προεπεξεργασμένο και επιφανειακά τροποποιημένο με gallic acid,

3a = τροποποιημένο με catechol, **3b** = προεπεξεργασμένο και επιφανειακά τροποποιημένο με catecho,

4a = τροποποιημένο με pyrogallol, **4b** = προεπεξεργασμένο και επιφανειακά τροποποιημένο με pyrogallol

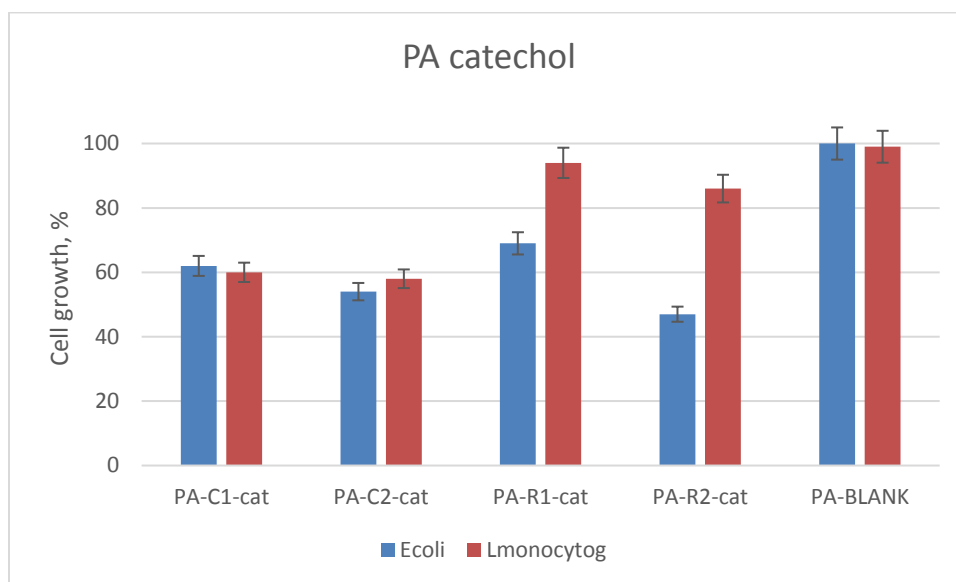
Από το παραπάνω σχήμα παρατηρείται ότι η καλύτερη αντιμικροβιακή δράση παρουσιάστηκε κατά των οργανισμών *E. coli* και *L. monocytogenes*, ενώ δεν ανιχνεύτηκε καθόλου δραστηριότητα έναντι του *S. aureus*. Ως προς τον *P. aeruginosa* αντιμικροβιακή δράση δείχνει μόνο το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης. Τα δείγματα που τροποποιήθηκαν με κατεχόλη και πυρογαλλόλη ήταν τα πιο ενεργά ενώ η τροποποίηση με γαλλικό οξύ δεν έδειξε αποτέλεσμα στις δεδομένες συνθήκες.

Συγκεκριμένα, για το *E. coli* το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης δείχνει περίπου 20 % μικρότερη ανάπτυξη κυττάρων, ενώ το προεπεξεργασμένο δείγμα δείχνει 57 % μικρότερη ανάπτυξη κυττάρων. Συνεπώς όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς η προεπεξεργασία προσφέρει τη δυνατότητα για μεγαλύτερη απόδοση της ενζυμικής τροποποίησης λόγω των επιπλέον αμινομάδων που προέκυψαν από αυτήν, το προεπεξεργασμένο ύφασμα δείχνει αρκετά μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από το μη επεξεργασμένο. Το ίδιο παρατηρείται και για τα δείγματα που τροποποιήθηκαν με πυρογαλλόλη. Το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της πυρογαλλόλης δείχνει περίπου 25 % μικρότερη ανάπτυξη κυττάρων, ενώ το προεπεξεργασμένο δείγμα δείχνει 82 % μικρότερη ανάπτυξη κυττάρων.

Ως προς τον *P. aeruginosa* αντιμικροβιακή δράση δείχνει μόνο το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης και μάλιστα η ανάπτυξη των κυττάρων μειώνεται κατά 58 %. Καθώς, όμως το αντίστοιχο προεπεξεργασμένο δείγμα δεν παρουσιάζει καθόλου αντιμικροβιακότητα, μάλλον οφείλεται σε μόλυνση του δείγματος.

Για το *L. Monocytogenes*, τα δείγματα κατεχόλης παρουσιάζουν μείωση κατά 15 % και 32 % στην ανάπτυξη των κυττάρων για το μη προεπεξεργασμένο και το προεπεξεργασμένο δείγμα αντίστοιχα, όπως ήταν αναμενόμενο. Το ίδιο συμβαίνει και για τα δείγματα πυρογαλόλης, όπου το μη προεπεξεργασμένο δείχνει μείωση των αναπτυσσόμενων κυττάρων κατά 21 %, ενώ το προεπεξεργασμένο 42 %.

Εφόσον τα δείγματα της κατεχόλης και πυρογαλόλης έδειξαν τα καλύτερα αποτελέσματα, ο 2^{ος} κύκλος αντιμικροβιακού test έγινε για τις δύο αυτές φαινολικές ενώσεις και μόνο έναντι των μικροοργανισμών στους οποίους έδειξαν δραστηριότητα (*L. Monocytogenes* και *E. coli*).



Σχήμα 23: Αντιμικροβιακό test σε PA υφάσματα τροποποιημένα με catechol έναντι των οργανισμών *E. coli*, *L. monocytogenes*

PA-blank = σκέτο PA ύφασμα

PA-C1 = Επιφανειακά τροποποιημένο με catechol μη προεπεξεργασμένο PA ύφασμα χωρίς την παρουσία της λακάσης

PLA-C2 = αντίδραση catechol (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PA ύφασμα (μη προεπεξεργασμένο) για 3h στους 60 °C.

PA-R1-cat= Ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο PA ύφασμα με catechol (μη προεπεξεργασμένο)

PA-R2-cat= Ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο PA ύφασμα με catechol (προεπεξεργασμένο)

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mg αλκαλάσης/βυφάσματος για 24 h.

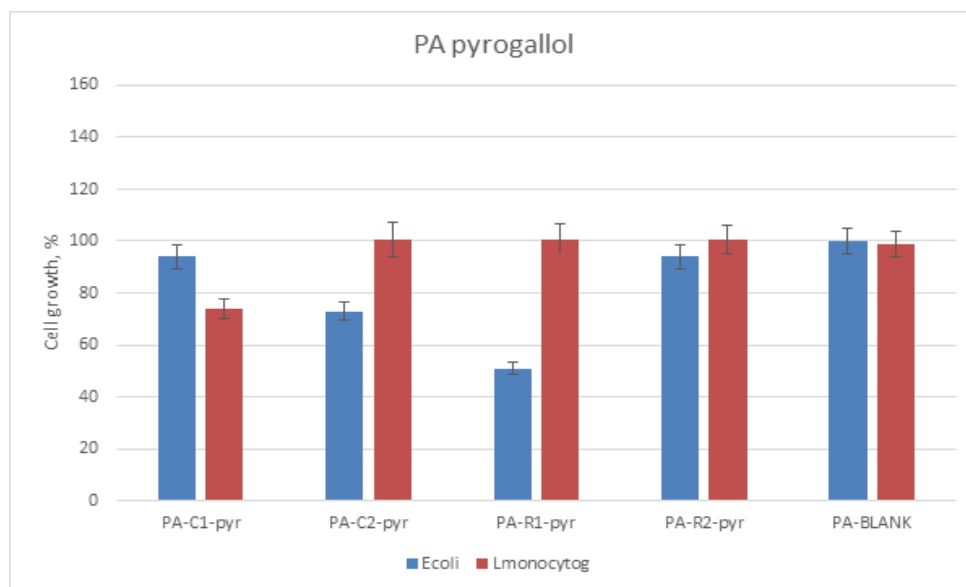
Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, Cφαινολικών = 40 mM, Cλακάσης = 4 U, ταντίδρασης = 3 h

Για το δείγμα της κατεχόλης και τον οργανισμό *E. coli* τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα εκτός από το δείγμα της ενζυμικής τροποποίησης σε μη προεπεξεργασμένο ύφασμα PA-R1 που παρουσιάζει την μικρότερη μείωση στην ανάπτυξη κυττάρων (31%) . Δηλαδή, το PA-C1 παρουσιάζει μείωση της ανάπτυξης κατά 38 %. Το PA-C2 εμφανίζει μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά 46 %, που οφείλεται στην πρόσδεση στην επιφάνεια του

film πλέον και ολιγο-/πολυμερών της κατεχόλης τα οποία όπως φαίνεται εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακότητα. Και τέλος, το δείγμα PA-R2 της ενζυμικά υποβοηθούμενης επιφανειακής τροποποίησης σε προεπεξεργασμένο ύφασμα εμφανίζει την καλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα (όπως είναι αναμενόμενο) με μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων κατά 53%. Η μη αναμενόμενη τιμή του PA-R1 πιθανότατα οφείλεται σε μόλυνση του δείγματος.

Κάτι αντίστοιχο παρατηρείται και για τον οργανισμό *L. monocytogenes*. Μόνο που σ' αυτήν την περίπτωση και το δείγμα της αντίδρασης στο προεπεξεργασμένο ύφασμα παρουσιάζει μεγαλύτερη τιμή από τα αντίστοιχα Control δείγματα. Συγκεκριμένα, η μείωση της ανάπτυξης των κυττάρων για τα δείγματα είναι για το PA-C1 40 %, για το PA-C2 42 %, για το PA-R1 6 % και για το PA-R2 14 %.



Σχήμα 24: Αντιμικροβιακό test σε PA υφάσματα τροποποιημένα με catechol έναντι των οργανισμών *E. coli*, *L. monocytogenes*

PA-blank = σκέτο PA ύφασμα

PA-C1 = Επιφανειακά τροποποιημένο με pyrogallol μη προεπεξεργασμένο PA ύφασμα χωρίς την παρουσία της λακάσης

PA-C2 = αντίδραση pyrogallol (40 mM) και λακάσης (4 U) για 3h, σε 60 °C και pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της λακάσης) και φυγοκέντρωσή του (για απομάκρυνση των στερεών). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με το PA ύφασμα (μη προεπεξεργασμένο) για 3h στους 60 °C.

PA-R1-cat= Ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο PA ύφασμα με pyrogallol (μη προεπεξεργασμένο)

PA-R2-cat= Ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο PA ύφασμα με pyrogallol (προεπεξεργασμένο)

Συνθήκες υδρόλυσης: pH 8 στους 60 °C με 37,2 mgαλκαλάσης/γυφάσματος για 24 h.

Συνθήκες προεπεξεργασίας: 4% w/w DCC σε EtOH για 3 h 25°C και στη συνέχεια 8% v/v EDA σε EtOH για 3 h σε 25 °C

Συνθήκες ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης: pH 6, 60 °C, C_{φαινολικών} = 40 mM, C_{λακάσης} = 4 U, τ_{αντίδρασης} = 3 h

Για το δείγμα της **πυρογαλόλης** και τον οργανισμό *E. coli* τα αποτελέσματα είναι αναμενόμενα εκτός από το δείγμα της ενζυμικής τροποποίησης σε προεπεξεργασμένο ύφασμα PA-R2 που παρουσιάζει την μικρότερη μείωση στην ανάπτυξη κυττάρων μαζί με το PA-C1 (6%) .

Το PA-C2 εμφανίζει μείωση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού κατά 27 %, που οφείλεται στην πρόσδεση στην επιφάνεια του film πλέον και ολιγο-/πολυμερών της κατεχόμενης τα οποία όπως φαίνεται εμφανίζουν καλύτερη αντιμικροβιακότητα. Και τέλος, το δείγμα PA-R2 της ενζυμικά υποβοηθούμενης επιφανειακής τροποποίησης σε προεπεξεργασμένο ύφασμα εμφανίζει την καλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα (όπως είναι αναμενόμενο) με μείωση στην ανάπτυξη των κυττάρων κατά 49%. Η μη αναμενόμενη τιμή του PA-R1 πιθανότατα οφείλεται σε μόλυνση του δείγματος.

Για τον οργανισμό *L. monocytogenes* το μόνο δείγμα που δείχνει αντιμικροβιακή ιδιότητα είναι το PA-C1 (36 %).

Αξίζει να αναφερθεί, ότι σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Schroeder *et al.*, 2007) ίνες και υφάσματα από λινάρι τροποποιήθηκαν με διάφορες φαινολικές ενώσεις όπως guaiacol, βανιλίνη, φεουλικό οξύ, 2-μεθοξυ-5-νιτροφαινόλη και ελέγχθηκε αντιβακτηριδιακή τους δραστηριότητα έναντι στα *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. Όλες οι φαινολικές ενώσεις, με εξαίρεση το guaiacol και τη βανιλίνη που είχαν πολύ ασθενή δράση, έδειξαν κάποια αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι των *B. Subtilis*, *S. Aureus* ενώ μόνο η 2-μεθοξυ-5-νιτροφαινόλη μπορούσε να μειώσει την ανάπτυξη του *K. Pneumoniae* , αν και όχι σε μεγάλο βαθμό. Τη μεγαλύτερη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα την έδειξαν σε όλες τις περιπτώσεις τα υφάσματα σε σχέση με τις ίνες.

Επίσης, τροποποιημένες μέσω λακάσης χιτοζάνες με γαλλικό οξύ και καφεϊκό οξύ έδειξαν καλή αντιμικροβιακή δράση έναντι των *L. Monocytogenes* και *E. coli* για διάλυμα με pH 4,5 , όταν όμως αυξήθηκε σε 5,5 και 6,5 η δράση αυτή μειώθηκε αρκετά. Σημαντική πληροφορία αποτελεί το γεγονός ότι και το ατροποποίητο υλικό στην συγκεκριμένη περίπτωση έδειξε αντιμικροβιακή δράση. (Božić, Gorgieva and Kokol, 2012)

9 Φασματοσκοπική ανάλυση ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις – Ανάλυση FTIR-ATR

Κάθε μόριο απορροφά μόνο συγκεκριμένες συχνότητες ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στην υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, οι οποίες αντιστοιχούν σε ενεργειακές αλλαγές το εύρος των οποίων περιλαμβάνει τις συχνότητες επιμήκυνσης και κάμψης των δεσμών στα περισσότερα ομοιοπολικά μόρια. Κατά τη διαδικασία της απορρόφησης, αυτές οι συχνότητες της υπέρυθρης ακτινοβολίας, που ταιριάζουν με τις φυσικές συχνότητες δόνησης του μελετώμενου μορίου, απορροφώνται και η απορροφούμενη ενέργεια χρησιμεύει για αύξηση της έντασης των κινήσεων δόνησης των δεσμών στο μόριο.

Καθώς κάθε τύπος δεσμού έχει διαφορετική φυσική συχνότητα δόνησης και καθώς δύο ίδιου τύπου δεσμοί σε δύο διαφορετικές ενώσεις βρίσκονται σε ελαφρώς διαφορετικό περιβάλλον, δύο μόρια διαφορετικής δομής δεν μπορούν ποτέ να έχουν ακριβώς το ίδιο υπέρυθρο φάσμα απορρόφησης. Έτσι το υπέρυθρο φάσμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν το δακτυλικό αποτύπωμα των των μορίων.

Για την παρατήρηση ενδεχόμενων αλλαγών στη δομή της επιφάνειας των τροποποιημένων δειγμάτων σε σχέση με τα ατροποποιημένα υλικά, τα πολυεστερικά films και τα πολυαμιδικά υφάσματα αναλύθηκαν με FTIR-ATR και παρακάτω φαίνονται τα αντίστοιχα γραφήματα απορρόφησης – κυματαριθμών, η ερμηνεία των οποίων έγινε με τη βοήθεια της απαραίτητης βιβλιογραφίας. (Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, 2001)

9.1 PLA

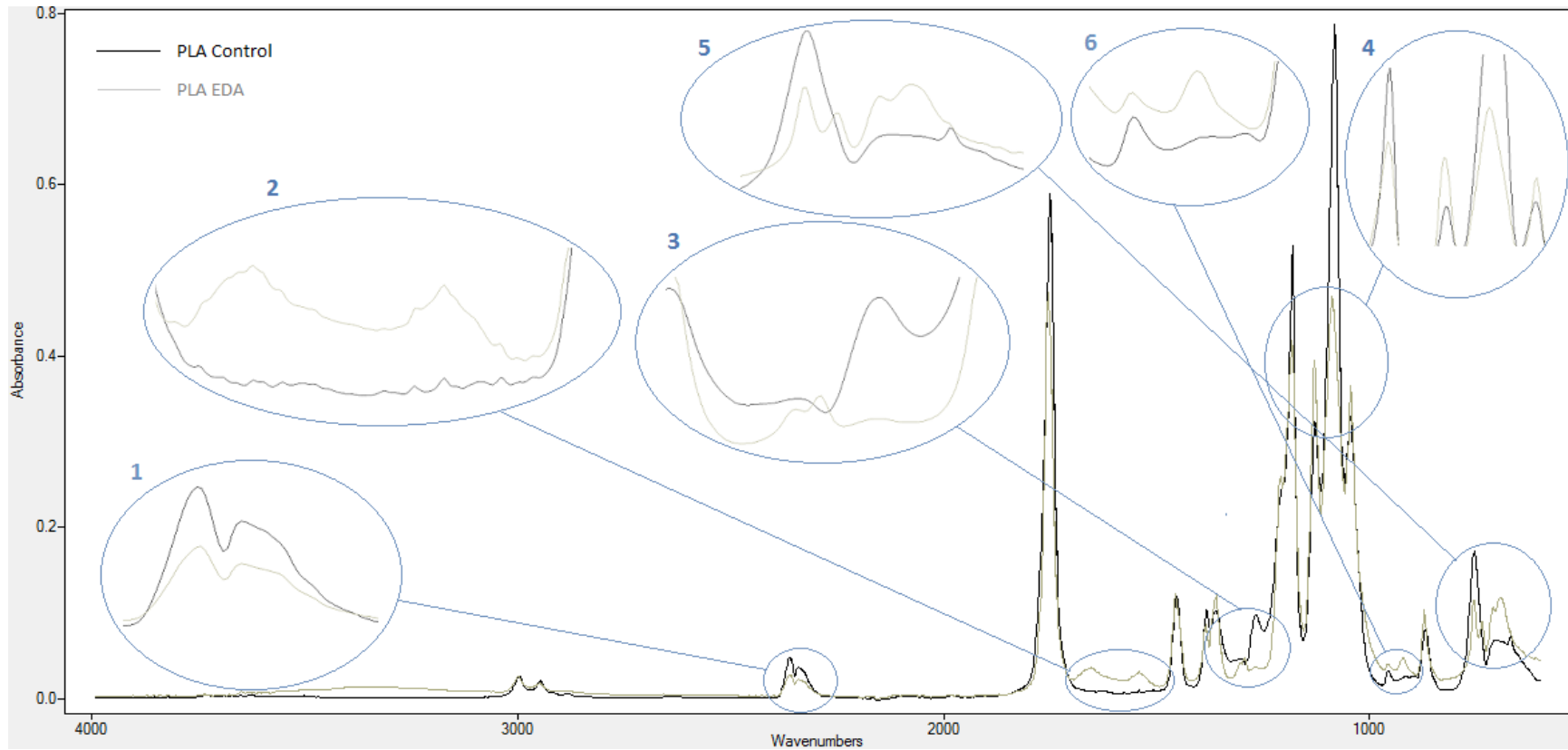
Για τα PLA films παρουσιάζονται παρακάτω δύο γραφήματα απορρόφησης από την FTIR-ATR ανάλυση: το πρώτο είναι για την σύγκριση του μη επεξεργασμένου δείγματος (Control) με το προεπεξεργασμένο με EDA δείγμα (Control EDA) και το δεύτερο είναι για τη σύγκριση του προεπεξεργασμένου με EDA δείγματος (Control EDA) με τα τροποποιημένα με τις διάφορες φαινολικές ενώσεις δείγματα.

Όλα τα δείγματα του PLA παρουσιάζουν λόγω της δομής τους κορυφές απορρόφησης σε συγκεκριμένες συχνότητες. Συγκεκριμένα, στα 1749 cm^{-1} υπάρχει η κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί στις δονήσεις επιμήκυνσης της ομάδας του καρβονυλίου C=O, στα 2995 cm^{-1} και στα 2945 cm^{-1} είναι οι κορυφές λόγω των δονήσεων επιμήκυνσης του ασύμμετρου και συμμετρικού –CH₃ αντίστοιχα, στα 1082 cm^{-1} είναι η κορυφή λόγω της επιμήκυνσης του C–O (σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, 2001) στην περιοχή $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$ εμφανίζονται παραπάνω από μία κορυφές απορρόφησης λόγω δονήσεων επιμήκυνσης του C–O όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχήματα, με μεγαλύτερη την κορυφή στα 1082 cm^{-1}), στα 1453 cm^{-1} και 1360 cm^{-1} είναι οι κορυφές λόγω δονήσεων κάμψης του ασύμμετρου και συμμετρικού

– CH₃ αντίστοιχα. Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην βιβλιογραφία. (Chieng *et al.*, 2014),(Choksi and Desai, 2017).

Στο **Σχήμα 25**, για το δείγμα του προεπεξεργασμένου με EDA PLA film, παρατηρείται μια πολύ μικρής έντασης και μεγάλου εύρους κορυφή στα **3342 cm⁻¹** η οποία οφείλεται στις δονήσεις επιμήκυνσης του N-H, στα **1653 cm⁻¹** και **1541 cm⁻¹** εμφανίζονται δύο νέες κορυφές που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του N-H. Στην περιοχή **1350 - 1000 cm⁻¹** αναμένεται η εμφάνιση απορρόφησης λόγω των δονήσεων επιμήκυνσης του δεσμού C-N, επειδή όμως συμπίπτει με την περιοχή απορρόφησης λόγω δονήσεων επιμήκυνσης του C-O παρατηρείται αύξηση σε κάποιες κορυφές για το δείγμα με την EDA (**1129 cm⁻¹** και **1043 cm⁻¹**) και μείωση σε κάποιες άλλες (**1267 cm⁻¹**, **1182 cm⁻¹** και **1082 cm⁻¹**). Παρατηρούνται, επίσης, 3 πολύ μικρές νέες κορυφές: μια στα **921 cm⁻¹**, μία στα **736 cm⁻¹** και μία διπλή στα **710** και **629 cm⁻¹**. Αυτές μπορεί να οφείλονται στις δονήσεις λόγω κάμψης εκτός πεδίου του N-H. Στην περιοχή όμως αυτή εμφανίζει και το PLA κάποιες κορυφές που παρουσιάζουν διαφορά στην απορρόφηση. Οι παραπάνω αυξομειώσεις στις απορροφήσεις οφείλονται στην πρόσδεση της EDA στις καρβοξυλ- και υδροξυλ- ομάδες της επιφάνειας του πολυεστερικού film.

Στο **Σχήμα 26**, παρουσιάζονται οι απορροφήσεις των τροποποιημένων PLA films με τις διάφορες φαινολικές ενώσεις και συγκρίνονται με το δείγμα του ατροποποιημένου αλλά προεπεξεργασμένου με EDA film. Παρατηρείται ότι για όλα τα δείγματα με τις φαινολικές ενώσεις μειώνεται η απορρόφηση όλων των κορυφών σε σχέση με το Control EDA δείγμα. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στον περιορισμό των δονήσεων όλων των δεσμών λόγω της ύπαρξης των φαινολικών ενώσεων και των παραγόντων τους στην επιφάνεια των δειγμάτων, καθώς είναι ογκώδη μόρια που περιέχουν τον φαινολικό δακτύλιο και περιορίζουν την κίνηση των γειτονικών μορίων. Οφείλεται, επίσης, εν μέρει στην δημιουργία του δεσμού των φαινολικών με την EDA και συνεπώς στην «κατανάλωση» των διαθέσιμων N-H δεσμών. Αυτό γίνεται ακόμα πιο εμφανές από τις κορυφές στα **1653 cm⁻¹** και **1541 cm⁻¹** που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του N-H, και, όπως φαίνεται από το FTIR-ATR γράφημα, μειώνονται για τα τροποποιημένα δείγματα. Είναι προφανές, λοιπόν, από την μείωση στην απορρόφηση αυτών των δύο κορυφών, ότι οι φαινολικές ενώσεις προσδένονται στην πολυεστερική επιφάνεια πραγματοποιώντας δεσμούς με την EDA. Παρατηρείται, επίσης, η δημιουργία μιας πολύ μικρής σε ένταση κορυφής στα **1522 cm⁻¹** (Σχήμα 26 [3]) η οποία οφείλεται στις δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου. Η ένταση είναι μικρή τόσο λόγω της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων σε σύγκριση με τον πολυεστέρα, όσο και γιατί όπως αναφέρεται από τη βιβλιογραφία η απορρόφηση αυτού του δεσμού είναι γενικά ασθενής. Παρόμοια συμπεριφορά, παρατηρείται και στη βιβλιογραφία (Ren *et al.*, 2013).



Σχήμα 25: Γράφημα FTIR-ATR για δείγματα PLA films: ακατέργαστο (Control) και προεπεξεργασμένο με EDA

(1): 2360 cm^{-1} και 1267 cm^{-1} Το δείγμα με την EDA παρουσιάζει μείωση στην απορρόφηση.

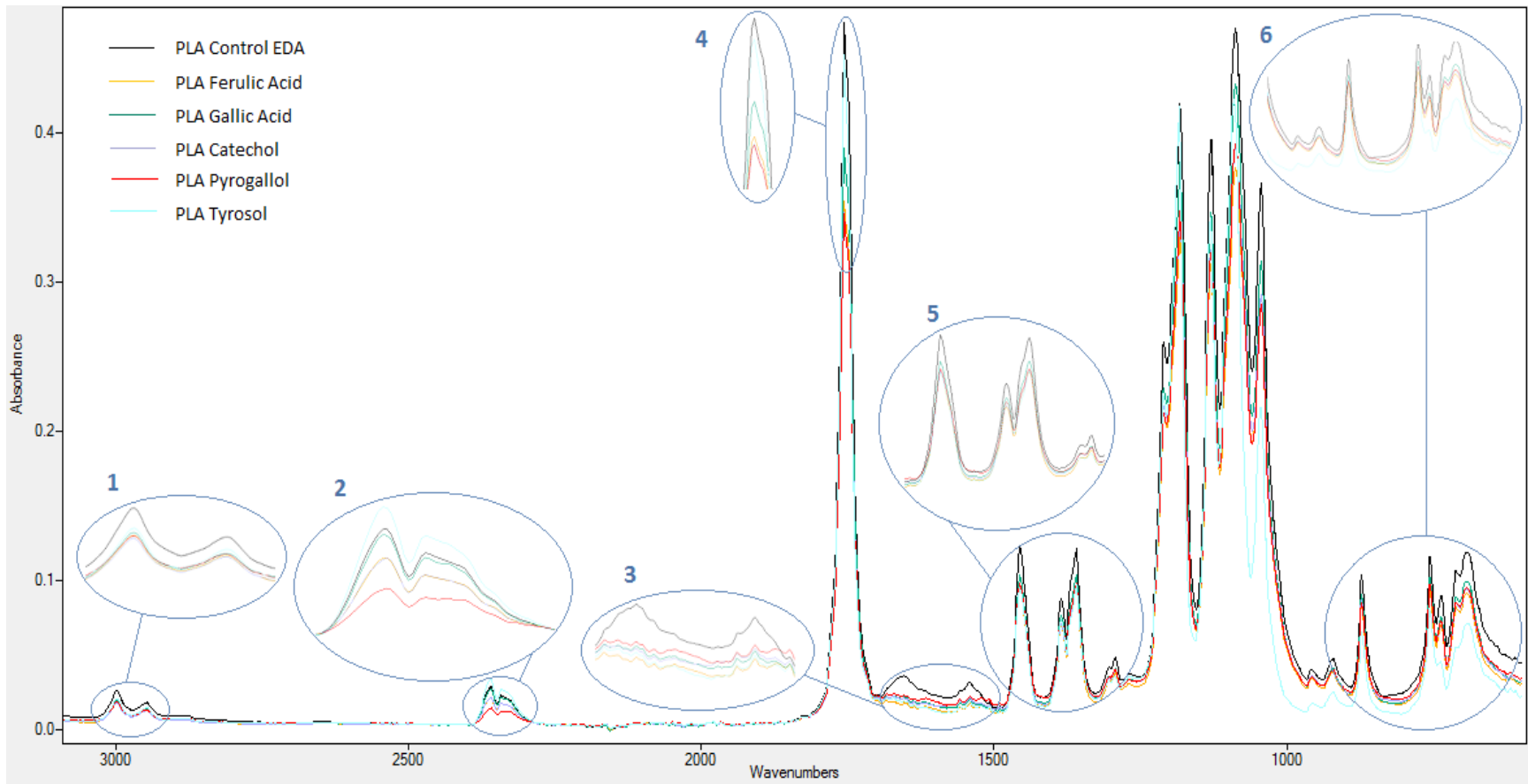
(2): 1653 cm^{-1} και 1541 cm^{-1} Το Control EDA παρουσιάζει 2 νέες κορυφές που δεν υπάρχουν στο μη προεπεξεργασμένο υλικό και οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του N-H.

(3): Το δείγμα με την EDA παρουσιάζει μία νέα πολύ μικρή κορυφή στα 1292 cm^{-1} και μειώνεται αρκετά η κορυφή στα 1267 cm^{-1} του μη προεπεξεργασμένου υλικού.

(4): Παρατηρούνται αυξομειώσεις στις κορυφές του εύρους $1350 - 1000\text{ cm}^{-1}$ στο οποίο συμπίπτουν οι απορροφήσεις λόγω των δονήσεων επιμήκυνσης του δεσμού C-N, και των δονήσεων επιμήκυνσης του C-O

(5): Για το προεπεξεργασμένο με EDA δείγμα παρατηρούνται 3 πολύ μικρές νέες κορυφές: μία στα 736 cm^{-1} και μία διπλή στα 710 και 629 cm^{-1} . Επίσης η κορυφή στα 755 cm^{-1} μειώνεται σε σχέση με το μη προεπεξεργασμένο δείγμα.

(6): Η κορυφή στα 957 cm^{-1} μειώνεται για το δείγμα με την EDA ενώ εμφανίζει και μία νέα μικρή κορυφή στα 921 cm^{-1}



Σχήμα 26: Γράφημα FTIR-ATR για δείγματα PLA films: προεπεξεργασμένο με EDA και τροποποιημένα με τις φαινολικές ενώσεις

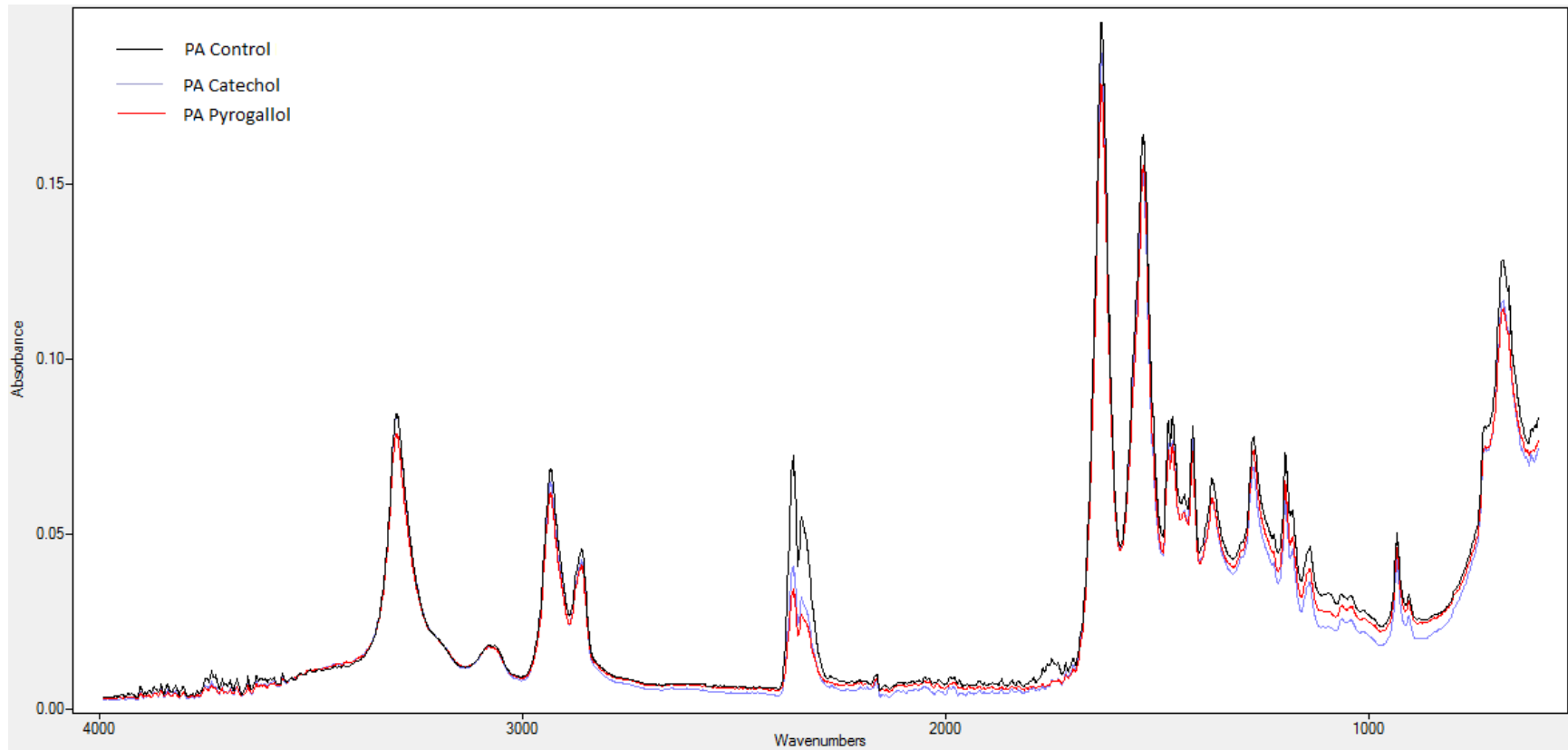
(1): 2995 cm^{-1} και 2945 cm^{-1} οι κορυφές λόγω δονήσεων επιμήκυνσης του ασύμμετρου και συμμετρικού $-\text{CH}_3$ αντίστοιχα. Παρουσιάζουν μείωση στα τροποποιημένα δείγματα
 (2): 2360 cm^{-1} και 1267 cm^{-1} Τα τροποποιημένα δείγματα παρουσιάζουν μείωση στην απορρόφηση
 (3): 1653 cm^{-1} και 1541 cm^{-1} Τα τροποποιημένα δείγματα παρουσιάζουν μείωση σε σύγκριση με το Control EDA των κορυφών που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του N-H. Επίσης, παρατηρείται μία νέα, πολύ μικρής έντασης κορυφή στα 1522 cm^{-1} η οποία οφείλεται στις δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου.
 (4), (5), (6): 1749 cm^{-1} (η κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί στις δονήσεις επιμήκυνσης της ομάδας του καρβονυλίου C=O), 1453 cm^{-1} και 1360 cm^{-1} (οι κορυφές λόγω δονήσεων κάμψης του ασύμμετρου και συμμετρικού $-\text{CH}_3$ αντίστοιχα) και οι κορυφές στην περιοχή $1000 - 600\text{ cm}^{-1}$ αντίστοιχα, μειώνεται για όλες η απορρόφηση στα τροποποιημένα δείγματα σε σχέση με την αντίστοιχη του Control EDA.

9.2 PA

Για τα πολυαμιδικά υφάσματα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος απορρόφησης στην υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος για ακατέργαστο ύφασμα και τροποποιημένο με κατεχόλη και πυρογαλόλη. Στο γράφημα απορρόφησης του FTIR-ATR του Σχήματος 27 παρατηρείται στα **1633 cm^{-1}** μία κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί στις δονήσεις επιμήκυνσης της ομάδας του καρβονυλίου C=O, στα **3301 cm^{-1}** μία κορυφή απορρόφησης που αντιστοιχεί στις δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού N-H. Οι δονήσεις επιμήκυνσης και κάμψης των δεσμών C-H των ομάδων $-\text{CH}_2$, όπως επίσης και οι δονήσεις των ομάδων $-\text{CH}_3$ στα άκρα των πολυαμιδικών αλυσίδων προβάλλονται στους κυματαριθμούς **2863** και **2934 cm^{-1}** , αντίστοιχα. Ο δεσμός C-N του αμιδίου εμφανίζεται στα **1000 - 1350 cm^{-1}** . Ίδια συμπεριφορά στο φάσμα του FTIR-ATR παρατηρήθηκε και στην βιβλιογραφία (Kanelli et al., 2016),(Acero et al., 2012).

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι η μορφή του γραφήματος απορρόφησης δεν παρουσιάζει διαφορά για τα τροποποιημένα δείγματα, παρά μόνο μείωση στην ένταση της απορρόφησης κάποιων κορυφών, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί πως οφείλεται στον περιορισμό των δονήσεων των δεσμών λόγω της ύπαρξης των φαινολικών ενώσεων και των παραγόντων τους στην επιφάνεια των δειγμάτων, καθώς είναι ογκώδη μόρια που περιέχουν τον φαινολικό δακτύλιο και περιορίζουν την κίνηση των γειτονικών μορίων, όπως υποτέθηκε και για τα PLA. Σύμφωνα πάντως με τη βιβλιογραφία (Vedamurthy and Murugesan, 2018) η μείωση στην απορρόφηση στην περιοχή των **3500 cm^{-1}** και των **660 cm^{-1}** έχει υποτεθεί πως οφείλεται στο δεσμό υδρογόνου μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και της πολυαμιδικής επιφάνειας. Δεν παρατηρείται αλλαγή στο φάσμα καθώς οι κυματαριθμοί στους οποίους παρουσιάζει απορρόφηση ο φαινολικός δακτύλιος (με πιο χαρακτηριστική την κορυφή στα **1522 cm^{-1}** η οποία οφείλεται στις δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου) παρουσιάζουν ήδη μεγάλη απορρόφηση για το πολυαμίδιο και η ποσότητα των φαινολικών ενώσεων σε σχέση με τον όγκο του πολυαμιδικού υφάσματος είναι πολύ μικρή ώστε να προκαλέσει ορατή διαφορά στην ένταση των κορυφών.

Και στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι για ενζυμική τροποποίηση πολυαμιδίου με φαινολικές ενώσεις από λακάση, διαφορές στη μορφή του γραφήματος απορρόφησης παρατηρήθηκαν μόνο για το υλικό που είχε υποστεί υδρόλυση πριν την τροποποίηση. (Acero et al., 2012)



Σχήμα 27: Γράφημα FTIR-ATR για δείγματα PA υφασμάτων: ακατέργαστο (Control) και τροποποιημένο με κατεχόλη και πυρογαλόλη
 Δείγματα: μαύρο = ακατέργαστο PA ύφασμα, μπλε = τροποποιημένο με κατεχόλη PA ύφασμα, κόκκινο = τροποποιημένο με πυρογαλόλη PA ύφασμα
 Δεν παρατηρείται διαφορά στην μορφή του γραφήματος, αλλά μείωση στην ένταση κάποιων κορυφών για τα τροποποιημένα δείγματα.

10 Μεταβολή χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων films PLA και υφασμάτων PA με φαινολικές ενώσεις

Οι ελεύθερες καρβοξυλ- και αμιν-ομάδες, που υπάρχουν στην επιφάνεια των πολυμερών και όσες επιπλέον προέκυψαν από την προεπεξεργασία τους μπορούν να σχηματίσουν χημικούς δεσμούς με τις φαινολικές ενώσεις, όπως έχει ήδη αναφερθεί και διαπιστωθεί από τους παραπάνω ελέγχους.

Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι το μείγμα αντίδρασης για όλες τις φαινολικές ενώσεις άλλαξε χρώμα κατά την οξειδωση, όπως αναφέρεται συχνά σε ενζυμική οξειδωση φαινολικών ενώσεων. Για το διάλυμα της κατεχόλης πήρε μία πολύ σκούρα μωβ προς μαύρη απόχρωση, για την πυρογαλόλη μία σκούρα καφέ προς μαύρη απόχρωση, για το γαλλικό οξύ μία σκούρα πράσινη προς μαύρη απόχρωση και για το φερουλικό οξύ μία σκούρα πορτοκαλί προς καφέ απόχρωση. Εξάιρεση αποτελεί η τυροσόλη που από διαυγές πήρε μία λευκή απόχρωση. Η μεταβολή αυτή μπορεί πιθανότατα να αποδοθεί στις παραγόμενες κινόνες που σχηματίζονται από τη δράση του ενζύμου, καθώς και στα διαλυτά στο μίγμα ολιγο- και πολυμερή των φαινολικών ουσιών που σχηματίζονται και αυτά κατά την οξειδωση με τη λακάση. (Zerva *et al.*, 2016)

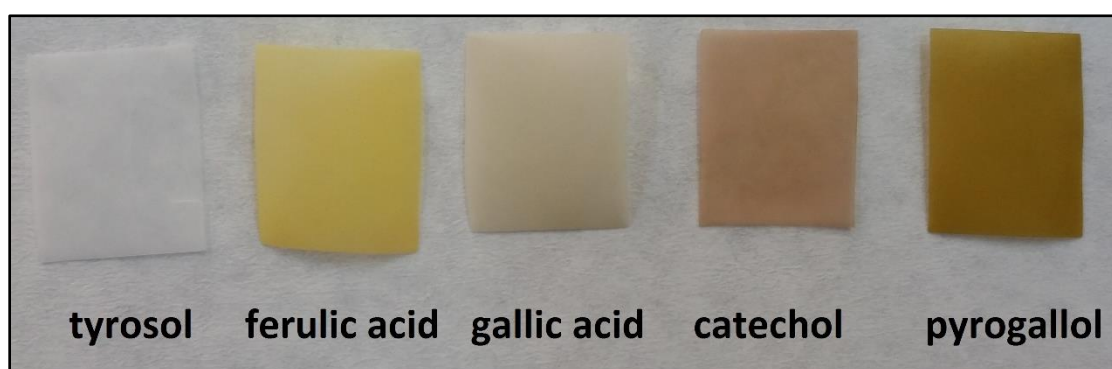
Επίσης, πρέπει να αναφερθεί πως και τα τροποποιημένα δείγματα (τόσο για το PLA όσο και για το PA) αναλόγως της φαινολικής ουσίας απέκτησαν και διαφορετικό χρώμα, όπως έχει ήδη παρουσιαστεί και στην **Εικόνα 17**. Παρακάτω παρουσιάζεται και ποσοτικά η μεταβολή του χρώματος για κάθε δείγμα σε σύγκριση με το αρχικό υλικό.

10.1 PLA

Στην **Εικόνα 20** εμφανίζεται η μεταβολή στην εμφάνιση των PLA films από την ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση τους με τις φαινολικές ενώσεις. Τα films παρουσιάζουν διαφορετικό χρώμα αναλόγως της χρησιμοποιούμενης φαινολικής ένωσης, επιβεβαιώνοντας έτσι και οπτικά την τροποποίηση. Εξάιρεση αποτελεί το δείγμα της τυροσόλης που χρωματικά είναι ίδιο με το αρχικό υλικό, άχρωμο και σχεδόν διαφανές, γεγονός που οφείλεται ενδεχομένως σε μικρότερο ποσοστό τροποποίησης της επιφάνειας του film (μικρότερη απόδοση της ενζυμικής υποβοηθούμενης από την λακάση επιφανειακής τροποποίησης των films για τη συγκεκριμένη φαινολική ένωση, που μπορεί να αποτελεί και λόγο για την μικρή αντιοξειδωτική αλλά και αντιμικροβιακή ιδιότητα των δειγμάτων τυροσόλης) καθώς και στο χρώμα του διαλύματος της τυροσόλης που είχε απόχρωση του λευκού. Οι μεταβολές και μη στο χρώμα των δειγμάτων αποτυπώνονται και ποσοτικά στις τιμές ΔΕ που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8** και έχουν υπολογιστεί σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρεται στο κεφάλαιο **5.14**. Την μεγαλύτερη οπτική διαφορά την παρουσίασε το δείγμα της πυρογαλόλης, ενώ δεύτερο σε ένταση χρώματος είναι το δείγμα της κατεχόλης.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα μέτρησης χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων PLA films (επιφάνειας 2x2,5 cm²). Συνθήκες προεπεξεργασίας δειγμάτων: 30 min στους 25 °C με 8% v/v EDA σε EtOH. Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση των δειγμάτων για 3h στους 60 °C και pH 6 με την αντίστοιχη φαινολική ένωση.

Δείγμα PLA	L	a	b	ΔΕ
Control	94,84 ± 0,22	-0,53 ± 0,02	2,20 ± 0,06	
ferulic acid	92,98 ± 0,65	-2,54 ± 0,41	18,35 ± 3,95	16,40 ± 3,92
gallic acid	83,53 ± 1,95	0,76 ± 0,31	13,94 ± 1,02	16,45 ± 1,88
catechol	70,23 ± 3,40	7,30 ± 0,64	22,08 ± 1,10	32,69 ± 3,38
pyrogallol	52,66 ± 2,75	7,78 ± 0,49	27,57 ± 0,67	50,03 ± 2,08
tyrosol	95,18 ± 0,60	-0,69 ± 0,01	2,89 ± 0,15	0,91 ± 0,16



Εικόνα 20: Μεταβολή χρώματος των ενζυμικώς επιφανειακά τροποποιημένων PLA films.

Είναι προφανής η μεταβολή στην εμφάνιση των τροποποιημένων δειγμάτων. Τα films έχουν βαφεί από την αντίδραση και εμφανίζουν διαφορετικό χρώμα αναλόγως της χρησιμοποιούμενης φαινολικής ένωσης, με εξαίρεση το δείγμα της τυροσόλης, το οποίο δεν εμφανίζει προφανή μεταβολή και οπτικώς είναι ίδιο με το αρχικό υλικό, σχεδόν διάφανο. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα ΔΕ.

Για τον 2^ο κύκλο πειραμάτων, παρατηρείται οπτική διαφορά και στα control δείγματα. Συγκεκριμένα, για το Control 1 που αφορά την αντίδραση μόνο της φαινολικής ουσίας με το PLA, χωρίς την παρουσία της λακάσης, το ύφασμα έχει χρωματιστεί. Αυτό σημαίνει ότι η πυρογαλόλη συνδέεται χημικά στην επιφάνεια του film και χωρίς την «βοήθεια» της λακάσης (όπως έχει ήδη διαπιστωθεί και από τα αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά τεστ). Ομοίως, το Control 2 δείχνει επίσης μεταβολή στο χρώμα και μάλιστα η τιμή ΔΕ που προέκυψε είναι πολύ κοντά σε αυτή της υποβοηθούμενης από τη λακάση αντίδρασης. Μπορεί, λοιπόν, να θεωρηθεί ότι, η πυρογαλόλη που έχει παραμείνει στο διάλυμα μετά την αντίδραση με το ένζυμο καθώς και τα διαλυμένα μόρια της πουργουρογαλλίνης και άλλων ενδεχόμενων κινονών και oligo-πολυμερων που έχουν προκύψει από την οξειδωτική δράση της λακάσης, συνδέονται χημικά στην επιφάνεια του film και χωρίς την «βοήθεια» της λακάσης. Η αύξηση αυτή στο ΔΕ μπορεί να υποτεθεί ότι οφείλεται στα παράγωγα της οξειδωτικής δράσης της λακάσης που όπως έχει προαναφερθεί είναι υπεύθυνα για τον χρωματισμό του διαλύματος αντίδρασης, και εφόσον προσδένονται στην πολυμερική επιφάνεια και για τον πιο έντονο χρωματισμό της.

Τέλος, με μικρή διαφορά από το Control 2, το δείγμα R, που αφορά την υποβοηθούμενη από τη λακάση τροποποίηση, εμφανίζει την μεγαλύτερη τιμή ΔΕ, γεγονός αναμενόμενο, καθώς σκοπός της χρήσης του ενζύμου είναι η αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Όλες οι τιμές εμφανίζονται με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση στον **Πίνακα 9**.

Πίνακας 9: Αποτελέσματα μέτρησης χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων PLA films (επιφάνειας 2x2,5 cm²) του 2^{ου} κύκλου πειραμάτων.

Συνθήκες προεπεξεργασίας δειγμάτων: 30 min στους 25 °C με 8% v/v EDA σε EtOH.

Δείγμα PLA	L	a	b	ΔΕ
Blank	93,30 ± 0,25	-1,28 ± 0,03	3,13 ± 0,22	
Control 1	80,15 ± 1,91	0,24 ± 0,87	22,53 ± 0,36	23,53 ± 1,39
Control 2	65,31 ± 2,14	5,11 ± 0,89	31,04 ± 0,80	40,07 ± 1,59
R	57,43 ± 1,63	6,03 ± 0,75	23,41 ± 0,99	41,87 ± 1,11

Blank (τυφλό πρότυπο): PLA προεπεξεργασμένο με EDA

Control 1: PLA προεπεξεργασμένο με EDA και στη συνέχεια ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένο με ryrogallol (40 mM) για 3h στους 60 °C και pH 6.

Control 2: Αντίδραση ryrogallol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h, σε 60 °C, pH 6 χωρίς το PLA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της laccase) και φυγοκέντρησή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: κροκιδωμένα διμερή ryryrogallin και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με PLA (προεπεξεργασμένο με EDA) για 3h στους 60 °C.

R: Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση PLA προεπεξεργασμένου με EDA με ryrogallol (40 mM) και laccase (4 U) για 3h στους 60 °C και pH 6.

10.2 PA

Στον **Πίνακα 10** εμφανίζονται τα αποτελέσματα μέτρησης χρώματος των ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένων PA υφασμάτων. Όπως αποτυπώνεται από τις τιμές του ΔΕ, την μεγαλύτερη οπτική διαφορά την παρουσίασαν τα δείγματα της πυρογαλόλης και του φερουλικού οξέος (προεπεξεργασμένα και μη), ενώ ακολουθούν σε ένταση χρώματος τα δείγματα της κατεχόλης. Όλα τα δείγματα είχαν μεταβολή στο χρώμα, με εξαίρεση τα δείγματα της τυροσόλης, γεγονός που οφείλεται ενδεχομένως στους λόγους που αναφέρθηκαν και παραπάνω. Κάθε φαινολική ένωση έδωσε διαφορετική απόχρωση στο PA ύφασμα (βλέπε **Εικόνα 21**). Παρατηρείται ότι για την κάθε φαινολική ένωση η διαφορά στο ΔΕ ανάμεσα στο προεπεξεργασμένο και μη ύφασμα είναι ελάχιστη και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί με σκοπό την εκτίμηση στη διαφορά του βαθμού τροποποίησής τους.

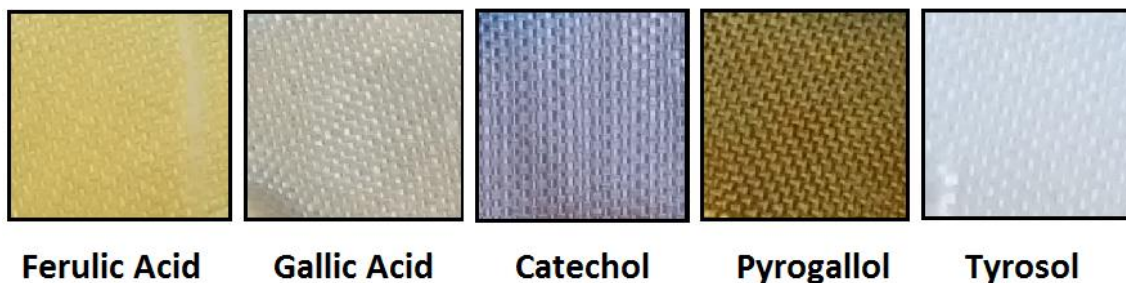
Πίνακας 10: Αποτελέσματα μέτρησης χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων PA υφασμάτων (επιφ. 2 x 2,5 cm²) προεπεξεργασμένων και μη.

Όσα δείγματα υπέστησαν προεπεξεργασία αναφέρονται ως προεπεξεργασμένα.

Συνθήκες προεπεξεργασίας δειγμάτων: Αρχικά υδρόλυση με αλκαλάση (37,2 mg_{ενζύμου} /g_{υφάσματος}) στους 60 °C για 24 h, στη συνέχεια 3h στους 25 °C με 4% w/v DCC σε EtOH και τέλος 3h στους 25 °C με 8% v/v EDA σε EtOH.

Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση όλων των δειγμάτων (προεπεξεργασμένων και μη) για 3h στους 60 °C και pH 6 με την αντίστοιχη φαινολική ένωση.

Δείγμα PA	L	a	b	ΔΕ
Control	95,78 ± 0,25	-1,00 ± 0,02	4,71 ± 0,11	
ferulic acid	86,42 ± 0,32	4,79 ± 0,43	59,14 ± 0,17	55,53 ± 0,23
ferulic acid (προεπεξ. ύφασμα)	85,63 ± 0,33	5,27 ± 0,47	61,09 ± 0,63	57,63 ± 0,71
gallic acid	73,71 ± 0,57	5,73 ± 0,21	25,16 ± 0,42	30,83 ± 0,24
gallic acid (προεπεξ. ύφασμα)	73,78 ± 0,12	4,48 ± 0,08	23,67 ± 0,25	29,55 ± 0,15
catechol	59,59 ± 0,20	6,55 ± 0,06	11,72 ± 0,19	37,62 ± 0,18
catechol (προεπεξ. ύφασμα)	62,33 ± 0,76	4,68 ± 0,06	14,71 ± 0,14	35,37 ± 0,68
pyrogallol	52,23 ± 0,23	9,15 ± 0,05	35,49 ± 0,47	54,29 ± 0,15
pyrogallol (προεπεξ. ύφασμα)	52,39 ± 1,12	9,48 ± 0,26	38,02 ± 0,45	55,70 ± 0,68
tyrosol	95,63 ± 0,36	-0,84 ± 0,02	4,86 ± 0,03	0,39 ± 0,13
tyrosol (προεπεξ. ύφασμα)	95,31 ± 0,16	-0,66 ± 0,03	4,96 ± 0,10	0,64 ± 0,14



Εικόνα 21: Μεταβολή χρώματος των ενζυμικώς επιφανειακά τροποποιημένων PA υφασμάτων.

Είναι προφανής η μεταβολή στην εμφάνιση των τροποποιημένων δειγμάτων. Τα υφάσματα έχουν βαφεί από την αντίδραση και εμφανίζουν διαφορετικό χρώμα αναλόγως της χρησιμοποιούμενης φαινολικής ένωσης, με εξαίρεση το δείγμα της τυροσόλης, το οποίο δεν εμφανίζει προφανή μεταβολή και οπτικώς είναι ίδιο με το αρχικό υλικό. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα ΔΕ.

Ομοίως με το PLA, για τον 2^ο κύκλο πειραμάτων παρατηρείται οπτική διαφορά και στα control δείγματα του PA υφάσματος και μπορεί να υποθεθεί, όπως και παραπάνω, η τροποποίησή τους χωρίς την παρουσία της λακάσης τόσο από την φαινολική ένωση (Control 1), όσο και από το προκύπτον διάλυμα της αντίδρασης της φαινολικής ένωσης με τη λακάση (Control 2).

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι ενώ αναμένεται η τιμή των ενζυμικώς καταλυόμενων αντιδράσεων να είναι μεγαλύτερες από των Control 2, αντιθέτως βρέθηκε μικρότερη (αν και με μικρή διαφορά,

ειδικά για την πυρογαλόλη). Επίσης, ενώ η κατεχόλη παρουσιάζει μεγαλύτερο ΔΕ για το προεπεξεργασμένο δείγμα, όπως αναμένεται, η πυρογαλόλη εμφανίζει μεγαλύτερο ΔΕ για το μη προεπεξεργασμένο ύφασμα (αν και μικρή η διαφορά). *Φαίνεται λοιπόν, και από αυτά τα αποτελέσματα ότι η μέτρηση του χρώματος μπορεί να δείξει την τροποποίηση του δείγματος, πλην όμως δεν είναι κατάλληλη για την ποσοτικοποίηση της τροποποίησης, με σκοπό την σύγκριση των διαφορών.*

Όλες οι τιμές ΔΕ εμφανίζονται με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση στον **Πίνακα 11**.

Πίνακας 11: Αποτελέσματα μέτρησης χρώματος των ενζυμικά τροποποιημένων PLA films (επιφάνειας 2x2,5 cm²) του 2^{ου} κύκλου πειραμάτων.

Συνθήκες προεπεξεργασίας δειγμάτων: Αρχικά υδρόλυση με αλκαλάση (37,2 mg_{ενζύμου} /g_{υφάσματος}) στους 60 °C για 24 h, στη συνέχεια 3h στους 25 °C με 4% w/v DCC σε EtOH και τέλος 3h στους 25 °C με 8% v/v EDA σε EtOH.

Δείγμα PA		L	a	b	ΔΕ
Blank		92,66 ± 0,62	-1,20 ± 0,04	4,20 ± 0,41	
catechol	Control 1	75,00 ± 0,32	7,28 ± 0,13	13,42 ± 0,49	21,65 ± 0,48
	Control 2	61,20 ± 0,88	5,18 ± 0,14	11,90 ± 0,40	33,02 ± 0,74
	R1	65,85 ± 0,30	2,43 ± 0,07	12,28 ± 0,16	28,24 ± 0,24
	R2	61,62 ± 1,12	3,39 ± 0,19	14,01 ± 0,29	32,88 ± 0,97
pyrogallol	Control 1	67,12 ± 1,21	7,96 ± 0,21	18,24 ± 0,34	30,56 ± 0,85
	Control 2	58,06 ± 1,23	7,70 ± 0,20	24,00 ± 0,53	40,85 ± 0,81
	R1	57,20 ± 1,18	7,55 ± 0,60	21,46 ± 0,91	40,42 ± 0,54
	R2	59,21 ± 0,82	7,27 ± 0,04	20,39 ± 0,11	38,12 ± 0,77

Blank (τυφλό πρότυπο): σκέτο PA ύφασμα

Control 1: Αντίδραση PA υφάσματος με την αντίστοιχη φαινολική ένωση (40 mM) για 3h στους 60 °C και pH 6.

Control 2: Αντίδραση της αντίστοιχης φαινολικής ένωσης (40 mM) με laccase (4 U) για 3h σε 60 °C, pH 6 χωρίς το PA, στη συνέχεια βράσιμο για 30 min του διαλύματος αντίδρασης (για απενεργοποίηση της laccase) και φυγοκέντρησή του (για απομάκρυνση των στερεών της αντίδρασης: διμερή pyrurogallin ή αδιάλυτες στο δ/μα αντίδρασης κινόνες και απενεργοποιημένο – κροκιδωμένο ένζυμο). Τέλος, αντίδραση του υπερκειμένου με PA για 3h στους 60 °C.

R1: Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση μη προεπεξεργασμένου PA υφάσματος με την αντίστοιχη φαινολική ένωση (40 mM) και laccase (4 U) για 3h στους 60 °C και pH 6.

R2: Ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση προεπεξεργασμένου PA υφάσματος (με alcalase και DCC και EDA σύμφωνα με την προαναφερόμενη μέθοδο προεπεξεργασίας) με την αντίστοιχη φαινολική ένωση (40 mM) και laccase (4 U) για 3h στους 60 °C και pH 6.



Εικόνα 22: : Μεταβολή χρώματος των ενζυμικώς επιφανειακά τροποποιημένων PA υφασμάτων του 2^{ου} κύκλου πειραμάτων.

R1: ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένα *μη προεπεξεργασμένα* PA υφάσματα με την αντίστοιχη φαινολική ένωση.
R2: ενζυμικά επιφανειακά τροποποιημένα *προεπεξεργασμένα* PA υφάσματα με την αντίστοιχη φαινολική ένωση.
Όπως φαίνεται, οπτικώς υπάρχει μια διαφορά στην ένταση του χρώματος μεταξύ του προεπεξεργασμένου και μη δείγματος και για τις 2 φαινολικές ενώσεις (κατεχόλη και πυρογαλόλη). Οι διαφορές αυτές αποτυπώνονται και στις τιμές ΔΕ του παραπάνω πίνακα.

*Παρατήρηση:

Να τονιστεί ότι η μέτρηση της μεταβολής του χρώματος των δειγμάτων των πολυμερών δεν είναι κατάλληλη μέθοδος για την αξιολόγηση του βαθμού τροποποίησής τους, καθώς η μεταβολή του χρώματος εξαρτάται και από το είδος της φαινολικής ένωσης. Κάθε φαινολική ένωση προσδίδει διαφορετικό χρώμα στο πολυμερές, όπως έχει ήδη αναφερθεί και φαίνεται και στις παραπάνω εικόνες, γεγονός που επηρεάζει την τιμή ΔΕ. Η σύγκριση τιμών ΔΕ έχει νόημα μόνο μεταξύ δειγμάτων τροποποιημένων με την ίδια ουσία, με σκοπό να βρεθεί η διαφορά στην ένταση του χρώματος ανάμεσα τους.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

11 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συνθετικά υφάσματα, όπως τα πολυαμιδικά, παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως αυξημένη αντοχή, υψηλή ελαστικότητα, μειωμένο ζάρωμα και γρήγορο στέγνωμα, ενώ παράλληλα ευνοούν την οικονομική μαζική παραγωγή. Έτσι αποτελούν σημαντικό κομμάτι της κλωστοϋφαντουργίας. Αντίστοιχα, πολυμερή όπως το PLA που είναι βιοαποικοδομήσιμα και μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμες πηγές προτιμώνται, εφόσον κατέχουν τις κατάλληλες ιδιότητες, σε εφαρμογές όπως συστήματα μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών, σε συσκευασίες τροφίμων αλλά και για την παραγωγή ινών με σκοπό τη χρήση τους στην βιομηχανία υφάσματος. Η βελτίωση των ιδιοτήτων τους είναι επιθυμητή για να γίνουν καταλληλότερα για αυτούς τους τομείς καθώς και για την χρήση τους σε άλλες εφαρμογές. Σε αυτήν την βάση, επιλέχθηκε για την παρούσα διπλωματική να εφαρμοστεί μία νέα ενζυμική (και συνεπώς φιλικότερη προς το περιβάλλον) διεργασία, με σκοπό την επιφανειακή τροποποίηση των πολυμερών με φαινολικές ενώσεις, που παρέχουν αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες. Η μέθοδος αναπτύχθηκε σε δύο στάδια: το στάδιο της προεπεξεργασίας και το στάδιο της ενζυμικής επιφανειακής τροποποίησης με τις φαινολικές ενώσεις.

Για το 1^ο στάδιο, τα PLA films προεπεξεργάστηκαν με 8% v/v EDA σε αιθανόλη στους 25 °C και έγινε μελέτη για τον χρόνο προεπεξεργασίας με δοκιμαζόμενες διάρκειες: 30 min, 1 h και 3 h. Επιλέχθηκε σαν βέλτιστος χρόνος προεπεξεργασίας η **1 h** σύμφωνα με τα αποτελέσματα απώλειας μάζας και αντιοξειδωτικότητας. Τα PA υφάσματα υδρολύθηκαν πρώτα με 37,2 mg_{ενζύμου}/g_{υφάσματος} του ενζύμου **Alcalase 2.4 L**, προεπεξεργάστηκαν με 4% w/w DCC σε αιθανόλη για 3 h στους 25°C και στη συνέχεια με 8% v/v EDA σε αιθανόλη για 3 h στους 25 °C. Στο δεύτερο στάδιο, όλα τα δείγματα τροποποιήθηκαν ενζυμικά, κάνοντας χρήση του ενζυμικού σκευάσματος λακάσης **Laccase Novozym® 51003**, με τις φαινολικές ενώσεις φερουλικό οξύ, γαλλικό οξύ, κατεχόλη, πυρογαλόλη και τυροσόλη με συγκέντρωση των φαινολικών ενώσεων 40 mM, χρόνο αντίδρασης 3 h, σε pH 6, στους 60 °C.

Για τον έλεγχο της **αντιοξειδωτικής ικανότητας** που παρουσιάζουν τα πολυμερή δείγματα μετά την τροποποίησή τους με τις φαινολικές ενώσεις διενεργήθηκε test με ελεύθερες ρίζες DPPH και μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 517 nm. Να αναφερθεί ότι η απορρόφηση των ατροποποίητων υλικών ήταν μηδενική και συνεπώς τα αρχικά υλικά δεν παρουσιάζουν από μόνα τους αντιοξειδωτικές ικανότητες.

Για τα PLA films διενεργήθηκαν 3 κύκλοι πειραμάτων: ο 1^{ος} ήταν για τον καθορισμό της διάρκειας της προεπεξεργασίας με την EDA, ο 2^{ος} πραγματοποιήθηκε για τις 2 φαινολικές ενώσεις με τα καλύτερα αποτελέσματα από τον 1^ο κύκλο με σκοπό να ελεγχθεί σε τι βαθμό προσδίδονται οι αντιοξειδωτικές ικανότητες και χωρίς την παρουσία του ενζύμου κατά την επιφανειακή τροποποίηση. Και, τέλος, ο 3^{ος} κύκλος αφορούσε την επίδραση του χρόνου της ενζυμικής αντίδρασης και της συγκέντρωσης του ενζύμου στις προσδιδόμενες ιδιότητες (μελετούμενες διάρκειες της αντίδρασης: 30 min, 1.5h, 3h , 6h και ελεγχόμενες συγκεντρώσεις λακάσης: 1, 4, 8 U). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του

αντιοξειδωτικού test του 1^{ου} κύκλου σε συνδυασμό με την απώλεια μάζας που υπέστησαν τα films από τη προεπεξεργασία με την EDA, σαν βέλτιστη διάρκεια προεπεξεργασίας επιλέχθηκε η 1h, καθώς παρουσίασε αρκετή βελτίωση της αντιοξειδωτικότητας των δειγμάτων σε σχέση με την αντίστοιχη για προεπεξεργασία διάρκειας 30 min, ενώ δεν είχε τόσο μεγάλη διαφορά από τα αποτελέσματα των 3 h, και παράλληλα διατηρήθηκε χαμηλή η απώλεια μάζας (στο 1 %). Για αυτή την διάρκεια προεπεξεργασίας, καλύτερη αντιοξειδωτική δράση την έδειξαν τα δείγματα της κατεχόλης και της πυρογαλόλης με **EC₅₀ 0,89 cm²** και **0,94 cm²** αντίστοιχα. Όπως διαπιστώθηκε από τον 2^ο κύκλο, συμβαίνει τροποποίηση των films και χωρίς την παρουσία της λακάσης και τα προϊόντα επιδεικνύουν και αυτά αντιοξειδωτικές ικανότητες, μικρότερες όμως (όπως ήταν αναμενόμενο) από τις αντίστοιχες των ενζυμικά τροποποιημένων δειγμάτων. Κατά τον 3^ο κύκλο, προέκυψε ότι η τροποποίηση για όλες τις συγκεντρώσεις λακάσης ολοκληρωνόταν εντός της 1,5h (πιθανότατα λόγω απενεργοποίησης του ενζύμου σε αυτή τη διάρκεια), εκτός από τη συγκέντρωση 8 U όπου διαπιστώθηκε περαιτέρω τροποποίηση και μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για τις 6 h αντίδρασης, με μικρή ωστόσο την ποσοτική βελτίωση του αποτελέσματος (πιθανότατα γιατί, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης, ποσότητα του ενζύμου συνεχίζει να έχει ακόμα δραστηριότητα και μετά την 1,5 h). Επιπλέον, βρέθηκε ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου (8 U) έδειξε καλύτερα αποτελέσματα από τις άλλες συγκεντρώσεις και βελτίωση στην αντιοξειδωτικότητα του δείγματος μόνο για μεγάλους χρόνους αντίδρασης (6 h).

Για τα PA υφάσματα διενεργήθηκαν 2 κύκλοι πειραμάτων: ο 1^{ος} ήταν για την μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υφασμάτων για τις διάφορες χρησιμοποιούμενες φαινολικές ενώσεις, ενώ ο 2^{ος} (και πάλι για τις 2 φαινολικές ενώσεις με τα καλύτερα αποτελέσματα από τον 1^ο κύκλο) σκοπό είχε να ελεγχθεί σε τι βαθμό προσδίδονται οι αντιοξειδωτικές ικανότητες και χωρίς την παρουσία του ενζύμου κατά την επιφανειακή τροποποίηση και να ελεγχθεί αν η υδρόλυση και η προεπεξεργασία των υφασμάτων βελτίωσε ακόμα περισσότερο την προσδιδόμενη αντιοξειδωτική ικανότητα. Και για τα PA καλύτερη αντιοξειδωτική δράση στον 1^ο κύκλο έδειξαν τα δείγματα της κατεχόλης και της πυρογαλόλης, με τιμές **EC₅₀ 1,14 cm²** για το δείγμα της κατεχόλης και **1,12 cm²** για το δείγμα της πυρογαλόλης. Στον 2^ο κύκλο, παρατηρείται και πάλι ότι συμβαίνει τροποποίηση των films και χωρίς την παρουσία της λακάσης και τα προϊόντα επιδεικνύουν και αυτά αντιοξειδωτικές ικανότητες. Φαίνεται, επίσης, ότι τα προεπεξεργασμένα δείγματα που τέθηκαν υπό ενζυμική επιφανειακή τροποποίηση με τις φαινολικές ενώσεις παρουσίασαν καλύτερη αντιοξειδωτικότητα από αυτή των μη προεπεξεργασμένων. Σημαντικό, επίσης, είναι να αναφερθεί ότι τα Control δείγματα τα οποία αντέδρασαν με το υπερκείμενο της αντίδρασης της λακάσης με τα φαινολικά, μετά την απενεργοποίηση του ενζύμου, παρουσίασαν αρκετά καλή αντιοξειδωτικότητα, στις περισσότερες περιπτώσεις καλύτερη και από της ενζυμικής τροποποίησης σε προεπεξεργασμένα και μη υφάσματα. Αυτό πιθανόν οφείλεται στην δράση της λακάσης που υπό τη δεδομένη περίπτωση εκτελεί μόνο την δράση οξείδωσης και πολυμερισμού των φαινολικών ενώσεων και όχι την «προσθήκη» των φαινολικών στην πολυμερική επιφάνεια. Όποτε τα μόρια που στη συνέχεια τροποποιούν τα υφάσματα είναι τα oligo-/πολυμερή των φαινολικών και ενδεχομένως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τα αντίστοιχα μονομερή των φαινολικών ενώσεων.

Τη μεγαλύτερη (και μόνη σημαντική) **αντιμικροβιακή ιδιότητα**, για τα PLA films, την έδειξε το δείγμα της πυρογαλόλης έναντι του *P. Aeruginosa*, με **44 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για

διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 30 min και **79 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για διάρκεια προεπεξεργασίας με EDA 1 h. Αξίζει να αναφερθεί ότι και το τροποποιημένο, απουσία λακάσης, δείγμα παρουσιάζει αντιμικροβιακότητα, αλλά και το Control δείγμα που αντέδρασε με το υπερκείμενο της αντίδρασης της λακάσης με τα φαινολικά, μετά την απενεργοποίηση του ενζύμου, παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση με **63 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων, γεγονός που επιβεβαιώνει και πάλι ότι τα ολιγο-/πολυμερή παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα από τα αντίστοιχα μονομερή των φαινολικών ενώσεων.

Τα πολυαμιδικά υφάσματα έδειξαν την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ιδιότητα έναντι του *E. coli* με **82 %** και **57 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων για το προεπεξεργασμένο δείγμα της πυρογαλόλης και το προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης αντίστοιχα, ενώ σημαντική αντιμικροβιακή δράση έδειξε και το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της κατεχόλης έναντι του *P. Aeruginosa* με **58 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων. Αξίζει να αναφερθεί και εδώ ότι το Control δείγμα που αντέδρασε με το υπερκείμενο της αντίδρασης της λακάσης με την κατεχόλη, μετά την απενεργοποίηση του ενζύμου, παρουσίασε σημαντική αντιμικροβιακή δράση με **46 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων έναντι του *E. coli* και **42 %** λιγότερη ανάπτυξη κυττάρων έναντι του *L. Monocytogenes*, στην δεύτερη περίπτωση μάλιστα η αντιμικροβιακότητα ήταν καλύτερη και από την αντίστοιχη του προεπεξεργασμένου και ενζυμικά τροποποιημένου δείγματος. Αυτό επιβεβαιώνει και πάλι ότι τα ολιγο-/πολυμερή παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή ικανότητα από τα αντίστοιχα μονομερή των φαινολικών ενώσεων. Παρατηρείται, επίσης, ότι για την ενζυμική τροποποίηση τα προεπεξεργασμένα δείγματα έδειξαν μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση από τα αντίστοιχα μη προεπεξεργασμένα έναντι των *E. coli* και *L. Monocytogenes*, όπως ήταν άλλωστε αναμενόμενο. Για τα δείγματα της πυρογαλόλης, αντίθετα, το μη προεπεξεργασμένο δείγμα της ενζυμικής τροποποίησης έδειξε καλύτερη αντιμικροβιακότητα από το αντίστοιχο προεπεξεργασμένο έναντι του *E. coli*.

Η υπό μελέτη ενζυμική τροποποίηση των PLA films και PA υφασμάτων εξετάστηκε και μέσω της φασματοσκοπικής μεθόδου **FTIR-ATR**. Για τα PLA δείγματα παρατηρήθηκε η εμφάνιση νέων κορυφών λόγω της προεπεξεργασίας με την EDA, με σημαντικότερες τις κορυφές στα **1653 cm⁻¹** και **1541 cm⁻¹**, που οφείλονται στις δονήσεις κάμψης του N-H. Για τα τροποποιημένα δείγματα με τις φαινολικές ενώσεις οι κορυφές αυτές μειώθηκαν και δημιουργήθηκε μια πολύ μικρή σε ένταση κορυφή στα **1522 cm⁻¹**, η οποία οφείλεται στις δονήσεις επιμήκυνσης του δεσμού C=C του αρωματικού δακτυλίου. Για τα PA υφάσματα, η μορφή του γραφήματος απορρόφησης δεν παρουσίασε διαφορά καθώς η συχνότητες στις οποίες παρουσιάζει απορρόφηση ο φαινολικός δακτύλιος παρουσιάζουν ήδη μεγάλη απορρόφηση για το πολυαμίδιο και η ποσότητα των φαινολικών σε σχέση με τον όγκο του υφάσματος είναι πολύ μικρή.

Τέλος, με στόχο τον έλεγχο της παρουσίας των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των πολυμερών μετρήθηκε η παρατηρούμενη **μεταβολή χρώματος ΔΕ**. Για τα PLA films την μεγαλύτερη διαφορά στο χρώμα παρουσίασε το δείγμα της πυρογαλόλης με **ΔΕ 50,03 ± 2,08** και δεύτερο ήταν το δείγμα της κατεχόλης με **ΔΕ 32,69 ± 3,38**. Στα πολυαμιδικά υφάσματα, αντίθετα, την μεγαλύτερη μεταβολή την εμφάνισε το προεπεξεργασμένο δείγμα του φερουλικού οξέος με **ΔΕ 57,63 ± 0,71** με αμέσως επόμενο το προεπεξεργασμένο δείγμα της πυρογαλόλης με **ΔΕ 55,70 ± 0,68**.

12 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Η μέθοδος που εφαρμόζεται στην παρούσα εργασία εστιάζει στην βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων συχνά χρησιμοποιούμενων πολυμερών, επιλέγοντας μια πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση, καθώς χρησιμοποιούνται ένζυμα για πιο ήπιες θερμοκρασιακά διεργασίες με pH κοντά στο ουδέτερο. Για μια πιο ολοκληρωμένη μελέτη της μεθόδου που τίθεται υπό μελέτη, μπορούν να προταθούν κάποιοι περαιτέρω έλεγχοι για τη βελτιστοποίησή της. Ένα εύλογο επόμενο βήμα θα ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στα αποτελέσματα της αντίδρασης (αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες αλλά και μεταβολή στα οπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων), καθώς και η μελέτη της απόδοσης της διεργασίας σε διαφορετικές θερμοκρασίες (ιδιαίτερως σε χαμηλότερες, για μία πιο ήπια και ακόμα πιο φιλική προς το περιβάλλον διεργασία), μιας και στο χρησιμοποιούμενο εμπορικό σκεύασμα λακάσης δεν αναφερόταν η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του.

Απαραίτητη κρίνεται, επίσης, η μελέτη των φυσικο-μηχανικών ιδιοτήτων των τελικών προϊόντων, που αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό για τον καθορισμό της καταλληλότητας ενός υλικού για την επιλογή του σε συγκεκριμένες εφαρμογές (πχ μελέτη αντοχής σε εφελκυσμό, κάμψη, διάτμηση, μελέτη υδροφιλικότητας).

Εξίσου σημαντικό, αν όχι περισσότερο, είναι να ελεγχθεί η τοξικότητα των τελικών προϊόντων καθώς προορίζονται για χρήση σε ένδυση και συσκευασία φαρμάκων και τροφίμων. Θα μπορούσε, επίσης, λόγω της τρέχουσας πανδημίας που επικρατεί, να προταθεί η χρήση των πολυαμιδικών υφασμάτων σε ιατρο-τεχνολογικό εξοπλισμό, όπως μάσκες μιας χρήσης ή νοσοκομειακός ρουχισμός, με σκοπό την εκμετάλλευση των προσδιδόμενων από την τροποποίηση αντιμικροβιακών ιδιοτήτων. Σε αυτήν την κατεύθυνση προτείνεται η μελέτη δυνατότητας αφαίρεσης του σταδίου προεπεξεργασίας των PA υφασμάτων με το DCC καθώς είναι μια πτητική και τοξική χημική ουσία, ακατάλληλη για χρήση στις προαναφερθείσες εφαρμογές. Εάν κάτι τέτοιο είναι δυνατό όχι μόνο θα αποφευχθεί η χρήση μια επιβλαβούς χημικής ένωσης (υπολείμματα της οποίας ενδέχεται να παραμένουν ακόμα και μετά το στάδιο καθαρισμού των υφασμάτων), αλλά θα γίνει και πιο σύντομη η διεργασία με την αφαίρεση ενός σταδίου.

Τέλος, προτείνεται ο έλεγχος μοντέλου της αντίδρασης με τα μονομερή των χρησιμοποιούμενων πολυμερών και η ταυτοποίηση των παραγόμενων προϊόντων για να ελεγχθεί αν συμβαίνει η υποτιθέμενη, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, παραγωγή ολιγο-/πολυμερών και κινονών από την οξείδωση των φαινολικών ενώσεων.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

Acero, E. H. *et al.* (2012) 'Two-step enzymatic functionalisation of polyamide with phenolics', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 79, pp. 54–60. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.03.019.

Badhani, B., Sharma, N. and Kakkar, R. (2015) 'Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications', *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry, 5(35), pp. 27540–27557. doi: 10.1039/c5ra01911g.

Bishop, P. A. (2014) 'Ergonomics and Comfort in Protective and Sport Clothing: A Brief Review', *Journal of Ergonomics*. OMICS Publishing Group, S2(02). doi: 10.4172/2165-7556.s2-005.

Božić, M., Gorgieva, S. and Kokol, V. (2012) 'Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd, 87(4), pp. 2388–2398. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.11.006.

Brzonova, I. *et al.* (2011) 'Enzymatic synthesis of catechol and hydroxyl-carboxylic acid functionalized chitosan microspheres for iron overload therapy', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier B.V., 79(2), pp. 294–303. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.04.018.

Cheng, Y. *et al.* (2009) 'Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: A review', *Frontiers of Chemistry in China*. Springer, 4(3), pp. 259–264. doi: 10.1007/s11458-009-0092-x.

Chieng, B. W. *et al.* (2014) 'Poly(lactic acid)/poly(ethylene glycol) polymer nanocomposites: Effects of graphene nanoplatelets', *Polymers*. MDPI AG, 6(1), pp. 93–104. doi: 10.3390/polym6010093.

Choksi, N. and Desai, H. (2017) *Synthesis of Biodegradable Polylactic Acid Polymer By Using Lactic Acid Monomer*, *International Journal of Applied Chemistry*. Available at: <http://www.ripublication.com> (Accessed: 17 September 2020).

Djordjević, D. M., Petronijević, Ž. B. and Cvetković, D. M. (2005) 'Polyester fabric modification by some lipases', *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, 11(4), pp. 183–188. doi: 10.2298/CICEQ0504183D.

Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, G. S. K. (2001) *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry - Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, George S. Kriz, Harcourt College Publishers*. Available at: https://books.google.gr/books/about/Introduction_to_Spectroscopy.html?id=CE4vAQAAIAAJ&redir_esc=y (Accessed: 8 September 2020).

Douka, A. *et al.* (2018) 'A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides', *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd, pp. 1–25. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001.

Farah, S., Anderson, D. G. and Langer, R. (2016) 'Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., pp. 367–392. doi: 10.1016/j.addr.2016.06.012.

Gregorova Adriana (2013) 'Application of Differential Scanning Calorimetry to the

Characterization of Biopolymers', in *Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. InTech. doi: 10.5772/53822.

Gübitz, G. M. and Paulo, A. C. (2003) 'New substrates for reliable enzymes: Enzymatic modification of polymers', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, pp. 577–582. doi: 10.1016/j.copbio.2003.09.010.

Guebitz, G. M. and Cavaco-Paulo, A. (2008) 'Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers', *Trends in Biotechnology*. Trends Biotechnol, pp. 32–38. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.10.003.

Heumann, S. *et al.* (2006) 'New model substrates for enzymes hydrolysing polyethyleneterephthalate and polyamide fibres', *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. Elsevier, 69(1–2), pp. 89–99. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.02.005.

Janorkar, A. V., Luo, N. and Hirt, D. E. (2004) 'Surface modification of an ethylene - Acrylic acid copolymer film: Grafting amine-terminated linear and branched architectures', *Langmuir*, 20(17), pp. 7151–7158. doi: 10.1021/la049715w.

Kanelli, M. *et al.* (2016) 'Surface modification of polyamide 6.6 fibers by enzymatic hydrolysis', *Process Biochemistry*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.procbio.2016.06.022.

Karaki, N. *et al.* (2016) 'Physicochemical characterization of pectin grafted with exogenous phenols', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 60, pp. 486–493. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.04.004.

Karković Marković, A. *et al.* (2019) 'Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health', *Molecules*. MDPI AG, 24(10), p. 2001. doi: 10.3390/molecules24102001.

Khoo, R. Z., Ismail, H. and Chow, W. S. (2016) 'Thermal and Morphological Properties of Poly (Lactic Acid)/Nanocellulose Nanocomposites', *Procedia Chemistry*. Elsevier BV, 19, pp. 788–794. doi: 10.1016/j.proche.2016.03.086.

Kim, H. A., Choi, J. H. and Takizawa, S. (2007) 'Comparison of initial filtration resistance by pretreatment processes in the nanofiltration for drinking water treatment', *Separation and Purification Technology*. Elsevier, 56(3), pp. 354–362. doi: 10.1016/j.seppur.2007.02.016.

Kiumarsi, A. and Parvinzadeh, M. (2010) 'Enzymatic Hydrolysis of Nylon 6 Fiber Using Lipolytic Enzyme', *Journal of Applied Polymer Science*, 116(6), pp. 3140–3147. doi: 10.1002/app.31756.

Lee, S. H. and Song, W. S. (2010) 'Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment', *Fibers and Polymers*, 11(1), pp. 54–59. doi: 10.1007/s12221-010-0054-4.

Li, J. X. *et al.* (2007) 'The influence of polyethylene terephthalate surfaces modified by silver ion implantation on bacterial adhesion behavior', *Surface and Coatings Technology*. Elsevier, 201(19-20 SPEC. ISS.), pp. 8155–8159. doi: 10.1016/j.surfcoat.2006.02.069.

Li, M. *et al.* (2014) 'Superhydrophilic surface modification of fabric via coating with nano-TiO₂ by UV and alkaline treatment', *Applied Surface Science*. Elsevier B.V., 297, pp. 147–152. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.01.105.

Maitz, M. F. (2015) 'Applications of synthetic polymers in clinical medicine', *Biosurface and*

- Biotribology*. Elsevier BV, 1(3), pp. 161–176. doi: 10.1016/j.bsbt.2015.08.002.
- Mofokeng, J. P. *et al.* (2012) 'Comparison of injection moulded, natural fibre-reinforced composites with PP and PLA as matrices', *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 25(8), pp. 927–948. doi: 10.1177/0892705711423291.
- Ogunsona, E. O. *et al.* (2019) 'A critical review on the fabrication processes and performance of polyamide biocomposites from a biofiller perspective', *Materials Today Sustainability*. Elsevier Ltd, p. 100014. doi: 10.1016/j.mtsust.2019.100014.
- Ozturk Sarikaya, S. B. (2015) 'Acetylcholinesterase inhibitory potential and antioxidant properties of pyrogallol', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Taylor and Francis Ltd, 30(5), pp. 761–766. doi: 10.3109/14756366.2014.965700.
- Ren, J. *et al.* (2013) 'Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 53, pp. 77–81. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011.
- Rodríguez-Morató, J. *et al.* (2016) 'Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol', *Drug Metabolism Reviews*. Taylor and Francis Ltd, pp. 218–236. doi: 10.1080/03602532.2016.1179754.
- Schroeder, M. *et al.* (2007) 'Enzymatic coating of lignocellulosic surfaces with polyphenols', *Biotechnology Journal*, 2(3), pp. 334–341. doi: 10.1002/biot.200600209.
- Schweigert, N., Zehnder, A. J. B. and Eggen, R. I. L. (2001) 'Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals', *Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd, 3(2), pp. 81–91. doi: 10.1046/j.1462-2920.2001.00176.x.
- Siemann, U. (2005) 'Solvent cast technology: a versatile tool for thin film production', *Prog. Colloid Polym*, pp. 1–14.
- Sutanto, H., Susanto, B. H. and Nasikin, M. (2019) 'Solubility and antioxidant potential of a pyrogallol derivative for biodiesel additive', *Molecules*. MDPI AG, 24(13). doi: 10.3390/molecules24132439.
- Tian, H. *et al.* (2012) 'Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application', *Progress in Polymer Science (Oxford)*. Elsevier Ltd, pp. 237–280. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2011.06.004.
- Uttam, D. (2013) 'Active Sportswear Fabrics', *International Journal of IT, Engineering and Applied Sciences Research (IJIEASR)*, 2(1), pp. 34–40.
- Vedamurthy, T. and Murugesan, M. (2018) 'Synthesis, characterization, and evaluation of the hydrophobic, dielectric properties of phenols functionalized nylon 6 polymers by zinc acetate catalyst using Mannich reaction', *Materials Chemistry and Physics*. Elsevier Ltd, 216, pp. 517–525. doi: 10.1016/j.matchemphys.2018.05.070.
- Yu, W. *et al.* (2018) 'Synthesis of Poly(lactic acid)-block-poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) Copolymers with Controllable Block Structures via Reversible Addition Fragmentation Polymerization from Aminolyzed Poly(lactic acid)', *International Journal of Polymer Science*. Hindawi Limited, 2018. doi: 10.1155/2018/7361659.

Zduńska, K. *et al.* (2018) 'Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application', *Skin Pharmacology and Physiology*. S. Karger AG, 31(6), pp. 332–336. doi: 10.1159/000491755.

Zerva, A. *et al.* (2016) 'Bioconversion of Biomass-Derived Phenols Catalyzed by *Myceliophthora thermophila* Laccase', *Molecules*. MDPI AG, 21(5), p. 550. doi: 10.3390/molecules21050550.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

13 ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Abs	Απορρόφηση	Absorbance
ABTS	2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλβενζοθειαζολιν-6-σουλφονικό οξύ)	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
DCC	N, N'-δικυκλοεξυλκαρβοδιμίδιο	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο	Dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζύλιο	2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl
DSC	Θερμιδομετρία διαφορικής σάρωσης	Differential scanning calorimetry
EDA	Αιθυλενοδιαμίνη	Ethylenediamine
FTIR-ATR	Υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier - Αποσβένουσα ολική ανάκλαση	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflection
LB	Θρεπτικό μέσο Luria Bertani	Luria Bertani broth
Na ₂ CO ₃	Ανθρακικό νάτριο	Sodium carbonate
NaOH	Υδροξείδιο του νατρίου/ καυστικό νάτριο	Sodium hydroxide
OD ₆₀₀	Οπτική πυκνότητα (στα 600 nm)	Optical density (at 600 nm)
PA 6.6	Πολυαμίδιο 6.6	Polyamide 6.6
PLA	Πολύ(γαλακτικό οξύ)	Polylactic acid
P.P. buffer	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου	Potassium Phosphate buffer
T _c	Θερμοκρασία κρυστάλλωσης	Crystallization temperature
T _m	Θερμοκρασία τήξης	Melting temperature
T _g	Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης	Glass transition temperature
TGA	Θερμοσταθμική ανάλυση	Thermogravimetric analysis
ΔΕ	Διαφορά χρώματος	Colour change