

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

TANJA J. NIKOLIĆ

**DOBIJANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH
VLAKANA NA BAZI SELEKTIVNO
OKSIDISANE CELULOZE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2011.

Mentor:

dr Mirjana Kostić, van. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Članovi komisije:

dr Petar Škundrić, red. prof.
Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

dr Živomir Petronijević, red. prof.
Tehnološki fakultet, Leskovac

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija rađena je u laboratorijama Visoke strukovne škole za tekstil u Leskovcu, Vunarskog Instituta „Vunil“ u Leskovcu i laboratorijama Katedre za biohemiju i biohemijsko inženjerstvo Tehnološkog fakulteta u Leskovcu. Pojedine analize rađene su na Katedri za tekstilno inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu i na Medicinskom fakultetu u Nišu.

Najiskrenije se zahvaljujem mom mentoru dr Mirjani Kostić, van. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, na predloženoj temi, dragocenoj pomoći, izuzetno stručnoj i prijateljskoj saradnji, kao i na strpljenju i vremenu posvećenom mom naučno-istraživačkom radu.

Izuzetnu zahvalnost dugujem i dr Petru Škundriću, red. prof. Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, koji je svojim stalnim interesovanjem, savetima i podsticajima dao veliki doprinos pri izradi ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam dr Živomiru Petronijeviću, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, za stručnu pomoć iz oblasti Enzimologije i konstantno interesovanje i praćenje izrade ove disertacije, od njenih početaka do završnog oblika.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ljubiši Milenkoviću, prof. Visoke strukovne škole za tekstil u Leskovcu, za materijalnu, moralnu i stručnu pomoć tokom izrade ovog rada.

Najsrdačnije se zahvaljujem i svim kolegama sa Katedre za tekstilno inženjerstvo Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu na pomoći, poklonjenoj pažnji, rečima podrške i ohrabrenja.

Konačno, veliko hvala mojoj porodici na безусловnoj podršci i velikom razumevanju tokom rada na doktorskoj disertaciji.

Sadržaj

Uvod

TEORIJSKI DEO

1. Struktura i svojstva celuloze	1
1.1. Molekulska struktura celuloze	2
1.2. Nadmolekulska struktura celuloze	6
1.3. Morfološka struktura celuloze	17
2. Struktura i svojstva prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana	20
2.1. Struktura i svojstva prirodnih celuloznih vlakana	21
2.1.1. Prateće supstance u vlaknima pamuka	25
2.1.2. Kvalitet i svojstva pamuka	27
2.2. Struktura i svojstva hemijskih celuloznih vlakana	33
3. Reaktivnost celuloze	41
3.1. Dejstvo vode na celulozu	42
3.2. Dejstvo alkalija na celulozu	43
3.3. Dejstvo kiselina na celulozu	48
3.4. Dejstvo oksidacionih sredstava na celulozu	50
3.5. Oksidacija celuloze perjodatima	54
4. Imobilizacija enzima na tekstilnim materijalima	59
4.1. Celulozni materijali sa imobilisanim enzimima	60
4.2. Ostali vlaknasti materijali sa imobilisanim enzimima	61
4.3. Vlakna sa kompleksnom (kombinovanom) aktivnošću	63
4.4. Celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom	64
4.4.1. Struktura i svojstva tripsina	65
4.4.2. Uloga tripsina u lečenju	66
4.5. Enzimi i metode za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima	68
4.5.1. Određivanje aktivnosti enzima	70
4.5.2. Određivanje sadržaja proteina	71
4.5.2.1. Određivanje proteina UV apsorpcijom	71
4.5.2.2. Metod po Lowry-ju	72
4.5.2.3. BCA metod	73
4.5.2.4. Bradford-ov metod	73

EKSPERIMENTALNI DEO

5. Materijal i metode	74
5.1. Materijal	74
5.1.1. Pamučna pređa	74
5.1.2. Viskozna pređa	74
5.1.3. Oksidaciono sredstvo – natrijum-perjodat	74

5.1.4.	Biološki aktivno sredstvo – tripsin	74
5.1.5.	Supstrat tripsina	74
5.1.6.	Pregled i karakteristike ostalih materijala koji se koriste za dobijanje biološki aktivnih celuloznih vlakana	75
5.2.	Metode	76
5.2.1.	Dovođenje uzoraka i epruveta u standardno stanje	76
5.2.2.	Oksidacija pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom	76
5.2.3.	Određivanje gubitka mase	76
5.2.4.	Određivanje sadržaja aldehidnih grupa	77
5.2.5.	Određivanje finoće pređe	77
5.2.6.	Određivanje prekidne jačine pređe	77
5.2.7.	Određivanje sorpcije vlage	77
5.2.8.	Određivanje sposobnosti zadržavanja vode	78
5.2.9.	Određivanje vrednosti sorpcije joda i stepena kristalnosti	78
5.2.10.	Imobilizacija tripsina na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi	79
5.2.11.	Određivanje sadržaja proteina – Bradford-ov metod	80
5.2.12.	Određivanje aktivnosti tripsina	81
5.2.13.	Ispitivanje stabilnosti slobodnog i imobilisanog tripsina pri lagerovanju	83
5.2.14.	Ispitivanje otpuštanja tripsina sa nosača	83
5.2.15.	Skenirajuća elektronska mikroskopija	83
6.	Rezultati i diskusija	85
6.1.	Karakteristike nemodifikovane pamučne i viskozne pređe	85
6.2.	Karakteristike oksidisane pamučne i viskozne pređe	87
6.2.1.	Gubitak mase oksidisane pamučne i viskozne pređe	87
6.2.2.	Sadržaj aldehidnih grupa u oksidisanim pamučnim i viskoznim vlaknima ...	89
6.2.3.	Sorpcija vlage i sposobnost zadržavanja vode u oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi	95
6.2.4.	Sorpcija joda oksidisanim pamučnim i viskoznim vlaknima	101
6.2.5.	Fizičko-mehanička svojstva oksidisane pamučne i viskozne pređe	105
6.2.6.	Morfološke karakteristike oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana	109
6.3.	Karakteristike pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom	113
6.3.1.	Količina proteina i aktivnost tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi	113
6.3.2.	Mikrostruktura pamučnih i viskoznih vlakana sa imobilisanim tripsinom	124
6.3.3.	Stabilnost tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi.	126
7.	Zaključak	130
8.	Literatura	136

Dobijanje biološki aktivnih vlakana na bazi selektivno oksidisane celuloze

APSTRAKT

U radu je proučena oksidacija pamučnih i viskoznih vlakana natrijum-perjodatom pri različitim uslovima u cilju dobijanja informacija o uticaju perjodatne oksidacije na svojstva prirodnih i regenerisanih celuloznih vlakana. Dejstvo perjodatne oksidacije na hemijska i fizička svojstva pamučne i viskozne pređe ocenjeno je određivanjem sadržaja aldehidnih grupa, finoće i prekidne jačine pređe. Promene u sorpcionim svojstvima pamučne i viskozne pređe okarakterisane su određivanjem sorpcije vlage, sposobnosti zadržavanja vode i sorpcije joda. Takođe, ispitane su promene površine oksidisanih celuloznih vlakana primenom SEM tehnike.

Perjodatna oksidacija je omogućila uvođenje značajnih količina aldehidnih grupa u celulozna vlakna (maksimalne količine aldehidnih grupa iznose 99,2 $\mu\text{mol/g}$ i 1284,0 $\mu\text{mol/g}$ za oksidisana vlakna pamuka i viskoze, respektivno), pri čemu se količina uvedenih funkcionalnih grupa može kontrolisati izborom uslova modifikovanja. Perjodatna oksidacija nema značajan uticaj na gubitak mase modifikovane celulozne pređe i izaziva minimalno povećanje finoće oksidisane pređe. Prekidna jačina oksidisane pamučne i viskozne pređe se ne menja značajno za vreme oksidacije u periodu 0-180 minuta. Međutim, sa produženjem vremena reakcije iznad 180 minuta, prekidna jačina se značajno smanjuje. U poređenju sa nemodifikovanim vlaknima, oksidisana pamučna i viskozna vlakna pokazuju povećanje sorpcije vlage i smanjenje vrednosti sposobnosti zadržavanja vode i sorpcije joda.

Oksidisana celulozna vlakna sa različitim sadržajem aldehidnih grupa korišćena su kao nosači za imobilizaciju tripsina, enzima sa anti-inflamatornim svojstvom. U ovom procesu amino grupe tripsina reaguju sa aldehidnim grupama oksidisanih celuloznih vlakana uz obrazovanje odgovarajućih Schiff-ovih baza. Za imobilizaciju tripsina na oksidisanim vlaknima primenjene su dve procedure: direktna na pamuku i indirektna na viskozi, uvođenjem proteina BSA i glutaraldehida. Dobijena celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom okarakterisana su sa aspekta sadržaja proteina, aktivnosti enzima i njegove stabilnosti pri lagerovanju.

Oksidisana viskozna vlakna vezuju veće količine proteina u odnosu na oksidisana pamučna vlakna: maksimalna količina imobilisanog tripsina iznosi 8,35 mg/g viskozne pređe i 6,1 mg/g pamučne pređe. Međutim, oksidisana viskozna vlakna ispoljavaju niže vrednosti imobilisane aktivnosti (do 0,78 U/g) u poređenju sa oksidisanim pamučnim vlaknima (do 1,22 U/g). Stabilnost imobilisanog tripsina značajno je poboljšana u poređenju sa slobodnim enzimom pri skladištenju tokom dužeg vremenskog perioda i ukazuje na potencijal sistema tripsin – selektivno oksidisana celuloza za primenu u medicini.

U radu je pokazana efikasnost primene perjodatne oksidacije na prirodna i hemijska celulozna vlakna u cilju dobijanja dialdehid celuloze, kao i mogućnost dobijanja biološki aktivnih pamučnih i viskoznih vlakana sa imobilisanim tripsinom na bazi dialdehid celuloze kao polazne osnove.

Ključne reči: celulozna vlakna, pamuk, viskoza, oksidacija natrijum-perjodatom, dialdehid celuloza, fizičko-hemijska svojstva, tripsin, imobilizacija, stabilnost pri lagerovanju

Obtaining of biologically active fibers on the basis of selectively oxidized cellulose

ABSTRACT

In this thesis, sodium periodate oxidation of cotton and viscose fibers under various conditions was studied in order to obtain information about influence of periodate oxidation on properties of natural and man-made cellulose fibers. The effect of periodate oxidation on the chemical and physical properties of cotton and viscose yarns was evaluated by determining aldehyde group content, fineness and tensile strength of yarns. The changes in sorption properties of cotton and viscose yarns were evaluated by determination of moisture sorption, water retention power and iodine sorption value. Also, changes on the surface of oxidized cellulose fibers were examined by SEM technique.

By the periodate oxidation, significant amounts of aldehyde groups can be introduced into cellulose fibers (the maximum amounts of aldehyde groups are 99.2 $\mu\text{mol/g}$ and 1284.0 $\mu\text{mol/g}$ for oxidized cotton and viscose fibers, respectively) and the amount of introduced functionalities is controllable by selecting the oxidation conditions. Periodate oxidation has no significant influence on weight loss of the modified cellulose yarns, and causes minimal increase in the oxidized yarn fineness. The tensile strength of the oxidized cotton and viscose yarns does not change remarkably for the oxidation time up to 180 min. However, tensile strength strongly decreases when the time of oxidation is over 180 min. Compared to the untreated fibers, oxidized cotton and viscose fibers exhibit higher moisture sorption, while water retention values and iodine sorption values of oxidized fibers are lower.

Obtained oxidized cellulose fibers with different aldehyde group contents are employed as carriers for subsequent immobilization of trypsin, an enzyme with anti-inflammatory properties. The aldehyde groups on the cellulose fibers are able to react with amino groups of trypsin to form the corresponding Schiff base, and result in cellulose yarn immobilized trypsin. The enzyme is covalently immobilized on oxidized fibers by two procedures: directly on cotton fibers and indirectly on viscose fibers through bovine serum albumin as a spacer and glutaraldehyde as a linker. Measurements of protein load from Bradford assay and catalytic activity in hydrolysis of *N*- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide were made for the immobilized enzyme.

The protein content in the modified viscose yarn is higher than that in the cotton yarn: the maximum amount of immobilized trypsin is 8.35 mg/g viscose yarn and 6.1 mg/g cotton yarn. However, immobilized activity is higher for cotton fiber (up to 1.22 U/g) than viscose fiber (up to 0.78 U/g). The storage stability of the trypsin immobilized on selectively oxidized cellulose yarn is significantly improved compared with the free enzyme. The resulting composition of trypsin with cellulose has potential for medical applications.

This study demonstrates the potential of the periodate oxidation towards natural and regenerated cellulose fibers in order to obtain dialdehyde cellulose fibers, as well as the possibility of obtaining biologically active cellulose fibers with immobilized trypsin using dialdehyde cellulose cotton and viscose fibers.

Key words: cellulose fibers, cotton, viscose, sodium periodate oxidation, dialdehyde cellulose, physico-chemical properties, trypsin, immobilization, storage stability

Nomenklatura

A	apsorbancija
Asp	asparaginska kiselina
AFM	mikroskopija atomskih sila
BAPNA	N- α -benzoil-DL-arginin- <i>p</i> -nitroanilid
BCA	2-(4-karboksihinolin-2-il)hinolin-4-karboksilna kiselina
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (albumin iz seruma govečeta)
CrI	indeks kristalnosti, %
CV	<u>c</u> ellulose <u>v</u> iscose (viskozno vlakno)
CV	<u>c</u> oefficient of <u>v</u> ariation (koeficijent varijacije), %
DAC	dialdehid celuloza
DEAE	dietilaminoetil
EDTA	etilendiamintetraacetat
FTIR	Fourier-ova transmisiona infracrvena spektroskopija
GM	gubitak mase, %
GRAS	<u>g</u> enerally <u>r</u> ecognized <u>a</u> s <u>s</u> afe (generalno priznat kao siguran)
GSB	Goldweit, Smith i Barnett test
His	histidin
HT	<u>h</u> igh <u>t</u> enacity (ojačana viskozna vlakna)
HWM	<u>h</u> igh <u>w</u> et <u>m</u> odulus (viskozna vlakna visokog mokrog modula)
I _{broj}	jodni broj
l	dužina, cm
m	masa uzorka, g
MPA	<u>m</u> ultipoint <u>a</u> tachment (vezivanje preko većeg broja veza)
MV	mikroner vrednost
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
PAN	poliakrilonitril
PEG	polietilenglikol
PES	poliester
PI	Pressley indeks
PRE	povratno rasuti elektroni
PVA	polivinilalkohol
SE	sekundarni elektroni
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
Ser	serin
SPA	<u>s</u> inglepoint <u>a</u> tachment (vezivanje preko jedne veze)
SZV	sposobnost zadržavanja vode, %
T	količina tripsina, mg
t	vreme, min
TEMPO	2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-1-oksil radikal
USDA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates <u>D</u> epartment of <u>A</u> griculture (Ministarstvo poljoprivrede SAD-a)
V	zapremina rastvora, ml
w	sadržaj vlage, %
ϵ	molarni koeficijent apsorpcije, M ⁻¹ ·cm ⁻¹

Uvod

Celuloza je najrasprostranjeniji bioobnovljivi prirodni polimer i zbog toga se može smatrati izuzetno važnom sirovinom za dobijanje niza proizvoda različite namene. Nedavno je ovaj biopolimer privukao pažnju javnosti zbog njegove moguće upotrebe u proizvodnji biogoriva. Međutim, celuloza se već vekovima koristi kao materijal i pokazala je svoju raznovrsnost u brojnim primenama. Društvena zainteresovanost za održive ekološke proizvode podstiče efikasnu eksploataciju celuloze, a time i dalja istraživanja u oblasti biosinteze, strukture, hemijskog modifikovanja, svojstava, novih postupaka i tehnologija i novih primena ovog polisaharida.

Celulozni materijali se, generalno, odlikuju karakteristikama kao što su: jačina, hidrofilnost, nerastvorljivost u vodi, stabilnost prema hemikalijama, biokompatibilnost, netoksičnost, reproducibilnost, biodegradabilnost i mogućnost recikliranja. I pored ovih specifičnih i preimućstvenih karakteristika celuloze, istraženi su (i još uvek se istražuju) postupci modifikovanja kojima se mogu poboljšati ova originalna svojstva ili dodati nove funkcionalnosti celulozi. Na polju modifikovanja celuloze centralno mesto zauzimaju hemijski tretmani, među kojima se posebno izdvaja hemijsko modifikovanje celuloze upotrebom oksidacionih agenasa. Tokom oksidacije celuloze, aldehidne, keto i karboksilne grupe mogu biti formirane u celulozi, u zavisnosti od prirode oksidacionog sredstva i uslova procesa oksidacije. Zahvaljujući trima hidroksilnim grupama dostupnim za oksidaciju u okviru jedne anhidroglukozne jedinice i polimernom karakteru celuloze, može se postići izuzetna raznovrsnost strukturalnih modifikacija i kombinacija.

Oksidacijom celuloze nastaje oksidisana celuloza, oksiceluloza, koja predstavlja značajnu klasu biokompatibilnih i bioresorptivnih polimera. Bioapsorpcija oksiceluloze *in vivo* dešava se hemijskim depolimerizovanjem i enzimskom hidrolizom. Uprkos tome što je oksiceluloza dokazana kao hemostatički agens i široko se koristi u kliničkoj praksi, ona i dalje privlači veliku pažnju i ispituju se njene potencijalno nove primene.

Za razliku od većine reakcija oksidacije koje karakteriše niska selektivnost, perjodatna oksidacija je jedan od retkih primera visoko selektivnog modifikovanja celuloze. Oksidacijom celuloze perjodatima dolazi do istovremene oksidacije obe sekundarne hidroksilne grupe do aldehidnih, uz otvaranje oksidisanog dela piranoznog prstena makromolekula celuloze. Na taj način dobijena dialdehid celuloza predstavlja polaznu osnovu za dobijanje širokog spektra vlakana specijalne namene. Jedna od značajnih prednosti perjodata nad ostalim oksidacionim sredstvima je u tome što minimizuju degradaciju i obezbeđuju očuvanje mehaničkih i morfoloških svojstava polaznog materijala. Parcijalnom perjodatnom oksidacijom celuloze nastali polimeri, koji pored primarnih i sekundarnih hidroksilnih grupa sadrže i aldehidne grupe, proširuju opseg primena celuloze.

Prema raspoloživim literaturnim podacima, dosadašnja istraživanja uticaja perjodatne oksidacije na svojstva celuloznih materijala uglavnom su fokusirana na različite vrste tehničke celuloze.

Predmet rada ove doktorske disertacije je proučavanje uticaja visoko selektivnog oksidacionog sredstva natrijum-perjodata na svojstva prirodnih (pamuk) i hemijskih (viskoza) celuloznih vlakana, kao i proučavanje dobijanja i svojstava biološki aktivnih vlakana dobijenih imobilizacijom tripsina na oksidisanim celuloznim vlaknima. U radu su istraženi uzajamni odnosi i uticaji strukture i svojstava različitih celuloznih vlakana, uslova oksidacije i parametara imobilizacije tripsina i postignutih efekata bioaktivnog dejstva celuloznih vlakana

sa imobilisanim tripsinom. Takođe, određeni su optimalni uslovi modifikovanja u zavisnosti od moguće dalje upotrebe bioaktivnih celuloznih vlakana.

Za modifikovanje natrijum-perjodatom i dobijanje biološki aktivnih vlakana odabrana su pamučna i viskozna vlakna zbog toga što predstavljaju najznačajnija celulozna vlakna za primenu u medicini, zahvaljujući izuzetnim karakteristikama koje ih odlikuju: sorpcija vlage i tečnosti, mekoća, afinitet prema koži, antistatičko ponašanje, visoka mehanička stabilnost i lako pranje i/ili sterilizacija. Izuzetan potencijal celuloznih vlakana leži u njihovoj molekulskoj strukturi, koja daje odlične mogućnosti kao matriks za dizajniranje bioaktivnih, biokompatibilnih i inteligentnih materijala.

Uticaj promene parametara oksidacije na strukturu i svojstva prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana praćen je standardnim metodama za karakterisanje i ispitivanje vlakana, uključujući i instrumentalne metode analize. Polazna i modifikovana pamučna i viskozna vlakna okarakterisana su sa aspekta sadržaja aldehidnih grupa (Ca-acetatna metoda), fizičko-mehaničkih svojstava (finoća i prekidna jačina), sorpcionih svojstava (sorpcija vlage, sposobnost zadržavanja vode i sorpcija joda), indeksa i stepena kristalnosti (preko jednog broja) i mikromorfoloških karakteristika (skenirajuća elektronska mikroskopija). Dobijena celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom okarakterisana su određivanjem količine vezanih proteina, katalitičke aktivnosti i stabilnosti enzima pri lagerovanju (spektrofotometrijske metode).

U radu je pokazano da selektivna oksidacija prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana natrijum-perjodatom, pri različitim uslovima, omogućava dobijanje dialdehid celuloze različitog stepena oksidacije. Zahvaljujući visokoj reaktivnosti aldehidne grupe, dialdehid celuloza može da se koristiti kao polazna osnova za dobijanje širokog spektra vlakana specijalne namene. Dialdehid celuloza može da se upotrebi kao podloga za kovalentno vezivanje proteina, aminopolisaharida ili boja reakcijom sa njihovim amino grupama, kao materijal za izmenu jona nakon dalje oksidacije do odgovarajućih karboksilnih kiselina, ili nepromenjena za specifične primene. Dialdehid celuloza je preporučena kao pogodan biokompatibilni i biodegradabilni matriks za imobilizaciju i kontrolisano otpuštanje lekova i hormona, dok sama dialdehid celuloza u nerastvornom obliku inhibira razvoj mikroorganizama. U ovom radu dialdehid celuloza je uspešno iskorišćena kao nosač za imobilizaciju tripsina, enzima koji nalazi primenu u tretmanima rana.

U skladu sa ciljevima ovog rada, utvrđeni su parametri procesa modifikovanja različitih celuloznih vlakana natrijum-perjodatom i osvojen je postupak dobijanja biološki aktivnih vlakana imobilizacijom tripsina na oksidisanim celuloznim vlaknima. Utvrđena je korelacija između uslova oksidacije, uvedenih aldehidnih grupa i svojstava modifikovanih pamučnih i viskoznih vlakana, sa jedne strane, i količine i aktivnosti tripsina imobilisanog na oksidisanim celuloznim vlaknima, sa druge strane, i ovakva zavisnost do sada nije zabeležena u literaturi. Time je omogućeno da se izborom uslova oksidacije dobiju pamučna i viskozna vlakna sa određenim sadržajem aldehidnih grupa, a time i konkretnim vrednostima količine i aktivnosti imobilisanog tripsina, mehaničkim i sorpcionim svojstvima, što omogućava njihovo prilagođavanje željenoj nameni finalnog proizvoda. Proizvodnja vlakana sa imobilisanim enzimima predstavlja obećavajući pravac razvoja u oblasti biološki aktivnih vlakana i budući rad na ovom polju bi bio od izuzetnog praktičnog značaja.

Istraživanja vezana za predmet ovog rada uklapaju se u svetske trendove i po obimu i po naučnim dostignućima u svetu predstavljaju značajan opus u oblasti polimernih materijala, tekstilnog i biohemijškog inženjerstva.

TEORIJSKI DEO

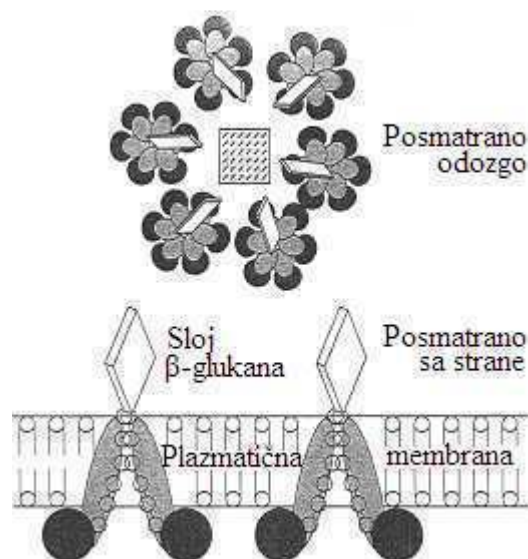
1. Struktura i svojstva celuloze

Celuloza je najrasprostranjeniji organski polimer, koji doprinosi ukupnoj godišnjoj proizvodnji biomase sa oko $1,5 \times 10^{12}$ tona i smatra se gotovo neiscrpnim izvorom sirovog materijala [1]. Celuloza je osnovna gradivna supstanca ćelijskih zidova biljnog sveta i važna obnovljiva sirovina za dobijanje niza proizvoda različite namene. Ona je važna industrijska sirovina za proizvodnju hartije, tekstila, hemijskih vlakana i celuloznih derivata. Zbog svog ogromnog industrijskog značaja celuloza je u pogledu svojih fizičkih i hemijskih svojstava vrlo temeljno proučavana.

Najveći sadržaj i najčistija celuloza potiče iz pamuka, u kome je ona u skoro čistom obliku (95-98 %). Ona se u biljkama nalazi u smeši sa hemicelulozama, ligninom, pentozanima i drugim pratećim supstancama. Poznavanje principa biosinteze, teksture rasta i morfologije prirodnih celuloznih vlakana i traheida drveta, u kojima se fibrili celuloze u toku rasta na različit način orijentišu u pojedinim slojevima ćelijskog zida, u odnosu na elementarne fibrile, predstavlja osnovu za razumevanje hemijskog i fizičkog ponašanja celuloznih vlakana i ćelija drveta [2].

Biosinteza celuloze podrazumeva formiranje celuloznih lanaca iz monomera glukoze, formiranje fibrila iz celuloznih lanaca i orijentaciju fibrila u ćelijskom zidu. U nastajanju celuloze glavnu ulogu igra kompleks enzima celuloza-sintetaza, tzv. terminalni kompleks ili rozeta. Ovaj enzim katalizuje vezivanje glukoze za neredukujući kraj molekula i na taj način produžava lanac celuloze. Svaki terminalni kompleks ima 6 subjedinica, a svaka se sastoji od 6 enzima koji proizvode 6 glukoznih lanaca [3, 4]. Kompleks se nalazi unutar spoljne ćelijske membrane, tako da su celulozni lanci direktno naslagani u ćelijskom zidu. Svi enzimi terminalnog kompleksa istovremeno sintetizuju paralelne celulozne lance koji, izvan terminalnog kompleksa, spontano kristališu u paralelnu strukturu celuloze I [5] (slika 1.1).

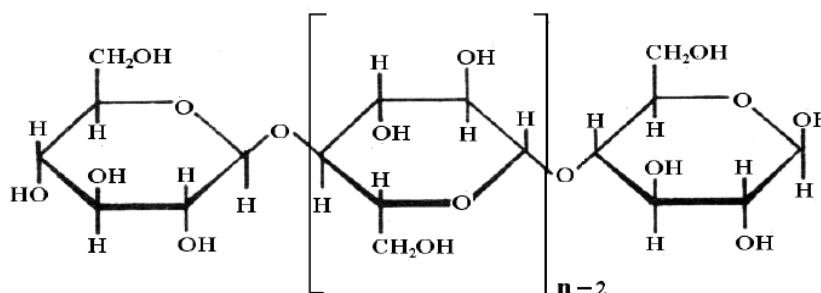
Celuloza kao materijal je vekovima široko korišćena u raznim praktičnim primenama. Međutim, njen hemijski sastav, struktura i morfologija su takođe vekovima bile nepoznate. Moderna istorija hemije celuloze je zapravo počela 1838. godine kada je francuski naučnik Anselme Payen [6] otkrio da su ćelijski zidovi skoro svih biljaka izgrađeni od iste supstance, kojoj je dao naziv *celuloza*. Od tada su činjeni brojni pokušaji da se utvrdi njena hemijska i fizička struktura. Mnogi naučnici su verovali da je celuloza izgrađena od nekoliko malih molekula glukoze ili celobioze, a samo mali broj naučnika je prihvatao premisu da je celuloza polimer [7]. Međutim, tek u 20-tom veku, pet godina nakon Haworth-ovog otkrića strukture celobioze [8], predložena je molekulska struktura od strane Sponser-a i Dore-a [9], 1926 godine. U njihovom radu su zanemarene neke esencijalne tačke diskusije, kao što je prostorni aranžman lanaca, ali je, bez obzira na to, taj rad bio osnova za praktično svaki model celuloze postavljen od tada.



Slika 1.1 Model kompleksa enzima celuloza-sintetaza iz koga nastaje kristalna celuloza I [4]

1.1. Molekulska struktura celuloze

Celuloza se može definisati kao polidisperzni linearni polimer poli- $\beta(1,4)$ -D-glukoze sa sindiotaktnom konfiguracijom [7]. Empirijska formula celuloze je $(C_6H_{10}O_5)_n$, a njena opšta formula može se prikazati kao na slici 1.2. Povezivanje molekula D-glukoze β -glikozidnom vezom između C1 i C4 omogućava linearno prostiranje makromolekula celuloze i određuje njena svojstva i konfiguraciju. Svaki drugi glukozidni ostatak u celuloznom lancu je zarotiran za 180° u ravni. Na ovaj način, dve susedne strukturne jedinice definišu disaharid celobiozu. S obzirom na to da se hidroksilne grupe na šestom ugljenikovom atomu dva susedna glukopiranozna prstena nalaze u *trans* položaju, celuloza je svrstana u sindiotaktne stereoregularne polimere.



Slika 1.2 Opšta formula celuloze [2]

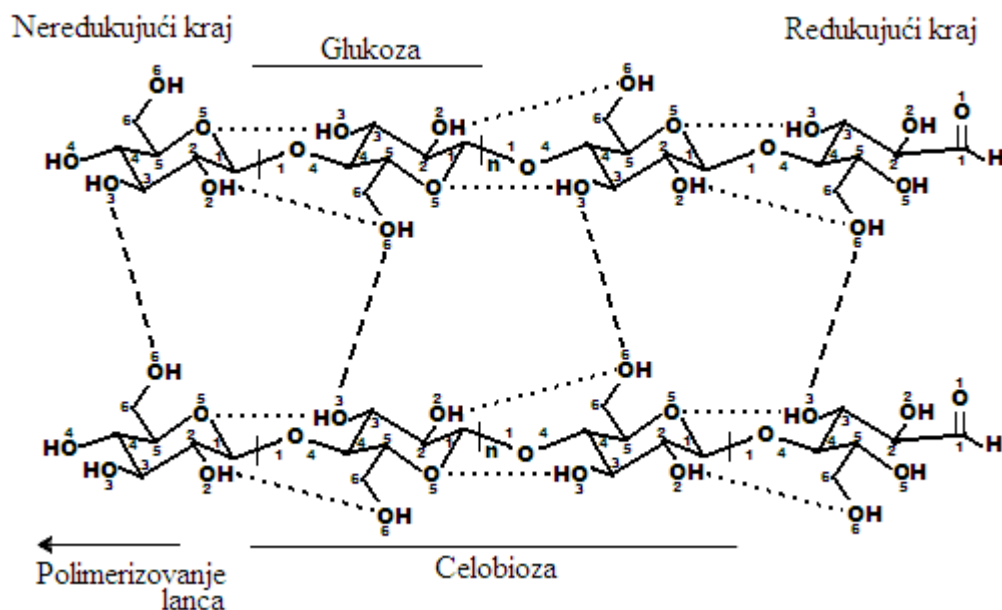
Svaka jedinica glukoze ($C_6H_{10}O_5$) u celulozi sadrži tri slobodne hidroksilne grupe, dve sekundarne, na drugom i trećem C-atomu, i jednu primarnu na šestom C-atomu. Sekundarne hidroksilne grupe ispoljavaju kiseli karakter i u znatnom stepenu disosuju, naročito hidroksilne grupe na drugom C-atomu. Prema polarnosti (ili reaktivnosti) u vodi, one se mogu poredati u sledeći niz: C2-OH > C6-OH > C3-OH [10]. Bez obzira na izvesne razlike u karakteru, sve tri hidroksilne grupe glukozidnih ostataka sposobne su za tipične reakcije OH grupa, kao što su eterifikovanje i esterifikovanje.

Svaki molekul celuloze sadrži dve različite krajnje grupe, zbog čega se može govoriti o usmerenosti lanaca (slika 1.3). Na jednom kraju lanca nalazi se D-glukozidna jedinica sa slobodnom C4-OH grupom (neredukujući kraj), a na drugom, ostatak glukoze sa slobodnom C1-OH grupom, koja je u ravnoteži sa aldehidnom strukturom (redukujući kraj) [11, 12].

U celulozi koja se koristi kao industrijska sirovina uvek se nalazi i izvesna količina keto, karboksilnih i metoksilnih grupa, u zavisnosti od izvora i postupka izolovanja celuloze [1, 2]. Smatra se da se makromolekul celuloze sastoji iz 99 % glukozidnih monomernih jedinica, a da se pored glukoze mogu naći ostaci ksiloze, manoze i glukuronskih kiselina [2].

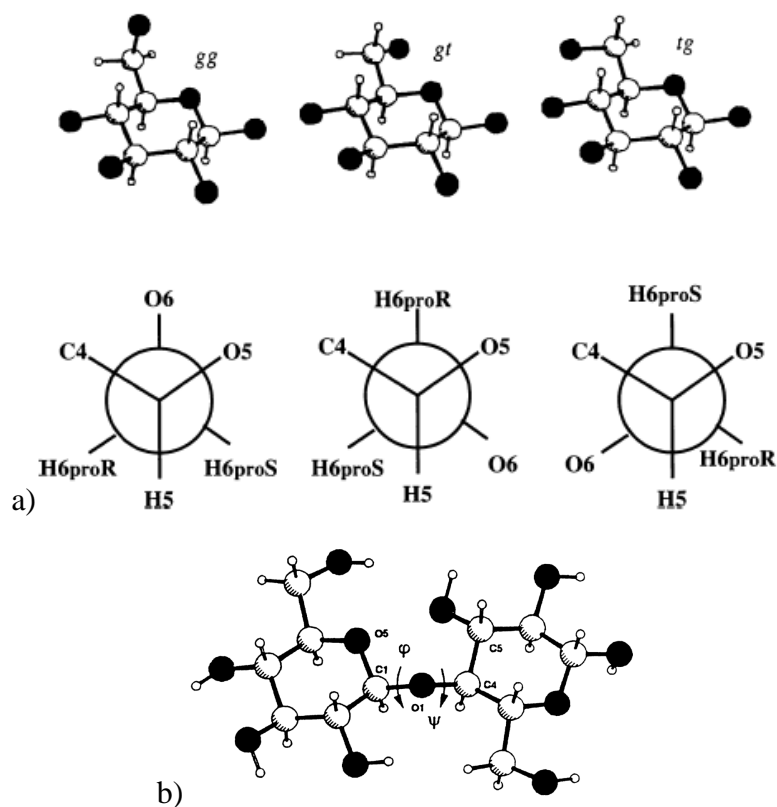
Monomerne jedinice celuloze imaju strukturu piranoznog prstena, što su pokazala ispitivanja pomoću difrakcije X-zraka i IC i NMR spektroskopije. Glukopiranozni prsten može da zauzme osam energetski povoljnih konformacionih oblika "stolice" i "kade", koji mogu da utiču na reakcionu sposobnost hidroksilnih grupa [13] i da predodrede polikristalnu strukturu celuloze. Utvrđeno je da ostaci D-glukoze usvajaju konformaciju 4C_1 stolice, oblik sa najnižom slobodnom energijom za molekul.

Zahvaljujući ekvatorijalnoj orijentaciji hidroksilnih grupa i njihovoj linearnoj strukturi, molekuli celuloze pokazuju izrazitu tendenciju da obrazuju intra- i intermolekulske vodonične veze (slika 1.3). Smatra se da celuloza ima u najboljem slučaju dve različite intramolekulske vodonične veze, jednu između OH-3 i O-5' susednog prstena (dužine 2,75 Å) i drugu između OH-6 i OH-2' (dužine 2,87 Å) kada je hidroksimetil grupa na poziciji C-6 u *tg* konformaciji [10, 14].



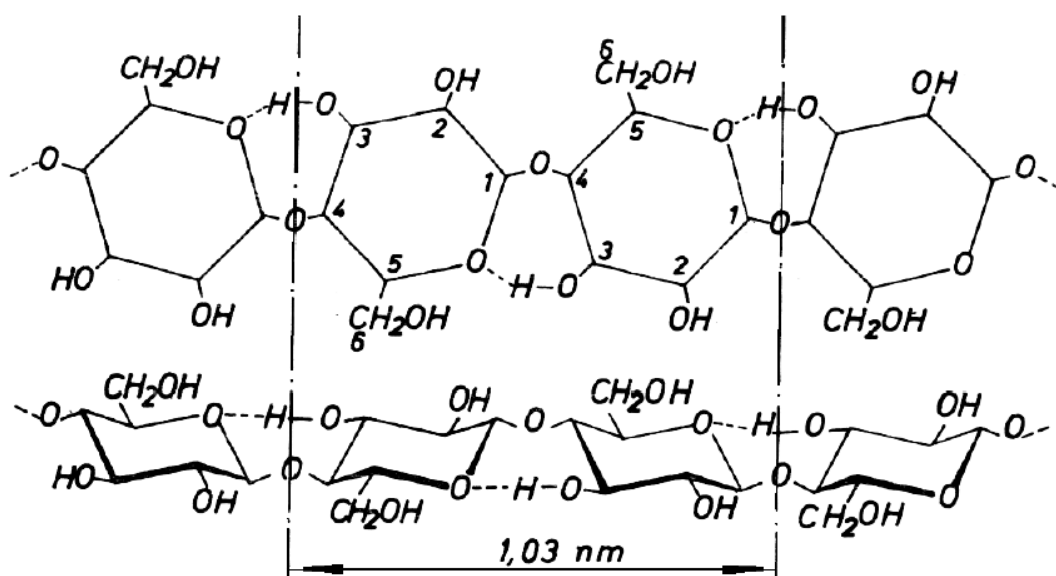
Slika 1.3 Struktura i intra (...) i intermolekulske (---) vodonične veze u celulozi I [2]

Konformacija hidroksimetil grupe je definisana sa dva slova, od kojih se prvo odnosi na torzioni ugao ($O5-C5-C6-O6$), a drugo na torzioni ugao ($C4-C5-C6-O6$). Na primer, idealna *gt* konformacija bi mogla biti definisana kao set od dva ugla, 60° i 180° . Na slici 1.4 prikazana su tri najverovatnija konformaciona položaja hidroksimetil grupa na C-6 atomu piranoznog prstena, kao i torzioni uglovi φ i ψ uz glikozidnu vezu. U celuloznom lancu konformacione varijacije uglavnom zavise od rotacija oko glikozidne veze.



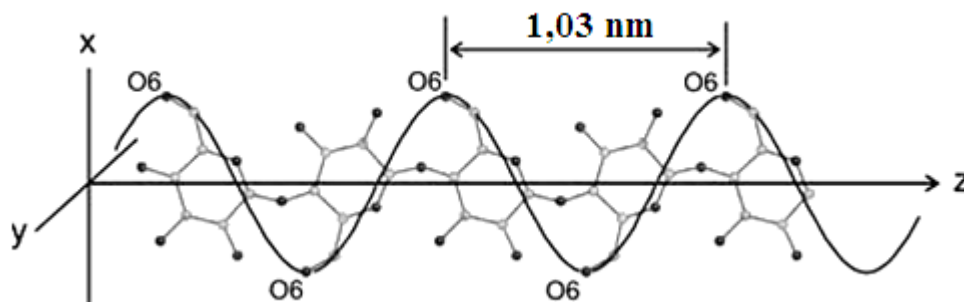
Slika 1.4 a) Šematski prikaz konformacija hidroksimetil grupe na C-6, *g* i *t* su skraćenice za *gauche* i *trans*; b) torzioni uglovi oko glikozidne veze [15]

Kao posledica 4C_1 konformacije i (1-4) glikozidne veze β -D-glukopiranoznih ostataka, struktura celuloznog lanca odgovara spirali drugog reda simetrije, sa periodom identičnosti od 10,36 Å (1,03 nm) [15]. Na slici 1.5 prikazan je "uvijeni" prostorni oblik makromolekula celuloze, u kome torzioni uglovi φ i ψ uz svaku glikozidnu vezu (C1-O1 i O1-C4) iznose -25° , odnosno $+146^\circ$. Ovakva orijentisanost glukopiranoznih ostataka omogućava stvaranje intramolekulske vodonične veze između OH grupe u položaju 3 i kiseonika u položaju 5' drugog ostatka, koja deluje tako da omogućava uvijanje makromolekula celuloze [2]. Ova veza obezbeđuje dodatnu stabilizaciju ($O_5 \cdots O_3$: 2,75 Å) i standardna je u celuloznim lancima sa simetrijom drugog reda, ali izostaje kada su druge manje stabilne konformacije dobijene pod različitim spoljnim uslovima [15].



Slika 1.5 Uvijeni prostorni raspored molekula celuloze po Hermans-u [13]

U saglasnosti sa shvatanjem spiralne strukture uvijenog makromolekula celuloze ustanovljeno je postojanje zavojne ose simetrije drugog reda (2_1). Zavojna osa povezuje svaki sledeći glukozni ostatak u lancu sa njegovim prethodnikom rotacijom za 180° oko ose molekula i translacijom za $\frac{1}{2}$ dužine perioda identičnosti duž ose molekula [16], kao što je prikazano na slici 1.6. Prema tome, za svaki atom sa koordinatama (x, y, z) postoji ekvivalentni atom sa koordinatama $(-x, -y, z + \frac{1}{2})$. Zbog 2_1 simetrije molekul celuloze ima oblik pljosnate trake.



Slika 1.6 Fragment celulozne spirale drugog reda, sa prikazanom "spiralnom niti" koja spaja O-6 atome. H-atomi nisu prikazani [16]

Istraživanja su pokazala da se 2_1 simetriji pokoravaju kristalne strukture celuloze I_β [17], celuloze II [18], celuloze III_I [19] i celuloze III_{II} [20]. Jedino celuloza I_α [21] ima prostornu grupu sa jednostavnijom simetrijom, P1, tako da je I_α jedini poznati oblik celuloze bez egzaktno spiralne simetrije. Iako je za ostale oblike kristalne celuloze 2_1 simetrija univerzalno prihvaćena, još uvek je otvoreno pitanje da li je 2_1 simetrija verovatan oblik izolovanog molekula celuloze (tj. konformacija veoma niske energije), ili je ta simetrija nametnuta na račun napona indukovanih u pojedinačnim molekulima kada se lanac pridružuje kristalnoj rešetki.

Pored toga što su odgovorne za zavojnu osu drugog reda, intramolekulske vodonične veze su osnovni uzrok relativne krutosti makromolekula celuloze. Krutosti lanca doprinosi i β -glikozidna veza, koja određuje linearnu prirodu lanca, i konformacija stolice piranoznog prstena [22]. Lanac celuloze zapravo nije tako krut; pre je sam molekul polusavrtljiv i može se smatrati relativno mobilnim. Molekuli međusobno reaguju i utiču jedni na druge, pri čemu su moguća dva načina stabilizacije za svaki molekul: po jednom načinu, pojedinačni molekul reaguje sa drugim molekulima, a zatim svaki molekul kompenzuje potencijalnu energiju radi stabilizacije, dok po drugom, najpre je potencijalna energija svakog molekula minimizovana, a nakon minimizovanja molekuli počinju da reaguju jedan sa drugim preko vodoničnih veza, van der Waals-ovih sila i interakcija dipolnog momenta [10].

Celuloza se, kao i drugi polimeri, sastoji iz linearnih makromolekula različitog stepena polimerizovanja i različite molekulske mase. Broj monosaharidnih jedinica u celulozi još uvek nije sa sigurnošću utvrđen. Problem utvrđivanja tačne dužine molekula potiče od niza faktora: vrste izvora, njegove starosti, načina izdvajanja, metode određivanja molekulske mase i sl.

Eksperimentalno određena molekulska masa celuloze kreće se od 300000-2500000 za nativnu celulozu iz pamuka, lana i ramije, i oko 30000-40000 za regenerisanu celulozu u hemijskim celuloznim vlaknima. Prema Staudinger-u, vrednost stepena polimerizovanja u biljnim vlaknima (pamuku, lanu, konoplji i ramiji) iznosi 2000-3000, a u regenerisanim celuloznim vlaknima, zavisno od postupka proizvodnje, 200-600 [2].

Verovatno je da nativne celuloze imaju srednji stepen polimerizovanja veći od 10000 ili srednju molekulsku masu blizu 2000000. Lan ima stepen polimerizovanja 36000, pamuk 10800, sulfidna celuloza 2-3000 i viskozni rejon 400 [14]. Delimičnom degradacijom lanca dobijaju se celulozni supstrati tipa mikrokristalne celuloze sa vrednostima stepena polimerizovanja između 150 i 300.

Dejstvom kiselina i celulazom katalizovanom hidrolizom, celuloza se može kvantitativno razgraditi do D-glukoze. Između monomera glukoze i celuloze postoji ključna razlika. Glukoza je u vodi rastvorljivi ugljeni hidrat sa mutarotacijom hidroksilne grupe na anomernom C-atomu [23], dok je celuloza nerastvorljivi polimer sa rigidnom mrežom vodoničnih veza. U suštini, sva svojstva glukoze se razlikuju od onih kod celuloze. Međutim, već celohexzoza, koja se sastoji od šest monomera, pokazuje nerastvorljivost u vodi, a njen ^{13}C NMR spektar je blizak spektru celuloze [24]. Glukan sa $\beta(1,4)$ -vezama koji se sastoji od 20-30 anhidroglukoznih jedinica koje se ponavljaju pokazuje sva svojstva celuloze [1].

Karakteristična svojstva celuloze koja potiču od molekulske strukture su: hidrofilnost, hiralnost, degradabilnost i široka hemijska raznovrsnost koju inicira visoka donorska reaktivnost OH grupa. Molekulska struktura je takođe osnova za prostrane mreže vodoničnih veza, koje celulozi omogućavaju da formira različite elemente strukture. Svojstva celuloze su, prema tome, određena hijerarhijom u nadmolekulskoj strukturi i organizaciji.

1.2. Nadmolekulska struktura celuloze

Intermolekulske vodonične veze, koje u velikom broju postoje između pojedinih OH grupa koje pripadaju ostacima glukoze različitih celuloznih lanaca, doprinose efikasnom pakovanju spiralno formiranih makromolekulskih nizova, što vodi obrazovanju karakterističnih pravilnih kristalnih struktura. Ovakvo efikasno pakovanje će izostati ukoliko u jednom ili više polisaharidnih nizova dođe do promene pravca niza, tako da već oformljena spirala izmeni karakteristike u jednom svom delu. Na ovaj način se objašnjava pojava amorfnih sekvenci u vlaknima celuloze [13]. Dakle, u celulozi se mogu razlikovati područja veće sredečnosti koja imaju kristalnu (ili blisku kristalnoj) strukturu i manje sredečene oblasti koje se smatraju amorfnim. Prisustvo kristalnih područja direktno je dokazano rentgenografskim metodama. Razlikuju se četiri glavna kristalna polimorfa celuloze: celuloza I, II, III i IV.

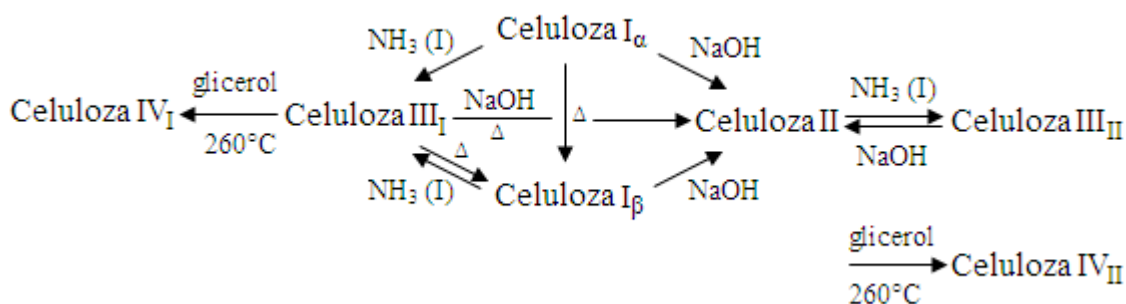
Celuloza I je nativna i sreće se u prirodnim vlaknima, kao što su pamuk, lan, ramija, juta i druga likina vlakna, algama, bakterijama, i može biti konvertovana u druge polimorfe različitim obradama. U okviru nativne celuloze koegzistiraju dva različita kristalna oblika, I_{α} i I_{β} . Oba oblika celuloze I imaju istu konformaciju molekulskih lanaca [25], ali različite sisteme vodoničnih veza [26]. Kristalni alomorf I_{α} je dominantan u celulozi algi i bakterija, dok u celulozi viših biljaka i celulozi animalnog porekla dominira I_{β} oblik [27]. Celuloza I_{α} je metastabilna i može biti ireverzibilno konvertovana u I_{β} oblik primenom visokih temperatura [28-30]. Svaki od alomorfa celuloze I može biti transformisan u celulozu II, bilo obradom alkalijama ili regenerisanjem iz rastvora [31, 32]. Osim toga, celuloza II se nalazi u prirodi kao proizvod sinteze nekih algi i bakterija [33].

Bubrenjem celuloze I ili celuloze II u tečnom amonijaku na -80°C ili nekim aminima kao što je etilendiamin i razlaganjem nastalog kompleksa, dobija se celuloza III. U zavisnosti od polazne celuloze, nastaje određeni tip celuloze III, celuloza III_I ili celuloza III_{II} , respektivno [34-36]. Na osnovu difrakcije X-zraka zaključeno je da su ova dva tipa međusobno veoma slična. Takođe, svaki tip celuloze III pokazuje strukturnu sličnost sa polimorfom celuloze iz koga je nastao. Konverzija u celulozu III je reverzibilna, tako da se polazni polimorf može dobiti obradom sa ključalom vodom ili hlorovodoničnom kiselinom. Takođe je moguće dobiti celulozu II iz celuloze III_I ili III_{II} obradom alkalijama, pri čemu je konverzija iz celuloze III_I ireverzibilna.

Obradom celuloze III_I , odnosno III_{II} u glicerolu na 260°C nastaje celuloza IV_I , odnosno IV_{II} [34, 37], ali je u većini slučajeva ova transformacija samo delimična [38]. Ova dva tipa celuloze IV, kao i polimorfi celuloze III, imaju skoro identične jedinične ćelije. Difrakcijom X-zraka otkriveno je da celuloza IV_I postoji u primarnom zidu pamučnih vlakana i nekih drugih vrsta sa primarnim zidom [39] i veruje se da je celuloza IV_I zapravo slabo sređeni oblik celuloze I.

Na slici 1.7 dat je zbirni prikaz interkonverzije između različitih polimorfa celuloze.

Merenjem modula elastičnosti E_l kristalnih oblasti polimorfa celuloze u pravcu paralelnom sa osom lanca, dobijene su vrednosti od 138, 88, 87, 58 i 75 GPa za celulozu I, II, III_I , III_{II} i IV_I , respektivno, koje ukazuju na međusobnu potpunu različitost ovih polimorfa u mehaničkom smislu [40].

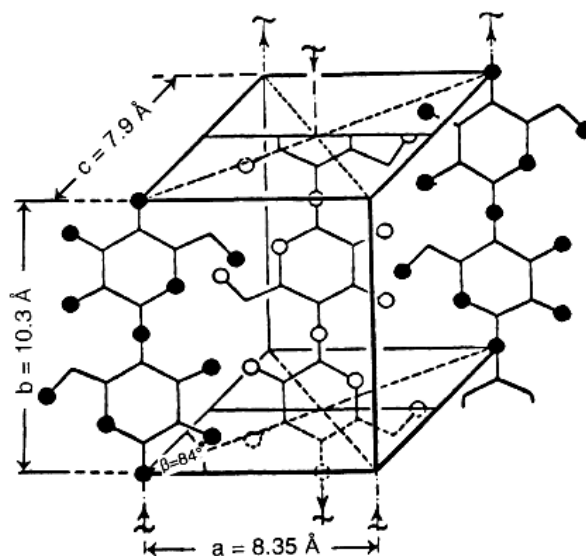


Slika 1.7 Različiti polimorfi celuloze i njihove transformacije [14]

Pre otkrića kristalnog dimorfizma celuloze, većina kristalografskih proučavanja bila je usmerena na određivanje osnovne jedinične ćelije. Kontroverze u vezi sa dimenzijama jedinične ćelije celuloze I i prostornom grupom (za koju se verovalo da je jedinstvena), trajale su dugi niz godina uprkos zapažanjima od strane istraživača da postoje značajne varijacije u intenzitetu difrakcija u zavisnosti od porekla uzorka. Iz tog razloga, u literaturi se sreće veliki broj protivurečnih eksperimentalnih podataka i strukturnih modela.

Prvi objavljeni izveštaj o nadmolekulskoj strukturi native celuloze (celuloze I) [41] prethodio je određivanju molekulske strukture, samo godinu dana nakon otkrića difrakcije X-zraka [42] i iste godine kada je ona prvi put primenjena od strane Bragg-a [43], tj. 1913 godine. Rasvetljavanje kristalne strukture celuloze počelo je radovima Sponser-a i Dore-a (1926. godine), koji su predložili jediničnu ćeliju sa jednim lancem. Prema ovom modelu, duž lanca se naizmenično smenjuju (1-1) i (4-4) veze [9].

Prvi podesan model za nativnu celulozu predložili su Meyer i Mark 1928. godine [44] na osnovu rentgenograma celuloze iz ramije. Oni su predložili monokliničnu jediničnu ćeliju ($a = 8,35 \text{ \AA}$, $b = 7,0 \text{ \AA}$ i $c = 10,3 \text{ \AA}$ (osa vlakna), $\gamma = 84^\circ$) koja je dugo služila kao referentna tačka. Elementi simetrije u prostornoj grupi $P2_1$ su u saglasnosti sa spiralnom simetrijom drugog reda celuloznog lanca, tako da je predložen strukturni model u kome su lanci bili antiparalelno orijentisani. Model celuloze I sa izvesnim izmenama objavili su Meyer i Misch 1937. godine [45]. Jedinična ćelija proizašla iz ovih istraživanja (slika 1.8) još uvek se koristi u edukacione i praktične svrhe.

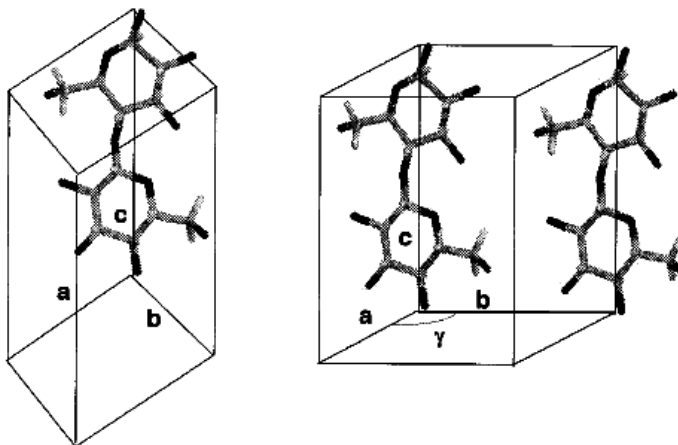


Slika 1.8 Meyer i Misch-ov model celuloze I (b-osa vlakna, β -ugao kristalne rešetke) [45]

Ispitivanja kristalne strukture celuloze sredinom 70-tih godina prošlog veka dovela su do modifikacije ovog modela, pre svega u orijentaciji lanaca u kristalnoj rešetki, za koju je zaključeno da je paralelna [46, 47], tj. da su lanci u istom kristalu orijentisani u istom smeru. Sa druge strane, ispitivanja strukture celuloze alge *Valonia* su ukazala na prostornu grupu P1 i trikliničnu jediničnu ćeliju [46, 48].

Nakon otkrića Atalla i VanderHart-a 1984. godine da se nativna celuloza sastoji od dve različite kristalne faze I_α i I_β , na osnovu ^{13}C -CP/MAS NMR spektroskopskih ispitivanja [49, 50], usledio je niz istraživačkih projekata sa ciljem određivanja kristalne strukture i svojstava pojedinačnih alomorfa, kao i procedure za njihovu interkonverziju [51, 52].

Razmatranjem prostornih grupa i organizacije lanaca, zaključeno je da celulozi I_α odgovara triklinična jedinična ćelija sa jednim lancem, a da celuloza I_β ima monokliničnu jediničnu ćeliju koja sadrži dva paralelna lanca [53, 54]. Prostorni aranžman molekula u jediničnim ćelijama prikazan je na slici 1.9. Postoje dva tipa paralelnog prostornog aranžmana, "parallel-up" i "parallel-down". U jediničnim ćelijama celuloze I_α i I_β lanci su upakovani na "parallel-up" način [55], što znači da atom kiseonika u glukopiranoznom prstenu (O5) ima veću vrednost z koordinate u odnosu na njemu najbliži atom ugljenika (C5), tj. da je redukujući kraj u pravcu c ose.



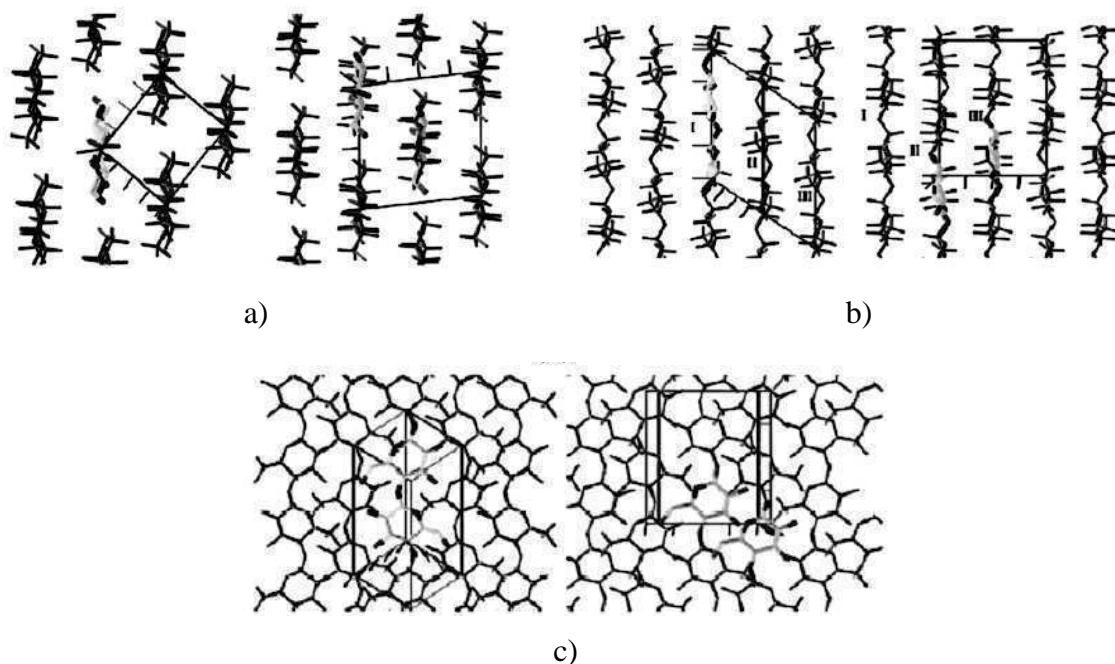
Slika 1.9 Šematski prikaz načina pakovanja lanaca u jediničnoj ćeliji celuloze. Levo: triklinična jedinična ćelija celuloze I_α ; desno: monoklinična jedinična ćelija celuloze I_β [55]

Triklinična jedinična ćelija ima jednolančanu P1 strukturu, sa susednim molekulima koji su pomereni za 1/4 veličine jedinične ćelije u c pravcu [54]. U monokliničnom sistemu sa dva lanca po jediničnoj ćeliji, ugaoni lanac je pomeren za $c/4$ u odnosu na centralni lanac, tako da celokupna konfiguracija pokazuje nepodudarnost susednih lanaca.

Razvoj novih metoda i tehnika, kao što je sinhrotron i neutron difrakcija, omogućio je da se razjasne kristalna struktura i sistem vodoničnih veza u celulozi I_α [21] i I_β [17]. U tabeli 1.1 dati su parametri jedinične ćelije celuloze I_α i I_β , a na slici 1.10 njihove različite projekcije.

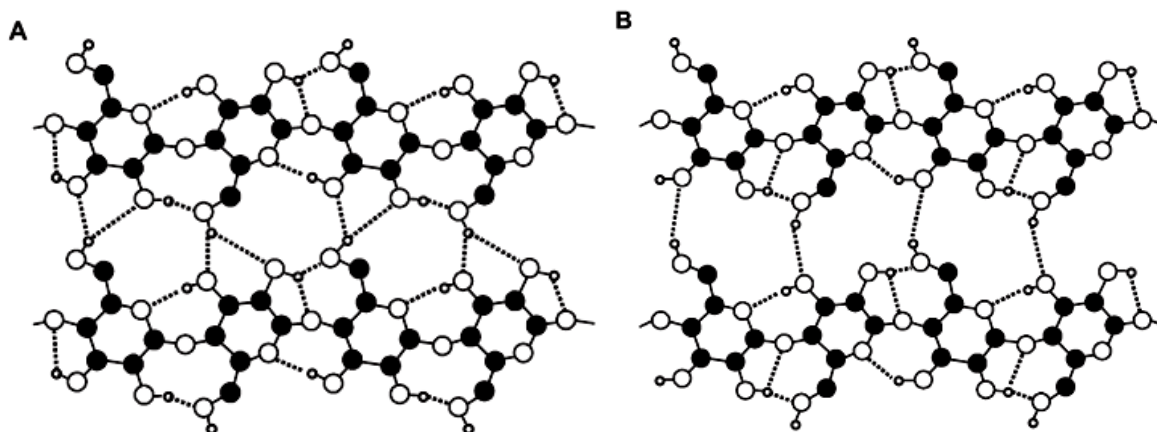
Tabela 1.1 Parametri jedinične ćelije celuloze I_α [21] i I_β [17]

Tip	Prostorna grupa	Broj lanaca	Dimenzije jedinične ćelije (Å, °)					
			a	b	c	α	β	γ
I_α Triklinična	P1	1	6,717	5,962	10,400	118,08	114,80	80,37
I_β Monoklinična	P2 ₁	2	7,784	8,201	10,380	90	90	96,5



Slika 1.10 Jedinične ćelije celuloze I_α (levo) i I_β (desno) u različitim projekcijama: a) duž ose lanca, b) vertikalno na osu lanca i c) vertikalno na slojeve [21]

U celulozi I_β, dva lanca čije se konformacije neznatno razlikuju su u monokličnoj jediničnoj rešetki. Svaki lanac leži na osi simetrije P2₁ koja zahteva da susedni glukozni ostaci u istom lancu budu identični. U celulozi I_α postoji jedan lanac u trikličnoj jediničnoj ćeliji. Sve hidroksimetil grupe usvajaju *tg* konformaciju, što omogućava obrazovanje intramolekulskih vodoničnih veza u koje su uključene O2 i O6 grupe, koje interaguju na više načina. Dakle, pored intramolekulске vodonične veze O3-H---O5, oba alomorfa celuloze I poseduju intramolekulsku vezu O2-H---O6, ali je ona kraća u celulozi I_α [17]. Kada je u pitanju intermolekulska vodonična veza O6-H---O3, koja leži u ravni molekulskog sloja celuloze, kod oba alomorfa postoji izvesna nesređenost sa ovom vezom. Naime, O6 može da deluje kao akceptor i, u nekim slučajevima, postoji sklonost ka obrazovanju O2-H---O6 intermolekulске vodonične veze [17, 21]. Na slici 1.11 prikazani su sistemi vodoničnih veza u celulozi I_α i I_β, dobijeni na osnovu kristalnih struktura koje su odredili Nishiyama i saradnici [17, 21].



Slika 1.11 Sistemi vodoničnih veza u celulozi I_α (A) i I_β (B). Oznake atoma: ugljenik (●), kiseonik (○) i deuterijum (◊) [56]

Konformacija anhidroglukoznih ostataka i $\beta(1,4)$ -veze su molekulske karakteristike koje prave razliku između celuloze I_α i I_β [57]. Kao što je rečeno, atomi O2 i O6 pokazuju višestruke mogućnosti obrazovanja vodoničnih veza. To može biti razlog što su O2 i O6 najreaktivniji od hidroksilnih grupa na površini kristala celuloze. Sa druge strane, atomi O3 su praktično nereaktivni zbog jačine intramolekulske O3-H...O5 veze [58].

Intermolekulske vodonične veze u celulozi su odgovorne za slojevitost prirode native celuloze. Celulozni lanci su organizovani u slojeve koji su upakovani na "parallel-up" način. Kako između makromolekula susednih slojeva (paralelnih ravni) nema vodoničnih veza, stabilnost strukture kristalne rešetke celuloze I pripisuje se van der Waals-ovim silama. Struktura celuloze I, koju karakterišu jake vodonične veze u ravni lanaca, a slabe privlačne sile između njih, idealna je za ulogu koju celuloza ima u zidovima biljnih ćelija [2].

Celuloza I_α je termodinamički manje stabilna od celuloze I_β , s obzirom na to da ima manju gustinu [54] i da zagrevanjem prelazi u stabilnu I_β fazu. Energija "pakovanja" faze I_α je veća u odnosu na I_β fazu, čime se objašnjava ireverzibilnost transformacije I_α u I_β . Rezultati FTIR analize su pokazali da su neke vodonične veze paralelne sa osom lanca celuloze reorganizovane tokom transformacije [54].

U bifaznim celuloznim sistemima koji sadrže značajne količine I_α i I_β faze, postavlja se pitanje preciznog ultrastrukturnog lociranja svake faze. U celulozi iz ćelijskog zida zelene alge *Microdictyon*, I_α i I_β domeni se naizmenično smenjuju, na kratkim rastojanjima, duž svakog mikrofibrila [54]. U slučaju alge *Valonia*, I_α i I_β domeni se smenjuju i popreko i duž mikrofibrila [59, 60].

U prirodi nije pronađen čist oblik celuloze I_α . Udeo ovog oblika celuloze varira od 64 % u algi *Valonia* i bakterijskoj celulozi, do 20 % u celulozi ramije i pamuka [61]. Sa druge strane, *tunicin* poseduje jedino oblik I_β . Odnos dva različita kristalna alomorfa I_α i I_β u nativej celulozi zavisi od porekla celuloze, ali ne utiče na kristalnost. Na primer, celuloza alge *Valonia*, koja je izuzetno visokog stepena kristalnosti, sadrži oblike I_α i I_β u odnosu od oko 60 % prema 40 % [62], dok celuloza animalnog porekla iz *Halocynthia*, približno istog stepena kristalnosti kao *Valonia*, sadrži ne više od 10 % celuloze I_α [63].

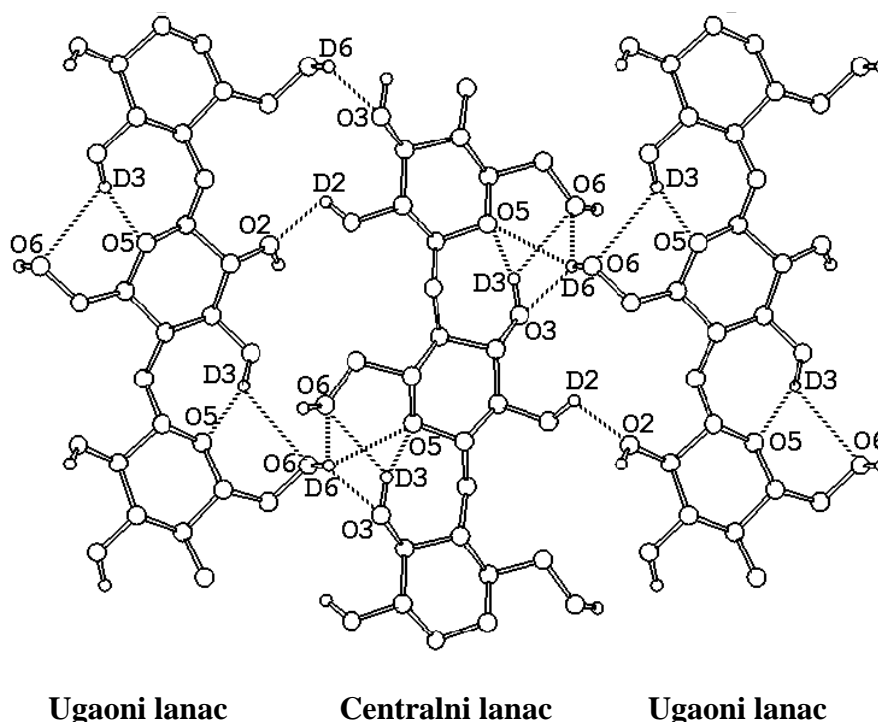
Postojanje I_α i I_β alomorfa u uzorcima celuloze može uticati na reaktivnost native celuloze s obzirom na to da je I_α metastabilna, a time i reaktivnija od I_β oblika. Dakle, njihova različita stabilnost može dovesti do toga da je oblik I_α centar inicijalne reakcije u mikrofibrilima [64].

Preliminarni rad na celulozi II od strane Andress-a 1929. godine [65], predstavio je jediničnu ćeliju sa dva molekula. Međutim, rezultati difrakcije X-zraka za celulozu II bili su manje pouzdani od onih za celulozu I zbog velikog broja difrakcionih intenziteta koji su se međusobno preklapali [66]. Ispitivanja pomoću difrakcije neutrona usmerila su pažnju na veću jediničnu ćeliju koja sadrži osam molekula i simetriju koja je bila bliska $P2_1$ [67]. Jedinične ćelije celuloze II dobijene mercerizovanjem i regenerisanjem su međusobno veoma slične, ali postoje i izvesne razlike. Tako, parametar a za regenerisanu celulozu ramije iznosi 8,662 Å, a za mercerizovanu 8,588 Å. Slično, mercerizovana celuloza ima veću vrednost ugla γ od većine regenerisanih uzoraka [68]. Treba naglasiti da važnu ulogu ima stepen čistoće korišćenih uzoraka i da regeneracija daje viši nivo konverzije celuloze I u celulozu II [31].

Proučavanja molekulske i kristalne strukture celuloze II dovela su do modela koje su nezavisno objavili Kolpak i Blackwell [31] i Stipanovic i Sarko [69] 1976. godine. Oba modela definišu celulozu II kao monokličnu jediničnu ćeliju sa dva antiparalelna celulozna lanca. Značajna karakteristika ove dve strukture je da dva lanca jedinične ćelije imaju različite konformacije hidroksimetil grupa. Prema Kolpak-u i Blackwell-u, sve hidroksimetil grupe "up" lanca lociranog u uglu jedinične ćelije bile su orijentisane blisko gt položaju, dok su hidroksimetil grupe "down" centralnog lanca bile blizu tg položaja. Ovakva situacija ukazuje

na zaključak da duž ugaonog lanca postoji samo jedan tip intramolekulske vodonične veze, a da se dva različita tipa ove veze javljaju duž centralnog lanca [70].

Celuloza II pripada prostornoj grupi $P2_1$ sa parametrima jedinične ćelije $a = 8,10 \text{ \AA}$, $b = 9,03 \text{ \AA}$, $c = 10,31 \text{ \AA}$ i monokliničnim uglom $\gamma = 117,10^\circ$ [18]. Molekulskim modelovanjem određeno je da energija pakovanja celuloze II iznosi $-21,4 \text{ kcal/mol}$, upotrebom "ring" metode [71]. Ovaj metod je takođe predvideo *gt* konformaciju hidroksimetil grupe, u saglasnosti sa ^{13}C NMR rezultatima i tehnikama difrakcije elektrona [32, 71-73]. Primenom neutron difrakcione tehnike, Langan i saradnici su izvršili reviziju modela i ukazali da bi se mali deo *tg* konformacije mogao naći u centralnom lancu [32]. Na slici 1.12 dat je šematski prikaz vodoničnih veza u celulozi II.



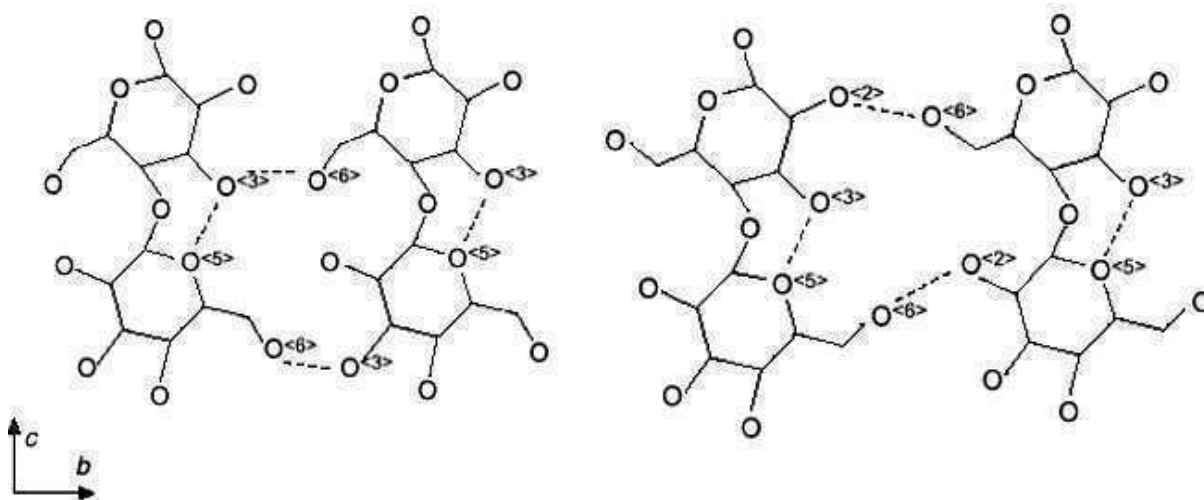
Slika 1.12 Vodonične veze u celulozi II [32]. Labilni atomi vodonika zamenjeni su atomima deuterijuma (D)

Za navodne intramolekulske vodonične veze je pronađeno da su razgranate, sa izraženom komponentom između O3 i O5, a neznatnom između O3 i O6. Atom O6 ugaonog lanca i za njega vezan H atom su u poziciji da se ponašaju kao donori prema trima mogućim akceptorskim atomima centralnog lanca (glavna komponenta O6---O6 i dve minorne komponente, O6---O5 i O6---O3). Jedno objašnjenje za ovakav sistem vodoničnih veza je u vezi sa nesređenošću hidroksimetil grupa. Smatra se da je ovakva organizacija pre statistički efekat (zbog moguće *gt* i *tg* konformacije O6) nego sistem vezivanja koji zaista postoji u celulozi II [74].

Razmatranjem rezultata analize struktura regenerisane i mercerizovane celuloze, uočene su male razlike između njihovih struktura, koje mogu biti u vezi sa velikim razlikama u količini nesređenih hidroksimetil grupa na centralnom lancu: $\sim 30 \%$ za regenerisanu celulozu i $\sim 10 \%$ za mercerizovanu celulozu [74].

Da u celulozi II postoji kompleksniji sistem vodoničnih veza od onog u celulozi I, dokazuje veća termodinamička stabilnost celuloze II i ireverzibilnost promene celuloze I u celulozu II [2]. Razlika između celuloze I i II naznačena je na slici 1.13. Intramolekulska

vodonična veza O3-H---O5 postoji kod oba polimorfa i odgovorna je za rigidni, linearni oblik pojedinačnog lanca celuloze. Razlika se javlja kod intermolekulskih vodoničnih veza: O6-H--O3 veza je dominantna u celulozi I, dok je O6-H---O2 glavna intermolekulska vodonična veza u celulozi II. Zapravo, O6-H---O2 vezu obrazuju ugaoni lanci, dok centralni celulozni lanci formiraju O6-H---O3 intermolekulsku vodoničnu vezu. Dodatna razlika u celulozi II je interakcija između susednih slojeva O2-H (ugaoni lanac)---O2 (centralni lanac), koja ne postoji u nativnoj celulozi [64]. Prema Fengel-u i saradnicima [75], transformacija celuloze I u celulozu II određena je raskidanjem i ponovnim formiranjem intermolekulskih i intramolekulskih vodoničnih veza.

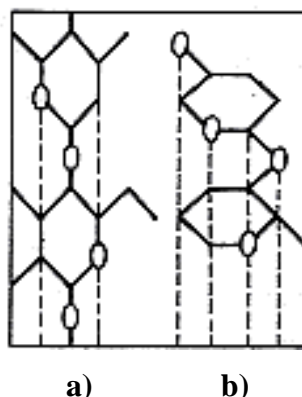


Slika 1.13 Razlika u vodoničnim vezama između celuloze I (levo) i celuloze II (desno) [64]

Celuloza II, nastala putem rekristalisanja, bilo obradom celuloze I alkalijama ili regenerisanjem iz rastvora, termodinamički je stabilnija od nativne celuloze zbog oslobađanja energije u procesu njenog nastajanja, koje je praćeno porastom entropije. Porast entropije ukazuje na manju sredeñost strukture celuloze II u odnosu na strukturu celuloze I, što je posledica antiparalelne orijentisanosti makromolekula koji se nalaze u susednim paralelnim ravnima [2].

Alkalizacija celuloze je od velikog značaja za komercijalnu proizvodnju celuloze kao metod za povećanje reaktivnosti (aktivacije) celuloze za naredne reakcije, kao i za mercerizaciju pamuka. Celulozu I je moguće konvertovati u razne kristalne alkalne forme koje imaju različite kristalne strukture i promenljiv sadržaj NaOH i vode. Sve forme prelaze u kristalnu hidratcelulozu tokom ispiranja i u celulozu II putem sušenja. Još uvek je nejasno kako paralelno upakovani lanci celuloze I prelaze u antiparalelnu orijentaciju celuloze II bez intermedijarne disperzije molekula celuloze [1].

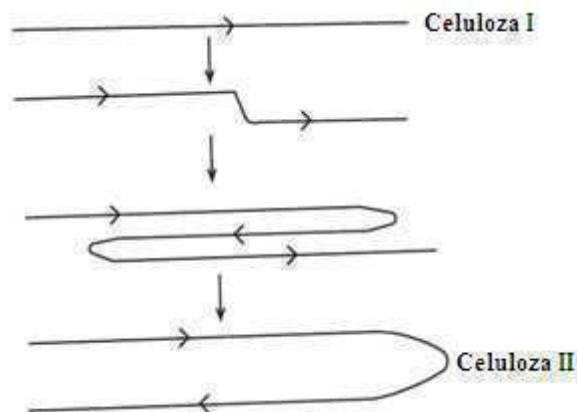
Pri obradi celuloze alkalijama, kristalografska ćelija celuloze se menja zbog toga što piranozni prstenovi u makromolekulu prelaze iz strukture vertikalnog cik-cak rasporeda (celuloza I) u strukturu sa vertikalno-horizontalnim rasporedom cik-cak konformacije (celuloza II). Razlika između navedenih strukturnih modifikacija celuloze, prikazana na slici 1.14, sastoji se u pomeranju nekih susednih slojeva molekulskih nizova poprečno na osu vlakna u toku obrade alkalijama [2].



Slika 1.14 Šema raspodele celobioznih ostataka u molekulu celuloze I i II: a) vertikalni raspored u celulozi I; b) kombinovani raspored u celulozi II [2]

Prema predloženom mehanizmu konverzije celuloze I u celulozu II [69], prilikom bubrenja agens ruši jediničnu ćeliju celuloze I razdvajajući slojeve lanaca orijentisanih u istom smeru. Nakon uklanjanja agensa, posmatrana ravan (sloj) ne može da se rekombinuje sa prethodnim susedima, već sa slojevima susednih elementarnih fibrila. Kristalizacija antiparalelnih slojeva odigrava se znatno brže od rekristalizacije paralelnih, s obzirom na to da je struktura celuloze II energetski stabilnija od celuloze I.

Istraživanjem mogućih konformacija segmenta celuloznog lanca, pokazano je da dva pravolančana segmenta od deset disaharidnih jedinica, antiparalelno upakovana, obezbeđuju dovoljno privlačnih interakcija kako bi indukovali oštro savijanje celuloze II, što može stvoriti mogućnost za prelaz iz paralelne celuloze I u antiparalelnu celulozu II [64, 76]. Na slici 1.15 prikazana je šema sukcesivnih koraka u transformaciji paralelne celuloze I u antiparalelnu celulozu II.



Slika 1.15 Šematski prikaz sukcesivnih faza transformacije antiparalelne celuloze II iz paralelne celuloze I [64]

Vlakna iz nativne i regenerisane celuloze sadrže veliko učešće sredenih područja. Odnos učešća kristalnih područja prema ukupnoj masi supstance, tj. stepen kristalnosti, određuje svojstva prirodnih celuloznih vlakana, polazne tehničke celuloze i gotovih hemijskih vlakana.

Prema rentgenografskim podacima, stepen kristalnosti pamuka je veći od 0,70, pamučnog lintersa oko 0,73, koji posle mercerizovanja pada na 0,40. Stepem kristalnosti lana se kreće od 0,80-0,85, a viskoznih vlakana od 0,31-0,50. Mikrokristalna celuloza zbog

udaljavanja amorfnih područja ima stepen kristalnosti do 0,9, a stepen polimerizovanja između 150-200, što odgovara dužini od 70-90 nm [2].

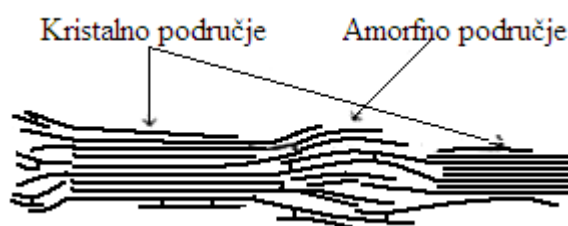
O obliku i veličini kristala postoje mnoge informacije. Pretpostavlja se da su pločastog oblika, a ispitivanjem njihove veličine dobijene su prosečne vrednosti dimenzija kristala, koje za celulozu I iznose $60 \times 10 \times 3$ nm, a za celulozu II, $30 \times 10 \times 3$ nm. Poznavanje dimenzija kristala omogućava da se izvedu zaključci o pristupačnosti hidroksilnih grupa na površini kristala i elementarnih fibrila i da se razjasni obim reakcije izmene vodonika iz hidroksilne grupe sa deuterijumom ili sorpcija vode. Takođe, određivanje orijentisanosti i dužine kristalita omogućava da se dobiju podaci o srednjoj veličini pora i šupljina u celuloznim vlaknima, čime se mogu i objasniti razlike u pristupačnosti za hemijske agense [2].

Gustina celuloznih kristala je u vezi sa strukturom supstance. Gustina kristalne celuloze, određena u pojedinačnom kristalu, iznosi $1,59 \text{ g/cm}^3$, dok gustina celuloze čistih prirodnih vlakana dostiže samo $1,55 \text{ g/cm}^3$ [77]. Manja gustina nađena u prirodnim vlaknima može se pripisati prisustvu amorfnosti ili manje srede celuloze [64].

Amorfna celuloza se razlikuje od kristalne celuloze po strukturi i svojstvima. Lanci u amorfnoj celulozi se drže zajedno pomoću izotropnih intermolekulskih vodoničnih veza, ostvarenih preko hidroksilnih grupa u položajima C-2 i C-3, što kao rezultat daje nasumično raspoređene domene [78]. Na osnovu NMR i difrakcije X-zraka otkriveno je da lanci u amornim područjima nisu pravi i da nemaju određenu orijentaciju kao u kristalnoj celulozi. Umesto toga, oni imaju savijen i uvijen skelet, a molekuli imaju konformaciju nasumičnog klupka [73, 79, 80].

Kristalna i amorfna područja se naizmenično smenjuju duž fibrila (slika 1.16).

Za razliku od kristalnih područja koja su sređena, rigidna, inertna i relativno nepropusna za vodu, amorfna područja su nasumična, fleksibilna i pristupačna za vodu [81]. Dok su kristalne oblasti nosioci postojanosti nadmolekulske strukture i određuju njenu stabilnost prema temperaturi i drugim uticajima, od strukture amornih područja zavise destrukcione karakteristike, jačina proizvoda, vrsta i brzina odigravanja destruktivnih procesa, ponašanje pri bubrenju i druga svojstva.

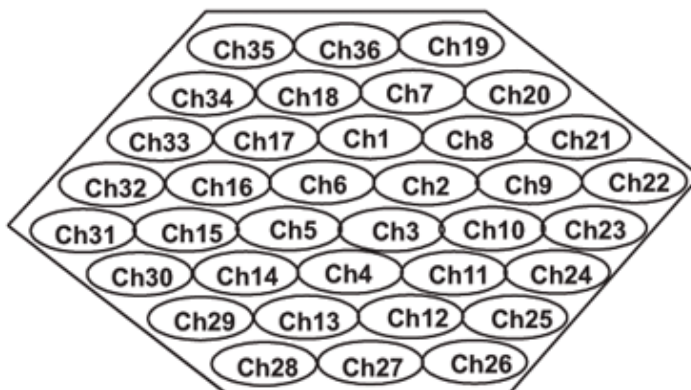


Slika 1.16 Detalj fibrila sa kristalnim i amornim područjima

Celulozni lanci su organizovani u elementarne fibrile, čije poprečne dimenzije iznose 3-20 nm, u zavisnosti od izvora celuloze, a dužina više hiljada nanometara i oni su skup elementarnih kristalita koji su međusobno povezani molekulima celuloze u jednom istom fibrilu [2].

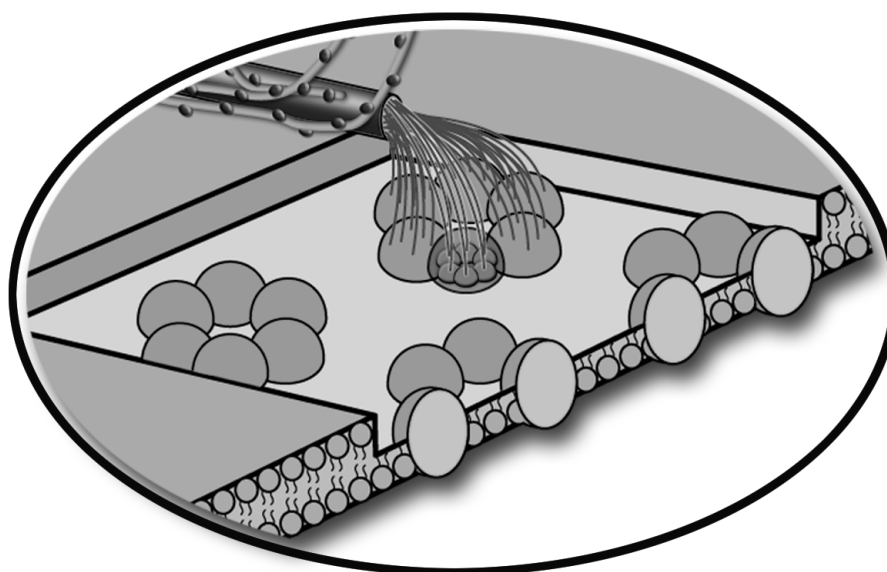
Nedavno je predložen strukturni model elementarnog fibrila na osnovu direktne vizuelizacije primarnog ćelijskog zida ćelija parenhima kukuruza, primenom AFM-a [3]. Prema ovom modelu, 36 lanaca glukana formira kristalne i subkristalne strukture, a raspoređeni su u tri grupe na osnovu njihove lokacije (slika 1.17). Prva grupa, koja predstavlja centralno, pravo kristalno jezgro, sastoji se od 6 lanaca (Ch1-6) koji formiraju heksagonalni poprečni presek. Za ovu grupu se smatra da je potpuno kristalna. Druga grupa uključuje lance

koji su direktno povezani sa kristalnim jezgrom i čine je 12 subkristalnih lanaca (Ch7-18). Konačno, treća grupa uključuje 18 subkristalnih ili nekristalnih lanaca lociranih na površini kristala (Ch19-36). Druga i treća grupa formiraju zaštitu i prelazne faze između kristalnog jezgra i naknadno naslaganih nekristalnih polimera.



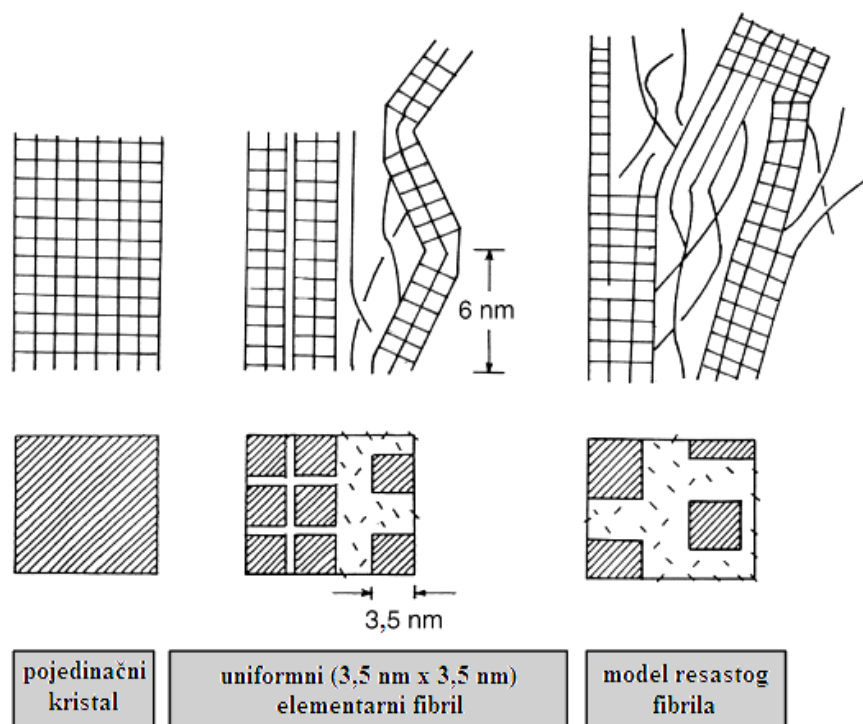
Slika 1.17 Poprečni presek elementarnog fibrila sa 36 lanaca. Lanci su numerisani od Ch1 do Ch36 i kategorizovani u tri grupe: grupa C1 (Ch1-6) sadrži 6 kristalnih lanaca, grupa C2 (Ch7-18) sadrži 12 subkristalnih lanaca i grupa C3 (Ch19-36) sadrži 18 subkristalnih ili nekristalnih lanaca [3]

Elementarni fibrili nastaju koordinisanom sintezom celuloznih lanaca koja se dešava na specifičnim mestima u plazmatičnoj membrani, gde enzimski kompleks celuloza-sintetaze sintetizuje glukozne lance jedan pored drugog, pre nego što nastupi kristalizacija. Svaki kompleks celuloza-sintetaze (poznat i kao terminalni kompleks ili rozeta), koji se sastoji od 6 subjedinica, a svaka subjedinica od 6 celuloza-sintetaza izoforma, proizvodi ukupno 36 glukoznih lanaca [3, 4] (slika 1.18). Ovaj proces je visoko organizovan i omogućava formiranje celuloze I umesto celuloze II. Pored toga, zahvaljujući ovako organizovanom procesu, izbegnuto je formiranje nekristalne celuloze I [82].



Slika 1.18 Kompleks enzima celuloza-sintetaza [83]: 36 izoforma celuloza-sintetaze, organizovani u 6 subjedinica, sintetizuju 36 glukoznih lanaca koji izgrađuju elementarni fibril

Više ili manje sređenim slaganjem elementarnih fibrila nastaje mikrofibril¹ i makrofibril i najzad "resasti fibril" iz koga krajevi molekula štrče kao rese, koji čini osnovu strukture prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana [2]. Model resastog fibrila sa kristalnim oblastima različitih dimenzija (kristaliti) i nekristalnim oblastima pokazao se uspešnim za opisivanje strukture mikrofibrila i delimične kristalne strukture celuloze koja je u vezi sa reaktivnošću ovog polimera [84] (slika 1.19).



Slika 1.19 Modeli nadmolekulske strukture mikrofibrila celuloze [1]

Fibrili u vlaknu su međusobno povezani međumolekulskim vezama prohodnih molekula i obrazuju novi strukturni nivo koji se naziva morfologijom vlakna. Morfologija vlakana zavisi od fibrilne strukture i uopšte od strukturne organizovanosti na nadmolekulskom nivou, od geometrije vlakana i od uslova njegovog nastanka. Nadmolekulska struktura vlakana utiče na reaktivnost celuloze, pristupačnost celuloze za hemijske agense, pristupačnost celuloze za mikroorganizme i tekstilna svojstva, naročito celuloznih hemijskih vlakana. Navedena svojstva su utoliko jače izražena ukoliko je veća poroznost i prečnik pora u vlaknima.

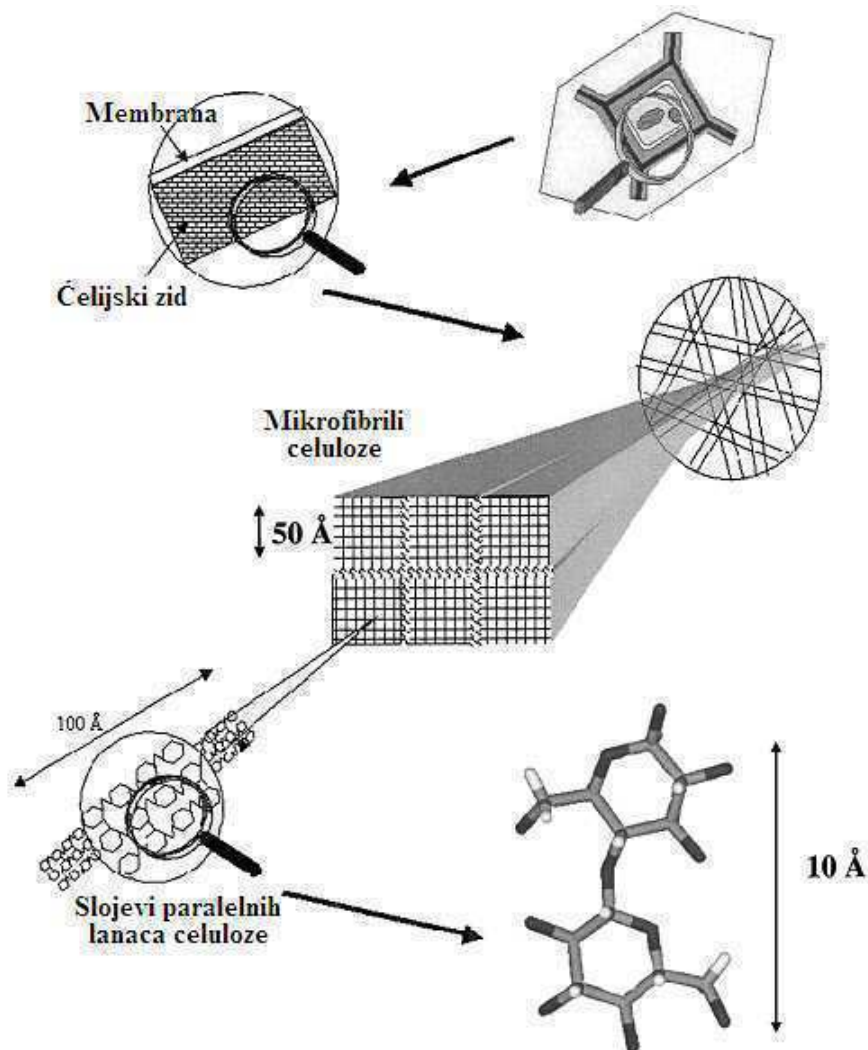
¹Celulozni mikrofibril može se razmatrati kao pojedinačan tanak i dug celulozni entitet sa izuzetno anizotropnim fizičkim svojstvima. Inače, sam termin "mikrofibril" može nekada izazvati zabunu, zbog toga što različiti autori koriste termin na različite načine sa srodnim terminima kao što je "elementarni fibril", "protofibril" ili "nanovlakna". Iako se radi o objektu koji ima nanometarske bočne dimenzije, termin "celulozni mikrofibril" obuhvata pojmove koji nisu ograničeni na njegovu veličinu [85].

1.3. Morfološka struktura celuloze

Pored nadmolekulskog (fibrilnog) nivoa, u fizičkoj strukturi celuloze se razlikuje i morfološki nivo koji odražava međusobni raspored fibrila i građu samih vlakana, tj. njihov geometrijski oblik i prisustvo slojevite strukture. Ova dva nivoa strukture su neraskidivo međusobno povezana i verovatno je da se njihovo obrazovanje javlja istovremeno.

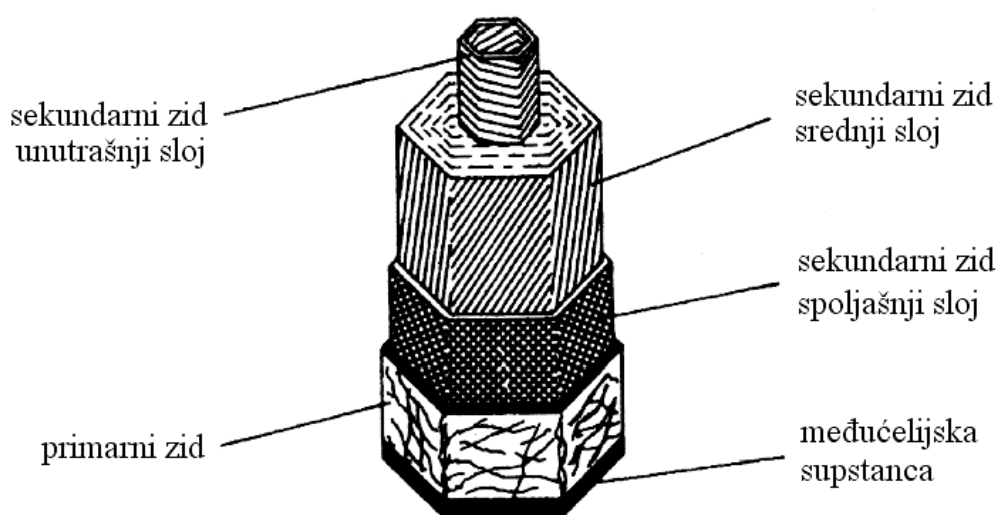
Morfologija prirodnih i regenerisanih vlakana se karakteriše različitim vidovima strukture. U prirodnim vlaknima postoje relativno veće razlike u gustini slaganja strukturnih elemenata i njihovoj orijentisanosti po pojedinim slojevima koji leže upravno na osu vlakna, dok je u celuloznim hemijskim vlaknima veoma izražena heterogenost po poprečnom preseku poznata kao struktura pokorica-kora-jezgro [2]. Morfologija vlakna zavisi od procesa njegovog dobijanja, tako da je u prirodnim vlaknima ona određena uslovima rasta ćelije, a u hemijskim vlaknima uslovima i parametrima procesa formiranja.

Kao osnovna gradivna komponenta svih biljaka, celuloza je organizovana u ćelijsku hijerarhijsku strukturu (slika 1.20). U kombinaciji sa pratećim supstancama (hemiceluloze, lignin, pektin), ova struktura daje izuzetna svojstva prirodnim materijalima, kao što je drvo, pamuk, lan i konoplja. Molekuli celuloze organizovani u ćelijskim zidovima u obliku mikrofibrila imaju karakteristične orijentacije, koje se razlikuju u zavisnosti od sloja ćelijskog zida i tipa biljke.

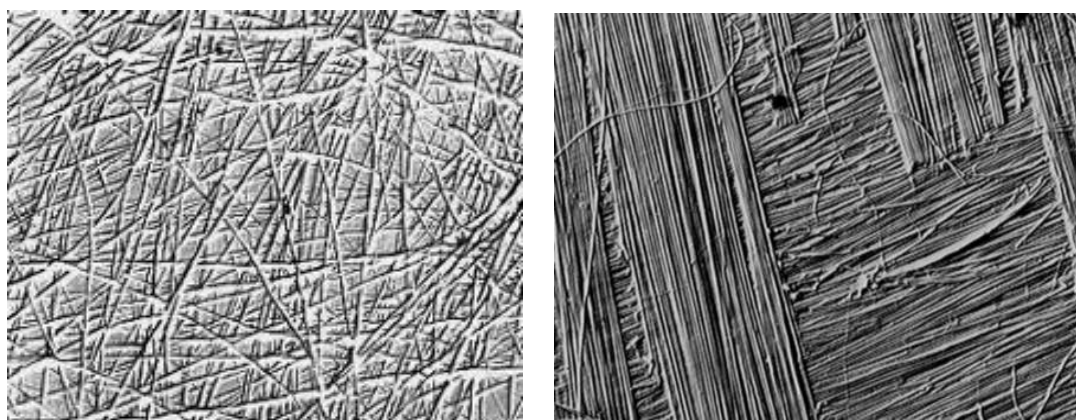


Slika 1.20 Strukturni nivoi organizacije celuloze u ćelijskom zidu biljaka [15]

Celuloza izgrađuje ćelijske zidove koji se sastoje iz dva sloja, primarnog i sekundarnog, i lumena. Na slici 1.21 dat je šematski prikaz rasporeda slojeva u ćelijskom zidu, kao i orijentacije mikrofibrila u njima. Organizaciju celuloznih mikrofibrila unutar ćelijskog zida biljaka jasno pokazuju fotografije na slici 1.22. U primarnom ćelijskom zidu, fibrili celuloze se nalaze u slučajnom rasporedu, bez nekog posebnog reda. Primarni zid je međućelijskom supstancom povezan sa susednim ćelijama i on je u manjoj meri pristupačan za agense koji se koriste pri izdvajanju celuloze. Sekundarni zid je osnovni izvor celuloze. U svim biljkama princip građe ćelije je takav da fibrili u obliku traka obavijaju lumen ćelije. U sekundarnom ćelijskom zidu nalazi se mnogo veći broj takvih traka koje su često složene u tri sloja različite gustine i raznog smera uvijanja. U spoljašnjem sloju sekundarnog zida, fibrili se međusobno ukrštaju pod skoro pravim uglom, u srednjem sloju, koji predstavlja glavnu masu ćelijskog zida, orijentisani su paralelno sa osom ćelije, dok su u unutrašnjem sloju dosta nagnuti u odnosu na osu ćelije. Uvrtnje spirala, odnosno promena njihovog smera, poboljšava jačinu biljnih vlakana [2, 13].



Slika 1.21 Šematski prikaz strukture ćelijskog zida biljnog sveta [13]

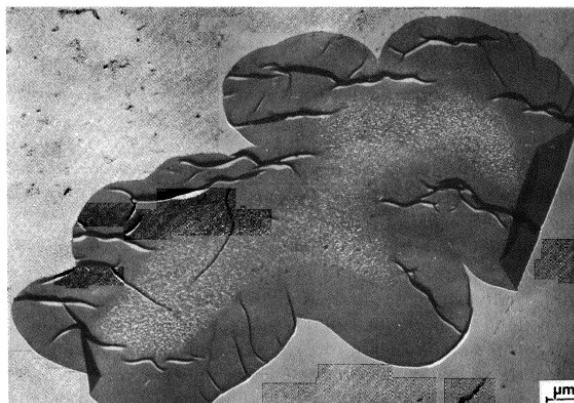


a)

b)

Slika 1.22 Fotografije organizacije celuloznih mikrofibrila u a) primarnom [86] i b) sekundarnom ćelijskom zidu [87]

Morfologija regenerisanih celuloznih vlakana i filmova je generalno okarakterisana fibrilnim mrežama koje se razlikuju u gustini slaganja. Struktura kora-jezgro je veoma često tipična za morfologiju ovih regenerisanih celuloznih proizvoda (slika 1.23) [2, 24].



Slika 1.23 Kora-jezgro morfologija viskoznog korda [24]

Elektronskom mikroskopijom, rasipanjem X-zraka i porozimetrijom celuloznih vlakana jasno je pokazano prisustvo neuniformnih pora, kapilara, šupljina i pukotina na površini vlakana [88]. Sistem pora, kapilara, šupljina i pukotina je komplementaran sa fibrilnom arhitekturom ćelijskog zida vlakana. Ove pore nisu uniformne po dimenzijama i obliku, tako da je za kompletno opisivanje sistema pora, koji ima odlučujuću ulogu u svim heterogenim hemijskim reakcijama celuloze, potrebno raspolagati informacijama o ukupnoj zapremini pora, srednjoj vrednosti dimenzija pora, distribuciji dimenzija, kao i obliku pora. Zbog postojanja sistema pora i šupljina, ukupna površina celuloznih vlakana u velikom stepenu prevazilazi geometrijsku spoljnu površinu [24]. Struktura pora određuje unutrašnju pristupačnu oblast površine celuloze, a time utiče i na njenu reaktivnost.

Na osnovu merenja gustine, određeno je da zapremina šupljina native celuloze iznosi 3-4 % [89]. Što se tiče dimenzija pora celuloznih vlakana, native celuloza, generalno, ima veće pore, dok su šupljine koloidnih dimenzija dominantne u regenerisanim celuloznim vlaknima [90].

Morfologija celuloznih prirodnih (pamuk) i hemijskih (viskoza) vlakana biće detaljno obrađena u narednom poglavlju.

2. Struktura i svojstva prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana

Veza između strukture i svojstava vlakana je oduvek privlačila pažnju istraživača, kako radi postavljanja teorijskih osnova proizvodnje hemijskih vlakana, tako i radi predviđanja njihovog ponašanja u eksploataciji.

Svojstva vlakana zavise, pre svega, od parametara i postupaka sinteze polimera (biosintezom ili sintezom u industriji) i postupka i parametara procesa njihovog nastanka, bilo rastom u živoj ćeliji i naknadnim izolovanjem iz biljaka, ili oblikovanjem polimera u vlakna u industriji. Na ovaj način ostvaren hemijski sastav i struktura vlakana nisu konstantni, već se menjaju u toku njihove prerade u razne poluproizvode i proizvode.

Struktura pamuka i drugih prirodnih celuloznih vlakana se formira u procesu biosinteze polimera i rasta ćelija, pa vlakna stiču niz svojstava specifičnih za datu biološku vrstu. Kao osnovna sirovina za dobijanje hemijskih celuloznih vlakana služi tehnička celuloza iz drveta. Tehnička celuloza, obična ili oplemenjena, hemijski se obrađuje i rastvara u odgovarajućim rastvaračima (specifičnim za svaku vrstu celuloznih vlakana) i po mokrom postupku oblikuje u viskozno ili bakrovo vlakno, po suvom postupku u acetatna vlakna, ili po suvo-mokrom postupku u liocel vlakna.

Svojstva vlakana zavise od molekulske strukture polimera (hemijski sastav, struktura, konfiguracija i konformacija) međusobnog rasporeda makromolekula i oblika njihovog agregiranja (nadmolekulska struktura), morfologije i energetskih karakteristika.

Celulozna vlakna, kako prirodna tako i regenerisana, imaju kristalno/amorfnu mikrofibrilnu strukturu. Elementarni fibrili se sastoje od nizova kristalita i manje sređenih intermedijarnih amornih regiona sa lateralnim prohodnim molekulima koji povezuju susedna amorfna područja [24]. Razlike između prirodnih i različitih tipova regenerisanih celuloznih vlakana leže primarno u veličini i orijentaciji kristalnih i amornih faza, dimenzijama i obliku šupljina, broju interfibrilarnih veza i prirodni nečistoća [22, 91]. Navedene različitosti su odgovorne za razlike u adsorpcionom karakteru i reaktivnosti u celuloznom materijalu. Značajan uticaj na adsorpciona svojstva vlakana ima količina pristupačnih hidroksilnih i karboksilnih grupa, kao i udeo amornih oblasti u kojima se odvijaju procesi adsorpcije [92], s obzirom na to da ni voda ni vodeni rastvori elektrolita, boja ili površinski aktivnih sredstava ne mogu da prodru u kristalna područja vlakna.

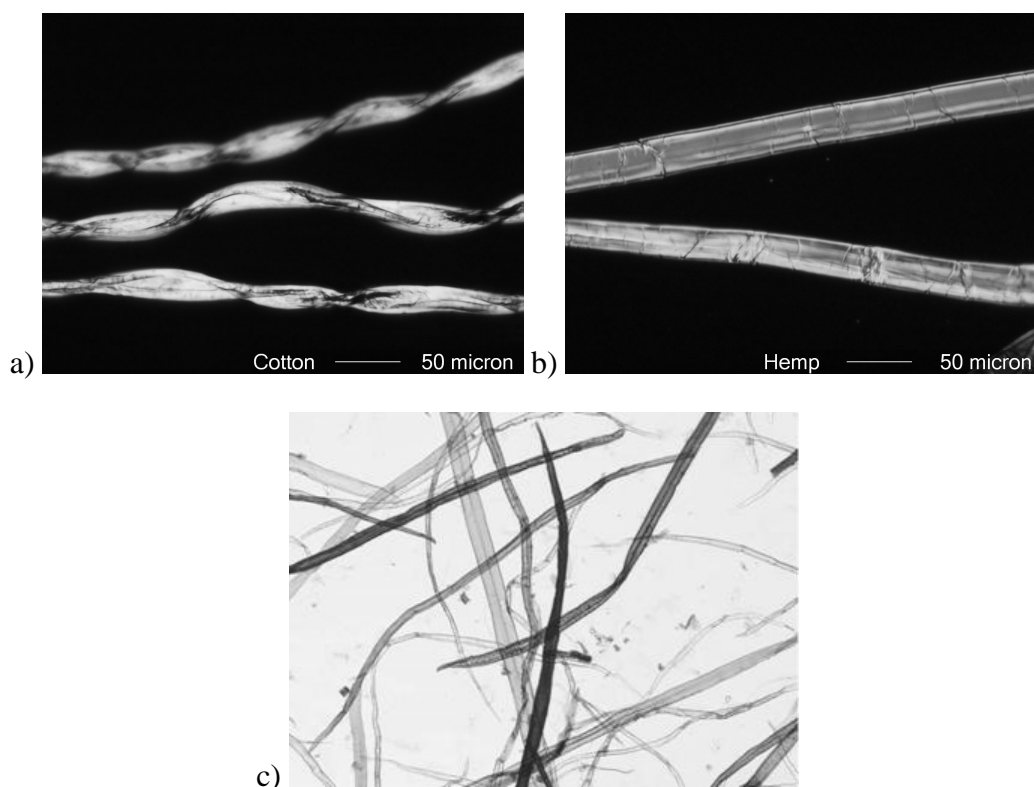
Poznavanje sadržaja pratećih supstanci u celuloznim vlaknima značajno je za definisanje njihovog kvaliteta. Poznavanje sadržaja α -celuloze u tehničkoj celulozi je veoma važno, kako za kvalitet vlakana, tako i za izbor postupka njenog pretvaranja u vlakna i druge proizvode. Osim toga, α -celuloza se koristi kao model supstance za proučavanje uticaja fizičkih i hemijskih agenasa, na osnovu kojih se mogu doneti zaključci o ponašanju raznih prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana prema njihovom dejstvu. Razlog je taj što prateće supstance prirodnih celuloznih vlakana mogu znatno da utiču na tok dejstva fizičkih i hemijskih agenasa i da time stvore utisak o stvarnom mehanizmu odigravanja proučavanih procesa [2].

Nečistoće u regenerisanim vlaknima, kao što su ulja, voskovi, antistatički agensi, lubrikanti i drugo, potiču iz procesa proizvodnje. One mogu biti amfifilne ili hidrofobne, snižavajući hidrofilitnost i adsorptivnost vlakana, što su značajna svojstva za dalje procesiranje vlakana.

2.1. Struktura i svojstva prirodnih celuloznih vlakana

Od raznih biljnih vrsta koje u nekim svojim delovima, kori, lišću, plodu ili na semenu sadrže vlakna, relativno mali broj se koristi kao industrijska sirovina. Od preko 50 biljnih vrsta u čijoj se kori (liki) nalaze prediva vlakna dobrih svojstava, veći tržišni značaj imaju lan, konoplja, juta i ramija. Slična je situacija i sa vlaknima iz lišća koja se potencijalno mogu dobiti iz preko 28 raznih biljaka, ali je u praksi najveću primenu našao sisal koji potiče iz lišća agave. Od vlakana sa ploda najpoznatije je kokosovo vlakno koje potiče sa ploda kokosove palme. Sva pomenuta vlakna pripadaju višecelijskim biljnim vlaknima. Od jednoćelijskih, elementarnih vlakana, najrasprostranjeniji i u najvećim količinama se proizvodi pamuk koji raste na semenu biljke pamukovac [2]. Bez obzira na poreklo vlakana i njihove morfološke karakteristike, zajedničko za sva biljna vlakna je da su izgrađena iz celuloze.

Jedno celulozno vlakno je izdužena biljna ćelija, pri čemu vlakna raznih biljnih vrsta imaju različite oblike i dimenzije (slika 2.1). Vlakna pamuka i likina vlakna imaju dužinu koja se meri centrimetrima, dok su vlakna drveta kratka, tipično 1-3 mm u dužini [93]. Pamučna vlakna su uvijena, dok su vlakna iz drveta, traheidi, generalno neuvijena i pljosnata nakon delignifikacije. Vlakna iz like (lan, konoplja, ramija, itd.) su prava i poligonalnog poprečnog preseka.



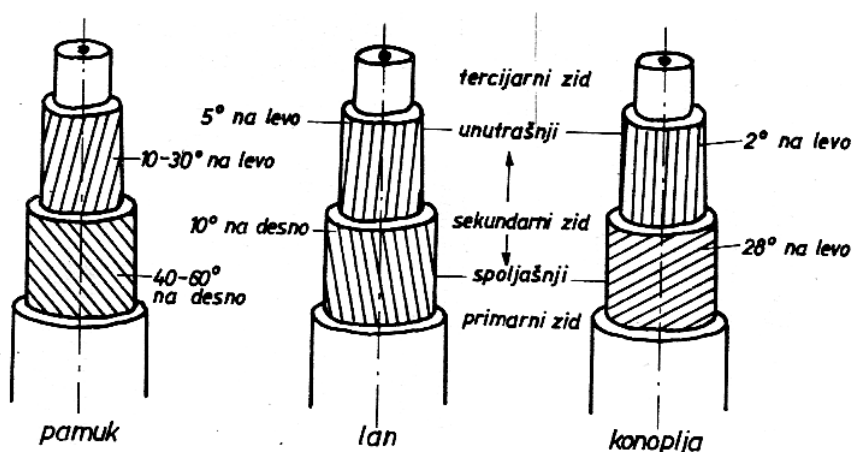
Slika 2.1 a) Uvijena pamučna vlakna; b) prava vlakna konoplje; c) traheidi drveta [94]

Celulozna vlakna sadrže razne defekte ili dislokacije: pore, pukotine, zglobove, slaba mesta i druge centre oštećenja [95], koje predstavljaju slabe tačke za hemijski napad i mehaničke sile.

Širina raznih biljnih vlakana iznosi 15-30 μm , uključujući lumen. Lumen se proteže skoro celom dužinom vlakana. Ćelijski zid tipičnog biljnog vlakna ima debljinu od 4-6 μm i sastoji se od primarnog, sekundarnog i tercijarnog zida. Primarni i tercijarni zidovi vlakana su tanki, oko 100 nm. Tipični primarni biljni ćelijski zidovi se sastoje od celuloznih mikrofibrila

(9-25 %) i interpenetrirajućeg matriksa hemiceluloza (25-50 %), pektina (10-35 %) i proteina (10 %) [96-98]. Snopovi mikrofibrila primarnog i tercijarnog zida formiraju nesredene mreže. Sekundarni ćelijski zidovi biljaka sadrže celulozu (40-80 %), hemicelulozu (10-40 %) i lignin (5-25 %) [97, 99]. Sekundarni zid ima debljinu od 3-5 μm i sastoji se od tri sloja, S1, S2 i S3. Dominantni sloj u ćelijskom zidu je S2-sloj i njegova debljina iznosi 2-4 μm . S2-sloj sadrži fibrilne snopove i lamele međusobno paralelno locirane i orijentisane pod oštrim uglom u odnosu na osu vlakna [100, 101]. Ovakva orijentacija omogućava celuloznim vlaknima povećana mehanička svojstva.

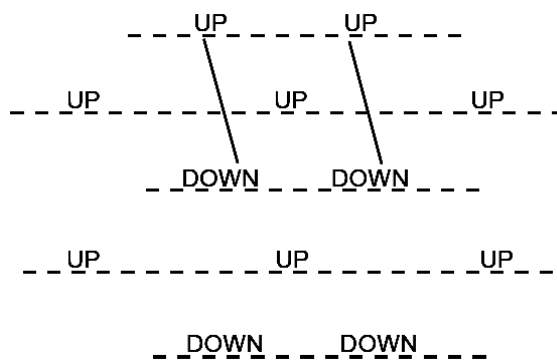
Razlika između pojedinih slojeva elementarnih biljnih vlakana je u uglu i pravcu nagiba fibrila (slika 2.2). Kod pamuka i lana, fibrili u sekundarnom zidu obrazuju desne spirale sa uglom nagiba prema osi vlakna 40-60° u pamuku i 8-12° u lanu, dok u konoplji fibrili obrazuju leve spirale sa uglom 28-30°. Unutrašnji sloj sekundarnog zida je izgrađen od fibrila koji su bolje orijentisani u pravcu ose vlakna, sa uglom orijentisanosti od 10-30° kod pamuka, oko 5° kod lana i oko 2° kod konoplje. Oni menjaju pravac u odnosu na pravac spirale u prethodnom sloju, od desne na levu spiralnu kod pamuka i lana, dok se u konoplji zadržava leva spirala fibrila u oba sloja. Uvrtnje spirala, odnosno promena njihovog smera, poboljšava jačinu biljnih vlakana, a takođe je i razlog povećanja jačine pamuka i lana u mokrom stanju. Ojačanju u mokrom stanju doprinosi i odstupanje ugla nagiba spirala [2].



Slika 2.2 Uporedni izgled elementarnih ćelija biljnih vlakana [2]

Snopovi i lamele ćelijskog zida se sastoje od elementarnih nanofibrila sa bočnim dimenzijama 3-15 nm i dužinom oko 1 μm . Svaki ovakav fibril sadrži sredene kristalite i nesredene domene koji imaju otprilike iste bočne dimenzije kao elementarni nanofibrili. U celuloznim materijalima različitog porekla, dužina kristalita je u opsegu 50-150 nm, a nesredjenih domena 25-50 nm [102].

Kristalizacija celuloze u nezrelom pamuku je direktno povezana sa formiranjem intermolekulskih vodoničnih veza [103], što je verovatno posledica činjenice da se molekuli celuloze organizuju u mikrofibrile tokom kristalizacije. Pamuk, ramija, drvo i druge fibrilne celuloze, srednje kristalnosti, u saglasnosti su sa dvolančanom monokliničnom jediničnom ćelijom. Razlike u kristalnoj strukturi između pojedinih vrsta (npr. pamuk, ramija, drvo) mogu poticati od sredenog ili nesredenog slaganja dve vrste slojeva, "up" i "down" [104] (slika 2.3). Za kristalite celuloze drveta je određeno da imaju širinu u opsegu 3,5-4,0 nm, dok su kristaliti pamučnog lintersa i celuloze lana širine 5-7 nm [64]. Dimenzije kristalnih jedinica u pamučnim vlaknima iznose približno 2-3 nm sa 15 lanaca [105].



Slika 2.3 Šematski prikaz slaganja strukture "up" i "down"-slojeva [64]

U prirodnim biljnim vlaknima, elementarni fibrili i fibrilni snopovi razdvojeni su amorfnim ligno-hemiceluloznim matriksom. Na primer, sadržaj lignina varira između 23 % i 34 % u drvetu, 1,5 % i 14 % u vlaknima iz like i između 6 % i 8 % u vlaknima iz lišća kao što je sisal [106]. Pamučna vlakna ne sadrže lignin, ali manje količine ove prateće supstance celuloze mogu da potiču iz ostataka semena čaure, lišća, grančica i stabljike [2].

Pamuk je elementarno biljno vlakno koje za vreme rasta ima cilindričan oblik. U njegovoj unutrašnjosti nalazi se protoplazma iz koje se sintetizuju molekuli celuloze koji se slažu u vlaknu od periferije ka centru, obrazujući prstenove rasta. Broj prstenova rasta određuje zrelost vlakana, odnosno debljinu sekundarnog zida i njenim porastom povećava se podužna gustina i prekidna jačina vlakana [2]. Utvrđeno je da u toku rasta vlakana dolazi do spiralnog pomeranja plazmaleme ćelije pamuka u smeru njenog rasta [107].

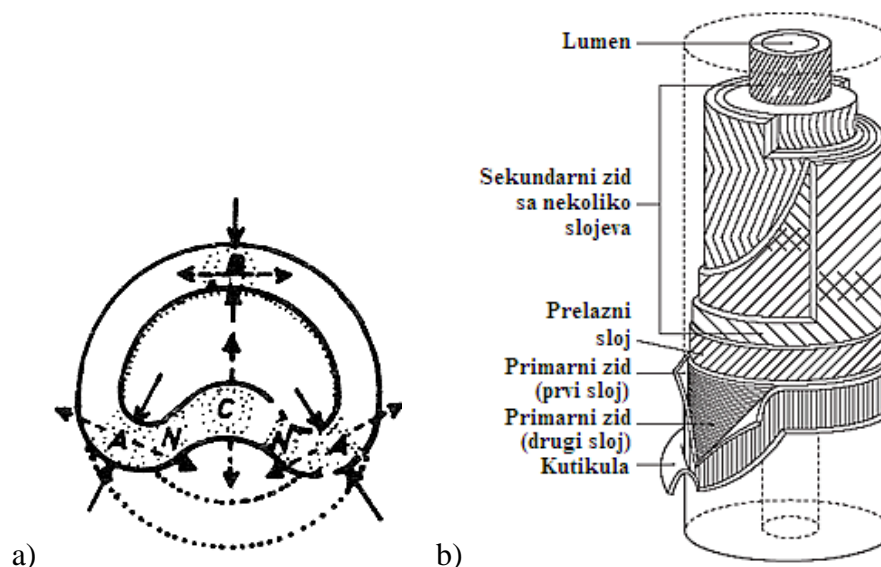
Nakon sazrevanja, kada se čaura pamuka otvori, dolazi do sušenja vlakana, što podrazumeva uklanjanje tečnosti iz lumena i intermolekulske vode u celulozi. Gubitak tečnosti iz lumena izaziva kolaps cilindričnog vlakna, dok gubitak intermolekulske vode omogućava celuloznim lancima da se međusobno približe i formiraju intermolekulske vodonične veze. Kolaps ćelijskog zida i formiranje vodoničnih veza izaziva ireverzibilne morfološke promene, uključujući strukturnu heterogenost, smanjenje poroznosti i sorpcionog kapaciteta u vlaknima [108].

Zrela vlakna pamuka sušenjem dobijaju oblik pljosnate uvijene trake (slika 2.1 a), pri čemu se pravac uvoja često menja duž vlakna. Broj uvoja u pamučnom vlaknu varira između 3,9 i 6,5 po milimetru, dok se promena smera kretanja spirale dešava 1 do 3 puta po milimetru dužine. Promene smera u pamučnim vlaknima u vezi su sa orijentacijom mikrofibrila sekundarnog zida, čija je organizacija od presudnog značaja za jačinu vlakna [108].

Smatra se da gustina pakovanja molekula duž vlakna varira, posebno u blizini promene pravca spirale. Pri tome, slaganje fibrila je gušće na mestima uvijanja [109], dok su susedne fibrilne strukture manje gustine pakovanja i često imaju različite dimenzije (finoću). Zbog toga se veruje da su ti susedni regioni slabe tačke na vlaknu, pre nego li sama mesta uvijanja.

Posmatrano podužno, vlakno pamuka ima oblik pljosnate trake različitog stepena i smera uvijanja, sa jednim otvorenim krajem (koji je ležao na semenu) i drugim zatvorenim i oštrim.

Poprečni presek zrelog osušenog pamučnog vlakna je pasuljastog oblika, što je posledica bilateralne strukture pamuka (slika 2.4 a). Oblasti poprečnog preseka međusobno se razlikuju po strukturnoj organizaciji, pristupačnosti za reagense i bubrenju. Fibrili su gušće složeni u zoni B preseka nego u zoni A, zbog čega je zona B otpornija na prodiranje agenasa i na bubrenje. Oblasti zona N i C su manje gustine i otvorenije su za agense, ali je oblast N pristupačnija od oblasti C [2].



Slika 2.4 Šema strukturalnih elemenata pamuka: a) bilateralna struktura poprečnog preseka sa prikazom raspodele mehaničkih napona (puna linija) i deformacija pri sušenju (isprekidana linija) vlakana [2]; b) model morfologije [110]

Sirova pamučna vlakna se sastoje iz četiri glavna dela koji formiraju njegovu centralnu površinu i to su: kutikula, primarni zid, sekundarni zid i lumen [111, 112] (slike 2.2 i 2.4 b). Sekundarni zid se sastoji iz tri podsloja, spoljašnjeg, centralnog i unutrašnjeg koji se često naziva tercijarni sloj. Svi slojevi su koaksijalno raspoređeni oko lumena ili unutrašnje šupljine vlakna.

Kutikula pamučnog vlakna je veoma tanak sloj čvrsto vezan za spoljašnji sloj primarnog zida. Tačnije, pamučno vlakno je obavijeno kutikulom koja ga štiti od raznih mehaničkih i hemijskih oštećenja. Kutikula sadrži voskove, pektine i kutin. Pamučni vosak koji postoji u kutikuli je kompleksna smeša masti, voskova i ulja [113]. Hemijskom analizom površine sirovih pamučnih vlakana utvrđeno je da prisutne necelulozne materije predstavljaju kompleksnu smešu masnih kiselina, alkohola, alkana, estara i glicerida [114].

Primarni zid je veoma tanak, debljine oko 0,1-0,2 μm , u poređenju sa prečnikom vlakna koji je reda 15-20 μm [113]. Sadrži oko 50 % celuloze, a ostatak čine: oko 8 % voskova, 10 % pektinskih materija, 13 % proteina, 6,25 % azota, 3 % pepela i oko 16 % neispitanih supstanci [2]. Na površini, molekulski lanci u primarnom zidu su u slučajnom rasporedu, bez određene orijentacije i reda. Međutim, celuloza prisutna unutar primarnog zida je u obliku finih fibrila i oni nisu paralelni sa osom vlakna, već spiralni pod uglom od oko 70° oko ose vlakna. Spirale ne menjaju pravac; ugao spirale je veći pri vrhu, a manji pri osnovi vlakna [113].

Ispod primarnog zida je zavojiti sloj koji ima jedan sloj ili fibrilne snopove mikrofibrila koji su pod uglom od oko 70° oko ose vlakna. Ovaj zavojiti ili prelazni sloj je takođe i sloj sekundarnog zida [115].

Sekundarni zid čini najveći deo mase pamučnog vlakna (tipično 90 % masenih), ima debljinu od 3-5 μm [101] i sastoji se uglavnom od celuloze (oko 95 %). Kao i primarni zid, sastoji se od koncentričnih slojeva fibrila u spiralnoj formaciji. U sekundarnom zidu makromolekuli celuloze su gušće složeni idući od periferije ka centru vlakna i obrazuju bolje orijentisane fibrile u odnosu na osu vlakna. U spoljašnjem sloju sekundarnog zida sredenost celuloznih lanaca je veća nego u primarnom zidu. Fibrili su orijentisani pod uglom od 40-60° prema osi vlakna i obrazuju S zavojnicu (desna spirala) [2]. Centralni sloj je dominantan u sekundarnom zidu, njegova debljina iznosi 2-4 μm i sadrži mnoštvo tankih lamela izgrađenih od nanofibrilnih snopova, koji imaju različitu orijentaciju prema osi vlakna. Ovi snopovi se

sastoje od elementarnih fibrila lateralnih dimenzija 5-8 nm [101]. Fibrili u centralnom sloju sekundarnog zida obrazuju ugao od 10-30° prema osi vlakna u Z pravcu (leva spirala). Tercijarni zid vlakna nije dovoljno proučen, ali bi takođe trebalo da ima spiralno raspoređene fibrile natopljene ostacima protoplazme [2] (slika 2.2). Gustina slaganja celuloze u sekundarnom zidu neosušenih pamučnih vlakana je uvek ista, bez obzira na genotip i uslove rasta biljke. Za uzorke neosušenih vlakana sa datom srednjom dužinom, srenja debljina sekundarnog zida je precizni indikator količine celuloze proizvedene u tim vlaknima [116].

Lumen je središnji deo vlakna, ispunjen protoplazmom dok je vlakno u razvoju, koji ostaje kao cilindrična šupljina kod zrelog vlakna. Zauzima oko 30-35 % ukupne oblasti poprečnog preseka. Sadržaj lumena isparava nakon otvaranja čaure i nakon sušenja i kolapsa vlakna oblast lumena se smanjuje na oko 5 % ukupne površine. U osušenom stanju lumen sadrži obojene materije, pored drugih nečistoća, koje određuju boju vlakna [113].

Različiti nivoi strukture u pamuku prikazani su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1 Strukturna hijerarhija u pamučnim vlaknima [117]

Strukturni nivo	Površina poprečnog preseka, nm ²	Broj celuloznih lanaca po poprečnom preseku
Pamučno vlakno	314 000 000	1 x 10 ⁹
Makrofibril	160 000	5 x 10 ⁵
Mikrofibril	625	2 x 10 ³
Elementarni fibril	30	1 x 10 ²
Molekul celuloze	0,32	1

2.1.1. Prateće supstance u vlaknima pamuka

Nativni pamuk je najčistiji oblik prirodne celuloze. Međutim, on sadrži uobičajene konstituente biljne ćelije kao što su proteini, ulja i voskovi, pektini, mineralne materije i druge supstance. Necelulozne materije su locirane na spoljašnjim slojevima i unutar lumena vlakna. Hemijski sastav pamuka varira u zavisnosti od porekla, tj. tipa pamuka, uslova rasta, kao i zrelosti vlakna. Generalno, nezreo pamuk ima više nečistoća od zrelog pamuka [108, 113]. Približan sastav suvog zrelog pamučnog vlakna prikazan je u tabeli 2.2. Poznavanje sadržaja pratećih supstanci u celuloznim vlaknima značajno je za definisanje njihovog kvaliteta.

Tabela 2.2 Hemijski sastav suvog pamuka [113]

Hemijski konstituent	Sadržaj, %
Celuloza	88,0 – 97,0
Proteini	1,0 – 2,0
Ulja i voskovi	0,4 – 1,5
Pektini	0,4 – 1,5
Minerali	0,7 – 1,6
Ostalo	0,5 – 8,0

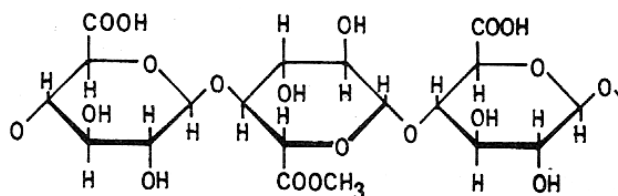
Nativni pamuk sadrži maksimalnu količinu celuloze u svom najčistijem obliku. Celuloza pamuka sadrži oko 12000 do 18000 glukozidnih ostataka u svom makromolekulu. Molekulska masa celuloze prisutne u pamuku je približno 2 miliona.

U vlaknu pamuka proteini su uglavnom koncentrisani u primarnom zidu i u lumenu kao ostaci protoplazme, a njihova ukupna količina varira između 1-2 %. Sadržaj proteina u vlaknu može uticati na boju pamuka [113]. Proteini se mogu udaljiti sa vlakna posle obrade sa toplim rastvorima alkalija ili obradom rastvorima natrijum- ili kalijum-hipohlorita. Nastale natrijumove i amonijumove soli hloraminske kiseline lako se rastvaraju u vodi i lako se udaljavaju sa vlakana ispiranjem [2].

Voskovi su hidrofobne supstance koje deluju kao zaštitna prevlaka na površini vlakana. To su u suštini veoma kompleksne supstance visokomolekulskih glicerida i masnih kiselina koje su prisutne kako u slobodnom stanju, tako i u obliku estara. U slobodnom stanju se sreću palmitinska $C_{15}H_{31}COOH$, oleinska $C_{17}H_{33}COOH$ i stearinska $C_{17}H_{35}COOH$ kiselina. Ove kiseline dospevaju u vlakna iz delova semena koja zaostaju iz operacije egreniranja. U alkalnim sredinama sve ove kiseline se osapunjuju i pretvaraju u rastvorljive sapune. Od svih alkohola, u pamuku je najviše zastupljen gopipil $C_{30}H_{61}OH$, montanil $C_{28}H_{57}OH$, ceril $C_{26}H_{53}OH$ i karnaubil $C_{24}H_{49}OH$. Ovi alkoholi su nerastvorljivi u vodi, u alkoholnim rastvorima i kiselinama i mogu se ekstrahovati organskim rastvaračima. Takođe su prisutni i čvrsti ugljovodonici sastava $C_{30}H_{62}$ i $C_{31}H_{64}$ [2, 113].

Voskovi su uglavnom lokalizovani u kutikuli i primarnom zidu vlakna i otežavaju kvašenje pamuka. Biljni voskovi se tope na temperaturi od 60-80 °C i u takvom stanju se emulguju u alkalnim vodenim rastvorima najčešće NaOH i površinski aktivnih supstanci. Ovo svojstvo voskova se koristi za njihovo udaljevanje sa površine vlakana.

Pamučna vlakna sadrže oko 0,4-1,5 % pektina, odnosno raznih derivata pektinske kiseline. To su pre svega kalcijum- i magnezijum-pektati, ali su takođe prisutni i slobodna pektinska kiselina i metilpektati. Pod pektinskim supstancama se zapravo podrazumeva smeša jedinjenja u kojoj je najviše zastupljen metilestar poligalakturonske (pektinske) kiseline, koji ima sledeći sastav:



U njemu se sadržaj metoksi grupa kreće od 9-12 %. Deo karboksilnih grupa pektinske kiseline se sreće u obliku kalcijumovih i magnezijumovih soli. Step en polimerizovanja poligalakturonske kiseline se kreće od 150-200.

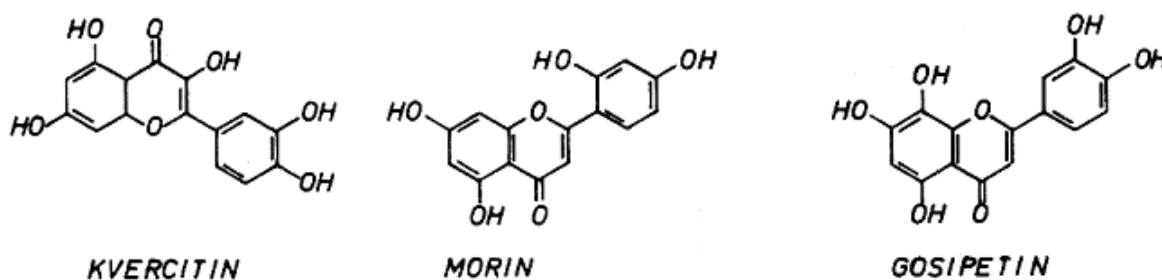
To su ugljeni hidrati slični celulozi i njihovi esterifikovani oblici su rastvorljivi u vodi. Slobodna pektinska kiselina i njene kalcijumove i magnezijumove soli nisu rastvorljive u vodi, ali se pod dejstvom alkalnih hidroksida ili karbonata mogu prevesti u produkte rastvorljive u vodi, čime je omogućeno njihovo uklanjanje iz pamučnog materijala [2, 113].

Pamuk sadrži oko 0,7-1,6 % mineralnih materija koje ostaju kao pepeo posle sagorevanja pamuka. Priroda i količina mineralnih materija koje se nalaze u pamuku zavise od uslova rasta biljke, njenog stepena zrelosti i klimatskih uslova, a naročito od sastava zemljišta na kome se gaji pamukovac. Zbog nečistoća prisutnih u zemljištu i atmosferi i u trenutku pucanja čaure mineralne primese su dodate nečistoćama na spoljašnjoj površini pamučnog vlakna. Od mineralnih supstanci najviše su zastupljeni hloridi, karbonati i sulfati kalijuma, kalcijuma i magnezijuma. Ukupna količina mineralnih supstanci prisutnih u vlaknu se može smanjiti jednostavnim ispiranjem vrućom vodom [2, 113]. Međutim, potpuno

udaljavanje mineralnih primesa nije tako jednostavno zbog toga što se neke od njih nalaze u vlaknu u nerastvornom stanju ili su jakim vezama povezane sa celulozom. Velike količine zemnoalkalnih metala u sirovom pamuku mogu da budu uzrok smetnji u procesu pripreme pamuka za oplemenjivanje. Takođe, prisustvo teških metala može da dovede do znatnog oštećenja, pa i do potpunog razaranja celuloze [2].

Od ostalih pratećih supstanci, u vlaknima pamuka mogu se naći organske kiseline (soli limunske i L-maleinske kiseline), šećeri (glukoza, galaktoza, fruktoza) i pigmenti.

Pigmenti su prisutni samo u tragovima i njihov sastav još uvek nije sa sigurnošću utvrđen. Pretpostavlja se da obojenje pamuka potiče od boja flavonskog niza kvercitina, morina i gosipetina [2]:



Ovi prirodni nosioci obojenja mogu se efikasno ukloniti oksidacijom vlakana pamuka.

Pored opisanih pratećih supstanci, sirova pamučna pređa i tkanine sadrže i druge nečistoće iz prethodnih operacija prerade, npr. sredstva za šlihtanje i ostatke mašinskog ulja.

Ponašanje pamuka u toku oplemenjivanja zavisi od hemijskog sastava njegovih pratećih supstanci. Da bi sirovi pamučni proizvodi mogli da se oplemenjuju u željenom pravcu, oni se moraju pripremiti udaljavanjem pratećih supstanci otkuvavanjem ili uopšte tretiranjem toplim rastvorima alkalija.

2.1.2. Kvalitet i svojstva pamuka

Od oko 50 poznatih vrsta pamukovca, privredni značaj imaju samo četiri vrste jednogodišnje biljke pamukovca: *Gossypium hirsutum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium arboreum* i *Gossypium herbaceum*, od kojih se uglavnom kultivišu prve dve vrste jer daju dobar prinos i kvalitetna vlakna [118]. Odmah nakon berbe pamuk se razvrstava na klase, čime se predodređuje njegova upotrebna vrednost. Većina zemalja proizvođača pamuka ima svoje standarde za razvrstavanje pamuka na kvalitetne klase, ali je najviše u upotrebi "Universal Standards" definisan od strane američkog sektora za agrikulturu (USDA), koji je generalno prihvaćen kao svetski standard za kvalitet pamučnih vlakana [119]. Prema "Universal Standards"-u, Upland pamuk se razvrstava na sedam klasa: 1 – vrlo dobar, 2 – dobar, 3-5 – srednji i 6 i 7 – zadovoljavajući kvalitet [2].

U prošlosti je razvrstavanje pamuka na kvalitetne klase vršeno na osnovu organoleptičkog ispitivanja iskusnog klasera. Od 1991. godine, sve klasifikacije se izvode savremenim instrumentima, tzv. "HVI" (High Volume Instrumentation) klasifikacija [120].

Klasifikacija pamuka se odnosi na primenu standardizovanih procedura, razvijenih od strane USDA, za merenje onih fizičkih atributa sirovog pamuka koji utiču na kvalitet krajnjeg proizvoda i/ili efikasnost proizvodnje. USDA klasifikacija podrazumeva određivanje dužine vlakna, ravnomernosti dužine, jačine, mikronera (mera finoće i zrelosti vlakna), boje, stepena glatkoće egreniranog pamučnog vlakna, sadržaja lišća i stranih materijala (pod kojim se

podrazumeva bilo koja supstanca u pamuku koja nije vlakno ili list, npr. kora drveta, delovi semena, trava, prašina, ulje i slično). Nastavlja se istraživanje i razvoj postupaka za brzo merenje drugih značajnih karakteristika vlakana, kao što su zrelost, lepljivost i sadržaj kratkih vlakana [121].

Pamučna vlakna spadaju u kratka štapelna vlakna velike finoće. Njihova dužina se kreće u opsegu od 8 do 42 mm, dok dužina pojedinačnih predivih vlakana može iznositi između 10 i 66 mm [2]. Dužina pamuka je važna karakteristika kvaliteta i služi za njegovo razvrstavanje u kvalitetne klase. Kako je dužina vlakana pamuka neujednačena, ona se izražava srednjom prosečnom dužinom, kao i pokazateljima ravnomernosti dužine svih vlakana u masi pamuka.

Prema srednjoj dužini štapela pamuk se razvrstava na četiri klase [122]:

- kratkovlasi, dužine ispod 25,4 mm,
- srednjevlasi, 25,4-27,8 mm,
- dugovlasi, 28,6-34,9 mm,
- ekstra dugovlasi, 36,5 mm i više.

Preko 90 % svetske proizvodnje čini srednjevlasi pamuk [118].

Dužina predivog pamuka se kreće od 10 do 56 mm, dok je dužina lintersa ispod 10 mm i ne može se prestići. Dužina vlakana je uglavnom određena vrstom, ali izloženost pamukovca ekstremnim temperaturama ili nedostatak nutrienata može dovesti do skraćivanja dužine vlakana. Smanjenje dužine može izazvati i prekomerno čišćenje i/ili sušenje vlakana.

Upotrebna vrednost pamuka zavisi u prvom redu od stepena ravnomernosti dužine. S obzirom na prirodnu varijaciju u dužini pamučnih vlakana, ravnomernost dužine će uvek biti manja od 100 (tabela 2.3). Ravnomernost dužine utiče na ujednačenost i jačinu pređe, pa se ova karakteristika ocenjuje prema tzv. bazi i koeficijentu varijacije dužine, koji je kod pamuka vrlo dobrog kvaliteta manji od 40 %, kod dobrog kvaliteta 50-60 %, kod upotrebljivog kvaliteta 60-70 %, a kod pamuka slabog kvaliteta 70-80 % [2]. Ona je takođe u vezi sa sadržajem kratkih vlakana (vlakna kraća od ½ inča). Procenat vlakana kraćih od ½ inča ima veliki uticaj na način prerade pamuka, jačinu pređe, broj grešaka nađenih u pređi i ujednačenost pređe. Ova četiri svojstva su od izuzetnog značaja za performanse pređe u procesu tkanja ili pletenja i za kvalitet finalnog proizvoda [123]. Kratka vlakna teže da se agregiraju i izazivaju zadebljanja na pređi. Takva pređa nije uniformna i ne može da se koristi za visoko kvalitetne proizvode. Pamuk sa niskim indeksom ravnomernosti ima visok procenat kratkih vlakana, tako da takav pamuk može biti nepovoljan za dalju preradu i obično daje pređu niskog kvaliteta [119, 124].

Tabela 2.3 Klasifikacija pamuka po stepenu ravnomernosti dužine [121]

Stepen ravnomernosti	Indeks ravnomernosti dužine, %
Veoma visok	iznad 85
Visok	83 – 85
Srednji	80 – 82
Nizak	77 – 79
Veoma nizak	ispod 77

Za razvrstavanje pamuka u kvalitetne klase, pored dužine i ravnomernosti dužine, kao pokazatelji se uzimaju u obzir i finoća (izražena preko mikroner vrednosti ili deciteksa), jačina i stepen zrelosti.

Finoća pamučnih vlakana je u korelaciji sa dužinom vlakana. Što su vlakna duža, to su i finija i obratno. Podužna masa (finoća) pamuka se kreće od 1-4 dtex što odgovara srednjoj debljini od 12-22 μm . Širina vlakna na užoj strani iznosi 10-40 μm , a na široj strani 10-60 μm . Ova karakteristika vlakana ima odlučujući uticaj pri određivanju minimalne podužne mase pređe. Finoća pamuka varira ne samo između pojedinih sorti već i unutar jedne sorte. Neravnomernost podužne mase pamuka jedne sorte kreće se od 40-60 % pri neravnomernosti dužine od oko 20-30 % [2]. Pređa izrađena od finijih vlakana ima veći broj vlakana u poprečnom preseku, što kao rezultat daje jaču pređu.

Finoća vlakana se iskazuje i relativnim pokazateljima, npr. preko mikroner vrednosti, pa se prema njima takođe vrši kategorizacija. Prema mikroner vrednosti (MV) razlikuju se: vrlo fini pamuk $MV < 3$ (do 1,3 dtex), fini pamuk $MV = 3-3,9$, srednje fini ili prosečan pamuk $MV = 4-4,9$ (1,59-1,95 dtex), grubi pamuk $MV = 5-5,4$ (1,96-2,35 dtex) i vrlo grubi pamuk $MV > 5,4$ (preko 2,38 dtex) [122].

Jačina pamučnih vlakana varira u zavisnosti od vrste pamuka, stepena zrelosti i oštećenosti vlakana. Prekidna jačina pamuka u normalnom stanju se kreće od 15 do 50 cN/tex, a jačina u mokrom stanju iznosi 100 do 110 % ove vrednosti. Zbog toga se pamučni proizvodi relativno malo oštećuju pri većem broju pranja. Neravnomernost po apsolutnoj prekidnoj jačini iznosi kod zrelog pamuka 38-42 % pri neravnomernosti stepena zrelosti 26-28 %, a kod manje zrelog pamuka, pri neravnomernosti stepena zrelosti 47-49 %, neravnomernost jačine dostiže 55-65 % [2].

Za izražavanje jačine pamuka, pored cN/tex ili cN/dtex, koristi se tzv. Pressley (Prisli) jedinica. Ukoliko su vlakna jača utoliko je Pressley vrednost veća i iznosi za pamuk srednje jačine 75-80, za jak pamuk 81-87 i za vrlo jak štapel 87-95. Iznad 93 PI (Pressley indeks) je jak pamuk, od 70-74 zadovoljavajuće jačine, a ispod 70 slab pamuk. Egipatski pamuk spada u izuzetno jak, prevazilazi jačine ostalih vrsta pamuka i iznosi za Delta pamuk oko 101 PI (53,6 cN/tex), a za Mako pamuk 90 PI (48,2 cN/tex) [2].

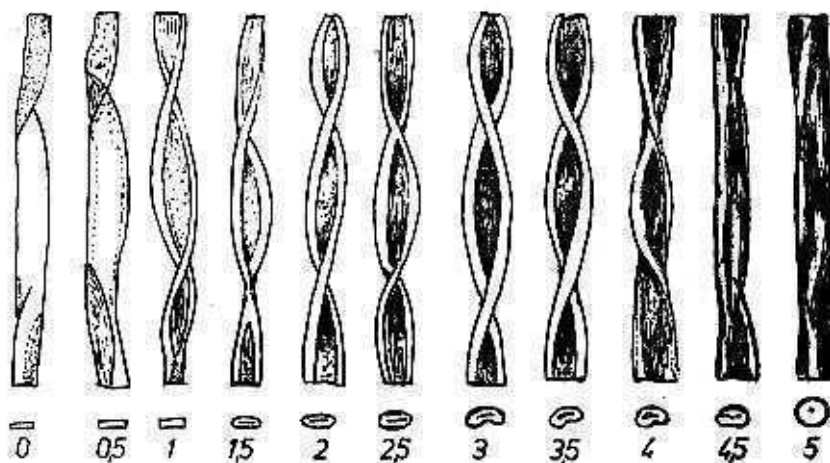
Pamuk ima malo prekidno izduženje koje pod normalnim uslovima iznosi 6-10 %, dok je izduženje u mokrom stanju 100-110 % ove vrednosti [2]. Stepem elastičnosti pamuka je takođe mali i razlog je velikog gužvanja pamučnih proizvoda, koje se može smanjiti njihovom obradom sredstvima protiv gužvanja. Vlakna u pamučnoj pređi imaju veliku neravnomernost jačine, ali i veliku neravnomernost izduženja, pa se pri opterećenju najpre kidaju vlakna manjeg prekidnog izduženja, a zatim jača vlakna čije je prekidno izduženje veće.

Kao pokazatelj kvaliteta može se uzeti i uvijenost pamuka koja se karakteriše brojem uvoja na 1 cm i zavisi od porekla pamuka i njegove zrelosti (slika 2.5). Zrelost pamuka je veoma važno svojstvo od koga zavisi sadržaj celuloze, promer lumena, debljina zidova, oblik poprečnog preseka, jačina, finoća, elastičnost i druga svojstva. Zrelost vlakana pamuka se izražava stepenom zrelosti, koja karakteriše kvalitet pamuka. Prema stepenu zrelosti pamuk se razvrstava u pet grupa (tabela 2.4).

Tabela 2.4 Klasifikacija pamuka po stepenu zrelosti [2]

Stepen zrelosti	Sadržaj zrelih vlakana, %
Vrlo zreo	preko 84
Zreo	77 – 84
Prosečno zreo	66 – 76
Nedozreo	60 – 67
Nezreo	manje od 60

Stepen zrelosti pamuka se kvalitativno određuje pomoću "Crveno-zelenog" testa ili GSB (Goldweit, Smith i Barnett) testa bojenjem sa test bojama koje zrela vlakna boje crveno, a poluzrela i mrtva vlakna zeleno. Kvantitativno se stepen zrelosti određuje na Mikroner uređaju. Od ostalih postupaka, može se koristiti mikroskopsko praćenje boje vlakana u polarizacionoj svetlosti, u kojoj je zreo pamuk žut do žuto-zelen, nezrelo žut sa primesama plave boje, a nezrelo ljubičast ili sasvim prozračan [2].



Slika 2.5 Šematski prikaz izgleda pamučnih vlakana sa oznakom koeficijenta zrelosti: mrtvo vlakno (0), potpuno nezrelo (0,5), nezrelo (1), skoro nezrelo (1,5), nezrelo (2), jedva zrelo (2,5), zrelo (3), potpuno zrelo (3,5), jedva prezrelo (4), prezrelo (4,5) i jako prezrelo (5) [125]

Stepen zrelosti se može izraziti preko odnosa širine zidova i širine lumena, na osnovu koga se razvrstava u 11 grupa (slika 2.5). U sirovom pamučnom vlaknu visokog stepena zrelosti, kontinuirano slaganje celuloze u sekundarnom zidu može biti tako gusto da ostavlja veoma mali lumen. Takvo vlakno u osušenom stanju ima izgled štapa pre nego pljosnate tračice. Sa druge strane, nezrelo vlakno može imati nedovoljno naslaganu celulozu u sekundarnom zidu, ostavljajući relativno širok i prazan kanal ili lumen [106]. Prema stepenu zrelosti pamuka mogu se razlikovati [2]:

- zrela vlakna, čija debljina zidova iznosi $1/3-2/3$ prečnika vlakna, sa izuzetno lučno savijenim krajevima,
- poluzrela vlakna, koja imaju nepotpuno razvijen sekundarni zid i nesavijene krajeve,
- nezrela (zeleno) vlakna, koja imaju tanke zidove (oko $1 \mu\text{m}$) i najčešće su bez uvoja i
- mrtva vlakna, u kojima postoji samo primarni zid debljine $0,5-0,6 \mu\text{m}$, jer su ova vlakna uginula pre početka perioda sazrevanja.

Jako prezrela vlakna nisu dovoljno gipka i gruba su pa kao takva ne zadovoljavaju zahteve tekstilne industrije. Takođe ne zadovoljavaju vlakna sa niskim stepenom zrelosti; ona su slabo ili neravnomerno uvijena, imaju manji sadržaj celuloze i slabijeg su kvaliteta. Predivost pamuka i ravnomernost obojenja pamučnih proizvoda rastu sa povećanjem sadržaja zrelih vlakana, a naglo opadaju sa porastom učešća nezrelih ili mrtvih vlakana [125].

Stepen mercerizovanja pamuka je takođe značajan pokazatelj kvaliteta i izražava se preko ocene sjaja od vrlo dobrog (stepen mercerizovanja $> 90 \%$), dobrog (stepen mercerizovanja $75-90 \%$), zadovoljavajućeg (stepen mercerizovanja $60-75 \%$) i slabog (stepen mercerizovanja $< 60 \%$) [122].

Boja pamuka određena je pre svega vrstom pamukovca, ali može biti izmenjena pod uticajem kiše, mraza, insektata i gljivica, kontakta sa zemljom, travom ili lišćem pamukovca. Osnovna boja pamuka koju poseduje u trenutku otvaranja čaure može biti izmenjena do trenutka prerade. Na primer, ukoliko beo pamuk bude izlagan duže vremena nevremenu i dejstvu mikroorganizama, postaće nešto tamniji. Ukoliko je razviće pamuka bilo zaustavljeno sušom ili drugim uticajem, zadobiće žutu boju različite dubine. Pod uticajem insekata, plesni, zaprljanja od zemlje ili drugih materija, pamuk gubi osnovnu boju i postaje mrljav. Uopšte, pamuk svih boja pod uticajem atmosferilija postaje nešto tamniji [125].

Prema "Universal Standards"-u, Upland pamuk se prema boji razvrstava na 25 zvaničnih klasa. Boja pamuka se određuje na osnovu stepena refleksije, koji ukazuje na to koliko je neki uzorak svetao ili taman i na osnovu stepena pigmentacije, tj. količine žute obojenosti uzorka. Boja pamuka je rangirana od bele do žućkaste i klasifikovana je u sledeće grupe, po opadajućem redosledu kvaliteta: bela, slabo pegava, pegava, flekava i žućkasta [119, 124, 126].

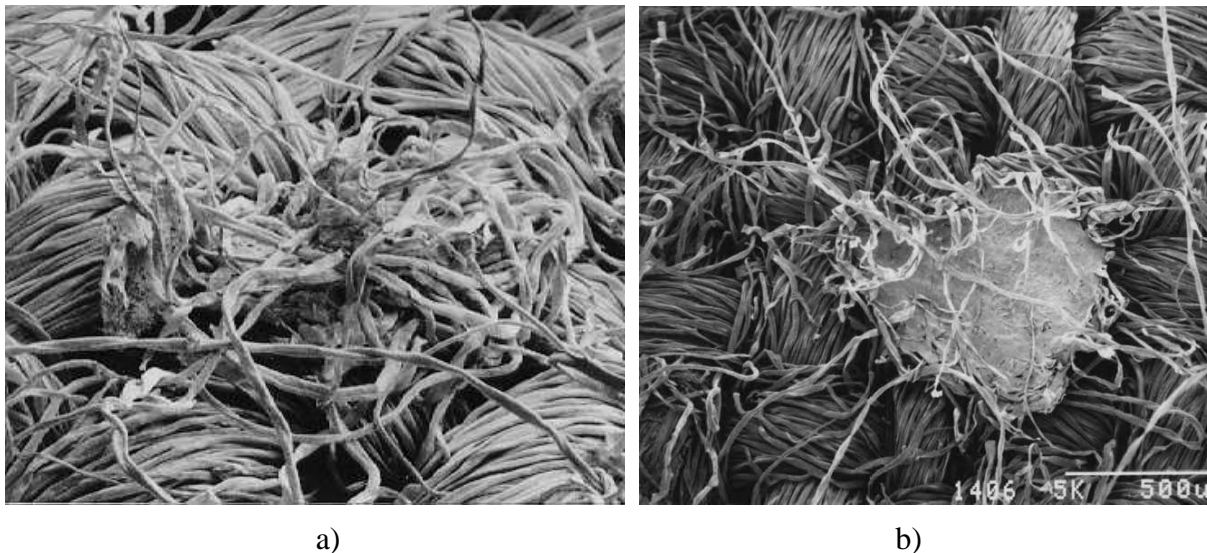
Veoma važne karakteristike kvaliteta pamuka su čistoća (sadržaj primesa i nečistoća), količina i vrsta defekata i lepljivost vlakana. Nečistoće su mera nevlaknastih materijala u pamuku. Površina uzorka pamuka se skenira video kamerom i izračunava procenat površine prekrivene česticama nečistoća. Neorganske nečistoće kao što su zemlja, pesak i prašina, nalaze se u sirovom pamuku i pamuku posle egreniranja. One se uglavnom odstranjuju za vreme primarne prerade sirovog pamuka, ali se deo uklanja tek u predionici, odnosno u čistionici. Organske nečistoće, delovi grančica, lišća i semena, takođe se najvećim delom udaljavaju u primarnoj preradi. Međutim, delovi suvog lišća (zbog krtosti) kao i delovi semena delimično se odstranjuju u čistionici, ali jedan njihov deo zaostaje u sirovoj pređi i tkaninama [2]. Na osnovu ocene količine čestica lišća pamukovca u Upland pamuku postoji sedam klasa, koje su označene kao "Leaf Grade 1" do "Leaf Grade 7", određene na osnovu fizičkih standarda. Određivanje nečistoća i klasifikovanje prema sadržaju lišća nisu iste kategorije, ali među njima postoji određena korelacija [119, 126].

Defekte pamuka čine mrtva vlakna, vlakna anomalne ili neravnomerne debljine, gnezda i smotuljci. Mrtva vlakna su sklona obrazovanju čvorića i zamršenih mesta (gnezda) i vrlo se slabo obojavaju pri bojenju tekstilnih proizvoda. Gnezda nastaju od čvrsto slepljenih vlakana čiji krajevi štrče u stranu i zaostaju u pamuku posle primarne prerade, ali mogu nastati i u toku grebenanja i čišćenja. Smotuljci vlakana nastaju njihovim preplitanjem i obično se otvaraju grebenanjem i češljanjem [2].

Gnezda su mali zamršeni čvorovi vlakana koji se ne mogu razmrsiti i mogu biti mehaničkog ili biološkog porekla. Mehanička gnezda sadrže samo vlakna i potiču iz prerade tih vlakana [127] (slika 2.6 a), dok biološka gnezda uključuju strani materijal, kao što su delovi semena, lišća ili stabljike [128]. Treći veoma važan tip gnezda su srasla gnezda, koja se sastoje samo od vlakana, ali su biološki produkt. U tekstilnom materijalu gnezda se pojavljuju kao mrlje, koje su u bojenom materijalu obično svetlije od pozadine. Mehanička i biološka gnezda koja sadrže nezrela vlakna stvaraju nebojena mesta na gotovom materijalu. Srasla gnezda, koja se sastoje isključivo od nezrelih vlakana, uvek se pojavljuju kao bele mrlje na obojenom materijalu (slika 2.6 b). Više od 90 % gnezda u krajnjem proizvodu sadrže nezrela vlakna [128]. Ova nebojiva mesta su poznata kao bele mrlje. Nisu sva gnezda bele mrlje, ali sve bele mrlje jesu gnezda i sadrže nezrela vlakna.

Lepljivost pamuka (tzv. medna rosa) se ispoljava u berbi, a naročito dolazi do izražaja pri egreniranju i pređenju. To je složena karakteristika koja zavisi od velikog broja faktora, pre svega od stepena oštećenosti pamukovca insektima, gljivicama i bakterijama, a zatim i od oblika lista i stabla biljke, vrste i sastava mono-, oligo- i polisaharida u biljci, uslova rasta pamukovca, primene agrotehničkih mera, vremenskih uslova, kvaliteta egreniranja i drugo. Medna rosa čini ozbiljne smetnje preradi, a pređa izrađena od lepljivog pamuka je slabija,

neravnomernija sa više zadebljanja, lošeg izgleda i stvara dosta teškoća pri tkanju. Smanjenje otpadaka u preradi i poboljšanje kvaliteta ovakve pređe može se postići predenjem u zimskim periodima i pri sniženoj vlažnosti vazduha (ispod 55 %) u predionicama, kao i mešanjem lepljivog pamuka sa kvalitetnijim pamukom ili drugim vlaknima [2, 123].



Slika 2.6 a) Gnezdo mehaničkog porekla – zamršena zrela i nezrela vlakna koja se pojavljuju kao bele mrlje na obojenom materijalu; b) Sraslo gnezdo (bela mrlja) na površini materijala – sastoji se od izuzetno nezrelih vlakana koja su međusobno srasla [129]

Gustina pamuka iznosi $1,54 \text{ g/cm}^3$ što odgovara specifičnoj zapremini od $0,64 \text{ cm}^3/\text{g}$ [113].

Opip pamuka je mek i svilast, a zavisi od stepena zrelosti, čistoće i vrste samog pamuka. Ukoliko je pamuk boljeg kvaliteta, utoliko će opip biti prijatnije izražen.

Sjaj pamučnog vlakna zavisi od strukture kutikule, sadržaja voska, odnosno kutina u njoj i od uvijenosti vlakna. Po pravilu finiji pamuk ima umeren sjaj, dok je grublji pamuk bez sjaja. Pamuk sa prijatno izraženim sjajem je cenjen, međutim, sjaj pamuka ne može biti presudan za kvalitet, jer postoji pamuk dobrog kvaliteta koji je bez sjaja. U toku dorade tkanina i drugih proizvoda sjaj se može znatno povećati npr. mercerizovanjem [2, 125].

Pamuk je jedno od najznačajnijih prirodnih vlakana koje se široko koristi zbog svojih izvanrednih svojstava koja uključuju regeneraciju, biodegradaciju, mekoću, biološku kompatibilnost i higroskopnost. Zahvaljujući svojim veoma dobrim svojstvima, kao što su zatezne karakteristike (spada u jača vlakna), otpornost na habanje i klizanje žica u suvom i mokrom stanju, postojanost prema ključalim alkalnim rastvorima, velika sorpciona sposobnost, propustljivost vazduha i dobra higijeničnost, pamuk je još uvek praktično nezamenljiv u izradi svih vrsta rublja. Pamuk ima veliku primenu u izradi raznih odevnih predmeta za svakodnevnu upotrebu, kao i tehničkog tekstila i različitih vrsta higijenskog i medicinskog tekstila.

2.2. Struktura i svojstva hemijskih celuloznih vlakana

Hemijska celulozna vlakna su komercijalno najstarija hemijska vlakna iz prirodnih polimera. Razlikuju se tri grupe ovih vlakana: regenerisana celulozna vlakna u koja spadaju viskozna, bakrova i liocel vlakna, vlakna tipa Fortizan koja se dobijaju saponifikovanjem acetilceluloznih vlakana i acetatna i triacetatna vlakna [122]. Sirovina iz koje se dobijaju ova vlakna je tehnička celuloza, obična ili oplemenjena, koja se dobija iz drveta i nekih jednogodišnjih biljaka.

Od svih tekstilnih vlakana, celulozna vlakna imaju najraznovrsniji opseg struktura i svojstava. Čak nezavisno od raznolikosti prirodnih celuloznih vlakana, sa njihovim visoko kristalnim fibrilnim strukturama, manje sređena regenerisana celulozna vlakna imaju mnogo različitih struktura, koje dovode do različitih svojstava i primena.

Proizvodnju celuloznih vlakana kontrolišu dva ili tri faktora: rastvarač i način odvajanja od rastvarača i, u nekim metodama, hemijska reakcija. Izbor proizvodnih uslova između velikog broja parametara dovodi do raznovrsnosti strukture i svojstava [130]. U tabeli 2.5 dat je sumarni pregled raznih načina formiranja celuloznih vlakana koji utiču na rezultujuću strukturu.

Tabela 2.5 Hemijska celulozna vlakna [130]

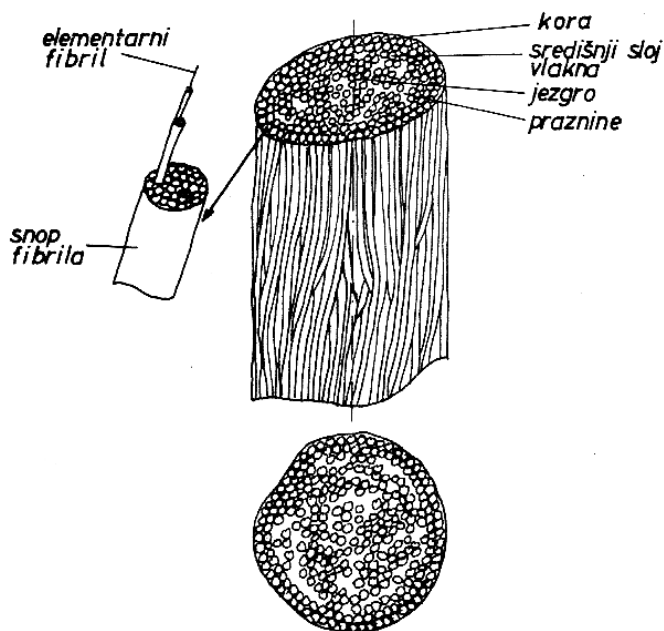
Tip vlakna	Proces i faktori koji određuju strukturu
Bakrovo	Rastvor u bakar-amonijum-hidroksidu; formiranje bakrovog kompleksa celuloze; koagulisanje u vodi
Prvo viskozno ispredeno u laboratoriji	Natrijum-celulozni ksantogenat, rastvoren u natrijum-hidroksidu, koagulisanje i regenerisanje u kiseloj taložnoj kupki
Viskozno obično ^b	Cinkovi joni dodati u kiselu taložnu kupku, dajući strukturu kora-jezgro
Fortizan ^a	Regenerisan iz visoko istegnutih celuloznih acetatnih vlakana
Ojačano (HT) ^b	Visok sadržaj cinka u taložnoj kupki i modifikatori u viskoznom rastvoru, struktura "samo kora"
Modalno, štapel ^c	Modifikacije u viskozi i slabo kisela taložna kupka
Polinožno ^c	Visoka viskoznost viskoze, modifikovana taložna kupka, omogućavajući formiranje gela
Viskozno, kovrdžavi štapel	Modifikacija viskoznog postupka koja izaziva pucanje kore
Cordenka EHM HT	Dodavanje formaldehida viskoznom procesu
Liocel (Tencel)	Rastvor u amino oksidu; koagulisanje u slabom vodenom rastvoru amino oksida
Acetatno	Sekundarni celulozni acetat suvo preden iz rastvora u acetonu
Triacetatno	Celulozni triacetat suvo preden iz rastvora u metilen-hloridu

^aNije komercijalan. ^b(Koagulisanje + regenerisanje) → istezanje. ^c(Koagulisanje + istezanje) → regenerisanje.

Regenerisana celulozna vlakna (viskozna, bakrova i liocel) se sastoje od čiste celuloze čiji je stepen polimerizovanja znatno manji nego u biljnim vlaknima i iznosi 220-800. To je posledica dejstva koncentrovanih rastvora različitih reagenasa koji se koriste u procesu dobijanja tehničke celuloze i njene pripreme za oblikovanje u vlakno, formiranje vlakana i njihove dorade.

Po svojoj fizičkoj strukturi celuloza u regenerisanim celuloznim vlaknima odgovara strukturi celuloze II. Makromolekuli u regenerisanim vlaknima obrazuju nadmolekulske strukture koje se sastoje iz mikrofibrila i fibrila. Po njihovoj dužini smenjuju se područja različite gustine slaganja makromolekula i različitog stepena kristalnosti, koji u viskoznim vlaknima, na primer, iznosi oko 40-50 %. Kristalnost i drugi parametri strukture ovih vlakana (stepen orijentisanosti i dimenzije kristala) mogu se menjati izmenom nekih parametara procesa formiranja vlakana, inkorporisanjem nepolimernih ili polimernih aditiva i hemijskim modifikovanjem osnovnog polimera putem supstitucije ili kalemljenja [2].

Regenerisana celulozna vlakna poseduju slojevitou strukturu sa slabo ili vrlo izraženom strukturom "kora-jezgro" i prisustvom pora i praznina koje nastaju u toku koagulisanja vlakana. Snopovi fibrila koji čine vlakno su izgrađeni od velikog broja elementarnih fibrila. Značajna strukturna karakteristika regenerisanih celuloznih vlakana je oblik njihovog poprečnog preseka, koji može biti različit, npr. okrugao, nepravilan, u obliku slova Y, E, U, T i ravan. Model strukture viskoznih i drugih hemijskih vlakana prikazan je na slici 2.7. Kora sadrži brojne male kristalite dok jezgro ima manji broj ali većih kristalita. U poređenju sa jezgrom, kora je jača i manje rastegljiva. Ona takođe manje bubri od jezgra; zadržavanje vode je manje u kori nego u jezgru, mada je vlažnost veća u kori. Ovo se može objasniti povećanim brojem hidroksilnih grupa koje su dostupne za vezivanje sa molekulima vode kao rezultat veće ukupne površine mnogobrojnih malih kristalita [131].



Slika 2.7 Model strukture viskoznih i drugih hemijskih vlakana [2]

Sva regenerisana celulozna vlakna se mogu proizvoditi kao kontinualne filamentne niti, koje sadrže i do nekoliko hiljada filamenata, ili kao teži kablovi sa milionima filamenata, koji se seku na štapel vlakna pogodne dužine za dobijanje kratkog ili dugog štapela. Tipična finoća vlakna bi bila u opsegu 0,1-0,5 tex (10-20 μm u prečniku), mada su dostupna i razna finija kao i grublja vlakna, do oko 5 tex (60 μm) [130].

Regenerisana celulozna vlakna su vrlo hidrofилна i njihova standardna vlažnost iznosi 12-13 %. U vodi brzo bubre pri čemu im se prečnik povećava do 50 %, a dužina za 2-5 %. Ova vlakna zadržavaju približno dva puta veću količinu vode nego pamučna vlakna. Regenerisana celulozna vlakna imaju i veću hemijsku aktivnost od prirodnih celuloznih vlakana. Povišena higroskopnost regenerisanih celuloznih vlakana i njihova velika hemijska aktivnost su posledica manjeg ukupnog dejstva vodoničnih veza između makromolekula, manjeg stepena orijentisanosti i relativno manje gustine slaganja njihovih makromolekula. Zbog svega navedenog, kao i zbog manjeg stepena polimerizovanja, jačina regenerisanih celuloznih vlakana je znatno manja od jačine prirodnih celuloznih vlakana, naročito u mokrom stanju, kada im jačina opada i do 50 % kao posledica povećanja međumolekulskog rastojanja usled bubrenja [2].

Viskozna vlakna se proizvode u širokom asortimanu. U zavisnosti od finoće, jačine i dužine proizvode se kao tekstilni i tehnički filament (rejon ili viskozna svila i viskozni kord), štapel vlakna pamučnog, vunenog i tepih tipa, celofanske sečene niti i različita specijalna viskozna vlakna. Iz potrebe da se običnim viskoznim vlaknima poboljša jačina, modul elastičnosti (naročito u mokrom stanju) i otpornost prema hemikalijama, nastala su tzv. ojačana viskozna vlakna (HT-tipovi) i modalna viskozna vlakna visokog mokrog modula HWM i polinozna vlakna. Viskozna vlakna mogu da se proizvode kao sjajna, mat, pumat ili obojena u masi, talasava ili kovrdžava, šuplja i šupljikava vlakna, diferencijalno obojiva, vlakna smanjene zapaljivosti, vlakna smanjene moći upijanja vlage ili uvećanog stepena upijanja i zadržavanja vlage i tečnosti, jonoizmenjivačka, elektroprovodljiva, antifrikciona itd.

Viskozni proces su otkrili britanski hemičari Cross, Bevan i Beadle istražujući promene na celulozi koje nastaju pri mercerizovanju. Oni su 1891. godine dokazali da se celuloza u prisustvu alkalija rastvara u ugljendisulfidu i prelazi u ksantogenat celuloze koji se rastvara u razblaženom rastvoru NaOH stvarajući rastvor viskozu (u početku nazvan "viskozni celulozni rastvor"). Ovaj rastvor se može konvertovati u čistu celulozu dodatkom razblažene sumporne kiseline [132].

Hemija viskoznog procesa se sastoji prvo u razdvajanju lanaca celuloze I u amorfним i kristalnim područjima bubrenjem u prisustvu hidrata NaOH, ksantogenovanjem nekih od hidroksilnih grupa tako da se dobijeni derivat može rastvarati u vodi ili razblaženom NaOH, a zatim u preokretanju procesa pri ispredanju uklanjanjem solventne vode, Na⁺ jona i ksantogenskih grupa, tako da hidroksilne grupe celuloze mogu privući lance međusobno, najpre preko van der Waals-ovih sila, a zatim preko vodoničnih veza kako bi se dobila struktura celuloze II [133].

Tehnološki postupak izrade viskoznih vlakana obuhvata sledeće operacije [2]:

- alkalizovanje celuloze,
- prevođenje alkaliceluloze u rastvorno stanje putem obrazovanja ksantogenata rastvorljivog u alkalijama,
- čišćenje i degaziranje dobijenog predivog rastvora,
- formiranje niti potiskivanjem rastvora kroz mlaznice i koagulisanje u kupki za taloženje viskoze uz razlaganje ksantogenata,
- ispiranje vlakna od soli i sumpornih jedinjenja, obrada avivažnim sredstvima i sušenje.

Od navedenih stadijuma postupka najvažniji je stadijum formiranja vlakana. Kada se viskozni rastvor uvede u taložnu kupku, određeni broj značajnih hemijskih i fizičkih procesa počinje da se simultano odvija. Brzina, interakcije i dozvoljeni stepen mehanizama ovih procesa određuju plastičnost, istegljivost i orijentisanost obrazovane gel niti. Od njih zavisi i morfološka sredećenost tako da se može dobiti široki spektar submikroskopske sredećenosti, od visoko amorfne do visoko kristalne. Iako je hemija viskoznog procesa u osnovi jednostavna, sukcesivnost hemijskih reakcija je veoma kompleksna, tako da način njihovog vođenja

ovaj rastvor zahteva sazrevanje. U toku sazrevanja se ksantogenat celuloze i sporedni produkti hemijski i fizičko-hemijski transformišu, kako bi se postigao određen nivo postojanosti viskoze prema sredstvima za koagulisanje, odnosno njena stabilnost pri taloženju. Najvažnija promena u ovom stadijumu je spontana dekompozicija celuloznog ksantogenata koja, ukoliko se odvija neometano, rezultuje u geliranju viskoznog rastvora. Ova promena je povezana sa promenama u distribuciji ksantogenskih grupa unutar celuloznog lanca kao i između celuloznih lanaca. U tabeli 2.7 prikazan je složeni sastav viskoze pre njenog oblikovanja u vlakna, kao i sastav suvog vlakna. Priprema viskoze za oblikovanje u vlakno uključuje i filtriranje i degaziranje viskoze u toku kojih se takođe odigravaju hemijska i fizičko-hemijska pretvaranja. Degaziranje viskoze, tj. udaljavanje rastvorenog i mehanički zadržanog vazduha je važna tehnološka operacija s obzirom na to da pri formiranju vlakana dispergovani vazduh dovodi do obrazovanja defekata u njima [2, 133, 134].

Tabela 2.7 Sastav viskoze pre oblikovanja u vlakna i sastav suvog vlakna [2]

Sastav viskoze	%	Sastav suvog vlakna	%
Celuloza	7	α - celuloza	80,0
Ksantogenske grupe	2,26	Hemiceluloze	15,0
NaOH	2,72	Pentoze	3,5
Karbonatni natrijum	1,70	Smole	0,5
Tiokarbonatni natrijum	0,92	Sapuni ili ulja	0,5 – 0,7
Natrijum-sulfid	0,45	Sumpor	0,1
Natrijum-pertiokarbonat	0,32	Pepeo	0,4 – 0,5
Tiosulfat, natrijum-tiosulfat	0,15	Lignin	0,3
Voda	85		

Pri oblikovanju viskoze u vlakna, predivi rastvor se potiskuje kroz mlaznice koje su uronjene u taložnu kupku takvog sastava da nastale strujnice očvršćavaju. U ovom stadijumu formirane niti imaju najmanju jačinu, tako da treba obezbediti uslove da ne dolazi do njihovog prekidanja ili obrazovanja defekata koji dovode do nastanka zadebljanja, slepljenih vlakana i izdvajanja čestica polimera [2]. U trenutku kontakta strujnice sa rastvorom kupke za taloženje počinju kompleksne promene koje konvertuju rastvor najpre u gel strukturu, a zatim u vlakno. Na graničnoj površini taložna kupka – viskoza vlada jako presićenje u kome praktično trenutno nastaju nukleusi strukture oko kojih počinje rast fibrilne strukture gela. Koagulisanje organskog materijala nastupa sa neutralisanjem natrijum-hidroksida u viskoznom rastvoru pod dejstvom sumporne kiseline iz taložne kupke. Istovremeno, kiselina difunduje u koagulisanu nit i izaziva razlaganje natrijum-celuloznog ksantogenata, regenerišući celulozu [134]. Paralelno se vrši istežanje viskoznog vlakna kako bi se molekuli celuloze orijentisali u pravcu ose vlakna.

Oblici strukturnih elemenata u viskoznim vlaknima u mnogome zavise od sastava taložne kupke. Konvencionalna kupka za standardna vlakna sadrži sledeće sastojke:

- izoljavajući agens, npr. Na_2SO_4 ,
- regenerišući agens, npr. H_2SO_4 ,
- agens koji obrazuje jedinjenja, npr. ZnSO_4 .

Vrsta i količina komponenata u kupki zavise od vrste vlakna koje se želi proizvesti. Pri formiranju polinoznih vlakana koristi se kupka koja ne sadrži cink, dok se za ispredanje preko

95 % vlakana koristi kupka sa Zn jonima. Uloga cinka u regulaciji strukture viskoznih vlakana je od izuzetnog značaja. U procesima ispredanja bez cinka pod normalnim uslovima koncentracije kiseline u taložnoj kupki, ksantogenat celuloze je konvertovan u celulozno-ksantogensku kiselinu a zatim u celulozu. Proces se odvija brzo i do regenerisanja dolazi pre postizanja odgovarajuće orijentacije molekula celuloze. Krajnji rezultat je slaba kristalna organizacija, a time i vlakno male jačine. U prisustvu cinka, međutim, dolazi do obrazovanja intermedijarnog kompleksa Zn-ksantogenata koji je stabilniji prema regenerisanju indukovanom kiselinom, tako da je regenerisanje celuloze sporije. Pored toga, cink, kao dvovalentni jon, formira poprečne veze između susednih ksantogenskih grupa. Zahvaljujući takvom dejstvu cinka, nastali gel se može istežati do visokog stepena pre regenerisanja, što kao rezultat daje visoko orijentisanu strukturu sa relativno većim brojem kristala malih dimenzija [133].

Regenerisana nit se dalje podvrgava ispiranju i desulfuraciji, tj. tretiranju rastvorom natrijum-sulfida kako bi se uklonio sumpor sa površine niti. Sveže formirane niti se bele hipohloritom radi poboljšanja beline. Na opranu nit se nanosi avivaža sa ciljem smanjenja trenja, poboljšanja opipa i preradivosti, a zatim se nit suši i namotava na kalem. U slučaju štapel vlakana, kabl nastao spajanjem pojedinačnih snopova niti se isteže do željenog stepena i seče, a dobijena vlakna se nakon dorade presuju u bale [2, 134].

Viskozno vlakno u svojoj građi nije homogeno. Ono se sastoji od celuloze, ali sadrži i ostatke pratećih materija upotrebljene celuloze. Takođe, ako su vlakna matirana sadrže sredstvo za matiranje (obično TiO_2), a ako su obojena sadrže čestice boje. Pored toga, vlakna mogu sadržavati i izvesne elemente hemikalija koje nisu u potpunosti isprane pri izradi vlakana.

Uslovi ispredanja, sastav taložne kupke i aditivi koji se dodaju viskoznom rastvoru određuju fizičko-mehaničke karakteristike vlakana – njihovu prekidnu jačinu i izduženje, modul, otpornost prema bubrenju u vodi i karakteristike u mokrom stanju [134]. Povećanje plastičnosti gela zajedno sa usporavanjem regenerisanja omogućava ispravljanje molekulskih lanaca u pravcu ose vlakna putem orijentacionog istezanja. Poboljšanje plastičnosti gela je osnovni korak u proizvodnji regenerisanih celuloznih vlakana velike jačine. Postoje tri praktična načina da se poboljša plastičnost gela pri čemu nastaju odgovarajuća vlakna, i to su [133]:

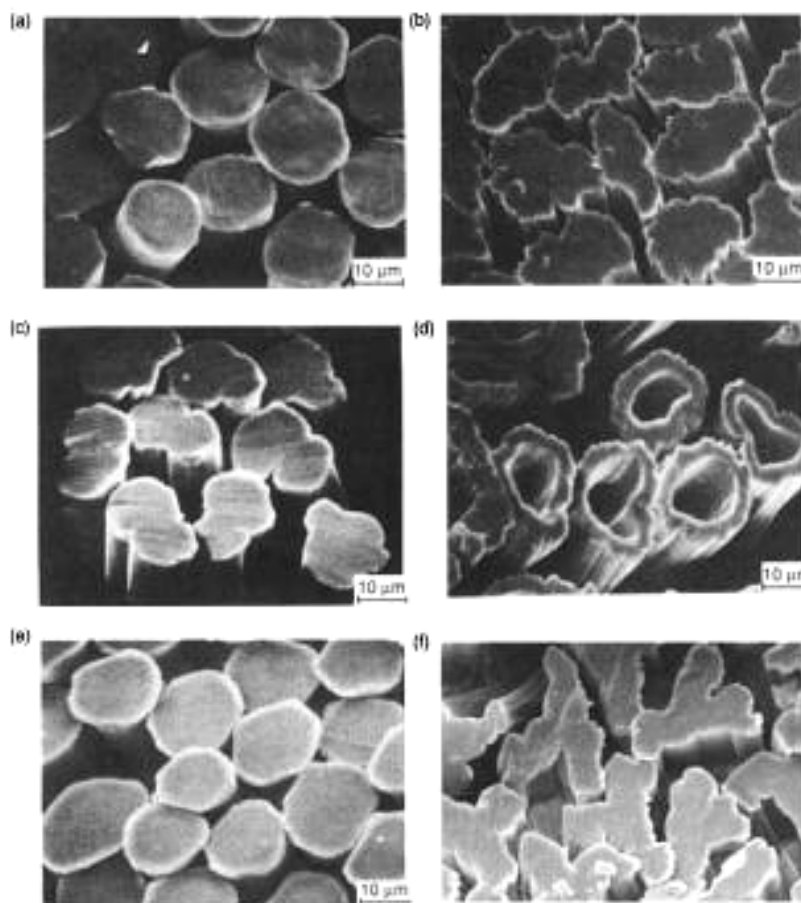
1. dodavanje hemijskih modifikatora viskoznom rastvoru:
 - tehnički filament
 - HWM vlakna (modifikovana)
2. upotreba taložne kupke sa niskim sadržajem kiseline, soli i niskom temperaturom:
 - polinozna vlakna (Toramomen proces)
3. dodavanje formaldehida kupki za taloženje:
 - Super HWM ili Ten X filament.

Uslovi formiranja viskoznih vlakana dovode do obrazovanja vlakana strukturno nehomogenog poprečnog preseka. Na površini vlakna se nalazi membrana debljine oko 1-2 nm, a ispod nje se nalazi kora koja zauzima oko 2-60 % površine preseka, ispod koje leži jezgro [2]. Varijacije hemijskih komponenata, njihove koncentracije i temperature taložne kupke određuju brzine koagulisanja i regenerisanja i time relativne količine kore i jezgra u poprečnom preseku vlakna. Tabela 2.8 prikazuje razlike u svojstvima kore i jezgra. Kora poseduje viši stepen sredenosti i bolja mehanička svojstva od jezgra, tako da se u proizvodnji vlakana poboljšanih performansi teži povećanju njenog udela, u nekim slučajevima do te mere da se po čitavom poprečnom preseku ostvari struktura kore [134]. Struktura "samo kora" se može dobiti jedino u prisustvu modifikatora.

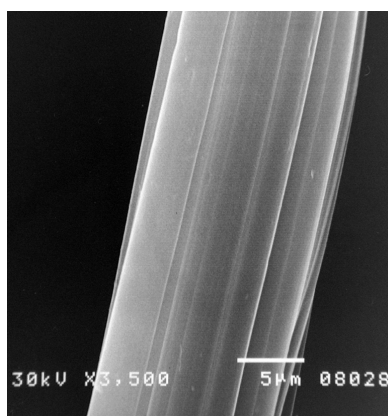
Morfologije poprečnog preseka nekih hemijskih celuloznih vlakana ilustrovane su na slici 2.8, a podužni izgled običnog viskoznog vlakna na slici 2.9.

Tabela 2.8 Karakteristike kore i jezgra viskoznog vlakna [133]

Karakteristike	Kora	Jezgro
Dužina kristala (Å)	104	206
Bubrenje u vodi (%)	55 – 65	75 – 85
Higroskopnost (%)	13 – 14	11 – 12
Gubitak jačine u mokrom stanju (%)	20	50



Slika 2.8 Oblici poprečnog preseka nekih hemijskih celuloznih vlakana: a) HWM, b) konvencionalna viskozna, c) kovrdžava HWM, d) šuplja, e) bakrova, f) trilobalna [135]



Slika 2.9 Podužni izgled konvencionalnog viskoznog vlakna [136]

Kao što je rečeno, postoji više tipova viskoznih vlakana različite finoće i dužine kao i fizičko-mehaničkih karakteristika. Viskozna vlakna su dizajnirana da poseduju opseg svojstava kako bi odgovorila zahtevima raznovrsnih krajnjih primena.

Viskozna vlakna u obliku štapela obuhvataju više od 55 % svih vrsta viskoznih vlakana i proizvode se takođe u različitim tipovima [2]. U tabeli 2.9 dat je uporedni pregled svojstava osnovnih tipova viskoznog vlakna i pamuka.

Tabela 2.9 Uporedni pregled važnijih karakteristika raznih tipova viskoznih (CV) vlakana i pamuka [2]

Karakteristike	Tipovi običnih CV-vlakana			Modalna vlakna		Pamuk raznog porekla
	pamučni tip	vuneni tip	ojačani tip	HWM tip	polinozna	
Prekidna jačina: kondicionirana, cN/tex	22-28	16-20	34-36	40	40-48	25-40
mokra, cN/tex	12-18	8-10	24-26	28	30-38	29-46
relativna mokra*, %	55-65	53-57	70	70	70-80	110-120
u omči, cN/tex	6-9	5-6	8	8	6-7	20-22
Prekidno izduženje: kondicionirano, %	15-19	21-23	19-23	15	8-12	7-10
mokro, %	19-23	24-28	25-29	16	10-15	10-14
Mokro izduženje pri 5 cN/tex	12	15	10	4	1,5-3	6
Mokri modul, cN/tex	40-50	20-30	50-70	80-100	120-150	80-110
Buburenje u vodi, %	90	110-120	70	65	60	46
Rastvorljivost u 6 % NaOH, %	20-22	20-22	8-10	4-8	1,5-3	-
Stepen polimerizovanja	300	280-320	350	350	450-500	2000

*Odnos prekidne jačine vlakna u mokrom i suvom stanju.

Viskozna vlakna su visoko apsorptivna, meka, udobna, a odlikuju se i dobrom higijeničnošću. Pored toga, zahvaljujući niskoj ceni i mogućnostima da se u preradi mogu upotrebiti sama ili u mešavini sa drugim vlaknima, nalaze veliku primenu u tekstilnoj industriji.

Saglasno širokom asortimanu, upotreba viskoznih vlakana je veoma široka i raznovrsna. Koriste se za izradu rublja, posteljine, odeće, dekorativnog tekstila, kao i industrijskih, netkanih, medicinskih hirurških i drugih proizvoda.

U preradi viskoznih vlakana se mora imati u vidu njihova smanjena jačina u mokrom stanju, kao i veća osetljivost na dejstvo hemikalija. Zbog toga se pri izradi mešavina biraju druge komponente koje će svojim prisustvom u optimalnim količinama doprineti da se negativna svojstva viskoznih vlakana priguše, a pozitivna dođu do izražaja.

3. Reaktivnost celuloze

Celulozna vlakna različitog porekla, stepena polimerizovanja i stepena kristalnosti zahtevaju različite uslove reakcije, što je posledica njihove različite nadmolekulske strukture koja jako utiče na pristupačnost hidroksilnih grupa, centara napada na celulozu [137].

Kao što je poznato, svaka anhidroglukopiranozna jedinica celuloze sadrži tri hidroksilne grupe, jednu primarnu i dve sekundarne. Ove grupe su sposobne za hemijske reakcije (npr. esterifikovanje i eterifikovanje) tipične za hidroksilne grupe. Međutim, situacija je kompleksnija zbog mikrostrukture nativne celuloze koja ima visok stepen kristalnosti, što limitira pristupačnost hidroksilnih grupa reagensima.

Pristupačnost hidroksilnih grupa za reagense zavisi od kristalnosti celuloze [138]. Hidroksilne grupe u amorfim područjima su veoma pristupačne i reaktivne. Za razliku od njih, hidroksilne grupe koje se nalaze u gusto upakovanim kristalnim područjima sa jakim intermolekulskim vezama mogu biti potpuno nepristupačne [139].

Između suštinske reaktivnosti hidroksilnih grupa celuloze i hidroksilnih grupa malih molekula ne postoji razlika, ali u slučaju celuloze kristalnost i nerastvorljivost ometaju pristup hidroksilnih grupa reagensima [14].

Reaktivnost celuloze je dakle usko povezana sa njenom pristupačnošću, pod kojom se podrazumeva relativna lakoća sa kojom reagensi mogu dospeti do hidroksilnih grupa [139]. Između pristupačnosti i reaktivnosti celuloze postoji veza koja omogućava da se na osnovu pristupačnosti celuloze predvidi njena reaktivnost prema nekim reagensima [140]. Tako, mali molekuli vode imaju potpuni pristup nekristalnim domenima celuloze. Molekuli polarnih organskih tečnosti (metanol, etanol i mravlja kiselina) imaju delimični pristup, dok sa povećanjem prečnika organskih molekula opada njihova pristupačnost strukturi celuloze.

Za merenje pristupačnosti celuloze, a time i njene reaktivnosti, mogu se koristiti različite metode: sorpcija vodene pare, sposobnost zadržavanja vode, sorpcija joda i boja, hidroliza kiselinama i druge metode [24, 90, 141, 142].

Prema Krässing-u [90], pristupačnost celuloze uglavnom zavisi od broja i dimenzija pora u strukturi celuloze, dimenzija i tipa rastvarača ili reagensa, unutrašnje pristupačne površine i strukture molekula celuloze, od čega zavisi koje će hidroksilne grupe biti dostupne. Prema tome, da bi se povećala pristupačnost celuloze, pore moraju biti otvorene, a fibrilni agregati i kristalne oblasti izmenjene.

Struktura pora se može otvoriti adsorpcijom para, na primer, etanola, sirćetne kiseline i vode [143]. Tako, prečnik pora koji u suvim biljnim vlaknima iznosi 0,5-2 nm, bubrenjem se povećava na 3-7 nm, dok se pri tome aktivna površina vlakana povećava od 10-20 m²/g na 100-200 m²/g [2].

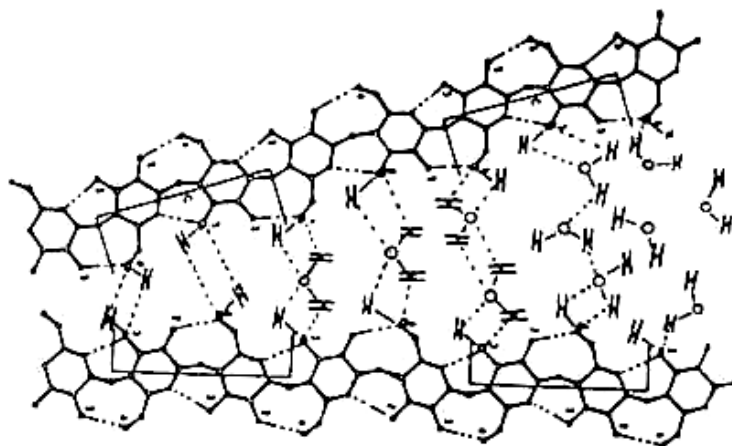
Sve reakcije celuloze mogu se klasifikovati u dve grupe. Prvu grupu čine reakcije u koje su uključene hidroksilne grupe. Prema kiselosti, hidroksilne grupe se mogu poredati u sledeći niz: C2-OH > C3-OH > C6-OH. Kada su hidroksilne grupe na drugom C-atomu jonizovane ili supstituisane, kiselost C3-OH se smanjuje i hidroksilne grupe na C-6 mogu ispoljiti veći stepen kiselosti. Druga grupa obuhvata reakcije praćene destrukcijom molekulskih lanaca [113].

Kao posledica nadmolekulske strukture, celuloza je nerastvorljiva u vodi i većini organskih rastvarača, čak i na povišenim temperaturama.

3.1. Dejstvo vode na celulozu

Zbog velikog sadržaja hidroksilnih grupa (31,48 % masenih), celuloza se ponaša kao hidrofilna supstanca koja sa vodom obrazuje vodonične veze. Kako hidroksilne grupe ostataka glukoze, uspostavljanjem intermolekulskih vodoničnih veza, učestvuju u izgradnji kristalne strukture vlakana celuloze, vodonične veze sa molekulima vode mogu da uspostave samo one OH grupe koje se nalaze u amorfnim područjima celuloze [13, 24]. Međutim, to nije dovoljno da makromolekuli native celuloze budu rastvorni u vodi. Prema tome, nerastvorljivost celuloze u vodi posledica je visokog stepena kristalichnosti (73 % kod pamučnog vlakna i oko 60 % kod celuloze iz drveta) [144, 145].

Interakcije između celuloze i vode veoma zavise od nadmolekulske strukture datog uzorka, količine već prisutne vode u polimeru i od faktora kao što je temperatura, koja utiče na strukturu vode [24]. Prodiranjem vode u celulozna vlakna dolazi do ograničenog anizotropnog bubrenja i zapreminske kontrakcije vlakana, koja se objašnjava dipolnim poljem u kome negativno naelektrisane OH grupe celuloze privlače pozitivno naelektrisanu stranu molekula vode [2]. Anizotropno bubrenje označava izrazito bubrenje po prečniku vlakna, a javlja se kao posledica usmerenosti makromolekula i fibrila u pravcu ose vlakna [24]. Slika 3.1 prikazuje amorfnu područje celuloze u kome adsorbovani molekuli vode vrše razmicanje makromolekulskih lanaca, što dovodi do povećanja zapremine, a time i bubrenja celuloze. Voda može da prouzrokuje jedino interkristalno bubrenje celuloze, tj. samo unutar amorfnih regiona.



Slika 3.1 Detalj amorfnog područja celuloze koji prikazuje adsorpciju vode [81]

Ispitivanja su pokazala da se u amorfnim područjima celuloze mogu obrazovati dva tipa hidrata u kojima su makromolekuli povezani sa jednim ili sa dva molekula vode. Pored hidratne vode, u celuloznim vlaknima je prisutna i adsorpciona i kapilarna voda. Na primer, od 45 % upijene vode u pamuku, 15 % je adsorpciona, a 30 % kapilarno vezana voda [2].

Celuloza različitog porekla, zbog različite strukturne građe, pokazuje različito izraženu higroskopsnost. Hemijska celulozna vlakna imaju rastresitiju strukturu i veći sadržaj slobodnih vodoničnih veza, tako da je stepen zamene ovih veza vodom znatno veći nego u biljnim vlaknima, što za posledicu ima smanjenje jačine ovih vlakana u mokrom stanju. Vezivanje vode u celuloznim vlaknima dovodi do promene ne samo njihovih mehaničkih, već i hemijskih i električnih svojstava.

Bubrenje native i regenerisane celuloze i njihovih derivata u vodi je vrlo različito: za pamuk iznosi 18 %, viskoznu svilu 74 %, bakrova vlakna 86 %, celulozni triacetat 10 %, celulozni tripionat 2-3 % i celulozni tributirat 1,8 % [2].

3.2. Dejstvo alkalija na celulozu

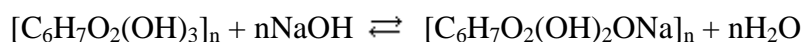
Dugo vremena je poznato da jaki vodeni rastvori alkalija deluju na celulozu. Još u 19-tom veku Mercer je otkrio da celulozna vlakna bubre u vodenim rastvorima natrijum-hidroksida i da dolazi do drastičnih promena svojstava vlakana. Pri obradi celuloze alkalijama, najčešće rastvorima natrijum-hidroksida, celuloza bubri, povećava se debljina vlakana i smanjuje njihova dužina, menja se nadmolekulska i morfološka struktura i rastvaraju se i udaljavaju iz celuloze niskomolekulske frakcije, hemiceluloze. Uticaj alkalija na celulozu zavisi od vrste alkalija, njihove koncentracije, temperature rastvora i vremena delovanja.

Hladni alkalni rastvori ne dovode do destrukcije celuloze, ali izazivaju strukturalna pretvaranja i razne hemijske i fizičko-hemijske promene. Razblaženi rastvori NaOH, na sobnoj temperaturi, ne izazivaju oštećenje celuloze. Na temperaturama od 130-140 °C alkalna sredina ubrzava delovanje kiseonika iz vazduha na celulozu. Tople alkalije oštećuju celulozu tako što izazivaju gubitak njene mase, verovatno stupnjevitom degradacijom od redukujućeg kraja celuloznog lanca. Stabilnost celuloze prema alkalijama može se povećati oksidisanjem aldehidnih grupa do karboksilnih, redukovanjem do alkoholnih ili blokiranjem nagrađivanjem metilglukozida [2].

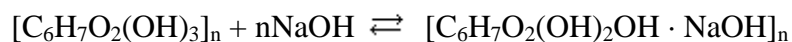
Izučavajući dejstvo rastvora NaOH na celulozu, Mercer [146] je napravio listu uticaja koncentracija natrijum-hidroksida na bubrenje celuloznog vlakna:

- 3,2 % NaOH je bez dejstva,
- 6,5 % NaOH deluje neznatno i na veoma niskim temperaturama,
- 10 % NaOH povećava efekat koji ostaje izraženiji na najnižim temperaturama,
- 18,8 % NaOH veoma povećava delovanje na celulozu.

Dejstvom koncentrovanih rastvora alkalija na celulozu obrazuje se novo jedinjenje alkaliceluloza, koja može da sadrži i do tri mola alkalija po molu celuloze. Kada je u pitanju njena struktura, postoje različita mišljenja. Prema jednom, u reakcijama sa alkalijama celuloza se ponaša kao alkohol, pa dolazi do zamene jona vodonika u hidroksilnoj grupi jonom natrijuma uz obrazovanje alkoholata, odnosno natrijum-celulozata. Alkaliceluloza je vrlo reaktivna i u mnogim reakcijama se ponaša kao natrijumova so celuloze, po šemi:



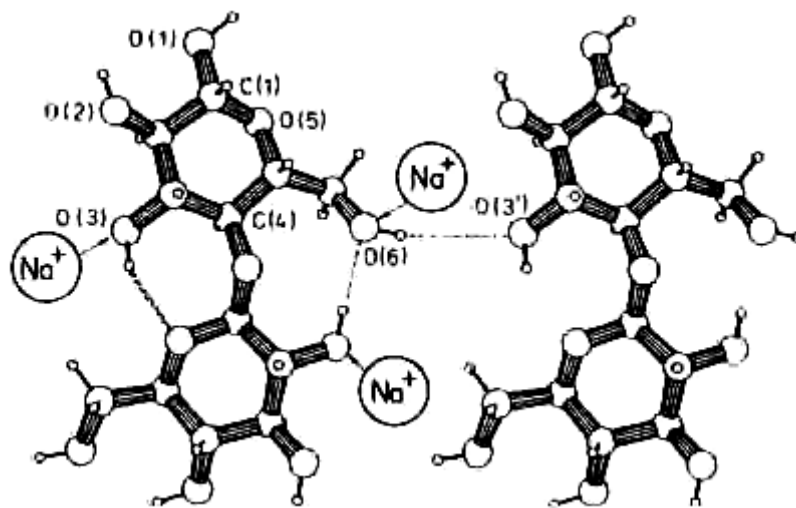
Prema mišljenju druge grupe istraživača, dejstvom alkalija na celulozu obrazuju se molekulska ili adiciona jedinjenja, alkaliceluloza, po šemi:



Preovladava mišljenje da pri dejstvu natrijum-hidroksida koncentracije 12-18 % nastaje alkaliceluloza sastava $(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_5)_2 \cdot \text{NaOH}$ ili $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5) \cdot \text{C}_6\text{H}_9\text{O}_4\text{ONa}$, a da se pri povećanju koncentracije natrijum-hidroksida na 20-40 % dobija jedinjenje $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot \text{NaOH}$ ili $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O} \cdot \text{ONa}$ [2].

Pretpostavlja se da natrijum-hidroksid reaguje sa hidroksilnim grupama koje se nalaze na drugom ugljenikovom atomu, zbog njihovog najizraženijeg kiselog karaktera, pre svega uz obrazovanje alkoholata celuloze, a da ostale hidroksilne grupe reaguju na način koji dovodi do molekulskog prisajedinjenja molekula natrijum-hidroksida [2]. Na slici 3.2 dat je šematski prikaz mogućih interakcija između celuloznih lanaca i Na^+ jona. Praktično svi autori [147-

151] se slažu da Na^+ raskida intermolekulske vodonične veze $\text{O2-H}\cdots\text{O6}'$ i da je najverovatnija lokacija Na^+ jona na C2-OH. Ugljenik u položaju 3 pokazuje veću rezistentnost prema formiranju kompleksa sa natrijum-hidroksidom.

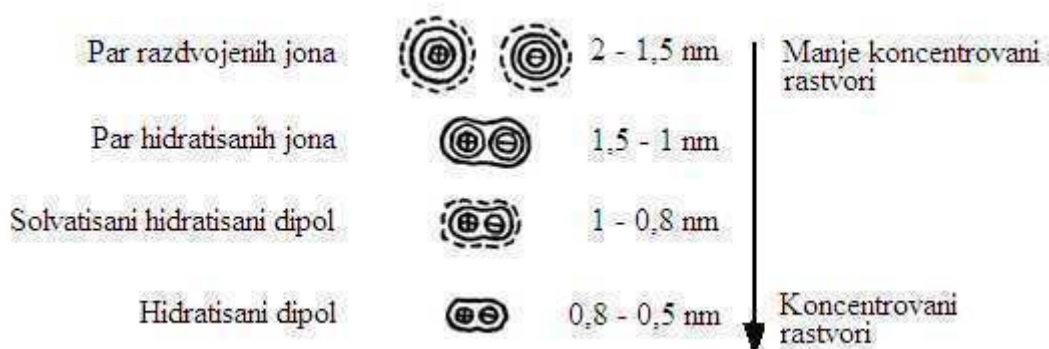


Slika 3.2 Interakcije između Na^+ i celuloznog lanca [150]

Fizičko-hemijski procesi koji se odigravaju u alkalnoj sredini posledica su intenzivnog bubrenja i delimičnog rastvaranja niskomolekulskih frakcija celuloze. Osnovni uzrok bubrenja je hemijska reakcija, kao i promena hemijskog potencijala usled razlike energetske stanja celuloze i alkaliceleuloze. Energetske promene vezane su za promenu u kristalnoj rešetki, a toplota hidratacije ima određeni uticaj na taj proces.

Osim hemijske reakcije, pri bubrenju celuloze u alkalijama veoma je važna količina tečnosti koju ona upije kapilarnim putem. Uloga kapilarnih sila u tom procesu se može proceniti ako se ima u vidu da je u alkaliceleulozi hemijski vezano 58 % supstance u obliku $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5 \cdot \text{NaOH} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Čak i ako se uzme da se zajedno sa molekulima natrijum-hidroksida zadržava i 10 molekula hidratne vode, tada bi bez učešća kapilarno vezane vode stepen bubrenja imao maksimalnu vrednost oko 170 %. Kapilarno usisavanje je određeno površinskim naponom i dimenzijama pora. Pore rastu pri dejstvu rastvora natrijum-hidroksida usled čega se unutrašnja površina mercerizovane celuloze povećava od $8 \text{ m}^2/\text{g}$ na $300\text{-}400 \text{ m}^2/\text{g}$ [2].

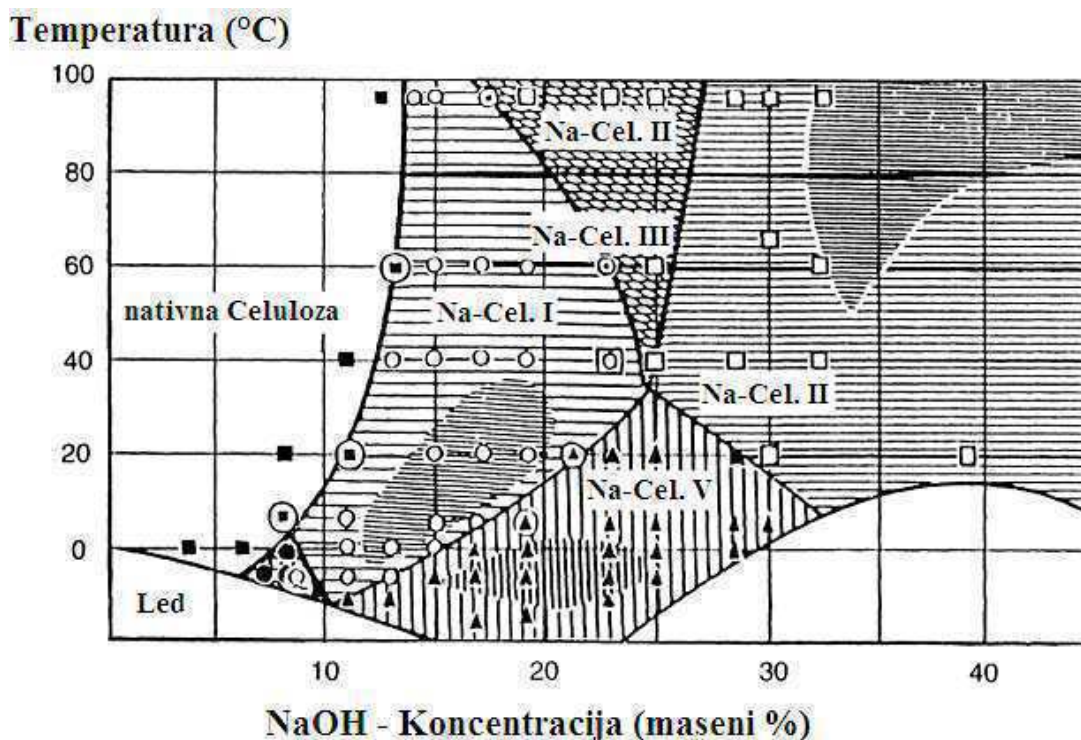
Alkaliceleuloza je nepostojano jedinjenje koje pri obradi vodom lako hidrolizuje uz obrazovanje celuloznog hidrata. Ova celuloza se razlikuje od polazne celuloze po fizičko-hemijskim svojstvima i strukturi. Rušenje strukture native celuloze i nastajanje celuloznog hidrata posledica je prodiranja disosovanih molekula natrijum-hidroksida najpre u amorfna područja, a sa porastom koncentracije i u kristalna područja [2]. Naime, alkalije se u rastvoru nalaze u odgovarajućem hidratisanom obliku čiji prečnik iznosi $0,5\text{-}2 \text{ nm}$, u zavisnosti od koncentracije alkalnog rastvora (slika 3.3). Ovi hidrati su sposobni da prođu unutar amorfni i kristalnih područja, pri čemu nivo penetracije zavisi od koncentracije upotrebljenog hidroksida. Solvatisani dipolni hidrati i hidratirani jonski parovi mogu da prođu samo u amorfne oblasti, dok su dipolni hidrati sposobni da penetriraju u kristalne regione zbog svojih manjih dimenzija [113]. Ispitivanja su pokazala da se pod dejstvom alkalija koncentracije do 10 % odigrava intermicelarno bubrenje, pri koncentracijama NaOH do oko 18 % dolazi do intramicelnog bubrenja, dok pri koncentracijama iznad 30 % dolazi do skupljanja vlakna [2].



Slika 3.3 Različiti oblici i odgovarajući hidrodinamički prečnici hidrata kao funkcija koncentracije jona [152]

Alkalizacija celuloze je od velikog značaja za komercijalnu proizvodnju celuloze kao metod za povećanje reaktivnosti (aktivacije) celuloze za naredne reakcije, kao i za mercerizaciju pamuka. Celulozu I je moguće konvertovati u razne kristalne alkalne forme, koje imaju različite kristalne strukture i promenljiv sadržaj NaOH i vode. Sve forme prelaze u kristalnu hidratcelulozu tokom ispiranja i u celulozu II putem sušenja [1].

Slika 3.4 pokazuje prisustvo pet različitih oblika alkaliceluloze: Na-celuloza I, II, III, IV ili Q i V. Formiranje ovih Na-celuloznih jedinjenja zavisi od temperature (od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $100\text{ }^{\circ}\text{C}$) i koncentracije NaOH (od 0 % do 45 %, masenih), ali su granice raznih regiona definisane više ili manje različito. Na primer, ispod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ i na koncentraciji NaOH od oko 8 % je lokacija alkaliceluloze koju autori nazivaju Na-celuloza Q, Q od Quellung (bubrenje na nemačkom). Njen patern difrakcije X-zraka je veoma karakterističan i otkriva stanje visoke nesređenosti i bubrenje u slojevima [153].



Slika 3.4 Fazni dijagram sistema celuloza/NaOH/voda; celuloza je iz vlakna ramije. Grafik otkriva zone različitih Na-celuloza u funkciji od koncentracije NaOH i temperature [153]

Od pet modifikacija alkaliceleuloze, praktični značaj ima alkaliceleuloza koja se dobija pri koncentraciji natrijum-hidroksida od 10-12 % i temperaturi od 0-30 °C. Ona ima sastav $C_6H_{10}O_5 \cdot NaOH \cdot 3H_2O$, a njena elementarna ćelija zauzima zapreminu od $27,9 \text{ nm}^3$, tj. za 68,5 % je veća od nativne celuloze [2].

Ispitivanjem sastava alkaliceleuloza korelacijom dve metode, analizom čvrste faze i određivanjem zapremine, dobijeni su rezultati prikazani u tabeli 3.1.

Tabela 3.1 Najverovatniji sastavi Na-celuloza i njihove molekulske mase i gustine [153]

Na-celuloza	Najverovatniji sastav	Molekulska masa, g/mol	Gustina, g/cm ³
Na-celuloza I	$C_6H_{10}O_5 \cdot NaOH \cdot 3 H_2O$	256	1,51
Na-celuloza III	$C_6H_{10}O_5 \cdot NaOH \cdot 2 H_2O$	238	1,51
Na-celuloza II	$C_6H_{10}O_5 \cdot NaOH \cdot H_2O$	220	1,60
Na-celuloza V	$C_6H_{10}O_5 \cdot NaOH \cdot 4,5-5 H_2O$	283-292	1,41-1,46
Na-celuloza IV	$C_6H_{10}O_5 \cdot H_2O$	180	1,48

Kako bi se bolje shvatile pomenute transformacije, ispitivane su promene koje se dešavaju u celulozi tokom obrade alkalijama [38, 147, 154, 155]. Prema rezultatima koje su dobili Okano i Sarko [156], pet jedinstvenih alkaliceleuloza se može generisati reproducibilno i mogu se podeliti u dva tipa na osnovu njihovih kristalografskih perioda identičnosti [157]. Na-celuloza I, III i IV su pokazale period identičnosti od 1,0 nm, dok je kod Na-celuloze IIA i IIB pronađen period identičnosti od 1,5 nm i konformacija lanca koja odgovara trostrukom heliksu (spirali trećeg reda), koja ne postoji u kristalnim celulozama. Sve alkaliceleuloze su imale umeren stepen kristalnosti i visok stepen fibrilne orijentacije. Kako Na-celuloza I ne može biti konvertovana u celulozu I, zaključeno je da Na-celuloza I poseduje antiparalelan prostorni aranžman, tj. istu polarnost lanaca za koju se veruje da postoji u celulozi II.

Na osnovu kristalografskih proučavanja Na-celuloze I [147], pripisana joj je jedinična ćelija sa četiri lanca, sa prostornom grupom $P2_1$ ($a = 0,883 \text{ nm}$, $b = 2,528 \text{ nm}$, $c = 1,029 \text{ nm}$ (period identičnosti); svi uglovi su 90°). Antiparalelna orijentacija lanaca je favorizovana u odnosu na paralelnu, dok su konformacije hidroksimetil grupa tg u "+ z" lancima, a gt u "- z" lancima.

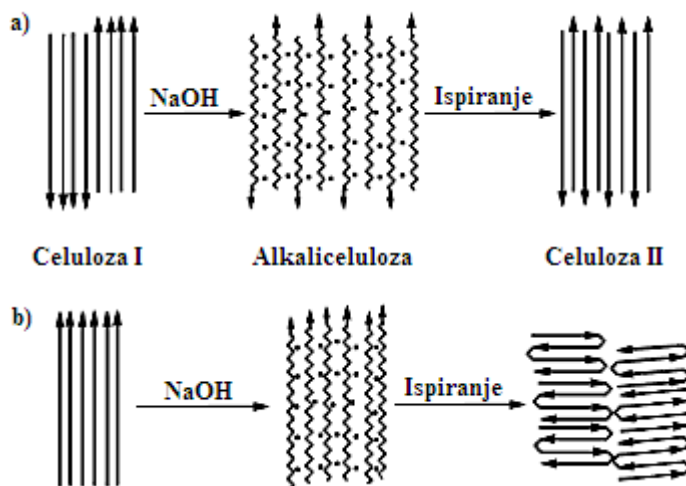
Strukturne promene Na-celuloze su ispitivane tokom stupnjevutih promena koncentracije natrijum-hidroksida. Na-celuloza I ili Na-celuloza II su dobijene u zavisnosti od početne koncentracije NaOH. Nakon formiranja, obe strukture su bile stabilne i nije dolazilo do konverzije jedne u drugu sa promenom koncentracije NaOH. Takva stabilnost ukazuje da se konverzija paralelno-u-antiparalelno verovatno ne odigrava u kristalnim područjima Na-celuloze. Mehanizam mercerizacije je predložen [158], pri čemu geometrija celuloznih molekula dozvoljava blisko slaganje hidrofobnih strana samo u antiparalelnom aranžmanu, na taj način dovodeći do formiranja antiparalelne strukture celuloze II.

Za objašnjenje promene polarnosti celuloznih kristala iz paralelne celuloze I u antiparalelnu celulozu II tokom mercerizovanja postoje dve glavne ideje [5]:

1. Fibrili celuloze I različite polarnosti leže blizu jedan do drugog (slika 3.5 a). Ovakva situacija je moguća na primer u različitim slojevima ćelijskog zida, gde se može pretpostaviti da su celulozni fibrili biosintetizovani u različitom "smeru". Tokom mercerizovanja, celuloza se obrađuje alkalijama kako bi se dobila alkaliceleuloza, oblik celuloze visokog stepena nabubrelosti. Dva fibrila različite polarnosti mogu zatim bubrenjem prodirati jedan u drugi. Nakon uklanjanja

alkalijske, materijal je manjeg stepena nabubrelosti, ali sa lancima koji su usvojili antiparalelnu orijentaciju.

2. Antiparalelni način pakovanja lanaca u celulozi II je rezultat savijanja lanaca (slika 3.5 b). Konformacione analize su pokazale da su savijanja u celuloznim lancima teoretski moguća.



Slika 3.5 Predložena konverzija paralelne celuloze I u antiparalelnu celulozu II (dve teorije):

a) Fibrili različite polarности bubre dajući Na-celulozu i difunduju jedan u drugi. Nakon ispiranja alkalijske nastaje antiparalelna celuloza II; b) Paralelni celulozni lanci bubre u NaOH formirajući Na-celulozu. Nakon ispiranja alkalijske nastaje cik-cak antiparalelna celulozna struktura [5]

Pored opisanih procesa i pojava, u rastvorima natrijum-hidroksida rastvara se i jedan deo celuloze. Njihova rastvorljivost zavisi od koncentracije NaOH; na primer, maksimum rastvorljivosti sulfitne i sulfatne celuloze dostiže se pri koncentraciji natrijum-hidroksida od 10-15 %. Osim toga, rastvorljivost celuloze u alkalijama jako zavisi od njihove temperature, pri čemu je ta zavisnost negativna pri koncentraciji NaOH od 14-16 % i pozitivna za koncentrovane rastvore ove alkalijske [2]. Podvrgavanje celuloze mehaničkim dejstvima može povećati njenu rastvorljivost u rastvorima NaOH, kao posledica smanjenja stepena polimerizovanja, a istovremeno i zbog raskidanja intermolekulskih vodoničnih veza [13].

Dejstvom alkalijske, ne menja se samo struktura polazne celuloze već se javljaju i promene u vlaknu. Još 1851. godine Mercer je utvrdio da obrada pamuka alkalijama uz naknadno ispiranje izaziva skupljanje vlakana i tkanina, povećanje njihove jačine, adsorpciju boja i povećanje fizičke kompaktnosti materijala, pri čemu se povećava sjaj vlakana i tkanina. Mercerizovanje se izvodi u zategnutom stanju, međutim ako se vrši bez zatezanja, skupljanje je znatno veće, sjaj manji i vlakna i pamučna pređa se mogu trajno deformisati.

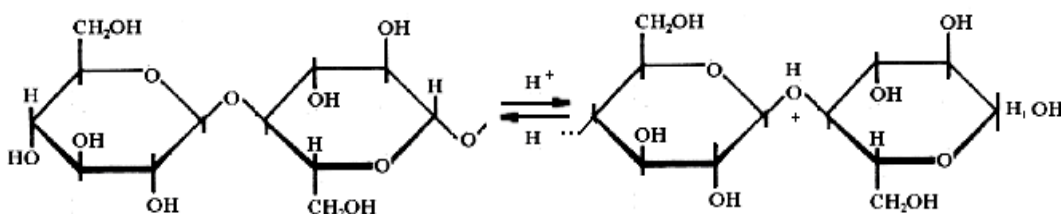
3.3. Dejstvo kiselina na celulozu

Vodeni rastvori kiselina i kiselih soli deluju hidrolizujuće na glikozidne veze u makromolekulu celuloze. Zapravo, kiseline u ovim reakcijama imaju ulogu katalizatora pošto bi samo pod dejstvom vode hidroliza tekla veoma sporo. Podešavanjem uslova reakcije mogu se dobiti različiti produkti. Energičnom hidrolizom (dugo kuvanje sa mineralnim kiselinama), celuloza daje glukozu, dok se pod blažim uslovima dobijaju i različiti oligosaharidi [159].

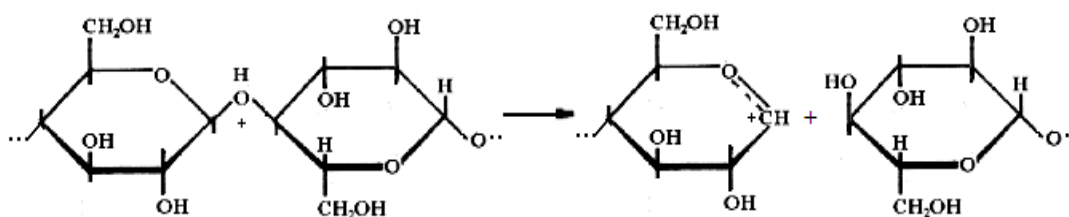
Dejstvo kiselina na celulozu zavisi od njihove prirode, koncentracije, temperature i vremena obrade. Prema intenzitetu hidrolitičke aktivnosti kiseline se mogu poredati u sledeći niz: borna < sirćetna < mravlja < oksalna < fosforna < sumporna < azotna < hlorovodonična kiselina. Brzina hidrolize raste sa povišenjem temperature, povećanjem koncentracije i vremena dejstva kiseline na celulozu. Kiseline sa celulozom obrazuju adiciona jedinjenja "kiselu celulozu" vezujući na taj način 0,5-1 mol kiselina po molu celuloze [2, 160].

U prvom stadijumu dejstva kiselina na celulozu dolazi do raskidanja međumolekulskih veza, a zatim do razgradnje makromolekula u amorfnim područjima uz obrazovanje oligosaharida. Krajnji produkt hidrolize je glukozu.

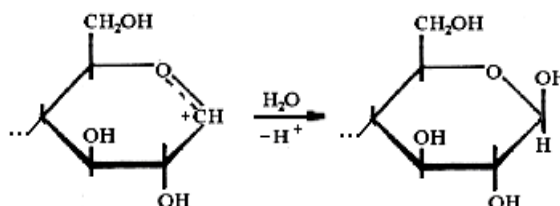
Hidrolitička destrukcija celuloze počinje protonovanjem kiseonika glikozidne veze uz obrazovanje oksonijum jona, što se može prikazati šemom [2]:



Nastali oksonijum jon disosuje, glikozidna veza se raskida i glukozil obrazuje katjon, po šemi:



U sledećem stadijumu glukozil katjon reaguje sa vodom, po šemi:



Svi stadijumi reakcije hidrolize ne odigravaju se istom brzinom. Reakcija između protona i celuloze odigrava se vrlo brzo, dok je brzina razgradnje nastalog glukozil katjona vrlo spora i određuje brzinu hidrolize [2, 14].

Različita područja celuloznih vlakana nisu izložena dejstvu kiselina u istom stepenu, jer se reakcija hidrolize odigrava u heterogenoj fazi. Po svom karakteru to je tipična topohemijska reakcija, u kojoj kiseline prvo deluju na površinske slojeve vlakana, zatim na unutrašnje i to prvenstveno u amorfnim područjima. Kao rezultat takve reakcije dobija se smeša složenog sastava koja se sastoji iz nepromenjene celuloze i produkata različitog stepena destrukcije – hidroceluloza [2].

Naziv hidroceluloza primenjuje se za celulozu koja je samo delimično hidrolizovana i koja nije izgubila svoju fibrilnu strukturu. Generalno se definiše kao bilo koji preparat celuloze, izuzev estara, čija su svojstva u većem ili manjem stepenu promenjena dejstvom kiselina, ali u kome celuloza još uvek zadržava svoju fibrilnu strukturu [113, 160]. U poređenju sa neoštećenom celulozom, hidroceluloza pokazuje:

- povišenu rastvorljivost u alkalijama,
- povišenu redukcionu sposobnost,
- manju prekidnu jačinu,
- sniženu viskoznost njenih bakar-amonijačnih rastvora,
- povećanu osetljivost prema toploti.

Kiseline mogu da izazovu veliki stepen oštećenja, zbog čega vlakna postaju krta i posle sušenja se lako pretvaraju u prah [2].

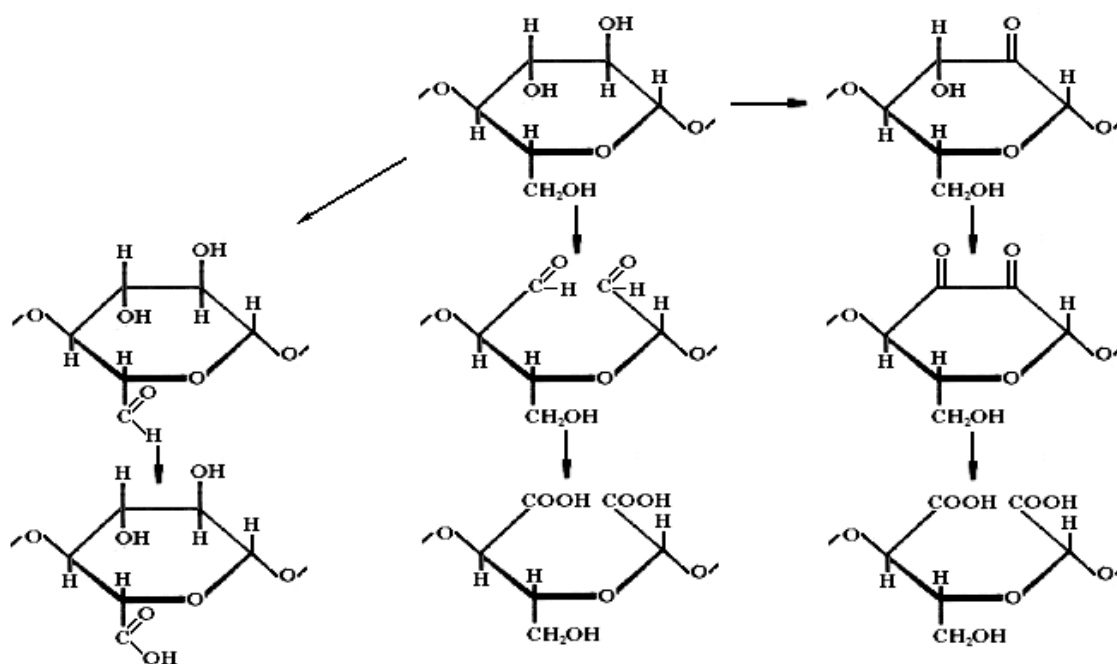
Organske kiseline imaju znatno slabije dejstvo na celulozna vlakna, ali ipak mogu da dovedu do znatnih promena u vlaknu. Uglavnom se koriste u procesima neutralisanja posle oplemenjivanja celuloze i u procesu bojenja.

U reakcijama hidrolize celuloze, kidanjem glikozidne veze formira se nova redukujuća grupa, pa se promena njenog sadržaja, određena preko bakrovog broja, može koristiti za određivanje stepena oštećenja, kao uostalom i promena viskoznosti i jačine vlakana. Bakrov broj je broj grama redukovanog bakra izdvojenog po tretmanu 100 g celuloze Fehling-ovim rastvorom. Vrednost količine redukovanog bakra je mera stepena degradacije celuloze u slučajevima kada dolazi do stvaranja aldehidnih grupa, koje imaju redukcionu moć. Stepenu oštećenja celuloze određen merenjem viskoznosti rastvora celuloze uglavnom se koristi kod većih oštećenja celuloze, tj. kada su makromolekuli celuloze značajno skraćeni, pa je i viskoznost tog rastvora niža [2].

3.4. Dejstvo oksidacionih sredstava na celulozu

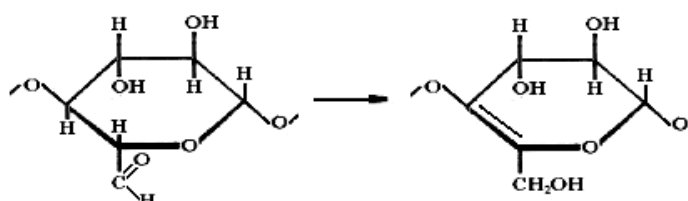
Hemijska modifikacija celuloze upotrebom oksidacionih agenasa je veoma česta procedura u hemiji celuloze. Afinitet celuloze prema oksidacionim sredstvima potiče od osetljivosti njenih alkoholnih grupa prema ovoj vrsti agenasa. U zavisnosti od vrste oksidacionog sredstva i uslova u kojima se proces oksidacije odvija, u reakciji učestvuju različite funkcionalne grupe celuloze, pri čemu mogu nastati jedinjenja koja sadrže aldehidne, keto ili karboksilne grupe (slika 3.6). Hidroksilne grupe mogu biti oksidisane do odgovarajuće karbonilne strukture, tj. aldehidne u položaju C-6 i keto u položaju C-2 i C-3, ili karboksilne u položaju C-6. Oksidacija može biti praćena i raskidanjem ugljenik-ugljenik veze između C-2 i C-3 i uvođenjem aldehidnih ili karboksilnih struktura u ovim položajima.

Proces oksidacije celuloze je, kao i proces hidrolize, tipična topohemijska reakcija. Mehanizam oksidacije celuloze se sastoji u napadu na njene funkcionalne grupe locirane na površini vlakna, što dovodi do progresivne penetracije u jezgro vlakna. Zbog veće pristupačnosti, oksidaciona sredstva najpre napadaju amorfne regione, a zatim kristalne.



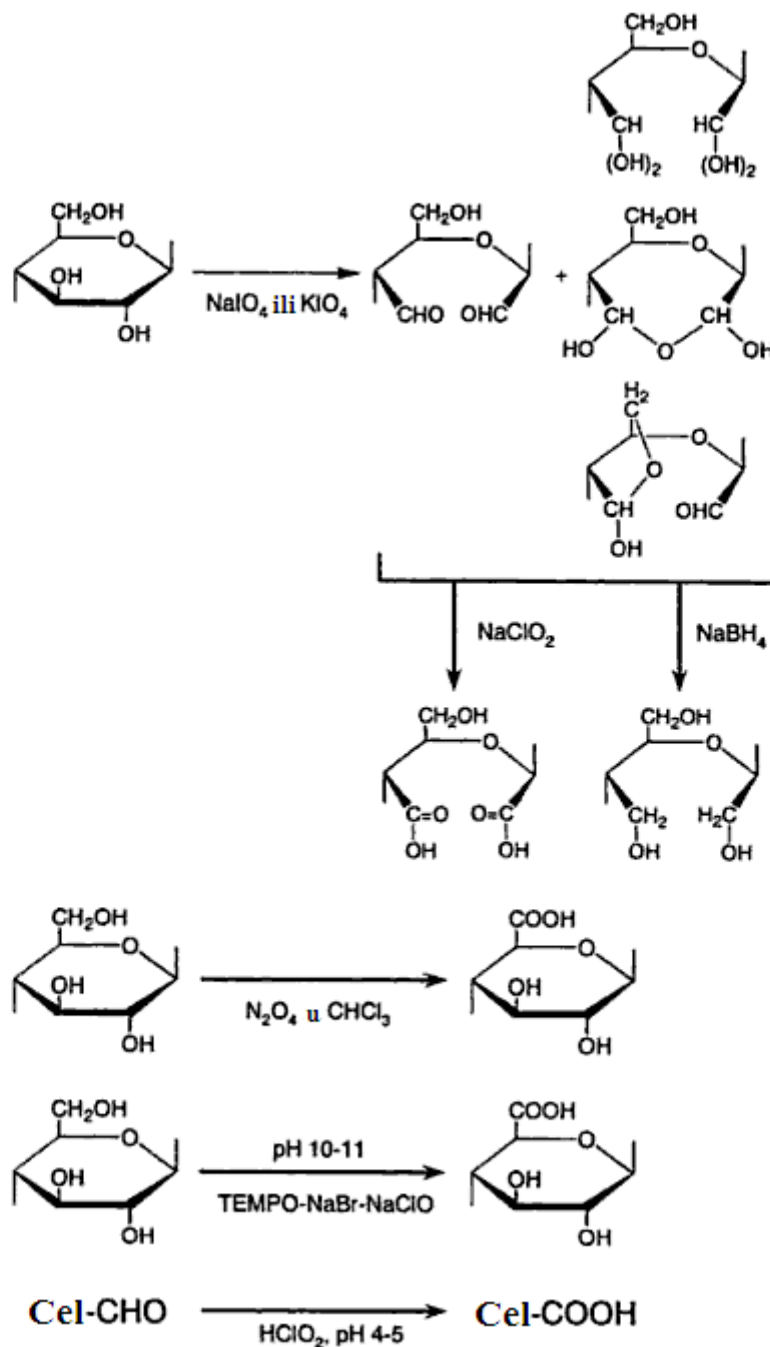
Slika 3.6 Šema procesa oksidacije celuloze [2]

Oksidacija je često praćena degradacijom celuloze (raskidanjem glikozidnih veza i depolimerizovanjem makromolekula), koja je zapravo izazvana naknadnim reakcijama, a ne samom oksidacijom. Cepanju glikozidne veze prethodi pregrupisanje vodonikovih atoma u piranoznom prstenu uz obrazovanje aldehidnih i keto grupa po šemi:



Obrazovana dvostruka veza između četvrtog i petog C-atoma u piranoznom prstenu, u susedstvu glikozidne veze, izaziva kidanje ove veze [2].

Neka oksidaciona sredstva deluju na celulozu selektivno, tako da oksiduju hidroksilne grupe na određenim ugljenikovim atomima uz obrazovanje produkata oksidacije koji sadrže samo jedan tip funkcionalnih grupa. Pregled selektivnih oksidacionih reakcija koje se koriste za hemijsko modifikovanje celuloze prikazan je na slici 3.7. Selektivno oksidisanje celuloze se dosta koristi u istraživačkoj praksi i za dobijanje nekih specijalnih preparata iz celuloze.



Slika 3.7 Selektivna oksidacija celuloze [161]

Oksidacija celuloze perjodatima (NaIO_4 ili KIO_4) je visoko selektivna reakcija koja dovodi do istovremene oksidacije obe sekundarne hidroksilne grupe do aldehidnih, uz otvaranje piranoznog prstena oksidisanog dela makromolekula celuloze. Aldehidne grupe novonastale dialdehid celuloze (DAC) se mogu oksidisati do karboksilnih naknadnom obradom bromom ili natrijum-hloritom, ili redukovati do hidroksilnih obradom borhidridom [2, 161]. Jedna od značajnih prednosti perjodata u odnosu na druga oksidaciona sredstva je u tome što minimizuju degradaciju i obezbeđuju očuvanje mehaničkih i morfoloških svojstava polaznog materijala [162]. Dialdehid celuloza predstavlja polaznu osnovu za dobijanje širokog spektra vlakana specijalne namene.

Isti efekti oksidacije se dobijaju dejstvom rastvora olovo-tetraacetata na celulozu. Alkalni perjodati i olovo-tetraacetat su komplementarni, s tim što se perjodat koristi u vodenom rastvoru, a olovo-tetraacetat u organskim rastvaračima [163].

Selektivna oksidacija celuloze može se obaviti upotrebom N_2O_4 u hloroformu, koji oksiduje hidroksilne grupe u položaju C-6 anhidroglukozne jedinice do karboksilnih. Međutim, ovo oksidaciono sredstvo inicira i brojne sporedne reakcije koje je teško kontrolisati i koje mogu imati značajan uticaj na svojstva produkta [161, 162].

Primarne hidroksilne grupe celuloze mogu biti konvertovane u odgovarajuće aldehidne i karboksilne grupe TEMPO-oksidacijom, tj. pomoću sistema 2,2',6,6'-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO)/ NaClO / NaBr . Oksidacija počinje dejstvom nitroksil radikala koji konvertuje hidroksilne grupe u aldehidne, dok dalju oksidaciju aldehidnih do karboksilnih grupa izaziva hipobromit generisan *in situ* iz hipohlorita i bromida. TEMPO-oksidacijom nativne celuloze [164, 165] uvode se relativno male količine karboksilnih grupa u celulozu. Kada se kao polazni materijal koristi regenerisana celuloza [166, 167], skoro sve primarne hidroksilne grupe su selektivno oksidisane do karboksilnih. Oksidacija je često praćena drastičnim promenama molekulske mase, a do delimičnog depolimerizovanja celuloznih lanaca dolazi zbog β -eliminacije u alkalnim uslovima. Reakcija se obično izvodi pri pH 10-11, s obzirom na to da je na nižim pH vrednostima povećana agresivnost i smanjena selektivnost hipohlorita i da dolazi do opadanja reaktivnosti TEMPO-radikala [161, 168]. Nedavno je razvijen novi način TEMPO-oksidacije sa katalitičkim količinama TEMPO-radikala i NaClO , i NaClO_2 kao primarnog oksidacionog agensa, koji se izvodi u slabo kiseloj ili neutralnoj sredini, pri pH 3,5-6,8. Pri ovim uslovima izvođenja oksidacije sprečava se depolimerizovanje celuloze usled reakcije β -eliminacije, koja se inače odvija u alkalnim uslovima. Oksidacija je primenjena za modifikovanje hemijske strukture regenerisane celuloze [169].

Selektivna oksidacija celuloze natrijum-hloritom je posebno interesantna zato što ovaj agens u celulozi oksiduje samo krajnje aldehidne grupe, a ne deluje na hidroksilne grupe i glikozidnu vezu [2, 170]. Variranjem uslova oksidacije (koncentracije oksidacionog sredstva, vremena reakcije i modula kupatila) mogu se dobiti celulozna vlakna sa različitim sadržajem karboksilnih grupa (0,08 do 0,645 mmol/g pamučnih vlakana i 0,11 do 1,37 mmol/g viskoznih vlakana) [136].

Dejstvom neselektivnih oksidacionih sredstava na celulozu dolazi do istovremene oksidacije i primarnih i sekundarnih hidroksilnih grupa, uz obrazovanje aldehidnih, keto i karboksilnih grupa na raznim atomima piranoznog prstena duž makromolekula. Uslovi izvođenja procesa, pre svega pH sredine, temperatura, vrsta oksidacionog sredstva i njegova koncentracija, određuju odnos karboksilnih i karbonilnih grupa u produktima oksidacije celuloze [2].

Najčešće korišćena neselektivna oksidaciona sredstva su KMnO_4 i H_2O_2 [168]. Neutralni rastvori permanganata deluju na celulozu sporo, tako da se mogu uspešno koristiti kao agensi za beljenje. Oksidacija je znatno drastičnija u prisustvu alkalija, pri čemu stepen oksidacije zavisi od uslova tretmana [171]. H_2O_2 se može koristiti u širokom opsegu

reakcionih uslova. U reakciji se raspada na kiseonik i vodu, dajući reakcione produkte koji nisu toksični ni štetni. Pri beljenju pamuka, vodonik-peroksid daje stabilna, bela i hidrofilna vlakna [106, 170].

Krajnji produkt dejstva oksidacionih sredstava na celulozu je oksiceluloza [160], heterogena kompleksna smeša makromolekula oksidisanih do različitog stepena, pri čemu su u najvećem stepenu oksidisana područja na površini vlakana. Razlika između hidroceluloze i oksiceluloze je u tome što poslednja sadrži karboksilne grupe. U poređenju sa polaznom celulozom, oksiceluloza ima manji stepen polimerizovanja, a samim tim i manju jačinu i manja je viskoznost njenih rastvora. Sa druge strane, oksiceluloza pokazuje povećanu redukcionu sposobnost i rastvorljivost u alkalnim rastvorima. Kao i hidroceluloza i oksiceluloza ima povećanu osetljivost prema toploti [2].

Dejstvom različitih oksidacionih agenasa mogu nastati dva tipa oksiceluloze. Oksidacijom u neutralnim ili kiselim rastvorima nastaje oksiceluloza redukujućeg tipa, dok u alkalnim uslovima prvenstveno nastaje oksiceluloza karboksilnog tipa, koje se mogu kvantitativno odrediti preko bakrovog broja, odnosno broja metilenskog plavog. Osim toga, sadržaj određenog tipa oksiceluloze može se odrediti i preko drugih reakcija na aldehidnu i karboksilnu grupu [2, 113, 160].

Generalno, postoje tri tipa oksiceluloze u zavisnosti od njene osetljivosti prema alkalijama [113]. To su:

- Oksiceluloza pristupačna alkalijama: Ovaj tip oksiceluloze sadrži glukozidnu strukturu sličnu polaznoj celulozi. Ali u ovom slučaju, oksiceluloza je rastvorljiva u alkalijama kao što je natrijum-hidroksid, zahvaljujući dužini njenih kratkih lanaca.
- Oksiceluloza rastvorljiva u alkalijama: Kod ovog tipa oksiceluloze, stepen polimerizovanja se može porediti sa polaznom celulozom, ali je sadržaj COOH grupa visok.
- Oksiceluloza osetljiva prema alkalijama: Ovaj tip oksiceluloze se rastvara u alkalijama kao što je natrijum-hidroksid, zbog fragmentacije izazvane alkalnom dekompozicijom glukoznih jedinica i izmenjene strukture usled oksidacije.

3.5. Oksidacija celuloze perjodatima

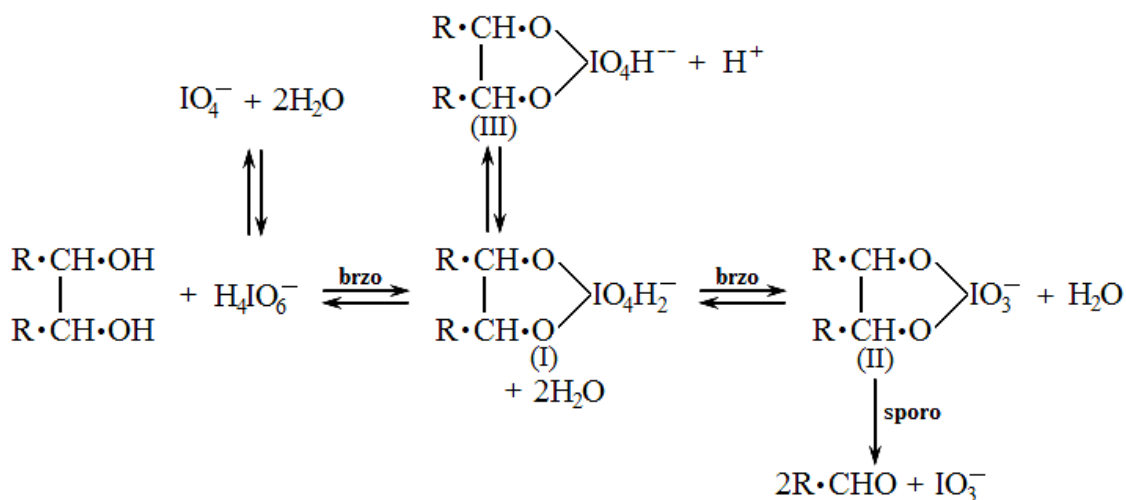
Oksidacija perjodatnim jonom je jedna od najšire korišćenih reakcija u hemiji ugljenih hidrata. Od njenog otkrića od strane Malaprade-a, perjodatna reakcija je bila primenjena na raznovrsne probleme na svim poljima organske hemije. Ova reakcija je naročito bila korišćena u proučavanju ugljenih hidrata zbog njihove polihidroksilne prirode. Umereni uslovi reakcije su posebno dobro prilagođeni osetljivoj strukturi ugljenih hidrata. Razvoj i široka primena reakcije su bile prouzrokovane brojnim faktorima, od kojih je najvažniji visok stepen selektivnosti koju perjodatna reakcija pokazuje kada se izvodi u odgovarajućim uslovima. Još jedna karakteristika koja doprinosi širokoj upotrebi perjodatne oksidacije je njena jednostavna primena [172, 173].

Prva dokumentovana upotreba perjodatnih jedinjenja bila je otkriće Malaprade-a [174, 175] 1928. godine da perjodna kiselina brzo raskida i oksiduje α -glikolne grupe manitola. Četiri godine kasnije Fleury i Lange [176] su objavili da je perjodatna reakcija selektivna za hidroksilne grupe vezane za susedne ugljenikove atome. Jackson i Hudson [177] su 1937. godine prvi put primenili Malaprade-ovu reakciju (oksidaciju α -glikolnih grupa perjodnom kiselinom) na celulozu. Inače, dugi niz godina se smatralo da se oksidativni napad na celulozu dešava na primarnim hidroksilnim grupama, ali je rad Jackson-a i Hudson-a pokazao da to nije slučaj sa oksidacijom perjodnom kiselinom.

Hidrolizom perjodatom oksidisane celuloze nastaje glioksal i D-eritroza koja je potvrđena kao D-eritronska kiselina [178]. Ovo otkriće je dokaz da je perjodatna oksidacija bila izazvana raskidanjem ugljenik-ugljenik veze koja sadrži vicinalne hidroksilne grupe na C2 i C3 anhidroglukopiranoznih jedinica. Ovaj dokaz je takođe doprineo potvrđivanju generalno prihvaćene strukture drugih polisaharida oksidisanih perjodatom.

Perjodatna oksidacija celuloze okarakterisana je specifičnim raskidanjem C2-C3 veze glukopiranoznog prstena i formiranjem dve aldehidne grupe po monomernoj jedinici. Reakcija se odvija preko intermedijarnog kompleksa, cikličnog diestra perjodne kiseline sa α -hidroksilnim grupama celuloze [179].

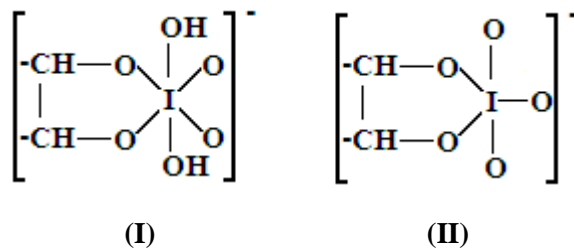
Pri oksidaciji glukoze (α -glikola) nastaju intermedijarne supstance koje su stabilnije u alkalnoj nego u kiseljoj sredini [180]. Stepenn formiranja kompleksa α -glikola i perjodata raste sa povećanjem pH vrednosti, ali se ireverzibilno razlažu jedino kompleksi koje obrazuju jednovalentni joni, koji su prisutni u visokoj koncentraciji u kiselim rastvorima [181]. Na slici 3.8 prikazan je mehanizam oksidacije celuloze perjodatima, koji generalno važi za α -glikole.



Slika 3.8 Mehanizam oksidacije celuloze perjodatima [179]

U umereno alkalnim rastvorima kompleks se uglavnom nalazi u obliku dvostruko naelektrisanog jona (III), koji ne može dehidratacijom da pređe u strukturu analognu (II) i ne raspada se na jodat i oksicelulozu. Navedeni produkti ne mogu nastati direktnim raspadanjem struktura (I) i (III). Oksidacioni produkti nastaju iz strukture (II) koja podleže intramolekulskom redoks procesu praćenom raskidanjem C-C veze. Brzina razlaganja intermedijarnog kompleksa na produkte je znatno manja od brzine njegovog nastajanja [179].

Veruje se da se ova reakcija odvija preko cikličnih intermedijara, npr. dodavanjem hidroksilnih grupa I-O vezama jona IO_4^- nastaje struktura (I), a njenom dehidratacijom struktura (II), od kojih je prva oktahedralna, a druga trigonalna bipiramida:



Zbog dužine I-O veze, O-I-O ugao u petočlanom prstenu ima veoma nisku vrednost, blizu 75° , što nesumnjivo utiče na reakciju. Ako je tako, dehidratacija, kao što pokazuje jedinjenje sa strukturom (II), ima fundamentalnu ulogu. U jako alkalnoj sredini, jedinjenje sa strukturom (I) gubi proton, tako da dehidratacija više nije moguća i reakcija se usporava [163].

U nekim slučajevima perjodatne oksidacije, sterni efekti mogu uticati na povećanje težnje dve hidroksilne grupe da se udalje i time na smanjenje mogućnosti stvaranja cikličnog kompleksa tipa (I) ili (II), tako da je brzina reakcije određena brzinom formiranja kompleksa. Iako sekundarne hidroksilne grupe u molekulu celuloze nisu u najpovoljnijem položaju za formiranje kompleksa, one su dovoljno blizu da mogu obrazovati kompleks sa perjodatnim jonima [179].

Oksidacija celuloze perjodatima se odvija bez značajnih sporednih reakcija [182] u kontrolisanim uslovima temperature, pH, svetlosti, koncentracije oksidacionog agensa, itd.

Oksidacija je mnogo sporija pri niskim pH vrednostima, kada dominira nedisosovana kiselina, i pri visokim pH vrednostima, kada je dvovalentni jon u visokoj koncentraciji, nego u pH opsegu 2,9-6,8, kada je perjodat uglavnom u obliku jednovalentnog jona [179]. U ovom opsegu pH vrednosti nema značajne promene u reaktivnosti celuloze sa perjodatima [179, 183].

Svetlost ubrzava perjodatnu oksidaciju celuloze. Njen uticaj na glavnu reakciju (Malaprade-ovu oksidaciju) nije poznat, ali se zna da se brzine sporednih reakcija (prekomerna oksidacija) znatno povećavaju. Sporedne reakcije se ne mogu kompletno eliminisati ni u odsustvu svetlosti, ali se mogu svesti na minimum ukoliko se koristi umereni višak perjodata, iznad količine potrebne za kompletnu Malaprade-ovu oksidaciju, i održava što je moguće nižim [184]. Između selektivne oksidacije perjodatima i opšte oksidacije (tzv. "over-oxidation") teško je napraviti jasnu razliku, s obzirom na to da bi odlučujući faktor mogao biti primenjeni precizni eksperimentalni uslovi [173].

Većina ispitivanja perjodatne oksidacije celuloze se izvode na temperaturi od 55°C ili nižoj. Na 55°C i višim temperaturama perjodat je nestabilan i razlaže se nakon izvesnog vremena uz oslobađanje joda, što otežava tačno određivanje količine utrošenog perjodata. Na sobnoj temperaturi ($< 35^\circ\text{C}$) reakcija oksidacije se odvija veoma sporo [183]. Oksidacija celuloze perjodatom se može efikasno izvesti i na višim temperaturama (i do 85°C) ukoliko je vreme oksidacije dovoljno kratko. Povećanje efikasnosti oksidacije može se postići

korišćenjem litijum-hlorida i drugih soli metala, kao što je kalcijum-hlorid. Ovakvi uslovi omogućavaju da se upotrebom manjih količina perjodata dobije visok sadržaj aldehidnih grupa u dialdehid celulozi [185].

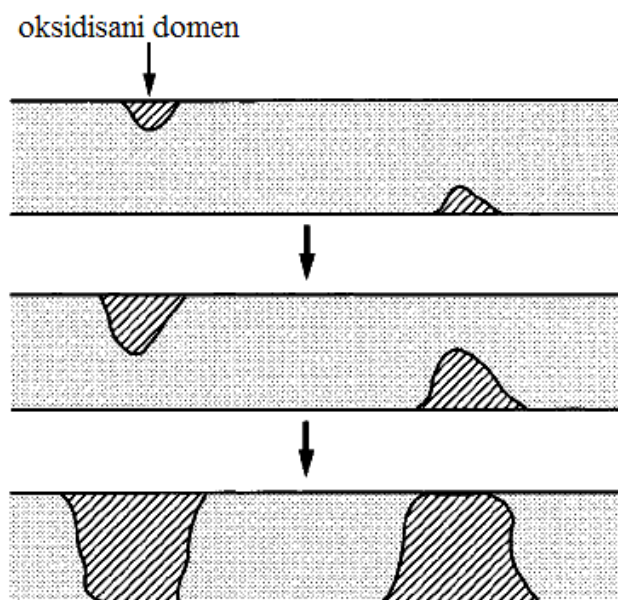
Povećanje koncentracije perjodata drastično povećava brzinu oksidacije [183], tako da se stepen oksidacije celuloze može kontrolisati količinom dodatog perjodata.

Neki literaturni podaci [186] jasno ukazuju da je brzina perjodatne oksidacije veoma osetljiva prema nadmolekularnoj strukturi celuloze.

Pored pomenute specifičnosti perjodata u reakciji oksidacije, perjodati se razlikuju od većine ostalih oksidacionih agenasa po svojstvu da penetriraju i reaguju sa kristalnim kao i sa amorfnim regionima celuloze i da pri tome ne izazivaju značajnu degradaciju u kontrolisanim uslovima [187]. Sa uobičajenim vrstama oksidacionih agenasa, reakcija je ograničena na amorfna područja i površine kristalita, a produkti su izloženi nespecifičnoj oksidaciji. S obzirom na to da celuloza nije rastvorljiva u vodi, uobičajena perjodatna oksidacija celuloze u vodenoj sredini je heterogena reakcija. Ispitivanja su pokazala da nema značajnih efekata homogenih u odnosu na heterogene reakcije [183].

Perjodatna oksidacija celuloze je kompleksan proces koji se odvija postepeno, od amorfne do kristalne faze [188], pri čemu su kristalne oblasti celuloze napadnute perjodatima već pri niskom stepenu oksidacije [182, 189, 190]. Pri oksidaciji perjodatima, kristalni regioni u celulozi ispoljavaju posebnu reaktivnost, tj. reakcija se odvija na krajnje heterogen način, uz obrazovanje izolovanih oksidisanih domena [182, 191]. Prema predloženom modelu (slika 3.9), oksidacijom hidroksilnih grupa glukopiranoznog prstena na površini, susedne grupe postaju osetljivije prema dejstvu oksidacionog sredstva, zbog lokalnog gubitka sredenosti kristalnih oblasti, tako da se oksidacija nastavlja u susedstvu postojećih oksidisanih centara.

Kristalnost oksidisane celuloze, određena na osnovu difrakcije X-zraka, smanjuje se u saglasnosti sa nivoom oksidacije. Smatra se da je gubitak kristalnosti rezultat otvaranja glukopiranoznih prstenova i narušavanja njihovog sredenog pakovanja [182].

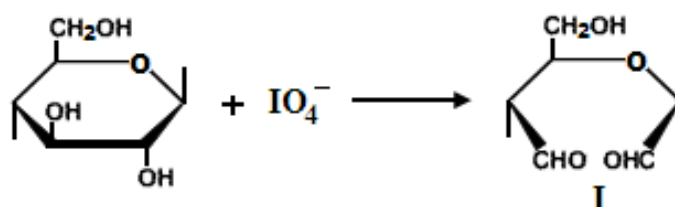


Slika 3.9 Model delovanja perjodata na kristalne oblasti celuloze [182]

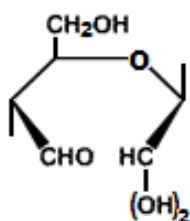
Poznato je da su (originalne) glikozidne veze dialdehid celuloze osetljive i u kiselim i u alkalnim uslovima. U izvesnom stepenu može doći do hidrolitičkog cepanja, verovatno izazvano kiselošću rastvora [192]. Oksiceluloze dobijene dejstvom perjodne kiseline ili

alkalnih perjodata pripadaju ekstremnom redukujućem tipu oksiceluloze i ispoljavaju veoma visok stepen osetljivosti prema alkalijama. Kada se obrade razblaženim rastvorima alkalija njihova jačina se veoma smanjuje; npr., pamučna pređa oksidisana perjodnom kiselinom, koja je zadržala 30 % od svoje početne prekidne jačine, potpuno se dezintegriše u kontaktu sa decinormalnim rastvorom NaOH na 20 °C [160].

Dialdehid celuloza može postojati u delimično ili potpuno hidratisanom obliku, kao hemiacetal ili kao hemialdal [182, 193] (slika 3.10). Izrazita karakteristika dialdehid celuloze je njena nerastvorljivost u vodi i u uobičajenim organskim rastvaračima, čak i nakon kompletne oksidacije. Ova nerastvorljivost se pripisuje obrazovanju hemiacetalnih veza između aldehidnih grupa i preostalih hidroksilnih grupa celuloze [194, 195]. Stabilne, kovalentne hemiacetalne veze mogu biti formirane unutar iste anhidroglukozne jedinice i između susednih anhidroglukoznih jedinica, ili intermolekulski između susednih lanaca [190, 195]. Rastvorljivost u vodi se postiže tek nakon redukcije aldehidnih grupa dialdehid celuloze do primarnih hidroksilnih [196] ili njihove oksidacije do karboksilnih grupa [197, 198]. Pored toga, potpuno oksidisana dialdehid celuloza se lako rastvara u vreloj vodi [194].

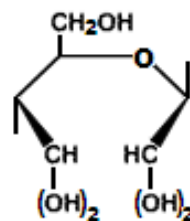


I postoji u sledećim oblicima:



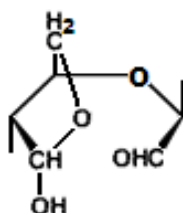
II

delimično hidratisani oblik



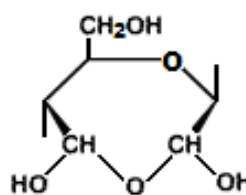
III

hidratirani oblik



IV

hemiacetal



V

hemialdal

Slika 3.10 Različiti oblici oksidisane glukopiranozne jedinice koji mogu postojati u dialdehid celulozi

Postoje dokazi da dialdehid celuloza hidrolizuje pri pH 7,4 dajući glikolnu kiselinu i 2,4-dihidroksibuternu kiselinu. To su prirodni metabolički produkti koji postoje u sistemima sisara i mogu biti bezbedno izlučeni iz tela [74, 199]. Perjodatom oksidisana celuloza raspada se na male molekule kada se implantira potkožno, pa se može koristiti kao biodegradabilni nosač lekova [200].

Dialdehid celuloza je preporučena kao pogodan biokompatibilni i biodegradabilni matriks za imobilizaciju i kontrolisano otpuštanje lekova i hormona. Za ovu podlogu uspešno su vezani insulin i antibiotici streptomycin i tetraciklin [201]. Sama dialdehid celuloza u nerastvornom obliku inhibira razvoj mikroorganizama i ova aktivnost pokazuje otpornost prema toploti i pranju [202].

Perjodatna oksidacija je izvođena na nekoliko tipova celuloze uključujući pamučni linters [74], mikrokristalnu celulozu [194], celulozu u prahu dobijenu iz pamuka i bukovog drveta [203] i kristalnu celulozu izolovanu iz alge *Cladophora sp.* [182]. Regenerisana biljna celuloza je takođe bila oksidisana upotrebom perjodatnog reagensa [192, 199].

Zahvaljujući visokoj reaktivnosti aldehidne grupe, dialdehid celuloza se može koristiti kao intermedijar u derivatizaciji celuloze. Dialdehid celuloza različitog stepena oksidacije može se koristiti za kovalentno vezivanje (imobilizaciju) enzima [204, 205] ili aminopolisaharida [206, 207], reakcijom sa njihovim amino grupama, kao jonoizmenjivački materijal nakon oksidacije do odgovarajućih karboksilnih kiselina [203, 208], ili kao takva (nepromenjena) za specifične primene [194, 209].

4. Imobilizacija enzima na tekstilnim materijalima

Dobijanje imobilisanih enzima i proizvodnja vlakana sa imobilisanim enzimima predstavljaju obećavajući pravac razvoja na polju biološki aktivnih vlakana. Kada su imobilisani na čvrstom nosaču, enzimi postaju značajno stabilniji i mogu se koristiti više puta i u dužim vremenskim periodima.

Proučavanje imobilisanih enzima za biomedicinske primene počelo je šezdesetih godina prošlog veka, sa ciljem da se reše neka ograničenja u vezi sa primenom enzima u kliničkoj praksi, da se učine stabilnijim, manje imunogenim i toksikogenim i da se produži njihovo vreme cirkulacije *in vivo*. Od tada je nekoliko pristupa korišćeno kada je u pitanju biomedicinska primena enzima, bilo za detekciju bioaktivnih supstanci u dijagnostici, ili sa ciljem tretiranja obolelih stanja [210].

Za dobijanje enzim-aktivnih vlakana mogu se koristiti sledeće metode [211]:

- dodavanje enzima rastvoru za ispređanje,
- uvođenje enzima u šuplja vlakna i
- fiksiranje enzima za vlakna hemijskim vezama.

Metod uvođenja enzima u strukturu vlakna njegovim dodavanjem u rastvor (ili čak u rastop) polimera je ograničene primene zbog niske termičke stabilnosti enzima u njihovom prirodnom obliku. Ovaj metod je uspešno korišćen samo u slučaju rastvora celuloznih acetata. Nedostaci druge metode su niska stabilnost krajnjeg produkta i to što je produkt aktivan samo sa niskomolekulskim supstratima.

Upotreba gotovih vlakana kao nosača imobilisanih enzima uključuje prednosti prve dve metode i omogućava proširenje opsega ne samo polimernih nosača, već i metoda vezivanja enzima (uključujući hemijske metode). Praktično svaki enzim sa adekvatnom aktivnošću i pristupačnošću za različite tipove supstrata može biti imobilisan na modifikovanim vlaknima. Ovaj metod daje maksimalne mogućnosti za variranje svojstava imobilisanih enzima [211]. Mogućnosti modifikovanja vlakana koje pruža ova metoda se uveliko koriste i budući rad na ovom polju bi bio od izuzetnog praktičnog značaja.

Veliki broj polimera se može razmatrati za imobilizaciju enzima, međutim ovaj broj značajno ograničavaju striktni biomedicinski kriterijumi, kao što su:

- biokompatibilnost,
- hidrofilitnost,
- netoksičnost,
- postojanost prema mikroorganizmima,
- niska cena i
- jednostavna proizvodnja.

Karakteristike koje nosač treba da ima kako bi se koristio za imobilizaciju enzima u potpunosti ispunjavaju vlakna dobijena iz polivinilalkohola, soli alginske kiseline, kolagen i celuloza. Vlakna na bazi alginske kiseline i kolagena, pored toga što odgovaraju specifikacijama materijala za imobilizaciju enzima, interesantna su i zbog svoje sposobnosti resorpcije u okviru kontrolisanog vremenskog intervala [211].

Osvojena je široka paleta vlaknastih materijala sa različitim aktivnostima: fenol-oksidirajućom, proteolitičkom, peroksidirajućom, trombolitičkom, hidrolitičkom i drugim vidovima aktivnosti.

4.1. Celulozni materijali sa imobilisanim enzimima

Celulozni materijali se široko koriste kao nosači za imobilisane enzime. Njihove prednosti su laka dostupnost, niska cena, hidrofilni karakter i značajan broj hidroksilnih grupa na površini, pogodne za hemijsku reakciju. Enzimi mogu biti imobilisani na celulozi i njenim derivatima različitim putevima, kao što su adsorpcija na celuloznim jonoizmenjivačima, npr. dietilaminoetil (DEAE)-celulozi [212], vezivanje putem obrazovanja helata na površini celuloze aktivirane solima prelaznih metala i kovalentno vezivanje [213]. Primeri kovalentnog vezivanja enzima uključuju vezivanje za celulozu aktiviranu cijanogen-bromidom [214], natrijum-perjodatom ili karbodiimidom [204], vezivanje pomoću glutaraldehida za aminoetilcelulozu [215], vezivanje upotrebom hlortriazina [216], vezivanje azidnim metodom za karboksimetilcelulozu [217].

Naslojavanjem pamuka polietileniminom dobijena su anjonizmenjivačka vlakna za koja se mogu vezati enzimi, kao što su glukozoksidaza [218], ureaza [219] i invertaza [220], jonskom adsorpcijom, uz naknadno fiksiranje enzima tretiranjem sa glutaraldehydom. Celulozna vlakna kalemljena poliakrilnom kiselinom takođe se mogu koristiti kao podloga za imobilizaciju enzima adsorpcijom; na ovaj način dobijena su vlakna sa imobilisanom lipazom [221].

Pamučni tekstilni materijali sa antimikrobnom aktivnošću dobijeni su imobilizacijom enzima α -amilaze, alkalne pektinaze i lakaze na pamuku putem umrežavanja, kao i obrazovanja Cu-helata [222]. Metodom umrežavanja ostvareno je i vezivanje antibakterijskog enzima lizozima za pamučne materijale [223].

Kovalentna imobilizacija obezbeđuje najjače veze, a time i najstabilnije komplekse enzim – nosač. Kovalentno vezivanje enzima se veoma često ostvaruje direktnom reakcijom sa reaktivnim funkcionalnim grupama na površini, ili posredstvom vezujućih reagenasa (medijatora) koji omogućavaju kalemljenje enzima na funkcionalnim grupama tekstilnih materijala.

Celulozna (pamučna) vlakna mogu biti aktivirana raznovrsnim reagensima sa ciljem kovalentnog vezivanja enzima. Tako, proteolitički enzimi pepsin i tripsin kovalentno su imobilisani na pamučnim vlaknima koja su prethodno aktivirana tosilhloridom. Imobilizaciona procedura je obuhvatila mercerizovanje pamuka natrijum-hidroksidom, predtretman sa piridinom, aktivaciju pamuka tosilhloridom i vezivanje enzima za pamučna vlakna. Hlorid *p*-toluensulfonil (tosilhlorid) jedan je od najjeftinijih reagenasa koji se može koristiti za aktiviranje hidroksilnih grupa u umerenim uslovima. Materijali aktivirani tosilhloridom su stabilni u slabo kiselj sredini i kovalentne veze obrazovane nakon uklanjanja toсила mogu biti veoma jake i stabilne [224].

Kovalentna imobilizacija glukoamilaze na celuloznim vlaknima ostvorena je reakcijom amino grupa enzima sa aldehidnim grupama celuloze, koje su uvedene oksidacijom vlakana perjodnom kiselinom (natrijum-perjodat i sumporna kiselina) [205].

Imobilizacija enzima može se ostvariti i korišćenjem različitih medijatora koji su kovalentno vezani za vlakna. Uvođenjem polietilenglikola reakcijom celuloze sa polietilenglikol diacilhloridom, dobijena su aktivirana celulozna vlakna koja su mogla da vežu enzim lipazu amidnom vezom obrazovanom između karboksilne grupe polietilenglikola i amino grupe enzima [221].

Pored pomenutih, razvijene su i druge metode za imobilizaciju enzima, kao što je sol-gel metoda kojom je ostvorena imobilizacija enzima papaina na pamučnom tekstilnom materijalu [225].

4.2. Ostali vlaknasti materijali sa imobilisanim enzimima

Kao podloga za imobilizaciju enzima može se koristiti vlakno svile na koje je fiksiran sericin, u ulozi spejsera, upotrebom glutaraldehida kao fiksacionog agensa. Ovako dobijena podloga korišćena je za imobilizaciju tripsina i α -himotripsina [226]. Postoje brojni primeri upotrebe fibroina svile, u raznim oblicima, kao podloge za imobilizaciju različitih enzima. Fibroinske membrane sa vezanim enzimima su uspešno korišćene u nekoliko bioreaktora za određivanje glukoze, vodonik-peroksida i mokraćne kiseline, pokazujući sposobnost brze analize različitih bioloških uzoraka, uključujući ljudsku krv ili samo serum [227].

Tekstilni materijali sa antibakterijskim svojstvima dobijeni su aktiviranjem vunениh vlakana glutaraldehydom i naknadnom kovalentnom imobilizacijom lizozima. Dobijeni materijal je ispoljio bakteriostatičko delovanje prema *Staphylococcus aureus* [228].

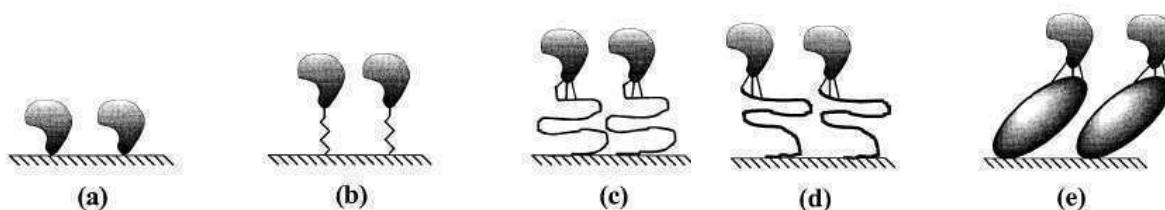
Testirane su različite metode za kovalentnu imobilizaciju enzima na poliamidnim vlaknima, u čijoj su osnovi bile dve posebne strategije: kontrolisana, delimična hidroliza polimera praćena vezivanjem enzima za oslobođene amino i karboksilne grupe i vezivanje reaktivnih grupa direktno za poliamid bez narušavanja polimerne strukture (*O*-alkilacija). U oba slučaja su korišćeni različiti spejseri za kovalentno vezivanje enzima termolizina. Imobilizacija enzima preko oslobođenih amino grupa izvođena je upotrebom glutaraldehida, a preko oslobođenih karboksilnih grupa, upotrebom dicikloheksilkarbodiimida. Od funkcionalnih grupa oslobođenih hidrolizom, amino grupe su se pokazale kao pogodnije za imobilizaciju, tj. dobijeni su viši nivoi aktivnosti imobilisanog enzima. Direktno vezivanje enzima za poliamid, bez delimične hidrolize, može se ostvariti elektrofilnom adicijom reaktivnih grupa na slobodne elektronske parove kiseonika ili azota u polimeru. Najbolji rezultati se mogu postići aktiviranjem amino grupa poliamida trietiloksonijum-tetrafluoroboratom, modifikovanjem aktiviranog polimera 1,6-heksandiaminom i vezivanjem termolizina preko glutaraldehida [229].

Aktivacione i imobilizacione tehnike, primenjene u slučaju poliamidnih vlakana, u principu je moguće primeniti i na poliestarska vlakna, ali je neophodno koristiti odgovarajuće spejsere, s obzirom na hidrofobnu površinu ovog polimera (koja izaziva inaktivaciju imobilisanog enzima). Delimičnom kiselom hidrolizom poliestarskih vlakana, sa ciljem stvaranja slobodnih karboksilnih i hidrosilnih grupa kao reaktivnih centara, i naknadnom obradom sa N-hidroksisukcinimidom i N,N'-dicikloheksilkarbodiimidom, dobijena je aktivirana površina koja može biti modifikovana različitim reakcijama. Na ovaj način dobijeni su poliestarski netkani materijali sa molekulima tripsina koji su vezani za površinu direktno, kao i preko različitih spejsera: polietilenglikol (PEG)-diamina, aldehid dekstrana, amino dekstrana i albumina iz seruma govečeta (BSA) (slika 4.1). Imobilizacijom tripsina preko spejsera postignuti su bolji rezultati aktivnosti i stabilnosti u odnosu na direktno vezivanje enzima, što se može pripisati minimizovanju sternih smetnji i uticaja okruženja uslovljenog površinskim svojstvima polimernog nosača [230].

Brojni su dokazi da direktna imobilizacija enzima na nekim aktiviranim nosačima može dovesti do niže efikasnosti imobilizacije. Razlozi mogu biti [231]:

- sterne smetnje,
- uticaj površine (hidrofobne površine često izazivaju inaktivaciju imobilisanog enzima),
- svojstva matrice,
- nepoželjne interakcije molekula enzima sa nosačem,
- neodgovarajuća orijentacija enzima na nosaču, kao što je učešće aktivnog centra u vezivanju,
- nekompatibilno mikrookruženje,

- preveliki broj veza između jednog molekula enzima i nosača,
- uticaj mobilnosti ili konformacione fleksibilnosti enzima.



Slika 4.1 Šematski prikaz različitih strategija imobilizacije tripsina na površini PES [230]:
a) direktno vezivanje na površini, b) imobilizacija preko relativno kratkih linearnih spejsera, npr. PEG-diamin, c) imobilizacija pomoću dugolančanih hidrofилnih spejsera, npr. aldehid dekstran ili d) amino dekstran, e) imobilizacija pomoću velikih, globularnih spejsera, npr. BSA. Izuzev PEG-diamina, ostali spejseri poseduju nekoliko vezujućih centara i omogućavaju uspostavljanje većeg broja veza sa jednim molekulom enzima

Uvođenje spejsera između enzima i nosača često poboljšava performanse imobilisanog enzima, npr. stabilnost enzima, sačuvanu aktivnost i specifičnu aktivnost. Prisustvo odgovarajućeg spejsera može oslabiti uticaj površine nosača i obezbediti fleksibilnost enzimu i promenu njegovog mikrokruženja.

Generalno, spejseri mogu biti okarakterisani sledećim svojstvima:

- dužina i veličina,
- struktura,
- oblik (linearan ili globularan),
- hidrofobnost/hidrofilnost,
- naelektrisanje.

Svojstva spejsera kao što su dužina, hidrofobnost/hidrofilnost i naelektrisanje mogu značajno uticati na sposobnost vezivanja, očuvanje aktivnosti, stabilnost i katalitičke performanse. U principu, mnoga jedinjenja, počev od malih molekula do makromolekula, mogu se koristiti kao spejseri [231]:

- razna bifunkcionalna jedinjenja, npr. glutaraldehid,
- linearni polimeri kao što je PEG-diamin, dekstran i polietilenimin,
- funkcionalni polisaharidi kao što je aldehid dekstran i amino dekstran,
- proteini kao što je albumin iz seruma govečeta (BSA),
- polietar.

Fotohemijski tretmani omogućavaju trajno modifikovanje površine nekoliko sintetičkih vlakana kao što su poliestarska, poliamidna ili poliolefinska pomoću UV svetlosti u prisustvu različitih reaktivnih sredina. Ovi procesi su bazirani na homolitičkom cepanju veze koje je inicirano apsorpcijom energije fotona i dovodi do stvaranja radikala na ozračenim polimernim površinama. Time su omogućene raznovrsne naknadne reakcije kao što su foto-oksidacija, kalemljenje i umrežavanje. Fotohemijska imobilizacija je iskorišćena za kovalentno vezivanje enzima katalaze za tekstilni materijal od polietilentereftalnih vlakana [232].

Modifikovano poliakrilonitrilno vlakno se može koristiti kao matrica za vezivanje nekih enzima, kao što su tripsin, himotripsin, papain i dr. Veza enzima sa PAN vlaknom modifikovanim poliepoksidiaminom najverovatnije se ostvaruje obrazovanjem kompleksa između enzima i nosača, praveći helate, kao i jonskom vezom između amino i karboksilnih grupa prisutnih u strukturi i enzima i nosača [233]. Reverzibilna imobilizacija enzima

invertaze na PAN vlaknima ostvarena je nakon njihovog modifikovanja, kalemljenjem polianilina [234].

Polivinilalkoholna vlakna koja sadrže enzime mogu se dobiti uvođenjem halogenskih ili aldehidnih grupa u njihovu strukturu, koje omogućavaju da se tripsin ili papain vežu za vlakno kovalentnim vezama. Za istu svrhu može se koristiti PVA vlakno acetalizovano maleinaldehidom i modifikovano naknadnim kalemljenjem maleinskom kiselinom [235].

Enzim glukoamilaza kovalentno je imobilisan na modifikovanim polipropilenskim vlaknima upotrebom karbodiimida kao vezujućeg agensa. Podloga za imobilizaciju je pripremljena kalemljenjem polipropilenskih vlakana akrilamidom i akrilnom kiselinom, koje je indukovano zračenjem [236].

4.3. Vlakna sa kompleksnom (kombinovanom) aktivnošću

U praksi se često javlja potreba za kombinovanom primenom različitih biološki aktivnih supstanci. Vlakna sa kombinovanom biološkom aktivnošću se mogu dobiti ili mešanjem različitih biološki aktivnih vlakana koja sadrže po jednu od supstanci (preparata) koje se kombinuju ili vezivanjem dve ili više supstanci na isto vlakno. Osnovni uslov za vezivanje različitih biološki aktivnih supstanci na isti vlaknasti materijal je da među njima nema antagonističkog dejstva.

Dobijanje vlakana sa kompleksnom biološkom aktivnošću može da se ostvari kako u stadijumu formiranja vlakana, tako i metodom hemijskog modifikovanja različitih vrsta vlakana, pri čemu se preparati vezuju istim ili različitim vrstama veza. Praktična realizacija ovih mogućnosti zavisi od hemijske strukture i vlakana i preparata.

Veoma interesantna za medicinsku praksu su vlakna sa kombinovanim (enzimskim) proteolitičkim i antimikrobnim dejstvom, koja bi mogla efikasno da reše problem skraćenja vremena lečenja rana. Materijali sa kombinovanom enzimsko-antimikrobnom aktivnošću dobijeni su na bazi celuloznih i poliestarskih vlakana i sadržali su imobilisanu proteazu C i visokomolekulski antimikrobni poliheksametilenguanidin hidrohlorid [237].

Razvijeni su materijali sa imobilisanim različitim enzimima koji ispoljavaju kompleksnu terapeutsku aktivnost. Dalcex-tripsin-lizozim je hirurška gaza sa imobilisanim proteolitičkim enzimom tripsinom i bakterioličkim enzimom lizozimom, koja ima ne samo nekrolitičku, već i bakterioličku aktivnost. Dalcex-kolitin je vrsta gaze na kojoj je imobilisan proteolitički polienzimski preparat kolitin, koji poseduje aktivnosti slične tripsinu, himotripsinu i elastazi [238].

4.4. Celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom

Literaturni podaci [239] ukazuju da postoji individualna zavisnost fizičko-hemijskih svojstava, aktivnosti i stabilnosti svakog pojedinačnog enzima od tipa polimernog matriksa i metode imobilizacije.

U praksi je ostvarena imobilizacija tripsina različitim metodama, kao što su adsorpcija [240], uključivanje u ograničeni prostor [241] i kovalentno vezivanje [242-244]. Za imobilizaciju tripsina korišćeni su različiti nosači, na primer silika gel naslojen hitozanom [245], poliestarski netkani materijal [230], hitozan i celuloza [246]. Izbor podloge za imobilizaciju enzima u velikoj meri zavisi od namene proizvoda.

Medicinski zahtevi značajno ograničavaju broj nosača koji se mogu koristiti za imobilizaciju enzima za terapijske svrhe. Takvi nosači treba da su netoksični, nekancerogeni, biokompatibilni i da ni na koji način ne ugrožavaju biološko okruženje. Uglavnom se za imobilizaciju proteolitičkih enzima (za terapijske svrhe) koriste polimerni nosači, najčešće na bazi celuloznih materijala (tabela 4.1).

Malo je informacija u literaturi o pripremi heterogenih biokatalizatora na bazi celuloznih vlaknastih materijala i tripsina, enzima koji (zajedno sa α -himotripsinom) ima ključnu poziciju u sistemu digestivnih enzima. Primeri su kovalentno imobilisani tripsin na pamučnim vlaknima koja su prethodno aktivirana tosilhloridom [224] i na perjodatom oksidisanom pamučnoj gazi [247] i tripsin imobilisan uključivanjem u polisaharidni film, upotrebom celuloze (gaze) kao podloge [241].

Tabela 4.1 Imobilisane proteaze kao lekoviti preparati za spoljnu upotrebu [248]

Aktivna komponenta	Nosač	Metod imobilizacije
Tripsin, himotripsin, protosubtilin, terilitin	Celulozni triacetat i sekundarni acetat, estar karboksimetilceluloze, polivinilalkohol	Uključivanje u strukturu vlakna tokom formiranja
Tripsin, protosubtilin	Aktivirana pamučna vata i gaza	Kovalentno vezivanje
Tripsin	Karboksimetilceluloza	Kovalentno vezivanje
Protosubtilin	Aminoetilceluloza	Adsorpcija
Papain	Vlakna na bazi polivinilalkohola, polikaproamida, celuloznog hidrata	Aktivacija praćena adsorpcijom

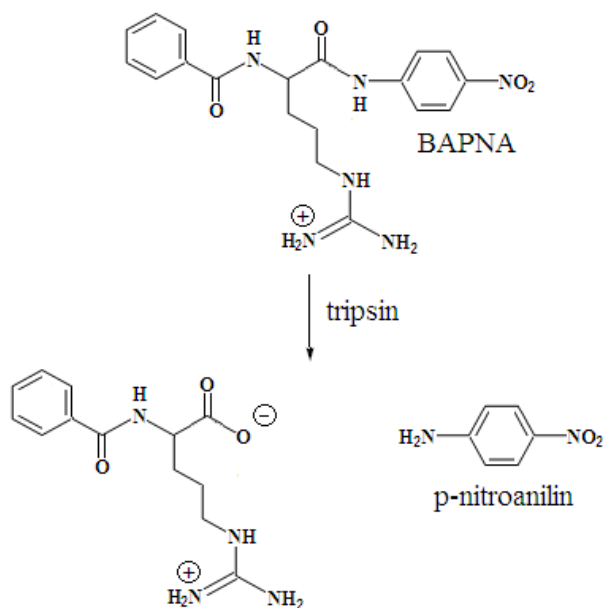
4.4.1. Struktura i svojstva tripsina

Tripsin nastaje u crevnom traktu od neaktivnog prekursora tripsinogena, koga stvaraju ćelije pankreasa. Proenzim se prevodi u aktivni oblik enteropeptidazom kao i autokatalitički, dejstvom samog tripsina. Aktivacija se sastoji u odvajanju heksapeptida sa N-terminalnog kraja tripsinogena čime je omogućena promena konformacije, tako da reaktivne grupe mogu izgraditi aktivni centar enzima. Tripsin sadrži u aktivnom centru histidinski i serinski ostatak zbog čega je svrstan u podgrupu serinskih proteaza. Mehanizam dejstva ovog enzima u potpunosti je razjašnjen [249, 250].

Postoje tri oblika tripsina koji ispoljavaju enzimsku aktivnost. Nativni oblik tripsina, označen kao β -tripsin, sastoji se od jednog polipeptidnog lanca. Autolizom β -tripsina (između lizina-131 i serina-132) nastaje α -tripsin čiji se delovi lanca drže zajedno disulfidnim vezama. Dodatnim cepanjem lanca između lizina-176 i asparaginske kiseline-177 nastaje ψ -tripsin. Ovaj oblik ispoljava značajno manju katalitičku aktivnost [251]. Polipeptidni lanac tripsina, izgrađen od 223 aminokiselinska ostatka, sklopčan je tako da obrazuje dva različita globularna domena. Svaki domen je izgrađen od antiparalelnih β segmenata koji formiraju β barel [251, 252]. Struktura molekula tripsina stabilizovana je sa ukupno šest disulfidnih veza [252]. Tripsin sadrži jedan jon Ca^{2+} po molekulu enzima koji ga štiti od autolize i denaturacije [253].

Kristalni tripsin ima relativnu molekulsku masu 24000. Deluje optimalno u slabo alkalnoj sredini, pri pH 7 do 9 [249], a njegova izoelektrična tačka iznosi 10,6 [240]. Tripsin ispoljava najveću stabilnost na pH 3, dok pri visokim pH vrednostima (iznad 11) dolazi do njegove reverzibilne denaturacije [250, 254].

Tripsin deluje na sve proteine raskidajući peptidne veze i to isključivo sa karboksilne strane ostataka lizina i arginina [255]. Takođe hidrolizuje estarske i amidne veze nekoliko sintetičkih supstrata. Jedan od takvih supstrata je N- α -benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilid (BAPNA), čiju amidnu vezu tripsin hidrolizuje oslobađajući *p*-nitroanilin, proizvod koji intenzivno apsorbuje u vidljivoj oblasti spektra. Enzimska hidroliza ovog supstrata odigrava se prema šemi prikazanoj na slici 4.2.



Slika 4.2 Hidroliza supstrata N- α -benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilid. Tripsin hidrolizuje BAPNA oslobađajući *p*-nitroanilin

Tripsin, kao i ostale proteaze, široko se koristi u industriji i biomedicini. Međutim, nestabilnost i brz gubitak biološke aktivnosti ograničavaju praktičnu primenu nativnih enzima. Osetljivost tripsina na autolizu [254] je glavni faktor odgovoran za inaktivaciju ovog enzima koja se dešava tokom njegove upotrebe i skladištenja.

Aktivni tripsin kovalentno vezan za nerastvorni inertni nosač, u poređenju sa enzimom u rastvoru, ne podleže autolizi jer su pojedinačni molekuli imobilisani na matriksu i ne dolazi do njihove agregacije. ϵ -Amino grupe ostataka lizina nisu esencijalne za katalitičku aktivnost tripsina i mogu se koristiti za obrazovanje veza sa nerastvornim nosačima. Rezultujući katalitički kapacitet zavisi od dva parametra, od relativnog sadržaja tripsina vezanog za nosač i od gubitka specifične aktivnosti koji je izazvan hemijskim modifikovanjem nativnog enzima ili relativnom orijentacijom molekula enzima u matriksu [250].

4.4.2. Uloga tripsina u lečenju

Fiziološka funkcija tripsina i ostalih proteolitičkih enzima u digestiji proteina je dobro poznata, zbog čega su dugo bili oralno administrirani u svrhu digestije u slučajevima deficijencije pankreasa. Proteolitički enzimi su se pokazali kao efikasni terapeutici u redukciji inflamacije i edema kada se pravilno doziraju. Veruje se da tripsin funkcioniše kao depolimeraza u inflamiranom centru, da preokreće fibrinogen-fibrin reakciju odgovornu za inflamaciju. Sa povećanjem poroznosti sloja nastalog umrežavanjem proteina, međučelijska tečnost se oslobađa, hidrostatički pritisak smanjuje, kapilari otvaraju i cirkulacija u lokalnoj oblasti se obnavlja. Dakle, anti-inflamatorno dejstvo tripsina je direktan rezultat olakšavanja drenaže iz inflamirane oblasti usled lize fibrinskih začepjenja u limfnim sudovima i kapilarima oko inflamirane lezije [256].

Dokumentovan je i terapijski efekat intramuskularno administriranog tripsina [257].

Mogućnost intravenskog, intramuskularnog i u mnogim slučajevima i lokalnog administriranja je niska zbog iritirajućeg efekta proteaza, njihovih imunogenih i alergijskih svojstava, hemolitičkog dejstva pri intravenskom administriranju, slabe biološke dostupnosti i drugih faktora koji se manifestuju zajedno ili odvojeno, ali relativno često. Klinička upotreba je ograničena zbog visoke cene, male dostupnosti, brze eliminacije iz tela i nemogućnosti postizanja visoke lokalne koncentracije preparata bez povećanja njegove sistemske koncentracije.

Proteolitički enzimi imaju široku primenu u hirurgiji, posebno za lečenje rana. Preparati nativnih proteaza obično su u formi gela, praha ili tečnosti. Međutim, upotreba nativnih enzima u lečenju rana ograničena je brojnim nedostacima: nativni enzimi se brzo inaktiviraju inhibitorima, nestabilni su u vodenim rastvorima, ispoljavaju antigena i pirogena svojstva, mogu dospeti u krvotok i izazvati alergijsku reakciju, mogu ih isprati izlučevine rane i, pored toga, imaju visoku cenu [258]. Upotrebom imobilisanih proteaza značajno se smanjuje utrošak enzima (zbog produženog dejstva), povećava efikasnost terapije i smanjuju alergijske reakcije. Analiza morfoloških promena u eksperimentalnim gnojnim ranama i vremena potrebnog za čišćenje rane i potpuno zarastanje, pokazala je da su imobilisani oblici enzima efikasniji od odgovarajućih nativnih preparata [238, 259].

U tabeli 4.2 prikazane su karakteristike nativnog i imobilisanog tripsina koji su korišćeni za lečenje rana.

Tabela 4.2 Uporedne karakteristike nativnog i imobilisanog tripsina u lečenju rana [260]

Nativni tripsin	Imobilisani tripsin
Brza inaktivacija inhibitorima krvi i tkiva	Stabilnost prema inhibitorima krvi i tkiva
Visoka osetljivost prema toploti, promeni pH, inhibitorima krvi i tkiva, jonizujućem zračenju	Stabilnost prema toploti, promeni pH, inhibitorima krvi i tkiva, jonizujućem zračenju
Brzo ispiranje sa rane	Ostaje na nosaču
Kratkotrajno dejstvo	Dugotrajno dejstvo, sa postepenim smanjenjem aktivnosti preparata
Česta promena zavoja (nekoliko puta dnevno)	Retka promena zavoja (jednom u 2-3 dana)
Visoka antigenost	Niska antigena aktivnost

4.5. Enzimi i metode za određivanje koncentracije proteina i aktivnosti enzima

Enzimi su proteinske strukture različite kompleksnosti, čiji su molekuli izgrađeni od aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Brojni su faktori po kojima se enzimi mogu međusobno razlikovati, kao što su aminokiselinski sastav, redosled njihovog međusobnog povezivanja, prisustvo ili odsustvo metalnih jona, kao i, mnogo bitnije, konformacija ili oblik strukture proteina. Kod enzima koji su rastvorljivi u vodi, aminokiselinski lanci su sklopčani na takav način da su hidrofobni ostaci orijentisani ka unutrašnjosti, a hidrofилni ka spoljašnjosti, omogućavajući maksimalno povezivanje vodoničnim vezama intramolekulski, kao i sa vodom i drugim molekulima. Inače, voda je esencijalna sredina za pravilno funkcionisanje većine enzima.

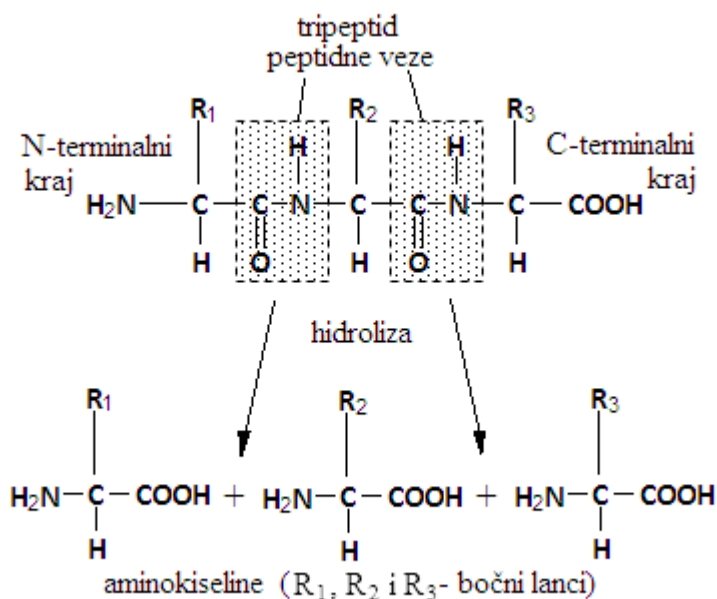
Enzimi su izuzetno efikasni katalizatori koji omogućavaju da reakcije, koje se pod normalnim uslovima ne bi odigravale, teku i to sa velikom brzinom. Njihova izuzetna efikasnost kao bioloških katalizatora ogleda se u činjenici da se enzimske reakcije odvijaju brzinom koja je 10^8 - 10^{20} puta veća od brzine nekatalizovanih reakcija [253]. Ovi katalizatori se ne troše tokom reakcije, ali obezbeđuju niskoenergetski put za njeno odvijanje i mogu katalizovati naknadne reakcije. Enzimi su često visoko specifični u pogledu vrste i broja supstrata; od velikog broja veoma sličnih supstanci, enzimi sa visokom specifičnošću reaguju samo sa jednom od njih. Pri tome, enzim sa datim supstratom katalizuje samo jednu reakciju, tako da nema sporednih proizvoda.

Proteolitički enzimi (proteaze) katalizuju raskidanje peptidne veze (slika 4.3). Neke proteaze (egzopeptidaze) deluju samo sa krajeva peptidnog lanca odvajajući pojedinačne krajnje aminokiseline. Druge (endopeptidaze) raskidaju peptidne veze unutar lanca i stvaraju peptidne fragmente. Ovoj grupi pripadaju poznati enzimi varenja, tripsin, himotripsin i pepsin. Suprotno mnogim drugim enzimima, proteaze nisu specifične za određene supstrate (tj. određene proteine) već za određene strukturne karakteristike peptidnog lanca. Prema tome, navedeni enzimi deluju na sve proteine, pri čemu denaturisane proteine hidrolizuju lakše od nativnih. Unutar peptidnog lanca dolazi do hidrolize samo na određenim mestima, tj. ispred ili iza određenih aminokiselina. Posebno je izražena specifičnost tripsina, koji raskida lanac samo na mestima gde se nalazi ostatak lizina ili arginina i to tako da peptidi nastali delovanjem tripsina imaju lizin ili arginin kao C-terminalnu aminokiselinu. Himotripsin raskida peptidni lanac pre svega iza hidrofobnih aminokiselina (aromatske aminokiseline, leucin), ali nije tako strogo specifičan kao tripsin. Specifičnost pepsina još je manje izražena; pretežno se raskidaju veze kod aromatskih ili kiselih aminokiselina, ali prisustvo ostalih aminokiselina u susedstvu takođe utiče [224, 249]. Ovakve razlike u specifičnosti delovanja uslovljene su prirodom aminokiselinskih ostataka u aktivnom centru proteaza koje se vezuju za svoje supstrate.

Imobilizacija enzima predstavlja proces uključivanja molekula enzima u određenu izolovanu fazu koja je odvojena od slobodnog rastvora, ali je sposobna da reaguje sa u njemu prisutnim molekulima liganada. U procesu imobilizacije enzim se prevodi u oblik koji je nerastvoran u vodi i od homogenog postaje heterogeni katalizator. Karakteristike imobilisanog enzima određene su pravilnim izborom tri osnovne komponente: enzima, nosača i metode vezivanja enzima za nosač. Enzimi mogu biti imobilisani na različitim nosačima metodama koje se zasnivaju na adsorpciji (hidrofobna, jonska), kovalentnom vezivanju ili uključivanju enzima u ograničeni prostor, mikrokapsule ili matrice polimera [231, 261].

Svojstva imobilisanih enzima razlikuju se od onih kod enzima u rastvoru, najviše zbog uticaja mikrookruženja uslovljenog matricom nosača i zbog uticaja samog procesa

imobilizacije, preko sternih efekata i promene konformacije i stabilnosti imobilisanog enzima. Intenzitet uticaja ovih faktora na svojstva enzima zavisi od upotrebljene metode.



Slika 4.3 Hidroliza peptidne veze

Imobilizacija enzima kovalentnim vezivanjem obično daje veoma stabilne preparate u poređenju sa drugim imobilizacionim procedurama. Kovalentna veza se ostvaruje reakcijom nosača koji je prethodno aktiviran nekom od brojnih raspoloživih metoda [231, 261, 262], sa aktivnom grupom enzima. Najčešće primenjivane reakcije uključuju aktivne grupe ostataka lizina (ϵ -amino grupa), cisteina (sulfhidrilna grupa) i asparaginske i glutaminske kiseline (karboksilna grupa).

Na performanse kovalentno imobilisanih enzima mogu uticati sledeća svojstva [231]:

- fizička priroda nosača, na primer veličina pora, poroznost, oblik i dr.,
- hemijska priroda nosača (hemijski sastav glavnog lanca, aktivne grupe),
- priroda hemije vezivanja,
- konformacija enzima u trenutku imobilizacije ili nakon imobilizacije,
- orijentacija enzima,
- priroda i dužina spejsera (ukoliko su korišćeni),
- svojstva medijuma korišćenog za vezivanje enzima,
- broj veza obrazovanih između enzima i nosača,
- raspodela enzima na nosaču ili unutar nosača.

Kovalentne metode su veoma efikasne u zadržavanju enzima i njima se mogu postići visoke vrednosti aktivnosti nakon imobilizacije, ukoliko u kovalentnom vezivanju za nosač ne učestvuju aminokiselinski ostaci esencijalni za katalitičku aktivnost. Kovalentno imobilisan enzim se ne gubi tokom upotrebe zbog čvrste veze sa nosačem, može lako da ostvari kontakt sa supstratom s obzirom da je lokalizovan na površini nosača i često pokazuje povećanu termičku stabilnost zbog jakih interakcija sa nosačem.

Enzimi postaju sve značajniji zbog svoje primene u medicini, analitici, sintezi organskih jedinjenja, sistemima za konverziju energije i mnogim granama industrije. Mnogi problemi koji se javljaju kod primene enzima u terapiji, kao što su labilnost u fiziološkim uslovima, razgradnja pod dejstvom proteaza, antigenost enzima kao stranih tela, kao i mala

dostupnost i visoka cena čistih preparata, mogu se u znatnoj meri rešiti primenom imobilisanih enzima.

Izbor tehnike i podloge za imobilizaciju enzima, koje su danas dostupne u velikom broju, zavisi od prirode enzima, prirode supstrata i krajnje primene. Prema tome, nije moguće predložiti neki univerzalan način imobilizacije. Matrice treba da obezbede jednostavnu i sigurnu imobilizaciju i treba da odgovaraju oblikom, veličinom, gustinom i drugim svojstvima namenjenoj upotrebi. Posebna pažnja mora se posvetiti izboru podloge i reagensa za imobilizaciju, koji bi trebalo da imaju GRAS status, ukoliko su namenjeni za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

4.5.1. Određivanje aktivnosti enzima

Aktivnost enzima, kao merilo količine prisutnog enzima, uglavnom se određuje merenjem brzine reakcije koju dati enzim katalizuje. Za tačnost ovih određivanja treba obezbediti linearnu zavisnost između količine enzima i brzine reakcije. Međutim, kako kod većine enzima dolazi do smanjenja brzine reakcije sa vremenom, kinetička određivanja se vrše na osnovu početne brzine reakcije, koja je konstantna sve dok količina izreagovalog supstrata ne pređe 20 % od svoje početne koncentracije.

Sve metode za određivanje aktivnosti enzima mogu se podeliti u tri grupe [251, 253]:

- Periodične metode – enzim se inkubira sa supstratom u toku određenog vremena, a zatim se reakcija zaustavlja i meri količina stvorenog proizvoda.
- Nепrekidne metode – omogućavaju kontinualno merenje i registraciju parametara reakcije bez njenog prekidanja.
- Konjugovane metode – supstanca, koju nije moguće neposredno registrovati, prevodi se u jedinjenje čiji se sadržaj može direktno meriti.

Da bi se odredila aktivnost enzima, neophodne su odgovarajuće metode za merenje količine obrazovanog proizvoda ili količine utrošenog supstrata. Za ovu svrhu na raspolaganju su brojne metode, kao što su: spektrofotometrijske, fluorimetrijske, gasometrijske, polarimetrijske, viskozimetrijske, hemijske, radiohemijske, hromatografske i dr. [253, 263].

Spektrofotometrijski postupci [264] se često koriste u praksi zbog svoje jednostavnosti, brzine i velike tačnosti. Mnogi supstrati i proizvodi enzimskih reakcija apsorbuju svetlost u vidljivoj ili UV oblasti spektra i retko se dešava da imaju identične apsorpcione spektre, tako da nije teško naći talasnu dužinu na kojoj dolazi do značajne promene apsorpcije u toku reakcije. Merenje veličine takve promene omogućava kvantitativno proučavanje toka enzimske reakcije. Kod nekih enzima se spektrofotometrijske metode mogu primeniti ako se umesto uobičajenih supstrata koriste tzv. hromogeni supstrati, koji daju proizvode koji apsorbuju na određenoj talasnoj dužini, ili ako se proizvodi enzimske reakcije prevedu u jedinjenja koja apsorbuju, pomoću posebnog reagensa, ili dodatog drugog enzima ili više dopunskih enzima. Sintetički supstrati se često koriste za određivanje aktivnosti proteolitičkih enzima [265]. Najjednostavniji supstrati su pojedinačne aminokiseline povezane preko svojih α -COOH grupa sa hromogenim aminima, kao što su 4-nitroanilin ili 2-naftilamin. Kako je intenzitet apsorpcije direktno proporcionalan koncentraciji ispitivane supstance, deljenjem registrovane veličine apsorpcije sa veličinom molarnog koeficijenta apsorpcije lako se nalazi molarna koncentracija rastvora. Ukoliko koeficijent apsorpcije nije dostupan, radi se kalibracioni dijagram ispitivane supstance.

Da bi se mogla porediti efikasnost i jačina pojedinih enzimskih preparata definisane su jedinice aktivnosti, od kojih se najviše koristi tzv. internacionalna jedinica. Pod jednom internacionalnom jedinicom podrazumeva se ona količina enzima koja pod strogo određenim

uslovima (temperatura, pH sredine i dr.) za vreme od jednog minuta katalizuje transformaciju jednog mikromola supstrata. Broj jedinica aktivnosti po jednom miligramu proteina predstavlja specifičnu aktivnost enzima u ispitivanom uzorku. Veća specifična aktivnost se dobija kada je enzim potpuno aktivan i bez stranih proteina [266].

4.5.2. Određivanje sadržaja proteina

Brz i tačan metod za određivanje koncentracije proteina je esencijalan u mnogim oblastima proučavanja proteina. Najprecizniji metod je verovatno kisela hidroliza proteina praćena analizom aminokiselina. Skoro sve ostale metode su osetljive na aminokiselinski sastav proteina i ne mogu se dobiti apsolutne koncentracije.

Za određivanje koncentracije proteina u rastvoru uglavnom se koriste četiri spektroskopske metode [267, 268]. One uključuju merenje apsorpcije proteina u UV oblasti spektra i tri metode koje generišu promenu boje usled vezivanja proteina: metod po Lowry-ju, BCA metod i Bradford-ov metod. Svaka od procedura ima određene prednosti i nedostatke (tabela 4.3) i ni za jednu se ne može reći da je potpuno zadovoljavajuća. Izbor metode zavisice od prirode proteina, prirode ostalih komponentata u uzorku proteina, željene brzine, osetljivosti i preciznosti ispitivanja.

4.5.2.1. Određivanje proteina UV apsorpcijom

Koncentracija proteina može se odrediti merenjem apsorpcije u bliskoj i dalekoj UV oblasti spektra [269]. Apсорpcija zračenja u bliskoj UV oblasti (280 nm) zavisi od sadržaja aromatičnih aminokiselina u proteinima, pre svega tirozina i triptofana, a u veoma malom stepenu i od količine fenilalanina i disulfidnih veza. Vrednosti A_{280} uglavnom se kreću u opsegu 0,5-1,5, ali mogu i znatno da variraju kod različitih proteina, na primer za rastvor koncentracije 1 mg/ml dobijene su vrednosti od 0 do 4 (za neke tirozinom bogate proteine vune). Viši nivoi strukture proteina takođe mogu da apsorbuju u UV oblasti, ili da menjaju molarne koeficijente apsorpcije tirozina i triptofana, tako da je UV detekcija veoma osetljiva na pH i jonsku jačinu na kojima se merenje izvodi. Pored toga, mnoge druge ćelijske komponente, posebno nukleinske kiseline, apsorbuju UV svetlost. Generalno, svaka neproteinska komponenta rastvora koja apsorbuje UV svetlost unosi grešku u ispitivanje. Iako različiti proteini imaju različite aminokiselinske sastave, a samim tim i različite molarne koeficijente apsorpcije, ovaj metod može biti veoma precizan kada se porede različiti rastvori istog proteina.

Ovaj metod ima najmanju osetljivost od ostalih metoda, ali se osetljivost može povećati ukoliko se apсорpcija meri u dalekoj UV oblasti (205 nm). U ovoj oblasti peptidne veze proteina intenzivno apsorbuju i varijacije u odgovoru između različitih proteina su male. Međutim, mnogi puferi i druge komponente, kao što su hem ili piridoksal grupe, takođe intenzivno apsorbuju u ovoj oblasti.

Prednosti ove metode određivanja koncentracije proteina su jednostavnost, brzina i činjenica da ispitivani uzorak ostaje nepromenjen. Najčešće se upotrebljava u hromatografiji ili kada brzina ima prioritet u odnosu na preciznost određivanja koncentracije proteina. Ovaj metod može biti dobra polazna tačka kada se radi sa nepoznatim uzorkom proteina i često se koristi za procenu koncentracije proteina pre upotrebe neke osetljivije metode. UV spektrofotometrija se preporučuje za kalibrisanje rastvora BSA ili drugih čistih proteina koji se koriste kao standardi u drugim metodama.

Tabela 4.3 Metode za određivanje koncentracije proteina [268]

Metod	Osnovne prednosti	Osnovni nedostaci
UV-spektrofotometrija	Brzina Jednostavnost Uzorak je sačuvan Korisna za procenu proteina pre upotrebe preciznije metode	Osetljivost na prisustvo pufera, bioloških materijala i soli Aminokiselinski sastav proteina je izuzetno važan, što otežava izbor standarda Apsorpcija jako zavisi od pH i jonske jačine rastvora
Metod Lowry-ja	Osetljivost u širokom opsegu Može se izvoditi na sobnoj temperaturi 10-20 puta veća osetljivost od UV spektrofotometrije	Mnoge supstance ometaju određivanje Potrebno je dosta vremena za ispitivanje Fotosenzitivnost Obojenost varira kod različitih proteina Radni reagens mora biti sveže pripremljen
BCA metod	Visoka osetljivost i brzina, ako se koriste povišene temperature Kompatibilnost sa mnogim deterdžentima Radni reagens je stabilan Male varijacije u odgovoru između različitih proteina Širok linearni radni opseg	Reakcija ne ide do kraja kada se izvodi na sobnoj temperaturi ili 37 °C Često je neophodno razblaživanje uzoraka koncentrovanih proteina
Bradford-ov metod	Visoka osetljivost Brzina i niska cena Visoka specifičnost za proteine Kompatibilnost sa mnogim supstancama Kompleks boja-protein stabilan je u toku 60 minuta	Nelinearan kalibracioni dijagram u širokom opsegu Odgovor na različite proteine može znatno da varira, izbor standarda je veoma važan

4.5.2.2. Metod po Lowry-ju

Metod po Lowry-ju se bazira na dve različite reakcije. U prvoj reakciji dvovalentni jon bakra formira kompleks sa peptidnim vezama proteina u alkalnim uslovima i redukuje se do jednovalentnog jona. Druga reakcija je redukcija Folin-Ciocalteau reagensa (još uvek nedovoljno razjašnjena) pomoću bakrom katalizovane oksidacije aromatičnih aminokiselina. Redukovani reagens je intenzivno plave boje, koja delimično zavisi od sadržaja tirozina i triptofana, i može se detektovati spektrofotometrom u opsegu od 500 do 750 nm. Metod daje najbolje rezultate sa rastvorima čija je koncentracija u opsegu od 0,01-1,0 mg/ml proteina [270].

Procedura Lowry-ja je relativno osetljiva, ali traži više vremena u odnosu na druge metode i ometaju je razna jedinjenja. Određivanje proteina ometaju sledeće supstance:

deterdženti, ugljeni hidrati, glicerol, EDTA, Tris, jedinjenja kalijuma, sulfhidrilna i disulfidna jedinjenja, magnezijum i kalcijum. Mnoge od ovih supstanci su česti sastojci pufera za pripremu proteina, zbog čega je ovo jedno od glavnih ograničenja metode.

4.5.2.3. BCA metod

Ova procedura je slična Lowry-jevoj u tome što se takođe zasniva na redukciji dvovalentnog u jednovalentni jon bakra u alkalnim uslovima. U sledećem koraku redukovani bakar reaguje sa BCA reagensom gradeći kompleks koji intenzivno apsorbuje na 562 nm. Kako je stvaranje Cu^+ jona u ovom ispitivanju funkcija koncentracije proteina i vremena inkubacije, sadržaj proteina nepoznatih uzoraka može se odrediti spektrofotometrijski poređenjem sa poznatim proteinskim standardima. Određivanje koncentracije proteina može se izvesti na dva načina, standardnim ispitivanjem (0,1-1,0 mg proteina/ml) i mikroispitivanjem (0,5-10 μg proteina/ml) [271].

Metod po Lowry-ju i BCA metod su slične osetljivosti, ali s obzirom na to da je BCA stabilna u alkalnim uslovima, ovo ispitivanje se može izvesti kao jednostepeni proces što mu daje prednost u odnosu na dvostepeno ispitivanje po Lowry-ju. Još jedna prednost BCA metode je generalno veća tolerantnost na prisustvo jedinjenja koja ometaju određivanje po Lowry-ju, posebno deterdženata i denaturišućih agenasa. Ispitivanja BCA metodom mogu da ometaju interakcije sa redukujućim agensima.

4.5.2.4. Bradford-ov metod

Ispitivanje sadržaja proteina po Bradford-u je veoma popularan metod u mnogim laboratorijama. U poređenju sa metodom Lowry-ja, ova tehnika je jednostavnija, brža, osetljivija i znatno manje ometana od strane najčešće korišćenih biohemijskih agenasa. Određivanje proteina se zasniva na vezivanju boje Coomassie Blue G250 za proteine, verovatno prvenstveno za ostatke arginina i lizina. Ova specifičnost može dovesti do varijacija u odgovoru metode na različite proteine i predstavlja njen glavni nedostatak. Boja može postojati u različitim jonskim oblicima koji maksimalno apsorbuju na 470 nm (crvena), 650 nm (zeleno) i 590 nm (plavo). Proteini se vezuju za plavi anjonski oblik molekula boje, pri čemu može doći do pomeranja apsorpcionog maksimuma sa 590 na 620 nm. S obzirom da je na uobičajenoj pH ispitivanja jedan deo molekula boje u zelenom katjonskom obliku, koji ometa merenje apsorpcije kompleksa boja-protein na 620 nm, sadržaj proteina određuje se merenjem apsorpcije rastvora na 595 nm. Merenje na ovoj talasnoj dužini predstavlja najbolji kompromis između favorizovanja apsorpcije od strane kompleksa i minimizovanja apsorpcije od strane zelenog oblika slobodnog molekula boje.

Za određivanje koncentracije proteina na raspolaganju su dva tipa ispitivanja: standardno ispitivanje, pogodno za merenje između 10 i 100 μg proteina, i mikroispitivanje, za detektovanje između 1 i 10 μg proteina [272].

EKSPERIMENTALNI DEO

5. Materijal i metode

5.1. Materijal

5.1.1. Pamučna pređa

Za dobijanje selektivno oksidisanih pamučnih vlakana, oksidacijom rastvorima natrijum-perjodata, korišćena je sirova nebeljena pamučna pređa ("Strumičanka", Strumica, Makedonija), finoće 20,85 tex, CV = 3,4 %, upredenosti 755 U/m, CV = 5,5 %, namenjena za proizvodnju gaze.

5.1.2. Viskozna pređa

Za modifikovanje natrijum-perjodatom i dobijanje biološki aktivnih vlakana, pored pamučne pređe, korišćena je i viskozna pređa u obliku filameta ("ITES RILON - LORISON", Odžaci, Srbija), finoće 10,60 tex.

5.1.3. Oksidaciono sredstvo - natrijum-perjodat

Oksidacija celuloze pamučnih i viskoznih vlakana, u cilju dobijanja dialdehid celuloze, vršena je natrijum-perjodatom (NaIO_4 , $M = 213,9 \text{ g/mol}$, FLUKA, Buchs, Switzerland). Rastvori natrijum-perjodata u 0,1 M acetatnom puferu, pH 4,0, pripremljeni su u koncentracijama od 0,2 % (2,0 mg/ml) i 0,4 % (4,0 mg/ml).

5.1.4. Biološki aktivno sredstvo - tripsin

Za davanje biološke aktivnosti oksidisanim celuloznim vlaknima korišćen je tripsin iz pankreasa govečeta (EC 3.4.21.4) u obliku praha bele boje (T9201, Trypsin from bovine pancreas, "Sigma Aldrich", St. Louis, SAD). Rastvor tripsina za imobilizaciju, koncentracije 0,8 mg/ml, priprema se neposredno pre upotrebe, rastvaranjem enzima u ohlađenom (4 °C) 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 9,2, koji sadrži 10 mM CaCl_2 .

5.1.5. Supstrat tripsina

Katalitička aktivnost nativnog i imobilisanog tripsina ispitivana je u reakciji sa supstratom *N*- α -benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilid hidrohlorid (B4875, BAPNA, $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4 \cdot \text{HCl}$, $\geq 98 \%$, $M = 434,88 \text{ g/mol}$, "Sigma Aldrich", St. Louis, SAD). Koncentrovani rastvor BAPNA (0,1 M) u dimetilsulfoksidu priprema se nedeljno i čuva na 4 °C u frižideru. Radni rastvor BAPNA, koncentracije 0,5 mM, priprema se neposredno pre upotrebe, razblaživanjem koncentrovanog rastvora BAPNA sa 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom, pH 7,0, koji se prethodno zagreje na 37 °C.

5.1.6. Pregled i karakteristike ostalih materijala koji se koriste za dobijanje biološki aktivnih celuloznih vlakana

Bradford-ov reagens, koji se koristi za određivanje sadržaja proteina, priprema se na sledeći način: 100 mg boje Coomassie brilliant blue G-250 (SERVA Blau G, C.I. 42655, research grade, $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2 \cdot Na_2$, $M = 877,0$ g/mol, "SERVA FEINBIOCHEMICA", Heidelberg, Germany) rastvori se u 50 ml 95 % etanola, promeša sa 100 ml orto-fosforne kiseline (min. 85 %) i dopuni destilovanom vodom do 1 l. Reagens se profiltrira kroz filter papir i čuva u tamnoj boci na sobnoj temperaturi.

Standardni rastvor BSA (albumina iz seruma govečeta) za određivanje sadržaja proteina u polaznom rastvoru enzima i supernatantu priprema se u koncentraciji od 1 mg/ml rastvaranjem BSA (Bovine albumin fraction-V, minimum assay 96,0 %, HIMEDIA RM 105, "HiMedia Laboratories Pvt. Limited", Mumbai, India) u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 9,2, koji sadrži 10 mM $CaCl_2$. Kao standardni rastvor BSA za određivanje sadržaja proteina u vodama od ispiranja koristi se 0,1 mg/ml rastvor BSA u fiziološkom rastvoru (0,91 % NaCl). Rastvori BSA čuvaju se u frižideru (4 °C).

U postupku dobijanja biološki aktivnih celuloznih vlakana, pored opisanog, korišćen je i sledeći materijal:

- Glacijalna sirćetna kiselina, CH_3COOH , $M = 60,05$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Natrijum-acetat-3-hidrat, $CH_3COONa \cdot 3 H_2O$, $M = 136,08$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Kalijum-jodid, KI, $M = 166,01$ g/mol, "JUGOLEK", Beograd
- Sumporna kiselina, p. a. H_2SO_4 , $M = 98,08$ g/mol, MRK Inženjering, Beograd
- Natrijum-tiosulfat, $Na_2S_2O_3$, $M = 158,09$ g/mol, Fisher Scientific UK limited
- Rastvorljivi skrob, p. a. $(C_6H_{10}O_5)_n$, "Alkaloid", Skopje
- Natrijum-hlorit, $NaClO_2$, $M = 90,45$ g/mol, "BETA HEM", Beograd
- Hlorovodonična kiselina, p. a. HCl, $M = 36,46$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Kalcijum-acetat, $C_4H_6O_4Ca \cdot x H_2O$, $M = 158,17$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Natrijum-hidroksid, NaOH, $M = 40,00$ g/mol, "Lachema", Češka
- Fenoltalein, $C_2H_{14}O_4$, $M = 318,33$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Jod, I_2 , $M = 253,80$ g/mol, "Alkaloid", Skopje
- Tris(hidroksimetil)aminometan, p. a. $C_4H_{11}NO_3$, $M = 121,14$ g/mol, "Alkaloid", Skopje
- Kalcijum-hlorid kristalni, p. a. $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, $M = 147,01$ g/mol, "Alkaloid", Skopje
- Natrijum-hlorid, p. a. NaCl, $M = 58,45$ g/mol, "Zorka Pharma", Šabac
- Natrijum-borhidrid, $NaBH_4$, $M = 37,83$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Dinatrijum-hidrogenfosfat bezvodni, p. a. Na_2HPO_4 , $M = 141,96$ g/mol, "Kemika", Zagreb
- Natrijum-fosfat monobazni, p. a. $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $M = 138,01$ g/mol, "Laphoma", Skopje
- Glutaraldehyd, 25 % vodeni rastvor, Art. 820603, $C_5H_8O_2$, $M = 100,12$ g/mol, MERCK, Darmstadt, Nemačka
- Dimetilsulfoksid, p. a. $(CH_3)_2SO$, $M = 78,13$ g/mol, "Centrohem", Stara Pazova
- Etanol, C_2H_5OH , 95 %, $M = 46,07$ g/mol, "Zorka Pharma", Šabac
- Orto-fosforna kiselina, p. a. H_3PO_4 , min. 85 %, $M = 98,00$ g/mol, "Kemika", Zagreb

5.2. Metode

5.2.1. Dovođenje uzoraka i epruveta u standardno stanje

Uzorci i epruvete dovode se u standardno stanje prema SRPS F.S0.100.

5.2.2. Oksidacija pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom

U cilju određivanja optimalnih uslova oksidacije pamučnih i viskoznih vlakana, ispitan je uticaj koncentracije oksidacionog sredstva i vremena modifikovanja na sadržaj aldehidnih grupa i ostala svojstva vlakana. Modifikovanje pamučne i viskozne pređe rastvorom natrijum-perjodata izvođeno je pri sledećim uslovima:

- Koncentracija NaIO_4 : 0,2 % i 0,4 %,
- pH rastvora 4,0,
- Vreme oksidacije: 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300 i 360 min,
- Temperatura sobna (21 °C),
- Modul kupatila 1:50.

Uzorci pređe mase 8,00 g modifikuju se rastvorom natrijum-perjodata u 0,1 M acetatnom puferu, u odsustvu svetlosti, uz neprekidno mešanje sadržaja. Po isteku zadatog vremena obrade, uzorci se obilno ispiraju ledeno hladnom destilovanom vodom radi uklanjanja zaostalog oksidacionog sredstva. Od svakog uzorka oksidisane pređe izdvaja se deo koji se, bez prethodnog sušenja, koristi za imobilizaciju tripsina, dok se preostali deo uzorka koristi za karakterizaciju modifikovanog uzorka pređe nakon njegovog sušenja na sobnoj temperaturi.

Kinetika reakcije oksidacije pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom praćena je preko utroška perjodata u toku reakcije. Polazne i krajnje koncentracije perjodata određuju se jodometrijskom titracijom na sledeći način: u 20 ml razblaženog rastvora perjodata (koncentracije 0,02 %, odnosno 0,04 %) dodaje se 10 ml 10 % kalijum-jodida, 10 ml 0,5 M H_2SO_4 i oslobođeni jod titriše sa 0,01 M rastvorom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ uz skrob kao indikator. Rade se tri probe i odredi srednja vrednost utroška natrijum-tiosulfata. Smanjenje sadržaja perjodata u rastvoru, izraženo preko broja molekula perjodata na 100 molekula glukoze, u daljem tekstu će biti nazivano utrošak perjodata [179].

5.2.3. Određivanje gubitka mase

Gubitak mase, koji nastaje kao posledica modifikovanja pređe natrijum-perjodatom, određuje se na osnovu razlike u masi apsolutno suvog uzorka pre i posle modifikovanja. Za izračunavanje gubitka mase (GM) koristi se formula:

$$\text{GM} = \frac{m_p - m_k}{m_p} \cdot 100, \%$$

gde je:

m_p – masa uzorka pre modifikovanja, g

m_k – masa uzorka posle modifikovanja, g

5.2.4. Određivanje sadržaja aldehidnih grupa

Uzorci nemodifikovane i oksidisanе pamučne i viskozne pređe okarakterisani su određivanjem sadržaja aldehidnih grupa, prema metodi opisanoj u literaturi [164, 273, 274]. Aldehidne grupe se najpre selektivno oksiduju do karboksilnih grupa pomoću natrijum-hlorita, pri pH 4-5, na sobnoj temperaturi u toku 48 h, a zatim se sadržaj karboksilnih grupa određuje modifikovanom kalcijum-acetatnom metodom [274].

Uzorci mase 0,5 g tretiraju se 0,01 M rastvorom HCl u toku 1 h, a zatim ispiraju destilovanom vodom. U sledećem koraku, uzorcima se dodaje 50 ml destilovane vode i 30 ml 0,25 M rastvora kalcijum-acetata. Nakon 2 h reakcije uz mešanje, odmeri se 30 ml rastvora (od ukupno 80 ml) koji se titriše sa 0,01 M NaOH uz fenolftalein kao indikator. Sadržaj karboksilnih (COOH) grupa određuje se prema formuli:

$$\text{COOH} = \frac{80}{30} \cdot 0,01M \cdot V(\text{NaOH}) \cdot m \cdot \left(1 - \frac{w}{100}\right), \text{ mmol/g}$$

gde je:

0,01 M – koncentracija NaOH

$V(\text{NaOH})$ – zapremina rastvora NaOH utrošena za titraciju, ml

m – masa tretiranog uzorka, g

w – sadržaj vlage, %.

Sadržaj aldehidnih grupa u oksidisanim uzorcima pamučne i viskozne pređe izračunava se tako što se od vrednosti sadržaja karboksilnih grupa, koja je određena za uzorke pređe oksidisanе natrijum-hloritom, oduzme vrednost sadržaja karboksilnih grupa dobijena za nemodifikovani uzorak pređe.

5.2.5. Određivanje finoće pređe

Određivanje finoće (izražene u tex-ima) nemodifikovane i oksidisanе pamučne i viskozne pređe vršeno je po metodi definisanoj standardom SRPS ISO 2060. Ovaj standard propisuje način određivanja linearne gustine (mase po jedinici dužine) pređe metodom povesma.

5.2.6. Određivanje prekidne jačine pređe

Određivanje prekidne jačine pamučne i viskozne pređe vršeno je na uređaju Tex Test (Švajcarska), sa klemama na rastojanju od 100 mm i brzinom donje kleme od 150 mm/min, prema uobičajenoj proceduri opisanoj u literaturi [275]. Prekidna jačina pređe izračunava se kao srednja vrednost 20 merenja.

5.2.7. Određivanje sorpcije vlage

Sadržaj vlage u polaznim i perjodatom modifikovanim uzorcima pamučne i viskozne pređe određivan je gravimetrijskom metodom definisanom standardom SRPS F.S3.101. Gravimetrijska metoda se sastoji u sušenju materijala u specijalnim uređajima – kondicionir

aparatura ili laboratorijskim sušnicama i merenju mase materijala pre sušenja, posle sušenja do konstantne mase i izračunavanju sadržaja vlage. Izračunavanje sadržaja vlage (w), određene po gravimetrijskoj metodi, vrši se prema sledećoj formuli:

$$w = \frac{m_p - m_k}{m_p} \cdot 100, \%$$

gde je:

m_p – masa uzorka pre sušenja, g

m_k – masa uzorka posle sušenja do konstantne mase, g

Dobijene vrednosti za svaki uzorak pamučne i viskozne pređe predstavljaju srednju vrednost tri merenja.

5.2.8. Određivanje sposobnosti zadržavanja vode

Sposobnost zadržavanja vode (SZV) nemodifikovane i oksidisanе pamučne i viskozne pređe određivana je standardnom metodom, koja se bazira na određivanju količine vode koju ispitivani uzorci mogu da apsorbuju i zadrže nakon potapanja u destilovanu vodu (1 h) i centrifugiranja (5 min). Masa uzorka meri se pre potapanja u vodu i posle centrifugiranja, a količina zadržane vode izračunava se prema formuli:

$$SZV = \frac{m_k \cdot 100}{m_p} - 100, \%$$

gde je:

m_k – masa uzorka posle potapanja u vodu i centrifugiranja, g

m_p – masa suvog uzorka, g

5.2.9. Određivanje vrednosti sorpcije joda i stepena kristalnosti

Za određivanje sorpcije joda korišćena je metoda Schwertassek-a [276-278]. Uzorak pređe mase 0,3 g tretira se sa 2 ml jednog rastvora, KI_3 , koji se priprema mešanjem 5 g I_2 , 40 g KI i 50 ml H_2O . Tretiranje se vrši 3 minuta, a zatim se dodaje 100 ml zasićenog rastvora natrijum-sulfata (200 g/l) i ostavi na tamnom mestu 1 sat, uz mešanje. Nakon isteka zadatog vremena, preostali jod u rastvoru (ukupne zapremine 102 ml) određuje se titracijom sa 0,02 M natrijum-tiosulfatom uz škrob kao indikator. Rade se tri probe i odredi srednja vrednost utroška natrijum-tiosulfata za svaki uzorak, kao i za slepu probu. Vrednost sorpcije joda, tj. jodni broj (I_{broj}), izražava se u mg apsorbovanog joda po g ispitivanog uzorka, a izračunava na sledeći način:

$$I_{broj} = \frac{(b-t) \cdot (M \cdot 102) \cdot (M \cdot 126,91)}{m_a} = \frac{(b-t) \cdot 2,04 \cdot 2,54}{m_a}, \text{ mg } I_2/\text{g celuloze}$$

gde je:

b – zapremina rastvora $Na_2S_2O_3$ utrošena za slepu probu, ml

t – zapremina rastvora $Na_2S_2O_3$ utrošena za titraciju rastvora uzorka, ml

M – molarnost $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

m_a – masa apsolutno suvog uzorka pređe, g

Prema Schwertassek-u, sorpcija joda se odigrava u amorfnim oblastima, tako da se vrednost jednog broja može iskoristiti za određivanje indeksa kristalnosti. Indeks kristalnosti (CrI) izračunava se prema sledećoj jednačini [276]:

$$\text{CrI} = 100 - \left(\frac{I_{\text{broj}}}{412} \cdot 100 \right), \%$$

5.2.10. Imobilizacija tripsina na oksidisanom pamučnoj i viskoznoj pređi

Uzorci modifikovane pamučne i viskozne pređe, sa različitim količinama uvedenih aldehidnih grupa, korišćeni su za kovalentnu imobilizaciju tripsina primenom dve procedure, direktne i indirektne preko BSA i glutaraldehida. Direktna i indirektna imobilizacija tripsina na oksidisanom pamučnoj i viskoznoj pređi, respektivno, vršena je iz rastvora enzima pri sledećim parametrima procesa:

- Koncentracija rastvora tripsina 0,8 mg/ml,
- pH rastvora 9,2,
- Vreme imobilizacije 18 h,
- Temperatura 4 °C,
- Modul kupatila 1:25.

Direktna imobilizacija tripsina na oksidisanom pamučnoj pređi

Uzorak oksidisanog pamučne pređe mase 0,1 g, bez prethodnog sušenja, inkubira se sa 2,5 ml rastvora tripsina (0,8 mg/ml) u 0,1 M Tris-HCl puferu pH 9,2 sa 10 mM CaCl_2 . U toku tretiranja uzorak stoji u frižideru, u zatvorenoj epruveti. Za svaki uzorak rade se dva testa imobilizacije. Nakon inkubacije, supernatant se odliva, a uzorak pređe ispira 9 puta sa po 5 ml ohlađenog fiziološkog rastvora kako bi se uklonio nekovalentno vezani tripsin. Broj ispiranja određuje se preliminarnim ispitivanjem, određivanjem aktivnosti u fiziološkom rastvoru nakon svakog ispiranja (tzv. voda od ispiranja), tako da se ispiranje prekida kada se utvrdi da u vodi od ispiranja više nema tripsina. Deo polaznog rastvora enzima za imobilizaciju, supernatant i vode od svih ispiranja čuvaju se za određivanje sadržaja proteina u uzorku. Dobijeni uzorci pamučne pređe sa imobilisanim tripsinom čuvaju se u fiziološkom rastvoru do upotrebe, u zatvorenim epruvetama.

Indirektna imobilizacija tripsina na oksidisanom viskoznoj pređi

Uzorak oksidisanog viskozne pređe mase 0,1 g, bez prethodnog sušenja, najpre se tretira sa 2,5 ml rastvora BSA (koncentracije 0,8 mg/ml) u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Nakon 18 h inkubacije na 4 °C, nekovalentno vezani protein uklanja se ispiranjem uzorka pređe fiziološkim rastvorom (9 puta), a zatim se uzorak još jednom ispira 0,1 M natrijum-fosfatnim puferom pH 7,0. Dobijena pređa sa vezanim proteinom BSA u sledećem koraku se inkubira sa 4 ml 2,5 % (v/v) rastvora glutaraldehida u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0. Nakon 2 h stajanja na 25 °C, višak ovog agensa ispira se destilovanom vodom, a zatim i 0,1 M Tris-HCl puferom sa 10 mM CaCl_2 (pH 9,2). Odmah nakon ispiranja, glutaraldehydom aktivirani uzorci pređe sa vezanim BSA inkubiraju se sa 2,5 ml rastvora tripsina (koncentracije 0,8 mg/ml) u 0,1 M Tris-HCl puferu pH 9,2, koji sadrži 10 mM CaCl_2 , preko noći na 4 °C. Nakon 18 h imobilizacije, uzorci se ispiraju i čuvaju na način kao što je opisano u slučaju direktne procedure.

5.2.11. Određivanje sadržaja proteina – Bradford-ov metod

Količina tripsina imobilisanog na pređi određuje se iz bilansa mase, kao razlika između količine proteina u rastvoru pre imobilizacije (polazni rastvor enzima) i sume proteina u istom rastvoru posle imobilizacije (supernatant) i u svim vodama od ispiranja. Za merenje količine proteina između 10 i 100 μg koristi se standardno ispitivanje, dok se za detektovanje manjih količina proteina, između 1 i 10 μg , koristi mikroispitivanje, koje je za potrebe ovog eksperimenta modifikovano u cilju dobijanja preciznijih rezultata.

Sadržaj proteina u polaznom rastvoru enzima i u supernatantu određuje se standardnim ispitivanjem na sledeći način: 50 μl ispitivanog rastvora dopuni se do 100 μl 0,1 M Tris-HCl puferom, pH 9,2, koji sadrži 10 mM CaCl_2 i dobro promeša sa 5 ml Bradford-ovog reagensa na vorteksu, a zatim se meri optička gustina rastvora na 595 nm (UV-VIS spektrofotometar SP6-550 Pye Unicam) u vremenu od 2 do 60 min posle mešanja rastvora. Za svaki uzorak rade se najmanje tri probe. Istovremeno se radi kalibracioni dijagram sa standardnim rastvorom BSA (1 mg/ml) u 0,1 M Tris-HCl puferu, pH 9,2, sa 10 mM CaCl_2 . Kalibracioni dijagram se radi sa 0, 10, 20, 40, 60, 80 i 100 μl standardnog rastvora, koji se istim puferom dopuni do 100 μl . Radi dobijanja što preciznijeg kalibracionog dijagrama, sa koga se očitava sadržaj proteina u uzorku ispitivanog rastvora, poželjno je raditi dve probe za svaku od navedenih tačaka kalibracionog dijagrama ili odrediti veći broj tačaka na osnovu kojih se konstruiše kalibraciona kriva, kao u slučaju prikazanom na slici 5.1.

Određivanje sadržaja proteina u vodama od ispiranja vrši se modifikovanim mikroispitivanjem na sledeći način: 0,25 ml vode od prvog ispiranja (dopunjeno do 0,5 ml fiziološkim rastvorom), odnosno 0,5 ml vode od ostalih ispiranja (ispiranja 2-9), promeša se sa 5 ml Bradford-ovog reagensa na vorteksu i meri optička gustina na 595 nm na prethodno opisani način. Za svaki uzorak rade se najmanje tri probe. Kao standardni rastvor koristi se rastvor BSA u fiziološkom rastvoru, koncentracije 0,1 mg/ml. Kalibracioni dijagram se radi sa 0, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 i 0,5 ml standardnog rastvora koji se dopuni do 0,5 ml fiziološkim rastvorom. I u ovom slučaju, radi postizanja veće preciznosti, rade se po dve probe sa navedenim količinama ili se kalibracioni dijagram radi sa većim brojem uzoraka koji sadrže između 0 i 0,5 ml standardnog rastvora BSA.

Za svaki set ispitivanja konstruiše se kalibraciona kriva (slika 5.1) na osnovu tačaka dobijenih za odgovarajući standardni rastvor BSA. Interpolacijom sa kalibracionog dijagrama za konkretne vrednosti optičke gustine uzorka na 595 nm očitava se sadržaj proteina u uzorku i izračunava količina proteina u ukupnoj zapremini ispitivanog rastvora. Na osnovu dobijenih rezultata pravi se bilans proteina i izračunava sadržaj proteina u mg/g pređe, prema sledećoj jednačini:

$$T_{\text{imob}} = \frac{T_{pr} - T_s - \sum_{i=1}^{i=9} T_i}{m}, \text{ mg/g pređe}$$

gde je:

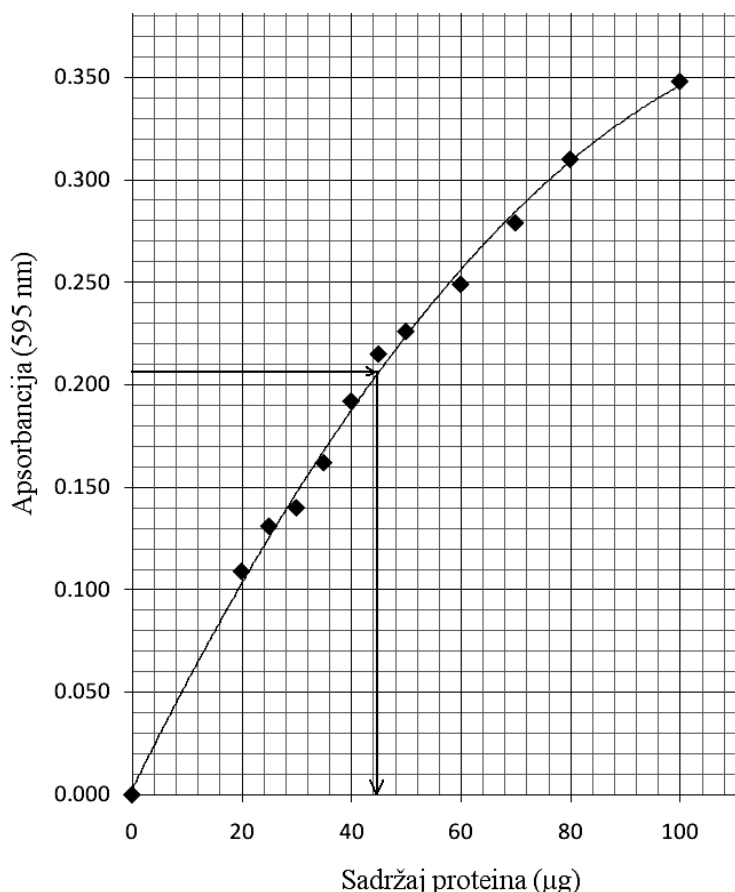
T_{imob} – količina tripsina imobilisanog na pređi, mg/g

T_{pr} – količina tripsina u polaznom rastvoru enzima, mg

T_s – količina tripsina u supernatantu, mg

T_i – količina tripsina u vodi od ispiranja, mg

m – masa apsolutno suvog uzorka pređe, g



Slika 5.1 Određivanje sadržaja proteina interpolacijom sa kalibracionog dijagrama

5.2.12. Određivanje aktivnosti tripsina

Aktivnost tripsina u rastvoru i u imobilisanom stanju određivana je na osnovu početne brzine hidrolize supstrata BAPNA. Enzimskom hidrolizom ovog supstrata, koji je bezbojan, oslobađa se žuto obojeni *p*-nitroanilin. Količina obrazovanog proizvoda srazmerna je povećanju intenziteta žute boje, koji se na spektrofotometru meri kao apsorbancija (optička gustina) na 410 nm.

Enzimске reakcije izvođene su u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0 i na temperaturi od 37 °C, što približno odgovara fiziološkim uslovima.

Aktivnost tripsina u rastvoru određuje se na sledeći način: u 3 ml 0,5 mM rastvora BAPNA, koji se pripremi neposredno pre izvođenja reakcija i temperira na 37 °C, dodaje se 50 μl rastvora tripsina (0,8 mg/ml) u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,0 i u istom trenutku uključi štoperica (radi merenja vremena reakcije) i reakciona smeša promućka na vorteksu (2-3 sekunde). Homogena reakciona smeša se odmah naspe u kivetu i meri optička gustina na 410 nm (UV-VIS spektrofotometar SP6-550 Pye Unicam) u jednakim vremenskim intervalima (10 sekundi) u toku 4 min. Za svaki uzorak rade se tri probe.

Pri određivanju aktivnosti tripsina imobilisanog na pamučnoj, odnosno viskoznoj pređi, reakciona smeša se sastoji od 3 ml 0,5 mM rastvora supstrata BAPNA i uzorka modifikovane pređe sa vezanim enzimom, mase približno 5 mg. Reakcija se izvodi u epruveti, uz neprekidno mućkanje sadržaja. U jednakim vremenskim intervalima od 1 min, deo rastvora dobro izmešane heterogene reakcione smeše preliva se u kivetu, meri optička gustina na 410 nm i sadržaj kivete brzo vraća u epruvetu sa preostalim rastvorom i uzorkom pređe. Nakon 7

min reakcije, vrši se ispiranje prede destilovanom vodom radi uklanjanja supstrata i proizvoda reakcije, sušenje na sobnoj temperaturi tokom 72 h i precizno merenje mase ispitivanog uzorka prede. Za svaki uzorak rade se tri probe.

Iz vrednosti apsorbancija za svaku probu crta se grafik zavisnosti apsorbancije od vremena reakcije i povlači tangenta na početni deo krive, kao što je prikazano na slici 5.2. Sa grafika se određuje nagib tangente kao promena apsorbancije u 1 min ($\Delta A/\Delta t$). Aktivnost tripsina se izražava u jedinicama aktivnosti po ml rastvora enzima (U/ml), kada se ispituje aktivnost slobodnog tripsina, odnosno u jedinicama aktivnosti po g prede (U/g), u slučaju određivanja aktivnosti tripsina imobilisanog na čvrstom supstratu. Jedinica aktivnosti tripsina (U) definisana je kao ona količina enzima koja kao rezultat hidrolize supstrata BAPNA stvara 1 μ mol *p*-nitroanilina u 1 min na 37 °C. Za izračunavanje aktivnosti tripsina koristi se formula:

$$\text{Aktivnost} = \frac{\Delta A / \Delta t \cdot V_{\text{smeše}}}{\varepsilon \cdot l \cdot E}, \text{ U/ml ili U/g prede}$$

gde je:

A – apsorbancija na 410 nm

t – vreme, min

V_{smeše} – zapremina reakcione smeše, ml

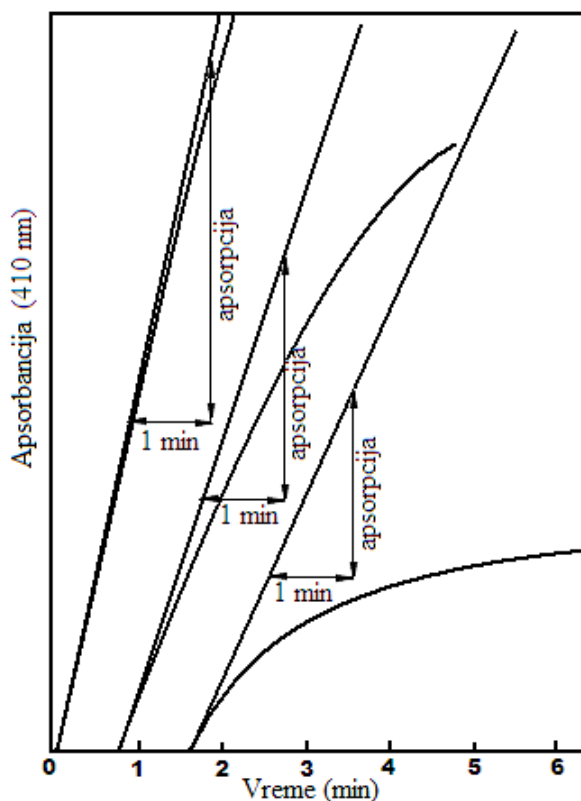
ε – molarni koeficijent apsorpcije; za *p*-nitroanilin $\varepsilon = 8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

l – rastojanje između zidova kivete, cm

E – količina ispitivanog uzorka: – zapremina rastvora enzima, ml

– masa prede sa imobilisanim enzimom, g

Aktivnost tripsina izračunava se kao srednja vrednost tri uzastopno određene vrednosti aktivnosti.



Slika 5.2 Određivanje početne brzine reakcije metodom tangente

5.2.13. Ispitivanje stabilnosti slobodnog i imobilisanog tripsina pri lagerovanju

Stabilnost tripsina u rastvoru i imobilisanog na oksidisanjoj celuloznoj pređi ispitivana je tokom 60 dana lagerovanja na 4 °C i 25 °C. Uzorci pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom, koji su čuvani u fiziološkom rastvoru u zatvorenim epruvetama i rastvori tripsina (0,8 mg/ml) pripremljeni u 0,1 M natrijum-fosfatnom puferu pH 7,0, ostavljeni su da stoje na temperaturi od 4 °C i 25 °C. Tokom 60 dana, njihove aktivnosti su periodično ispitivane, kao što je prethodno opisano (poglavlje 5.2.12.). Stabilnost slobodnog i imobilisanog tripsina pri skladištenju prikazana je kao relativna aktivnost, tj. u slučaju slobodnog enzima aktivnost lagerovanog rastvora tripsina data je u odnosu na aktivnost sveže pripremljenog rastvora enzima (početna aktivnost slobodnog tripsina), dok je u slučaju imobilisanog enzima aktivnost uskladištene pređe sa vezanim tripsinom data u odnosu na aktivnost istog uzorka koja je određena odmah nakon imobilizacije (početna aktivnost imobilisanog tripsina).

5.2.14. Ispitivanje otpuštanja tripsina sa nosača

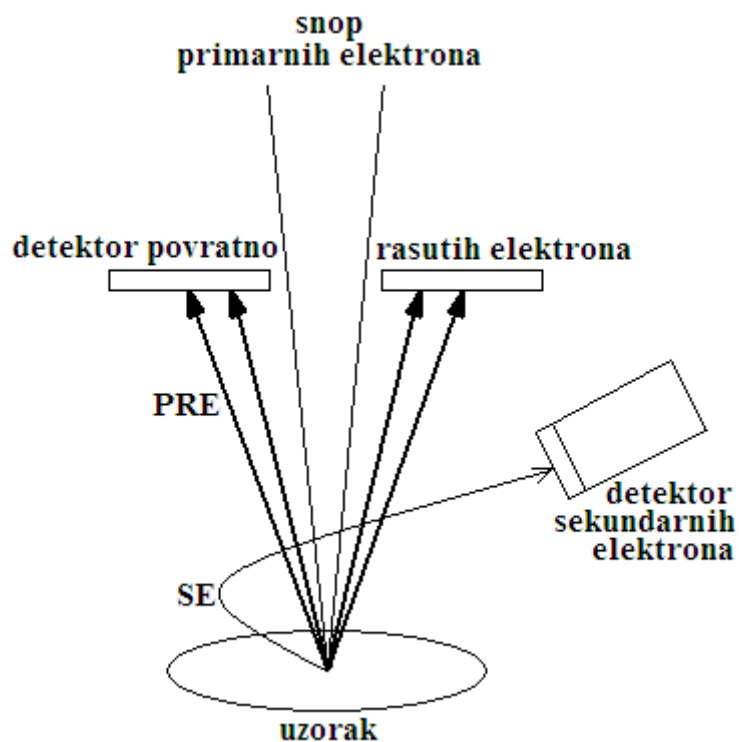
U cilju ispitivanja otpuštanja kovalentno vezanog tripsina sa pređe, po tri uzorka pamučne i viskozne pređe (mase 0,1 g) sa imobilisanim tripsinom ostavljena su da stoje 60 dana u fiziološkom rastvoru (5 ml) u zatvorenim epruvetama. Nakon 60 dana lagerovanja, ispitano je prisustvo proteina u rastvorima za čuvanje određivanjem sadržaja proteina na prethodno opisani način (poglavlje 5.2.11., modifikovano mikroispitivanje).

5.2.15. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfološke karakteristike polazne i modifikovane pamučne i viskozne pređe proučavane su skenirajućom elektronskom mikroskopijom pomoću skening elektronskog mikroskopa (SEM) marke JEOL JSM-5300 (Japan). Uzorci za snimanje pripremani su standardnom preparativnom tehnikom neparavanja zlatom, kojom se stvara provodna površina, na uređaju za katodno neparavanje, u toku 5 minuta.

Skenirajuća elektronska mikroskopija se bazira na jednostavnom principu "bombardovanja" površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona, što indukuje rasipanje elektrona koji se zatim detektuju. Princip rada SEM, kojim se dobija izgled površine uzorka, prikazan je na slici 5.3. Pri sudaru primarnih elektrona sa uzorkom dolazi do elastičnog i neelastičnog rasipanja elektrona. Povratno rasuti elektroni su zapravo primarni elektroni koji se vraćaju iz uzorka nakon sudara sa nukleusima u bombardovanom uzorku (elastično rasipanje). Sekundarni elektroni izlaze iz uzorka kada primarni elektroni prenesu energiju atomima u ispitivanom uzorku. To su elektroni sa niskom energijom koji se stvaraju na maloj dubini uzorka zbog njihove niske kinetičke energije (0-50 eV). Primarni elektroni, fokusirani na uzorak, stvaraju na svakom mestu dodira sekundarne elektrone, čiji intenzitet uglavnom zavisi od ispitivanog materijala, topografije površine i njihove orijentisanosti prema primarnom snopu elektrona. Intenzitet sekundarnih elektrona predaje se, pojačan, u video-sistem i gradi na vidnom zaklonu (ekranu) odgovarajuću sliku ispitivane površine kao vremenski analognu procesu dodira primarnog snopa. SEM slika (skening elektron-mikrograf) dobija se detektovanjem bilo povratno rasutih ili sekundarnih elektrona. Kontrast zavisi od orijentacije, tj. tačke na površini usmerene prema detektoru pojavljuju se kao svetlije u odnosu na one okrenute suprotno od detektora [2, 279].

Mikroskopi visoke rezolucije podešeni su na oko 5 nm rezolucije, ali je uobičajeno da se, kao i u ovom radu, SEM primenjuje u mikrometarskom režimu.



Slika 5.3 Princip rada SEM [279]. Snop primarnih elektrona je fokusiran na uzorak. Povratno rasuti elektroni (PRE) nastaju kao posledica direktnog sudara primarnih elektrona sa nukleusima uzorka (elastično rasipanje). Sekundarni elektroni (SE) nastaju kada primarni elektroni prenesu energiju atomima uzorka, koji izbacuju labavo vezane elektrone

6. Rezultati i diskusija

6.1. Karakteristike nemodifikovane pamučne i viskozne pređe

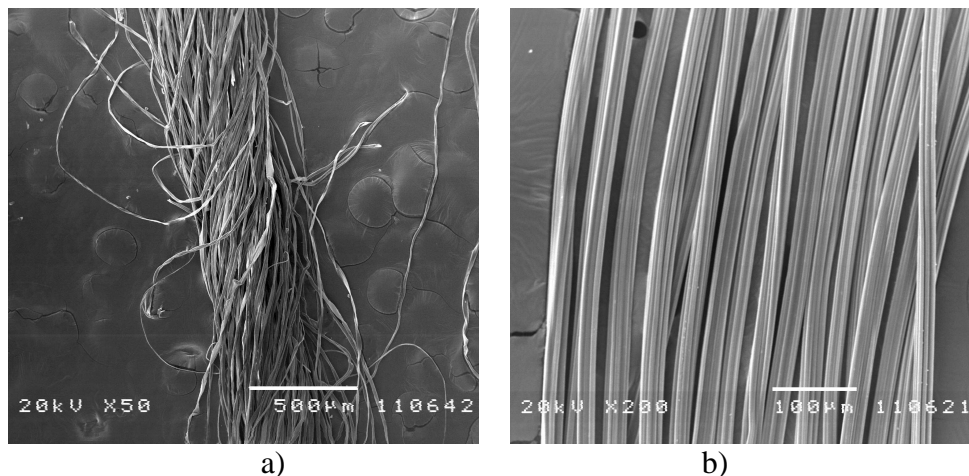
Karakteristike polazne, nemodifikovane pamučne i viskozne pređe, koje su korišćene u ovom radu, prikazane su u tabelama 6.1 i 6.2, respektivno. Na slici 6.1 prikazan je izgled polazne pamučne i viskozne pređe, dok se na slikama 6.2 i 6.3 mogu videti morfološke karakteristike pojedinačnih nemodifikovanih vlakana pamuka i viskoze.

Tabela 6.1 Karakteristike nemodifikovane pamučne pređe

Karakteristika polaznog uzorka pamučne pređe	Određena vrednost
Sadržaj vlage, %	6,16
Finoća, tex	20,85
Prekidna jačina, cN/tex	12,38
Izduženje, %	6,36
Upredenost, U/m	755
Sadržaj CHO-grupa, $\mu\text{mol/g}$	26,0
Zadržana voda, %	30,6
Količina vezanog tripsina, mg/g	zanemarljiva
Aktivnost imobilisanog tripsina, U/g	≈ 0

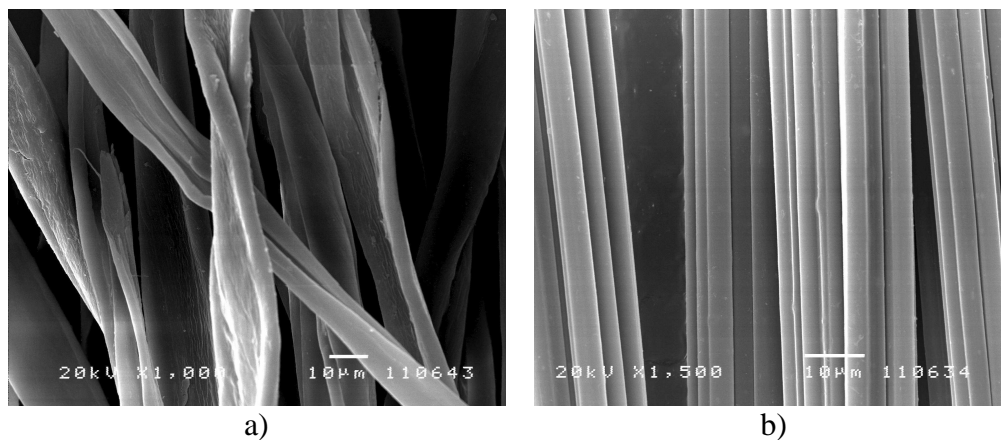
Tabela 6.2 Karakteristike nemodifikovane viskozne pređe

Karakteristika polaznog uzorka viskozne pređe	Određena vrednost
Sadržaj vlage, %	9,09
Finoća, tex	10,60
Prekidna jačina, cN/tex	17,60
Izduženje, %	13,5
Sadržaj CHO-grupa, $\mu\text{mol/g}$	18,4
Zadržana voda, %	58,1
Količina vezanog tripsina, mg/g	zanemarljiva
Aktivnost imobilisanog tripsina, U/g	nije prisutna

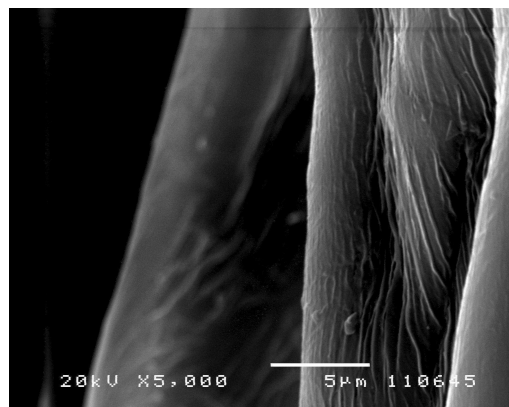


Slika 6.1 Nemodifikovana a) pamučna i b) viskozna pređa

Nemodifikovano pamučno vlakno, slika 6.2 a, karakteriše se izraženom izuvijanošću i mikrorapavošću (detalj površine pamučnog vlakna uvećan 5000x, slika 6.3). Na površini pamuka vide se sistemi približno paralelnih brazda i žljebova spiralno raspoređenih oko ose vlakna. Fibrilarna struktura površine i prisustvo brazdi i žljebova karakteristično je i za viskozna vlakna koji su, za razliku kod pamučnih vlakana, paralelno raspoređeni sa osom vlakna (slika 6.2 b). Viskozna vlakna se karakterišu jednorodnom površinom i izraženom periodičnošću mikroporozne strukture.



Slika 6.2 Izgled površine nemodifikovanih vlakana a) pamuka i b) viskoze



Slika 6.3 Detalj površine nemodifikovanog pamučnog vlakna

6.2. Karakteristike oksidisane pamučne i viskozne pređe

6.2.1. Gubitak mase oksidisane pamučne i viskozne pređe

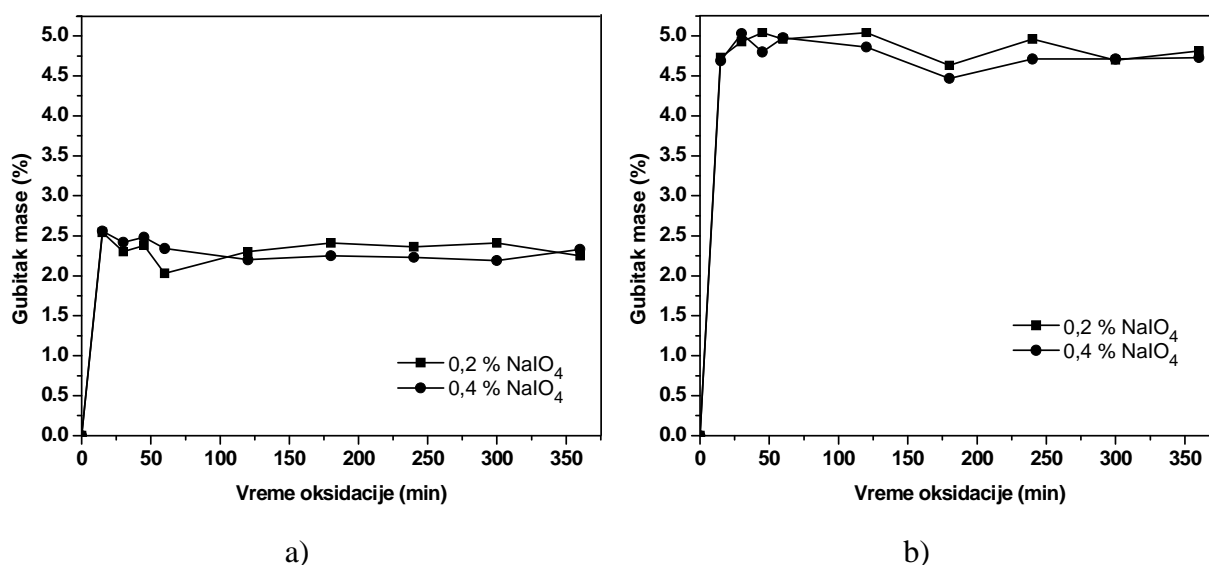
Oksidacija pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom praćena je formiranjem rastvorljivih fragmenata, što se može odrediti merenjem gubitka mase oksidisanih uzoraka pređe. Naime, pri oksidaciji celuloze natrijum-perjodatom, pored konverzije sekundarnih hidroksilnih grupa u aldehidne grupe, dolazi u izvesnoj meri i do destrukcije celuloze, tj. raskidanja glikozidnih veza i depolimerizovanja makromolekula, koja je zapravo izazvana naknadnim reakcijama, a ne samom oksidacijom. Pri tome se jedan deo produkata oksidacije rastvara, što za posledicu ima smanjenje mase modifikovanih uzoraka.

Gubitak mase, kao posledica modifikovanja pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom, određen je iz razlike u masi apsolutno suvog uzorka pre i posle reakcije oksidacije. Rezultati o gubitku mase usled oksidacije uzoraka celulozne pređe različitim koncentracijama perjodata i pri različitim vremenima modifikovanja, dati su u tabeli 6.3.

Tabela 6.3 Uticaj uslova oksidacije na gubitak mase pamučne i viskozne pređe

Uslovi oksidacije		Gubitak mase, %	
Oksidaciono sredstvo	Vreme oksidacije, min	Pamućna pređa	Viskozna pređa
0,2 % NaIO ₄	15	2,54	4,73
	30	2,30	4,93
	45	2,38	5,04
	60	2,03	4,96
	120	2,30	5,04
	180	2,41	4,63
	240	2,36	4,96
	300	2,41	4,70
	360	2,25	4,81
0,4 % NaIO ₄	15	2,56	4,69
	30	2,42	5,03
	45	2,48	4,80
	60	2,34	4,98
	120	2,20	4,86
	180	2,25	4,47
	240	2,23	4,71
	300	2,19	4,71
	360	2,33	4,73

Kao što se može videti iz eksperimentalnih podataka prikazanih u tabeli 6.3 i na slici 6.4, povećanje koncentracije perjodata i produženje vremena reakcije nema značajan uticaj na gubitak mase oksidisanih pamučnih i viskoznih uzoraka pređe. Tretiranjem pamučne pređe natrijum-perjodatom nastaju gubici mase čije se vrednosti kreću u intervalu od 2,03 % do 2,56 %, pri čemu su najveći gubici mase zabeleženi kod uzoraka koji su modifikovani sa 0,2 % i 0,4 % NaIO_4 tokom prvih 15 minuta reakcije. U ovom početnom periodu oksidacije dolazi do uklanjanja neceluloznih materija sa površine sirove nebeljene pamučne pređe, koja je korišćena u ovom eksperimentu, tako da ovaj proces doprinosi gubitku mase oksidisane pamučne pređe. Sa produžavanjem vremena modifikovanja iznad 15 min uočava se blago smanjenje gubitka mase, posebno kod uzoraka oksidisanih sa 0,4 % NaIO_4 , a razlog može biti vezivanje niskomolekulskih frakcija hemiacetalnim vezama za celulozne lance u vlaknima, kada je pređa, sa kojom mogu da ostvare kontakt, dovoljno dugo u rastvoru.



Slika 6.4 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO_4 i gubitka mase oksidisane a) pamučne i b) viskozne pređe

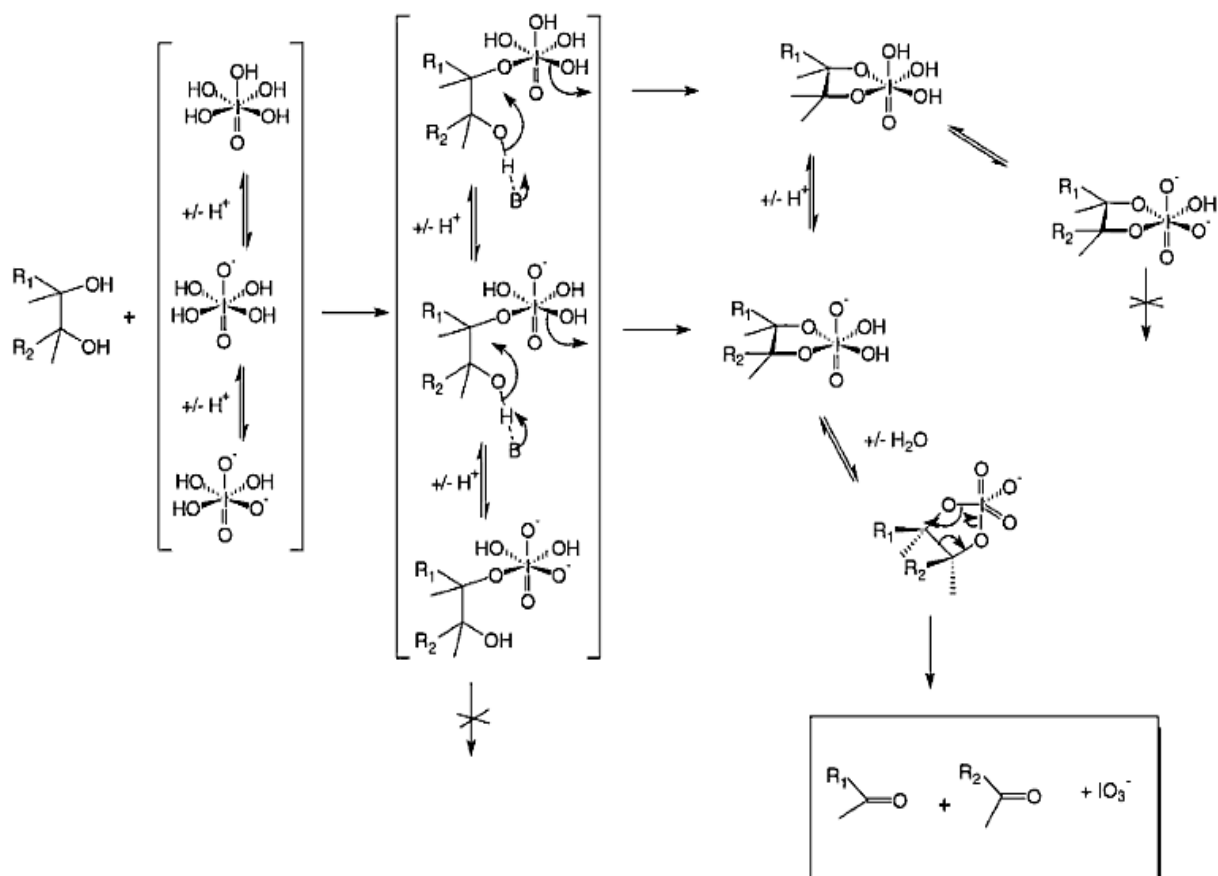
U slučaju modifikovane viskozne pređe takođe su zabeležene relativno niske vrednosti gubitka mase, čak i pri najrigoroznijim uslovima oksidacije, koje se kreću u opsegu od 4,47 % do 5,04 %. Ipak, ove vrednosti su skoro dvostruko veće od vrednosti za gubitak mase koje su dobijene za oksidisane uzorke pamuka. Dobijena razlika može se pripisati razlikama u strukturi prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana, uglavnom u stepenu polimerizovanja i kristalnosti, kao i prostornom aranžmanu fibrila.

Prikazani rezultati za gubitak mase celuloznih pređa u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim za uzorke Whatman papira oksidisane natrijum-perjodatom, kod kojih je zabeležen zanemarljiv gubitak mase [191], ali su u suprotnosti sa podacima o gubitku mase koji su dobijeni za liocel vlakna (do 21 %) oksidisana pomoću KIO_4 pod sličnim uslovima [206], kao i za pamuk, koji pri rigoroznim uslovima oksidacije (72 h, 0,4 M NaIO_4) gubi 30 % od svoje početne mase [188].

Na osnovu prikazanih rezultata o gubitku mase može se zaključiti da pri tretiranju celuloznih vlakana, pod uslovima koji su primenjeni u eksperimentu, natrijum-perjodat praktično neznatno oštećuje celulozu, kao i da efikasno razara primese u vlaknu.

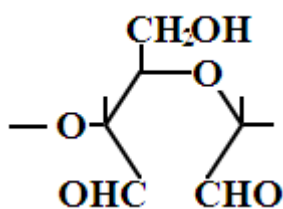
6.2.2. Sadržaj aldehidnih grupa u oksidisanim pamučnim i viskoznim vlaknima

Pri dejstvu visoko selektivnog oksidacionog sredstva natrijum-perjodata na celulozu u pamučnim i viskozim vlaknima dolazi do oksidacije obe sekundarne hidroksilne grupe celuloze do aldehidnih grupa, uz istovremeno raskidanje veze između ugljenika u položajima 2 i 3 i otvaranja oksidisanog dela glukopiranoznog prstena makromolekula celuloze. Na taj način nastaje jedinjenje 2,3-dialdehid celuloza. Reakcija oksidacije se verovatno odvija preko intermedijarnog kompleksa, cikličnog diestra perjodatnog jona sa α -hidroksilnim grupama celuloze, koji zatim podleže intramolekulskom redoks procesu sa raskidanjem C–C veze glukozidnih jedinica celuloze. Mehanizam ove reakcije prikazan je na slici 6.5, odakle se vidi da utroškom jednog molekula perjodata nastaju dve aldehidne grupe.



Slika 6.5 Mehanizam oksidacije celuloze perjodatima [172]

Oksidacijom celuloze perjodatom uvode se dve reaktivne aldehidne grupe po monomernoj jedinici, a nastale oksidisane anhidroglukozne jedinice celuloze imaju strukturu kao što je prikazano na slici 6.6. Pri perjodatoj oksidaciji, polimerna struktura celuloze ostaje očuvana, zbog čega se ova reakcija široko koristi u modifikovanju ne samo celuloze, već i drugih polisaharida. Međutim, makromolekuli celuloze koji sadrže oksidisane glukozne jedinice veoma su osetljivi u alkalnoj sredini i podložni su reakcijama depolimerizovanja, koje su praćene obrazovanjem novih krajnjih grupa i rastvorljivih fragmenata.



Slika 6.6 Oksidisana jedinica dialdehid celuloze

Oksidacija pamučne i viskozne pređe izvođena je pri različitim koncentracijama natrijum-perjodata i uz variranje vremena reakcije, pri čemu je najpre ispitan uticaj uslova oksidacije na brzinu reakcije i sadržaj aldehidnih grupa u modifikovanim uzorcima pamučne i viskozne pređe. S obzirom da, kao što je prethodno rečeno, utroškom jednog molekula perjodata nastaju dve aldehidne grupe, brzina potrošnje perjodata (tj. smanjenje sadržaja perjodata u rastvoru, prema masi pređe koja je uronjena u rastvor, izraženo kao broj molekula perjodata na 100 molekula glukoze) može se identifikovati sa brzinom reakcije oksidacije.

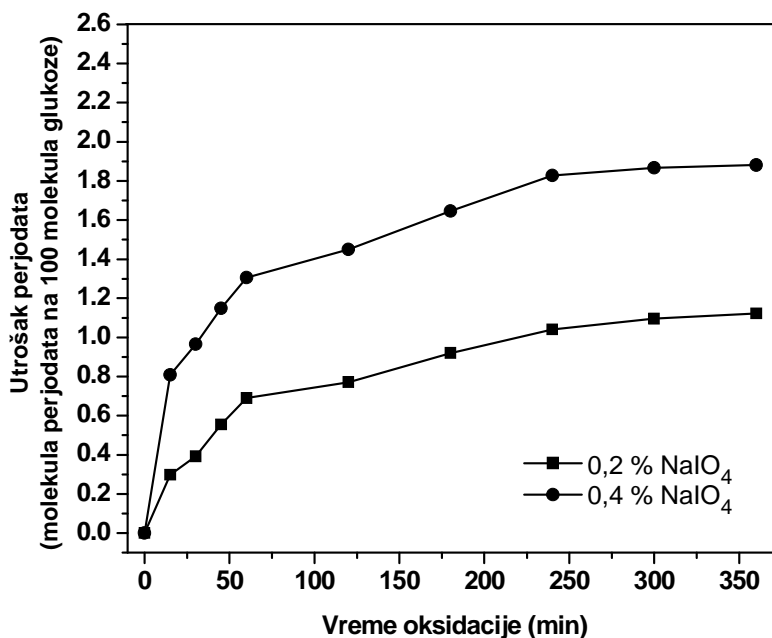
Slika 6.7 prikazuje utrošak perjodata u toku oksidacije pamučne i viskozne pređe pomoću 0,2 % i 0,4 % NaIO₄. U slučaju oksidacije pamučne pređe, krive koje ilustruju tok reakcije za 0,2 % i 0,4 % rastvora natrijum-perjodata mogu se podeliti na tri različite faze: brzina utroška perjodata je relativno visoka tokom prvih 60 minuta reakcije, za obe koncentracije rastvora, dok sa produženjem vremena oksidacije, brzina reakcije se najpre smanjuje, a iznad 240 minuta postaje skoro konstantna.

Tok reakcije oksidacije uzoraka viskozne pređe, koji je praćen merenjem potrošnje perjodata, takođe iz 0,2 % i 0,4 % rastvora NaIO₄, pokazuje sličan trend promene utroška perjodata kao kod pamučne pređe, ali se u ovom slučaju mogu uočiti dve odvojene faze (slika 6.7 b). Prva faza takođe obuhvata početnih 60 minuta oksidacije, kada je brzina reakcije, tj. utroška perjodata približno jednaka vrednostima dobijenim za pamučnu pređu (0,7 i 1,3 molekula perjodata na 100 molekula glukoze za 0,2 % i 0,4 % rastvora NaIO₄, respektivno). U drugoj fazi, potrošnja perjodata nastavlja da se kontinualno, skoro linearno povećava sa produženjem vremena oksidacije do 360 minuta, ali je brzina manja u odnosu na početnu fazu. Može se zapaziti da vrednosti dobijene za utrošak perjodata viskoznom pređom iz 0,4 % NaIO₄ daju nešto veći nagib u odnosu na vrednosti za 0,2 % rastvor. Najveći utrošak perjodata zabeležen je pri oksidaciji pamučne i viskozne pređe sa 0,4 % NaIO₄ u toku 360 minuta i iznosi, respektivno, 1,9 i 2,4 molekula perjodata na 100 molekula glukoze. Krive koje ilustruju utrošak perjodata pamučnom i viskoznom pređom, dobijene u ovom radu, slične su krivama koje prikazuju potrošnju perjodata liocel vlaknima iz 0,2 % i 0,4 % rastvora kalijum-perjodata (KIO₄) [206].

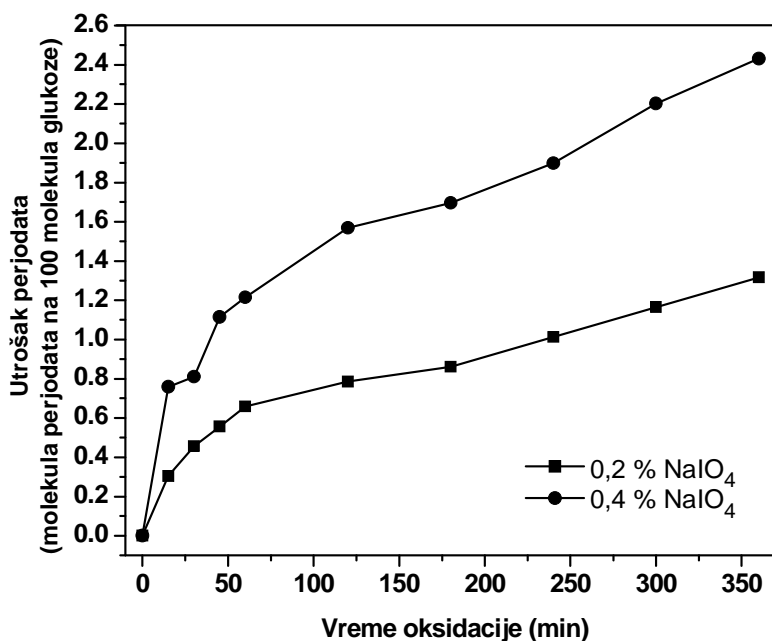
Analizirajući kinetiku perjodatne oksidacije, Calvini i saradnici [191] podelili su tok reakcije u tri faze, sugerišući odvijanje tri simultane reakcije tokom oksidacije perjodatom: brzi početni nasumični napad perjodata koji se dešava u amorfim regionima celuloze, druga sporija reakcija koja se pripisuje oksidaciji površine kristalita i veoma spora treća reakcija usled oksidacije kristalnih oblasti. Veruje se da se svi navedeni mehanizmi odigravaju na krajnje heterogen način [182], uz obrazovanje izolovanih oksidisanih domena, pri čemu se oksidacija nastavlja u neposrednom okruženju postojećih oksidisanih centara. Prema Nevell-u [179], početna brza reakcija može se identifikovati sa formiranjem cikličnog kompleksa perjodatnog jona sa α -hidroksilnim grupama celuloze, koji zatim podleže intramolekulskom redoks procesu sa kidanjem C–C veze glukozidnih jedinica celuloze.

Perjodatna oksidacija celuloze je kompleksan proces, s obzirom da se odvija postepeno od amorfne do kristalne faze. Početna nasumična oksidacija dešava se u amorfim područjima celuloze, a praćena je oksidacijom površine kristalita. Za oksidaciju unutrašnjih

oblasti celuloze neophodna su duža vremena reakcije i veće koncentracije perjodata. Takođe, prema literaturnim podacima [182], perjodatna oksidacija celulozних vlakana dovodi do neravnomerne distribucije dialdehidnih grupa.



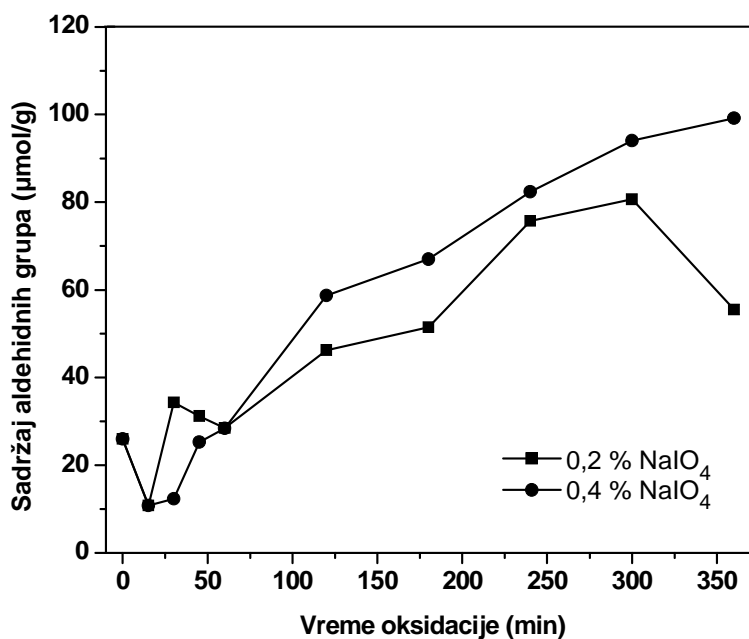
a)



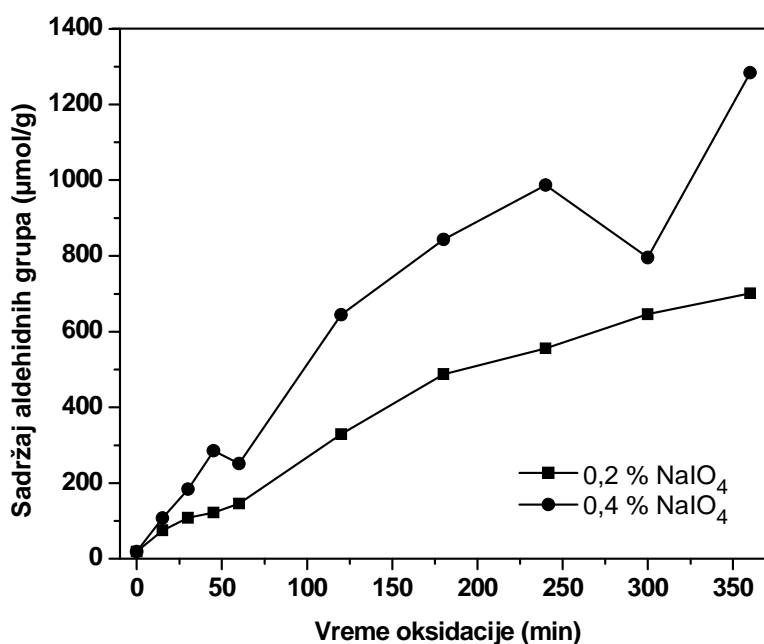
b)

Slika 6.7 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i utroška perjodata u toku oksidacije a) pamučne i b) viskozne pređe

Uticaj vremena oksidacije i koncentracije natrijum-perjodata na sadržaj aldehidnih grupa u oksidanim uzorcima pamučne i viskozne pređe prikazan je na slici 6.8.



a)



b)

Slika 6.8 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i sadržaja aldehidnih grupa u oksidisanim uzorcima a) pamučne i b) viskozne pređe

Nemodifikovani uzorci pamučne i viskozne pređe imaju sličan sadržaj aldehidnih grupa, koji iznosi 26,0 i 18,4 µmol/g celuloze, respektivno. Na osnovu eksperimentalno dobijenih rezultata za pamuk (slika 6.8 a), može se videti da tokom prvih 30 minuta perjodatne oksidacije pamučne pređe ne dolazi do povećanja sadržaja aldehidnih grupa. Nakon toga, sa produžavanjem vremena oksidacije, količina aldehidnih grupa u oksidisanom

pamuku se povećava za obe primenjene koncentracije perjodata. Kod uzoraka pamučne pređe koji su oksidisani sa 0,4 % NaIO_4 zabeleženo je veće povećanje sadržaja aldehidnih grupa (do 282 %) u odnosu na uzorke oksidisane pomoću 0,2 % rastvora NaIO_4 (povećanje do 210 %). Maksimalna količina aldehidnih grupa od 99,2 $\mu\text{mol/g}$ celuloze uvedena je u pamučna vlakna koja su oksidisana pri najrigoroznijim uslovima (0,4 % NaIO_4 , 360 min) i ova vrednost je 3,8 puta veća u odnosu na odgovarajuću vrednost za nemodifikovani pamuk.

Poređenjem sadržaja aldehidnih grupa sa utroškom perjodata za pamučnu pređu (slike 6.8 a i 6.7 a), može se zaključiti da se tokom prvih 30 minuta modifikovanja perjodat troši najverovatnije na necelulozne materije u pamuku, s obzirom da je u ovom radu korišćena sirova nebeljena pamučna pređa. Inače, poznato je da su necelulozne materije prisutne na površini pamučnih vlakana i da predstavljaju kompleksnu smešu masnih kiselina, alkohola, alkana, estara i glicerida [114]. Ovakav zaključak je u saglasnosti sa podacima o gubitku mase oksidisanog pamuka (tabela 6.3 i slika 6.4 a). Naime, kod uzoraka pamučne pređe koji su oksidisani tokom prvih 30 minuta zabeležene su vrednosti gubitka mase od oko 2,5 %, koje ostaju približno konstantne sa produženjem vremena reakcije i povećanjem koncentracije natrijum-perjodata. Očigledno je da se jedan deo perjodata troši u reakcijama sa primesama prisutnim u vlaknima pamuka.

Oksidacijom viskozne pređe uvedena je znatno veća količina aldehidnih grupa u oksidisane uzorke (slika 6.8 b) u odnosu na uzorke pamučne pređe modifikovane pri istim uslovima. U toku oksidacije viskoze 0,2 % rastvorom NaIO_4 , sadržaj aldehidnih grupa u oksidisanim uzorcima se približno linearno povećava sa produžavanjem vremena reakcije. Pri modifikovanju viskozne pređe natrijum-perjodatom koncentracije 0,4 %, odstupanje od skoro linearnog povećanja količine aldehidnih grupa sa vremenom registrovano je kod dva uzorka, oksidisana tokom 60 i 300 minuta. Sadržaj aldehidnih grupa u uzorcima viskozne pređe koji su oksidisani sa 0,2 % NaIO_4 kreće se u opsegu 74,5-701,2 $\mu\text{mol/g}$ celuloze, dok je u uzorcima oksidisanim sa 0,4 % NaIO_4 u opsegu 107,0-1284,0 $\mu\text{mol/g}$ celuloze. Za obe koncentracije rastvora perjodata, najveći sadržaj aldehidnih grupa zabeležen je kod uzoraka koji su oksidisani u toku najdužeg primenjenog vremena modifikovanja (360 min) i ove vrednosti su, respektivno, 38,2 i 69,8 puta veće od vrednosti dobijene za nemodifikovanu viskoznu pređu. Poređenjem sadržaja aldehidnih grupa u uzorcima pamučne i viskozne pređe modifikovanim sa 0,2 % i 0,4 % natrijum-perjodatom (slika 6.8), može se zapaziti znatno veća razlika u sadržaju aldehidnih grupa između viskoznih vlakana oksidisanih sa 0,4 % NaIO_4 i sa 0,2 % NaIO_4 pri istim vremenima modifikovanja, nego što je to u slučaju oksidisanih pamučnih vlakana.

Dobijeni rezultati ukazuju na mnogo veću reaktivnost regenerisanih viskoznih vlakana prema perjodatnom reagensu u odnosu na prirodna pamučna vlakna, koja se uglavnom može pripisati manjem stepenu kristalnosti i jednostavnijoj nadmolekulskoj i mikrostrukturi viskoznih vlakana. Tome doprinosi i veća pristupačnost kristalne strukture celuloze II hemijskih celuloznih vlakana za reagense u poređenju sa strukturom celuloze I prirodnih celuloznih vlakana.

Poređenjem maksimalnih vrednosti sadržaja aldehidnih grupa koje su dobijene za uzorak pamuka (99,2 $\mu\text{mol/g}$ celuloze) i uzorak viskoze (1284,0 $\mu\text{mol/g}$ celuloze) koji su oksidisani pri istim uslovima (0,4 % NaIO_4 , 360 min) i vrednosti utroška perjodata za ova dva uzorka (1,9 i 2,4 molekula perjodata na 100 molekula glukoze, respektivno), može se registrovati 13 puta veća količina aldehidnih grupa u uzorku oksidisane viskoze, kao i samo 1,3 puta veća vrednost utroška perjodata. Iako su vrednosti utroška perjodata slične za ova dva uzorka, treba imati u vidu da se kod pamuka perjodat troši i na necelulozne materije kojih nema u viskozi. Osim toga, stoji činjenica da su molekuli celuloze koji sadrže oksidisane jedinice podložni skraćivanju, tj. raskidanju glikozidnih veza i depolimerizovanju, pri čemu nastaju nove krajnje aldehidne grupe. S obzirom da perjodat ne deluje direktno na glikozidnu

vezu celuloze, već raskida isključivo C2–C3 vezu piranoznog prstena, pomenuto skraćivanje, odnosno depolimerizovanje celuloznih lanaca verovatno je posledica kiselosti rastvora [192, 193] i može se očekivati da je izraženije kod viskoznih vlakana, s obzirom na navedene razlike u strukturi prirodnih i regenerisanih celuloznih vlakana, kao i na veći stepen oksidacije, odnosno veći sadržaj oksidisanih jedinica u molekulima celuloze viskoznih vlakana. Kao posledica ovog procesa dolazi i do stvaranja niskomolekulskih proizvoda, od kojih se jedan deo rastvara i ulazi u vrednost gubitka mase (4,73 % za razmatrani uzorak oksidisane viskozne pređe), dok najverovatnije veći deo ostaje u vlaknu vezan hemiacetalnim vezama za susedne molekule celuloze. U prilog navedenom govori mnogo veći porast sadržaja aldehidnih grupa u odnosu na utrošak perjodata, dobijen za pomenuti uzorak viskozne pređe, koji se može videti ako se uporede vrednosti količine aldehidnih grupa i utroška perjodata prikazane na slikama 6.8 b i 6.7 b, respektivno. Takođe, izuzetno visok sadržaj uvedenih aldehidnih grupa upućuje na izraženo umrežavanje kod viskoznih vlakana usled obrazovanja hemiacetalnih veza između susednih celuloznih lanaca.

Izraženije depolimerizovanje viskoznih u odnosu na pamučna vlakna u toku perjodatne oksidacije može se očekivati s obzirom na dobro poznate činjenice da viskozna vlakna imaju manji stepen kristalnosti, odnosno veći udeo amorfne oblasti u odnosu na pamučna vlakna, kao i da su celulozni lanci u amorfne područjima podložniji hidrolizi u odnosu na lance u kristalnim oblastima. Brzina hidrolize amorfne celuloze je znatno veća u odnosu na brzinu hidrolize kristalne celuloze, što je posledica razlike u stepenu hidratacije između ove dve vrste celuloze. Amorfna celuloza je visoko hidratizovana u vodi i vodenim rastvorima, tako da većina glikozidnih veza može biti hidrolizovana. Kod kristalne celuloze, međutim, samo lanci površinskih slojeva su hidratizovani i pristupačni za hidrolizu. Prema tome, hidroliza kristalne celuloze se odvija sloj po sloj, tj. drugi sloj postaje pristupačan tek nakon uklanjanja prvog površinskog sloja hidrolizom, dok se hidroliza amorfne celuloze može (potencijalno) odvijati simultano u celokupnoj strukturi [280]. Očigledno je da je brzina hidrolize veća u vlaknima manje kristalnosti, tj. u viskoznim vlaknima u ovom slučaju, s obzirom da manja kristalnost znači veći broj lanaca pristupačnih za hidrataciju, a time i za hidrolizu, što za posledicu ima veći stepen depolimerizovanja i veći broj novoformiranih krajnjih aldehidnih grupa.

6.2.3. Sorpcija vlage i sposobnost zadržavanja vode u oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi

Sorpciona svojstva vlakana spadaju u najznačajnija praktična i tehnološka svojstva tokom tekstilnih obrada, s obzirom na to da se većina procesa obrada odigrava u vodenoj sredini. Radi boljeg razumevanja ponašanja tekstilnih vlakana tokom procesa mokrih obrada, poznavanje korelacije između njihove strukture i njihovih sorpcionih svojstava je od izuzetnog značaja. Za ispitivanje sorpcionih svojstava vlakana na raspolaganju su raznovrsne metode za određivanje: sorpcije vlage, sposobnosti zadržavanja vode, sorpcije joda i boja, kisele hidrolize i druge metode. U cilju karakterisanja pristupačnosti celuloze često se koriste interakcije sa vodom, koja je sposobna da raskine slabije vodonične veze, ali ne može da penetrira u visoko sredene oblasti. Količina apsorbirane vode je veoma značajan indikator za određivanje sorpcionih svojstava vlakana. Test sorpcije joda je takođe često korišćen, pogodan empirijski metod za merenje pristupačnosti amorfnih oblasti celuloze.

Poznato je da molekulska struktura (hemijaska struktura, stepen polimerizovanja, molekulska masa) i nadmolekulska struktura (stepen kristalnosti, orijentacija molekula, amorfnost područja i sistemi šupljina) imaju značajan uticaj na sorpciona svojstva vlakana. Perjodna oksidacija celuloze dovodi do promena u strukturi i kristalnosti rezultujućih molekula i utiče, između ostalog, na njene sorpcione karakteristike. Razlike u molekularnoj i nadmolekularnoj strukturi nemodifikovanih i oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana uzrokuju različita sorpciona svojstva ovih vlakana, koja su ocenjena određivanjem sorpcije vlage, sposobnosti zadržavanja vode i sorpcije joda.

Najznačajniji uticaj na sorpciona svojstva vlakana imaju pristupačni regioni – delovi manje sredenih amorfnih oblasti i sistem šupljina. Sredena područja (kristalna) ne doprinose značajno procesu sorpcije vode. Zapravo, ispitivanja pomoću X-zraka su pokazala da molekuli vode ne penetriraju u kristalna područja [281]. Dakle, sorpcija vlage se dešava isključivo u amorfnim regionima i na površini kristala [282].

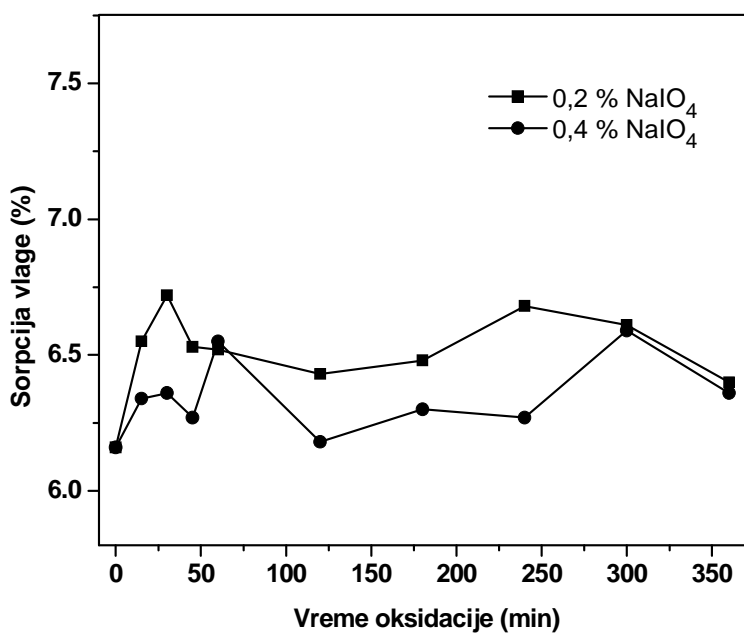
Slobodne hidroksilne grupe koje se nalaze u amorfnim područjima celuloze i na površini kristala odgovorne su za sorpciju vlage pri relativnoj vlažnosti vazduha od 65 % i temperaturi od 20 °C. Sorpcija vodene pare počinje sa formiranjem čvrsto vezanog monosloja, u kome je jedan molekul vode vezan za svaku pristupačnu hidroksilnu grupu. Dalje vezivanje molekula vode ostvaruje se vodoničnim vezama za postojeći monomolekulski sloj, što dovodi do obrazovanja dodatnih slojeva vode (multislojeva) [283]. Prema tome, određivanjem sorpcije vlage mogu se dobiti informacije o veličini oblasti u vlaknu koja je dostupna za vodenu paru.

Rezultati ispitivanja uticaja uslova hemijskog modifikovanja celuloznih vlakana pomoću natrijum-perjodata pokazali su da se direktno odražavaju na promene sposobnosti sorpcije vlage ovih vlakana. Vrednosti sorpcije vlage dobijene za nemodifikovana i oksidisana pamučna i viskozna vlakna prikazane su na slici 6.9.

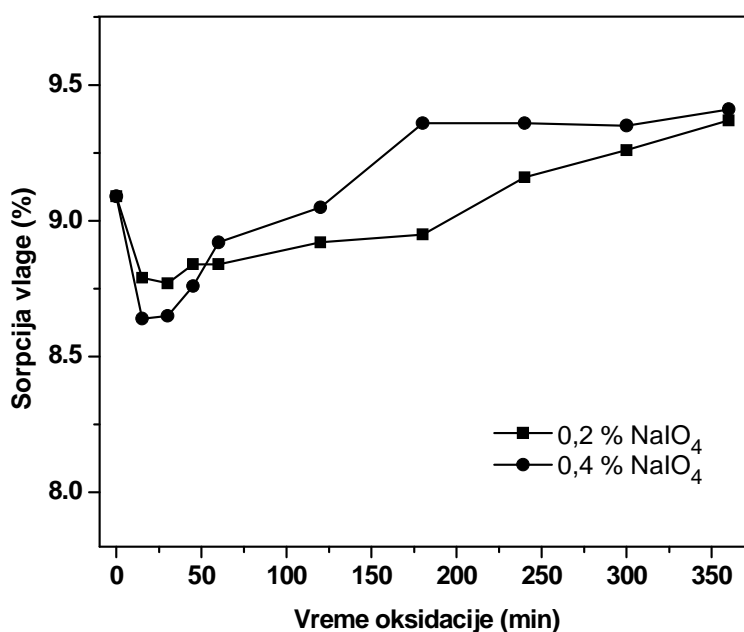
Sorpcija vlage polazne, nemodifikovane pamučne i viskozne pređe iznosi 6,16 % i 9,09 %, respektivno. Iz prikazanih rezultata je očigledno da pri svim uslovima oksidacije dolazi do promene sposobnosti sorpcije vlage modifikovanih pamučnih i viskoznih vlakana, kao i da oksidisana vlakna ispoljavaju neznatne promene sadržaja vlage u odnosu na odgovarajuće nemodifikovane uzorke.

U modifikovanim pamučnim vlaknima sorpcija vlage se povećava tokom prvih 30 minuta reakcije do vrednosti od 6,72 % i 6,36 %, kod uzoraka oksidisanih sa 0,2 % i 0,4 % NaIO₄, respektivno. Uzorci pamuka oksidisani u toku 60 minuta pokazuju približno iste

vrednosti sorpcije vlage od oko 6,5 %. Produžavanjem vremena reakcije preko 60 minuta, vrednosti sorpcije vlage dobijene za pamučna vlakna oksidisana sa 0,2 % NaIO_4 ostaju više ili manje konstantne, dok za vlakna oksidisana sa 0,4 % NaIO_4 najpre opadaju, a zatim poprimaju približno konstantnu vrednost od oko 6,34 %. U poređenju sa nemodifikovanom pamučnom predom, najveće povećanje sorpcije vlage (9 %) pokazao je uzorak oksidisan tokom 30 minuta pomoću 0,2 % rastvora natrijum-perjodata.



a)



b)

Slika 6.9 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO_4 i sorpcije vlage oksidisanih a) pamučnih i b) viskoznih vlakana

Viskozna vlakna koja su oksidisana pomoću 0,2 % i 0,4 % rastvora NaIO_4 tokom početnih 180 i 120 minuta, respektivno, sorbuju manju količinu vlage u poređenju sa nemodifikovanim vlaknima, dok se produžavanjem vremena reakcije oksidacije sorpcija vlage povećava. Od uzoraka viskoznih vlakana koji su oksidisani u prisustvu 0,2 % NaIO_4 , najnižu vrednost sadržaja vlage pokazao je uzorak modifikovan tokom 30 minuta (8,77 %). Daljim produžavanjem vremena oksidacije do 360 minuta, zapaža se postepeno, skoro linearno povećanje sorpcije vlage do maksimalne vrednosti od 9,37 %. Kriva koja prikazuje promenu vrednosti sorpcije vlage sa vremenom za viskozna vlakna koja su oksidisana većom koncentracijom natrijum-perjodata može se podeliti na tri oblasti: sadržaj vlage naglo opada u prvih 15 minuta oksidacije do minimalne vrednosti od 8,64 % (smanjenje 5 %), zatim se približno linearno povećava sa produžavanjem vremena modifikacije do 180 minuta dostižući vrednost od 9,36 %, a pri daljoj oksidaciji poprima skoro konstantnu vrednost. Maksimalnu vrednost sorpcije vlage od 9,41 % (povećanje 3,5 %) pokazao je uzorak oksidisan pri najrigoroznijim uslovima, tj. u toku 360 minuta, perjodatnom koncentracije 0,4 %.

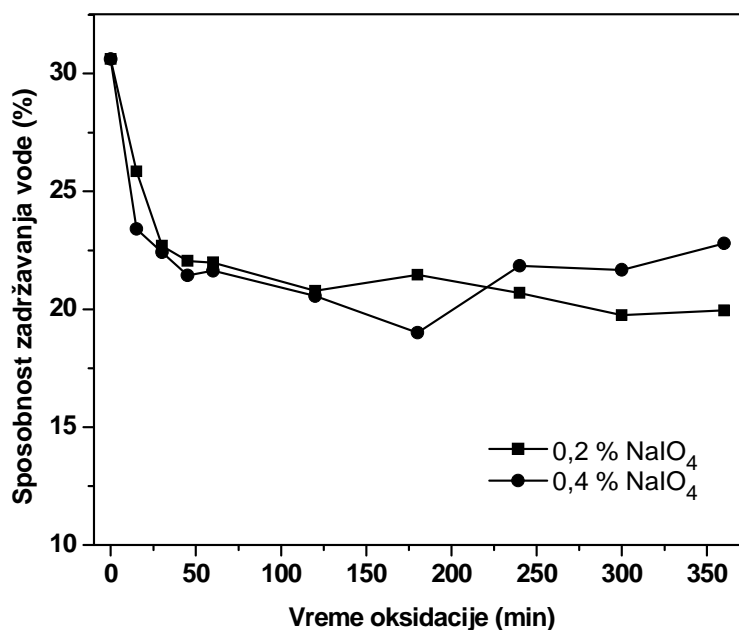
Kao što je prethodno naglašeno, za sorpciju vlage odgovorne su slobodne hidroksilne grupe koje se nalaze u amorfnim područjima celuloze i na površini kristala. U vlaknima koja su oksidisana perjodatom, određeni broj pristupačnih hidroksilnih grupa konvertovan je u aldehidne grupe, koje su verovatno nešto manje sklone sorpciji molekula vode u odnosu na hidroksilne grupe. Dakle, od oksidisanih vlakana se očekuje da ispolje niže vrednosti sorpcije vlage [284]. Pored toga, perjodatna oksidacija stvara mogućnost kovalentnog umrežavanja molekula celuloze u vlaknu, što za posledicu ima poboljšanje integriteta vlakna i uklanjanje potencijalnih centara sorpcije vode.

Veći sadržaj vlage kod oksidisanih pamučnih vlakana u odnosu na nemodifikovana vlakna može se objasniti delimičnim uklanjanjem nečistoća sa površine sirovih pamučnih vlakana u ranoj fazi oksidacije. Ove nečistoće predstavljaju hidrofobnu barijeru, tako da njihovo delimično eliminisanje omogućava molekulima vode da dopru do celuloznih materijala na površini koji su sposobni da sorbuju vlagu. U kasnijim fazama oksidacije, tj. pri rigoroznijim uslovima modifikovanja, moguće je da se uspostavlja neka vrsta ravnoteže između povećanja količine aldehidnih grupa, odnosno smanjenja broja hidroksilnih grupa i povećanja broja hemiacetalnih veza, što dovodi do smanjenja sorpcije vlage i oštećenja površine vlakana usled dejstva oksidacionog sredstva (poglavlje 6.2.6.), koja utiču na povećanje njihove mikroporoznosti i pristupačnosti za vodu.

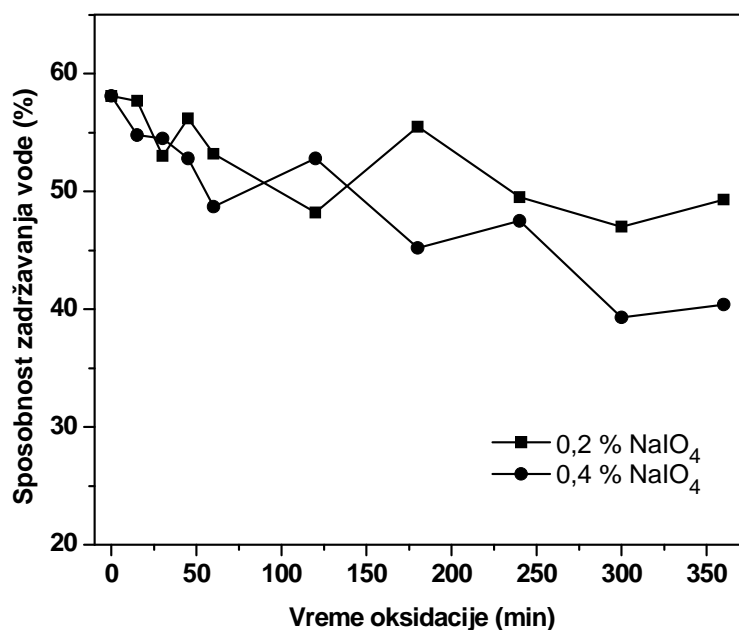
U slučaju oksidisanih viskoznih vlakana, najpre dolazi do smanjenja sorpcije vlage, verovatno kao posledica oksidacije molekula celuloze u površinskim slojevima vlakana, tj. konverzije hidroksilnih u aldehidne grupe i formiranja hemiacetalnih veza, čime se smanjuje broj hidroksilnih grupa dostupnih za interakcije sa molekulima vode. Sa produženjem vremena oksidacije, sorpcija vlage se povećava, što se može objasniti destrukcijom celuloze koja se odvija u tankom reakcionom površinskom sloju viskoznih vlakana, a što je pokazala i SEM analiza mikrostrukture vlakana (poglavlje 6.2.6.). Sa povećanjem koncentracije NaIO_4 i vremena reakcije dolazi do dubljeg prodiranja reagensa, što dovodi do pojave pukotina u vlaknima i povećanja njihove mikroporoznosti, tj. veće otvorenosti ili pristupačnosti za vodu u gasovitom stanju. Pri rigoroznijim uslovima oksidacije ovaj efekat je verovatno dominantniji u odnosu na smanjenje broja hidroksilnih grupa usled konverzije u aldehidne grupe i formiranja hemiacetalnih veza i razlog je povećanja sorpcije vlage pri dužim vremenima oksidacije.

Interakcije celuloznih vlakana sa vodom u tečnom stanju dovode do bubrenja vlakana koje uključuje širenje amorfnih područja. Kada se celulozna vlakna urone u vodu, ona upijaju veliku količinu vode i znatno bubre. Sposobnost zadržavanja vode predstavlja količinu vode koja ostaje u vlaknu nakon njegovog potapanja u vodu i centrifugiranja. Količina zadržane vode menja se sa promenom nadmolekulske strukture vlakna, s obzirom da predstavlja meru

njegove sorpcione sposobnosti. Ukupan kapacitet zadržavanja vode može se okarakterisati određivanjem sposobnosti zadržavanja vode. Sve površine, pukotine i šupljine u vlaknima koje apsorbiraju i zadržavaju vodu obuhvaćene su merenjem sposobnosti zadržavanja vode. Uticaj uslova oksidacije, koncentracije natrijum-perjodata i vremena modifikovanja, na promenu sposobnosti zadržavanja vode (SZV) pamučnih i viskoznih vlakana, prikazan je na slici 6.10.



a)



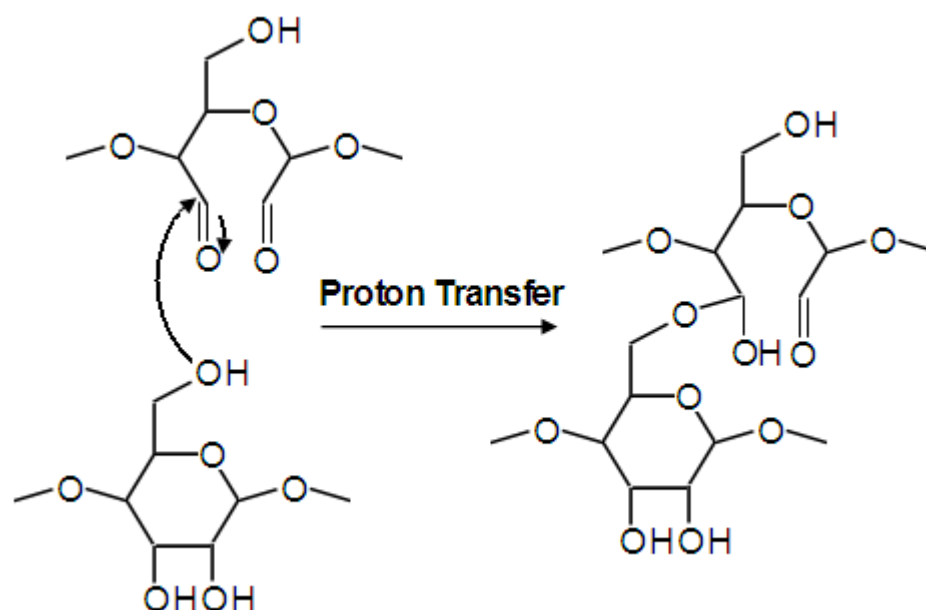
b)

Slika 6.10 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih a) pamučnih i b) viskoznih vlakana

Iz dobijenih rezultata se može videti da sposobnost zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana naglo opada tokom prvih 30 minuta modifikovanja, od 30,6 % (nemodifikovana vlakna) do 22,7 % i 22,4 % za uzorke oksidisane pomoću 0,2 % i 0,4 % NaIO_4 , respektivno. Produžavanjem vremena oksidacije, zapaža se kontinualno, blago smanjenje sposobnosti zadržavanja vode vlakana oksidisanih sa 0,2 % perjodatom, koje dostiže minimalnu vrednost od 19,9 % nakon 360 minuta. U slučaju vlakana oksidisanih sa 0,4 % natrijum-perjodatom, sposobnost zadržavanja vode poprima skoro konstantnu vrednost od 21,3 %, pri čemu je najniža vrednost od 19,0 % (smanjenje 38 %) dobijena za uzorak pamuka koji je oksidisan u toku 180 minuta.

Kao i u slučaju pamučne pređe, svi uzorci oksidisane viskozne pređe pokazuju niže vrednosti sposobnosti zadržavanja vode u odnosu na nemodifikovanu pređu (58,1 %). Prema rezultatima prikazanim na slici 6.10 b, oksidacijom viskoznih vlakana natrijum-perjodatom veće koncentracije, kojom se uvodi i veća količina aldehydnih grupa, kod skoro svih uzoraka dolazi do većeg smanjenja sposobnosti zadržavanja vode u odnosu na uzorke koji su oksidisani sa 0,2 % NaIO_4 . Minimalna vrednost sposobnosti zadržavanja vode od 39,3 % (smanjenje 32,4 %) zabeležena je za uzorak viskozne pređe koji je oksidisan natrijum-perjodatom koncentracije 0,4 % u toku 300 minuta.

Dobijeni rezultati mogu se objasniti pojavom umrežavanja zahvaljujući reaktivnim aldehydним grupama koje su uvedene u vlakna perjodatnom oksidacijom. Nakon formiranja u celuloznim vlaknima, aldehydne grupe su sposobne da dalje reaguju sa susednim hidroksilnim grupama u vlaknu i obrazuju hemiacetalne veze, kao što je prikazano šemom na slici 6.11. Aldehydne grupe formiraju stabilne, kovalentne intra- i intermolekulske hemiacetalne veze u dialdehyd celulozi [190]. Nastale hemiacetalne veze su odgovorne za umrežavanje, tj. stvaranje umrežene strukture. Efekat umrežavanja čini molekule kompaktnijim i uklanja potencijalne centre za vezivanje vode. Prema tome, smanjenje sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana verovatno je izazvano smanjenjem sposobnosti bubrenja usled stvaranja umreženih struktura [285], kao i eliminisanjem adsorpcionih centara pristupačnih za molekule vode.



Slika 6.11 Šematski prikaz mogućeg mehanizma reakcije umrežavanja [286]

Na slici 6.8 može se videti da postoji primetna razlika u sadržaju aldehidnih grupa između uzoraka koji su oksidisani sa 0,2 % i 0,4 % rastvorom natrijum-perjodata, međutim, približno jednake vrednosti sorpcije vlage i sposobnosti zadržavanja vode (slike 6.9 i 6.10, respektivno) mogu se uočiti između njih, posebno u slučaju oksidisanih pamučnih vlakana. Moguće objašnjenje je da je povećanje količine aldehidnih grupa u početnom periodu oksidacije praćeno obrazovanjem hemiacetalnih veza sve do trenutka postizanja zasićenja, nakon čega aldehidne grupe uvedene u celulozna vlakna sa produženjem reakcije oksidacije ne učestvuju u umrežavanju.

Vrednosti sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana menjaju se u opsegu 25,9-19,0 %, a oksidisanih viskoznih vlakana u opsegu 57,7-39,3 %. Očigledno je da je sposobnost zadržavanja vode oksidisanih viskoznih vlakana u svim slučajevima veća od sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana. Ovakav rezultat ukazuje na veću pristupačnost ili otvorenost strukture oksidisanih viskoznih vlakana za vodu u tečnom stanju u odnosu na strukturu oksidisanih pamučnih vlakana, što je i očekivano s obzirom na manju kristalnost i veću zapreminu pora i šupljina, odnosno unutrašnjih oblasti viskoznih vlakana u odnosu na pamučna vlakna.

Na osnovu iznetih razmatranja može se zaključiti da smanjenje sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih celuloznih vlakana nastaje usled uvođenja aldehidnih grupa i morfoloških promena putem perjodatne oksidacije. Oksidacija natrijum-perjodatom omogućava jedinstvene hemijske modifikacije selektivno u nesređenim oblastima i na površini kristalnih regiona, zajedno sa izvesnim morfološkim promenama celuloznih vlakana, u vodenoj sredini, pri umerenim uslovima.

6.2.4. Sorpcija joda oksidisanim pamučnim i viskoznim vlaknima

Proučavanje sorpcije joda, koja se odigrava samo u manje sređenim, amorfnim područjima celuloze, koristi se kao klasičan empirijski metod za određivanje sorpcionih svojstava. Vrednost sorpcije joda je mera pristupačnosti amorfnih oblasti celuloznih vlakana vodenim rastvorima, a njena inverzna vrednost proporcionalna je kristalnim oblastima vlakana i izražava se kao indeks kristalnosti [283, 287].

Mehanizam sorpcije joda razlikuje se od mehanizma sorpcije vode u celuloznim vlaknima. Tokom penetracije joda u amorfne oblasti vlakna javljaju se elektrostatičke interakcije između parcijalno pozitivno naelektrisanog vodonikovog atoma hidroksilne grupe celuloze i negativno naelektrisanog trijodid jona, koji nastaje spajanjem molekula joda i njegovog anjona. Za razliku od vode čijom sorpcijom nastaju multimolekulski slojevi, jod se vezuje isključivo u monomolekulskom sloju za dostupne hidroksilne grupe celuloze. Takođe, jod ne ispunjava u potpunosti slobodnu zapreminu šupljina u vlaknima kao što je to slučaj sa vodom [287]. Prema tome, rezultati određivanja vrednosti sorpcije joda mogu biti interpretirani sa aspekta monoslojne adsorpcije i na taj način iskorišćeni za izračunavanje površine unutrašnjih oblasti vlakana [288].

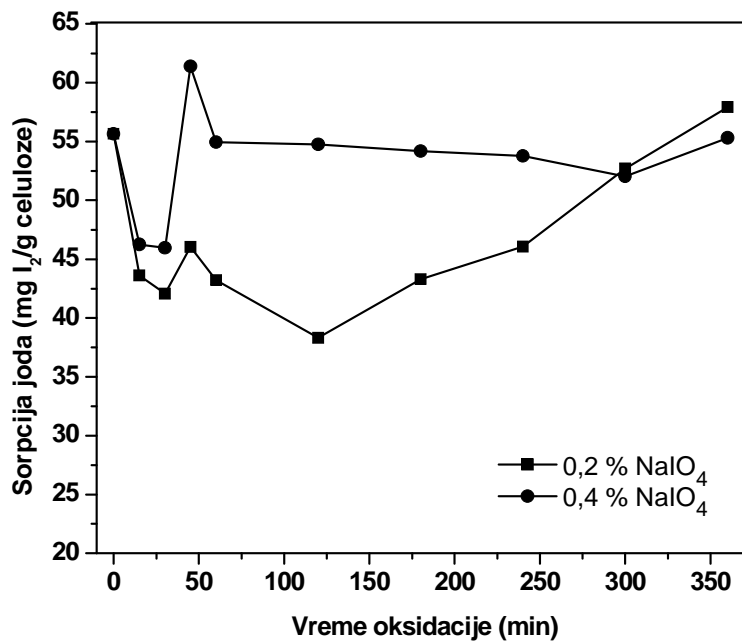
Vrednosti za sorpciju joda nemođifikovanih i oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana prikazane su na slici 6.12. Za polazna pamučna i viskozna vlakna vrednosti sorpcije joda iznose 55,6 i 291,1 mg I₂/g celuloze, respektivno. Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, različiti oksidacioni uslovi različito utiču na pristupačnost oksidisanih celuloznih vlakana ispitivanih u ovom radu.

Sorpcija joda vlaknima pamuka koja su modifikovana pomoću 0,4 % NaIO₄ najpre se smanjuje sa povećanjem vremena oksidacije do minimalne vrednosti od 46,0 mg/g, zatim se povećava do maksimalne vrednosti od 61,4 mg/g, dok sa produženjem vremena oksidacionog procesa preko 60 minuta poprima praktično konstantnu vrednost od 54,2 mg/g, što je 97,5 % od vrednosti dobijene za nemođifikovana pamučna vlakna. U slučaju uzoraka pamuka koji su oksidisani pomoću 0,2 % natrijum-perjodata, sorpcije joda se najpre smanjuje dostižući najnižu vrednost od 38,3 mg/g (smanjenje 31 %) dobijenu za uzorak koji je oksidisan tokom 120 minuta. Nakon ovog vremena, vrednosti za sorpciju joda se skoro linearno povećavaju približavajući se maksimalnoj vrednosti od 57,9 mg/g, koja je dobijena za uzorak oksidisan u toku 360 minuta.

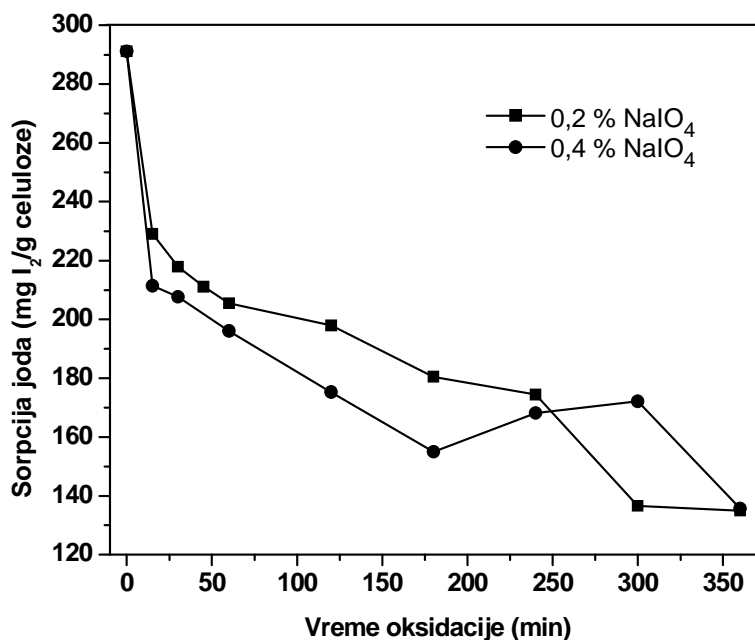
Svi uzorci oksidisanih viskoznih vlakana pokazuju manje vrednosti sorpcije joda u odnosu na nemođifikovana vlakna (291,1 mg/g). U toku prvih 15 minuta oksidacije, vrednost sorpcije joda naglo opada na 229,1 i 211,4 mg/g za uzorke oksidisane pomoću 0,2 % i 0,4 % natrijum-perjodata, respektivno. Sa produženjem vremena oksidacije do 360 minuta, sorpcija joda viskoznim vlaknima modifikovanim pomoću 0,2 % NaIO₄ se skoro linearno smanjuje, dostižući najnižu vrednost od 135,0 mg/g (smanjenje 53,6 %). U slučaju viskoznih vlakana koja su oksidisana u prisustvu perjodata veće koncentracije, vrednost sorpcije joda nastavlja da se smanjuje sa produženjem vremena reakcije do 180 minuta (155,0 mg/g), nakon čega se povećava, a zatim ponovo smanjuje približavajući se vrednosti dobijenoj za uzorak koji je tretiran sa 0,2 % perjodatom u toku 360 minuta.

Smanjenje sorpcije joda koje pokazuju oksidisana pamučna i viskozna vlakna posledica je uvođenja aldehidnih grupa tokom oksidativnog tretmana celuloze natrijum-perjodatom, kao i naknadnog procesa umrežavanja. Kao što je prethodno rečeno, trijodid anjon se inkorporira u vlakna preko specifičnih interakcija sa parcijalno pozitivnim vodonikom hidroksilne grupe celuloze. U slučaju većeg stepena kristalnosti, ove grupe su

uključene u kristalne oblasti i na taj način blokirane, odnosno nepristupačne. Prema tome, do smanjenja vrednosti sorpcije joda dolazi usled smanjenja broja hidroksilnih grupa ili usled povećanja stepena kristalnosti [287].



a)



b)

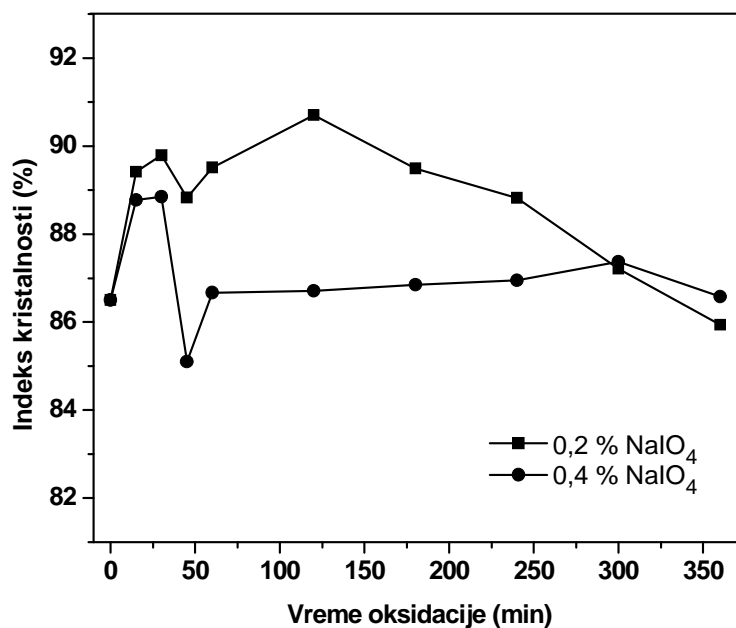
Slika 6.12 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i vrednosti sorpcije joda oksidisanih a) pamučnih i b) viskoznih vlakana

Prema eksperimentalnim rezultatima prikazanim na slici 6.12 a, može se zaključiti da pamučna vlakna oksidisana sa 0,4 % NaIO_4 sadrže veće količine specifičnih adsorpcionih centara koji su pristupačni za anjone joda u odnosu na vlakna modifikovana sa 0,2 % NaIO_4 . S obzirom da uzorci vlakana pamuka koji su modifikovani pomoću 0,4 % natrijum-perjodata imaju veći sadržaj aldehidnih grupa (tj. manju količinu hidroksilnih grupa) u poređenju sa vlaknima oksidisanim pomoću 0,2 % perjodata (slika 6.8 a), dobijene razlike u vrednostima sorpcije joda između vlakana pamuka oksidisanih sa 0,2 % i sa 0,4 % NaIO_4 posledica su promene stepena kristalnosti i umrežavanja.

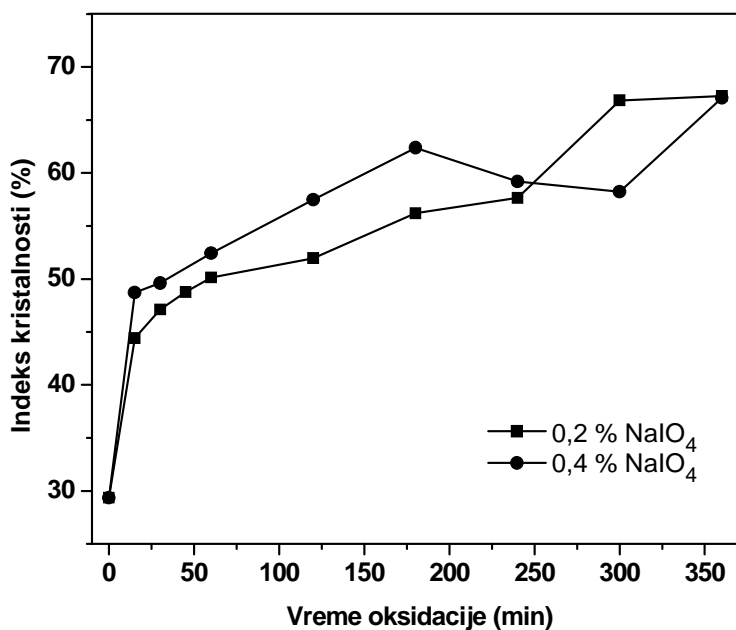
U poređenju sa oksidisanim pamučnim vlaknima, oksidisana viskozna vlakna pokazuju veći procenat smanjenja vrednosti sorpcije joda, što je u saglasnosti sa većim sadržajem aldehidnih grupa uvedenih oksidacijom u pristupačne oblasti viskoznih vlakana, odnosno manjom količinom preostalih slobodnih hidroksilnih grupa. Veza između sadržaja aldehidnih grupa i vrednosti sorpcije joda možda je najočiglednija na primeru uzorka viskozne pređe koji je oksidisan pomoću 0,4 % NaIO_4 u toku 300 minuta. Poređenjem vrednosti sadržaja aldehidnih grupa i sorpcije joda koje su dobijene za pomenuti uzorak oksidisane viskoze, može se videti odstupanje ovih vrednosti u odnosu na vrednosti dobijene za uzorke oksidisane pod sličnim uslovima, tj. naglo smanjenje količine aldehidnih grupa (slika 6.8 b) i povećanje vrednosti za sorpciju joda (slika 6.12 b).

Kako je vrednost sorpcije joda mera pristupačnosti amorfnih oblasti celuloznih vlakana, njena inverzna vrednost proporcionalna je kristalnim oblastima vlakana i izražava se kao indeks kristalnosti. Indeks kristalnosti oksidisanih celuloznih vlakana, izračunat na bazi vrednosti za sorpciju joda, predstavljen je na slici 6.13. Nemodifikovana viskozna vlakna imaju indeks kristalnosti 29,4 %, koji se tokom oksidacije lagano povećava i to za vlakna oksidisana sa 0,2 % NaIO_4 u opsegu 44,4-67,3 %, a za viskozna vlakna oksidisana pomoću 0,4 % NaIO_4 u opsegu 48,7-67,1 %. Tokom oksidacije pamučnih vlakana, indeks kristalnosti se povećava od 86,5 % (nemodifikovani pamuk) do 88,8 %, zatim opada do 85,1 %, a nakon 60 minuta oksidacije poprima skoro konstantnu vrednost od 86,9 %, za uzorke modifikovane pomoću 0,4 % NaIO_4 . U slučaju vlakana pamuka oksidisanih sa 0,2 % NaIO_4 , indeks kristalnosti se najpre povećava do najveće zabeležene vrednosti od 90,7 %, a zatim se lagano smanjuje do vrednosti od 85,9 % (360 min). Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da oksidacija natrijum-perjodatom, posebno pri većoj koncentraciji i dužem vremenu modifikovanja, narušava u izvesnom stepenu kristalnu strukturu celuloze, kao i reorganizacijom manje sređenih amorfnih frakcija oksidisanih uzoraka usled efekta umrežavanja.

Eksperimentalno dobijeni rezultati za sorpciju vlage, sposobnost zadržavanja vode i sorpciju joda pokazali su da uvedene aldehidne grupe imaju značajan uticaj na sorpciona svojstva i pristupačnost oksidisanih celuloznih vlakana. U poređenju sa nemodifikovanim vlaknima, oksidisani uzorci pamuka su ispoljili neznatno povećanje sorpcije vlage (do 9 %), smanjenje sposobnosti zadržavanja vode (do 38 %) i smanjenje vrednosti sorpcije joda (do 31 %). Na osnovu dobijenih rezultata, najveću osetljivost na promene u strukturi oksidisanih pamučnih vlakana pokazuje sposobnost zadržavanja vode, nešto manju sorpcija joda, a najmanju sorpcija vlage. U slučaju oksidisanih viskoznih vlakana, ispitivana sorpciona svojstva se prema osetljivosti na promene u strukturi oksidisanih vlakana mogu poredati, po opadajućim vrednostima, na sledeći način: sorpcija joda (smanjenje do 53,6 %), sposobnost zadržavanja vode (smanjenje do 32,4 %) i sorpcija vlage (smanjenje do 5 %, a zatim povećanje do 3,5 %). Očigledno je da najmanju osetljivost na promene u strukturi oksidisanih vlakana pamuka i viskoze pokazuje sorpcija vlage.



a)



b)

Slika 6.13 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i indeksa kristalnosti oksidanih a) pamučnih i b) viskoznih vlakana

6.2.5. Fizičko-mehanička svojstva oksidisane pamučne i viskozne pređe

Promene u molekulskoj i nadmolekulskoj strukturi celuloze, do kojih dolazi u toku procesa oksidacije natrijum-perjodatom, utiču na fizičko-mehaničke karakteristike oksidisane pređe, kao što su finoća i jačina, i značajne su sa stanovišta praktične primene. Fizičko-mehanička svojstva nemodifikovane i oksidisane pamučne i viskozne pređe određene su sa ciljem utvrđivanja korelacije između uslova hemijskog modifikovanja i rezultujućih svojstava ispitivanih uzoraka pređe.

Rezultati ispitivanja uticaja vremena delovanja i koncentracije oksidacionog sredstva NaIO_4 na promenu finoće pamučne i viskozne pređe prikazani su u tabeli 6.4. Finoća nemodifikovane pamučne i viskozne pređe iznosi 20,85 i 10,60 tex, respektivno, dok se kod svih uzoraka oksidisane celulozne pređe zapaža povećanje finoće, odnosno njihovo profinjavanje pri svim uslovima modifikovanja.

Tabela 6.4 Uticaj uslova oksidacije na promenu finoće pamučne i viskozne pređe

Uslovi oksidacije		Pamučna pređa		Viskozna pređa	
Oksidaciono sredstvo	Vreme oksidacije, min	Finoća, tex	Povećanje finoće, %	Finoća, tex	Povećanje finoće, %
0	0	20,85	0,00	10,60	0,00
0,2 % NaIO_4	15	20,30	2,64	10,30	2,83
	30	20,10	3,60	10,20	3,77
	45	20,45	1,92	10,30	2,83
	60	20,12	3,50	10,37	2,17
	120	19,75	5,28	10,50	0,94
	180	20,60	1,20	10,30	2,83
	240	20,60	1,20	10,10	4,72
	300	20,30	2,64	10,20	3,77
	360	20,40	2,16	10,50	0,94
0,4 % NaIO_4	15	20,45	1,92	10,10	4,72
	30	20,45	1,92	10,30	2,83
	45	20,25	2,88	10,40	1,89
	60	20,65	0,96	10,30	2,83
	120	20,50	1,68	10,20	3,77
	180	19,75	5,28	10,10	4,72
	240	20,30	2,64	10,00	5,66
	300	20,70	0,72	9,95	6,13
	360	20,80	0,24	10,10	4,72

Finoća oksidisanih pamučnih uzoraka menja se u opsegu od 20,80 tex do 19,75 tex (povećanje finoće od 0,24 % do 5,28 %), u zavisnosti od uslova modifikovanja. Nastale promene u finoći su najverovatnije posledica uklanjanja nečistoća prisutnih u vlaknima pamuka. Najveće povećanje finoće od 5,28 % zabeleženo je kod dva uzorka pamučne pređe, oksidisana sa 0,2 % NaIO_4 u toku 120 minuta i 0,4 % NaIO_4 tokom 180 minuta. Za modifikovane uzorke viskozne pređe vrednosti finoće kreću se u opsegu od 10,50 tex do 9,95 tex, odnosno povećanje finoće je u opsegu od 0,94 % do 6,13 %. Najveći stepen profinjavanja od 6,13 % postignut je kod uzorka viskoze koji je oksidisan sa 0,4 % NaIO_4 u toku 300 minuta. Za promene u finoći oksidisane pređe odgovorni su gubici mase modifikovanih uzoraka (tabela 6.3). Kod pamučne i viskozne pređe ispitivane u ovom radu nije registrovano skupljanje tokom oksidacije, za razliku od pamučne i lanene pređe kod kojih je oksidacija perjodatom dovela do njihovog skupljanja [188], ali je ona izvođena sa mnogo većom koncentracijom perjodata (10 i 20 puta) i pri mnogo dužim vremenima reakcije (do 120 h).

Uslovi hemijskog modifikovanja pamučne i viskozne pređe pomoću NaIO_4 imaju značajan uticaj na mehanička svojstva oksidisane pređe. Vrednosti prekidne jačine za nemodifikovane i uzorke pamučne i viskozne pređe oksidisane pri različitim radnim uslovima prikazane su u tabeli 6.5 i na slici 6.14. Iz prikazanih rezultata se može videti da se prekidna jačina modifikovanih uzoraka pamučne i viskozne pređe povećava u početnom periodu oksidacije. U slučaju pamučne pređe, do povećanja prekidne jačine dolazi kod uzoraka koji su oksidisani u periodu 0-120 minuta 0,2 % perjodatom, kao i kod uzoraka oksidisanih sa 0,4 % NaIO_4 tokom početnih 30 minuta. Najveće zabeleženo povećanje prekidne jačine pamučne pređe iznosi 19,87 %, za uzorak oksidisan pomoću 0,2 % NaIO_4 tokom 30 minuta, odnosno 5,98 %, za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO_4 u toku 15 minuta. U odnosu na nemodifikovanu viskoznu pređu, veće vrednosti prekidne jačine pokazali su uzorci viskozne pređe oksidisani sa 0,2 % NaIO_4 u toku 30 minuta (povećanje 7,39 %), 45, 60 i 180 minuta, kao i uzorci oksidisani sa 0,4 % NaIO_4 tokom 15 minuta (povećanje 10,23 %) i 30 minuta. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da do povećanja prekidne jačine dolazi uglavnom kod uzoraka koji su oksidisani pri blažim uslovima, tj. pri kraćim vremenima modifikovanja natrijum-perjodatom. U početnom periodu oksidacije moguće je da dominira efekat umrežavanja, odnosno međusobno povezivanje susednih celuloznih lanaca hemiacetalnim vezama, što za posledicu ima povećanje jačine pređe. Kod pomenutih celuloznih uzoraka, povećanju prekidne jačine doprinosi i povećanje njihove finoće (tabela 6.4).

Ostali uzorci oksidisane pamučne i viskozne pređe imaju manju prekidnu jačinu u odnosu na odgovarajuću nemodifikovanu pređu i to su uglavnom uzorci modifikovani pri dužim vremenima reakcije. Smanjenje njihove prekidne jačine može se objasniti oksidodestruktivnim procesima koji dovode do smanjenja stepena polimerizovanja i molekulske mase. Najveće smanjenje prekidne jačine utvrđeno je kod uzoraka pamučne i viskozne pređe koji su modifikovani pri najrigoroznijim uslovima (360 min, 0,4 % NaIO_4) i iznosi 51,13 % i 22,73 %, respektivno. Jedan od razloga za veći procenat smanjenja prekidne jačine oksidisane pamučne pređe u odnosu na oksidisanu viskoznu pređu jeste činjenica da je u ovom radu korišćena viskozna pređa u obliku filameta. Takođe, u oksidisana viskozna vlakna uveden je znatno veći sadržaj aldehidnih grupa što upućuje na izraženo umrežavanje kod viskoznih vlakana usled obrazovanja hemiacetalnih veza. Razlog može biti i izražena fibrilacija na površini pamučnih vlakana oksidisanih pri rigoroznijim uslovima (poglavlje 6.2.6, slika 6.18), pri čemu nastala kratka vlakna ne doprinose jačini, ali učestvuju u ukupnoj masi pređe.

Generalno, prekidna jačina oksidisane pamučne i viskozne pređe se ne menja značajno za vreme oksidacije u periodu 0-180 minuta. Kod uzoraka pamučne pređe koji su oksidisani pomoću 0,2 % i 0,4 % rastvora NaIO_4 tokom ovog perioda, očuvan je visok procenat jačine polazne pređe (96,93 % i 84,25 %, respektivno). U slučaju oksidisane viskozne pređe, kod uzoraka modifikovanih pomoću 0,2 % i 0,4 % NaIO_4 tokom 180 minuta zabeležene su

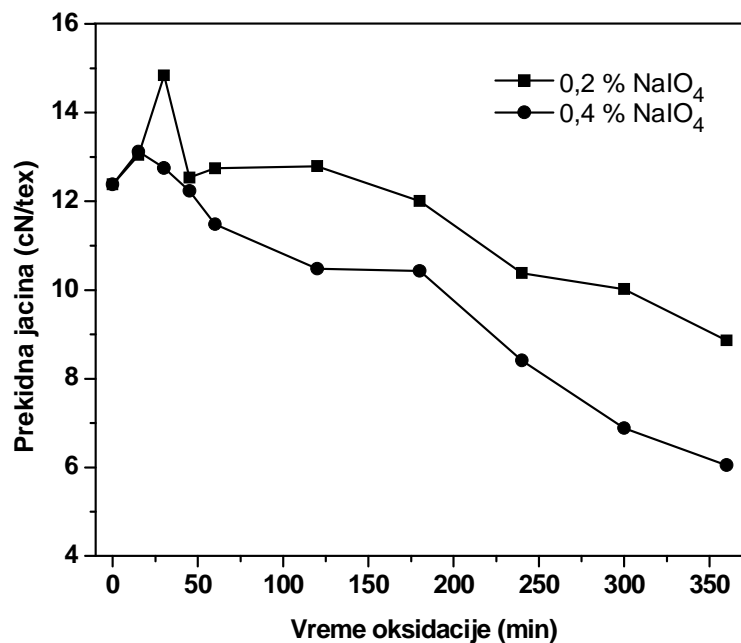
vrednosti prekidne jačine koje su iznosile, respektivno, 103,41 % i 87,50 % od vrednosti jačine nemodifikovane viskozne pređe. Međutim, sa produženjem vremena reakcije oksidacije iznad 180 minuta dolazi do značajnog smanjenja prekidne jačine oksidisane pamučne i viskozne pređe, koje je posebno izraženo kod uzoraka koji su oksidisani sa 0,4 % NaIO₄.

Tabela 6.5 Uticaj uslova oksidacije na prekidnu jačinu pamučne i viskozne pređe

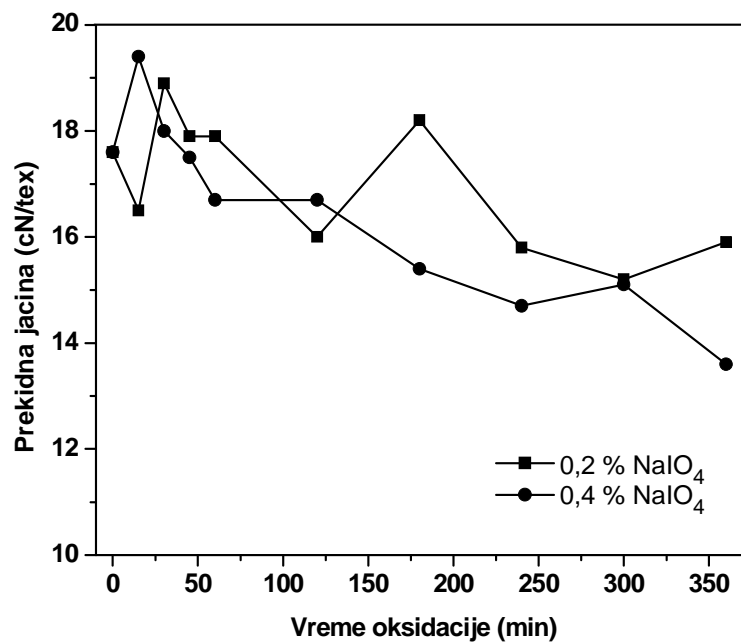
Uslovi oksidacije		Prekidna jačina, cN/tex	
Oksidaciono sredstvo	Vreme oksidacije, min	Pamučna pređa	Viskozna pređa
0	0	12,38	17,60
0,2 % NaIO ₄	15	13,04	16,50
	30	14,84	18,90
	45	12,53	17,90
	60	12,74	17,90
	120	12,79	16,00
	180	12,00	18,20
	240	10,38	15,80
	300	10,02	15,20
	360	8,86	15,90
0,4 % NaIO ₄	15	13,12	19,40
	30	12,75	18,00
	45	12,23	17,50
	60	11,48	16,70
	120	10,48	16,70
	180	10,43	15,40
	240	8,41	14,70
	300	6,88	15,10
	360	6,05	13,60

Dobijeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da oksidacija natrijum-perjodatom narušava u izvesnom stepenu kristalnu strukturu celuloze, pri čemu duže vreme modifikovanja oslabljuje mehanička svojstva oksidisane pamučne i viskozne pređe. Poznato je iz literature [182, 189, 190] da joni perjodata deluju na kristalne oblasti celuloze već pri niskim stepenima oksidacije, utičući na taj način na njena hemijska i fizička svojstva. Na prekidnu jačinu oksidisane pređe dodatni uticaj ima efekat umrežavanja. U toku oksidacije natrijum-perjodatom, moguće je da kod većine uzoraka dolaze istovremeno do izražaja oksido-destruktivni procesi, koji dovode do smanjenja stepena polimerizovanja i efekat umrežavanja, koji čini molekule kompaktnijim, tako da do povećanja ili smanjenja prekidne jačine oksidisane pređe dolazi u zavisnosti od toga koji je od pomenutih efekata dominantniji.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da pri blažim uslovima oksidacije, kada dolazi do povećanja prekidne jačine, efekat umrežavanja dominira u odnosu na uticaj oksido-destruktivnih procesa, dok su pri rigoroznijim uslovima modifikovanja oksido-destruktivni procesi dominantniji i uzrokuju smanjenje jačine oksidisane pređe.



a)



b)

Slika 6.14 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i prekidne jačine oksidisane a) pamučne i b) viskozne pređe

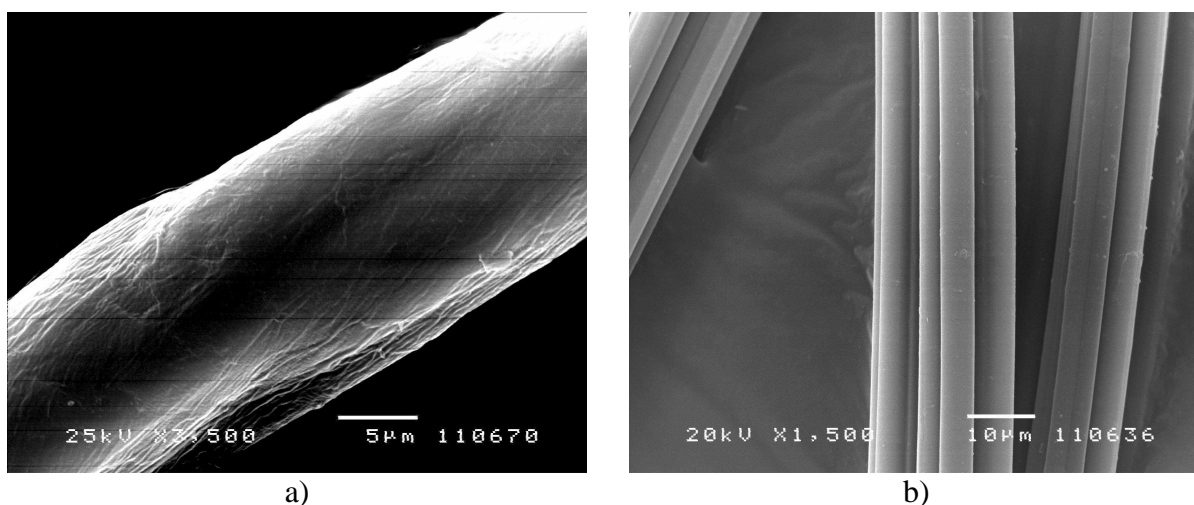
Za najbolje rezultate očuvane jačine poželjno je vršiti oksidaciju pamučne i viskozne pređe u vremenskom periodu 0-180 minuta, kako sa 0,2 %, tako i sa 0,4 % NaIO₄, s obzirom da promene prekidne jačine oksidisane pamučne i viskozne pređe, nastale pri navedenim uslovima, ne umanjuju značajno moguću upotrebnu vrednost dobijenih uzoraka pređe.

6.2.6. Morfološke karakteristike oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana

Struktura površine vlakana i oblik poprečnog preseka zavise od prirode vlakana, kao i uslova kojima se izlažu pri različitim tretmanima, što je veoma očigledno i na proučavanim uzorcima pamučnih i viskoznih vlakana. Rezultati uticaja hemijskog modifikovanja pamučnih i viskoznih vlakana reakcijama oksidacije natrijum-perjodatom na promene u izgledu površine vlakana, prikazani su na skenirajućim elektron-grafimima (slike 6.15-6.19). Takođe, razmatrane su i karakteristične promene u mikroporoznoj strukturi proučavanih vlakana i uzajamnoj vezi proučavanih svojstava i njihovih promena sa promenama u morfologiji i topografiji vlakana izazvanih hemijskim modifikovanjem.

Pod dejstvom hemijskih agenasa dolazi, u principu, do reakcija sa funkcionalnim grupama polimera, odnosno sa funkcionalnim grupama makromolekula. U razmatranom slučaju dejstva oksidacionog sredstva natrijum-perjodata na celulozu u pamučnim i viskoznim vlaknima dolazi do karakteristične topoheмиjske reakcije, a dobijeni krajnji produkt je oksiceluloza raznog stepena oksidacije. Opšte je poznata činjenica da kod topoheмиjskih reakcija na polimernim materijalima hemijska reakcija znatno prevazilazi brzinu difuzije reagensa. Usled toga, u slučaju dejstva oksidacionih sredstava, prvo dolazi do oksidacije jedne ili više hidroksilnih grupa na glukopiranoznom prstenu, a u određenim uslovima i do duboke destrukcije celuloze, koja se odvija u tankom reakcionom površinskom sloju pamučnih i viskoznih vlakana, što su između ostalog pokazali i rezultati elektron-mikroskopske analize i gubitka mase oksidisanih celuloznih vlakana, zatim povećanja finoće ili smanjenja prekidne jačine. Zona reakcije u vlaknima rasprostire se brzinom difuzije oksidacionog sredstva u masu vlakna. U slučaju oksidacije celuloze natrijum-perjodatom odigrava se selektivna oksidacija, ali i hemodestrukcija koja se odigrava u difuzionom režimu. Siguran pokazatelj reakcije oksidacije celuloze je količina novoformiranih aldehidnih grupa (slika 6.8).

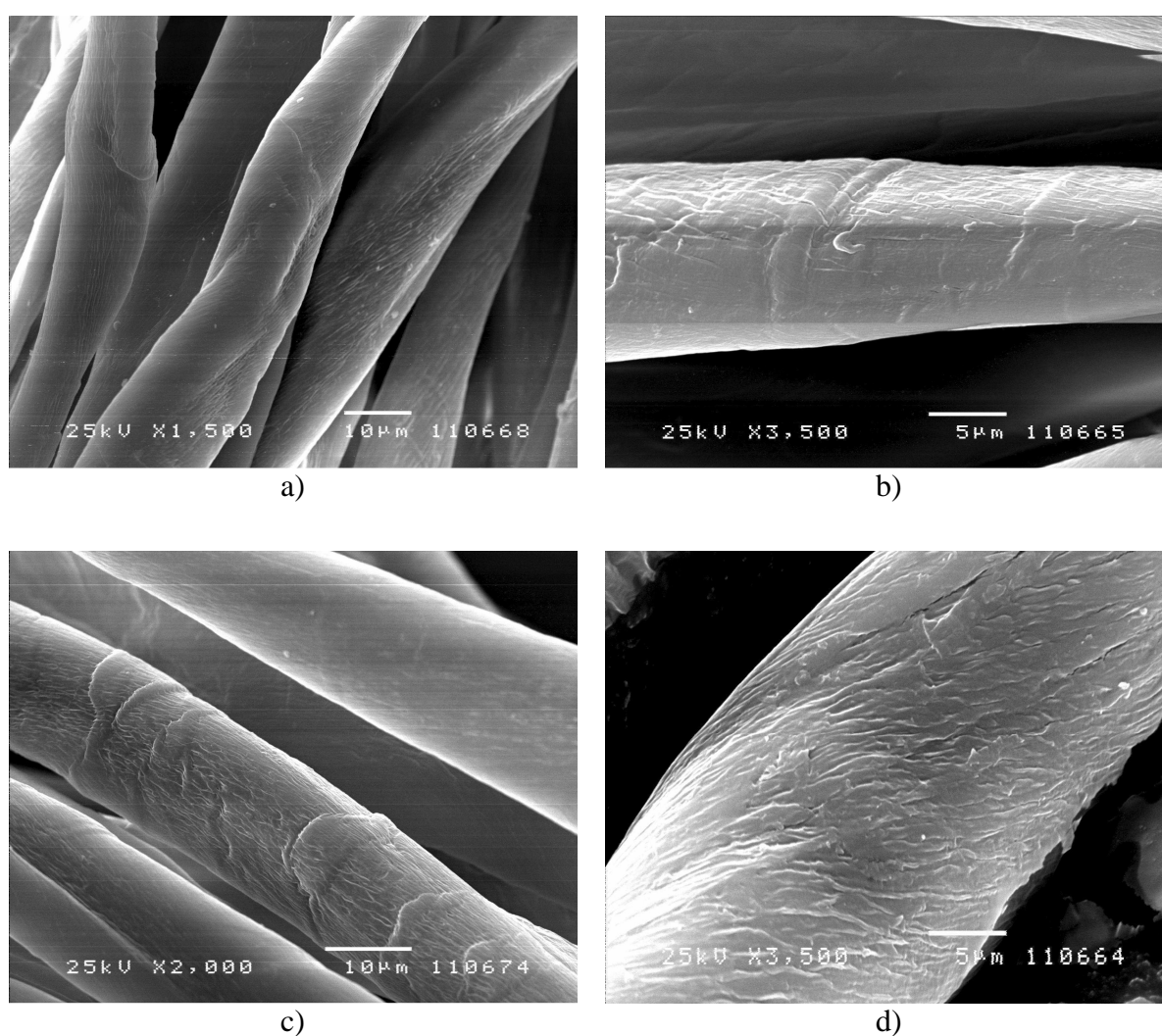
Postepenost reakcije oksidacije, koja se između ostalog karakteriše destrukcijom celuloze u tankom reakcionom površinskom sloju, može se veoma očigledno pokazati elektron-mikroskopskim snimcima površine uzoraka proučavanih vlakana. Na slikama 6.15-6.19 prikazane su promene u izgledu površine oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana.



Slika 6.15 SEM fotografije vlakana a) pamuka i b) viskoze oksidisanih pomoću 0,4 % NaIO_4 tokom 15 min

Kao što se može videti na SEM snimcima pamučnih i viskoznih vlakana koja su modifikovana pomoću 0,4 % NaIO_4 u toku 15 min (slika 6.15), blagi uslovi oksidacije praktično ne menjaju izgled površine ispitivanih vlakana, tako da je njihova površina skoro identična površini nemodifikovanih vlakana. Međutim, reljef površine pamučnih i viskoznih vlakana znatno se menja pri rigoroznijim uslovima hemijskog modifikovanja reakcijama oksidacije natrijum-perjodatom.

Na slici 6.16 primetne su razlike u intenzitetu delovanja natrijum-perjodata na izgled površine pamučnih vlakana. Očigledno je napadnut kutikularni sloj vlakana, a pri višoj koncentraciji natrijum-perjodata od 0,4 % izraženije je dublje prodiranje reagensa, praćeno pojavom većih pukotina u vlaknu i povećanjem njihove mikroporoznosti. Slično je ponašanje i viskoznih vlakana, samo je razlika u intenzitetu promena u reljefu površine manje izražena, kao što se može videti na slici 6.17.



Slika 6.16 Oksidisana vlakna pamuka

a) 0,2 % NaIO_4 , 180 min

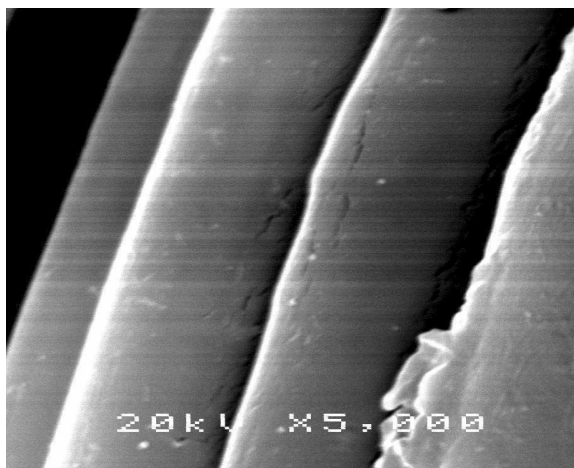
b) 0,2 % NaIO_4 , 180 min

c) 0,4 % NaIO_4 , 180 min

d) 0,4 % NaIO_4 , 180 min

Promene u reljefu površine oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana saglasne su i sa njihovim gubitkom mase, promenom finoće, sorpcionih svojstava i promenom njihovih prekidnih karakteristika.

Sa produženjem vremena modifikovanja do 360 minuta, na površini pamučnih vlakana dolazi do izražajnih promena u vidu naprslina, do izražene fibrilacije i prekida vlakana usled duboke hemodestrukcije (slika 6.18). Takođe se može jasno videti povećana brazdavost (slika 6.18 d), što dovodi do povećanja mikroporoznosti vlakana, odnosno veće otvorenosti ili pristupačnosti za vodu i hemijske agense. Slični efekti, pod istim uslovima oksidacije, zapaženi su i kod viskoznih vlakana (slika 6.19).



Slika 6.19 Oksidisana viskoza (0,4 % NaIO₄, 360 min)

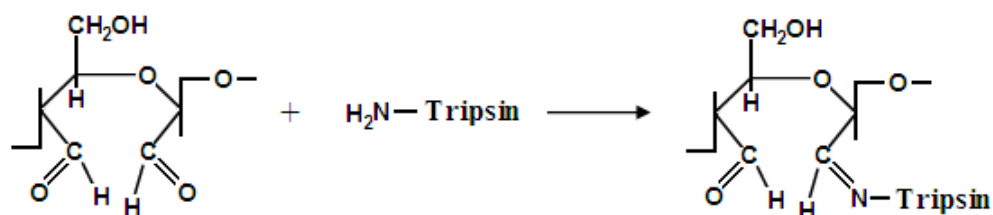
Pored karakterističnih promena u strukturi površine modifikovanih celuloznih vlakana, drastičniji uslovi oksidacije doveli su posebno do izraženijeg pada prekidne jačine pamučne i viskozne pređe za 51,13 % i 22,73 %, respektivno, u odnosu na odgovarajuću nemodifikovanu pređu. Smanjenju prekidne jačine pamučne pređe oksidisane pri rigoroznijim uslovima naročito doprinosi izražena fibrilacija na površini vlakana, kao i vlakna kod kojih je došlo do delimičnog ili potpunog prekida kao posledica delovanja oksidacionog sredstva.

SEM snimci oksidisanih celuloznih vlakana su potvrdili da ne dolazi do skupljanja vlakana pamuka i viskoze usled oksidacije natrijum-perjodatom. Takođe, elektron-mikroskopska analiza je pokazala da je struktura oksidisanih vlakana očuvana u visokom stepenu, što je u saglasnosti sa ispitivanim svojstvima vlakana, odnosno da natrijum-perjodat dovodi do minimalne degradacije mehaničkih i morfoloških svojstava polazne celuloze. Veća oštećenja na površini pamučnih i viskoznih vlakana nastaju modifikovanjem pri najrigoroznijim uslovima i mogu se povezati sa velikim padom prekidne jačine pređe oksidisane u dužem vremenskom periodu.

6.3. Karakteristike pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom

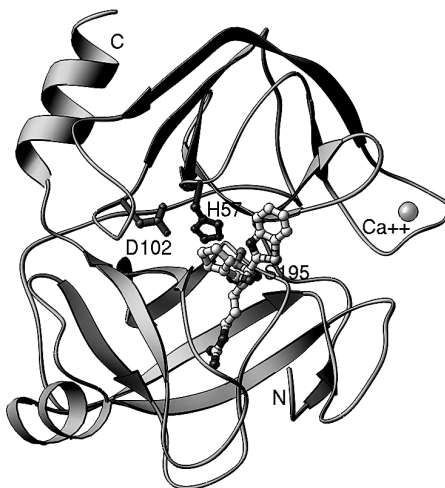
6.3.1. Količina proteina i aktivnost tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi

Pamučna i viskozna pređa, prethodno aktivirane perjodatnim tretmanom, korišćene su za imobilizaciju tripsina iz pankreasa govečeta. U ovom procesu, N-terminalna α -amino grupa, kao i ϵ -amino grupe ostataka lizina u tripsinu reaguju sa aldehidnim grupama oksidisanih celuloznih vlakana uz obrazovanje odgovarajućih Schiff-ovih baza, prema šemi prikazanoj na slici 6.20. Tripsin sadrži 14 ostataka lizina, a njegov N-terminalni aminokiselinski ostatak je izoleucin [289]. Ni jedan od ovih aminokiselinskih ostataka ne učestvuje u aktivnom centru enzima, koji je klasična Asp102–His57–Ser195 trijada serinskih proteaza sisara [290] (slika 6.21).



Slika 6.20 Šema kovalentne imobilizacije tripsina na perjodatom oksidisanjoj celulozi

Poznato je da molekuli enzima koji se sastoje od jednog polipeptidnog lanca, kao što je tripsin, obično usvajaju konformaciju blisku globuli, pri čemu se segmenti lanca koji formiraju katalitički aktivni centar približavaju jedan drugom. U takvoj konformaciji, hidrofobni segmenti makromolekula su uronjeni unutar globule i formiraju jezgro stabilizovano pomoću hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza. Za razliku od njih, hidrofilni bočni lanci, kao što su npr. ostaci lizina, teže da zauzmu položaje na spoljašnjoj površini.

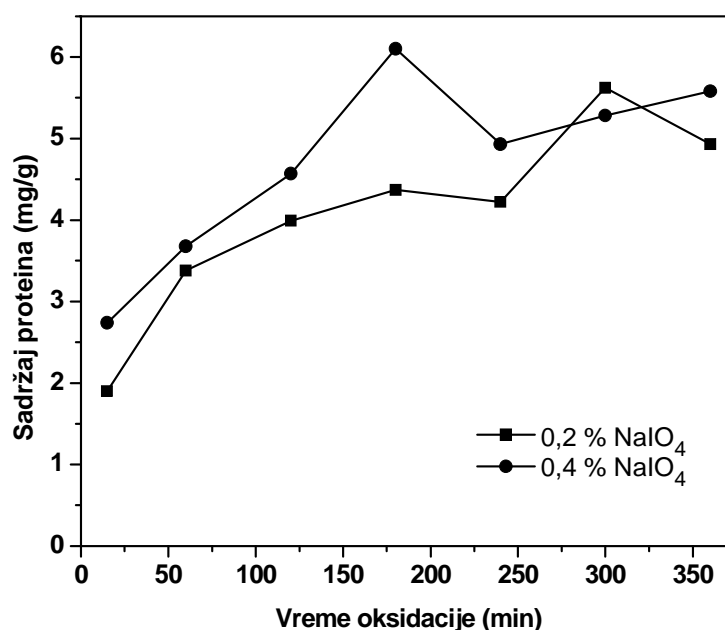


Slika 6.21 Model tripsina sa prikazanim aktivnim centrom (Asp102–His57–Ser195) [290]

Zahvaljujući velikom broju ostataka lizina i njihovoj lociranosti na površini molekula tripsina, postoji mogućnost obrazovanja većeg broja veza, tzv. "multipoint attachment" (MPA), između jednog molekula oksiceluloze i jednog polipeptidnog lanca enzima [244, 245].

Razlike u strukturi i svojstvima prirodnih (pamuk) i hemijskih (viskoza) celuloznih vlakana, koja su ispitivana u okviru ove disertacije, uslovile su primenu različitih procedura imobilizacije tripsina na oksidisanim vlaknima. Zbog toga su rezultati direktne i indirektno imobilizacije tripsina na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi, respektivno, zasebno prikazani i diskutovani. Dobijena celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom okarakterisana su određivanjem količine vezanih proteina, katalitičke aktivnosti imobilisanog enzima i njegove stabilnosti pri lagerovanju u dužem vremenskom periodu.

Količina tripsina imobilisanog na celuloznim vlaknima različitog stepena oksidacije određena je iz bilansa mase, kao razlika između količine proteina u rastvoru enzima pre imobilizacije i sume proteina u istom rastvoru posle imobilizacije i u svim vodama od ispiranja. Slika 6.22 prikazuje uticaj uslova perjodatne oksidacije na količinu tripsina kovalentno imobilisanog na modifikovanim vlaknima pamuka. Kao što se može videti iz dobijenih rezultata, količina vezanog tripsina se povećava sa povećanjem koncentracije natrijum-perjodata i vremena oksidacije i dostiže maksimalnu vrednost od 6,1 mg/g suve pamučne pređe za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ tokom 180 minuta. Dobijena vrednost je istog reda veličine kao i vrednosti dobijene za tripsin i druge proteaze kovalentno imobilisane na drugim materijalima, kao što je porozni cirkonijum [291] i hitozan u obliku filma [292] i karakteristična je za nosače koji imaju slabo razvijenu specifičnu površinu. Generalno, veće vrednosti sadržaja proteina zabeležene su kod uzoraka pamučne pređe koji su oksidisani sa 0,4 % NaIO₄ u odnosu na uzorke modifikovane pomoću 0,2 % NaIO₄ i ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima određivanja sadržaja aldehidnih grupa. Prema tome, sadržaj aldehidnih grupa u oksicelulozi je pokazatelj stepena oksidacije celuloznih vlakana modifikovanih natrijum-perjodatom, ali se odražava i na količinu kovalentno vezanih molekula tripsina.



Slika 6.22 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i količine tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj pređi

Kod uzoraka modifikovanih natrijum-perjodatom duže od 180 minuta, za obe koncentracije oksidacionog agensa, određene su manje količine vezanih proteina u odnosu na maksimalnu zabeleženu vrednost od 6,1 mg/g pređe i pored toga što su u tim slučajevima dobijena vlakna sa većim sadržajem aldehidnih grupa. Ovaj fenomen može se objasniti razmatranjem razlike u centrima odvijanja reakcije oksidacije i formiranja Schiff-ove baze u celulozi [207]. Naime, tokom oksidacije mali perjodadni jon može da prodre u unutrašnjost vlakna i da oksiduje jedinice glukoze u unutrašnjosti, kao i na površini vlakna. Sa druge strane, tripsin je veliki molekul koji ne može da dospe do aldehidnih grupa obrazovanih u unutrašnjosti vlakna, tako da do njegovog vezivanja dolazi samo na površini vlakna. Pored toga, molekuli tripsina u velikim količinama pokrivaju lanac dialdehid celuloze kao kontinualni monomolekulski sloj i zaklanjaju značajan deo aldehidnih grupa. Navedeni razlozi utiču na ograničenje količine vezanog tripsina bez obzira na slobodne, za reakciju sposobne aldehidne grupe.

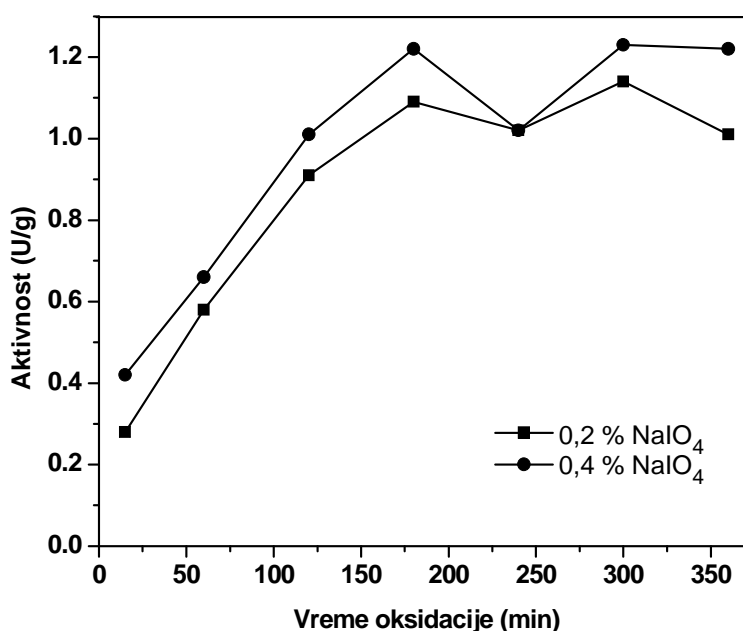
Na količinu vezanog proteina i performanse imobilisanog enzima mnogo više utiče dostupna površina nosača od njegove ukupne površine, pri čemu ona veoma zavisi od veličine pora. Veličina pora treba da bude dovoljno velika kako bi omogućila ulazak enzima, slobodu kretanja enzima radi promene konformacije i kako bi ublažila difuziona ograničenja. Za efikasnu imobilizaciju, pore bi morale biti 3-9 puta veće od veličine enzima [231]. Kako prečnik pora u suvim biljnim vlaknima iznosi 0,5-2 nm, koji se bubrenjem povećava na 3-7 nm [2], ne postoje uslovi za efikasno uključivanje tripsina (3,8 nm [293]) u mikroporoznu strukturu vlakna. Ukoliko dolazi do vezivanja enzima u unutrašnjosti vlakna, onda se to verovatno dešava u pukotinama koje nastaju pri rigoroznim uslovima oksidacije (slike 6.18 i 6.29). Prema tome, oblast dostupna za imobilizaciju tripsina je uglavnom spoljašnja površina vlakna. Tripsin lociran na površini vlakna, kao aktivna komponenta, ima veći kontakt sa okruženjem, čime dolaze do izražaja njegova pozitivna svojstva, kao što su nekrolitička, anti-inflamatorna, anti-toksična i drenažna svojstva.

Poznato je da proces imobilizacije velikih količina proteina na nosaču dovodi do sternih smetnji koje mogu da ometaju hemijske reakcije. Veliki molekuli proteina, kao što je tripsin koji ima molekulsku masu oko 24000 Da, suzbijaju i odlažu, tj. otežavaju pozicioniranje funkcionalnih grupa proteina i nosača u neposrednoj blizini i time njihove interakcije, formiranje Schiff-ve baze. Ovo ukazuje na potrebu za velikim viškom aldehidnih grupa u odnosu na amino grupe tokom hemijskog vezivanja velike količine proteina. Prema tome, penetracija, odnosno vezivanje velikih molekula proteina kao što je tripsin za oksidisani nosač i sazrevanje, tj. imobilizacija i stabilizacija enzima je spor proces koji zahteva respektivno 8-16 sati. Tokom ovog vremena procesa sazrevanja, većina molekula proteina je neravnomerno, čak nasumično kovalentno vezana za oksidisani tekstilni materijal, sa maksimalnom koncentracijom u gornjem sloju i minimalnom ispod njega [294].

Odmah nakon procesa imobilizacije određena je aktivnost pamučnih vlakana sa različitim količinama vezanog enzima. Aktivnost tripsina koji je imobilisan na pamučnim vlaknima oksidisanim pri različitim uslovima prikazana je na slici 6.23. Prema dobijenim rezultatima, aktivnost imobilisanog tripsina se povećava sa trajanjem oksidacije do 180 minuta, a zatim poprima skoro konstantnu vrednost sa produžetkom vremena modifikovanja. Kod svih uzoraka oksidisanih sa 0,4 % NaIO₄ zabeležene su veće vrednosti aktivnosti u odnosu na uzorke oksidisane sa 0,2 % NaIO₄. Rezultati dobijeni za aktivnost imobilisanog tripsina u saglasnosti su sa rezultatima određivanja sadržaja proteina. Maksimalna imobilisana aktivnost određena je kod uzorka pamuka oksidisanog sa 0,4 % rastvorom natrijum-perjodata u toku 180 minuta i iznosi 1,22 U/g suve pamučne pređe, što je 14 % od ukupne početne aktivnosti tripsina u rastvoru pre imobilizacije. Takođe, treba naglasiti da su inkubacijom enzima sa neoksidisanim vlaknima pamuka dobijena vlakna sa zanemarljivo malom imobilisanom aktivnošću.

Specifična aktivnost tripsina imobilisanog na uzorcima pamučne pređe koji su oksidisani duže od 60 minuta kreće se u opsegu od 46,03 % do 57,41 %, ili prosečno 50 % od vrednosti specifične aktivnosti određene za enzim u rastvoru (0,4345 U/mg). Sličan rezultat dobijen je za tripsin imobilisan na hitozanu preko glutaraldehida [295], dok je specifična aktivnost tripsina kovalentno imobilisanog na perjodatom aktiviranom celuloznom egzopolisaharidu [242], direktno i preko spejsera, iznosila, respektivno, 37,20 % i 9,16 % od vrednosti specifične aktivnosti određene za slobodni enzim.

Proces kovalentne imobilizacije enzima na nosaču obično je praćen izvesnim gubitkom aktivnosti. Smanjenje specifične aktivnosti posledica je procesa denaturacije (unfolding-a) enzima, kao i vezivanja enzima za nosač preko većeg broja veza. MPA način vezivanja može da smanji fleksibilnost imobilisanog enzima i pojača rigidnost enzima [296], što može da utiče na sternu pristupačnost supstrata i kao rezultat da niže vrednosti aktivnosti. Pored navedenog, treba imati u vidu da je aktivnost imobilisanog enzima određivana pri pH 7,0 i 37 °C, što su skoro optimalne vrednosti pH i temperature slobodnog tripsina. Pri ovim uslovima, katalitička moć imobilisanog enzima je manja od maksimalne, s obzirom da proces imobilizacije obično dovodi do pomeranja optimalnih vrednosti pH i temperature tripsina ka višim vrednostima [247].



Slika 6.23 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO₄ i aktivnosti tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj pređi

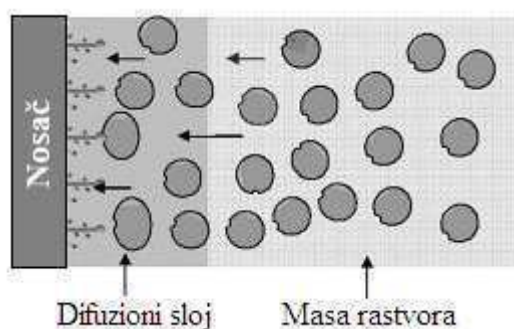
Kao što je prethodno pokazano, perjodatnom oksidacijom uvedene su znatno veće količine aldehidnih grupa u uzorke viskozne pređe u poređenju sa uzorcima pamučne pređe (slika 6.8), tako da je, u skladu sa tim rezultatima, očekivan i veći sadržaj proteina i veća aktivnost tripsina imobilisanog na viskoznoj pređi. Međutim, primenom iste procedure imobilizacije, oksidisana viskozna vlakna ne samo da su vezala manju količinu enzima u poređenju sa odgovarajućim pamučnim vlaknima (tabela 6.6), već su ispoljila i izuzetno nisku imobilisanu aktivnost. Na primer, uzorak viskozne pređe oksidisan sa 0,2 % NaIO₄ u toku 60 minuta pokazao je aktivnost od samo 0,0852 U/g pređe, odnosno 7 puta manju aktivnost od uzorka pamučne pređe koji je oksidisan pod istim uslovima.

Tabela 6.6 Količina proteina imobilisanog na uzorcima oksidisanе pamučne i viskozne pređe pri istim uslovima imobilizacije

Uslovi oksidacije		0,2% NaIO ₄ , 1 h	0,2% NaIO ₄ , 2 h	0,2% NaIO ₄ , 3 h	0,4% NaIO ₄ , 3 h
Sadržaj proteina (mg/g)	Pamuk	3,38	3,99	4,37	6,10
	Viskoza	1,66	2,87	3,49	4,39

Manji sadržaj proteina na viskoznoj pređi može se objasniti rastresitijom strukturom viskoznih vlakana, lakšim prodiranjem perjodatnih jona u amorfna, a zatim i kristalna područja celuloze i prisustvom velikog dela aldehydних grupa u unutrašnjim, za molekule tripsina nedostupnim delovima vlakna. Osim toga, moguće je da je jedan deo aldehydних grupa u viskoznim vlaknima učestvovao u obrazovanju hemiacetalnih ili hemialdaldnih veza. Takođe, zbog velikog sadržaja aldehydних grupa uvedenih oksidacijom u viskozna vlakna, a time i velike gustine vezujućih centara, verovatno je broj veza formiranih između tripsina i viskoze veći nego u slučaju vezivanja sa pamukom, odnosno, veći broj aldehydnih grupa oksidisanе viskoze je učestvovao u vezivanju jednog molekula enzima. Može se očekivati da molekuli tripsina, koji difuzijom iz mase rastvora dospevaju do pora i pukotina, koje su nastale usled oksidacije, reaguju primarno sa spoljašnjim aldehydnim grupama, jednostavno zbog toga što su to grupe na koje enzim prvo nailazi, čineći ostale aldehydne grupe u unutrašnjosti vlakna manje pristupačnim za vezivanje. Na ovaj način može doći do delimične ili potpune blokade otvora pora i pukotina, što bi se odrazilo na ukupnu količinu vezanih molekula tripsina.

Imobilizacija enzima se obično posmatra kao proces koji omogućava molekulima enzima da dođu u neposredan kontakt sa površinom nosača (slika 6.24). Blizak kontakt i interakcije koje uslede neizbežno narušavaju sile koje održavaju strukturu nativnih enzima, dovodeći do modifikacije strukture i funkcije enzima u zavisnosti od hemijske prirode nosača i reakcione sredine. Ma kakva da je nova konformacija molekula enzima na čvrstoj površini, enzim obično usvaja konformaciju koja je stabilizovana interakcijom između enzima i nosača. Ukoliko je novoindukovana konformacija slična strukturi nativnog enzima, imobilisani enzim može biti stabilizovan. U suprotnom, dolazi do inaktivacije enzima [231].

**Slika 6.24** Promena konformacije enzima sa približavanjem nosaču – uticaj hemijske prirode nosača na molekule enzima [231]

Pri imobilizaciji enzima na čvrstim supstratima, i metod imobilizacije i tip površine mogu imati veliki uticaj na rezultujuću biološku aktivnost vezanih enzima. Metod imobilizacije može uticati na aktivnost enzima preko hemijske modifikacije aminokiselina

koje su uključene u vezivanje supstrata, posebno kada je centar vezivanja mnogo bliži aktivnom centru enzima [245]. S obzirom da je vezivanje molekula tripsina za uzorke oksidisane viskoze vršeno na isti način kao u slučaju pamučnih vlakana, metod imobilizacije se može isključiti kao faktor odgovoran za dobijeni rezultat.

Hidrofobnost površine, naelektrisanje i prisustvo hemikalija na površini nosača takođe mogu uticati na aktivnost, stabilnost i orijentaciju enzima na površini. Tako, vezivanje tripsina direktno za površinu poliestra daje relativno nisku aktivnost imobilisanog enzima, što se može pripisati direktnom kontaktu enzima sa manje polarnom površinom poliestra [230]. Generalno, nosači koji sadrže hidrofobne grupe mogu denaturisati proteine, npr. analogno denaturaciji hidrofobnim rastvaračima. Pozitivno ili negativno naelektrisanje na hidrofilnom nosaču može ili smanjiti ili povećati stabilnost imobilisanog enzima kao rezultat dejstva elektrostatičkih interakcija između vezanog proteina i nosača [297].

S obzirom da regenerisana celulozna vlakna mogu da sadrže na površini razna ulja, voskove, antistatičke agense, lubrikante i druge aditive, ispitano je njihovo eventualno inhibitorno dejstvo na aktivnost tripsina. U sveže pripremljeni rastvor enzima za imobilizaciju potopljena je nemodifikovana viskozna pređa, kako bi se izbeglo smanjenje aktivnosti tripsina u rastvoru usled imobilizacije, a zatim je u određenim vremenskim intervalima merena zaostala aktivnost u alikvotima uzimanim iz reakcione smeše (tabela 6.7). Da bi se konstatovalo postojanje inhibicije, smanjenje aktivnosti enzima bi trebalo da bude znatno veće od zabeleženih vrednosti. Dobijeni rezultati su skoro identični sa rezultatima ispitivanja stabilnosti tripsina u rastvoru, što se može videti ako se uporede vrednosti sačuvane aktivnosti enzima nakon 5 dana lagerovanja na 4 °C (tabela 6.7 i slike 6.31 i 6.32) i ne ukazuju na postojanje inhibicije.

Tabela 6.7 Rezultati ispitivanja uticaja sastojaka prisutnih na površini viskozne pređe na aktivnost tripsina

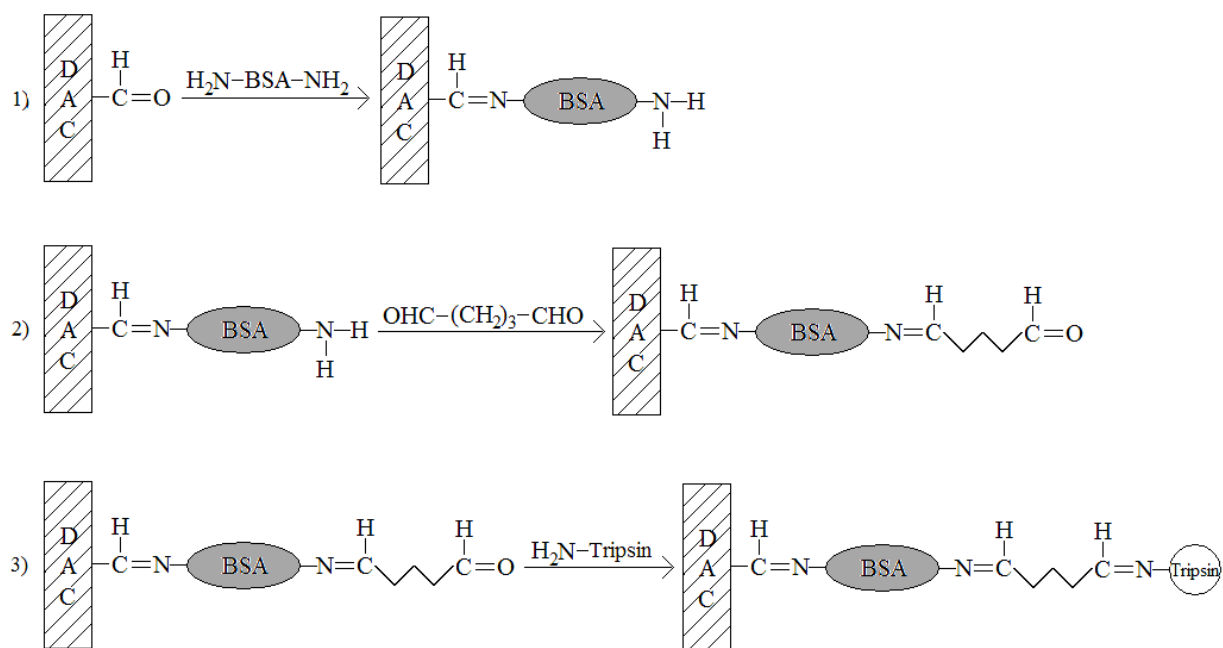
Vreme ispitivanja	0 min	5 min	10 min	20 min	30 min	60 min	5 dana
Sačuvana aktivnost*, %	100	98,58	98,52	96,54	96,30	92,35	72,10

* Aktivnost rastvora tripsina u kontaktu sa nemodifikovanom viskoznom pređom u odnosu na aktivnost sveže pripremljenog rastvora tripsina.

Aktivnost imobilisanih enzima obično je obrnuto proporcionalna broju veza ostvarenih sa nosačem [231], tako da sa većim brojem veza konformacija molekula enzima postaje rigidnija i nepristupačna za supstrat. Najverovatnije objašnjenje za dobijenu izuzetno nisku imobilisanu aktivnost jeste da je veći deo molekula tripsina pri vezivanju prešao u neaktivni (denaturisani) oblik, pre svega zbog prevelikog broja MPA veza. Tome mogu doprineti i (inertne) grupe koje potiču od hemikalija prisutnih na površini viskoze, uvedene tokom završne obrade. Ove grupe nemaju direktnu ulogu u vezivanju, tj. ne formiraju bilo kakve kovalentne veze sa enzimom, ali mogu da ispolje veliki uticaj na performanse imobilisanog enzima, kao što su sačuvana aktivnost, efikasnost vezivanja, stabilnost i selektivnost [231]. Pri razmatranju smanjene aktivnosti tripsina imobilisanog na oksidisanjoj viskozi treba uzeti u obzir i mogućnost njegovog uključivanja u mikroporoznu strukturu ovih vlakana, s obzirom da dimenzije njihovih pora iznose 5-25 nm, kao i usled prisustva pukotina nastalih tokom oksidacije vlakana. Dalje vezivanje molekula tripsina za aldehidne grupe na površini i u blizini otvora pora i pukotina dovelo bi do blokiranja enzima u njihovoj unutrašnjosti u smislu nepristupačnosti za supstrat.

S obzirom na dobijene rezultate direktne imobilizacije tripsina na oksidisanjoj viskoznoj pređi, pristupilo se indirektnom kovalentnom vezivanju enzima, uvođenjem proteina BSA u ulogu spejsera i glutaraldehida u ulogu linkera između oksidisanje viskozne pređe i polipeptidnog lanca enzima. Prisustvo spejsera može da utiče na promenu mikrookruženja, orijentacije i konformacione fleksibilnosti enzima i na taj način na njegovu katalitičku aktivnost. Zahvaljujući svojoj visokoj stabilnosti i ne ispoljavanju uticaja u mnogim biohemijskim reakcijama, BSA ima ulogu stabilizujućeg agensa u enzimskim reakcijama. Glutaraldehyd se veoma često koristi u procesima imobilizacije enzima zbog svoje visoke reaktivnosti prema proteinima, kao i relativno blagih uslova pod kojima reaguje. Glutaraldehyd koji se koristi za imobilizaciju zapravo predstavlja kompleksnu smešu jedinjenja sa različitim molekulskim masama [298].

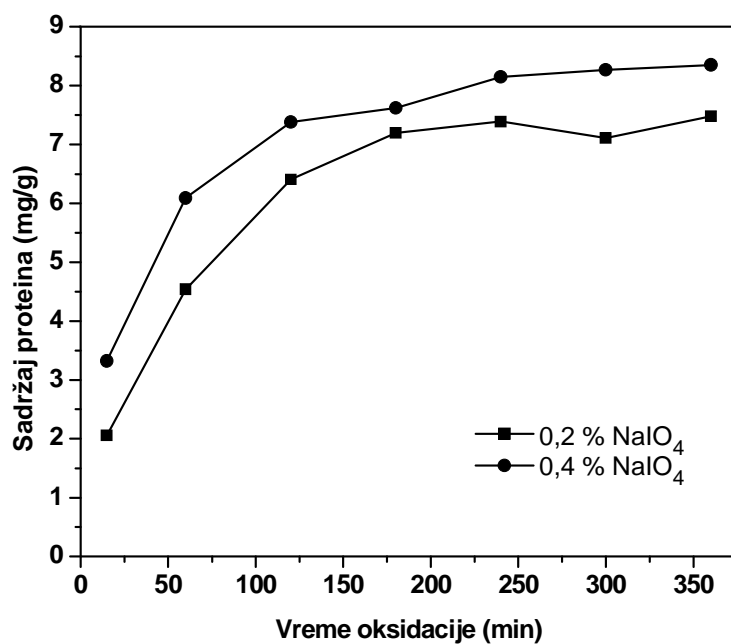
Indirektna procedura imobilizacije tripsina na oksidisanjoj viskoznoj pređi obuhvatila je nekoliko koraka, koji su prikazani šemom na slici 6.25. U prvom koraku, aldehidne grupe oksidisanih viskoznih vlakana reaguju sa amino grupama albumina (BSA) obrazujući Schiff-ove baze. Viskozna pređa sa imobilisanim albuminom se u drugom koraku aktivira glutaraldehydom, a u narednom koristi za kovalentno vezivanje molekula tripsina. Rezultati određivanja sadržaja proteina i aktivnosti tripsina imobilisanog na uzorcima oksidisanje viskozne pređe, aktiviranim na opisani način, prikazani su na slici 6.26.



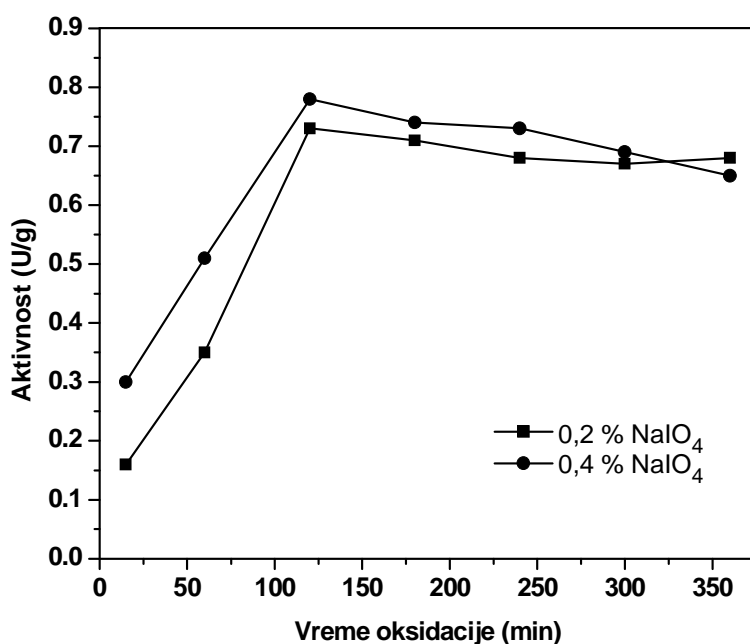
Slika 6.25 Redosled hemijskih reakcija pri indirektnoj proceduri kovalentne imobilizacije tripsina na oksidisanjoj viskoznoj pređi: 1) reakcija proteina BSA sa aldehidnim grupama dialdehid celuloze (DAC), 2) uvođenje glutaraldehyda, 3) vezivanje tripsina obrazovanjem Schiff-ove baze

Kao što se može videti iz eksperimentalno dobijenih rezultata, kod uzoraka viskozne pređe koji su oksidisani tokom početnih 120 minuta reakcije dolazi do porasta sadržaja proteina (slika 6.26 a) koji je praćen povećanjem imobilisane aktivnosti tripsina (slika 6.26 b). Međutim, produžavanjem vremena modifikovanja iznad 120 minuta, kod uzoraka oksidisanih kako sa 0,2 %, tako i sa 0,4 % rastvorom $NaIO_4$, količina imobilisanog proteina nastavlja da se blago povećava, dok katalitička aktivnost počinje da se smanjuje. Kod svih uzoraka

oksidisanih sa 0,4 % NaIO_4 zabeležene su veće vrednosti sadržaja proteina i aktivnosti u odnosu na uzorke oksidisane sa 0,2 % NaIO_4 . Najveća vrednost sadržaja proteina od 8,35 mg/g suve viskozne pređe određena je u slučaju uzorka viskoze koji je oksidisan pri najrigoroznijim uslovima (0,4 % NaIO_4 , 360 min). Međutim, maksimalna imobilisana aktivnost zabeležena je za uzorak koji je oksidisan perjodatom koncentracije 0,4 % u toku 120 minuta i iznosi 0,78 U/g suve viskozne pređe, što predstavlja 9 % od ukupne početne aktivnosti tripsina u rastvoru pre imobilizacije.



a)



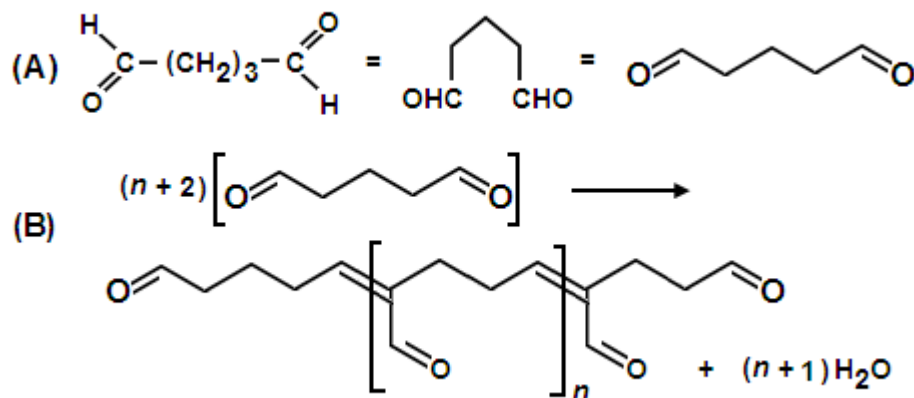
b)

Slika 6.26 Veza između vremena oksidacije, koncentracije NaIO_4 i a) količine tripsina, odnosno, b) aktivnosti tripsina imobilisanog na aktiviranoj viskoznoj pređi

Specifična aktivnost tripsina imobilisanog na različitim uzorcima viskozne pređe kreće se u opsegu od 0,08 do 0,11 U/mg, što je oko 18-26 % od vrednosti specifične aktivnosti određene za slobodni enzim i najveća je kod uzorka oksidisanog sa 0,2 % perjodatom u toku 120 minuta (26,21 %). Indirektnom imobilizacijom tripsina na uzorcima viskozne pređe ostvarene su veće vrednosti specifične aktivnosti u odnosu na vrednost dobijenu za uzorak celuloznog egzopolisaharida (9,16 %), kod koga je tripsin takođe vezan indirektno, preko BSA i glutaraldehida [242].

Indirektnom imobilizacijom tripsina na oksidisanom viskoznoj pređi vezana je veća količina proteina u odnosu na direktni put vezivanja, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [230, 242]. BSA je veliki globularni protein (molekulske mase oko 67000 Da, dimenzija $140 \times 40 \text{ \AA}$) izgrađen od 585 aminokiselinskih ostataka, od kojih su 60 ostaci lizina [299] koji mu omogućavaju obrazovanje velikog broja veza sa aldehidnim grupama oksidisane viskozne pređe, sa jedne strane i glutaraldehida sa druge strane. U vodenim rastvorima glutaraldehid je prisutan uglavnom u polimernim oblicima različitih dimenzija. Pored krajnjih aldehidnih grupa, ovakvi oblici sadrže po jednu slobodnu aldehidnu grupu sa strane svake jedinice polimernog molekula [298], kao što se može videti na slici 6.27. Sve slobodne aldehidne grupe sposobne su da reaguju sa amino grupama proteina sa kojima dolaze u kontakt, tako da postoji ogroman potencijal za međusobno povezivanje, što se upravo i dešava (slika 6.28), čime se mogu objasniti veće vrednosti sadržaja proteina dobijene indirektnom imobilizacijom na viskoznoj pređi u odnosu na direktno vezivanje za oksidisana viskozna i pamučna vlakna.

U poređenju sa količinom proteina koja je vezana za oksidisane uzorke pamučne pređe, indirektnom imobilizacijom tripsina na oksidisanom viskoznoj pređi ostvareno je povećanje sadržaja proteina do 75,1 % (u proseku 50 %). Iako je oksidacijom viskoznih vlakana uvedena znatno veća količina aldehidnih grupa u odnosu na pamučna vlakna (slika 6.8), površina oksidisanih delova viskoznih vlakana je uglavnom pokrivena velikim molekulima BSA (čija je molekulska masa oko tri puta veća od mase tripsina), koji prekrivaju brojne aldehidne grupe, od kojih je verovatno velika količina uvedena u unutrašnjost rastresite strukture viskoznih vlakana i nedostupna za obrazovanje Schiff-ovih baza. Prema tome, aldehidne grupe koje su na raspolaganju za vezivanje sa amino grupama tripsina uglavnom su one koje potiču od glutaraldehida, pri čemu se vezivanje ostvaruje većinom MPA načinom zbog velike gustine verovatno neravnomerno distribuiranih vezujućih centara. U vezivanju jednog molekula tripsina učestvuje veći broj aldehidnih grupa koje mogu da potiču sa istog poliglutaraldehydnog lanca ili sa više susednih lanaca.



Slika 6.27 (A) Tri reprezentacije monomera glutaraldehida; (B) Reakcija polimerizovanja glutaraldehida, sa prikazanim aldehidnim bočnim lancem na svakoj jedinici polimera [298]

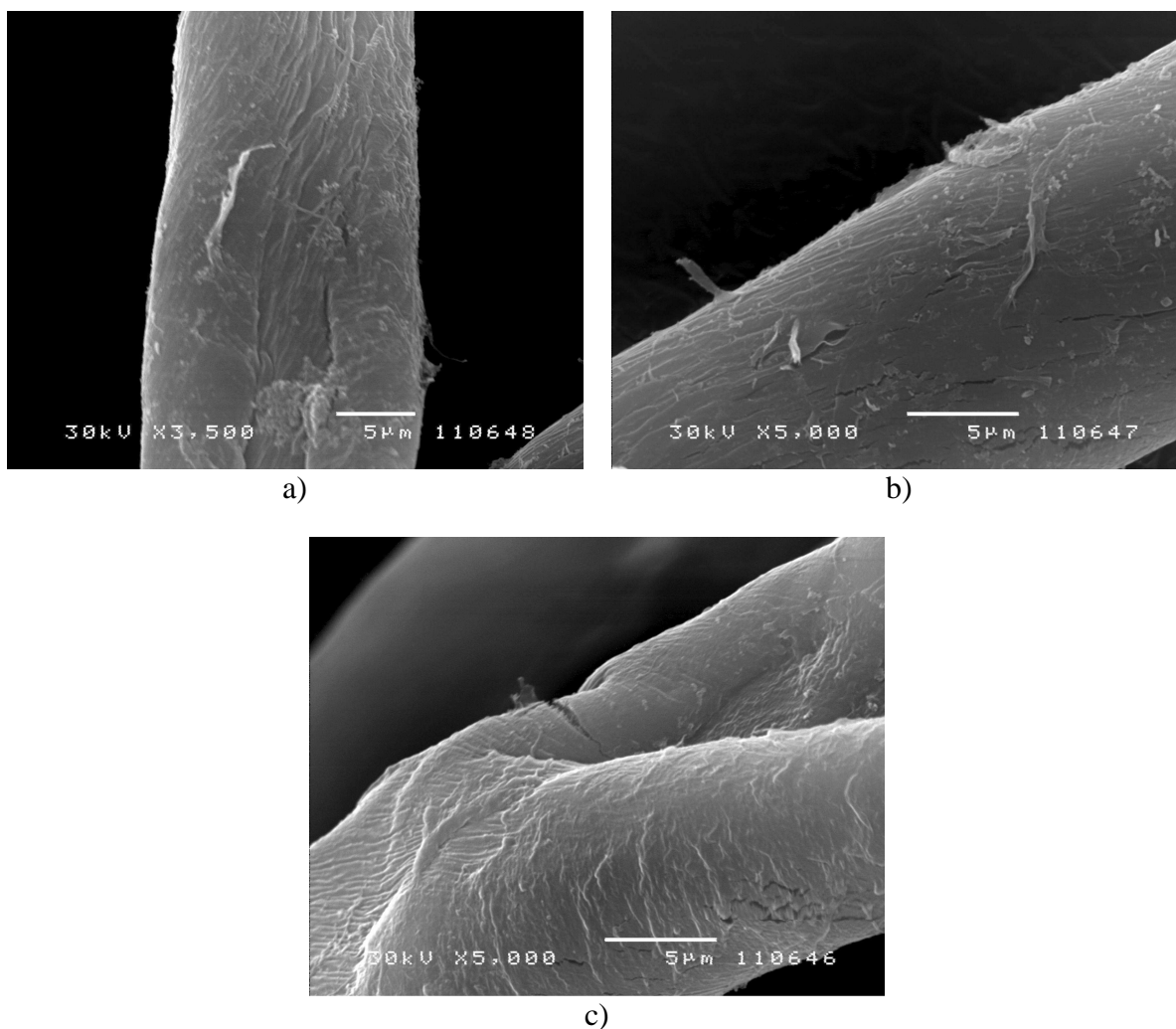
na oksidisana pamučna vlakna (najveća vrednost 6,1 mg/g, za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ tokom 180 minuta). Međutim, oksidisana viskozna vlakna su ispoljila niže vrednosti imobilisane aktivnosti, maksimalno do 0,78 U/g za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ u toku 120 minuta (slika 6.26 b), u poređenju sa oksidisanim pamučnim vlaknima, kod kojih je najveća aktivnost od 1,22 U/g zabeležena za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ tokom 180 minuta (slika 6.23), koji je takođe vezao i najveću količinu tripsina. Isti uzorak oksidisane pamučne pređe pokazao je visoku vrednost prekidne jačine od 10,43 cN/tex, odnosno 84,25 % od početne vrednosti prekidne jačine, kao i najveće povećanje finoće (5,28 %) u odnosu na nemoifikovanu pamučnu pređu (20,85 tex). Prema tome, ukoliko je cilj obezbediti dovoljnu količinu vezanog enzima koja će ispoljiti najveću katalitičku aktivnost, najbolji izbor je pamučna pređa, a optimalni uslovi oksidacije su koncentracija natrijum-perjodata 0,4 % i vreme reakcije 180 minuta, koji omogućavaju i očuvanje prekidne jačine oksidisane pređe. U situacijama kada manja aktivnost tripsina može da zadovolji predviđene potrebe, a postoji zahtev za većom prekidnom jačinom, većom finoćom i/ili većom sposobnošću sorpcije vlage i zadržavanja vode, optimalan izbor može biti uzorak viskozne pređe koji je oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ u toku 120 minuta. Navedeni uzorak oksidisane viskoze ima prekidnu jačinu 16,70 cN/tex, finoću 10,20 tex i značajno veće vrednosti sorpcije vlage i sposobnosti zadržavanja vode u poređenju sa uzorcima oksidisane pamučne pređe (slike 6.9 i 6.10, respektivno). Pored opisanih karakteristika dobijenih uzoraka oksidisane pamučne i viskozne pređe sa vezanim tripsinom, na izbor optimalnog enzim-aktivnog preparata značajan uticaj može imati i ostvarena stabilnost imobilisanog tripsina, što će biti diskutovano u poglavlju 6.3.3.

Dobijeni rezultati pokazuju da se variranjem uslova perjodatne oksidacije (koncentracije NaIO₄ i vremena modifikovanja) mogu dobiti uzorci pamučne i viskozne pređe sa različitim sadržajem aldehidnih grupa, a time i različitim vrednostima sadržaja proteina i aktivnosti imobilisanog tripsina, kao i mehaničkim i sorpcionim svojstvima, što omogućava njihovo prilagođavanje željenoj nameni.

6.3.2. Mikrostruktura pamučnih i viskoznih vlakana sa imobilisanim tripsinom

Mikrostruktura enzim-aktivnih vlakana dobijenih postupkom imobilizacije molekula tripsina na oksidisana pamučna i viskozna vlakna okarakterisana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom. SEM snimci oksidisanih pamučnih vlakana sa direktno imobilisanim tripsinom prikazani su na slici 6.29, a SEM snimci oksidisanih viskoznih vlakana sa tripsinom vezanim preko BSA i glutaraldehida prikazani su na slici 6.30.

Dobijena enzim-aktivna pamučna vlakna imaju sličnu ili identičnu strukturu površine kao i oksidisana pamučna vlakna, slika 6.29, što je i očekivano s obzirom na dimenzije molekula tripsina (3,8 nm) i u saglasnosti je sa pretpostavkom da se molekuli tripsina uglavnom vezuju tako da obrazuju monomolekulski sloj. Na slici su vidljive posledice rigoroznih uslova oksidacije u vidu izraženih naprslina u vlaknu (slika 6.29 c), tako da se može pretpostaviti da je izvesna količina enzima vezana i u unutrašnjosti vlakna.



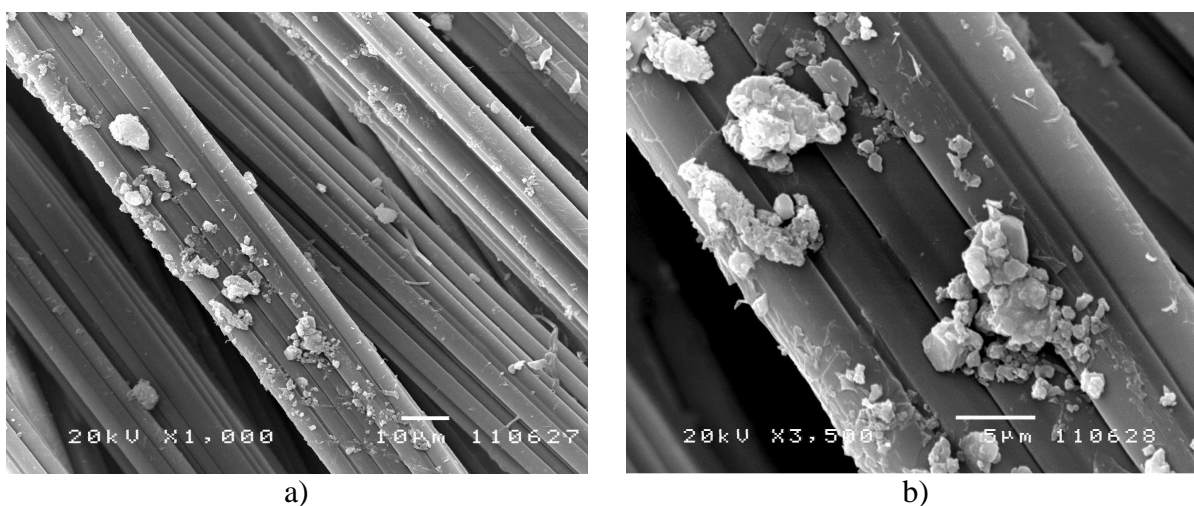
Slika 6.29 Oksidisana vlakna pamuka sa direktno imobilisanim tripsinom

a) 0,4 % NaIO₄, 180 min

b) 0,4 % NaIO₄, 180 min

c) 0,4 % NaIO₄, 360 min

Za razliku od enzim-aktivnih pamučnih vlakana, izgled površine oksidisanih viskoznih vlakana sa tripsinom vezanim preko BSA i glutaraldehida jasno se razlikuje od površine oksidisanih vlakana viskoze. Na slici 6.30, koja prikazuje viskozna vlakna oksidisana 0,4 % rastvorom NaIO_4 tokom 360 minuta i sa najvećom količinom indirektno imobilisanog tripsina, vide se mnogobrojne čestice različitih dimenzija neravnomerno raspoređene na površini vlakana. Ove čestice mikrometarskih razmera verovatno predstavljaju agregate molekula tripsina koji su preko glutaraldehida vezani za molekule BSA. Obrazovanje agregata je moguće zbog prisustva polimernih oblika glutaraldehida koji sadrže veliki broj aldehydnih grupa, kao i velikog broja amino grupa koje se nalaze na jednom molekulu BSA. Delujući kao umrežavajući agens, polimeri glutaraldehida mogu da vežu veliki broj molekula enzima (slika 6.28), kao i da preko njih ostvare veze sa molekulima BSA na bliskom rastojanju, stvarajući na taj način veće agregate. Neki od agregata se verovatno sastoje od velikog broja gusto vezanih enzima čija površina postaje nedostupna za sve reagujuće vrste, bilo zbog sternih smetnji ili prenosa mase i difuzionih ograničenja, što za posledicu ima uočeno smanjenje imobilisane katalitičke aktivnosti tripsina. Za razliku od njih, manji agregati i molekuli tripsina vezani preko monomernog glutaraldehida, koji se zbog svojih nanometarskih dimenzija ne mogu videti na SEM snimcima površine vlakana, doprinose povećanju ukupne imobilisane aktivnosti tripsina.



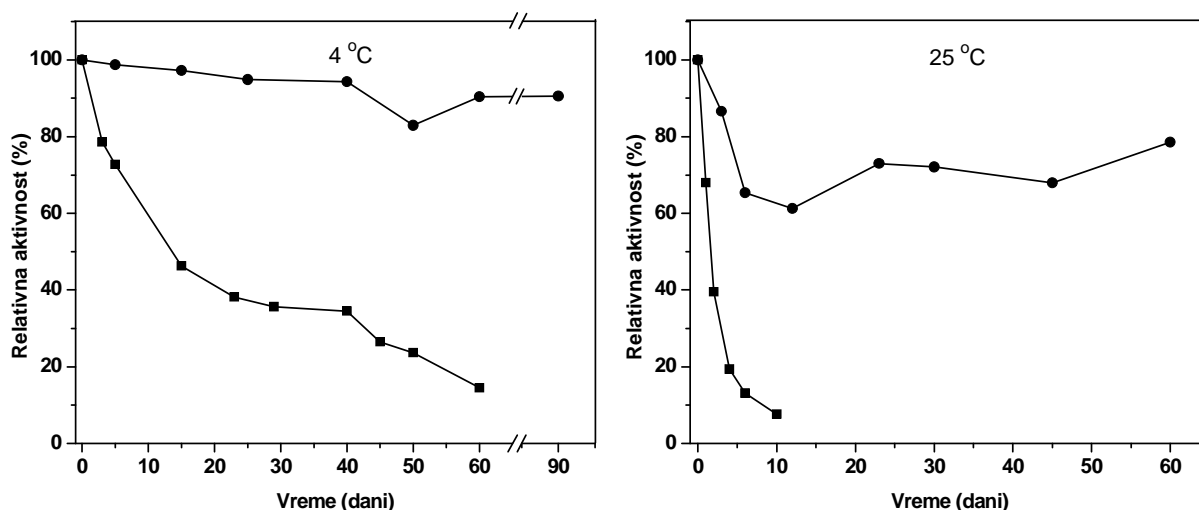
Slika 6.30 Oksidisana viskozna vlakna sa tripsinom vezanim preko BSA i glutaraldehida
a) 0,4 % NaIO_4 , 360 min, uvećanje 1000x, b) detalj slike 6.30 a, uvećanje 3500x

6.3.3. Stabilnost tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi

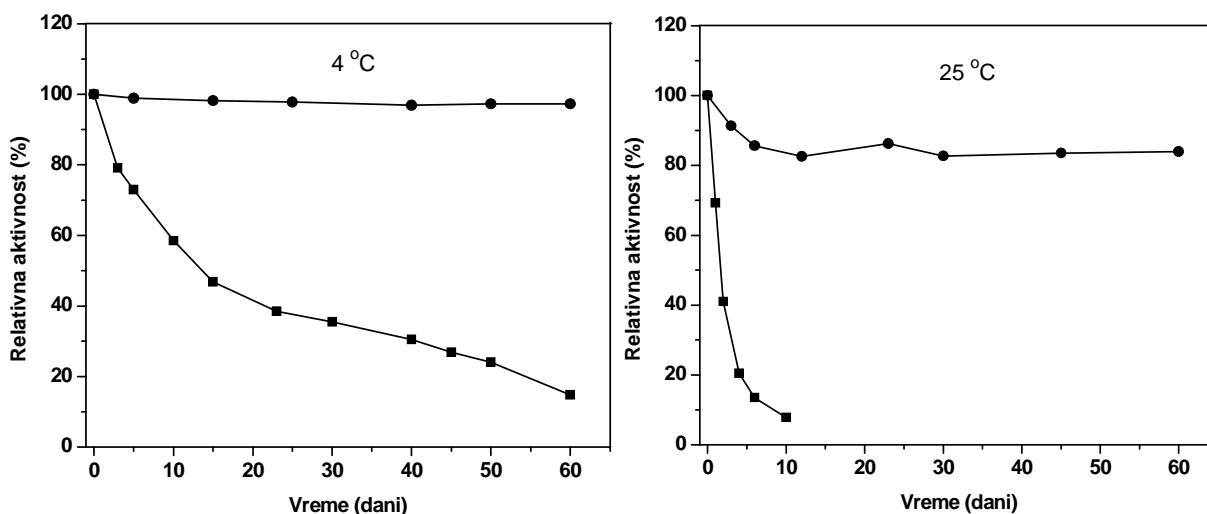
Stabilnost imobilisanog enzima je značajna karakteristika sa aspekta praktične primene, s obzirom da veća stabilnost rezultuje u dugotrajnosti imobilisanog enzima. Zbog toga je kreiranje stabilnog katalizatora jedan od najznačajnijih ciljeva imobilizacije enzima. Kako bi se ocenila upotrebna vrednost pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom, ispitana je njihova stabilnost pri skladištenju da bi se videlo da li enzim u imobilisanom obliku zadržava svoju katalitičku aktivnost u značajnom vremenskom periodu.

Uzorci pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom okarakterisani su na stabilnost, a rezultati su dati za uzorak pamučne pređe modifikovan pomoću 0,4 % NaIO₄ u trajanju od 180 minuta i uzorak viskozne pređe oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ tokom 120 minuta, koji su izabrani na osnovu prikazanih rezultata o količini vezanih proteina i imobilisanoj aktivnosti, kao i vrednosti dobijenih ispitivanjem mehaničkih svojstava oksidisanih uzoraka pređe. Treba napomenuti da su rezultati dobijeni ispitivanjem stabilnosti ostalih uzoraka slični rezultatima koji su prikazani za odgovarajuće izabrane uzorke pamučne i viskozne pređe.

Kako bi se dobro uočila stabilnost imobilisanog enzima, posmatrani su istovremeno izabrani uzorci oksidisane pređe sa vezanim tripsinom i kontrolni uzorci slobodnog (neimobilisanog) enzima. Stabilnost tripsina u rastvoru i imobilisanog na oksidisanim celuloznim vlaknima, pri čuvanju na 4 °C i sobnoj temperaturi, ocenjena je praćenjem njihovih aktivnosti sa vremenom (slike 6.31 i 6.32). Stabilnost slobodnog i imobilisanog tripsina pri skladištenju izražena je kao relativna aktivnost, tj. u slučaju slobodnog enzima, aktivnost lagerovanog rastvora tripsina data je u odnosu na aktivnost sveže pripremljenog rastvora tripsina (početna aktivnost slobodnog enzima), dok je u slučaju imobilisanog enzima, aktivnost uskladištene pređe sa vezanim tripsinom data u odnosu na aktivnost istog uzorka koja je određena odmah nakon imobilizacije (početna aktivnost imobilisanog enzima).



Slika 6.31 Stabilnost tripsina u rastvoru (■) i imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj pređi (●) pri čuvanju na 4 °C i 25 °C. Aktivnosti su date relativno u odnosu na aktivnost određenu odmah nakon pripreme rastvora, odnosno nakon imobilizacije enzima (100 %)



Slika 6.32 Stabilnost tripsina u rastvoru (■) i imobilisanog na oksidisanjoj viskoznoj pređi (●) pri čuvanju na 4 °C i 25 °C. Aktivnosti su date relativno u odnosu na aktivnost određenu odmah nakon pripreme rastvora, odnosno nakon imobilizacije enzima (100 %)

Stabilnost tripsina u slobodnom i u imobilisanom obliku ispitivana je tokom 60 dana skladištenja. Kao što se može videti na slikama 6.31 i 6.32, slobodni enzim je izgubio oko 85 % od svoje početne aktivnosti nakon 60 dana čuvanja na 4 °C, dok je na sobnoj temperaturi uočen gubitak aktivnosti od ~ 92 % nakon samo 10 dana. Do oštrog smanjenja aktivnosti tripsina u rastvoru dolazi uglavnom zbog intermolekulske autodigestije, odnosno autolize tripsina. Naime, poznato je da primenu tripsina (kao i ostalih proteolitičkih enzima) ograničavaju problemi vezani za njegovu nestabilnost i brz gubitak katalitičke aktivnosti u toku upotrebe i perioda skladištenja, do kojih dolazi usled njegove sklonosti ka autolizi, unfolding-u i agregaciji. Imobilizacijom se mogu prevazići ova ograničenja, s obzirom da imobilizacija stabilizuje strukturu, a time i aktivnost enzima. U prilog ovome govore rezultati dobijeni za stabilnost tripsina koji je imobilisan na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi (slike 6.31 i 6.32, respektivno). Tripsin imobilisan na pamučnoj pređi zadržao je ~ 90 % od svoje početne aktivnosti nakon 60 dana čuvanja na 4 °C, dok je uzorak uskladišten na sobnoj temperaturi sačuvao oko 72 % od svoje početne aktivnosti u istom periodu. Pored toga, uzorak čuvan na 4 °C pokazao je isti procenat sačuvane aktivnosti i nakon dodatnih 30 dana lagerovanja (slika 6.31). U poređenju sa pamučnom pređom, tripsin imobilisan na viskoznoj pređi pokazao je veći stepen stabilnosti (slika 6.32). Nakon 60 dana skladištenja na 4 °C i 25 °C, imobilisana aktivnost tripsina iznosila je, respektivno, 97,3 % i 83,8 % od njegove početne aktivnosti, određene odmah nakon imobilizacije.

Iz prikazanih rezultata je očigledno da je stabilnost tripsina koji je imobilisan na oksidisanjoj celuloznoj pređi značajno poboljšana u poređenju sa slobodnim enzimom, kao i da je stabilnost veća na 4 °C, što je posledica manjeg stepena unfolding-a koji se dešava imobilisanom enzimu na nižoj temperaturi. U slučaju tripsina koji je indirektno imobilisan na oksidisanjoj viskoznoj pređi, prisustvo BSA dodatno stabilizuje enzim, čime se može objasniti veća stabilnost tripsina imobilisanog na viskoznoj pređi u poređenju sa pamučnom pređom. Slični rezultati dobijeni su za stabilnost tripsina koji je direktno kovalentno imobilisan na celuloznom egzopolisaharidu [242] i pamučnoj gazi [247], kod kojih je sačuvana aktivnost iznosila, respektivno, 86,5 % nakon 54 dana i 85,0 % nakon 50 dana čuvanja na 4 °C. Prema

rezultatima koje su objavili Cavalcante i saradnici [242], tripsin imobilisan indirektno na egzopolisaharidu, preko BSA i glutaraldehida, zadržao je 99,12 % od svoje početne aktivnosti pri čuvanju tokom 54 dana na 4 °C. Za stabilnost kovalentno imobilisanog tripsina na sobnoj temperaturi, u literaturi se mogu naći podaci o vrednostima sačuvane aktivnosti od 30 %, za direktno vezani enzim [247] i oko 65-85 % u zavisnosti od metode indirektno imobilizacije [245], nakon 30 dana lagerovanja.

Poboljšana stabilnost tripsina verovatno je rezultat imobilizacije koja štiti enzim od proteolitičkog napada (autolize), kao i od agregacije do koje dolazi kada su molekuli tripsina u rastvoru. Najznačajniju ulogu u stabilizovanju ima MPA način vezivanja koji omogućava veći broj veza jednog molekula oksiceluloze sa nekoliko amino grupa istog polipeptidnog lanca. MPA način vezivanja povećava rigidnost enzima i sprečava unfolding (gubitak aktivne konformacije) molekula tripsina. Naime, poznato je da je marginalna stabilnost većine proteaza posledica prvenstveno njihove ireverzibilne inaktivacije usled autoproteolitičke digestije. Ovo dovodi do kompleksnog denaturacionog procesa koji se sastoji od reverzibilne faze unfolding-a, koji je praćen ireverzibilnom fazom. Takođe je poznato da nativni enzimi u sklopčanom (folded) stanju pokazuju manju sklonost prema proteolizi od njihovog odgovarajućeg delimično ili potpuno nesklupčanog (unfolded) oblika. Pored toga, autoproteoliza se dešava pri blago denaturišućim uslovima. Na osnovu iznetih činjenica, stabilizacija proteaza može se ostvariti onemogućavanjem reverzibilne faze unfolding-a. To se upravo postiže MPA načinom vezivanja, tj. uvođenjem većeg broja kovalentnih veza koje stabilizuju sklopčanu strukturu proteina, sprečavajući unfolding. Pojedini molekuli tripsina su verovatno vezani SPA ("singlepoint attachment") načinom koji, za razliku od MPA načina vezivanja, obezbeđuje fleksibilnost enzimu, ali i manju zaštitu od promene konformacije sa vremenom [296], što može biti razlog blagog smanjenja stabilnosti imobilisanih enzima tokom dužeg perioda skladištenja.

Stabilnosti imobilisanih molekula tripsina može značajno doprineti i obrazovanje vodoničnih veza između nosača i enzima kada su na dovoljno bliskom odstojanju. Ove veze su moguće zahvaljujući brojnim hidroksilnim grupama koje sadrže molekuli celuloze, koje interaguju sa hidrofilnim grupama na površini enzima dovodeći do suštinske hidrofiličacije.

Dobijena razlika u stabilnosti, odnosno sačuvanoj aktivnosti nakon dužeg perioda skladištenja, između tripsina vezanog za oksidisana viskozna i pamučna vlakna, u nekim slučajevima može se pokazati kao odlučujući faktor pri izboru optimalnog nosača i procedure za imobilizaciju tripsina. Sumirajući ostvarene rezultate imobilizacije tripsina na dialdehid celulozi, oksidisana viskoza i indirektna procedura obezbeđuju veću količinu kovalentno vezanog tripsina i veće vrednosti sačuvane katalitičke aktivnosti u dužem periodu skladištenja, u odnosu na pamuk i direktnu proceduru imobilizacije, kojom se pak postiže veća aktivnost tripsina, ali i dovoljno visoka stabilnost enzima pri lagerovanju. Pored svega navedenog, treba imati u vidu i veću složenost indirektno imobilizacije u odnosu na direktno vezivanje tripsina, kao i uvođenje medijatora, kao što je glutaraldehyd, pri indirektno imobilizaciji enzima.

U cilju proučavanja otpuštanja vezanog tripsina sa nosača, nekoliko uzoraka pamučne i viskozne pređe sa imobilisanim tripsinom čuvano je u fiziološkom rastvoru. Nakon 60 dana skladištenja, spektrofotometrijska ispitivanja su pokazala da proteini nisu prisutni u rastvoru. Ovakav rezultat ukazuje na čvrstu vezu tripsina sa nosačem, što je karakteristika kovalentne imobilizacije enzima.

Poznato je da se Schiff-ove baze mogu redukovati do stabilnijih sekundarnih amina odgovarajućim redukujućim agensom. U tom cilju izvršena je dodatna inkubacija uzorka oksidisanu pamučnu pređu sa imobilisanim tripsinom sa 100 mM NaBH₄ u toku 2 h na 4 °C. Međutim, redukcija borhidridom je izazvala gubitak aktivnosti vezanog enzima i do 30 %.

Uočeno značajno smanjenje aktivnosti verovatno je posledica redukcije veza, kao što su disulfidne, koje su neophodne za aktivnost nativnog enzima [305].

Veze koje nastaju interakcijom dialdehid celuloze sa tripsinom su dovoljno stabilne (energija C=N veze varira od 393 do 583 kJ/mol) i ne mogu se raskinuti pod dejstvom izlučevina rane [294]. Veze formirane reakcijom glutaraldehida sa amino grupama pokazuju izuzetnu stabilnost, čak i pri ekstremnim pH vrednostima i temperaturama [298]. S obzirom na iznete činjenice, može se zaključiti da su formirane Schiff-ove baze dovoljno stabilne i da nije potrebno, niti poželjno vršiti njihovo naknadno redukovanje do sekundarnih amina.

Ispitivanja stabilnosti tripsina imobilisanog na pamučnoj pređi nakon godinu dana lagerovanja u fiziološkom rastvoru na 4 °C pokazala su da je katalitička aktivnost enzima sačuvana u visokom stepenu (oko 85 % od početne imobilisane aktivnosti). Ovakvi rezultati su potvrdili da je stabilnost veze tripsin – oksidizano celulozno vlakno veoma dobra. Ovo je od velikog značaja jer je nakon dužeg vremenskog perioda sačuvana aktivnost imobilisanog enzima, što može biti korisno u predviđanju trajnosti enzim-aktivnog dejstva ovih materijala i proizvoda na njihovoj osnovi.

Dobijena celulozna vlakna sa vezanim tripsinom mogla bi da posluže kao biomedicinski tekstilni materijali, u obliku npr. gaze i zavoja, namenjeni prvenstveno za tretman rana, s obzirom na dobru biokompatibilnost celulozних materijala, nekrolitička, anti-inflamatorna, anti-toksična i drenažna svojstva tripsina, kao i ostvarenu visoku stabilnost formiranih biološki aktivnih vlakana.

7. Zaključak

Na osnovu teorijskih razmatranja i rezultata eksperimentalnih istraživanja na dobijanju selektivno oksidisanih prirodnih (pamuk) i hemijskih (viskoza) celuloznih vlakana pomoću natrijum-perjodata, kao polazne osnove za dobijanje biološki aktivnih vlakana sa imobilisanim tripsinom, predstavljenih u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- U skladu sa ciljem ovog rada, dobijena su enzim-aktivna vlakna sa anti-inflamatornim svojstvom postupkom imobilizacije molekula tripsina na celulozna, pamučna i viskozna, vlakna koja su prethodno aktivirana visoko selektivnim oksidacionim sredstvom natrijum-perjodatom.
- Pri oksidaciji celuloze natrijum-perjodatom dolazi u izvesnoj meri do destrukcije celuloze, pri čemu se jedan deo produkata oksidacije rastvara, što za posledicu ima smanjenje mase modifikovanih uzoraka. Tretiranjem pamučne pređe rastvorom natrijum-perjodata pri različitim uslovima nastaju gubici mase čije se vrednosti kreću u intervalu od 2,03 % do 2,56 %, pri čemu su najveći gubici mase zabeleženi kod uzoraka koji su modifikovani sa 0,2 % i 0,4 % NaIO_4 tokom prvih 15 minuta reakcije. U ovom početnom periodu oksidacije dolazi do uklanjanja neceluloznih materija sa površine sirove nebeljene pamučne pređe. U slučaju modifikovane viskozne pređe, vrednosti gubitka mase kreću se u opsegu od 4,47 % do 5,04 %. Veći gubitak mase zabeležen u slučaju oksidisanih viskoznih vlakana u odnosu na pamučna vlakna može se pripisati razlikama u strukturi prirodnih i hemijskih celuloznih vlakana, uglavnom u stepenu polimerizovanja i kristalnosti, kao i prostornom aranžmanu fibrila.
- U toku oksidacije pamučne i viskozne pređe natrijum-perjodatom dolazi do oksidacije sekundarnih hidroksilnih grupa celuloze u aldehydne, uz istovremeno otvaranje oksidisanog dela glukopiranoznog prstena celuloze. Količina uvedenih aldehydnih grupa može se kontrolisati izborom uslova perjodatne oksidacije. Povećanje koncentracije i vremena delovanja oksidacionog sredstva NaIO_4 omogućava uvođenje značajnih količina aldehydnih grupa u oksidisana celulozna vlakna, koje se za pamučna vlakna kreću do 99,2 $\mu\text{mol/g}$ celuloze, a za viskozna do 1284,0 $\mu\text{mol/g}$ celuloze. Očigledno je da se oksidacijom uzoraka viskozne pređe uvodi znatno veći sadržaj aldehydnih grupa u odnosu na uzorke pamučne pređe. Maksimalna količina aldehydnih grupa koja je uvedena u viskozna vlakna oksidacijom pri najrigoroznijim uslovima je 13 puta veća u odnosu na vrednost dobijenu za pamučna vlakna oksidisana pri istim uslovima. Dobijeni rezultati ukazuju na mnogo veću reaktivnost viskoznih vlakana, koja se uglavnom može pripisati manjem stepenu kristalnosti i jednostavnijoj nadmolekulske i mikrostrukturi viskoznih u odnosu na pamučna vlakna, kao i većoj pristupačnosti za reagense kristalne strukture celuloze II regenerisanih celuloznih vlakana u poređenju sa strukturom celuloze I prirodnih celuloznih vlakana.
- Perjodatna oksidacija celuloze dovodi do promena u strukturi i kristalnosti rezultujućih molekula i utiče na njena sorpciona svojstva. Radi boljeg razumevanja ponašanja ispitivanih pamučnih i viskoznih vlakana tokom mokrih obrada, proučena je korelacija između njihove strukture i njihovih sorpcionih svojstava. Razlike u molekulske i nadmolekulske strukturi nemođifikovanih i oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana uzrokuju različita sorpciona svojstva vlakana, koja su ocenjena određivanjem sorpcije vlage, sposobnosti zadržavanja vode i sorpcije joda.

- Rezultati ispitivanja uticaja uslova hemijskog modifikovanja pamučnih i viskoznih vlakana pomoću natrijum-perjodata su pokazali da se direktno odražavaju na promene sposobnosti sorpcije vlage ovih vlakana. Kod svih uzoraka oksidisanih pamučnih vlakana zabeleženo je blago povećanje sorpcije vlage u odnosu na nemodifikovana vlakna. Maksimalna vrednost za sorpciju vlage od 6,72 % (povećanje 9 %) dobijena je za vlakna pamuka koja su oksidisana tokom 30 minuta sa 0,2 % NaIO₄. Ovakav rezultat može se objasniti delimičnim uklanjanjem hidrofobnih nečistoća sa površine sirovih pamučnih vlakana u ranoj fazi oksidacije, što omogućava molekulima vode da dopru do celuloznih materijala na površini koji su sposobni da sorbuju vlagu. Viskozna vlakna oksidisana pomoću 0,2 % i 0,4 % NaIO₄ tokom početnih 180 i 120 minuta, respektivno, sorbuju manju količinu vlage u poređenju sa nemodifikovanim vlaknima, dok se produžavanjem vremena oksidacije sorpcija vlage povećava. Početno smanjenje sorpcije vlage verovatno je posledica smanjenja broja pristupačnih hidroksilnih grupa u površinskom sloju vlakna usled njihove konverzije u aldehidne grupe i formiranja hemiacetalnih veza. Minimalnu vrednost sorpcije vlage od 8,64 % (smanjenje 5 %) pokazao je uzorak viskoze oksidisan tokom 15 minuta sa 0,4 % NaIO₄. Sa produženjem oksidacije iznad pomenutih vremena i povećanjem koncentracije perjodata, dolazi do povećanja sorpcije vlage kod oksidisanih viskoznih vlakana u odnosu na nemodifikovane uzorke, što se može objasniti destrukcijom celuloze koja se odvija u tankom reakcionom površinskom sloju viskoznih vlakana. Maksimalna vrednost sorpcije vlage od 9,41 % (povećanje 3,5 %) dobijena je za uzorak viskoze koji je oksidisan pri najrigoroznijim uslovima (360 min i 0,4 % NaIO₄). Dobijeni rezultati generalno ukazuju na neznatne promene sorpcije vlage kod oksidisanih vlakana pamuka i viskoze.
- Svi uzorci oksidisanih celuloznih vlakana pokazuju niže vrednosti sposobnosti zadržavanja vode u odnosu na nemodifikovana vlakna. Sposobnost zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana dostiže najnižu vrednost od 19,0 % (smanjenje 38 %) nakon 180 minuta oksidacije sa 0,4 % natrijum-perjodatom, dok je u slučaju oksidisanih viskoznih vlakana minimalna vrednost od 39,3 % (smanjenje 32,4 %) zabeležena za uzorak koji je oksidisan u toku 300 minuta, takođe većom koncentracijom natrijum-perjodata. Smanjenje sposobnosti zadržavanja vode moguće je objasniti obrazovanjem stabilnih, kovalentnih intra- i intermolekulskih hemiacetalnih veza, reakcijom uvedenih aldehidnih grupa sa susednim hidroksilnim grupama u vlaknu, koje dovode do umrežavanja. Efekat umrežavanja čini molekule kompaktnijim, smanjuje sposobnost bubrenja i eliminiše potencijalne centre za vezivanje vode, što za posledicu ima smanjenje sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana. Vrednosti sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana menjaju se u opsegu 25,9-19,0 %, a oksidisanih viskoznih vlakana u opsegu 57,7-39,3 %. Očigledno je sposobnost zadržavanja vode oksidisanih viskoznih vlakana u svim slučajevima veća od sposobnosti zadržavanja vode oksidisanih pamučnih vlakana. Ovakav rezultat ukazuje na veću pristupačnost ili otvorenost strukture oksidisanih viskoznih vlakana za vodu u tečnom stanju u odnosu na strukturu oksidisanih pamučnih vlakana, što je u saglasnosti sa manjom kristalnošću i većom zapreminom pora i šupljina, tj. unutrašnjih oblasti viskoznih vlakana u odnosu na vlakna pamuka.
- Usled uvođenja aldehidnih grupa tokom oksidativnog tretmana celuloze natrijum-perjodatom, kao i naknadnog procesa umrežavanja, oksidisana celulozna vlakna pokazuju smanjenje sorpcije joda. Kod uzoraka pamuka koji su oksidisani sa 0,2 % NaIO₄, sorpcija joda dostiže najnižu vrednost od 38,3 mg/g (smanjenje 31 %) nakon 120 minuta modifikovanja. Sa produženjem vremena oksidacije do 360 minuta,

vrednosti za sorpciju joda se skoro linearno povećavaju približavajući se maksimalnoj vrednosti od 57,9 mg/g (povećanje 4 %). Za pamučna vlakna oksidisana sa 0,4 % NaIO₄ karakteristično je da nakon 60 minuta oksidacije pokazuju praktično konstantnu vrednost sorpcije joda, koja iznosi oko 97,5 % od vrednosti sorpcije joda dobijene za nemodifikovana pamučna vlakna. Dobijene razlike u vrednostima sorpcije joda između vlakana pamuka oksidisanih sa 0,2 % i sa 0,4 % NaIO₄ posledica su promene stepena kristalnosti i umrežavanja. Sorpcija joda viskozim vlaknima oksidisanim sa 0,2 % i 0,4 % NaIO₄ smanjuje se skoro linearno (uz manja odstupanja u slučaju uzoraka oksidisanih sa 0,4 % NaIO₄) sa povećanjem vremena modifikovanja, dostižući najnižu vrednost od 135,0 mg/g (smanjenje 53,6 %). Veći procenat smanjenja vrednosti sorpcije joda dobijen za oksidisana viskozna vlakna, u poređenju sa oksidisanim pamučnim vlaknima, u saglasnosti je sa većom količinom aldehidnih grupa uvedenih oksidacijom u pristupačne oblasti viskoznih vlakana.

- Vrednost sorpcije joda, kao mera pristupačnosti amorfnih oblasti celuloznih vlakana, može se iskoristiti za određivanje indeksa kristalnosti. Nemodifikovana viskozna vlakna imaju indeks kristalnosti 29,4 %, koji se tokom oksidacije lagano povećava i menja u opsegu 44,4-67,3 %. Kod pamučnih vlakana modifikovanih pomoću 0,4 % NaIO₄ indeks kristalnosti se povećava od 86,5 % (nemodifikovani pamuk) do 88,8 %, zatim opada do 85,1 %, a nakon 60 minuta oksidacije ima skoro konstantnu vrednost od 86,9 %. U slučaju vlakana pamuka oksidisanih sa 0,2 % NaIO₄, indeks kristalnosti se najpre povećava do najveće zabeležene vrednosti od 90,7 %, a zatim se lagano smanjuje do vrednosti od 85,9 % (360 min). Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da oksidacija natrijum-perjodatom, posebno pri većoj koncentraciji i dužem vremenu modifikovanja, narušava u izvesnom stepenu kristalnu strukturu celuloze, kao i reorganizacijom manje sređenih amorfnih frakcija oksidisanih uzoraka usled efekta umrežavanja.
- Uvedene aldehidne grupe imaju značajan uticaj na sorpciona svojstva i pristupačnost oksidisanih celuloznih vlakana. U poređenju sa nemodifikovanim vlaknima, oksidisani uzorci pamuka su ispoljili neznatno povećanje sorpcije vlage (do 9 %), smanjenje sposobnosti zadržavanja vode (do 38 %) i smanjenje vrednosti sorpcije joda (do 31 %). Na osnovu dobijenih rezultata, najveću osetljivost na promene u strukturi oksidisanih pamučnih vlakana pokazuje sposobnost zadržavanja vode, nešto manju sorpcija joda, dok najmanju osetljivost na promene u strukturi vlakana pokazuje sorpcija vlage. U slučaju oksidisanih viskoznih vlakana, ispitivana sorpciona svojstva se, prema osetljivosti na promene u strukturi oksidisanih vlakana, mogu poredati na sledeći način: sorpcija joda (smanjenje do 53,6 %), sposobnost zadržavanja vode (smanjenje do 32,4 %) i sorpcija vlage (smanjenje do 5 %, a zatim povećanje do 3,5 %). Oksidacija natrijum-perjodatom omogućava jedinstvene hemijske modifikacije selektivno u nesređenim oblastima i na površini kristalnih regiona, zajedno sa izvesnim morfološkim promenama celuloznih vlakana, u vodenoj sredini, pri umerenim uslovima.
- Promene u molekulskoj i nadmolekulskoj strukturi celuloze, do kojih dolazi u toku procesa oksidacije natrijum-perjodatom, utiču na fizičko-mehaničke karakteristike oksidisane pređe. Finoća nemodifikovane pamučne i viskozne pređe iznosi 20,85 i 10,60 tex, respektivno, dok su kod oksidisanih uzoraka zapažene uglavnom minimalne promene finoće, koje se za pamučnu pređu kreću u opsegu od 20,80 tex do 19,75 tex, a za viskoznu pređu od 10,50 tex do 9,95 tex, u zavisnosti od uslova modifikovanja. Promene finoće, umrežavanje molekula preko hemiacetalnih veza, kao i smanjenje stepena polimerizovanja usled oksido-destruktivnih procesa do kojih dolazi tokom oksidacije natrijum-perjodatom, odrazile su se na promenu prekidne jačine oksidisane

pamučne i viskozne pređe. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da pri blažim uslovima oksidacije efekat umrežavanja dominira u odnosu na uticaj oksido-destruktivnih procesa i dovodi do povećanja prekidne jačine, dok su pri rigoroznijim uslovima modifikovanja oksido-destruktivni procesi dominantniji i uzrokuju smanjenje prekidne jačine oksidisane pređe. Generalno, prekidna jačina oksidisane pamučne i viskozne pređe se ne menja značajno za vreme oksidacije u periodu 0-180 minuta, ali se izrazito smanjuje kada je vreme modifikovanja duže od 180 minuta. Najveće smanjenje prekidne jačine utvrđeno je kod uzoraka pamučne i viskozne pređe koji su modifikovani pri najrigoroznijim uslovima (360 min, 0,4 % NaIO₄) i iznosi 51,13 % i 22,73 %, respektivno.

- Promene u izgledu površine oksidisanih pamučnih i viskoznih vlakana proučene su SEM tehnikom. Elektron-mikroskopska analiza je pokazala da se morfološki izgled oksidisanih celuloznih vlakana jasno razlikuje od nemodifikovanih vlakana. Na površini se uočavaju oštećenja nastala kao posledica dejstva oksidacionog sredstva. Promene u izgledu površine najviše su izražene pri drastičnijim uslovima oksidacije pamučnih i viskoznih vlakana, pri modifikovanju u dužem vremenskom intervalu (360 min), posebno natrijum-perjodatom veće koncentracije, što se može povezati sa velikim padom prekidne jačine pamučne i viskozne pređe oksidisane u dužem vremenskom periodu.
- Pamučna i viskozna pređa, prethodno aktivirane perjodatnim tretmanom, mogu se koristiti za vezivanje molekula koji sadrže amino grupe sposobne da reaguju sa aldehidnim grupama dialdehid celuloze uz obrazovanje odgovarajućih Schiff-ovih baza. U ovom radu izvršena je imobilizaciju tripsina, enzima sa anti-inflamatornim svojstvima, na oksidisanim celuloznim vlaknima. Razlike u strukturi i svojstvima prirodnih (pamuk) i hemijskih (viskoza) celuloznih vlakana, koja su ispitivana u okviru ove disertacije, uslovile su primenu različitih metoda imobilizacije tripsina. Za razliku od direktne imobilizacije tripsina na oksidisanu pamučnu pređu, u slučaju viskozne pređe bolji rezultati postignuti su indirektnim kovalentnim vezivanjem tripsina, uvođenjem proteina BSA i glutaraldehida između oksidisane pređe i enzima. Dobijena celulozna vlakna sa imobilisanim tripsinom okarakterisana su određivanjem sadržaja proteina, aktivnosti enzima i njegove stabilnosti pri lagerovanju.
- Rezultati pokazuju da se količina tripsina kovalentno imobilisanog na modifikovanim vlaknima pamuka povećava sa povećanjem koncentracije perjodata i vremena oksidacije i dostiže maksimalnu vrednost od 6,1 mg/g suve pamučne pređe, za uzorak oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ tokom 180 minuta. Produžavanjem vremena reakcije iznad 180 minuta, za obe koncentracije oksidacionog agensa, ne dolazi do daljeg povećanja količine vezanih proteina i pored toga što su u tim slučajevima dobijena vlakna sa većim sadržajem aldehidnih grupa. Objašnjenje za ovu pojavu može se naći u činjenici da je tripsin veliki molekul koji ne može da dospe do aldehidnih grupa u unutrašnjosti vlakna, tako da se vezuje samo za oksidisane molekule na površini. Osim toga, jedan molekul enzima može da reaguje sa više aldehidnih grupa i da pri tome zakloni (blokira) značajan deo preostalih aldehidnih grupa. Veće količine vezanih proteina zabeležene su kod uzoraka pamučne pređe koji su oksidisani sa 0,4 % NaIO₄ u odnosu na uzorke modifikovane pomoću 0,2 % NaIO₄ i ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima o sadržaju aldehidnih grupa. Aktivnost tripsina imobilisanog na oksidisanim pamučnim vlaknima se povećava sa trajanjem oksidacije do 180 minuta, a zatim postaje praktično konstantna sa produžetkom vremena modifikovanja. Kod svih uzoraka oksidisanih sa 0,4 % NaIO₄ zabeležene su veće vrednosti aktivnosti u odnosu na uzorke oksidisane sa 0,2 % NaIO₄. Rezultati dobijeni za aktivnost imobilisanog tripsina u saglasnosti su sa rezultatima ispitivanja sadržaja proteina. Maksimalna

imobilisana aktivnost određena je kod uzorka oksidisanog perjodatom koncentracije 0,4 % u toku 180 minuta i iznosi 1,22 U/g suve pamučne pređe. Inkubacijom tripsina sa nemodifikovanim pamučnim vlaknima dobijaju se vlakna sa zanemarljivo malom imobilisanom aktivnošću.

- Indirektnom imobilizacijom tripsina na oksidisanjoj viskoznoj pređi dobijene su veće vrednosti sadržaja proteina i aktivnosti enzima u odnosu na vrednosti dobijene direktnim vezivanjem. Kod uzoraka viskozne pređe koji su oksidisani tokom prvih 120 minuta dolazi do porasta sadržaja proteina koji je praćen povećanjem imobilisane aktivnosti. Međutim, sa produžavanjem vremena reakcije, kod uzoraka oksidisanih kako sa 0,2 %, tako i sa 0,4 % perjodatom, količina imobilisanog proteina nastavlja da se blago povećava, dok katalitička aktivnost počinje da se smanjuje, verovatno kao posledica prevelikog broja veza između enzima i nosača, kao i nagomilavanja enzima, čija površina postaje nedostupna za sve reagujuće vrste, bilo zbog sternih smetnji ili prenosa mase i difuzionih ograničenja. Najveća vrednost sadržaja proteina od 8,35 mg/g suve pređe određena je u slučaju uzorka viskoze koji je oksidisan pri najrigoroznijim uslovima (0,4 % NaIO₄, 360 min), dok je maksimalna imobilisana aktivnost zabeležena za uzorak koji je oksidisan perjodatom koncentracije 0,4 % u toku 120 minuta i iznosi 0,78 U/g suve viskozne pređe. U poređenju sa oksidisanim pamučnim vlaknima, uzorci oksidisanih (i naknadno aktiviranih) viskoznih vlakana vezuju veće količine proteina, ali pokazuju niže vrednosti imobilisane aktivnosti.
- SEM analiza je pokazala da dobijena enzim-aktivna pamučna vlakna imaju sličnu ili identičnu strukturu površine kao i oksidisana pamučna vlakna, dok se na površini oksidisanih viskoznih vlakana sa tripsinom vezanim preko BSA i glutaraldehida uočavaju agregati enzima.
- Poređenjem rezultata imobilizacije tripsina na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi može se zaključiti da su bolji rezultati ostvareni direktnom imobilizacijom tripsina na oksidisanjoj pamučnoj pređi, koja se ogleda u većim vrednostima katalitičke aktivnosti enzima. Ukoliko je cilj obezbediti dovoljnu količinu vezanog enzima koja će ispoljiti najveću katalitičku aktivnost, najbolji izbor je pamučna pređa, a optimalni uslovi oksidacije su koncentracija perjodata 0,4 % i vreme oksidacije 180 minuta. Isti uzorak oksidisane pamučne pređe pokazao je visoku vrednost prekidne jačine, 10,43 cN/tex (84,25 % od početne vrednosti prekidne jačine), kao i najveće povećanje finoće (5,28 %) u odnosu na nemodifikovanu pamučnu pređu (20,85 tex). U situacijama kada manja aktivnost tripsina može da zadovolji predviđene potrebe, a postoji zahtev za većom prekidnom jačinom, većom finoćom i/ili većom sposobnošću sorpcije vlage i zadržavanja vode, optimalan izbor može biti uzorak viskozne pređe koji je oksidisan sa 0,4 % NaIO₄ u toku 120 minuta (aktivnost 0,78 U/g). Navedeni uzorak oksidisane viskozne pređe ima prekidnu jačinu 16,70 cN/tex, finoću 10,20 tex i značajno veće vrednosti sorpcije vlage i sposobnosti zadržavanja vode u poređenju sa uzorcima oksidisane pamučne pređe. Dakle, variranjem uslova perjodatne oksidacije moguće je dobiti uzorke pamučne i viskozne pređe sa različitim sadržajem aldehidnih grupa, a time i različitim vrednostima sadržaja i aktivnosti imobilisanog tripsina, mehaničkim i sorpcionim svojstvima i na taj način ih prilagoditi željenoj nameni.
- Rezultati ispitivanja stabilnosti tripsina imobilisanog na oksidisanjoj pamučnoj i viskoznoj pređi tokom 60 dana skladištenja na 4 °C i sobnoj temperaturi pokazali su da je stabilnost imobilisanog tripsina značajno poboljšana u poređenju sa slobodnim enzimom, kao i da je stabilnost veća na 4 °C. Tripsin imobilisan na uzorcima pamučne i viskozne pređe zadržao je, respektivno, 90 % i 97,3 % od svoje početne aktivnosti nakon 60 dana lagerovanja na 4 °C, dok su uzorci čuvani na sobnoj temperaturi sačuvali 72 % i 83,8 % od svoje početne aktivnosti, respektivno, u istom periodu.

Poboljšana stabilnost tripsina verovatno je rezultat imobilizacije, koja štiti enzim od proteolitičkog napada i agregacije. Najznačajniju ulogu u stabilizovanju ima MPA način vezivanja koji povećava rigidnost enzima i sprečava gubitak aktivne konformacije molekula tripsina. U slučaju indirektno imobilizacije tripsina na oksidisanom viskoznoj pređi, prisustvo BSA dodatno stabilizuje enzim, čime se može objasniti veća stabilnost tripsina imobilisanog na viskoznoj pređi u odnosu na pamučnu pređu. Dobijena razlika u stabilnosti između tripsina vezanog za oksidisanu viskozna i pamučna vlakna u nekim slučajevima može se pokazati kao odlučujući faktor pri izboru optimalnog nosača i procedure za imobilizaciju tripsina.

- Rezultati proučavanja otpuštanja vezanog tripsina sa nosača pokazuju da protein ostaje čvrsto vezan na nosaču, što je karakteristika kovalentne imobilizacije enzima. Takođe, ispitivanja stabilnosti imobilisanog tripsina su pokazala da je katalitička aktivnost enzima sačuvana u visokom stepenu (85 %) i nakon godinu dana lagerovanja u fiziološkom rastvoru na 4 °C. Ovakvi rezultati su potvrdili da je stabilnost veze tripsin-oksidisanom celulozno vlakno veoma dobra. Ovo je od velikog značaja jer je nakon dužeg vremenskog perioda sačuvana aktivnost imobilisanog enzima, što može biti korisno u predviđanju trajnosti enzim-aktivnog dejstva ovih materijala i proizvoda na njihovoj osnovi.
- Selektivna oksidacija celuloze natrijum-perjodatom pri različitim uslovima omogućava dobijanje dialdehid celuloze različitog stepena oksidacije, koja može da se koristi kao polazna osnova za dobijanje širokog spektra vlakana specijalne namene. Dobijena dialdehid celuloza može da se upotrebi za imobilizaciju proteina, aminopolisaharida ili boja reakcijom sa njihovim amino grupama, kao materijal za izmenu jona nakon dalje oksidacije do odgovarajućih karboksilnih kiselina, ili nepromenjena za specifične primene. U ovom radu dialdehid celuloza je uspešno iskorišćena kao nosač za imobilizaciju tripsina. Dobijena pamučna i viskozna vlakna sa imobilisanim tripsinom mogla bi da posluže kao biomedicinski tekstilni materijali, u obliku npr. gaze i zavoja, namenjeni prvenstveno za tretman rana s obzirom na dobru biokompatibilnost celuloznih materijala, nekrolitička, anti-inflamatorna, anti-toksična i drenažna svojstva tripsina, kao i ostvarenu visoku stabilnost formiranih biološki aktivnih vlakana.

8. Literatura

- [1] Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.-P., Bohn, A. (2005) Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 44, 3358-3393
- [2] Jovanović, R. S. (1989) 2 Celulozna prirodna i hemijska vlakna, Građevinska knjiga, Beograd
- [3] Ding, S. Y., Himmel, M. E. (2006) The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54, 597-606
- [4] Brown, Jr M. R., Saxena, I. M. (2000) Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers, *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 57-67
- [5] Henriksson, G., Lennholm, H. (2009) Cellulose and carbohydrate chemistry, in *Wood Chemistry and Wood Biotechnology*, Eds. M. Ek, G. Gellerstedt, G. Henriksson, Walter de Gruyter GmbH & Co., Berlin, 71-100
- [6] Payen, A. (1838) Mémoire sur la composition du tissue propre des plantes et du ligneux, *Comptes Rendus*, 7, 1052, 1125
- [7] Hon, D. N.-S. (1994) Cellulose: a random walk along its historical path, *Cellulose*, 1, 1-25
- [8] Haworth, W. N., Hirst, E. L. (1921) The constitution of the disaccharides. Part V: Cellobiose, *Journal of the Chemical Society*, 119, 193-201
- [9] Sponsler, O. L., Dore, W. H. (1926) The structure of ramie cellulose as derived from X-ray data, *Colloid Symposium Monograph*, 4, 174-202
- [10] Kondo, T. (2005) Hydrogen bonds in cellulose and cellulose derivatives, in *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, Ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker, New York, 69-98
- [11] Purves, C. B. (1954) Chain structure, in *Cellulose and Cellulose Derivatives, Part I*, Eds. E. Ott, H. M. Spurlin, Wiley-Interscience, New York, 54
- [12] Marchessault, R. H., Sundararajan, P. R. (1983) Cellulose, in *The polysaccharides*, Ed. G. O. Aspinall, Academic Press, New York, Vol. 2, 12-95
- [13] Stojanović, O., Stojanović, N. (2000) Hemija ugljenih hidrata, Univerzitetska štampa, Beograd
- [14] Gilbert, R. D., Kadla, J. F. (1998) Polysaccharides – Cellulose, in *Biopolymers from renewable resources*, Ed. D. L. Kaplan, Springer-Verlag, Berlin, 47-95
- [15] Pérez, S., Mazeau, K. (2005) Conformations, structures, and morphologies of celluloses, in *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, Ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker, New York, 41-68
- [16] French, A. D., Johnson, G. P. (2009) Cellulose and the twofold screw axis: modeling and experimental arguments, *Cellulose*, 16, 959-973
- [17] Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. (2002) Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I_β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction, *Journal of American Chemical Society*, 124, 9074-9082
- [18] Langan, P., Nishiyama, Y., Chanzy, H. (2001) X-ray structure of mercerized cellulose II at 1 Å resolution, *Biomacromolecules*, 2, 410-416
- [19] Wada, M., Chanzy, H., Nishiyama, Y., Langan, P. (2004) Cellulose III_I crystal structure and hydrogen bonding by synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction, *Macromolecules*, 37, 8548-8555

- [20] Wada, M., Heux, L., Nishiyama, Y., Langan, P. (2009) X-ray crystallographic, scanning microprobe X-ray diffraction, and cross-polarized/magic angle spinning ^{13}C NMR studies of the structure of cellulose III_{II}, *Biomacromolecules*, 10, 302-309
- [21] Nishiyama, Y., Sugiyama, J., Chanzy, H., Langan, P. (2003) Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I_α from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction, *Journal of American Chemical Society*, 125, 14300-14306
- [22] Krässig, H. A. (1996) *Cellulose: structure, accessibility and reactivity*, Gordon and Breach Science Publishers, New York
- [23] David, S. (1997) *The molecular and supramolecular chemistry of carbohydrates*, Oxford University Press, New York, 17-41
- [24] Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W. (1998) *Comprehensive cellulose chemistry, Volume 1, Fundamentals and Analytical Methods*, Wiley-VCH, Weinheim
- [25] Atalla, R. H. (1984) Polymorphism in native cellulose: recent developments, in *Structure, function and biosynthesis of plant cell walls*, Eds. W. M. Dugger, S. Bartinicki-Garcia, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 381-391
- [26] Wiley, J. H., Atalla, R. H. (1987) Raman spectra of celluloses, in *The structures of cellulose*, Ed. R. H. Atalla, (ACS Symposium Series, Vol. 340) American Chemical Society, Washington, DC, 151-168
- [27] Atalla, R. H. (1990) The structures of cellulose, in *Materials interactions relevant to the pulp, paper, and wood industries: Proceedings*, Eds. D. F. Caulfield, J. D. Passaretti, S. F. Sobczynski, Materials Research Society symposium, 1990 April 18-20, San Francisco, CA. Pittsburgh, PA: Materials Research Society, 1990:89-98, Vol. 197
- [28] Yamamoto, H., Horii, F., Odani, H. (1989) Structural changes of native cellulose crystals induced by annealing in aqueous alkaline and acidic solutions at high temperatures, *Macromolecules*, 22, 4130-4132
- [29] Hardy, B. J., Sarko, A. (1996) Molecular dynamics simulations and diffraction-based analysis of the native cellulose fiber: structural modeling of the I_α and I_β phases and their interconversion, *Polymer*, 37, 1833-1839
- [30] Wada, M. (2002) Lateral thermal expansion of cellulose I_β and III_I polymorphs, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 40, 1095-1102
- [31] Kolpak, F. J., Blackwell, J. (1976) Determination of the structure of cellulose II, *Macromolecules*, 9, 273-278
- [32] Langan, P., Nishiyama, Y., Chanzy, H. (1999) A revised structure and hydrogen bonding system in Cellulose II from a Neutron fiber diffraction analysis, *Journal of American Chemical Society*, 121, 9940-9946
- [33] Jonas, R., Farah, L. F. (1998) Production and application of microbial cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 59, 101-106
- [34] Hayashi, J., Sufoka, A., Ohkita, J., Watanabe, S. (1975) The confirmation of existences of cellulose III_I, III_{II}, IV_I, and IV_{II} by the X-ray method, *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, Vol. 13, 23-27
- [35] Sarko, A., Southwick, J., Hayashi, J. (1976) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides 7. Crystal structure of cellulose III, and its relationship to other cellulose polymorphs, *Macromolecules*, 9, 857-863
- [36] Chanzy, H., Henrissat, B., Vincendon, M., Tanner, S., Belton, P. S. (1987) Solid-state ^{13}C -NMR and electron microscopy study on the reversible cellulose I to cellulose III_I transformation in *Valonia*, *Carbohydrate Research*, 160, 1-11
- [37] Gardiner, E. S., Sarko, A. (1985) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides: 16. The crystal structures of celluloses IV_I and IV_{II}, *Canadian Journal of Chemistry*, 63, 173-180

- [38] Buleon, A., Chanzy, H. (1980) Single crystals of cellulose IV_{II}, Preparation and properties, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics*, 18, 1209-1217
- [39] Chanzy, H., Imada, K., Vuong, R. (1978) Electron diffraction from the primary wall of cotton fibers, *Protoplasma*, 94, 299-306
- [40] Nishino, T., Takano, K., Nakamae, K. (1995) Elastic modulus of the crystalline regions of cellulose polymorphs, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 33, 1647-1651
- [41] Nishikawa, S., Ono, S. (1913) Transmission of X-rays through fibrous, lamellar and granular substances, *Mathematico-Physical Society Tokyo*, 7, 131-138
- [42] Friedlich, W., Knipping, P., von Laue, M. (1912) Interferenzen-Erscheinungen bei Röntgenstrahlen, *Sitzungsber math.-phys. Klasse, K. B. Akad. Wiss. München*, 303-322
- [43] Bragg, W. L. (1913) The structure of some crystals as indicated by their diffraction of X-rays, *Proceedings A, Royal Society London*, 89, 248
- [44] Meyer, K. H., Mark, H. (1928) Über den Bau des kristallisierten Anteils der Cellulose, *Ber*, 61, 593-614
- [45] Meyer, K. H., Misch, L. (1937) Position des atomes dans le nouveau module spatial de la cellulose, *Helvetica Chimica Acta*, 20, 232-244
- [46] Sarko, A., Muggli, R. (1974) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides: III. *Valonia* cellulose and cellulose II, *Macromolecules*, 7, 486-494
- [47] Gardner, K. H., Blackwell, J. (1974) The structure of native cellulose, *Biopolymers*, 13, 1975-2001
- [48] Claffey, W., Blackwell, J. (1976) Electron diffraction of *Valonia*. A quantitative interpretation, *Biopolymers*, 15, 1903-1915
- [49] Atalla, R. H., VanderHart, D. L. (1984) Native cellulose: a composite of two distinct crystalline forms, *Science*, 223, 283-285
- [50] VanderHart, D. L., Atalla, R. H. (1984) Studies of microstructure in native celluloses using solid-state ¹³C-NMR, *Macromolecules*, 17, 1465-1472
- [51] VanderHart, D. L., Atalla, R. H. (1987) Further carbon-13 NMR evidence for the coexistence of two crystalline forms in native celluloses, *ACS Symposium Series*, 340, 88-118
- [52] Hirai, A., Horii, F., Kitamaru, R. (1987) Transformation of native cellulose crystals from cellulose I_β to cellulose I_α through solid-state chemical reactions, *Macromolecules*, 20, 1440-1442
- [53] Sugiyama, J., Okano, T., Yamamoto, H., Horii, F. (1990) Transformation of *Valonia* cellulose crystals by an alkaline hydrothermal treatment, *Macromolecules*, 23, 3196-3198
- [54] Sugiyama, J., Vuong, R., Chanzy, H. (1991) Electron diffraction study on the two crystalline phases occurring in native cellulose from an algal cell wall, *Macromolecules*, 24, 4168-4175
- [55] Koyama, M., Helbert, W., Imai, T., Sugiyama, J., Henrissat, B. (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94, 9091-9095
- [56] Sturcova, A., His, I., Apperley, D. C., Sugiyama, J., Jarvis, M. C. (2004) Structural details of crystalline cellulose from higher plants, *Biomacromolecules*, 5, 1333-1339
- [57] Kono, H., Yunoki, S., Shikano, T., Fujiwara, M., Erata, T., Kawai, M. (2002) CP/MAS ¹³C NMR study of cellulose and cellulose derivatives. 1. Complete assignment of the CP/MAS ¹³C NMR spectrum of the native cellulose, *Journal of American Chemical Society*, 124, 7506-7511
- [58] Rowland, S. P., Howley, P. S. (1988) Hydrogen bonding on accessible surfaces of cellulose from various sources and relationship to order within crystalline regions, *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 26, 1769-1778

- [59] Imai, T., Sugiyama, J. (1998) Nanodomains of I_{α} and I_{β} cellulose in algal microfibrils, *Macromolecules*, 31, 6275-6279
- [60] Sassi, J.-F., Tekely, P., Chanzy, H. (2000) Relative susceptibility of the I_{α} and I_{β} phases of cellulose towards acetylation, *Cellulose*, 7, 119-132
- [61] Yamamoto, H., Horii, F. (1993) CP/MAS ^{13}C NMR analysis of the crystal transformation induced for *Valonia* cellulose by annealing at high temperature, *Macromolecules*, 26, 1313-1317
- [62] Larsson, P. T., Wickholm, K., Iversen, T. (1997) A CP/MAS ^{13}C -NMR investigation of molecular ordering in celluloses, *Carbohydrate Research*, 302, 19-25
- [63] Larsson, P. T., Westermarck, U., Iversen, T. (1995) Determination of the cellulose I_{α} allomorph content in a tunicate cellulose by CP/MAS ^{13}C -NMR spectroscopy, *Carbohydrate Research*, 278, 339-343
- [64] O'Sullivan, A. C. (1997) Cellulose: the structure slowly unravels, *Cellulose*, 4, 173-207
- [65] Andress, K. R. (1929) The X-ray diagram of mercerized cellulose, *Zeitschrift Physikalische Chemie B*, 4, 190-206
- [66] Buleon, A., Chanzy, H. (1978) Single crystals of cellulose II, *Journal of Polymer Science: Polymer Physics*, 16, 833-839
- [67] Ahmed, A. U., Ahmed, N., Aslam, J., Butt, N. M., Khan, Q. H., Atta, M. A. (1976) Neutron diffraction on studies of the unit cell of cellulose II, *Journal of Polymer Science: Polymer Letters*, 14, 561-564
- [68] Wellard, H. J. (1954) Variation in the lattice spacing of cellulose, *Journal of Polymer Science*, 13, 471-476
- [69] Stipanovic, A. J., Sarko, A. (1976) Packing analysis of carbohydrates and polysaccharides: 6. Molecular and crystal structure of regenerated cellulose II, *Macromolecules*, 9, 851-857
- [70] Raymond, S., Kvick, Å, Chanzy, H. (1995) The Structure of Cellulose II: A Revisit, *Macromolecules*, 28, 8422-8425
- [71] Aabloo, A., French, A. D., Mikelsaar, R. H. (1995) Packing energy calculations on the crystalline structure of cellulose I, in *Cellulose and cellulose derivatives: physicochemical aspects and industrial applications*, Ed. J.F. Kennedy, Woodhead publishing Ltd., 51-55
- [72] Horii, F., Hirai, A., Kitamaru, R. (1983) Solid-state ^{13}C -NMR study of conformations of oligosaccharides and cellulose, *Polymer Bulletin*, 10, 357-361
- [73] Newman, R. H., Hemmingson, J. A. (1995) Carbon-13 NMR distinction between categories of molecular order and disorder in cellulose, *Cellulose*, 2, 95-110
- [74] RoyChowdhury, P., Kumar, V. (2006) Fabrication and evaluation of porous 2,3-dialdehydecellulose membrane as a potential biodegradable tissue-engineering scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research*, 76A, 300-309
- [75] Fengel, D., Jacob, H., Strobel, C. (1995) Influence of the alkali concentration on the formation of cellulose II – Study by X-ray diffraction and FTIR spectroscopy, *ibid.* 49, 505-511
- [76] Simon, I., Glasser, L., Scheraga, H. A., Manley, R. St. J. (1988) Structure of cellulose. 2. Lowenergy crystalline arrangements, *ibid.* 21, 990-998
- [77] Hermans, P. H. (1949) *Physics and Chemistry of Cellulose Fibres*, Elsevier, New York, 13-20
- [78] Kondo, T., Sawatari, C. (1996) A fourier transform infra-red spectroscopic analysis of the character of hydrogen bonds in amorphous cellulose, *Polymer*, 37, 393-399
- [79] Fink, H.-P., Kunze, J., Philipp, B., Serimaa, R., Paakkari, T. (1987) The structure of amorphous cellulose as revealed by wide-angle X-ray scattering, *Polymer*, 28, 1265-1270

- [80] Hirai, A., Horii, F., Kitamaru, R. (1990) Carbon-13 spin-lattice relaxation behavior of the crystalline and noncrystalline components of native and regenerated celluloses, *Cellulose Chemistry and Technology*, 24, 703-711
- [81] Kremer, R., Tabb, D. (1990) Paper: The beneficially interactive support medium for diagnostic test development, *American Laboratory*, 22, 136-143
- [82] Saxena, I. M., Brown, Jr R. M. (2005) Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts, *Annals of Botany*, 96, 9-21
- [83] <http://genomics.energy.gov/gallery/biomass/detail.np/detail-06.html>, 23. 07. 2010
- [84] Fink, H.-P., Hofmann, D., Philipp, B. (1995) Some aspects of lateral chain order in cellulose from X-ray scattering, *Cellulose*, 2, 51-70
- [85] Nishiyama, Y. (2009) Structure and properties of the cellulose microfibril, *Journal of Wood Science*, 55, 241-249
- [86] <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/fo26/03.jpg>, 23. 07. 2010
- [87] <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/newstat/stat38.htm>, 23. 07. 2010
- [88] Kroon-Batenburg, L. M. J., Kroon, J., Nordholt, M. G. (1986) Chain modulus and intramolecular hydrogen bonding in native and regenerated cellulose fibres, *Polymer Communications*, 27, 290-292
- [89] Hermans, P. H., Heikens, D., Weidinger A. (1959) A quantitative investigation on the X-ray small angle scattering of cellulose fibers. Part II. The scattering power of various cellulose fibers, *Journal of Polymer Science*, 35, 145-165
- [90] Krässig, H. A. (1993) Effect of structure and morphology on accessibility and reactivity, in *Cellulose: Structure, Accessibility, and Reactivity*, Vol. 11, Ed. H. A. Krässig, Gordon and Breach Science Publishers, Yverdon, 167-324
- [91] Krässig, H. A. (1984) Struktur und reaktivität von Cellulosafasern, *Das Papier*, 38, 571-578
- [92] Stana-Kleinsschek, K., Kreze, T., Ribitsch, V., Simona, S. (2001) Reactivity and electrokinetical properties of different types of regenerated cellulose fibres, *Colloid Surfaces*, 195, 275-284
- [93] Katkevich, Y., Milutina, S. (1972) Wood cell wall and its change under chemical treatments, *Zinatne*, Riga
- [94] <http://microlabgallery.com/gallery-fiber.aspx>, 15. 09. 2010
- [95] Ander, P., Hilden, L., Daniel, G. (2008) Cleavage of softwood kraft pulp fibres by HCl and cellulases, *BioResources*, 3, 477-490
- [96] Esau, K. (1977) Cell wall, in *Plant Anatomy*, John Wiley & Sons, New York, 43-60
- [97] Salisbury, F. B., Ross, C. W. (1992) Plant physiology and plant cells, in *Plant Physiology*, Wadsworth, Belmont, 3-26
- [98] Goodwin, T. W., Mercer, E. I. (1983) The plant cell wall, in *Introduction to Plant Biochemistry*, Pergamon Press, New York, 55-91
- [99] Bidlack, J. E. (1990) Cell-wall components and lignin biosynthesis in forages, Ph.D. Dissertation, Iowa State Univ., Ames, IA
- [100] Ioelovich, M., Ivulonok, Z. (1987) Study of structure-strength relationship for cellulose fibers and films, *Wood Chemistry*, 4, 3-8
- [101] Ioelovich, M., Leykin, A. (2008) Structural investigations of various cotton fibers and cotton celluloses, *BioResources*, 3, 170-177
- [102] Ioelovich, M. (2008) Cellulose as a nanostructured polymer: a short review, *BioResources*, 3, 1403-1418
- [103] Matsuda, Y., Kowsaka, K., Okajima, K., Kamide, K. (1992) Structural change of cellulose contained in immature cotton boll during its growth, *Polymer International*, 27, 347-351
- [104] Takahashi, Y., Matsunaga, H. (1991) Crystal structure of native cellulose, *Macromolecules*, 24, 3968-3969

- [105] Samir, O. M., Somashekar, R. (2007) Intrinsic strain effect on crystal and molecular structure of (dch32) cotton fiber, *Powder Diffraction*, 22, 20-26
- [106] Ghosh, P. (2004) *Fibre science and technology*, Tata McGraw-Hill, New Delhi
- [107] Krakhmalev, V. A., Paiziev, A. A. (2006) Spiral structures of cotton fiber, *Cellulose*, 13, 45-52
- [108] Hsieh, Y.-L. (1999) Structural development of cotton fibers and linkages to fiber quality, in *Cotton fibers: developmental biology, quality improvement and textile processing*, Ed. A. S. Basra, The Haworth Press, New York, 137-166
- [109] Patel, G. S., Bhama Iyer, P., Sreenivasan, S., Krishna Iyer, K. R. (1990) Reversals in cotton: A study with scanning electron microscopy, *Textile Research Journal*, 60, 771-774
- [110] <http://www.cottoninc.com/Cotton-Nonwoven-Technical-Guide/>, 15. 09. 2010
- [111] Mehta, P. C., Srivastava, H. C., Dweltz, N. E., Harshe, S. N., Madan, G. L., Kulshreshtha, A. K. (1974) *Modification of cellulose and other polysaccharides*, ATIR silver jubilee monographs, Textile industries research association, Ahmadabad, India
- [112] Kothari, V. K. (2000) *Progress in textile: science and technology*, Textile fibers: developments and innovations, Vol 2, IAFL, New Delhi, India
- [113] Mishra, S. P. (2000) *A text book of fibre science and technology*, New Age International, New Delhi
- [114] Mitchell, R., Carr, C. M., Parfitt, M., Vickerman, J. C., Jones, C. (2005) Surface chemical analysis of raw cotton fibres and associated materials, *Cellulose*, 12, 629-639
- [115] <http://cotton.missouri.edu/Classroom-Physical-Structure.html>, 15. 09. 2010
- [116] Peeters, M.-C., De Langhe, E. (1986) Cellulose packing density in the secondary wall of never dried cotton fibers, *Textile Research Journal*, 56, 755-758
- [117] Frey-Wyssling, A. (1957) A general structure of fibres, in *Proceedings of the Transactions of the First Fundamental Research Symposium*, BPBMA, Ed. F. Bolam, Cambridge, 1-5
- [118] <http://unctad.org/infocomm/anglais/cotton/characteristics.htm>, 15. 09. 2010
- [119] <http://unctad.org/infocomm/anglais/cotton/quality.htm>, 15. 09. 2010
- [120] <http://www.engr.utk.edu/mse/Textiles/Cotton-fibers.htm>, 15. 09. 2010
- [121] *The Classification of Cotton (2001) USDA Agricultural Marketing Service, Agricultural Handbook 566*, <http://www.extension.org/mediawiki/files/6/60/The-Classification-of-Cotton.pdf>
- [122] Škundrić, P., Kostić, M., Medović, A., Mihailović, T., Asanović, K., Sretković, Lj. (2008) *Tekstilni materijali, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd*
- [123] Werber, F. X., Backe, E. E. (1994) Textile industry needs, in *Cotton ginner's handbook*, Eds. W. S. Anthony, W. D. Mayfield, USDA, *Agricultural Handbook 503*, 293-306
- [124] Moore, J. F. (1994) The classification of cotton, in *Cotton ginner's handbook*, Eds. W. S. Anthony, W. D. Mayfield, USDA, *Agricultural Handbook 503*, 287-292
- [125] Georgiev, N., Nikolić, T., Radivojević, D., Ristić, I. (2007) *Tekstilna vlakna*, VSŠT, Leskovac
- [126] <http://www.cottoninc.com/ClassificationofCotton/?Pg=3#Classification>, 15. 09. 2010
- [127] van der Sluijs, M. H. J., Hunter, L. (1999) Neps in cotton lint, *Textile Progress*, 28, 4, 1-51
- [128] Hebert, J. J., Boylston, E. K., Thibodeaux, D. P. (1988) Anatomy of a nep, *Textile Research Journal*, 58, 7, 380-382
- [129] Bel, P. D. (2004) *Cotton quality - fibre to fabric: Fibre properties relationships to fabric quality*, PhD thesis, University of Southern Queensland
- [130] Hearle, L. W. S. (2001) Physical structure and fibre properties, in *Regenerated cellulose fibres*, Ed. C. Woodings, Woodhead Publishing Ltd., Abington, 199-234
- [131] <http://www.engr.utk.edu/mse/Textiles/Rayon-fibers.htm>, 19. 09. 2010

- [132] Woodings, C. (2001) A brief history of regenerated cellulosic fibres, in Regenerated cellulose fibres, Ed. C. Woodings, Woodhead Publishing Ltd., Abington, 1-21
- [133] Sengupta, A. K. (1997) Rayon fibres, in Manufactured fibre technology, Eds. V. B. Gupta, V. K. Kothari, Chapman & Hall, London, 480-513
- [134] Gupta, B. S. (2007) Manufactured textile fibers, in Kent and Riegel's handbook of industrial chemistry and biotechnology Vol. 1, Ed. J. A. Kent, Springer Science+Business Media, LLC., New York, 431-498
- [135] Turbak, A. (1985) Rayon, in Encyclopedia of polymer science and engineering, Vol. 14, John Wiley & Sons, Inc., New York, 55
- [136] Nikolić, T. (2008) Dobijanje antimikrobnih medicinskih materijala na bazi celuloze, Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Leskovac
- [137] El Seoud, O. A., Heinze, T. (2005) Organic esters of cellulose: New perspectives for old polymers, in Polysaccharides I: Structure, characterization and use, Ed. T. Heinze, Springer-Verlag, Berlin, 103-150
- [138] Tasker, S., Badyal, J. P. S., Backson, S. C. E., Richards, R. W. (1994) Hydroxyl accessibility in celluloses, *Polymer*, 35, 4717-4721
- [139] Sjöström, E. (1993) Wood chemistry: fundamentals and applications, Academic Press, London
- [140] Ioelovich, M. (2009) Accessibility and crystallinity of cellulose, *BioResources*, 4, 1168-1177
- [141] Bertran, M. S., Dale, B. E. (2003) Determination of cellulose accessibility by differential scanning calorimetry, *Journal of Applied Polymer Science*, 32, 4241-4253
- [142] Inglesby, M. K., Zeronian, S. H. (1996) The accessibility of cellulose as determined by dye adsorption, *Cellulose*, 3, 165-181
- [143] Rowland, S. P. (1977) Cellulose: Pores, internal surfaces, and the water interface, in Textile and paper chemistry and technology, Ed. J. C. Arthur, ACS Symposium Series, No. 49, American Chemical Society, Washington, DC, 20-45
- [144] Папков, С. П., Файнберг, Э. З. (1976) Взаимодействие целлюлозы и целлюлозных материалов с водой, Изд. Химия, Москва
- [145] Оудиан, Дж. (1974) Основы химии полимеров, Изд. Мир, Москва
- [146] The Editors of "Dyer and Calico Printer". Mercerisation: a practical and historical manual. Vol.I. London: Heywood and company LTD (1903), 240
- [147] Nishimura, H., Okano, T., Sarko, A. (1991) Mercerization of cellulose. 5. Crystal and molecular structure of Na-cellulose I, *Macromolecules*, 24, 759-770
- [148] Kamide, K., Okajima, K., Kowsaka, K. (1985) Determination of intramolecular hydrogen bonds and selective coordination of sodium cation in alkalicellulose by CP/MASS C^{13} NMR, *Polymer Journal*, 17, 707-711
- [149] Takahashi, M., Ookubo, M., Takenaka, H. (1991) Solid state ^{13}C NMR spectra analysis of alkalicellulose, *Polymer Journal*, 23, 1009-1014
- [150] Fink, H. P., Walenta, E., Kunze, J., Mann, G. (1995) Wide angle X-Ray and solid state C-NMR studies of cellulose alkalization, in Cellulose and cellulose derivatives: Physico-chemical aspects and industrial applications, Eds. J. F. Kennedy, G. O. Phillips, P. A. Williams, Woodhead publishing Ltd.
- [151] Isogai, A. (1997) NMR Analysis of cellulose dissolved in aqueous NaOH solutions, *Cellulose*, 4, 99-107
- [152] Egal, M. (2006) Structure and properties of cellulose/NAOH aqueous solutions, gels and regenerated objects, PhD thesis, Ecole des Mines de Paris
- [153] Sobue, H., Kiessig, H., Hess, K. (1939) The cellulose-sodium hydroxide-water system as a function of the temperature, *Ztach. Physik. Chem. B*, 43, 309-328

- [154] Hayashi, J., Yamada, T., Shimizu, Y.-L. (1989) Memory phenomenon of the original crystal structure in allomorphs of Na-cellulose, in *Cellulose and Wood: Chemistry and Technology*, Ed. C. Schuerch, Proceedings of the Tenth Cellulose Conference, John Wiley and Sons, New York, 77-102
- [155] Nishimura, H., Okano, T., Sarko, A. (1991) Mercerization of cellulose. 6. Crystal and molecular structure Na-cellulose IV, *Macromolecules*, 24, 771-778
- [156] Okano, T., Sarko, A. (1985) Mercerization of cellulose. II. Alkali-cellulose intermediates and a possible mercerization mechanism, *Journal of Applied Polymer Science*, 30, 325-332
- [157] Okano, T., Sarko, A. (1984) Mercerization of cellulose. I. X-ray diffraction evidence for intermediate structures, *Journal of Applied Polymer Science*, 29, 4175-4182
- [158] Nishiyama, Y., Kuga, S., Okano, T. (2000) Mechanism of mercerization revealed by X-ray diffraction, *Journal of Wood Science*, 46, 452-457
- [159] Džamić, M. (1984) *Biohemija*, Građevinska knjiga, Beograd
- [160] Marsh, J. T. (1942) *An Introduction to the Chemistry of Cellulose*, Chapman & Hall Ltd., London
- [161] Isogai, A. (2001) Chemical modification of cellulose, in *Wood and cellulosic chemistry*, Eds. D.N.-S. Hon & N. Shiraishi, Marcel Dekker, New York, 599-626
- [162] Nevell, T. P. (1963) Oxidation, in *Methods in carbohydrate chemistry*, Ed. R. L. Whistler, Academic Press, New York, 164-189
- [163] David, S. (1997) *The molecular and supramolecular chemistry of carbohydrates: chemical introduction to the glycosciences*, Oxford University Press, New York
- [164] Saito, T., Isogai, A. (2004) TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The effect of oxidation conditions on chemical and crystal structures of the water-insoluble fractions, *Biomacromolecules*, 5, 5, 1983-1989
- [165] Saito, T., Okita, Y., Nge, T. T., Sugiyama, J., Isogai, A. (2006) TEMPO-mediated oxidation of native cellulose: Microscopic analysis of fibrous fractions in the oxidized products, *Carbohydrate Polymers*, 65, 4, 435-440
- [166] Isogai, A., Kato, Y. (1998) Preparation of polyuronic acid from cellulose by TEMPO-mediated oxidation, *Cellulose*, 5, 3, 153-164
- [167] Shibata, I. Isogai, A. (2003) Nitroxide-mediated oxidation of cellulose using TEMPO derivatives: HPSEC and NMR analyses of the oxidized products, *Cellulose*, 10, 4, 335-341
- [168] Kostić, M., Škundrić, P., Praskalo, J., Pejić, B., Medović, A. (2007) New functionalities in cellulosic fibers developed by chemical modification, *Hemijska industrija*, 61, 5, 233-237
- [169] Hirota, M., Tamura, N., Saito, T., Isogai, A. (2009) Oxidation of regenerated cellulose with NaClO₂ catalyzed by TEMPO and NaClO under acid-neutral conditions, *Carbohydrate Polymers*, 78, 2, 330-335
- [170] Džokić, D. (1976) *Hemijska dorada tekstilnog materijala*, TMF, Beograd
- [171] Cross, C. F., Bevan, E. J., Beadle, C. (2005) *Cellulose*, Adamant Media Corporation, London
- [172] Sinnott, M. L. (2007) *Carbohydrate chemistry and biochemistry: structure and mechanism*, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- [173] Bobbitt, J. M. (1956) Periodate oxidation of carbohydrate, in *Advances in carbohydrate chemistry*, Vol. 11, Ed. M. L. Wolfrom, Academic Press, New York, 1-41
- [174] Malaprade, L. (1928) Oxidation of some polyalcohols by periodic acid – applications, *Comptes Rendus*, 186, 382-384
- [175] Malaprade, L. (1928) Action of polyalcohols on periodic acid. Analytical application, *Bulletin de la Societe Chimique de France*, 43, 683-696

- [176] Fleury, P. F., Lange, J. (1932) The oxidation of acid alcohols and sugars by periodic acid, *Comptes Rendus*, 195, 1395-1397
- [177] Jackson, E. L., Hudson, C. S. (1937) Application of the cleavage type of oxidation by periodic acid to starch and cellulose, *Journal of the American Chemical Society*, 59, 2049-2050
- [178] Browning, B. L. (1967) *Methods of Wood Chemistry*, Vol. II, Interscience Publishers, New York, 538
- [179] Nevell, T. P. (1957) The mechanism of the oxidation of cellulose by periodate, *Journal of the Textile Institute*, Vol 48, No 12, T484-T494
- [180] Hughes, G., Nevell, T. P. (1948) The mechanism of the oxidation of glucose by periodate, *Transactions of the Faraday Society*, 44, 941-948
- [181] Buist, G. J., Bunton, C. A. (1954) The mechanism of oxidation of α -glycols by periodic acid. I. Ethylene glycol, *Journal of Chemical Society*, 1406-1413
- [182] Kim, U.-J., Kuga, S., Wada, M., Okano, T., Kondo, T. (2000) Periodate oxidation of crystalline cellulose, *Biomacromolecules*, 1, 488-492
- [183] Varma, A. J., Kulkarni, M. P. (2002) Oxidation of cellulose under controlled conditions, *Polymer Degradation and Stability*, 77, 25-27
- [184] Head, F. S. H. (1953) The effect of daylight on the periodate oxidation of β -methyl glucoside, β -methyl cellobioside, and cellulose, *Journal of the Textile Institute*, 44, T209-T223
- [185] Sirvio, J., Hyvakko, U., Liimatainen, H., Niimimaki, J., Hormi, O. (2011) Periodate oxidation of cellulose at elevated temperatures using metal salts as cellulose activators, *Carbohydrate Polymers*, 83, 1293-1297
- [186] Aimin, T., Hongwey, Z., Gang, C., Guohui, X., Wenzhi, L. (2005) Influence of ultrasound treatment on accessibility and regioselective oxidation reactivity of cellulose, *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 467-472
- [187] Nevell, T. P. (1985) Oxidation of cellulose, in *Cellulose Chemistry and its Application*, Eds. T. P. Nevell, S. H. Zeronian, John Wiley & Sons, New York, 243-265
- [188] Princi, E., Vicini, S., Pedemonte, E., Proietti, N., Capitani, D., Segre, A. L., D'Orazio, L., Gentile, G., Polcaro, C., Martuscelli, E. (2004) Physical and chemical characterization of cellulose based textiles modified by periodate oxidation, *Macromolecular Symposia*, 218, 343-352
- [189] Varma, A. J., Chavan, V. B. (1995) A study of crystallinity changes in oxidized celluloses, *Polymer Degradation and Stability*, 49, 245-250
- [190] Potthast, A., Kostic, M., Schiehser, S., Kosma, P., Rosenau, T. (2007) Studies on oxidative modifications of cellulose in the periodate system: Molecular weight distribution and carbonyl group profiles, *Holzforschung*, 61, 662-667
- [191] Calvini, P., Conio, G., Princi, E., Vicini, S., Pedemonte, E. (2006) Viscometric determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose Part II. Topochemistry of oxidation, *Cellulose*, 13, 571-579
- [192] Calvini, P., Conio, G., Lorenzoni, M., Pedemonte, E. (2004) Viscometric determination of dialdehyde content in periodate oxycellulose. Part I. Methodology, *Cellulose*, 11, 99-107
- [193] Margutti, S., Vicini, S., Proietti, N., Capitani, D., Conio, G., Pedemonte, E., Segre, A. L. (2002) Physical-chemical characterization of acrylic polymers grafted on cellulose, *Polymer*, 43, 6183-6194
- [194] Kim, U.-J., Wada, M., Kuga, S. (2004) Solubilization of dialdehyde cellulose by hot water, *Carbohydrate Polymers*, 56, 7-10
- [195] Potthast, A., Schiehser, S., Rosenau, T., Kostic, M. (2009) Oxidative modifications of cellulose in the periodate system – Reduction and beta-elimination reactions, *Holzforschung*, 63, 12-17

- [196] Rahn, K., Heinze, Th. (1998) New cellulosic polymers by subsequent modification of 2,3-dialdehyde cellulose, *Cellulose Chemistry and Technology*, 32, 173-183
- [197] Chavan, V. B., Sarwade, B. D., Varma, A. J. (2002) Morphology of cellulose and oxidized cellulose in powder form, *Carbohydrate Polymers*, 50, 41-45
- [198] Varma, A. J., Chavan, V. B., Rajmohan, P. R., Ganapathy, S. (1997) Some observation of the high-resolution solid-state CP-MAS ¹³C NMR spectra of periodate-oxidized cellulose, *Polymer Degradation and Stability*, 58, 257-260
- [199] Laurence, S., Bareille, R., Baquey, C., Fricain, J. C. (2005) Development of a resorbable macroporous cellulosic material used as hemostatic in an osseous environment, *Journal of Biomedical Materials Research*, 73A, 422-429
- [200] Singh, M., Ray, A. R., Vasudevan, P. (1982) Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose, *Biomaterials*, 3, 16-20
- [201] Hon, D. N.-S. (1996) Cellulose and its derivatives: Structures, reactions, and medical uses, in *Polysaccharides in medical application*, Ed. S. Dumitriu, Marcel Dekker, New York, 87-105
- [202] Siraqusa, J. A. (1977) Method of inhibiting microbial activity using insoluble dialdehyde polysaccharides, US Patent 4034084
- [203] Maekawa, E., Koshijima, T. (1984) Properties of 2,3-dicarboxy cellulose combined with various metallic ions, *Journal of Applied Polymer Science*, 29, 2289-2297
- [204] Carneiro-da-Cunha, M. G., Rocha, J. M. S., Garcia, F. A. P., Gil, M. H. (1999) Lipase immobilization on to polymeric membranes, *Biotechnology Techniques*, 13, 403-409
- [205] Varavinit, S., Chaokasem, N., Shobsngob, S. (2001) Covalent immobilization of a glucoamylase to bagasse dialdehyde cellulose, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 721-725
- [206] Janjic, S., Kostic, M., Vucinic, V., Dimitrijevic, S., Popovic, K., Ristic, M., Skundric, P. (2009) Biologically active fibers based on chitosan-coated lyocell fibers, *Carbohydrate Polymers*, 78, 240-246
- [207] Liu, X. D., Nishi, N., Tokura, S., Sakairi, N. (2001) Chitosan coated cotton fiber: preparation and physical properties, *Carbohydrate Polymers*, 44, 233-238
- [208] Kim, U.-J., Kuga, S. (2002) Ion-exchange separation of proteins by polyallyllamine-grafted cellulose gel, *Journal of Chromatography A*, 955, 191-196
- [209] Kim, U.-J., Kuga, S. (2000) Reactive interaction of aromatic amines with dialdehyde cellulose gel, *Cellulose*, 7, 287-297
- [210] Esquisabel, A., Hernández, R. M., Gascón, A. R., Pedraz, J. L. (2006) Immobilized enzymes for biomedical applications, in *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. J. M. Guisan, Humana Press, Totowa, New Jersey, 283-294
- [211] Vol'f, L. A., Shamolina, I. I., Khokhlova, V. A. (1979) Production, properties, and applications of enzyme-active fibres, *Fibre Chemistry*, Vol. 11, 262-268
- [212] Jach, M., Sugier, H. (1983) Adsorption of glucoamylase on DEAE-cellulose, *Starch-Stärke*, 35, 12, 427-430
- [213] Przybyt, M., Sugier, H. (1988) Immobilization of glucoamylase on cellulose, *Starch-Stärke*, 40, 7, 275-279
- [214] Axén, R., Porath, J., Ernback, S. (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature*, 214, 1302-1304
- [215] Lilly, M. D. (1970) Immobilized enzymes, in *Methods in Enzymology*, Ed. K. Mosbach, Academic Press, New York, 44, 46
- [216] Kay, G., Crook, E. M. (1967) Coupling of enzymes to cellulose using chloro- δ -triazines, *Nature*, 216, 514

- [217] Crook, E. M., Brocklehurst, K., Wharton, C. M. (1970) Cellulose-insolubilized enzymes, in *Methods in Enzymology*, Eds. G. E. Perlmann & L. Lovand, Academic Press, New York, 19, 963
- [218] Kumar, S. D., Kulkarni, A. V., Kalyanraman, R., Krishnamoorthy, T. S. (1997) Whole blood glucose determination using glucose oxidase immobilized on cotton cheese cloth, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 338, 1-2, 135-140
- [219] Kamath, N., Melo, J. S., D'Souza, S. F. (1988) Urease immobilized on polyethyleneimine cotton cloth, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 19, No. 3, 251-258
- [220] Yamazaki, H., Cheok, R. K. H., Fraser, A. D. E. (1984) Immobilization of invertase on polyethylenimine-coated cotton cloth, *Biotechnology Letters*, Vol. 6, No. 3, 165-170
- [221] You-Lo, H., Wang, Y., Chen, H. (2005) Enzyme immobilization onto ultrahigh specific surface cellulose fibers via amphiphilic (PEG) spacers and electrolyte (PAA) grafts, *A.C.S. symposium series*, Vol. 900, 63-79
- [222] Ibrahim, N. A., Gouda, M., El-shafei, A. M., Abdel-Fatah, O. M. (2007) Antimicrobial activity of cotton fabrics containing immobilized enzymes, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 104, 3, 1754-1761
- [223] Edwards, J. V., Ullah, A. J., Sethumadhavan, K., Batiste, S., Bel-Berger, P., Von Hoven, T., Goynes, W. R., Condon, B., Caston-Pierre, S. (2007) New uses for immobilized enzymes and substrates on cotton and cellulose fibers, in *Industrial application of enzymes on carbohydrate-based material*, Eds. G. Eggleston & J. R. Vercellotti, American Chemical Society, Vol. 972, 171-185
- [224] Innocent, C., Seta, P. (2006) Development of chemical microreactors by enzyme immobilization onto textiles, in *Proteins at solid-liquid interfaces*, Ed. P. Déjardin, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 199-230
- [225] Li, F.-Y., Xing, Y.-J., Ding, X. (2007) Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 40, 7, 1692-1697
- [226] Lee, K. H., Kang, G. D., Shin, B. S., Park, Y. H. (2005) Sericin-fixed silk fiber as an immobilization support of enzyme, *Fibers and Polymers*, Vol. 6, No. 1, 1-5
- [227] Zhang, Y.-Q. (1998) Natural silk fibroin as a support for enzyme immobilization, *Biotechnology Advances*, 16, 5-6, 961-971
- [228] Wang, Q., Fan, X., Hu, Y., Yuan, J., Cui, L., Wang, P. (2009) Antibacterial functionalization of wool fabric via immobilizing lysozymes, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol. 32, No 5, 633-639
- [229] Moeschel, K., Nouaimi, M., Steinbrenner, C., Bisswanger, H. (2003) Immobilization of thermolysin to polyamide nonwoven materials, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 82, No. 2, 190-199
- [230] Nouaimi, M., Möschel, K., & Bisswanger, H. (2001) Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 567-574
- [231] Cao, L. (2005) *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design*, Wiley-VCH, Weinheim
- [232] Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E. (2007) Functionalization of catalase for a photochemical immobilization on poly(ethylene terephthalate), *Biotechnology Journal*, Vol. 2, 3, 347-352
- [233] Medović, A. H. (1998) Proučavanje dobijanja vlakana sa programiranom biološkom aktivnošću, *Magistarska teza*, TMF, Beograd
- [234] Bayramoğlu, G., Karakışla, M., Altıntaş, B., Metin, A. U., Saçak, M., Arıca, M. Y. (2009) Polyaniline grafted polyacrylonitrile conductive composite fibers for reversible immobilization of enzymes: Stability and catalytic properties of invertase, *Process Biochemistry*, 44, 8, 880-885
- [235] Jovanović, R. S. (1990) *Sintetizovana organska vlakna*, Građevinska knjiga, Beograd

- [236] Kamal, H., Sabry, G. M., Lotfy, S., Abdallah, N. M., Rosiak, J., Hegazy, E. A. (2008) Immobilization of glucoamylase on polypropylene fibers modified by radiation induced graft copolymerization, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 45, 1, 65-75
- [237] Yudanova, T. N., Skokova, I. F., Gavrikova, L. I., Gal'braikh, L. S. (1999) Fabrication of textile materials with a combined biological effect, *Fibre Chemistry*, Vol. 31, No. 2, 90-95
- [238] Tolstykh, P. I., Ignatyuk, T. E., Gostishchev, V. K. (1994) Morphological study of the effects of textile-immobilized enzymes on an experimental purulent wound, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 118, No. 9, 1027-1029
- [239] Yudanova, T. N., Reshetov, I. V. (2006) Drug synthesis methods and manufacturing technology. Modern wound dressings: making and properties. II. Wound dressings containing immobilized proteolytic enzymes (a review), *Pharmaceutical Chemistry Journal*, Vol. 40, No. 8, 430-434
- [240] Kotel'nikova, N. E., Mikhailova, S. A., Vlasova, E. N. (2007) Immobilization of proteolytic enzymes trypsin and α -chymotrypsin to cellulose matrix, *Russian Journal of Applied Chemistry*, 80, 322-329
- [241] Monteiro, F. M. F., Silva, G. M. M., Silva, J. B. R., Porto, C. S., Carvalho Jr., L. B., Lima-Filho, J. L., Carneiro-Leão, A. M. A., Carneiro-da-Cunha, M. G., Porto, A. L. F. (2007) Immobilization of trypsin on polysaccharide film from *Anacardium occidentale* L. and its application as cutaneous dressing, *Process Biochemistry*, 42, 884-888
- [242] Cavalcante, A. H. M., Carvalho Jr., L. B., Carneiro-da-Cunha, M. G. (2006) Cellulosic exopolysaccharide produced by *Zoogloea* sp. as a film support for trypsin immobilization, *Biochemical Engineering Journal*, 29, 258-261
- [243] Kumar, A., Gupta, M. N. (1998) Immobilization of trypsin on an enteric polymer Eudragit S-100 for the biocatalysis of macromolecular substrate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 5, 289-294
- [244] Villalonga, R., Villalonga, M. L., Gómez, L. (2000) Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 483-490
- [245] Xi, F., Wu, J., Jia, Z., Lin, X. (2005) Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead, *Process Biochemistry*, 40, 2833-2840
- [246] Zelenetskii, A. N., Akopova, T. A., Kildeeva, N. R., Vikhoreva, G. A., Obolonkova, E. S., Zharov, A. A. (2003) Immobilization of trypsin on polysaccharides upon intense mechanical treatment, *Russian Chemical Bulletin*, 52, 2073-2077
- [247] Seabra, I. J., Gil, M. H. (2007) Cotton gauze bandage: a support for protease immobilization for use in biomedical applications, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 43, No. 4, 535-542
- [248] Kovalenko, G. A. (1998) Immobilized proteolytic enzymes for external use, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, Vol. 32, No. 4, 213-216
- [249] Karlson, P. (1989) *Biokemija, Školska knjiga*, Zagreb
- [250] Keil, B. (1971) Trypsin, in *The Enzymes, III Hydrolysis: peptide bonds*, Ed. P. D. Boyer, Academic Press, New York, 250-276
- [251] Yon-Kahn, J., Hervé, G. (2005) *Molecular and cellular enzymology*, Springer-Verlag, Berlin
- [252] Higakiz, J. N., Lights, A. (1986) Independent refolding of domains in the pancreatic serine proteinases, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 261, No. 23, 10606-10609
- [253] Petronijević, Ž. (2000) Opšta i primenjena enzimologija I, Tehnološki fakultet, Leskovac
- [254] Simon, M. L., László, K., Kotormán, M., Szajáni, B. (2001) A comparative study of the conformational stabilities of trypsin and α -chymotrypsin, *Acta Biologica Szegediensis*, 45 (1-4), 43-49

- [255] Olsen, J. V., Ong, S.-E., Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues, *Molecular & Cellular Proteomics*, 3, 6, 608-614
- [256] Martin, G. J. (1961) Enteric coated trypsin and chymotrypsin anti-inflammatory compositions, US Patent 3004893
- [257] Seligman, B. (1955) Trypsin: an anti-inflammatory agent, *Angiology*, Vol. 6, No. 3, 208-211
- [258] Margel, S., Sturchak, S. (1999) Bioactive conjugates of cellulose with amino compounds, US Patent 5855987
- [259] Belov, A. A., Filatov, V. N., Belova, E. N., Lebedeva, A. N. (2008) Development and study of the properties of textile materials containing proteolytic enzymes, *Fibre Chemistry*, Vol. 40, No. 5, 467-470
- [260] Belov, A. A. (2008) Development, investigation and output of biologically-active (with proteins) textile materials and products on their basis for medicine and cosmetology, The Russian-German Forum on Biotechnology, 01-03.10.2008.
- [261] Petronijević Ž. (1988) Dobijanje, prečišćavanje i imobilizacija enzima dekstransaharaze iz *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F, Doktorska disertacija, TMF, Beograd
- [262] Brena, B. M., Batista-Viera, F. (2006) Immobilization of enzymes: A literature survey, in *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. J. M. Guisan, Humana Press, Totowa, New Jersey, 15-30
- [263] Kendereški, S. (1986) Osnovi enzimologije, TMF, Beograd
- [264] John, R. A. (2002) Photometric assays, in *Enzyme assays*, Eds. R. Eisenthal and M. J. Danson, Oxford University Press, Oxford, New York, 49-78
- [265] Sarath, G., Zeece, M. G., Penheiter, A. R. (2001) Protease assay methods, in *Proteolytic enzymes*, Eds. R. J. Beynon and J. S. Bond, Oxford University Press, Oxford, New York, 45-76
- [266] Bisswanger, H. (2004) *Practical enzymology*, Wiley-VCH, Weinheim
- [267] Stoscheck, C. (1990) Quantification of protein, *Methods in Enzymology*, 182, 50-68
- [268] Olson, B. (2000) Assay of protein concentration, http://www-class.unl.edu/biochem/protein_assay/, 17. 07. 2009
- [269] Aitken, A., Learmonth, M. P. (2002) Protein determination by UV absorption, in *The protein protocols handbook*, Ed. J. M. Walker, Humana Press, Totowa, New Jersey, 3-6
- [270] Waterborg, J. H. (2002) The Lowry method for protein quantitation, in *The protein protocols handbook*, Ed. J. M. Walker, Humana Press, Totowa, New Jersey, 7-10
- [271] Walker, J. M. (2002) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation, in *The protein protocols handbook*, Ed. J. M. Walker, Humana Press, Totowa, New Jersey, 11-14
- [272] Kruger, N. J. (2002) The Bradford method for protein quantitation, in *The protein protocols handbook*, Ed. J. M. Walker, Humana Press, Totowa, New Jersey, 15-21
- [273] Kumar, V., Yang, T. (2002) HNO₃/H₃PO₄-NaNO₂ mediated oxidation of cellulose preparation and characterization of bioabsorbable oxidized celluloses in high yields and with different levels of oxidation, *Carbohydrate Polymers*, 48, 403-412
- [274] Praskalo, J., Kostic, M., Potthast, A., Popov, G., Pejic, B., Skundric, P. (2009) Sorption properties of TEMPO-oxidized natural and man-made cellulose fibers, *Carbohydrate Polymers*, 77, 791-798
- [275] Koblyakov, A. (1989) *Laboratory practice in the study of textile materials*, Mir Publishers, Moscow, 141-144
- [276] Nelson, M. L., Rousselle, M.-A., Cangemi, S. J., Trouard, P. (1970) The iodine sorption test. Factors affecting reproducibility and a semimicro adaptation, *Textile Research Journal*, 40, 870-880

- [277] Siroka, B., Noisternig, M., Griesser, U. J., Bechtold, T. (2008) Characterization of cellulosic fibers and fabrics by sorption/desorption, *Carbohydrate Research*, 343, 2194-2199
- [278] Stankovič Elesini, U., Pavko Čuden, A., Richards, A. F. (2002) Study of the green cotton fibers, *Acta Chimica Slovenica*, 49, 815-833
- [279] Kontturi, E. J. (2005) Surface chemistry of cellulose: from natural fibres to model surfaces, PhD thesis, Eindhoven University of Technology
- [280] Tong, X., McCarty, P. L. (2005) Microbial hydrolysis of lignocellulosic materials, in *Methane from community wastes*, Ed. R. Isaacson, Taylor & Francis Group, London and New York, 61-100
- [281] Wadsworth, L. C., Cuculo, J. A. (1978) Determination of accessibility and crystallinity of cellulose, in *Modified Cellulosic*, Eds. R. M. Rowell, R. A. Young, Academic Press, New York, 117-146
- [282] Saafan, A. A., Kandil, S. H., Habib, A. M. (1984) Liquid ammonia and caustic mercerization of cotton fibers using X-ray, infrared, and sorption measurements, *Textile Research Journal*, 54, 863-867
- [283] Fakin, D., Golob, V., Stana Kleinschek, K., Majcen Le Marechal, A. (2006) Sorption properties of flax fibers depending on pretreatment processes and their environmental impact, *Textile Research Journal*, 76, 448-454
- [284] Han, S., Lee, M., Kim, B. K. (2010) Crosslinking reactions of oxidized cellulose fiber. I. Reactions between dialdehyde cellulose and multifunctional amines on lyocell fabric, *Journal of Applied Polymer Science*, 117, 682-690
- [285] Wenbin, L., Xuchen, Z., Siyao, C., Xingping, Z., Dajun, C., Xiaqin, W. (2008) Crosslinking of rayon fibers with co-oligomer of maleic acid and methylacrylate and their responses to water, *Carbohydrate Polymers*, 73, 223-230
- [286] Larsson, P. (2010) Hygro- and hydroexpansion of paper: Influence of fibre-joint formation and fibresorptivity, PhD thesis, KTH Royal Institute of Technology
- [287] (a) Kreze, T., Jeler, S., Strnad, S. (2002) Correlation between structure characteristics and adsorption properties of regenerated cellulose fibers, *Materials Research Innovations*, 5, 277-283 (b) Strnad, S., Kreze, T., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V. (2001) Correlation between structure and adsorption characteristics of oriented polymers, *Materials Research Innovations*, 4, 197-203
- [288] Doppert, H. L. (1967) Adsorption of iodine from aqueous solutions by samples of tire yarn from regenerated cellulose, *Journal of Polymer Science, A-2*, 5, 263-270
- [289] Mikes, O., Holeysovsky, V., Tomasek, V., Sorm, F. (1966) Covalent structure of bovine trypsinogen. The position of the remaining amides, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 24, 346-352
- [290] Perona, J, Craik, CS (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine proteases, *Protein Science*, 4, 337-360 (b) www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum
- [291] Huckel, M., Wirth, H-J., Eran, M. (1996) Porous zirconia: a new support material for enzyme immobilization, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 31, 165-179
- [292] Akkus Cetinus, S., Oztop, H. N. (2000) Immobilization of catalase on chitosan film, *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 7, 497-501
- [293] Rocha, C., Ducso, L., Gonçalves, M. P., Teixeira, J. A. (2005) Spent-grains and zeolites as potential carriers for trypsin immobilization, *Proceedings of the 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering – ENPROMER and 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering*
- [294] Filatov, V. N., Ryltsev, V., Simenhaus, Z. (2002) Wound dressing, Patent EP1380310
- [295] Leuba, J.-L., Widmer, F. (1979) Immobilization of proteinases on chitosan, *Biotechnology Letters*, 1, 109-114

- [296] Fernandez-Lafuente, R., Cowan, D. A., Wood, A. N. P. (1995) Hyperstabilization of a thermophilic esterase by multipoint covalent attachment, *Enzyme and Microbial Technology*, 17, 366-372
- [297] Turková, J. (1978) *Affinity chromatography*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam
- [298] (a) Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., Waldron, K. C. (2004) Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, 37, 790-802 (b) Kiernan, J. (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde, *Microscopy Today*, 00-1, 8-12
- [299] Friedli, G.-L. (1996) Interaction of SWP with bovine serum albumin (BSA), <http://www.friedli.com/research/PhD/chapter5a.html>, 17. 01. 2011
- [300] Adriano, W. S., Filho, E. H. C., Silva, J. A., Giordano, R. L. C., Gonçalves, L. R. B. (2005) Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 22, 529-538
- [301] Liang, Z. P., Feng, Y. Q., Meng, S. X., Liang, Z. Y. (2005) Preparation and properties of urease immobilized onto glutaraldehyde cross-linked chitosan beads, *Chinese Chemical Letters*, 16, 135-138
- [302] Zhou, Q. Z. K., Chen, X. D. (2001) Immobilization of β -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde, *Journal of Food Engineering*, 48, 69-74
- [303] Olszewski, J., Wasserman, B. P. (1986) Effect of glutaraldehyde on the activity of some DNA restriction endonucleases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 13, 29-35
- [304] Herzog, V., Fahimi, H. D. (1974) The effect of glutaraldehyde on catalase, *The Journal of Cell Biology*, 60, 303-311
- [305] Peng, L., Calton, G. J., Burnett, J. B. (1987) Effect of borohydride reduction on antibodies, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 14, 91-99

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом

**DOBIJANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH
VLAKANA NA BAZI SELEKTIVNO
OKSIDISANE CELULOZE**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 16. 10. 2014

Танја Николетић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

DOBIJANJE BIOLOŠKI AKTIVNIH VLAKANA NA BAZI SELEKTIVNO OKSIDISANE CELULOZE

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци дат је на следећој страници.)

Потпис

Ђанска Никодић

у Београду, 16.10.2014