

Streszczenie wyników rozprawy doktorskiej Moniki A. Koperskiej

## DEGRADATION OF NATURAL FIBERS IN ARTEFACTS: MECHANISM AND INHIBITION

Przeprowadzone w ramach doktoratu badania skupiły się na aspekcie indukowanej wysoką temperaturą (150 °C) degradacji fibroiny z jedwabiu z jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*). Atmosfera składu mieszaniny postarzającej została tak dobrana, że umożliwiła łatwe wyodrębnienie zmiennych kinetycznych decydujących o szybkości degradacji. Dlatego starzono w atmosferze: otwartej i zamkniętej (obserwując wpływ endogennych lotnych związków organicznych); powietrza i beztlenowej (badając wpływ tlenu); suchej i wilgotnej (przy wilgotności bezwzględnej równej zero oraz 0.6 i 1.7 [kg/m<sup>3</sup>]).

Biorąc pod uwagę wielorzędową budowę badanego białka dostępne metody analizy podzielono na grupy:

- 1) metody makroskopowe, opisujące cechy fizyczne i chemiczne materiału, często istotne z punktu widzenia użytkownika tekstyliów (tu pomiary koloru, pH, masy i wytrzymałości na rozciąganie);
- 2) metody mikroskopowe, umożliwiające wniknięcie w strukturę materiału i monitorowanie zachodzących zmian na poziomie:
  - a) struktury pierwszorzędowej białka (tu metody: spektroskopii w podczerwieni, w zakresie ultrafioletu i widzialnym oraz Ramanowskiej, chromatografii gazowej i żelowej oraz wiskozymetrii),
  - b) stopnia krystaliczności (tu metody spektroskopii w podczerwieni oraz dyfrakcji rentgenowskiej).

Metody makroskopowe dokumentują zmieniające się w czasie sztucznego postarzania cechy fizyczne i chemiczne. Z fizycznych, zarówno masa jak wytrzymałość mechaniczna obniżają wartość w miarę postarzania, a wartość zmiany wzrasta z poziomem wilgotności, jak i z obecnością tlenu w atmosferze starzejącej. Makroskopowe własności chemiczne, jak na przykład pH, podobnie ulegają obniżeniu. Ich wartości są najbardziej podatne na działanie sprzężonych warunków beztlenowych i wilgoci. Zmiana koloru próbek modelowych staje się dostrzegalna ( $\Delta E > 3$ ) po siedmiu dniach postarzania w warunkach suchych i skraca się do dnia w warunkach wilgotnych. Metody makroskopowe posłużyły, jako wstępne indykatory zmian zachodzących podczas termo-degradacji fibroiny. Głębsze zrozumienie procesu rozpadu białka zawdzięczamy metodą mikroskopowym.

Wyniki uzyskane za pomocą metod mikroskopowych pozwoliły na wyodrębnienie markerów głównych ścieżek degradacji struktury polipeptydu: utleniania, hydrolizy; oraz zmiany krystaliczności zachodzących podczas termo-rozkładu fibroiny.

Podczas analizowania danych z testów sztucznego postarzania szczególny nacisk położyliśmy na monitorowanie zaniechanego w opisie literaturowym ścieżki utleniania fibroiny. Badania UV-Vis pokazały, że łańcuch białkowy ulega utlenieniu z powstaniem  $\alpha$ -keto-kwasów i dikarboksyloaminokwasów, a najbardziej rozpowszechniony aminokwas aromatyczny w fibroinie tyrozyna (5% ww.) utlenia się do orto-chinonów i para-dichinonów. Podobny mechanizm zarejestrowano dla próbek sztucznie postarzanych światłem z zakresu ultrafioletowego.

Za markery utleniania przyjęto korelujące ze sobą wskazania: całki z widma zarejestrowanego metodą UV-VIS  $E_{UV-Vis}$  oraz stosunek intensywności drgań na widmach zarejestrowanych w podczerwieni  $E_{amidI/II}$  ( a charakterystycznych dla białek drgań adimowych (I do II)). Wyliczany z podczerwieni marker, choć zawiera w sobie informację na temat rozrywanych na drodze hydrolizy wiązań peptydowych okazał się być wrażliwszy na efekty utleniania i licznie powstające wtedy grupy karbonylowe (nakładające się na drgania amid I).

Obraz procesów utleniania zachodzących podczas degradacji fibroiny wzbogacono o analizę za pomocą chromatografii gazowej lotnych produktów jej rozpadu. Udało się zidentyfikować następujące związki:

- a) aromatyczne: benzen, toluen, etylobenzen, p-ksylen, benzaldehyd,
- b) disiarczki dimetylu oraz trisiarczki dimetylu
- c) ketony: 2-butanon, 5-metylo-3-heksanon, 5-metylo-2-heksanon;
- d) alkohole: n-propanol, n-butanol
- e) kwasy karboksylowe: kwas octowy, kwas propanowy;

Zidentyfikowane związki aromatyczne mogą być produktem utleniania tyrozyny lub efektem rekombinacji powstających na drodze utleniania niskocząsteczkowych rodników. Di- i tri- siarczek dimetylu to produkty rozpadu mostków siarczkowych. Ketony i kwasy są najprawdopodobniej produktem utleniania rodnikowego zhydrolizowanych, przez co znacznie skróconych, łańcuchów aminokwasu. Kwas octowy i propanowy może być produktem utleniania samej glicyny i alaniny. Wyniki pół-ilościowe pokazały zwiększoną produkcję kwasu octowego w pierwszym tygodniu termopostarzania. W kolejnych dniach starzenia emisja obu kwasów jest porównywalna. Ten kwaśny charakter emitowanych z fibroiny LZO ma znaczący wpływ na szybkość hydrolizy wiązań peptydowych.

Degradację struktury pierwszorzędowej na drodze hydrolizy śledzono za pomocą metod chromatografii żelowej oraz viskozymetrii. Wyniki z obu metod wskazują na kilkukrotny spadek długości łańcucha aminokwasowego (SEC) oraz lepkości rozpuszczonych próbek fibroiny (z viskozymetrii) podczas pierwszego dnia starzenia w zamkniętych reaktorach (przy obecności LZO). W otwartych warunkach spadek wskazań zaczyna być znaczący z późniejszym okresie postarzania. Dodatkowe badania SEC, z poprzedzającą je metodą preparatywną rozdzielającą łańcuch ciężki od lekkiego pokazują, że rozpad wiązań peptydowych przez pierwsze dni starzenia zachodzi szybciej w ciężkim łańcuchu białka. To tłumaczyć może gwałtowny spadek lepkości w początkowym okresie degradacji.

Wartości wyników średniej masy molowej fibroiny wyznaczonej metodą SEC posłużyły do weryfikacji wskazań markerów wyliczonych z pomiarów w podczerwieni. Dzięki temu został zaproponowany nowy marker degradacji,  $E_{\text{COOH}}$ , który monitoruje zmiany ilości grup dikarboksylovych (monitorując intensywność drgań zginających grup  $-\text{CH}$  znajdujących się przy grupach  $-\text{COOH}$  w łańcuchu, a zlokalizowanych na widmie przy  $1318\text{ cm}^{-1}$ ). Ponadto wykazano, że estymator  $E_{\text{COOH}}$  jest selektywny. Może posłużyć do śledzenia ścieżki hydrolitycznej procesu degradacji fibroiny i wydaje się być najbardziej wyseparowany od innych estymatorów rozpadu wyliczonych z podczerwieni.

Mając na celu monitorowanie zmiany stopnia krystaliczności indukowanego na drodze termopostarzania posłużono się 3 literaturowymi markerami wyliczonymi z podczerwieni [odnośniki]:  $E_{\text{C=O1}}$  (stosunek pasm od drgań grup karbonylovych w obszarze  $\beta$ -harmonijki i  $\alpha$ -helisy);  $E_{\text{C-N}}$  (stosunek pasm od drgań C-N w obszarze  $\beta$ -harmonijki i  $\alpha$ -helisy);  $E_{\text{C=O2}}$  (stosunek intensywności pasm od drgań grup karbonylovych  $\beta$ -harmonijki ułożonych równolegle do przeciwrównoległych). Dzięki niezależnym pomiarom dyfrakcji rentgenowskiej udało się zweryfikować wskazania estymatorów krystaliczności. Udowodniono, że  $E_{\text{C=O1}}$  i  $E_{\text{C-N}}$  nie są reprezentatywnymi miernikami krystaliczności ze względu na różnice w fizycznych znaczeniach estymatorów. Licznie powstające podczas degradacji grupy karbonylowej i rozpad wiązań peptydowych zaburza wskazania tych dwu markerów.  $E_{\text{C=O2}}$  okazuje się być jedynym z puli przebadanych wskaźników krystaliczności fibroiny, który koreluje się z wskazaniami z XRD.

Ilość pary wodnej zawartej w atmosferze reakcji ma największy wpływ na postęp degradacji fibroiny. Tendencję tę odzwierciedlają wszystkie estymatory i wyniki pomiarów zebranych za pomocą metod mikroskopowych oraz makroskopowych. Cząsteczki wody mogą pełnić funkcję substratu w reakcji hydrolizy, i źródła rodników tlenowych w reakcji utleniania. Trzecią funkcją wody podczas rozkładu może być również funkcja rola plastyfikatora biopolimeru ułatwiającego reorganizację polimeru, jak pokazano przez niezależne analizy XRD.

Brak tlenu w atmosferze reakcji sztucznego postarzania (wpływ jedynie LZO) powoduje nieznaczne zmiany we wskazaniach markerów degradacji w mikroskali, a w makroskali jedynie wskazania zmiany koloru są wyższe w tych warunkach. To obecność lotnych związków organicznych w połączeniu z wodą lub tlenem ma znaczący wpływ na degradację, co objawia się w wyliczonych wskazaniach z metod w mikroskali oraz wskazaniach wytrzymałości mechanicznej.