



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας IV: Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΠΟΛΥΜΕΡΩΝ
ΑΚΥΛΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΜΕ ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ
ΣΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Διδακτορική Διατριβή

Σταύρος Γκρέμος
Χημικός Μηχανικός, ΕΜΠ

Αθήνα 2012

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

Ευχαριστίες

Κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής είχα την τύχη να συνεργαστώ με ανθρώπους οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Στο σημείο αυτό λοιπόν νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω:

Τον καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση, επιστημονικό μου υπεύθυνο, για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος και κυρίως για την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια που δουλέψαμε μαζί.

Τον καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις επιστημονικές - και όχι μόνο - συμβουλές του, για το έντονο ενδιαφέρον που επέδειξε ως προς την πορεία των εργασιών μου καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια του με στόχο την ολοκλήρωση της διατριβής μου.

Τον καθηγητή κ. Παύλο Χριστακόπουλο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη γενικότερη συμβολή του στην περάτωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Τον καθηγητή κ. Κωστή Μαγουλά για το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του, όπως επίσης και για τη συνεργασία που προσέφερε σχετικά με τις αντιδράσεις σε περιβάλλον υπερκρίσιμων ρευστών.

Τον επίκουρο καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Βουτσά για τις ιδέες και τη βοήθεια του σε θέματα υπερκρίσιμων ρευστών.

Την επίκουρο καθηγήτρια κ. Πετρούλα Ταραντίλη για την απλόχερη βοήθεια που προσέφερε όποτε απαιτούνταν και για τις πολύτιμες συμβουλές και την πειραματική της υποστήριξη σε θέματα τεχνολογίας πολυμερών.

Την καθηγήτρια κ. Κωνσταντίνα Τζιά για τις επιστημονικές της συμβουλές και για την έντονη προθυμία της να βοηθήσει.

Τον επίκουρο καθηγητή κ. Λουκά Ζουμπουλάκη για την υποστήριξη που μου παρείχε σχετικά με την προετοιμασία δισκίων KBr, για τη γενικότερη συμβουλευτική του στάση.

Τον επίκουρο καθηγητή κ. Πέτρο Ταραντίλη και τον κ. Χρήστο Παππά, επιστημονικό προσωπικό της Γεωπονικής Σχολής Αθηνών, για την υπερπολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν αναφορικά με τη διεξαγωγή μετρήσεων φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) και την αποτίμηση των αντίστοιχων φασμάτων.

Τη διδάκτορα χημικό μηχανικό Διομή Μαμμά, μέλος Ι.Δ.Α.Χ. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη διάθεση της να βοηθήσει όποτε απαιτούνταν και για την καθοριστική της συμβολή στην τελική μορφοποίηση της παρούσας διατριβής.

Τη διδάκτορα χημικό μηχανικό Βασιλική Λούλη για την εξαιρετικά σημαντική βοήθεια της στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, για τη φιλοξενία της στο εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς και για τη γενικότερη συνεργασία που είχαμε.

Το διδάκτορα χημικό μηχανικό Μανώλη Καλογερή για τις πολύτιμες επιστημονικές και μη συμβουλές του, τις εμπειριστατωμένες του απόψεις, τις εποικοδομητικές μας συζητήσεις, τη συνολική του προσφορά στη διατριβή μου και κυρίως για την καλή διάθεση που πάντα είχε.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Μάκη Λαδουκάκη για την αδιάκοπη βοήθεια και συμπαράσταση που μου παρείχε χωρίς δισταγμό μέχρι και την τελευταία στιγμή πριν την ολοκλήρωση της διατριβής, αλλά πάνω απ' όλα για το κλίμα που φρόντιζε να επικρατεί στο εργαστήριο.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Μήτση και το υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου Επιστήμης Υλικών, που πάντα ήταν πρόθυμοι να με εξυπηρετήσουν.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Μελά για τη συμβολή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων υπολογισμού του μέτρου ελαστικότητας των κυτταρινούχων υλικών.

Το σύνολο των παιδιών του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας με τα οποία μοιραζόμασταν τον ίδιο χώρο και περνάγαμε πολλές ώρες μαζί.

Το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τα έτη 2007-2011.

Δημοσιεύσεις εργασιών σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

1. Gremos, S., Kekos, D., Kolisis, F. 2012. Supercritical carbon dioxide biocatalysis as a novel and green methodology for the enzymatic acylation of fibrous cellulose in one step. *Bioresource Technology*, **115**, 96-101.
2. Gremos, S., Zarafeta, D., Kekos, D., Kolisis, F. 2011. Direct enzymatic acylation of cellulose pretreated in BMIMCl ionic liquid. *Bioresource Technology*, **102**(2), 1378-1382.
3. Ahmed, H., Gremos, S., Kolisis, F. 2010. Enzymatic removal of the oily dirt from a Coptic tunic using Lipase enzyme. *Journal of Textiles Apparel. Technology & Management*, **6** (3).

Συμμετοχές σε επιστημονικά συνέδρια

A. Διεθνή συνέδρια

1. Gremos Stavros, Kekos Dimitris, Kolisis Fragiskos. "Cellulose pretreated by ionic liquids has been successfully esterified with long chain fatty acids by enzymes in a solvent free system". 7th International Conference on Polymer and Textile Biotechnology. 2-4 March, 2011. Milan, Italy.
2. Gremos Stavros, Kekos Dimitris, Kolisis Fragiskos. "Enzymatic esterification of cellulose using ionic liquids as pretreatment medium". 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition. 14-18 September, 2010. Rimini, Italy.
3. Gremos Stavros, Kekos Dimitris, Kolisis Fragiskos. "Enzymatic acylation of cellulose". Polysaccharides as a Source of Advanced Materials. 21-24 September, 2009. Turku, Finland.
4. Gremos Stavros, Kekos Dimitris, Kolisis Fragiskos. "Enzymatic modification of cellulose derivatives for the production of novel biopolymers". Biotechnical Functionalisation of Renewable Polymeric Materials. 18-19 September, 2008. Varna, Bulgaria.

B. Ελληνικά συνέδρια

1. Gremos Stavros, Zarafeta Dimitra, Dourou Christina, Kekos Dimitris, Kolisis Fragiskos. "Enzymatic production of cellulose esters". 7^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής. 3-5 Ιουνίου, 2009. Πάτρα, Ελλάδα.

Περίληψη

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έχει ως σκοπό την ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης. Η παραγωγή των αντίστοιχων αλειφατικών εστέρων είναι ιδιαίτερως σημαντική, καθώς οι τελευταίοι ανήκουν σε μία άκρως ενδιαφέρουσα και χρήσιμη τάξη βιοπολυμερών· τα θερμοπλαστικά. Το γεγονός της προέλευσης τους από την κυτταρίνη αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη διαδικασία παραγωγή τους. Η κυτταρίνη, λόγω του εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται ανάμεσα στις αλυσίδες της, παρουσιάζει μία εξαιρετικά συμπαγή και σχεδόν αδιαπέραστη μοριακή δομή. Έτσι η διαλυτότητα της είναι ιδιαίτερως περιορισμένη, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η όποια χημική επεξεργασία της.

Στη συγκεκριμένη εργασία σχεδιάζονται και αναπτύσσονται δυο διαφορετικές και ανεξάρτητες διεργασίες, που ως στόχο έχουν τη διάνοιξη της δομής της κυτταρίνης και την αύξηση της διαθεσιμότητας και της δραστηριότητας των υδροξυλίων της. Η πρώτη διεργασία αφορά στη διάλυση και την προκατεργασία της κυτταρίνης (Avicel και ινώδους) σε συγκεκριμένα ιοντικά υγρά ([bmim]Cl, [emim]OAc), έτσι ώστε να αλλοιωθεί η συμπαγής δομή της και να μειωθεί ο αντίστοιχος δείκτης κρυσταλλικότητας. Μετά την παραλαβή της αναγεννημένης κυτταρίνης που προκύπτει, επιχειρείται η ενζυμική της ακυλίωση σε διάφορα μη συμβατικά συστήματα βιοκατάλυσης (οργανικοί διαλύτες, ιοντικά υγρά, συστήματα ελεύθερα διαλυτών). Ως ακυλο-δότες χρησιμοποιήθηκαν οι βινυλ-εστέρες του προπιονικού, του λαυρικού και του στεατικού οξέως. Τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν ήταν η λυοφιλιωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, η λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, η λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, η λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, η ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Από τα αντιδρώντα συστήματα που δοκιμάστηκαν, μόνο στα ελεύθερα διαλυτών επετεύχθη η επιθυμητή αντίδραση εστεροποίησης της κυτταρίνης με τους τρεις διαφορετικούς ακυλο-δότες. Επίσης τα ένζυμα που κατέστησαν ικανά να καταλύσουν τις παραπάνω ακυλίωσεις ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Αντιθέτως, καμία από τις λιπάσες δεν εξέφρασε δραστηριότητα. Στο πλαίσιο της μελέτης των επιτυχών αντιδράσεων, εξετάστηκε και η επίδραση που έχουν ορισμένες βασικές παράμετροι στην πορεία των ενζυμικών ακυλίωσεων. Ως αποτέλεσμα παράχθηκαν τρεις διαφορετικοί εστέρες κυτταρίνης· η προπιονική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα 1.9%, η λαυρική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα 1.3% και η στεατική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα 0.9%.

Η δεύτερη διεργασία αποτελείται από ένα μόνο στάδιο και στηρίζεται στην ταυτόχρονη διόγκωση και ενζυμική ακυλίωση της (ινώδους) κυτταρίνης, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Ως ακυλο-δότες χρησιμοποιήθηκαν οι βινυλ-εστέρες του προπιονικού, του λαυρικού και του στεατικού οξέως. Τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν ήταν η ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η

ακίνητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Και οι τρεις βιοκαταλύτες επέδειξαν την ικανότητα ακυλίωσης της κυτταρίνης στο συγκεκριμένο σύστημα με το υπερκρίσιμο ρευστό. Τα προϊόντα που παράχθηκαν ήταν η προπιονική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα 4.4%, η λαυρική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα 4.0% και η στεατική κυτταρίνη με μέγιστο ποσοστό εστέρα ίσο με 3.3%. Επίσης πραγματοποιήθηκε και μελέτη της επίδρασης που είχαν ορισμένες βασικές παράμετροι στην πορεία των μελετώμενων ενζυμικών αντιδράσεων. Τέλος οι παραγόμενοι εστέρες κυτταρίνης αξιολογήθηκαν ως προς ορισμένες χαρακτηριστικές τους ιδιότητες. Ειδικότερα υπολογίστηκε το μέτρο ελαστικότητας Young των παραγόμενων εστέρων (ενδεικτικό της σκληρότητας των συγκεκριμένων υλικών). Επίσης μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας τους και μελετήθηκε η μορφολογία της επιφάνειάς τους. Θα πρέπει να σημειωθεί πως με τις δυο παραπάνω προσεγγίσεις επιτυγχάνεται για πρώτη φορά η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης, με αλειφατικές αλυσίδες μεγάλου μήκους.

Summary

The present study focuses on the enzymatic acylation of cellulose. Aliphatic esters of cellulose have recently raised the interest on the field of biopolymers, because of their thermoplastic properties. Due to the extended intra- and intermolecular hydrogen bonding between the cellulose chains, this biopolymer has a high crystalline structure. As a result it is completely insoluble in water or in common solvents leading to difficulties in chemical manipulation.

In this work there have been developed two different processes in order to open the strict structure of cellulose and make its hydroxyl groups as permeable as possible. In the first methodology, cellulose (Avicel and fibrous) was putted into specific ionic liquids ([bmim]Cl, [emim]OAc), in order to facilitate the unwrap of the structure of the polysaccharide molecule and make it accessible to the enzyme. Thus, after this pretreatment the enzymatic esterification reaction was tested using various media (organic solvents, ionic liquids, solvent free systems). There were used three different acyl donors: vinyl propionate, vinyl laurate and vinyl stearate. The biocatalysts used were the following hydrolases: lyophilized lipase B *Candida antarctica*, lyophilized lipase *Candida cylindracea*, lyophilized lipase *Aspergillus niger*, lyophilized lipase *Rhizomucor miehei*, immobilized lipase B *Candida antarctica*, lyophilized esterase from hog liver, immobilized esterase from hog liver and immobilized cutinase *Fusarium solani pisi*. From the reaction systems tested, only the solvent free were able to produce the cellulose esters. The enzymes capable of catalyzing the acylation of cellulose were found to be the lyophilized and immobilized esterases from hog liver and the immobilized cutinase from *Fusarium solani pisi*, while the lipases used did not show any catalytic activity. In order to investigate those reactions further, a number of parameters that affect the reaction course were also studied. Cellulose esters of propionate, laurate and stearate were synthesized with a maximum ester content of 1.9, 1.3 and 0.9%, respectively.

Concerning the second methodology, there was designed a system at which cellulose swelling by supercritical carbon dioxide and enzymatic esterification of the swelled macromolecule by acyl groups, are occurred in one step. The cellulosic substrate was fibrous cellulose. The acyl donors used were vinyl propionate, vinyl laurate and vinyl stearate, while the biocatalysts used for this reaction were immobilized lipase B *Candida antarctica*, immobilized esterase from hog liver and immobilized cutinase *Fusarium solani pisi*. All the reactions tested with those immobilized enzymes were successful; the formed products were cellulose propionate, cellulose laurate and cellulose stearate with a maximum ester content of 4.4, 4.1 and 3.3%, respectively. In order to investigate those reactions further, a number of parameters that affect the reaction course were also studied. Finally, the produced cellulose esters were mechanically tested as thermoplastic materials; Young's modulus was calculated as a measure of their stiffness. Additionally the crystallinity index of those materials was measured and the morphology of their surface was also studied. It must be noted that the above novel biocatalytical processes are the first successful attempts on the enzymatic acylation of cellulose with long chain fatty acids.

Περιεχόμενα

	Σελ.
Εισαγωγή	1
Θεωρητικό Μέρος	7
1. Κυτταρίνη	8
1.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα	8
1.2 Αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή προϊόντων	9
1.3 Δομή και χημεία κυτταρίνης	10
1.3.1 Εισαγωγή	10
1.3.2 Δομή και κρυσταλλικότητα κυτταρίνης	11
1.3.3 Χαρακτηριστικές ιδιότητες κυτταρίνης	14
1.3.4 α-, β- και γ- κυτταρίνη	15
2. Εστέρες κυτταρίνης	16
2.1 Εισαγωγή	16
2.2 Εφαρμογές των εστέρων κυτταρίνης	18
2.3 Παραγωγή αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης	20
2.3.1 Χημεία της εστεροποίησης κυτταρινών	20
2.3.2 Βιομηχανική παραγωγή οξικής κυτταρίνης	21
2.3.3 Οικονομικά μεγέθη σχετικά με την παραγωγή οξικής κυτταρίνης	23
2.3.4 Αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης μακριάς ανθρακικής αλυσίδας	23
2.4 Εναλλακτικές προσεγγίσεις στην παραγωγή εστέρων κυτταρίνης	25
2.5 Αναλυτικές μέθοδοι σχετικές με τους εστέρες κυτταρίνης	28
3. Βιοκατάλυση	29
3.1 Εισαγωγή	29
3.2 Λιπάσες	33
3.3 Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα	37
3.3.1 Εισαγωγή	37
3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα σε μη συμβατικά συστήματα	39
3.3.3 Βασικές κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων βιοκατάλυσης	40
3.3.3.1 Διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη	40
3.3.3.2 Συστήματα ελεύθερα διαλυτών	41
3.3.3.3 Ιοντικά υγρά	41
3.3.3.4 Υπερκρίσιμα ρευστά	41
4. Ιοντικά υγρά	41
4.1 Εισαγωγή	41
4.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών	43
4.2.1 Σημείο τήξης	43
4.2.2 Τάση ατμών	44
4.2.3 Ιξώδες	44
4.2.4 Πυκνότητα	44
4.2.5 Πολικότητα	45
4.2.6 Διαλυτική ικανότητα των ιοντικών υγρών	45
4.2.7 Θερμική σταθερότητα	46

4.3 Εφαρμογές των ιοντικών υγρών	46
4.3.1 Εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες	46
4.3.1.1 Πλεονεκτήματα της χρήσης ιοντικών υγρών στις βιοκαταλυτικές διεργασίες	48
4.4 Αξιοποίηση των ιοντικών υγρών για την επεξεργασία κυτταρινούχων υποστρωμάτων	49
5. Υπερκρίσιμα ρευστά	50
5.1 Εισαγωγή	50
5.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών	51
5.3 Βιοκατάλυση σε υπερκρίσιμα ρευστά	52
5.4 Παράγοντες που επιδρούν στην ενζυμική ενεργότητα σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα	53
5.5 Αξιοποίηση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα για την επεξεργασία κυτταρινούχων υποστρωμάτων	55
Υλικά και Μέθοδοι	57
6. Υλικά	58
6.1 Ένζυμα	58
6.2 Κυτταρινούχα υποστρώματα	58
6.3 Ακυλο-δότες	58
6.4 Ιοντικά υγρά	59
6.5 Οργανικοί διαλύτες	59
6.6 Λοιπά αντιδραστήρια / υλικά	59
7. Μεθοδολογία	60
7.1 Προσδιορισμός της ενεργότητας των υδρολυτικών ενζύμων	60
7.2 Προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού των κυτταρινούχων υλικών	60
7.3 Μέτρηση του δείκτη κρυσταλλικότητας των κυτταρινούχων υλικών με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)	61
7.3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο	61
7.3.2 Πειραματική διαδικασία	61
7.4 Μελέτη της μορφολογίας των κυτταρινούχων υλικών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)	62
7.4.1 Θεωρητικό υπόβαθρο	62
7.4.2 Πειραματική διαδικασία	62
7.5 Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης που έχει υποστεί προκατεργασία σε ιοντικά υγρά	63
7.5.1 Προκατεργασία κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά	63
7.5.1.1 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl	63
7.5.1.2 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc	63
7.5.2 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης	64
7.5.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος	65
7.5.3.1 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες	65
7.5.3.2 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις αντιδράσεις σε ιοντικά υγρά	65

7.5.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις ελεύθερες διαλυτών αντιδράσεις	65
7.5.4 Ποιοτική ανάλυση του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR)	66
7.5.4.1 Θεωρητικό υπόβαθρο	66
7.5.4.2 Πειραματική διαδικασία	66
7.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα	66
7.6 Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($scCO_2$)	67
7.6.1 Αντιδραστήρας $scCO_2$	67
7.6.2 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης σε περιβάλλον $scCO_2$	68
7.6.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος	69
7.6.4 Ποιοτική ανάλυση του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR)	69
7.6.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα	69
7.7 Υπολογισμός του μέτρου ελαστικότητας (Young's modulus) των εστέρων κυτταρίνης	70
7.7.1 Θεωρητικό υπόβαθρο	70
7.7.2 Πειραματική διαδικασία	70
Αποτελέσματα και Σχόλια	73
8. Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης που έχει υποστεί προκατεργασία σε ιοντικά υγρά	74
8.1 Προκατεργασία κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά	74
8.1.1 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl	75
8.1.1.1 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στον βαθμό πολυμερισμού του αναγεννημένου προϊόντος	76
8.1.1.2 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στο δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος	78
8.1.1.3 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στη μορφολογία του αναγεννημένου προϊόντος	83
8.1.2 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc	85
8.1.2.1 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στον βαθμό πολυμερισμού του αναγεννημένου προϊόντος	86
8.1.2.2 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στο δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος	88
8.1.2.3 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στη μορφολογία του αναγεννημένου προϊόντος	93
8.2 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης	95

8.2.1 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης Avicel	95
8.2.1.1 Αντιδράσεις σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη	97
8.2.1.2 Αντιδράσεις σε περιβάλλον ιοντικών υγρών	98
8.2.1.3 Αντιδράσεις σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών	101
8.2.1.3.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	114
8.2.1.3.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	118
8.2.1.3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	122
8.2.2 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά ινώδους κυτταρίνης	125
8.2.2.1 Αντιδράσεις σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη	126
8.2.2.2 Αντιδράσεις σε περιβάλλον ιοντικών υγρών	129
8.2.2.3 Αντιδράσεις ελεύθερες διαλύτη	131
8.2.2.3.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	140
8.2.2.3.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	144
8.2.2.3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	148
9. Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (scCO_2)	151
9.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	159
9.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	162
9.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	163
9.4 Επίδραση του μήκους της αλυσίδας του ακυλο-δότη στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	165
9.5 Επίδραση της πίεσης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	166
9.6 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης	167
9.7 Μελέτη της σταθερότητας των βιοκαταλυτών μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις	169
9.8 Έλεγχος της επίδρασης των υπερκρίσιμων συνθηκών στη δομή της κυτταρίνης	170
10. Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης	172
10.1 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς τη μηχανική τους συμπεριφορά	172
10.2 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς το δείκτη κρυσταλλικότητας τους	176
10.3 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς τη μορφολογία της επιφάνειάς τους	179

Συμπεράσματα	181
11. Συμπεράσματα	182
Βιβλιογραφία	195
Παράρτημα	215
Φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ	216
Φάσματα FTIR	218

Εισαγωγή

Στην εποχή μας, η μείωση των παγκόσμιων αποθεμάτων αργού πετρελαίου και οι δυσάρεστες περιβαλλοντικές επιπτώσεις που προκαλούνται από την ευρεία χρήση πετροχημικών προϊόντων, έχουν οδηγήσει στην αναζήτηση εναλλακτικών πρώτων υλών. Ένας από τους σημαντικότερους τομείς της χημικής βιομηχανίας που παραδοσιακά χρησιμοποιεί ως κύριες πρώτες ύλες τα πετροχημικά προϊόντα, είναι αυτός των πλαστικών. Τα τελευταία χρόνια λοιπόν επικρατεί η τάση για εύρεση νέων εναλλακτικών πρώτων υλών και σε αυτόν τον κλάδο. Η ιδανική πρώτη ύλη για αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να είναι φθηνή, άφθονη, μη τοξική, αποικοδομήσιμη και ανακυκλώσιμη. Τα κριτήρια αυτά πληρούνται σε θεωρητικό τουλάχιστον επίπεδο, από μία τάξη φυσικών πολυμερών που λέγονται κυτταρινούχα υλικά (Lee & Wang, 2006). Πράγματι μία σημαντική κατηγορία πλαστικών, τα θερμοπλαστικά υλικά, μπορούν να παραχθούν από παράγωγα μόρια της κυτταρίνης (Edgar et al., 2001; Wibowo et al., 2006).

Στην πραγματικότητα, η φυσική κυτταρίνη δεν επιδεικνύει καμία θερμοπλαστική συμπεριφορά. Αντιθέτως, έχει συμπαγή μοριακή δομή και αντιδρά δύσκολα, εξαιτίας του εκτενούς δικτύου των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αλυσίδων της (Klemm et al., 2005; Nishiyama et al., 2002). Η αντικατάσταση των ελεύθερων υδροξυλίων της κυτταρίνης από διάφορες χημικές ομάδες, οδηγεί στο σχηματισμό παραγώγων μορίων τα οποία με τη σειρά τους εμπίπτουν σε ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται πως οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης έχουν υψηλή δυναμική ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία θερμοπλαστικών. Αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές επισημαίνουν την έως τώρα χρήση των υλικών αυτών στην παραγωγή ινών, πλαστικών, φιλμ, μεμβρανών, σύγχρονων επικαλυπτικών, καλλυντικών και φαρμάκων (Edgar, 2006; Edgar et al., 2001; Stevens & Stevermagel, 1978; Yoshida, 2009).

Τα αποτελέσματα μελετών που εξετάζουν τις φυσικές, μηχανικές και θερμοπλαστικές ιδιότητες των αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης, συγκλίνουν σε ένα κοινό συμπέρασμα. Οι συγκεκριμένες ιδιότητες εξαρτώνται άμεσα από το βαθμό υποκατάστασης των υδροξυλίων και από το μήκος της εκάστοτε αλειφατικής αλυσίδας. Ειδικότερα, οι σχετικά υψηλοί βαθμοί υποκατάστασης και οι μακρύτερες αλειφατικές αλυσίδες οδηγούν σε καλύτερη θερμοπλαστική συμπεριφορά και εντονότερη θερμική σταθερότητα (Chauvelon et al., 2003; Edgar, 2006; Jandura et al., 2000). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο μεγάλο μήκος της αλειφατικής αλυσίδας, η οποία λειτουργεί σαν εσωτερικός πλαστικοποιητής. Έτσι δεν απαιτείται η προσθήκη κάποιου εξωγενούς πλαστικοποιητή.

Το βασικό εμπόδιο για τις αντιδράσεις ακυλίωσης της κυτταρίνης είναι η ίδια η δομή της. Η συμπαγής δομή της με τις υψηλές τιμές δείκτη κρυσταλλικότητας, δυσχεραίνουν την όποια χημική επεξεργασία. Μέχρι σήμερα, τέτοιου είδους προϊόντα (εστέρες κυτταρίνης) παρασκευάζονται με τη χρήση ετερογενών κυρίως συστημάτων που περιέχουν τοξικές και περιβαλλοντικά επικίνδυνες ουσίες, όπως η πυριδίνη και το N,N-διμεθυλακεταμίδιο. Επιπροσθέτως, οι τεχνικές αυτές περιορίζονται στην εστεροποίηση της κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες μικρού και μέσου μήκους ($C < 6$) (Klemm et al., 1983; Klemm et al., 1987; Zhang &

McCormick, 1997). Μία εναλλακτική προσέγγιση για την ακυλίωση της κυτταρίνης, θα μπορούσε να βασιστεί στη βιοκατάλυση, με την εφαρμογή της οποίας δύνανται να περιοριστούν οι παραπάνω αδυναμίες και τα μειονεκτήματα της κλασικής χημικής σύνθεσης. Οι βιοκαταλυτικές διεργασίες προσφέρουν επιπλέον πλεονεκτήματα όπως οι ήπιες συνθήκες διεξαγωγής των δράσεων, ο περιβαλλοντικά φιλικός ή πράσινος χαρακτήρας, η απλοποίηση των χημικών μετατροπών που συνήθως ενοποιούνται σε ένα απλό στάδιο και ο περιορισμός του σχηματισμού παραπροϊόντων (Klibanov, 2000; Klibanov, 1988; Park & Kazlauskas, 2003).

Η πρώτη προσπάθεια για τη βιοκαταλυτική εστεροποίηση της κυτταρίνης έγινε το 1998 (Sereti et al., 1998). Σύμφωνα με τη συγκεκριμένη αναφορά επιχειρήθηκε η απευθείας εστεροποίηση της κυτταρίνης Avicel με λαυρικό οξύ, σε περιβάλλον διάφορων οργανικών διαλυτών, παρουσία λιπασών. Οι συγκεκριμένες αντιδράσεις δεν ήταν επιτυχείς εξαιτίας της δομής της κυτταρίνης. Το συγκεκριμένο μεγαλομόριο έχει υψηλό δείκτη κρυσταλλικότητας και δεν είναι διαλυτό στα παραπάνω συστήματα, με συνέπεια να μην είναι εφικτή η προσέγγιση του από τα μόρια του ενζύμου και του λιπαρού υποστρώματος. Ως αποτέλεσμα, η σχετική ερευνητική δραστηριότητα στράφηκε στην ενζυμική ακετυλίωση και ακυλίωση διαλυτών παραγώγων κυτταρίνης, έτσι ώστε να διευκολύνεται η πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Προφανώς τα αντίστοιχα κυτταρινούχα υποστρώματα έχουν προκύψει μετά από χημική υποκατάσταση των υδροξυλομάδων της κυτταρίνης από άλλες λειτουργικές ομάδες. Οι τελευταίες έχουν συνήθως διττό ρόλο· αφενός βοηθούν στη διαλυτοποίηση του κυτταρινούχου μορίου και αφετέρου μπορεί να αποτελέσουν οι ίδιες τις θέσεις-στόχους για την ακυλίωση. Αυτό συμβαίνει όταν το παράγωγο της κυτταρίνης είναι ήδη κάποιος εστέρας της (π.χ. οξική κυτταρίνη). Έτσι πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η ενζυμική εστεροποίηση της οξικής κυτταρίνης με λαυρικό οξύ, σε περιβάλλον ακετονιτριλίου. Ο βιοκαταλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ένζυμο λιπάση B από *Candida antarctica*, σε ακινητοποιημένη μορφή. Ακολούθως εστεροποιήθηκε η υδροξυ-πρότυλο κυτταρίνη με λαυρικό οξύ σε περιβάλλον τριτοταγούς βουτανόλης, παρουσία λιπάσης B από *Candida antarctica* (Sereti et al., 2001). Επίσης αναφέρθηκε η ακετυλίωση της καρβοξυ-μέθυλο κυτταρίνης σε υδατικό περιβάλλον και σε διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη, χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτη τη λιπάση *Aspergillus niger* (Yang & Wang, 2003). Στις παραπάνω περιπτώσεις, το ποσοστό των εν δυνάμει εστεροποιηθέντων υδροξυλομάδων που υπέστησαν ακετυλίωση ή ακυλίωση κυμαίνονταν από 10 έως 40%. Παρόλα αυτά, μέχρι τώρα εξακολουθούσε να μην έχει καταστεί δυνατή η ενζυμική ακυλίωση της «καθαρής» κυτταρίνης· δηλαδή της κυτταρίνης της οποίας όλα τα υδροξύλια είναι ελεύθερα.

Η παρούσα διατριβή έχει ως σκοπό την ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης. Όπως προαναφέρθηκε, τα μειονεκτήματα και οι δυσκολίες που αντιμετωπίζονται σχετικά με την επεξεργασία των κυτταρινούχων υλικών, έγκεινται στην ίδια τη δομή τους. Οι γραμμικές αλυσίδες της κυτταρίνης συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους, εξαιτίας των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στα υδροξύλια των μονομερών τους. Ως αποτέλεσμα η κυτταρίνη παρουσιάζει μία δομή σχεδόν αδιαπέραστη από την πλειοψηφία των χημικών ουσιών, κάτι που

εκφράζεται και με τις υψηλές τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της. Συνδυάζοντας τα δεδομένα αυτά με τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις έως τώρα προσπάθειες ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης, καθίσταται σαφές πώς η τελευταία πρέπει πρώτα να υποστεί κάποια αλλαγή στη δομή της ώστε να υπάρχουν πιθανότητες να εστεροποιηθεί βιοκαταλυτικά.

Στη συγκεκριμένη εργασία σχεδιάστηκαν δυο διαφορετικά συστήματα στα οποία επιχειρήθηκε η ενζυμικά καταλυόμενη ακυλίωση της κυτταρίνης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δυο εμπορικά διαθέσιμα είδη αυτής· η Avicel και η ινώδης. Η φιλοσοφία των συστημάτων αυτών αφορά στη διάνοιξη της μοριακής δομής της κυτταρίνης, με στόχο την αύξηση της διαθεσιμότητας και της δραστηριότητας των υδροξυλίων της. Το πρώτο σύστημα στηρίζεται στην προκατεργασία του πολυσακχαρίτη στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, τα συγκεκριμένα ιοντικά υγρά διαλύουν την κυτταρίνη και προκαλούν μερική καταστροφή του δικτύου των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων της. Παράλληλα παρατηρείται μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας του πολυσακχαρίτη (Dadi et al., 2006; Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006). Ο μηχανισμός της διάλυσης της κυτταρίνης και της μείωσης του δείκτη κρυσταλλικότητας της στο περιβάλλον των παραπάνω ιοντικών υγρών, στηρίζεται στα ίδια τα χαρακτηριστικά των τελευταίων. Η φύση του ιμιδαζολικού κατιόντος και ο ισχυρός ηλεκτραρνητικός χαρακτήρας του ανιόντος μαζί με το μικρό του μέγεθος, συνεισφέρουν στον παραπάνω μηχανισμό. Ειδικότερα, το μικρό μέγεθος ηλεκτραρνητικό ανιόν εισχωρεί ανάμεσα στις αλυσίδες κυτταρίνης και προσβάλλοντας τα ελεύθερα υδροξύλια της, τα αποπρωτονώνει. Με αυτόν τον τρόπο καταστρέφονται παράλληλα και οι δεσμοί υδρογόνου. Επιπροσθέτως, το ιμιδαζολικό κατιόν με τα π ηλεκτρόνια που διαθέτει, αλληλεπιδρά μη δεσμικά με τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων της κυτταρίνης, εμποδίζοντας τον επανασχηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της (Dadi et al., 2006).

Το προϊόν που προκύπτει καλείται πλέον αναγεννημένο και με βάση τις σχετικές αναφορές ένα μεγάλο ποσοστό των υδροξυλίων του είναι πλέον προσπελάσιμο από ενζυμικά μόρια. Οι παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές χρησιμοποίησαν την προκατεργασία αυτή με απώτερο σκοπό την ενζυμική υδρόλυση της αναγεννημένης κυτταρίνης από κυτταρινάσες. Η βασική αλλαγή που επιφέρει στην κυτταρίνη μία τέτοιου είδους επεξεργασία σε ιοντικά υγρά είναι η αλλαγή της μικροδομής της. Ξαν συνέπεια αυξάνεται η επιφάνεια της η οποία μπορεί να είναι προσβάσιμη από διάφορα μόρια (χημικές ουσίες, υποστρώματα, ενζυμα κλπ) (Barthel & Heinze, 2006; Wu et al., 2004). Έως τώρα οι τεχνικές αυτές έχουν αναπτυχθεί για την αξιοποίηση της κυτταρίνης ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ειδικότερα, με την επεξεργασία αυτή είναι δυνατή η εύκολη, ταχεία και πλήρης υδρόλυση της κυτταρίνης από κυτταρινάσες, με σκοπό τη μετατροπή της σε γλυκόζη (Dadi et al., 2006; Zhao et al., 2009).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται η εν λόγω προκατεργασία της κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά με στόχο την αύξηση της προσπελασιμότητας των υδροξυλίων της από τα ένζυμα λιπάση, εστεράση και κουτινάση, ώστε τελικά να πραγματοποιηθεί η ακυλίωση του πολυσακχαρίτη. Σε πρώτη φάση λοιπόν αναγεννόνται η Avicel και η ινώδης κυτταρίνη από τα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και

[emim]OAc. Παράλληλα μελετάται η επίδραση της σύστασης των μειγμάτων προκατεργασίας και της διάρκειας αυτής στο μέσο βαθμό πολυμερισμού, το δείκτη κρυσταλλικότητας και τη μορφολογία των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στον προσδιορισμό εκείνων των συνθηκών προκατεργασίας που οδηγούν στο σχηματισμό αναγεννημένης κυτταρίνης ίδιου μεγέθους με την αρχική αλλά με όσο το δυνατόν λιγότερο κρυσταλλική δομή. Στη συνέχεια επιχειρείται η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης σε διάφορους τύπους μη συμβατικών συστημάτων βιοκατάλυσης (οργανικοί διαλύτες, ιοντικά υγρά, συστήματα ελεύθερα διαλυτών). Επίσης, για τις επιτυχείς αντιδράσεις, εξετάζεται η επίδραση που έχουν ορισμένες βασικές παράμετροι (συγκέντρωση ενζύμου, περιεκτικότητα κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα, μήκος ανθρακικής αλυσίδας του ακυλοδότη, είδος βιοκαταλύτη και θερμοκρασία) στην πορεία και το τελικό ποσοστό της εστεροποίησης. Οι συγκεκριμένες ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης (Avicel και ινώδους), πραγματοποιούνται για πρώτη φορά στην παγκόσμια επιστημονική βιβλιογραφία.

Το δεύτερο σύστημα που σχεδιάστηκε αποτελείται από ένα μόνο στάδιο και στηρίζεται στην ταυτόχρονη διόγκωση και ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Υπάρχουν ορισμένες βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες καταδεικνύουν τις διογκωτικές ιδιότητες που έχει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα στην κυτταρίνη (Nishino et al., 2011; Yin et al., 2007). Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι ιδιαίτερος συμπίεστο και οι ιδιότητες του εξαρτώνται άμεσα από τις τιμές θερμοκρασίας και πίεσης που έχει. Σε σχετικά υψηλές πιέσεις (>14 MPa) τα μόρια του ρευστού έχουν τη δυνατότητα να παρεισφρήσουν ανάμεσα στις αλυσίδες της κυτταρίνης και να την διογκώσουν. Παράλληλα, εφόσον επιχειρείται και η διεξαγωγή κάποιας χημικής αντίδρασης στον πολυσυκακχαρίτη, το ρευστό δύναται να λειτουργήσει και ως μέσο αντίδρασης. Ανάλογα με τα αντίστοιχα υποστρώματα μπορεί να απαιτηθεί και η παρουσία κάποιου συνδιαλύτη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων εργασιών, με τη βοήθεια του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα έχει επιτευχθεί έως τώρα η χημική εστεροποίηση της κυτταρίνης. Αρχικά επετεύχθη η εστεροποίηση της ινώδους κυτταρίνης με ουρία, συνεπικουρούμενη από προκατεργασία των αντιδρώντων σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (T=50 °C, P=18 MPa), παρουσία αιθανόλης ως συνδιαλύτη (Yin et al., 2007). Ακόμα, πραγματοποιήθηκε χημική ακετυλίωση φυσικής κυτταρίνης σε ινώδη μορφή, με ακυλο-δότη τον οξικό ανυδρίτη (T=70 °C, P=9.8 MPa). Στην περίπτωση αυτή το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χρησίμευσε ως παράγοντας διόγκωσης της κυτταρίνης αλλά και ως μέσο αντίδρασης (Nishino et al., 2011). Η διόγκωση της κυτταρίνης θεωρείται μεγάλης σημασίας διότι έτσι δημιουργείται προσβασιμότητα στις αλυσίδες της και αυξάνει η δραστηριότητα των υδροξυλίων της. Το ποσοστό των υδροξυλομάδων που εστεροποιήθηκαν ήταν της τάξεως του 5-6% για την περίπτωση της ουρίας και της τάξης του 75% για τον οξικό ανυδρίτη.

Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα με το γεγονός πως τα ένζυμα που μας ενδιαφέρουν (λιπάσες, εστεράσες, κουτινάσες) παραμένουν σταθερά και διατηρούν την καταλυτική τους ενεργότητα σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα (Lozano et al., 2004; Sereti et al., 1997), επιχειρείται η

διόγκωση και η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης (ινώδους), σε ένα μόνο στάδιο. Στο πλαίσιο διερεύνησης του συγκεκριμένου τύπου αντίδρασης, μελετάται η επίδραση ορισμένων βασικών παραμέτρων (συγκέντρωση ενζύμου, περιεκτικότητα κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα, συγκέντρωση ακυλοδότη, μήκος ανθρακικής αλυσίδας ακυλοδότη, είδος ενζύμου, πίεση και θερμοκρασία συστήματος) στην πορεία της ενζυμικής ακυλίωσης. Επίσης εξετάζεται και η επίδραση που έχει από μόνη της η παρουσία του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα στο δείκτη κρυσταλλικότητας και στη μορφολογία της κυτταρίνης. Οι παραπάνω ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, πραγματοποιούνται για πρώτη φορά στην παγκόσμια επιστημονική βιβλιογραφία.

Στο τέλος γίνεται αξιολόγηση των διαφορετικών ειδών ακυλιωμένης κυτταρίνης που παράχθηκαν από τα δύο παραπάνω συστήματα. Ειδικότερα εξετάζονται (i) ο δείκτης κρυσταλλικότητας και η μορφολογία τους και (ii) η μηχανική συμπεριφορά των ανάλογων υλικών που προέκυψαν μετά από θερμομόρφωση, μέσω μέτρησης του μέτρου ελαστικότητας Young.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εντάσσεται στο πλαίσιο της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας και αφορά στο σχεδιασμό και τη μελέτη δύο διαφορετικών συστημάτων, μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης. Τα συστήματα αυτά στηρίζονται σε δύο σχετικά νέα και πολλά υποσχόμενα μέσα· τα ιοντικά υγρά και τα υπερκρίσιμα ρευστά.

Η συγκεκριμένη εργασία αποτελείται από τέσσερις βασικές ενότητες. Η πρώτη ενότητα είναι το θεωρητικό μέρος, στο οποίο γίνεται μία βιβλιογραφική επισκόπηση των θεμάτων που αφορούν τη διατριβή. Η δεύτερη ενότητα αναφέρει τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και περιγράφει τη μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Στην τρίτη ενότητα παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα και ακολουθεί αξιολόγηση και σχολιασμός τους. Τέλος στην τέταρτη ενότητα παρουσιάζονται συμπυκνωμένα τα βασικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη εργασία.

Θεωρητικό Μέρος

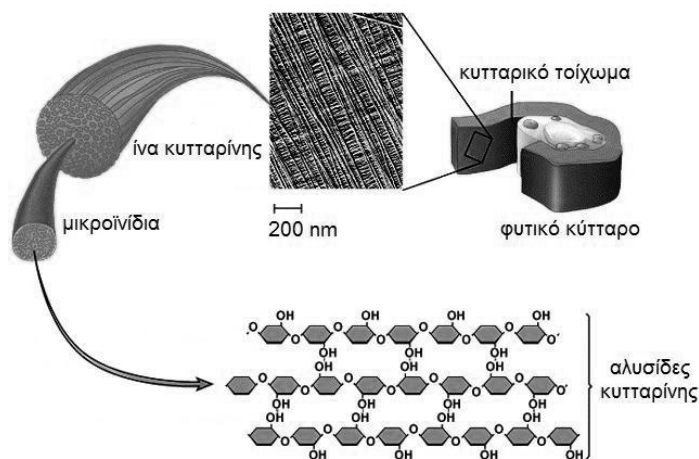
1. Κυτταρίνη

1.1 Λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα

Η λιγνινοκυτταρίνη είναι μία γενική έννοια που αφορά στα κύρια συστατικά των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτών που είναι (i) η κυτταρίνη, (ii) η ημικυτταρίνη και (iii) η λιγνίνη. Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης της γλυκόζης, η ημικυτταρίνη είναι ένα σύνολο πολυσακχαριτών που ο σκελετός τους αποτελείται από διάφορες εξόζες (γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη) και πεντόζες (ξυλόζη, απαβινόζη) και τέλος η λιγνίνη είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο από διαφορετικές μονάδες φαινυλπροπανίου (Zugenmaier, 2008).

Τα φυτά χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο μηχανισμών προστασίας από τις διάφορες ασθένειες που τα απειλούν. Ο πιο σημαντικός μηχανικός μηχανισμός προστασίας από τους μικροοργανισμούς είναι η ύπαρξη του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, το οποίο προστατεύει το ευαίσθητο εσωτερικό τους από τις πιθανές εισβολές μικροβιακών κυττάρων και ιών.

Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα είναι πολύ πιο παχύ από την κυτταρική μεμβράνη. Η ακριβής χημική του σύσταση διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτού αλλά και ανάλογα με το είδος των φυτικών κυττάρων. Σε γενικές γραμμές πάντως το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από μικροϊνίδια κυτταρίνης (**σχήμα 1.1**) τα οποία ενσωματώνονται μέσα σε μία μάζα από πρωτεΐνες και άλλους πολυσακχαρίτες, όπως οι ημικυτταρίνες (Klemm et al., 2005). Η κατασκευή αυτή αποτελεί ανάλογο του οπλισμένου σκυροδέματος των οικοδομών, με τα μικροϊνίδια κυτταρίνης να παίζουν το ρόλο των ράβδων σιδήρου και τη μάζα των πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών να έχουν το ρόλο του σκυροδέματος (**σχήμα 1.2**).



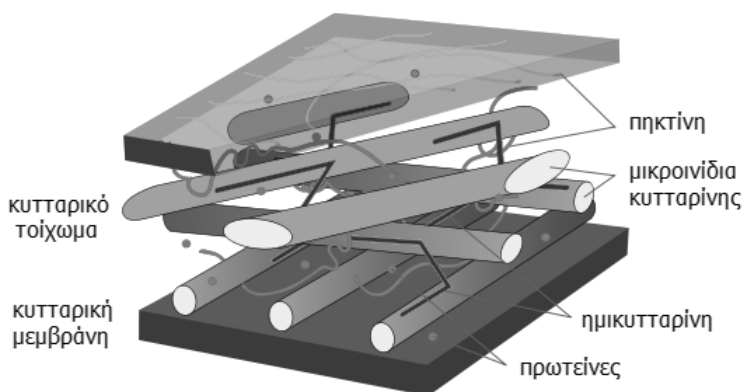
Σχήμα 1.1 Η κυτταρίνη ως συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.

Δύο νέα, γειτονικά φυτικά κύτταρα που σχηματίζονται, δημιουργούν πρώτα λεπτά και σχετικά ευλύγιστα τοιχώματα· τα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα που

αποτελούνται από κυτταρίνη και ημικυτταρρίνη. Ένας άλλος πολυσακχαρίτης, η πηκτίνη, ως κολλώδης ουσία συγκολλά και συγκρατεί τα γειτονικά κύτταρα στη θέση τους. Επιπρόσθετα, ορισμένα κύτταρα δημιουργούν μεταξύ της κυτταρικής μεμβράνης και του πρωτογενούς τοιχώματος ένα δευτερογενές κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από λιγνίνη, κάτι το οποίο ισχυροποιεί περαιτέρω τη μηχανική υποστήριξη του φυτού. Μετά το θάνατο των παραπάνω κυττάρων δημιουργείται ο ξυλώδης κορμός των δέντρων (Nishiyama et al., 2002; Peng et al., 2002).

Γενικά η κυτταρίνη προσδίδει ακαμψία στους φυτικούς ιστούς και παρέχει υψηλή αντοχή σε αξονικό εφελκυσμό. Παράλληλα η παρουσία των ημικυτταρινών και της λιγνίνης προσδίδουν αντοχή σε κάμψη, θλίψη και κρούση.

Το κύριο συστατικό της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας είναι η κυτταρίνη, που ανάλογα με την πηγή προέλευσης μπορεί να αποτελεί έως και το 50% του λιγνινοκυτταρινούχου κλάσματος. Οι ημικυτταρίνες έχουν ένα ποσοστό παρουσίας 23-32% και η λιγνίνη 15-25% (Klemm et al., 2005; Lee & Wang, 2006).



Σχήμα 1.2 Δομή του φυτικού κυτταρικού τοιχώματος.

1.2 Αξιοποίηση της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας για την παραγωγή προϊόντων

Το γεγονός της αφθονίας της λιγνοκυτταρινούχου βιομάζας σε συνδυασμό με το ότι δεν αποτελεί εδώδιμη ύλη για τον άνθρωπο και είναι φθηνή, την καθιστούν θεωρητικά ως την ιδανική πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων. Πράγματι την τελευταία κυρίως δεκαετία ενθαρρύνεται και αναπτύσσεται έντονα η έρευνα και η τεχνολογία αξιοποίησης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας σε τομείς που ως τώρα χρησιμοποιούν τα ορυκτά καύσιμα (πετρελαιοειδή) σαν πρώτη ύλη. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι η παραγωγή αιθανόλης από φυτική βιομάζα, η οποία θα χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια ως καύσιμο (βιοαιθανόλη). Εκτός όμως από τα βιοκαύσιμα, η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται και ως πρώτη ύλη για την παραγωγή διαφόρων χαρακτηριστικών προϊόντων της χημικής

βιομηχανίας, όπως τα πλαστικά (Klemm et al., 2005; Kozlowski et al., 2004; Lee & Wang, 2006; Moon et al., 2011; Ostmark et al., 2007).

Σχετικά με τη διαθεσιμότητα της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας οι αριθμοί συνηγορούν υπέρ της χρησιμοποίησης της. Ειδικότερα, η επιφάνεια της γης δέχεται από τον ήλιο 53000 TW ενέργειας ετησίως. Μέσω της φωτοσύνθεσης, 64 TW και 128 TW ενέργειας ενσωματώνονται ως οργανικός άνθρακας κατά την ανάπτυξη της βιομάζας στους ωκεανούς και στην ξηρά αντίστοιχα. Από τα 128 TW που ενσωματώνονται στην ετήσια εδαφική παραγωγή της βιομάζας, περίπου 44 TW χρησιμοποιούνται για την διατήρηση της ποιότητας του εδάφους μέσω της αυτότροφης αναπνοής, καθώς και σε ανθρωπογενείς δραστηριότητες όπως η παραγωγή τροφίμων, χαρτομάζας, επίπλων κλπ. Ακόμα και με το μικρό βαθμό μετατροπής ενέργειας μέσω της φωτοσύνθεσης, υπολογίζεται πως το μη χρησιμοποιούμενο δυναμικό παραμένει υψηλό. Έτσι, περίπου 10^{11} τόνοι λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας παραμένουν διαθέσιμοι για διάφορες εφαρμογές (Kozlowski et al., 2004; Lee & Wang, 2006).

Εκτός από τα βασικά πλεονεκτήματα της χρήσης της λιγνινοκυτταρινούχου βιομάζας που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, υπάρχει και δυο ακόμα πλεονεκτήματα τα οποία είναι καίρια και ύψιστης σημαντικότητας. Η παραγωγή βιομηχανικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των καυσίμων, στηρίζεται στην άμεση ή έμμεση χρήση πετρελαιοειδών. Η αντικατάστασή τους από εναλλακτικές πηγές όπως η λιγνινοκυτταρινούχος βιομάζα, αφενός συμβάλλει στη μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος, ελαττώνοντας κυρίως τις εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα (φαινόμενο θερμοκηπίου)· αφετέρου συμβάλλει στη μείωση της εξάρτησης από το ορυκτό πετρέλαιο.

Ειδικότερα, όσον αφορά την κυτταρίνη, η διαθεσιμότητα της είναι θεωρητικά απεριόριστη. Τεράστιες ποσότητες κυτταρίνης σχηματίζονται κάθε έτος μέσω της φωτοσύνθεσης κι έτσι μπορεί να αναπληρωθεί οποιαδήποτε κατανάλωση. Σήμερα οι κύριες πηγές κυτταρίνης, για χημικές επεξεργασίες, είναι το βαμβάκι και το ξύλο. Το βαμβάκι είναι σχεδόν καθαρή κυτταρίνη (95%). Όσον αφορά στο ξύλο, η περιεκτικότητά του σε κυτταρίνη κυμαίνεται ανάλογα με το είδος και την τοποθεσία ανάπτυξης του αντίστοιχου φυτού. Σε γενικές γραμμές το ξύλο περιέχει σαν ποσοστό του ξηρού του βάρους: κυτταρίνη 40-50%, ημικυτταρίνη 10-30% και λιγνίνη 20-30% (Klemm et al., 2005).

1.3 Δομή και χημεία κυτταρίνης

1.3.1 Εισαγωγή

Η κυτταρίνη είναι το πλέον άφθονο οργανικό μόριο της φύσης. Αποτελεί το σημαντικότερο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και πήρε το όνομα της από τον γάλο χημικό Anselme Payen (1838). Ο Payen όρισε την κυτταρίνη ως τον πολυσακχαρίτη που αποτελεί στοιχειώδες και ομοιόμορφο συστατικό όλων των φυτικών κυττάρων. Για αυτόν το λόγο ονομάστηκε cellulose (cell = κύτταρο). Η κυτταρίνη αποτελεί επίσης συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων ορισμένων αλγών (*Zea mays*), αλλά εκκρίνεται και από αρκετά βακτήρια (*Sarcina*, *Rhizobium*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*). Παρόλα αυτά, μόνο τα είδη του

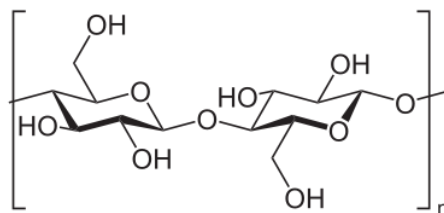
Acetobacter μπορούν να παράγουν ικανές ποσότητες κυτταρίνης που θα έχουν εμπορική σημασία και χρήση.

Η κυριότερη πρώτη ύλη παραγωγής της κυτταρίνης είναι το ξύλο. Η πορεία μετατροπής του ξύλου σε κυτταρίνη χαρακτηρίζεται γενικά σαν πολτοποίηση. Ανάλογα με τη μέθοδο που ακολουθείται, έχουμε τα ακόλουθα είδη πολτών (Klemm et al., 2005):

- α) Μηχανικός πολτός. Παράγεται με απλή μηχανική απόξεση των ξύλων, σε αποδόσεις 90-95% και χρησιμοποιείται στη χαρτοποιεία.
- β) Ημιμηχανικός πολτός. Είναι μηχανικός πολτός που έχει υποστεί μία σχετικώς ήπια χημική επεξεργασία, προκειμένου να καταστεί δυνατή η απομάκρυνση ενός μέρους της λιγνίνης.
- γ) Ημιχημικός πολτός. Είναι ανάλογος του ημιμηχανικού πολτού με τη διαφορά της εντονότερης χημικής επεξεργασίας. Με αυτήν επιτυγχάνεται η απομάκρυνση μεγαλύτερων ποσοστών λιγνίνης. Συνήθως λαμβάνεται σε αποδόσεις 70-80% επί του ξύλου.
- δ) Χημικός πολτός. Στην περίπτωση αυτή η χημική επεξεργασία είναι έντονη με αποτέλεσμα την σχεδόν πλήρη απομάκρυνση της λιγνίνης και ενός μέρους των ημικυτταρινών. Οι αποδόσεις είναι της τάξεως του 50%.

1.3.2 Δομή και κρυσταλλικότητα κυτταρίνης

Από πλευράς δομής του μορίου, η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό βιολογικό πολυμερές που αποτελείται από δομικές μονάδες β-D-γλυκόζης και η σύνδεση τους γίνεται με 1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ορισμένες φορές αναφέρεται και ο δισακχαρίτης κελλοβιόζη ως δομική μονάδα της κυτταρίνης. Στην ουσία δεν υπάρχει κάποια διαφορά μίας και η κελλοβιόζη αποτελείται από δυο μόρια γλυκόζης ενωμένα μεταξύ τους με τον β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Απλά με τον τρόπο αυτό δίνεται έμφαση στον ίδιο το γλυκοζιτικό δεσμό, ο οποίος είναι χαρακτηριστικός της κυτταρίνης (**σχήμα 1.3**). Ο γενικός μοριακός τύπος της κυτταρίνης είναι $(C_6H_{10}O_5)_n$. Οι δομικές μονάδες διατάσσονται στο μόριο της κυτταρίνης με το επίπεδο τους εναλλάξ, ώστε η δομή να είναι κατά το πρότυπο της συνδυοστακτικής κανονικότητας. Κάθε δομική μονάδα έχει τρία ελεύθερα υδροξύλια από τα οποία το ένα είναι πρωτοταγές και τα άλλα δυο δευτεροταγή. Οι ακραίες δομικές μονάδες του μορίου διαφοροποιούνται και η μία έχει τέσσερα ελεύθερα υδροξύλια, ενώ η άλλη μία ομάδα ημιακετάλης (ελεύθερο ανωμερές υδροξύλιο).



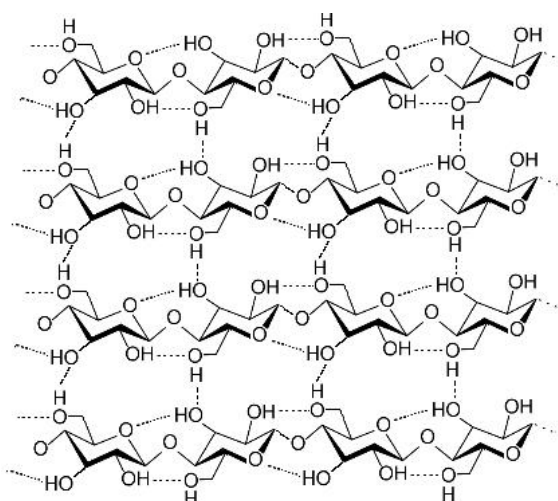
Σχήμα 1.3 Δομική μονάδα κυτταρίνης.

Ο βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης εξαρτάται από την προέλευση της. Γενικά υπάρχει ένα εύρος από 3000 έως 15000 μονάδες γλυκόζης. Για την κυτταρίνη από βαμβάκι ο μέσος βαθμός πολυμερισμού έχει τιμές πάνω από 4000. Για την κυτταρίνη από ξύλα δίνονται τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 3000 και 4000 (Moon et al., 2011). Παρόλα αυτά ο μέσος βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης που χρησιμοποιείται σαν πρώτη ύλη για διάφορες εφαρμογές, είναι πολύ μικρότερος. Αυτό συμβαίνει γιατί οι κλασικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και τον καθαρισμό της κυτταρίνης συνοδεύεται και από μερικό αποπολυμερισμό της. Έτσι, η κυτταρίνη που λαμβάνεται από το βαμβάκι έχει μέσο βαθμό πολυμερισμού που συνήθως κυμαίνεται από 1000 έως 3000. Η αντίστοιχη κυτταρίνη που προέρχεται από το ξύλο έχει μέσο βαθμό πολυμερισμού από 300 έως 1000. Τα πολυμερή της κυτταρίνης παρουσιάζονται ως διατεταγμένες δομές (μικροϊνίδια) και η κύρια λειτουργία τους είναι να εξασφαλίσουν τη ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών. Τα μικροϊνίδια έχουν διάμετρο 2-20 nm, μήκος 100-40000 nm και το καθένα περιέχει μέχρι 36 αλυσίδες (μόρια) κυτταρίνης (Zugenmaier, 2008).

Τα τρία υδροξύλια της κάθε δομικής μονάδας μίας αλυσίδας κυτταρίνης, δημιουργούν τη δυνατότητα ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου αναπτύσσονται μεταξύ των υπολειμμάτων γλυκόζης (glucose residues) της ίδιας αλυσίδας κυτταρίνης ($O3 - H \rightarrow O5'$ και $O6 \rightarrow H - O2'$) καθώς και από τους δεσμούς υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ μορίων γλυκόζης που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες κυτταρίνης ($O6 - H \rightarrow O3'$). Οι ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις που δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο, σε συνδυασμό και με την κανονικότητα της δομής του μορίου, ευνοούν την εμφάνιση υψηλών βαθμών κρυσταλλικότητας (Klemm et al., 2005; Moon et al., 2011; Peng et al., 2002). Ειδικότερα οι δεσμοί υδρογόνου διευθετούν τις αλυσίδες της κυτταρίνης σε παράλληλη και επίπεδη διάταξη προκαλώντας ταυτόχρονα και το σχηματισμό υδρογονικών δεσμών μεταξύ των παράλληλων επιπέδων κυτταρίνης, δημιουργώντας έτσι συμπαγείς και δύσκολα αποικοδομήσιμες κρυσταλλικές περιοχές (σχήμα 1.4). Οι τυπικές τιμές του βαθμού κρυσταλλικότητας κυμαίνονται από 70% έως 95%. Τα παραπάνω καθιστούν την κυτταρίνη έναν αδιάλυτο πολυσακχαρίτη που σχηματίζει σε μεγάλο βαθμό κρυσταλλικές περιοχές (Casarano et al., 2011; Moon et al., 2011; Spence et al., 2010).

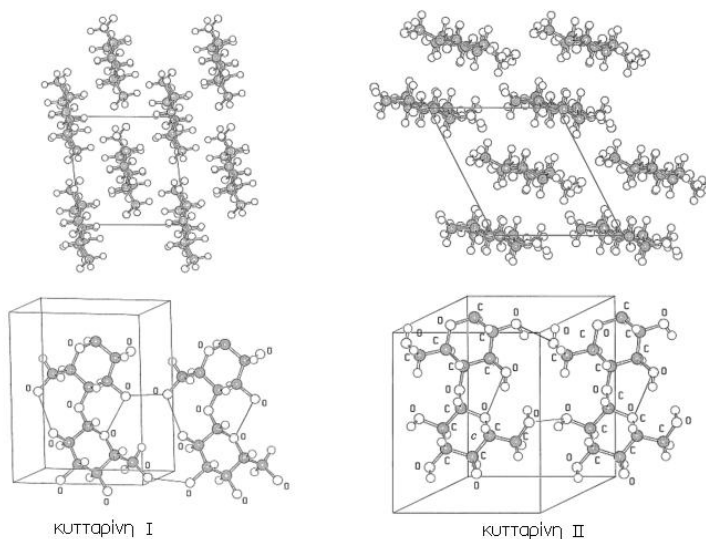
Ένα μέρος πάλι της κυτταρίνης είναι άμορφο και παρεμβάλλεται μεταξύ των κρυσταλλικών περιοχών. Οι άμορφες περιοχές είναι πολύ υγροσκοπικές και ως συνέπεια η κυτταρίνη μπορεί να διογκωθεί σε πολύ μεγάλο βαθμό. Επίσης η κυτταρίνη μπορεί να αποικοδομηθεί πλήρως σε έντονα όξινες συνθήκες (παρουσία θειικού, υδροχλωρικού ή φωσφορικού οξέως) (Casarano et al., 2011). Η κρυσταλλική δομή που μπορεί να έχει η κυτταρίνη, εξαρτάται από τη θέση και τη διάταξη των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των αλυσίδων κυτταρίνης. Ειδικότερα, η φυσική κυτταρίνη κρυσταλλώνεται συνήθως με τέτοιο τρόπο ώστε οι κρυσταλλίτες να διατάσσονται στην ίνα με τον νοητό άξονα της μεγάλης τους διάστασης παράλληλα προς τη διεύθυνση της ίνας. Η κρυσταλλική αυτή μορφή χαρακτηρίζεται σαν κυτταρίνη τύπου I και οι αντίστοιχες δομές είναι οι I_α και I_β . Η βασική διαφορά μεταξύ τους είναι πως στη δομή τύπου I_α , τα γειτονικά φύλλα κυτταρίνης (η επίπεδη διάταξη που δημιουργείται από πολλές

αλυσίδες που τοποθετούνται η μία δίπλα στην άλλη) τοποθετούνται το ένα πάνω στο άλλο διατηρώντας τον ίδιο, κοινό προσανατολισμό.



Σχήμα 1.4 Τυπική διάταξη αλυσίδων κυτταρίνης.

Αντίθετα, στη δομή τύπου I_{β} , τα φύλλα κυτταρίνης διατάσσονται αντιπαράλληλα το ένα με το άλλο. Μία δεύτερη κρυσταλλική μορφή (κυτταρίνη τύπου II) συναντάται σε κυτταρίνες που συνήθως έχουν διογκωθεί με αλκαλικά διαλύματα περιεκτικότητας άνω του 11%. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της κυτταρίνης τύπου II σε σχέση με αυτήν του τύπου I, είναι πως οι γειτονικές αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες μεταξύ τους (Moon et al., 2011; Nishiyama et al., 2002) (σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5 Κρυσταλλική δομή κυτταρίνης τύπου I και II.

Η κυτταρίνη που παράγεται από βακτήρια και φύκη είναι κυρίως τύπου I_α, ενώ η φυτική κυτταρίνη έχει κατά το πλείστον κρυσταλλική δομή τύπου I_β. Όταν με χημική επεξεργασία η κυτταρίνη τύπου I μεταπίπτει σε κυτταρίνη τύπου II, τότε η τελευταία δεν μπορεί να επανέλθει στην αρχική κρυσταλλική δομή, υποδηλώνοντας πως το φαινόμενο αυτό είναι αναντίστροφο και άρα ο τύπος II πιο σταθερός ενεργειακά από τον I (Spence et al., 2010; Tokuda & Watanabe, 2007).

Αναλυτικότερα, η φυσική κυτταρίνη (κυτταρίνη I_α) δημιουργεί κρυστάλλους στους οποίους αναπτύσσονται διαμοριακοί δεσμοί υδρογόνου μεταξύ υδροξυλίων των μονομερών της ίδιας αλυσίδας αλλά και μεταξύ υδροξυλίων των μονομερών που ανήκουν σε διαφορετικές αλυσίδες. Με αυτόν τον τρόπο σχηματίζονται επίπεδα πλέγματα κυτταρινών. Κάθε υπόλειμμα γλυκόζης προσανατολίζεται ως προς το διπλανό του κατά 180°. Από την άλλη, υπάρχουν και ορισμένες άμορφες περιοχές οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα στις κρυσταλλικές. Η συνολική αυτή δομή της κυτταρίνης δημιουργεί στο χώρο ένα δίκτυο όπου υπάρχουν μόνο μικροί και υδρόφιλοι πόροι, δημιουργώντας ουσιαστικά μικροσκοπικές σωληνώσεις. Τέτοιες, ώστε μονάχα μόρια νερού να μπορούν να προσεγγίσουν και να διεισδύσουν μέσα σε αυτές, οδηγώντας σε διάγκωση της κυτταρίνης (Moon et al., 2011; Spence et al., 2010; Stevens & Steuernagel, 1979; Stevens & Steuernagel, 1978).

1.3.3 Χαρακτηριστικές ιδιότητες κυτταρίνης

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που έχει η κυτταρίνη, τα οποία της προσδίδουν το λειτουργικό της ρόλο ως δομικό συστατικό των φυτών, είναι και αυτά που την καθιστούν υλικό που δεν μπορεί να επεξεργαστεί εύκολα. Το πολύ μεγάλο μέγεθος ενός μορίου κυτταρίνης (πολυμερές μόριο), είναι από μόνο του ένας παράγοντας για το δύσκολο χειρισμό της σε μοριακό επίπεδο, λόγω της περιορισμένης ή και μηδενικής διαλυτότητας που έχουν τα μεγαλομόρια γενικώς. Ένας ακόμα παράγοντας είναι η πολύ συμπαγής και στενή σύνδεση που έχουν τα μόρια κυτταρίνης μεταξύ τους (Klemm et al., 2005). Αυτό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οφείλεται στην ανάπτυξη ισχυρότατων διαμοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των υδροξυλομάδων των μονομερών της κυτταρίνης. Με βάση τον αριθμό των ελεύθερων υδροξυλίων κάθε δομικής μονάδας και τον μέσο βαθμό πολυμερισμού των αλυσίδων κυτταρίνης, γίνεται εύκολα αντιληπτή η έκταση των δεσμών υδρογόνου σε ένα τυπικό δίκτυο κυτταρινικών μορίων. Αυτό ακριβώς είναι που συγκρατεί τις αλυσίδες του πολυσακχαρίτη τόσο σφικτά και στενά, ώστε να συγκροτούν ένα σχεδόν αδιαπέραστο πλέγμα που έχει μεγάλη τάξη στη δομή του. Έκφραση αυτού του φαινομένου είναι ο πολύ υψηλός βαθμός κρυσταλλικότητας που έχουν οι φυσικές κυτταρίνες (Moon et al., 2011; Nishiyama et al., 2002).

Συνέπεια των παραπάνω είναι η δυσκολία της χημικής κατεργασίας της κυτταρίνης εξαιτίας της μη προσπελασιμότητας της από διάφορα μόρια, αλλά και το ότι η φυσική κυτταρίνη δεν διαλύεται σχεδόν σε κανέναν διαλύτη, κάτω από συνήθεις συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Υπάρχουν μόνο ελάχιστοι,

ιδιαίτεροι διαλύτες ή καλύτερα συστήματα αυτών, στα οποία μπορεί να διαλυθεί η κυτταρίνη (πίνακας 1.1).

Πίνακας 1.1 Συστήματα διαλυτών στα οποία η κυτταρίνη παρουσιάζει διαλυτότητα.

1	N-methylmorpholine-N-oxide
2	CdO / ethylenediamine
3	LiCl / N,N-dimethylacetamide

Χαρακτηριστικά επίσης αναφέρεται πως το άμυλο, το οποίο είναι και αυτό ένα φυσικό πολυμερές της γλυκόζης, μπορεί να μετατραπεί από κρυσταλλικό σε άμορφο όταν θερμανθεί πάνω από τους 70 °C, σε υδατικό περιβάλλον. Απεναντίας η κυτταρίνη απαιτεί θερμοκρασία 320 °C και πίεση 25 MPa, για να καταστεί άμορφη σε περιβάλλον νερού. Η θεμελιώδης δομική διαφορά μεταξύ αμύλου και κυτταρίνης είναι ο τύπος του γλυκοζιτικού δεσμού που συνδέει τα μονομερή της γλυκόζης. Στο άμυλο υπάρχει ο α- γλυκοζιτικός δεσμός, ενώ στην κυτταρίνη ο δεσμός αυτός είναι ο β-. Σαν αποτέλεσμα η κυτταρίνη αναπτύσσεται στο χώρο γραμμικά και έχει τα χαρακτηριστικά που μόλις αναφέρθηκαν (Kozlowski et al., 2004).

Είναι λοιπόν προφανές το ότι η αποτελεσματική επεξεργασία της κυτταρίνης (χημική ή βιοτεχνολογική) αποτελεί ένα από τα πλέον προκλητικά προβλήματα στις προσπάθειες μετατροπής των κυτταρινούχων υλικών σε καύσιμα και χημικά.

1.3.4 α-, β- και γ- κυτταρίνη

Οι όροι α-κυτταρίνη, β-κυτταρίνη και γ-κυτταρίνη, χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό της ποιότητας της κυτταρίνης. Οι διαφορές, ως προς το κριτήριο αυτό, αφορούν στο διαφορετικό μοριακό βάρος της κυτταρίνης και η ποιοτική κατάταξη γίνεται βάση της διαλυτότητας σε τυποποιημένα υδατικά διαλύματα υδροξειδίου του νατρίου (Kozlowski et al., 2004; Moon et al., 2011; Pappas et al., 2002). Η α-κυτταρίνη είναι αδιάλυτη σε υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου περιεκτικότητας 17.5%. Η β-κυτταρίνη είναι διαλυτή στο διάλυμα NaOH 17.5%, αλλά είναι αδιάλυτη σε διάλυμα NaOH 8%. Τέλος η γ-κυτταρίνη είναι διαλυτή σε διάλυμα NaOH περιεκτικότητας 8%. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η φυσική κυτταρίνη είναι σχεδόν εξολοκλήρου α-κυτταρίνη. Με τον όρο «ολοκυτταρίνη» επίσης, χαρακτηρίζεται το σύνολο των α-, β- και γ- κυτταρινών. Να σημειωθεί πως ο εν λόγω χαρακτηρισμός της κυτταρίνης ως α- ή β-, δεν έχει καμία συνάφεια με τον χαρακτηρισμό ενός γλυκοζιτικού δεσμού ως α- ή β-.

2. Εστέρες κυτταρίνης

2.1 Εισαγωγή

Η κυτταρίνη, ως πολυυδροξυλιωμένη αλκοόλη, δύναται να αντιδράσει μέσω των υδροξυλίων της με διάφορους υποκαταστάτες. Τα νέα μόρια που προκύπτουν έχουν συνήθως νέες ιδιότητες, με τους εστέρες και τους αιθέρες της κυτταρίνης να αποτελούν τις πλέον χαρακτηριστικές περιπτώσεις. Όταν η κυτταρίνη αντιδρά με κάποια οξέα (κυρίως μέσω των ανυδριτών και χλωριδίων τους), το αποτέλεσμα είναι η παραγωγή των αντίστοιχων εστέρων (Edgar et al., 2001; Fox et al., 2011). Οι εστέρες αυτοί προφανώς δεν χαρακτηρίζονται σαν πολυεστέρες επειδή ο εστερικός δεσμός δεν συμμετέχει στην ανάπτυξη της δομής της βασικής αλυσίδας του πολυμερούς. Οι εστερικές αυτές ομάδες αναπτύσσονται σαν πλευρικές ομάδες της αλυσίδας της κυτταρίνης. Οι ιδιότητες των εστέρων της κυτταρίνης καθορίζονται από το μέγεθος της κυτταρινικής αλυσίδας, το είδος του υποκαταστάτη, το βαθμό υποκατάστασης και την κατανομή των υποκαταστατών στο μεγαλομόριο (Samaranayake & Glasser, 1993a; Vaca-Garcia et al., 2001). Ως βαθμός υποκατάστασης (Degree of Substitution/DS) ορίζεται ο αριθμός των τριών αρχικά ελεύθερων υδροξυλίων της κάθε δομικής μονάδας της κυτταρίνης, τα οποία έχουν υποκατασταθεί από μία νέα χημική ομάδα. Ο αριθμός αυτός μπορεί προφανώς να πάρει τιμές στο διάστημα [0,3] και επίσης να είναι και δεκαδικός, αφού αναφέρεται στο μέσο όρο της υποκατάστασης όλων των δομικών μονάδων ενός μορίου κυτταρίνης (Fox et al., 2011).

Η αντίδραση της εστεροποίησης οδηγείται σε λίγες μόνο περιπτώσεις μέχρι πλήρους υποκαταστάσεως. Συνήθως παράγονται προϊόντα με έναν συγκεκριμένο και απαιτούμενο (μέσο) βαθμό υποκατάστασης. Αυτά αποτελούνται από δομικές μονάδες γλυκόζης που έχουν διαφορετικούς βαθμούς υποκατάστασης, με τυχαία κατανομή. Μπορούν επομένως να χαρακτηριστούν και ως «τυχαία» συμπολυμερή. Φυσικά τέτοιου είδους δομή παρατηρείται και στις περιπτώσεις των μεικτών εστέρων, όπου εκεί υπάρχουν εστεροποιημένα με την κυτταρίνη δύο ή περισσότερα διαφορετικά είδη εστέρα (π.χ. οξικός - βουτυρικός εστέρας).

Γενικά, μπορεί να ειπωθεί πως οι εστέρες της κυτταρίνης είναι θερμοπλαστικά υλικά και βρίσκουν ευρεία εφαρμογή ως πλαστικά και επικαλυπτικά κυρίως, μετά από μόρφωση τους σε φύλλα και ίνες. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που ακολουθείται μία διαδικασία θερμομόρφωσης είναι απαραίτητη η παρουσία ενός πλαστικοποιητή. Οι συνήθεστοι πλαστικοποιητές για αυτές τις περιπτώσεις είναι ο φθαλικός διαιθυλεστέρας και ο φθαλικός διβουτυλεστέρας (Edgar et al., 2001; Gemili et al., 2009; Jin et al., 2010). Η χρήση των πλαστικοποιητών κρίνεται αναγκαία διότι το σημείο θερμοπλαστικότητας βρίσκεται συνήθως στα όρια του σημείου θερμικής αποσύνθεσης. Οι συνήθειες ποσότητες πλαστικοποιητών που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται μεταξύ 10% και 70% w/w. Οι κυριότεροι από τους βιομηχανικούς εστέρες κυτταρίνης είναι:

α) Ο νιτρικός εστέρας κυτταρίνης ή νιτροκυτταρίνη.

β) Ο οξικός εστέρας κυτταρίνης ή οξική κυτταρίνη.

γ) Ο προπιονικός εστέρας κυτταρίνης ή προπιονική κυτταρίνη.

δ) Ο βουτυρικός εστέρας κυτταρίνης ή βουτυρική κυτταρίνη.

Από τους παραπάνω εστέρες μόνο ο νιτρικός είναι ανόργανης φύσης, ενώ οι υπόλοιποι είναι οργανικοί. Γενικά οι εστέρες της κυτταρίνης μπορούν να θεωρηθούν (βιο)αποικοδομήσιμα και ανανεώσιμα υλικά. Στον πίνακα που ακολουθεί (**πίνακας 2.1**) παρατίθενται ορισμένες χαρακτηριστικές φυσικοχημικές ιδιότητες των βιομηχανικά σημαντικότερων εστέρων κυτταρίνης.

Πίνακας 2.1 Ιδιότητες εστέρων κυτταρίνης ($DS=3$).

Εστέρας	Σημείο Τήξεως ($^{\circ}\text{C}$)	WTV*	Πυκνότητα (g/mL)
Οξικός	306	54.4	1.52
Προπιονικός	234	26.9	1.28
Βουτυρικός	183	16.1	1.23

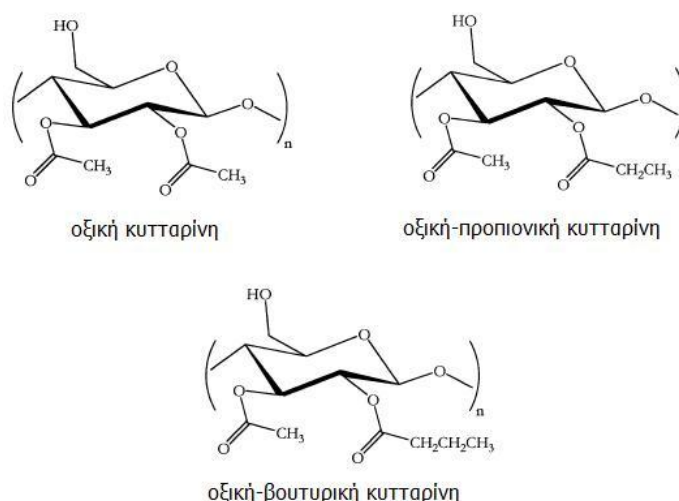
* *Water Tolerance Value*: mL H_2O που απαιτούνται για να ξεκινήσει η καταβύθιση του εστέρα από 125 mL διαλύματος του σε ακετόνη, συγκέντρωσης 0.1% w/v.

Ως θερμοπλαστικά υλικά (thermoplastics ή thermosoftening plastics) ορίζονται εκείνα τα υλικά (πολυμερή) τα οποία τήκονται με τη θέρμανση και όταν στη συνέχεια ψυχθούν κατάλληλα, μεταβαίνουν σε μία υαλώδη κατάσταση. Πιο συγκεκριμένα είναι τα υλικά που αποκτούν πλαστικότητα και μορφοποιούνται με την επίδραση της θερμοκρασίας και της πίεσης. Το φαινόμενο αυτό είναι αντιστρεπτό και το υλικό μπορεί επανειλημμένα να θερμανθεί και να μεταβεί στην πλαστική κατάσταση χωρίς καμία χημική μεταβολή. Επίσης τήκονται και διαλύονται από συγκεκριμένους διαλύτες. Η βασική διαφορά τους με μία άλλη κατηγορία υλικών, τα θερμοσκληρινόμενα, έγκειται στο ότι τα θερμοπλαστικά μπορούν εκ νέου να τηχθούν και να μορφωθούν (Edgar et al., 2001; Shiraishi et al., 1982; Yoshida, 2009).

Η κυριότερη αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται από την τεχνολογία των πολυμερών σε αυτού του είδους τα υλικά, είναι η θερμομηχανική (TMA) και η δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA). Η θερμομηχανική ανάλυση μετρά αλλαγές στις διαστάσεις του υλικού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση αυτή το υλικό υφίσταται παράλληλα και μία στατική δύναμη. Η δυναμική μηχανική ανάλυση μετρά διάφορες μηχανικές παραμέτρους κάτω από δυναμική ή παλμική καταπόνηση. Η τελευταία μπορεί να συνδυαστεί και με παράλληλη σάρωση ενός θερμοκρασιακού εύρους, οπότε έχουμε την δυναμική και θερμική μηχανική ανάλυση (DTMA) (Bouhdadi et al., 2011; Vaca-Garcia et al., 2003; Yoshida, 2009).

2.2 Εφαρμογές των εστέρων κυτταρίνης

Οι εστέρες κυτταρίνης που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο εμπορικό, άρα και τεχνολογικό ενδιαφέρον, είναι οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης. Από αυτούς οι πλέον χρησιμοποιούμενοι είναι η οξική κυτταρίνη, η οξική-βουτυρική κυτταρίνη, και η οξική-προπιονική κυτταρίνη (σχήμα 2.1). Η οξική κυτταρίνη χρησιμοποιείται χαρακτηριστικά υπό τη μορφή ινών σε υφάσματα, ως πρώτη ύλη σε πλαστικά, σε σχηματισμό διαφόρων φιλμ, σε βερνίκια, σε οθόνες τεχνολογίας LCD, στη δημιουργία ειδικών υδρόφοβων επιφανειών και φύλλων και στον τομέα των καλλυντικών (Edgar et al., 2001; Wibowo et al., 2006) (σχήμα 2.2).

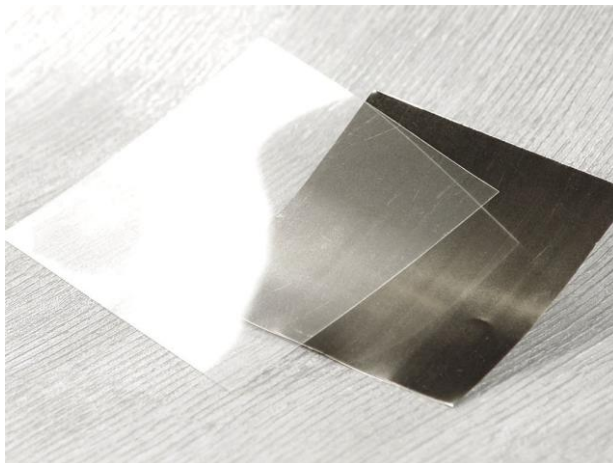


Σχήμα 2.1 Δομικές μονάδες τριών σημαντικών εστέρων κυτταρίνης.

Μεγάλες ποσότητες οξικής κυτταρίνης χρησιμοποιούνται παγκοσμίως στην παραγωγή διαφόρων ειδών φίλτρων. Επίσης, εξαιτίας της οπτικής διαύγειας, της μηχανικής αντοχής και του εύκολα κατεργάσιμου χαρακτήρα τους, τα φιλμ οξικής κυτταρίνης χρησιμοποιούνται ευρέως ως υλικά συσκευασίας (packaging) και ως διακοσμητικά ενθέματα (decorative films). Από οξική κυτταρίνη προέρχονται και διάφορα πλαστικά τα οποία βρίσκουν χρήσεις σε προϊόντα οδοντικής περιποίησης λόγω της μη τοξικότητάς τους, σε μαγειρικά σκεύη που δεν υπόκεινται σε υψηλές θερμοκρασίες αλλά και σε πολυμερή τμήματα ηλεκτρονικών υπολογιστών (Mascheroni et al., 2010; Stevens & Stevermagel, 1978).

Η οξική κυτταρίνη χαμηλού ιξώδους χρησιμοποιείται εκτενώς ως συστατικό σε προϊόντα καλλυντικής περιποίησης, ως προστατευτικό υλικό επικάλυψης σε χάρτινη ύλη, σε μεταλλικά αλλά και γυάλινα αντικείμενα. Θερμοανθεκτικά πρόσθετα υφασμάτων έχουν επίσης κατασκευαστεί από οξική κυτταρίνη. Ακόμα, οι εστέρες οξικής κυτταρίνης σχηματίζουν φιλμ τα οποία αποτελούν πολύ καλή βάση για διαπερατές μεμβράνες που είναι ευαίσθητες σε αλλαγές πίεσης. Σχετικά με τη χρήση της οξικής κυτταρίνης στην κατασκευή μεμβρανών, αναφέρεται πως τα αντίστοιχα φιλμ παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητα αλλά και

πορώδη δομή· έτσι ένα ακόμα πεδίο εφαρμογών τους είναι οι μεμβράνες αντίστροφης όσμωσης για τον καθαρισμό νερού. Επίσης κατασκευάζονται μεμβράνες που ο ρόλος τους είναι να φιλτράρουν και να καθαρίζουν βιολογικά υγρά όπως το αίμα ή και εδώδιμα ρευστά όπως οι χυμοί φρούτων.



Σχήμα 2.2 Φύλλα κατασκευασμένα από οξική κυτταρίνη.

Βιοδιασπώμενα φιλμ, σύνθετα υλικά με αφρώδη υφή (π.χ. σπόγγι), υποκατάστατα ειδών καπνιστού, επικαλυπτικά φαρμάκων αλλά και συστήματα νανοδιαστάσεων με σκοπό την κατευθυνόμενη *in vivo* μεταφορά και αποδέσμευση φαρμάκων είναι μερικές ακόμα από τις καινούριες και πολλά υποσχόμενες εφαρμογές των εστέρων (οξικής) κυτταρίνης (Edgar, 2006; El-Tahlawy et al., 2007; Elegir et al., 2008).

Με τις περιβαλλοντικά φιλικές διεργασίες και τα ανάλογα προϊόντα τους να είναι πιο επίκαιρα από ποτέ, οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης επανέρχονται στο προσκήνιο ως βιοδιασπώμενα θερμοπλαστικά φυσικής προέλευσης. Η οξική κυτταρίνη είναι βιοαποικοδομήσιμη, με τον ρυθμό αποικοδόμησης να αυξάνει αντιστρόφως ανάλογα ως προς τον βαθμό υποκατάστασης. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως φιλμ οξικής κυτταρίνης με βαθμό υποκατάστασης $DS=2.5$, απαιτούν χρόνο της τάξεως των 10 ημερών ώστε να αποικοδομηθούν *in vitro* σε ελεγχόμενη καλλιέργεια. Παρομοίως, φιλμ οξικής κυτταρίνης με βαθμό υποκατάστασης $DS=1.7$, παρουσιάζουν βαθμό αποικοδόμησης 70% για παραμονή 27 ημερών σε τυπικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Όταν όμως πρόκειται για οξική κυτταρίνη βαθμού υποκατάστασης $DS=2.5$, απαιτείται χρόνος παραμονής 10 εβδομάδων περίπου για αντίστοιχο βαθμό αποικοδόμησης (Edgar et al., 2001; Harrison, 1987; Satge et al., 2004).

Αναφορικά με τους μεικτούς εστέρες κυτταρίνης, οι οξικός-προπιονικός και οξικός-βουτυρικός έχουν και αυτοί αρκετές εφαρμογές ως πλαστικά, φιλμ, επικαλυπτικά και συστατικά καλλυντικών προϊόντων (ως σταθεροποιητές). Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα δυο είδη εστέρων πάντως, ο οξικός-βουτυρικός εστέρας της κυτταρίνης συμμετέχει εντονότερα στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων, σε σχέση με τον οξικό-προπιονικό εστέρα. Ως θερμοπλαστικά υλικά,

αυτοί οι δυο μεικτοί εστέρες μορφώνονται κατάλληλα είτε μέσω έγχυσης σε καλούπια, είτε μέσω εκβολής. Επίσης μπορούν να διαλυθούν σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (π.χ.ακετόνη, ακετονιτρίλιο, διχλωρομεθάνιο/μεθανόλη) και να σχηματίσουν φιλμ μετά την εξάτμιση του διαλύτη. Οι μεικτοί εστέρες κυτταρίνης είναι γενικά περισσότερο συμβατοί με διάφορους πλαστικοποιητές και διάφορες τεχνητές ρητίνες σε σχέση με την οξική κυτταρίνη (Liebert & Heinze, 2005; Polyakov et al., 1993; Qiu et al., 2004; Samaranayake & Glasser, 1993b). Έτσι τα αντίστοιχα προϊόντα τους επιδεικνύουν καλύτερα χαρακτηριστικά σε μηχανικές ιδιότητες, είναι πιο ανθεκτικά και έχουν εξαιρετική οπτική διαύγεια. Για παράδειγμα, ο οξικός-βουτυρικός εστέρας της κυτταρίνης είναι συμβατός με πολυεστέρες, καθώς και με ακρυλικές και βινυλικές ρητίνες. Μάλιστα, η αναμειξιμότητα του με τις συγκεκριμένες ουσίες αλλά και οι ιδιότητες των υλικών που προκύπτουν επηρεάζονται από το ποσοστό παρουσίας του βουτυρικού εστέρα.

Ο οξικός-βουτυρικός εστέρας κυτταρίνης με υψηλό ποσοστό βουτυρικών ομάδων, είναι διαλυτός σε διάφορους κοινούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται από τη βιομηχανία βερνικιών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι συγκεκριμένοι εστέρες να απαντώνται ως συστατικά βερνικιών και επικαλυπτικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στην αυτοκινητοβιομηχανία και στην κατασκευή επίπλων. Οξικοί-βουτυρικοί εστέρες, μορφωμένοι μαζί με ακρυλικά πολυμερή, παρέχουν σύνθετα υλικά που είναι ανθεκτικά σε ιδιαίτερες καιρικές συνθήκες (αδιάβροχα, αντιανεμικά κλπ.) και που από ρευστομηχανική άποψη επιτρέπουν την ομαλή ροή ρευστών. Τέτοιου είδους υλικά βρίσκουν εφαρμογή σε υφάνσιμες ίνες αλλά και στην κατασκευή αγωγών και σωληνώσεων με ειδικές απαιτήσεις (Vaca-Garcia & Borredon, 1999).

Οι οξικός-προπιονικός εστέρας της κυτταρίνης επίσης, εξαιτίας του σχετικά υψηλού σημείου τήξεως, της ανθεκτικότητας του έναντι ορισμένων αλκοολών και της γενικότερης αντοχής που επιδεικνύει, χρησιμοποιείται στην παραγωγή επιφανειών εκτύπωσης και επικάλυψης. Επίσης λόγω της μη τοξικότητας του, επιλέγεται και ως υλικό συσκευασίας σε τρόφιμα. Τέλος οι μεικτοί εστέρες της κυτταρίνης που παρουσιάζονται στις παραγράφους αυτές, βρίσκουν πεδίο εφαρμογής και στην κατασκευή οπτικών που έχουν σχεδιαστεί για να λειτουργούν σε συνθήκες ομίχλης (Liebert & Heinze, 2005; Stevens & Steuernagel, 1979).

2.3 Παραγωγή αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης

2.3.1 Χημεία της εστεροποίησης κυτταρινών

Η αντίδραση εστεροποίησης των πρωτοταγών και δευτεροταγών αλκοολομάδων που έχει η κυτταρίνη δεν διαφέρει ουσιαστικά από την αντίδραση εστεροποίησης οποιασδήποτε άλλης αλκοόλης. Οι ιδιαιτερότητες και δυσκολίες στην εστεροποίηση της κυτταρίνης οφείλονται στη μακρομοριακή δομή και διάταξη της. Παρόλα αυτά έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συνθήκες κάτω από τις οποίες είναι δυνατή η καταλυτική εστεροποίηση του συγκεκριμένου

πολυσακχαρίτη. Ο ρυθμός και η απόδοση της αντίδρασης, είναι μεγέθη τα οποία εξαρτώνται κυρίως από την ποιότητα της κυτταρίνης.

Καρβοξυλικά οξέα, χλωρίδια και ανυδρίτες τους, είναι οι εν δυνάμει ακυλοδοτές για τις αντιδράσεις εστεροποίησης των υδροξυλίων της κυτταρίνης, σε βιομηχανική κλίμακα. Όσον αφορά την εστεροποίηση με ελεύθερα καρβοξυλικά οξέα, απαιτούνται τόσο υψηλές θερμοκρασίες και συγκεντρώσεις καταλυτών (συνήθως ισχυρά οξέα), που μόνο προϊόντα μικρού μοριακού βάρους άπα και μικρού βαθμού πολυμερισμού, παράγονται (Bludova et al., 1984; Ciacco et al., 2003). Και αυτό συμβαίνει διότι οι παραπάνω συνθήκες οδηγούν σε αποπολυμερισμό και υποβιβασμό του μεγέθους των μορίων κυτταρίνης. Επίσης οι προσπάθειες που έγιναν για εστεροποίηση της κυτταρίνης με χλωρίδια καρβοξυλικών οξέων και κυρίως του οξικού, απέφεραν αποτελέσματα αλλά η συνολική διεργασία ήταν οικονομικά ασύμφορη (Edgar et al., 2001; Fox et al., 2011; Klemm & Heinze, 1986).

Όλες οι βιομηχανικές διεργασίες εστεροποίησης της κυτταρίνης που είναι εν ισχύ, χρησιμοποιούν ανυδρίτες των καρβοξυλικών οξέων διαλυμένους συνήθως σε πυριδίνη. Στοιχειομετρικά, για την πλήρη εστεροποίηση της κυτταρίνης, απαιτούνται 3 mol του ανυδρίτη ανά δομική μονάδα του πολυμερούς, καθώς τα εν δυνάμει εστεροποιηθέντα υδροξύλια είναι τρία. Στην πράξη φυσικά, όπως είναι αναμενόμενο, χρησιμοποιείται περίσσεια του ανυδρίτη για να εξασφαλιστεί ο ποσοτικός χαρακτήρας της αντίδρασης (Klemm et al., 1983; Klemm et al., 1987).

Αρκετοί καταλύτες έχουν κατά καιρούς προταθεί για την επιτάχυνση της αντίδρασης εστεροποίησης της κυτταρίνης με ανυδρίτες καρβοξυλικών οξέων (κυρίως του οξικού). Από αυτούς μόνο το θειικό οξύ (H_2SO_4) βρίσκει ευρεία πρακτική εφαρμογή. Ο χλωριούχος ψευδάργυρος (ZnCl_2) που χρησιμοποιήθηκε και αυτός ως καταλύτης, απαιτούνταν σε σχετικά υψηλές αναλογίες (0.5-1 μέρη ανά μέρος κυτταρίνης) και επίσης είχε πολύ υψηλό κόστος αναγέννησης. Η καταλυτική επίδραση του θειικού οξέος έγκειται κυρίως στον ταχύτατο και ποσοτικό σχηματισμό όξινων εστέρων κυτταρίνης-θειικού οξέος (sulfoesters). Οι εστέρες αυτοί στη συνέχεια, αρχίζουν να αντικαθίστανται από τις οξικές ομάδες των αντίστοιχων χλωριδίων, καθώς αυξάνεται και η θερμοκρασία (Protoporov et al., 2005; Xu et al., 2011).

Με την αντίδραση που παρουσιάστηκε παραπάνω, επιτυγχάνεται κυρίως η παραγωγή τριοξικής κυτταρίνης, δηλαδή κυτταρίνης που όλα τα αρχικά υδροξύλια της έχουν εστεροποιηθεί. Βεβαίως υπάρχουν και παραπροϊόντα όπως μερικώς αποκατεστημένες από το καρβοξυλικό οξύ κυτταρίνες, αλλά και εντελώς αδιάλυτα μόρια όπως κυτταρίνη. Στην περίπτωση που απαιτείται προϊόν με βαθμό υποκατάστασης μικρότερο του τρία ($\text{DS} < 3$), τότε γίνεται στη συνέχεια ελεγχόμενη υδρόλυση της ήδη παραχθείσας τριοξικής κυτταρίνης. Η υδρόλυση αυτή γίνεται πλέον σε ομογενές σύστημα με την προσθήκη νερού ή αραιωμένου οξικού οξέος, ώστε να εξουδετερωθεί και η περίσσεια του ανυδρίτη.

2.3.2 Βιομηχανική παραγωγή οξικής κυτταρίνης

Η βιομηχανική παραγωγή οξικής κυτταρίνης που θα πληρεί τις ζητούμενες προδιαγραφές, απαιτεί προσεκτική επιλογή των πρώτων υλών. Τα κυτταρινούχα

υποστρώματα προέρχονται κυρίως από το βαμβάκι, όπου μετά από ενδελεχή καθαρισμό προκύπτουν υλικά υψηλής καθαρότητας με α -κυτταρίνη σε ποσοστό πάνω από 99%. Επίσης χρησιμοποιείται κυτταρίνη από ξύλο, με το ποσοστό α -κυτταρίνης να κυμαίνεται στο διάστημα 90-97%. Για την καλύτερη και αποδοτικότερη περαιτέρω χημική επεξεργασία της, η κυτταρίνη υπόκειται σε μείωση του βαθμού πολυμερισμού της.

Αρχικά η κυτταρίνη ξηραίνεται για να απομακρυνθεί το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας, εφόσον είναι υγροσκοπικό μόριο. Έπειτα γίνεται κάποιο είδος προκατεργασίας με οξικό οξύ, το οποίο μπορεί να περιέχει και μικροποσότητες θειικού οξέος. Θεωρείται πως αυτό το στάδιο προκατεργασίας δημιουργεί μία μερική διόγκωση (swelling) της κυτταρίνης με το να διασπά κάποιους δεσμούς υδρογόνου και να καθιστά ευκολότερη την είσοδο των μορίων ακυλο-δότη ανάμεσα στις αλυσίδες του πολυσακχαρίτη. Μία αναλογία 30-100 μερών οξικού οξέος ανά 100 μέρη κυτταρίνης χρησιμοποιείται για το σκοπό αυτό και η θερμοκρασία δεν ξεπερνά τους 100 °C. Η προκατεργασία αυτή διαρκεί από μία έως και αρκετές ώρες.

Στη συνέχεια γίνεται η κυρίως αντίδραση της εστεροποίησης. Το μείγμα ακετυλίωσης, εκτός από την κυτταρίνη, αποτελείται από ανυδρίτη του οξικού οξέος σε ποσότητες 10-40%, πυριδίνη που είναι ο κυρίως διαλύτης και θειικό οξύ ως καταλύτης σε περιεκτικότητα 2-15% (Wibowo et al., 2006; Zhang & McCormick, 1997). Το μείγμα αυτό είναι προφανώς ετερογενές. Παράλληλα με την έντονα εξώθερμη αντίδραση εστεροποίησης ξεκινάει και υδρόλυση της κυτταρινικής αλυσίδας. Το ανεπιθύμητο αυτό φαινόμενο μπορεί να τεθεί υπό έλεγχο μόνο με ρύθμιση και διατήρηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης.

Με το πέρας της αντίδρασης, συνήθως προστίθεται νερό ή αραιωμένο οξικό οξύ ώστε να εξουδετερωθεί η περίσσεια του οξικού ανυδρίτη και να ρυθμιστεί η περιεκτικότητα του ύδατος σε 5-10%. Έτσι ξεκινάει η υδρόλυση της τριοξικής κυτταρίνης που παράχθηκε προηγουμένως, μέχρι του επιθυμητού βαθμού υποκατάστασης. Η ταχύτητα της υδρόλυσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία που πρέπει να διατηρείται στο διάστημα 40 °C - 80 °C και από τη περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό και θειικό οξύ. Η πορεία της αντίδρασης διακόπτεται όταν εξουδετερωθεί ο καταλύτης με προσθήκη οξικού νατρίου ή οξικού μαγνησίου. Το προϊόν συνήθως συλλέγεται μέσω καταβύθισης, υπό τη μορφή νιφάδων ή κόκκων, με την προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων νερού. Ακολουθεί καθαρισμός του και περαιτέρω απομάκρυνση των εναπομεινάντων στο αντιδρών μείγμα ουσιών και παραπροϊόντων. Οι παραπάνω διεργασίες λαμβάνουν κυρίως χώρα σε συστήματα διαλείποντος έργου (batch systems) (Edgar et al., 2001).

Ο οξικός-προπιονικός και ο οξικός-βουτυρικός εστέρας της κυτταρίνης, παράγονται με εντελώς αντίστοιχο τρόπο, μόνο που στα αντιδρώντα εκτός από ανυδρίτες του οξικού οξέος, υπάρχουν και ανυδρίτες του προπιονικού ή του βουτυρικού οξέος ανάλογα. Θα πρέπει πάντως να σημειωθεί πως το μέγεθος της βιομηχανικής παραγωγής των δυο αυτών εστέρων κυτταρίνης είναι σημαντικά μικρότερο από αυτό της οξικής (Chauvelon et al., 2003; Kozlowski et al., 2004).

2.3.3 Οικονομικά μεγέθη σχετικά με την παραγωγή οξικής κυτταρίνης

Ο κύριος παραγωγικός όγκος της οξικής κυτταρίνης αφορά στην παραγωγή διαφόρων ειδών φίλτρων. Ακολουθούν άλλα πεδία εφαρμογών και χρήσεων όπως οι υφάνσιμες ίνες, τα πλαστικά, τα φιλμ και οι απεικονίσεις τύπου LCD. Το 2001, η παγκόσμια βιομηχανία παραγωγής οξικής κυτταρίνης είχε τζίρο 2.8 δισεκατομμύρια δολάρια. Από αυτά, τα 2.2 δις \$ αφορούσαν στην παραγωγή φίλτρων και τα άλλα 0.6 δις \$ στις υπόλοιπες περιπτώσεις. Το 2002, η συνολική κατανάλωση οξικής κυτταρίνης στις ΗΠΑ, τη δυτική Ευρώπη, την Ιαπωνία και την Κίνα ήταν 665000 τόνοι. Η παγκόσμια παραγωγή οξικής κυτταρίνης ελέγχεται από ελάχιστες εταιρίες (πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2 Νομή παγκόσμιας παραγωγής οξικής κυτταρίνης.

Επωνυμία Επιχείρησης	Ποσοστό Κάλυψης Παγκόσμιας Αγοράς*
Celanese Acetate	38%
Voridian (Eastman Chemical Co.)	29%
Rhodia, Daicel, Mitsubishi, Acordis	33%

* Τα στοιχεία αυτά αφορούν τη δεκαετία 2000 - 2010.

2.3.4 Αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης μακριάς ανθρακικής αλυσίδας

Έχει αναφερθεί πως οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης είναι θερμοπλαστικά υλικά. Με τις τεχνολογίες που έχουν αναπτυχθεί ως τώρα στον τομέα αυτό, δύνανται να παραχθούν σε βιομηχανική κλίμακα εστέρες κυτταρίνης με αλειφατική αλυσίδα έως και τέσσερα άτομα άνθρακα. Στις περιπτώσεις αυτές όμως το σημείο τήξης του υλικού είναι πολύ κοντά στη θερμοκρασία αποσύνθεσης και ορισμένες φορές το ξεπερνά. Για αυτόν το λόγο οι κυτταρινούχοι εστέρες αναμιγνύονται συνήθως με πλαστικοποιητές. Και αυτό όμως δεν αποτελεί πανάκεια καθώς ορισμένες φορές οι πλαστικοποιητές μπορεί να οξειδωθούν ή ένα ποσοστό τους να εξατμιστεί, κατά τη διάρκεια μόρφωσης του αντίστοιχου σύνθετου υλικού. Αυτό μπορεί να έχει σαν συνέπεια αλλαγές στη συμπεριφορά και τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος.

Μία αποτελεσματική λύση θα ήταν η παραγωγή εστέρων κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες μεγαλύτερου μήκους ανθρακικής αλυσίδας ($C>4$) (σχήμα 2.3). Η εξήγηση είναι πως οι σχετικά μεγάλες αλειφατικές αλυσίδες των εν λόγω εστέρων λειτουργούν σαν εσωτερικοί πλαστικοποιητές του ίδιου του μορίου κυτταρίνης. Μάλιστα όσο πιο μακριά είναι η αλειφατική αλυσίδα ($C>8$), τόσο πιο έντονος είναι ο ρόλος του εστέρα σαν πλαστικοποιητής (Edgar, 2001; Edgar et al., 2001; Jandura et al., 2000). Σε πειραματικό επίπεδο λοιπόν, παράχθηκε μία σειρά εστέρων κυτταρίνης με ανθρακική αλυσίδα που αποτελείται από δύο (2) έως δεκαέξι (16) άτομα άνθρακα. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν με ακυλο-δότες τα χλωρίδια των αντίστοιχων καρβοξυλικών (λιπαρών) οξέων και ως μέσο αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα διαλυτών dimethylformamide

(DMF)/pyridine (Edgar, 2001; Zhang & McCormick, 1997). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν πως το σημείο υαλώδους μετάπτωσης (T_g) του εστέρα κυτταρίνης μειώνονταν με αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας από δυο άτομα άνθρακα, έως οκτώ. Με αύξηση όμως του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας από οκτώ άτομα άνθρακα και πάνω, το σημείο υαλώδους μετάπτωσης αυξάνονταν ανάλογα ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $135\text{ }^{\circ}\text{C}$). Παρόμοια αποτελέσματα υπήρξαν και από ορισμένες ακόμα ερευνητικές ομάδες (Shimizu et al., 1991; Wagenknecht et al., 1985). Ο συγκεκριμένος όμως τρόπος παρασκευής των εστέρων αυτών έχει μία σειρά από μειονεκτήματα. Υπάρχει πρόβλημα με την ακυλίωση της κυτταρίνης χρησιμοποιώντας συστήματα με ισχυρά όξινους καταλύτες και χλωρίδια ή ανυδρίτες καρβοξυλικών οξέων με άτομα άνθρακα άνω των πέντε. Αφενός αυτοί οι ακυλο-δότες αντιδρούν αργά με την κυτταρίνη για στερεοχημικούς λόγους, αλλά και για λόγους πολικότητας. Αφετέρου, υπό τις ανάλογες συνθήκες υπάρχει συναγωνισμός μεταξύ ακυλίωσης της κυτταρίνης και αποικοδόμησης της τελευταίας (Edgar, 2001; Heinze & Schaller, 2000)(Philipp et al., 1989).



R = αλειφατική αλυσίδα μεγάλου μήκους

Σχήμα 2.3 Απεικόνιση μίας τυπικής δομικής μονάδας εστεροποιημένης κυτταρίνης ($DS=2$) με αλειφατικές αλυσίδες μεγάλου μήκους.

Ένα παρόμοιο σύστημα αντίδρασης για την εστεροποίηση της κυτταρίνης με μακριές αλειφατικές αλυσίδες, έχει ακόμα προταθεί. Η βασική διαφορά έγκειται στο ότι ο βασικός διαλύτης είναι το σύστημα $\text{LiCl}/\text{N,N-DMAC}$, στο οποίο η κυτταρίνη είναι διαλυτή. Επομένως το αντίστοιχο αντιδρών μείγμα είναι ομογενές. Και πάλι όμως υπάρχουν οι γνωστές δυσκολίες. Είναι πολύ δύσκολο να συνδυαστούν επιτυχώς ουσίες με τόσο διαφορετική πολικότητα. Έντονα πολικοί διαλύτες, ισχυρά πολικά οξέα και η πολική-υδρόφιλη κυτταρίνη από τη μία. Από την άλλη, υδρόφοβα λιπαρά οξέα με μακριές αλυσίδες ή και οι αντίστοιχοι ανυδρίτες τους. Ορισμένες βελτιωτικές κινήσεις για αυτά τα προβλήματα είναι η χρήση των - λιγότερο υδρόφοβων - χλωριδίων των λιπαρών οξέων ως ακυλο-δότες και η προσθήκη πυριδίνης, η οποία εμφανίζει έναν «εξουδετερωτικό» χαρακτήρα για τα οξέα (acid scavenger) (Plisko et al., 1982; Protopopov et al., 2005)(Wagenknecht et al., 1991).

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούν το σύστημα διάλυσης και αντίδρασης $\text{LiCl}/\text{N,N-dimethylacetamide}$ (DMAC), είναι και αυτές περιορισμένης πρακτικότητας και δεν έχουν κάποια ουσιαστική εφαρμογή καθώς η ανακύκλωση του ούτως ή άλλως ακριβού LiCl είναι μία δύσκολη διεργασία.

Όπως και να έχει, οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης με μακριές ανθρακικές αλυσίδες ($C>4$), είναι αποδεδειγμένα θερμοπλαστικά υλικά τα οποία μπορούν να θερμομορφωθούν χωρίς την προσθήκη εξωτερικών πλαστικοποιητών. Επίσης, ορισμένες βασικές θερμομηχανικές ιδιότητες τους είναι ισάξιες ή και καλύτερες

από αυτές που εμφανίζουν εστέρες κυτταρίνης μικρής καρβοξυλικής αλυσίδας που εμπεριέχουν και πλαστικοποιητές (**πίνακας 2.3**). Αυτό υποδεικνύει πως κατά περίπτωση, οι εσωτερικοί πλαστικοποιητές που μπορεί να έχει ο ίδιος ο εστέρας της κυτταρίνης είναι πιο αποδοτικοί σε σχέση με τους εξωτερικούς πλαστικοποιητές που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των συγκεκριμένων θερμοπλαστικών.

2.4 Εναλλακτικές προσεγγίσεις στην παραγωγή εστέρων κυτταρίνης

Η βαθιά κατανόηση της σχέσης δομής-ιδιοτήτων των παραγώγων κυτταρίνης και πιο συγκεκριμένα των εστέρων της, εξαρτάται από τα είδη των υποκαταστατών και από τη θέση που αυτοί έχουν ως προς κάθε δομική μονάδα (υπόλειμμα γλυκόζης), αλλά και ως προς το μόριο του ίδιου του πολυσακχαρίτη. Όμως ο έλεγχος αυτών των παραμέτρων είναι πολύ δύσκολος εξαιτίας του μεγέθους που έχει ένα βιοπολυμερές όπως η κυτταρίνη και εξαιτίας των ιδιαιτεροτήτων που έχει η δομή της. Για την υπερπήδηση αυτών των δυσκολιών έχουν αναπτυχθεί πειραματικά δυο διαφορετικές προσεγγίσεις, με τις οποίες είναι δυνατή και η πρόβλεψη των θέσεων που γίνεται η εστεροποίηση (regioselectivity).

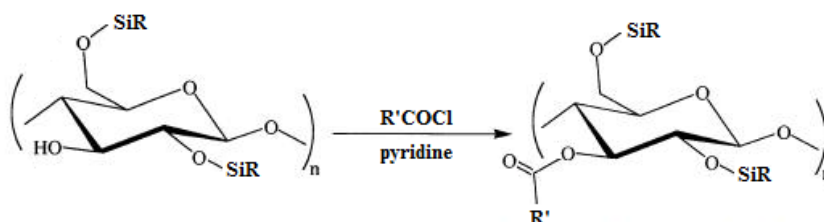
Η πρώτη προσέγγιση αφορά στην παραγωγή αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης μέσω χημικής προστασίας ορισμένων υδροξυλίων της (Edgar et al., 2001; Fox et al., 2011; Heinze & Schaller, 2000). Η προστασία αυτή επιτυγχάνεται συνήθως με το σχηματισμό αιθέρων πυριτίου (silyl ethers) στις υπό προστασία υδροξυλομάδες. Επίσης με το σχηματισμό αυτών των αιθέρων επιτυγχάνεται πολλές φορές και η διαλυτοποίηση του πολυσακχαρίτη σε διαλύτες που μπορεί να είναι ακόμα και μη πολικοί. Αυτή είναι μία επιπλέον παράμετρος που διευκολύνει την περαιτέρω αντίδραση εστεροποίησης. Με τη μέθοδο αυτή ο ακυλο-δότης (χλωρίδιο καρβοξυλικού οξέος) εστεροποιεί επιλεκτικά τα απροστάτευτα ελεύθερα υδροξύλια, υπό τη παρουσία μίας οργανικής ένωσης με βασικό χαρακτήρα (π.χ. πυριδίνη) (**σχήμα 2.4**). Από την άλλη πλευρά, η χημεία προστασίας διαφόρων ομάδων (protecting group chemistry) έχει κάποια μειονεκτήματα όπως τα πολλαπλά στάδια μέχρι τη σύνθεση του προστατευμένου μορίου-στόχου, την ολοένα μειούμενη απόδοση στο πέρας κάθε τέτοιου σταδίου, την πιθανότητα για αποικοδόμηση του αρχικού μορίου της κυτταρίνης κατά τη διαδικασία των εν λόγω αιθεροποιήσεων και την πιθανότητα να μην είναι πάντοτε η χημική δραστηριότητα των προστατευμένων ομάδων η αναμενόμενη.

Μία δεύτερη εναλλακτική προσέγγιση είναι η *de novo* σύνθεση εστέρων κυτταρίνης, με πολυμερισμό των αντίστοιχων εστέρων γλυκόζης (Edgar et al., 2001; Gradwell, 2004; Gustavsson et al., 2005). Η ιδέα αυτή υιοθετήθηκε μετά την πρώτη επιτυχή σύνθεση τεχνητής κυτταρίνης από πολυμερισμό κελλοβιόζης, με τη χρήση του ενζύμου κυτταρινάση ως καταλύτη. Με τον τρόπο αυτό παρασκευάζονται πρώτα αλειφατικοί εστέρες γλυκόζης ή κελλοβιόζης (Klemm et al., 2005; Peng et al., 2002).

Πίνακας 2.3 Ρεολογικές και θερμομηχανικές ιδιότητες συμβατικών εστέρων κυτταρίνης που περιέχουν εξωτερικό πλαστικοποιητή και εστέρων κυτταρίνης μακριάς αλειφατικής αλυσίδας.

Υλικό	DS (long chain)	Περιεκτικότητα Πλαστικοποιητή (w/w)	Ιξώδες (Pa s)	T _g (°C)	E * (GPa)
οξική κυτταρίνη	2.50	15%	1702	107	2.00
οξική-προπιονική κυτταρίνη	2.60	10%	934	125	1.93
οξική-εξανοϊκή κυτταρίνη	0.75	0%	206	137	2.12
οξική-εννιανοϊκή κυτταρίνη	0.70	0%	137	129	-
οξική-εννιανοϊκή κυτταρίνη	1.35	0%	7	110	0.69

* E: Μέτρο ελαστικότητας Young. Μέγεθος της μηχανικής που εκφράζεται σε μονάδες δύναμης ανά επιφάνεια ενός υλικού και το οποίο δείχνει την τάση που έχει το υλικό να καμφθεί (μεγαλύτερες τιμές υποδεικνύουν λιγότερο παραμορφώσιμο υλικό).



R και R': αλκιφατικές αλυσίδες

Σχήμα 2.4 Ακυλίωση κυτταρίνης, προστατευμένης με αιθέρες πυριτίου.

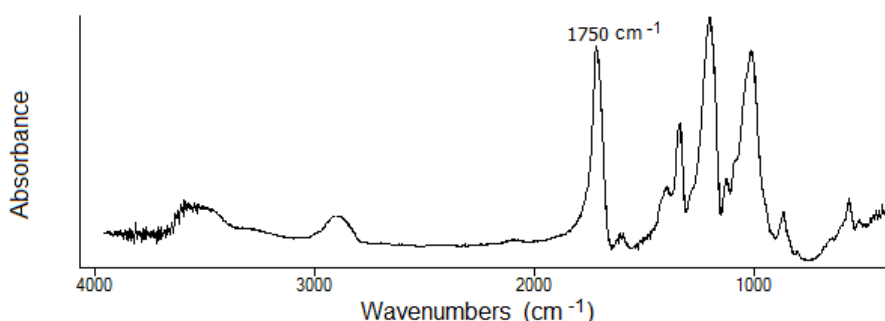
Οι εστεροποιήσεις αυτές είναι απολύτως ελεγχόμενες και κατευθυνόμενες λόγω της πλήρους διαλυτότητας των ανάλογων σακχαρούχων υποστρωμάτων σε πολλά συστήματα διαλυτών. Στη συνέχεια, οι εστεροποιημένοι μονοσακχαρίτες ή ολιγοσακχαρίτες πολυμερίζονται μέσω διαδοχικής σύναψης γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ τους. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός τεχνητών μορίων κυτταρίνης που είναι εστεροποιημένα σε συγκεκριμένες και γνωστές θέσεις. Φυσικά είναι προφανές πως για να εξελιχθεί αυτή η μέθοδος, δεν θα πρέπει να εστεροποιούνται τα υδροξύλια που συμμετέχουν στη σύναψη των γλυκοζιτικών δεσμών. Στην περίπτωση της κυτταρίνης τα υδροξύλια αυτά ανήκουν στους άνθρακες 1 και 4. Η λογική της *de novo* σύνθεσης εστέρων κυτταρίνης, παράγει εστέρες με σχεδόν απόλυτη τόπο-εκλεκτικότητα (regioselectivity). Αυτού του είδους η χημεία, αν και ακόμα έχει ατέλειες και αδυναμίες σε κάποιους τομείς της παρασκευής των τεχνητών μορίων, χαρακτηρίζεται από υψηλό δυναμικό και υπόσχεται να δώσει προϊόντα με μοναδικές δομές.

Ξεχωριστή μνεία γίνεται τέλος για τη βιοκαταλυτική τροποποίηση κυτταρινούχων υποστρωμάτων με σκοπό την παραγωγή εστέρων κυτταρίνης. Οι περισσότερες προσπάθειες που έχουν γίνει έως τώρα αφορούν στην ενζυμική εστεροποίηση διαλυτών παραγώγων κυτταρίνης με σημαντικότερα την οξική κυτταρίνη, την υδροξυπρόπυλο κυτταρίνη και την καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (Cheng & Gross, 2003; Sereti et al., 1998; Sereti et al., 2001; Xie & Hsieh, 2001). Τα μεγαλομόρια αυτά είναι διαλυτά στο νερό ή σε κοινούς οργανικούς διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο και η ακετόνη. Συνεπώς τα μεγάλου μοριακού βάρους ενζυμικά μόρια (λιπάσες, εστεράσες) μπορούν να προσεγγίσουν το υδατανθρακικό υπόστρωμα και να το εστεροποιήσουν με τους κατάλληλους ακυλο-δότες. Αντιθέτως, στην περίπτωση της ούτως ή άλλως μοριακά δυσπρόσιτης κυτταρίνης, το πρόβλημα γίνεται εντονότερο με την ενζυμική κατάλυση καθώς τα ένζυμα έχουν και αυτά μεγάλο μέγεθος ως βιοπολυμερή. Σαν αποτέλεσμα των παραπάνω έχει επιτευχθεί η ενζυμική παραγωγή αλκιφατικών εστέρων κυτταρίνης, με το μεγαλύτερο ποσοστό να αφορά σε ακετυλίωσεις (Yang & Wang, 2004; Yang & Wang, 2003).

2.5 Αναλυτικές μέθοδοι σχετικές με τους εστέρες κυτταρίνης

Στη χημεία εστεροποίησης της κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες, παίζει ιδιαίτερο ρόλο η ανάλυση της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης του μακρομορίου στους αντίστοιχους εστέρες. Οι σχετικές αναλυτικές μέθοδοι είναι λιγοστές εξαιτίας των ιδιοτεροτήτων της δομής της κυτταρίνης και του μεγαλομοριακού χαρακτήρα που έχει η ίδια αλλά και οι εστέρες της.

Μία διαδεδομένη μέθοδος για τον ποιοτικό προσδιορισμό ενός εστερικού δεσμού σε κυτταρίνη, είναι η φασματοσκοπική ανάλυση IR και ιδιαιτέρως η ειδικά μετασηματισμένη μορφή της, η Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) (Sereti et al., 2001). Με τη μέθοδο FTIR μπορεί να διακριθεί η ομάδα καρβονυλίου που ανήκει στον εστερικό δεσμό (**σχήμα 2.5**) και στην περίπτωση που υπάρχουν ποιοτικά περισσότεροι του ενός εστέρες, να διακριθούν μεταξύ τους με μία περαιτέρω μαθηματική επεξεργασία (deconvolution) (Jandura et al., 2000; Liebert & Heinze, 2005; Xie & Hsieh, 2001; Yin et al., 2007). Ο συνθέστερος τρόπος για να αναλυθεί ένα δείγμα εστέρα κυτταρίνης μέσω FTIR, είναι σε στερεή μορφή (ως δισκίο) καθώς τα μεγαλομόρια αυτά συνήθως δεν είναι ευδιάλυτα.



Σχήμα 2.5 Χαρακτηριστικό φάσμα FTIR ενός εστέρα κυτταρίνης. Σε κυματοαριθμό 1750 cm^{-1} εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στο καρβονύλιο του εστέρα.

Εξίσου σημαντικός είναι βέβαια και ο ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχόμενου εστέρα σε ένα μόριο εστεροποιημένης κυτταρίνης. Το μέγεθος αυτό εκφράζεται είτε ως βαθμός υποκατάστασης (DS), είτε ως % ποσοστό των συνολικών υδροξυλίων του πολυσακχαρίτη, τα οποία εστεροποιήθηκαν, είτε ως το % ποσοστό της συνολικής μάζας της εστεροποιημένης κυτταρίνης, το οποίο αντιστοιχεί στο σύνολο των αλειφατικών αλυσίδων. Οι κυριότερες αναλυτικές μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να υπολογιστεί και να ποσοτικοποιηθεί η έκταση της εστεροποίησης της κυτταρίνης είναι δυο. Η πρώτη από αυτές είναι η φασματοσκοπία μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού (NMR). Με το NMR μπορούν να φανούν οι ίδιες οι αλειφατικές αλυσίδες του εστέρα αλλά να προσδιοριστεί και η θέση της εστεροποίησης στις δομικές μονάδες της

κυτταρίνης (Jandura et al., 2000; Liebert et al., 2005; Samaranayake & Glasser, 1993b; Vaca-Garcia et al., 2001). Με την αναλυτική αυτή τεχνική το ποσοστό εστεροποίησης εκφράζεται συνήθως ως βαθμός υποκατάστασης (DS) και επίσης είναι δυνατή η εύρεση των αναλογίων σε περίπτωση μεικτών εστέρων. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι απαραίτητες πληροφορίες αντλούνται από NMR πρωτονίου (^1H NMR), αν και η πολυπλοκότητα των φασμάτων που δίνουν οι πολυσακχαρίτες απαιτεί ορισμένες φορές και NMR άνθρακα (^{13}C NMR). Εξαιτίας του μεγέθους των εστέρων κυτταρίνης και της πολυπλοκότητας της δομής τους, είναι συχνά δύσκολη η αποτίμηση των αντίστοιχων φασμάτων NMR. Τα σήματα μπορεί να διευρύνονται (line broadening) και να αλληλεπικαλύπτονται, καθώς και να υπάρχουν απειροελάχιστες διαφορές στις μετατοπίσεις (chemical shifts). Πέρα από την ποιότητα των φασμάτων όμως, υπάρχει και μία πρακτική δυσκολία. Οι μέθοδος NMR απαιτεί πλήρη διαλυτοποίηση των προς ανάλυση δειγμάτων σε δευτεριωμένους διαλύτες. Οι εστέρες κυτταρίνης από την άλλη πλευρά δεν είναι πάντα ευδιάλυτοι, ειδικά αυτοί με χαμηλούς βαθμούς υποκατάστασης. Έτσι η μόνη λύση είναι η φασματοσκοπία NMR στερεάς κατάστασης (solid state NMR), όπου το δείγμα μπορεί να μετρηθεί ως στερεό (Edgar et al., 2001). Θα πρέπει βέβαια να σημειωθεί πως η ανάλογη διάταξη και πειραματική διαδικασία του solid state NMR είναι πιο απαιτητική και μακράν πιο χρονοβόρα.

Η δεύτερη αναλυτική τεχνική για την ποσοτικοποίηση της εστεροποίησης της κυτταρίνης έγκειται σε σαπωνοποίηση των εστέρων και περαιτέρω ποσοτικό προσδιορισμό τους μέσω τιτλοδότησης και πιο συγκεκριμένα οπισθογκομέτρησης (back titration) (Sereti et al., 2001). Η μέθοδος αυτή είναι η πιο παλιά, η πιο απλή και με τη μεγαλύτερη ακρίβεια η οποία φτάνει το 0.1%. Ειδικότερα, γίνεται σαπωνοποίηση δεδομένης ποσότητας εστέρα κυτταρίνης με περίσσεια διαλύματος NaOH γνωστής κανονικότητας και την παρουσία ενός παράγοντα διόγκωσης ή ενός διαλύτη. Μετά το πέρας της σαπωνοποίησης των εστέρων της κυτταρίνης προσδιορίζεται η περίσσεια του NaOH με οπισθογκομέτρηση, μέσω πρότυπου διαλύματος HCl. Έτσι μπορούν να υπολογιστούν ποσοτικά οι σαπωνοποιημένες αλειφατικές αλυσίδες και επομένως οι αρχικοί εστέρες της κυτταρίνης.

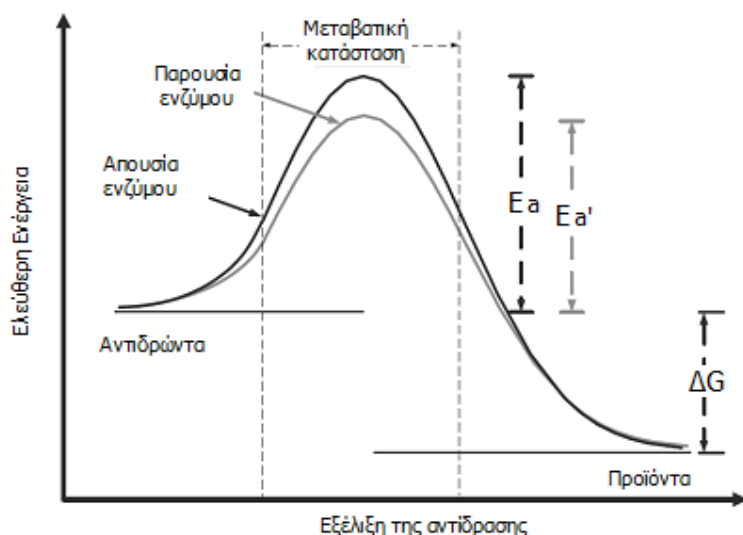
3. Βιοκατάλυση

3.1 Εισαγωγή

Η βιοτεχνολογία ορίζεται ως η επιστήμη που χρησιμοποιεί τις βιολογικές λειτουργίες των κυττάρων και διαφόρων συστατικών τους (π.χ. ενζύμων), για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές κατηγοριοποιούνται σε ποικίλες επιμέρους διεργασίες (ζυμώσεις, ζυμώσεις πρόδρομων συστατικών, βιομετασχηματισμούς), ανάλογα με τον αριθμό των απαραίτητων βημάτων και με βάση την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων. Οι βιοκαταλυτικές διεργασίες αφορούν στη μετατροπή μίας αρχικής ένωση στο επιθυμητό προϊόν, με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων ή

απομονωμένων ενζύμων, μέσω μίας διαδικασίας ενός και μόνου βήματος (Babel, 2000; Gupta & Roy, 2002; Jones & Wong, 1998).

Τα ένζυμα είναι βιολογικοί καταλύτες πρωτεϊνικής φύσης. Ως καταλύτες έχουν την ικανότητα να καταλύουν ποικίλες χημικές αντιδράσεις πολλές από τις οποίες είναι τόσο πολύπλοκες ώστε είναι αδύνατον να επιτευχθούν με τη χρήση χημικών καταλυτών. Τα ένζυμα, ωστόσο, δεν υπόκεινται σε διαφορετικές επιστημονικές αρχές από εκείνες που διέπουν τους χημικούς καταλύτες, καθώς δρουν μέσω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται για το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου, το οποίο οδηγεί στη σύνθεση του τελικού προϊόντος (**σχήμα 3.1**).



Σχήμα 3.1 Μηχανισμός κατάλυσης μίας αντίδρασης. E_a και E_a' είναι οι τιμές ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης χωρίς και με την παρουσία ενζύμου αντίστοιχα. ΔG είναι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της αντίδρασης, η οποία είναι ανεξάρτητη της παρουσίας καταλύτη.

Τα ένζυμα επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες και πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες (**πίνακας 3.1**). Οι περισσότερες από τις ιδιότητες των ενζύμων σχετίζονται άμεσα με τη μοριακή τους δομή. Η ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή η ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν μία χημική αντίδραση, βασίζεται στην ύπαρξη της κατάλληλης δομής του ενεργού κέντρου. Η ενζυμική σταθερότητα αποτελεί μία άλλη σημαντική ιδιότητα, η οποία καθορίζεται από διάφορες διεργασίες αποδιάταξης σε συγκεκριμένες περιοχές συνήθως κοντά ή στην ενζυμική επιφάνεια. Αν και με τον όρο αυτό εννοείται συνήθως η θερμική σταθερότητα, σημαντικές ιδιότητες αποτελούν επίσης η σταθερότητα αποθήκευσης, αλλά και η σταθερότητα της επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου. Μία άλλη σημαντική ιδιότητα, η οποία καθορίζεται από τη δομή του ενζύμου αποτελεί η εκλεκτικότητα, η οποία διακρίνεται επιμέρους στην

εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, την τόπο-εκλεκτικότητα και την ενάντιο-εκλεκτικότητα.

Πίνακας 3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων ως καταλυτών.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλή εκλεκτικότητα	Μεγάλη δομική πολυπλοκότητα
Υψηλή δραστικότητα υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης	Υψηλό κόστος παραγωγής
Δυνατότητα μετατροπής πολύπλοκων υποστρωμάτων	Απενεργοποίηση σε ακραίες συνθήκες
Βιοαποικοδομήσιμοι καταλύτες	Σχετικά μικρός αριθμός εμπορικά διαθέσιμων βιοκαταλυτών
Μη τοξικοί	

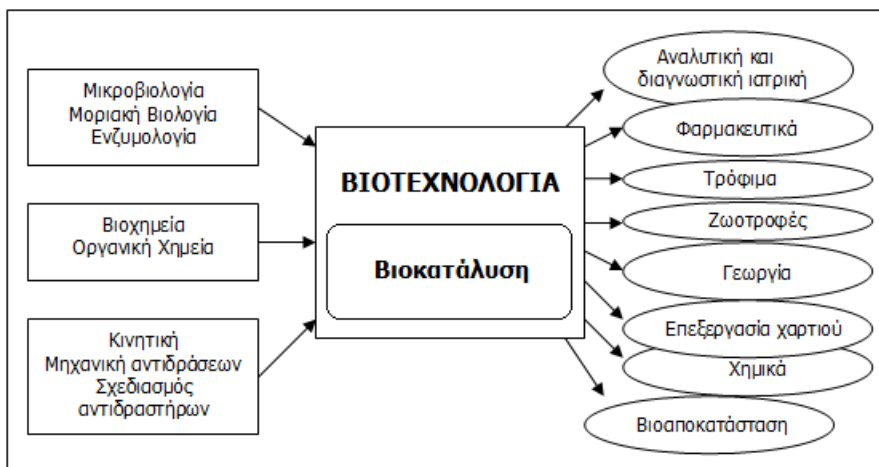
Η βιοτεχνολογία αποτελεί μία σημαντική κινητήρια δύναμη στην ανθρώπινη ιστορία. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι για την παρασκευή και διατήρηση τροφίμων και ποτών αναπτύχθηκαν μόλις το 4000-2000 π.Χ. Με το πέρασμα στην βιομηχανική εποχή και την ανάπτυξη σημαντικής ερευνητικής δραστηριότητας η βιοτεχνολογία βρήκε νέες εφαρμογές στους τομείς υγείας (κόκκινη βιοτεχνολογία) και στην γεωργία (πράσινη βιοτεχνολογία), ενώ τα τελευταία χρόνια η βιομηχανική ή λευκή βιοτεχνολογία κερδίζει συνεχώς έδαφος μέσω της εφαρμογής των «εργαλείων» της φύσης στη βιομηχανική παραγωγή.

Η κύρια δύναμη που οδηγεί στην ανάπτυξη και ενσωμάτωση της βιοτεχνολογίας στην βιομηχανική παραγωγή είναι τόσο οικονομική, καθώς η λευκή βιοτεχνολογία υπόσχεται ιδιαίτερα αποτελεσματικές διεργασίες με μικρότερο λειτουργικό κόστος, όσο και κοινωνικοπολιτική, καθώς οι βιοτεχνολογικές διεργασίες ικανοποιούν την απαίτηση για περιβαλλοντικά φιλικές διεργασίες.

Στο πλαίσιο της λευκής βιοτεχνολογίας, βιοκαταλυτικές διεργασίες έχουν εφαρμοστεί σε διάφορους τομείς (**σχήμα 3.2**) για την παραγωγή χημικών προϊόντων (commodity chemicals), εξειδικευμένων χημικών (fine chemicals), φαρμακευτικών ενώσεων (pharmaceuticals), τροφίμων και καλλυντικών, αναλυτικών και διαγνωστικών προϊόντων, βιοκαυσίμων, βιοδιασπώμενων πολυμερών καθώς επίσης και για την προστασία του περιβάλλοντος (Kelly & Waldmann, 1999; Rodriguezcoutho & Toca Herrera, 2006; Sheldon et al., 2002).

Το μέλλον της λευκής βιοτεχνολογίας και η διεύρυνση των εφαρμογών της βασίζεται σε επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα στους τομείς ανάπτυξης και σχεδιασμού βιοδιεργασιών (process development), στην πρόοδο της ενζυμικής/μεταβολικής μηχανικής (enzyme/metabolic engineering), στην εφαρμογή της συνθετικής βιολογίας (synthetic biology), στην επέκταση της

υπολογιστικής βιολογίας, στην ανάπτυξη αποτελεσματικών κατιουσών διεργασιών (downstream processing) και την αύξηση του αριθμού βιοκαταλυτών με ενδιαφέρουσες ιδιότητες (Gupta & Roy, 2002; Jones & Wong, 1998; Nicolini, 1998).



Σχήμα 3.2 Ο ρόλος της βιοκατάλυσης μεταξύ διαφόρων συναφών επιστημών (βιολογία, χημεία, χημική μηχανική) και βιομηχανικών κλάδων στους οποίους βρίσκει εφαρμογή.

Μεταξύ των διαθέσιμων βιοκαταλυτών, οι εστεράσες και ειδικότερα οι λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς. Η ευρεία εφαρμογή τους οφείλεται στην χήμειο-, τόπο- και στέρεο-εκλεκτικότητά τους, στη δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους από μικροβιακούς οργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες, στη δυνατότητα ορθολογικού ανασχεδιασμού τους, καθώς οι κρυσταλλογραφικές δομές των περισσότερων είναι γνωστές, και τέλος στο γεγονός ότι δεν απαιτούν καταλυτικούς συμπαράγοντες, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά το κόστος των διεργασιών (πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Πλεονεκτήματα της χρήσης λιπασών.

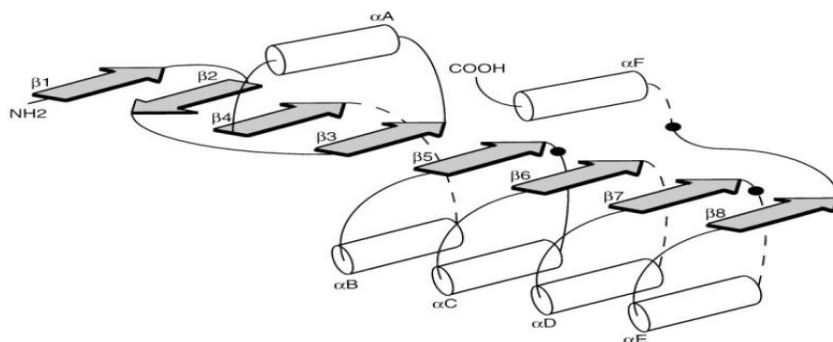
Υψηλή τόπο-, στέρεο- και ενάντιο-εκλεκτικότητα
Υψηλή δραστηριότητα σε μη συμβατικά συστήματα
Μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασία, pH, και οργανικούς διαλύτες
Μετατροπή πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων
Δεν απαιτούνται καταλυτικοί συμπαράγοντες
Παράγονται σε μεγάλες ποσότητες
Δυνατότητα αντιστροφής υδρολυτικών αντιδράσεων

3.2 Λιπάσες

Οι λιπάσες (EC 3.1.1.3) ανήκουν στην κατηγορία των υδρολυτικών ενζύμων (ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση χημικών δεσμών). Η φυσική τους δράση είναι η υδρόλυση εστερικών δεσμών (Sigurgisladottir et al., 1993; Velonia et al., 2005). Το χαρακτηριστικό που τις διαφοροποιεί όμως από τις υπόλοιπες εστεράσες, δηλαδή τα ένζυμα που γενικά υδρολύουν εστερικούς δεσμούς, είναι πως ειδικεύονται στην υδρόλυση τριγλυκεριδίων μακριάς αλυσίδας, σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα (Song et al., 2008).

Τα ένζυμα αυτά παράγονται μαζικά από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς. Οι μικροβιακές λιπάσες προσελκύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων βιομηχανικών εφαρμογών τους. Η παγκόσμια αγορά για τα ένζυμα αυτά προσδιορίζεται στα 20 εκατομμύρια δολάρια. Οι λιπάσες έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τι μοναδικές τους καταλυτικές ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να βρουν εφαρμογή στη χημεία των ελαίων, στην οργανική σύνθεση, σε απορρυπαντικά και διατροφικά σκευάσματα, στην επεξεργασία υφασμάτων και δέρματος.

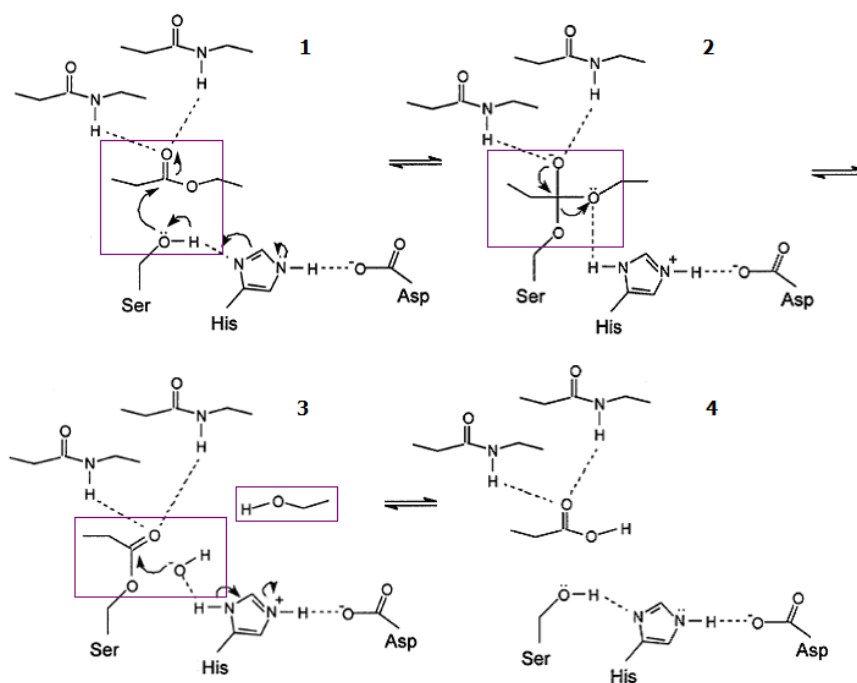
Στην πλειοψηφία τους, τα ένζυμα αυτά αποτελούν εξωκυτταρικές, όξινης γλυκοπρωτεΐνες, μοριακού βάρους μεταξύ των 20 και 60 kDa. Οι περισσότερες απομονωμένες λιπάσες περιέχουν ένα ποσοστό 2-15% υδατανθρακικών ομάδων. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής λιπασών διαφορετικής προέλευσης έδειξε πως ο αριθμός των αμινοξέων μπορεί να ποικίλει από 270 έως 641 κατάλοιπα (Beer et al., 1996; Gupta et al., 2004). Η πρώτη μελέτη της δομής μικροβιακής λιπάσης ήταν αυτή της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* και πραγματοποιήθηκε μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης ακτίνων Χ. Η τεχνική αυτή αποτελεί και σήμερα το πιο ευρέως διαδεδομένο εργαλείο για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής βιολογικών μακρομορίων. Όλες οι λιπάσες, των οποίων οι τρισδιάστατες δομές είναι γνωστές, ανήκουν στην κατηγορία των α/β υδρολασών. Η δομή αυτή αποτελείται από ένα κεντρικό β-πτυχωτό φύλλο, έως οκτώ β-πτυχών (b1–b8), συνδεδεμένο με έξι, το πολύ, α-έλικες (A–F), που έχουν ελάχιστες διαφοροποιήσεις μεταξύ τους (De Diego et al., 2005) (σχήμα 3.3).



Σχήμα 3.3 Αναδίπλωση α/β υδρολάσης. Οι α-έλικες απεικονίζονται ως κύλινδροι και οι β-πτυχές ως βέλη. Η θέση κάθε υπολειμματος αμινοξέως του ενεργού κέντρου εμφανίζεται ως συμπαγής κύκλος, το υπόλειμμα σερίνης βρίσκεται μετά την β₅ πτυχή, τα υπολείμματα ασπαρτικού/ γλουταμινικού μετά την β₇ πτυχή και η ιστιδίνη στην θηλιά μεταξύ της β₈ πτυχής και της έλικας F.

Το ενεργό κέντρο των λιπασών εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με εκείνο των σερινοπρωτεασών. Αποτελείται από μία σερίνη (Ser), μία ιστιδίνη (His) και ένα ασπαρτικό (Asp) ή γλουταμινικό (Glu) οξύ, την αποκαλούμενη καταλυτική τριάδα. Η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της b5 πτυχής, στο εσωτερικό ενός ιδιαίτερα συντηρημένου πενταπεπτιδίου GX₁SX₂G (όπου το G αντιστοιχεί σε γλυκίνη, το S σε σερίνη, το X₁ σε ιστιδίνη και το X₂ σε γλουταμινικό ή ασπαρτικό), σχηματίζοντας μία χαρακτηριστική στροφή.

Ο καταλυτικός μηχανισμός (σχήμα 3.4) στηρίζεται στην σερίνη του ενεργού κέντρου και μία άλλη δομική περιοχή, την οξυανιονική οπή. Η οξυανιονική οπή σχηματίζεται από δύο αμιδικές ομάδες ενός καταλοίπου του N-τελικού άκρου της λιπάσης και ενός, γειτονικού της σερίνης του καταλυτικού κέντρου, καταλοίπου προς την πλευρά του C-τελικού άκρου και σταθεροποιείται μέσω δυνάμεων van der Waals με την b₅-πτυχή.



Σχήμα 3.4 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών.

Η υδρόλυση του υποστρώματος ξεκινά με μία πυρηνόφιλη προσβολή από το οξυγόνο του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης προς τον ενεργοποιημένο καρβονυλικό άνθρακα του εστέρα. Δημιουργείται τότε ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο χαρακτηρίζεται από το αρνητικό φορτίο του καρβονυλικού οξυγόνου του εστέρα και από τέσσερα άτομα συνδεδεμένα με τον καρβονυλικό άνθρακα σε τετραεδρική διάταξη. Σε αυτό το στάδιο του καταλυτικού μηχανισμού αναγνωρίζονται και οι απαραίτητοι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν το υπόστρωμα στη μεταβατική κατάσταση. Αυτοί σχηματίζονται μεταξύ (α) του ασπαρτικού/γλουταμινικού του ενεργού κέντρου

και της ιστιδίνης, (β) της ιστιδίνης και της σερίνης, (γ) της ιστιδίνης και της αλκυλομάδας του υποστρώματος, και (δ) του καρβοξυλικού οξυγόνου του υποστρώματος και των αμινοξέων της οξυανιονικής οπής (Kumaresan et al., 2011; Skjot et al., 2009).

Η απουσία κάποιου από αυτούς τους δεσμούς, λόγω της στερεοδιάταξης του υποστρώματος, μπορεί να προκαλέσει την αστάθεια του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, δηλαδή της μεταβατικής κατάστασης, με αποτέλεσμα η κατάλυση είτε να γίνεται πολύ αργά, είτε να μην πραγματοποιείται καθόλου. Η πυρηνόφιλη προσβολή ενισχύεται από την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου, στην οποία μεταφέρεται ένα πρωτόνιο, από την υδροξυλομάδα της σερίνης. Ακολούθως, το πρωτόνιο μεταφέρεται στο εστερικό οξυγόνο με αποτέλεσμα τη σχάση του εστερικού δεσμού. Σε αυτό το στάδιο το οξικό τμήμα του υποστρώματος και η πυρηνόφιλη σερίνη εστεροποιούνται με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ομοιοπολικού ενδιάμεσου και το αλκοολικό τμήμα του υποστρώματος αποχωρεί.

Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της απακυλίωσης, όπου ένα μόριο νερού υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο. Αυτό το μόριο νερού ενεργοποιείται από την ιστιδίνη, η οποία του αποσπά ένα πρωτόνιο. Το προκύπτον ιόν (OH⁻) προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα της ακυλο-ομάδας που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τη σερίνη. Και πάλι σχηματίζεται ένα μεταβατικό, αρνητικά φορτισμένο τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την οξυανιονική οπή. Η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της καταλυτικής σερίνης, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνει την ακυλο-ομάδα. Μετά την απομάκρυνση του δεύτερου προϊόντος το ένζυμο είναι και πάλι έτοιμο να δεχτεί υπόστρωμα και να το υδρολύσει (Beer et al., 1996).

Το ενεργό κέντρο των λιπασών καλύπτεται από ένα επιφανειακό κινούμενο στοιχείο, το αποκαλούμενο κάλυμμα ή καπάκι (lid or flap). Πρόκειται για μία ολιγοπεπτιδική ομάδα, αποτελούμενη από μία ή δύο α-έλικες ή από ένα τμήμα βρόχου, συνδεδεμένη με το ένζυμο μέσω ευέλικτων δομικών στοιχείων. Η δομική αυτή περιοχή έχει συνδεθεί με το φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης των λιπασών. Κατά την επαφή της λιπάσης με την διεπιφάνεια, το κάλυμμα μετακινείται, μετατρέποντας την «κλειστή» μορφή του ενζύμου σε «ανοιχτή». Το άνοιγμα του καλύμματος συνιστά μία αλλαγή της διαμόρφωσης της λιπάσης. Συγκεκριμένα, καθώς το κάλυμμα απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο, η υδρόφιλη πλευρά του (εκτεθειμένη στον διαλύτη στην φυσική διαμόρφωση του ενζύμου), βυθίζεται μερικώς σε μία πολική κοιλότητα, προηγούμενα γεμάτη με ομοιόμορφα κατανεμημένα μόρια νερού. Ταυτόχρονα, η υδρόφοβη πλευρά του καλύμματος καθίσταται πλήρως εκτεθειμένη, επεκτείνοντας έτσι σημαντικά την μη πολική επιφάνεια γύρω από το ενεργό κέντρο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αύξηση της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμά του, και παράλληλα επιτρέπει την πρόσδεση της λιπάσης στην διεπιφάνεια (Hult, 2006; Louwrier et al., 1996).

Οι λιπάσες, όπως είδαμε και παραπάνω, ανήκουν σε μία κατηγορία υδρολασών που το είδος δεσμού που υδρολύουν φυσικά, είναι ο εστερικός. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και άλλες υδρολάσες οι οποίες ειδικεύονται στην υδρόλυση άλλων εστερικών δεσμών μεταξύ αλκοολών και καρβοξυλικών οξέων, πέραν των τριγλυκεριδίων. Τα ένζυμα αυτά κατά κόρον ονομάζονται εστεράσες

και συνήθως ακολουθεί και η ονομασία ενός φυσικού τους υποστρώματος ή προϊόντος (π.χ. εστεράσες του οξικού οξέος). Τα ένζυμα αυτά είναι τις περισσότερες φορές μικρότερου μοριακού βάρους από τις λιπάσες και δεν διαθέτουν το χαρακτηριστικό καπάκι των λιπασών. Ωστόσο κοινό δομικό στοιχείο της πλειοψηφίας των εστερασών είναι η ύπαρξη μίας πύχωσης α/β (α/β υδρολάση) και η ύπαρξη επίσης της καταλυτικής τριάδας των αμινοξέων σερίνη, ιστιδίνη και ασπαρτικό οξύ (σερινοπρωτεάσες). Συνεπώς ο καταλυτικός μηχανισμός των εστερασών είναι παρόμοιος με αυτόν που έχουν και οι λιπάσες.

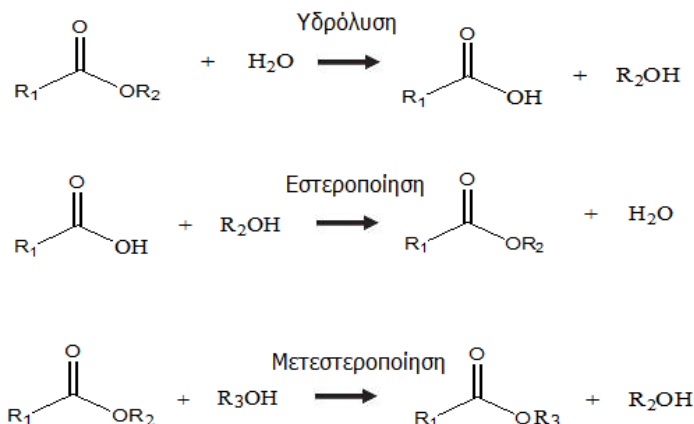
Ένα ακόμα ένζυμο το οποίο υδρολύει εστερικούς δεσμούς και έχει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον, είναι η κουτινάση. Η κουτινάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο που παράγεται από παθογόνους μύκητες των φυτών και που έχει ως φυσικό ρόλο την αποικοδόμηση του φλοιού των φυτών (Abergel et al., 1990; Carvalho et al., 1999; Egmond & de Vlieg, 2000). Το κύριο συστατικό του φλοιού πολλών φυτών είναι η κουτίνη, ένα αδιάλυτο στο νερό βιοπολυμερές που αποτελείται κυρίως από επόξυ- και υδρόξυ- λιπαρά οξέα. Η κουτινάση βέβαια μπορεί να υδρολύσει και πολλά άλλα υποστρώματα· από παρανιτροφαινυλεστέρες μικρής ανθρακικής αλυσίδας έως και τριγλυκερίδια με λιπαρά οξέα μακριάς ανθρακικής αλυσίδας.

Το ότι η κουτινάση μπορεί να υδρολύσει υδατοδιαλυτούς και μη εστέρες, είναι ένα γεγονός που την καθιστά ένα μοναδικό ένζυμο που συνδυάζει χαρακτηριστικά εστερασών και λιπασών μαζί. Καταρχήν η κουτινάση είναι μία α/β υδρολάση με πέντε κεντρικά και παράλληλα πτυχωτά φύλλα, τα οποία περικλείονται από πέντε α-έλικες. Το ενεργό της κέντρο αποτελείται από την τριάδα των αμινοξέων σερίνη, ιστιδίνη και ασπαρτικό οξύ (Poulsen et al., 2006; Prompers et al., 1999). Σε αντίθεση με τις λιπάσες, η κουτινάση δεν διαθέτει το χαρακτηριστικό καπάκι (lid) και επίσης δεν παρουσιάζει το φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης. Μία ακόμα σημαντική παρατήρηση που διαφοροποιεί την κουτινάση από τις λιπάσες είναι το ότι η σερίνη του ενεργού κέντρου βρίσκεται σε μία σχισμή μεταξύ δυο υδρόφοβων βρόχων (80-90 και 180-190), κάτι που κάνει την σερίνη ιδιαίτερα προσπελάσιμη από το υπόστρωμα (Carvalho et al., 1999; Carvalho et al., 1998). Επίσης έχει προταθεί το ότι το εύκολα προσπελάσιμο ενεργό κέντρο της κουτινάσης είναι υπεύθυνο για τη δραστηριότητα που εμφανίζει το ένζυμο σε υδατοδιαλυτούς εστέρες, γεγονός που συνδυάζεται με την απουσία του υδρόφοβου καπακιού.

Τέλος, με φασματοσκοπικές μελέτες NMR, έχει αποδειχθεί πως η οξυανική οπή στην κουτινάση δεν προυπάρχει, αλλά σχηματίζεται κατά το δέσιμο του υποστρώματος με το ένζυμο, όπως συμβαίνει και στις περισσότερες λιπάσες (Abergel et al., 1990; Pepermans et al., 1995; Poulsen et al., 2006).

Το μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις λιπάσες πηγάζει από δυο κύριους λόγους. Πρώτον τη μοριακή βάση της καταλυτικής λειτουργίας αυτών των ενζύμων. Οι λιπάσες, αν και είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα, καταλύουν αντιδράσεις με αδιάλυτα στο νερό λιπιδικά υποστρώματα σε μεσεπιφάνειες νερού-ελαίου. Η δυνατότητα αυτή συνδέεται με τα μοναδικά χαρακτηριστικά των λιπασών, και έχει καταστήσει τα ένζυμα αυτά χρήσιμα μοντέλα για τη μελέτη των αντιδράσεων που καταλύονται σε μεσεπιφάνειες. Ο δεύτερος λόγος συνδέεται με την υψηλή τόπο-εκλεκτικότητα, στέρεο-εκλεκτικότητα και εκλεκτικότητά τους ως προς το υπόστρωμα, γεγονότα που οδηγούν στη μείωση του σχηματισμού

παραπροϊόντων, του κόστους επεξεργασίας αποβλήτων και του ενεργειακού κόστους των διεργασιών καθώς οι λιπάσες δρουν υπό ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Οι λιπάσες επίσης εμφανίζουν την ικανότητα κατάλυσης όχι μόνο υδρολυτικών αντιδράσεων αλλά και αντιδράσεων σύνθεσης (Klibanov, 1988; Louwrier et al., 1996) (σχήμα 3.5).



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$: αλειφατικές αλυσίδες

Σχήμα 3.5 Τυπικές αντιδράσεις που καταλύονται από λιπάσες.

Μέσω της ικανότητας κατάλυσης συνθετικών αντιδράσεων οι λιπάσες μπορούν να εφαρμοστούν στην βιομηχανία φαρμάκων για το διαχωρισμό ρακεμικών μιγμάτων ή τη σύνθεση χειρόμορφων ενώσεων. Στον τομέα των τροφίμων μπορούν να βρουν εφαρμογές στην τροποποίηση λιπών και ελαίων, διεργασίες στις οποίες η τόπο-εκλεκτικότητα και εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα επιτρέπει τη σύνθεση συγκεκριμένων τριγλυκεριδίων, καθώς επίσης και σε αντιδράσεις λιποφιλίωσης μέσω συνδυασμού υδρόφιλων ενώσεων (σάκχαρα, αμινξέα, βιταμίνες, πολυφαινολικά συστατικά) με λιπόφιλα μόρια. Η επίτευξη των συνθετικών αυτών αντιδράσεων είναι θερμοδυναμικά ανέφικτη σε υδατικά μέσα και άρα απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιομηχανική τους αξιοποίηση αποτελεί η εφαρμογή των λιπασών σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό, τα επονομαζόμενα «μη συμβατικά συστήματα» (Cantone et al., 2007; Chodorge et al., 2005; Ikeda & Klibanov, 1993; Klibanov, 2000).

3.3 Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα

3.3.1 Εισαγωγή

Παρά την ύπαρξη κάποιων πρώιμων δεδομένων και επιχειρημάτων που στήριζαν τη δυνατότητα των ενζύμων να διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα σε σχεδόν άνυδρους οργανικούς διαλύτες, η επικρατούσα

αντίληψη ήταν πως τα ένζυμα παρέμεναν καταλυτικά ενεργά αποκλειστικά σε υδατικά διαλύματα. Για τον λόγο αυτό, τα αποτελέσματα του Klibanov στα τέλη της δεκαετίας του '70 σχετικά με την εστεροποίηση της Ν-ακετυλ-Ι-τρυπτοφάνης σε χλωροφόρμιο, προκάλεσαν έκπληξη στην επιστημονική κοινότητα (Klibanov, 1988; Klibanov et al., 1984). Έτσι, σε σύντομο χρονικό διάστημα, κατέστη προφανές πως ούτε η προέλευση, το είδος του ενζύμου ή η φύση του διαλύτη αποτελούσαν περιοριστικούς παράγοντες για την χρήση των οργανικών διαλυτών ως μέσων καθώς διάφορα ένζυμα, όπως λιπάσες, πρωτεάσες, οξειδοαναγωγάσες και άλλα, δρουν σε διάφορους οργανικούς διαλύτες.

Το μεγάλο ενδιαφέρον για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων στους οργανικούς διαλύτες πήγαζε από το γεγονός πως τα μέσα αυτά αποτελούσαν μία εναλλακτική στους περιορισμούς που επέβαλλε η χρήση των ενζύμων σε υδατικά μέσα. Γενικότερα, τα δυο κύρια χαρακτηριστικά των μη συμβατικών συστημάτων, δηλαδή των συστημάτων με μικρή έως και μηδενική περιεκτικότητα σε νερό, είναι το ότι μπορούν να χρησιμοποιούνται υδρόφοβα υποστρώματα και το ότι η πορεία μίας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να μετατοπίζεται πλέον προς την αντίθετη κατεύθυνση (π.χ. σύνθεση έναντι υδρόλυσης) (Garcia et al., 2004; Ikeda & Klibanov, 1993; Klibanov, 2000). Στον **πίνακα 3.3** συνοψίζονται τα βασικότερα χαρακτηριστικά-πλεονεκτήματα της ενζυμικής κατάλυσης σε μη συμβατικά συστήματα και ιδιαίτερα σε οργανικούς διαλύτες.

Πίνακας 3.3 Πλεονεκτήματα ενζυμικής κατάλυσης σε μη συμβατικά μέσα και ιδιαίτερα σε οργανικούς διαλύτες, έναντι της υδατικής βιοκατάλυσης.

Αυξημένη διαλυτότητα υδρόφοβων υποστρωμάτων, αδιάλυτων ή μερικώς διαλυτών στο νερό

Μετατόπιση της ισορροπίας υδρολυτικών αντιδράσεων προς την κατεύθυνση της σύνθεσης η οποία δεν ευνοείται θερμοδυναμικά σε υδατικά μέσα

Περιορισμός των εξαρτώμενων από το νερό παράπλευρων αντιδράσεων, όπως της υδρόλυσης, της ρακεμοποίησης και του πολυμερισμού

Δυνατότητα εύκολης απομόνωσης των ενζύμων καθώς αυτά δεν διαλυτοποιούνται σε υδρόφοβα μέσα

Εύκολη απομόνωση προϊόντων με τη χρήση διαλυτών χαμηλού σημείου ζέσεως και υψηλής τάσης ατμών

Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των οργανικών διαλυτών

Περιορισμός των μικροβιακών επιμολύνσεων

Αυξημένη σταθερότητα

Διαφορετική στέreo-εκλεκτικότητα ή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα

Μοριακή μνήμη

3.3.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την ενζυμική δραστικότητα σε μη συμβατικά συστήματα

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για μία συγκεκριμένη βιοκαταλυτική διεργασία, ακόμα και σήμερα δεν μπορεί να βασιστεί πλήρως σε μία σειρά καθορισμένων αρχών. Βασικό κριτήριο για την επιλογή αυτή συνιστά η συμβατότητα του οργανικού διαλύτη, όσον αφορά στην ικανότητα διατήρησης της ενζυμικής δραστικότητας και σταθερότητας. Λαμβάνοντας υπόψη την υδροφιλικότητα του διαλύτη, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η ενζυμική δραστικότητα και σταθερότητα είναι υψηλότερη σε υδρόφοβα παρά σε υδρόφιλα μέσα, εξαιτίας της ικανότητας των τελευταίων να απομακρύνουν μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζυμικού μορίου (Klibanov, 1988).

Για την περιγραφή της επίδρασης της υδροφοβικότητας των διαλυτών, επιχειρήθηκε η συσχέτιση της ενζυμικής δραστικότητας με την παράμετρο $\log P$, του συντελεστή κατανομής ανάμεσα στην οκτανόλη και το νερό. Η παράμετρος $\log P$ αποτελεί μέτρο της υδροφοβικότητας του διαλύτη. Χρησιμοποιώντας την παράμετρο αυτή βέλτιστοι διαλύτες, όσον αφορά στην ενζυμική δραστικότητα, είναι εκείνοι με $\log P > 4$, ακολουθούμενοι από εκείνους με $2 < \log P < 4$, ενώ μειωμένη δραστικότητα παρατηρείται σε διαλύτες με $\log P < 2$ (de Carvalho, 2011; Louwrier et al., 1996). Η τιμή $\log P$ του διαλύτη, αν και αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη, δεν μπορεί να εφαρμοστεί για να εξηγήσει καθολικά την εξάρτηση των καταλυτικών χαρακτηριστικών των ενζύμων από τη φύση του διαλύτη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον αυστηρό φορμαλισμό της παραμέτρου $\log P$, η οποία δεν λαμβάνει υπόψη ειδικές αλληλεπιδράσεις του διαλύτη με το ένζυμο (όπως για παράδειγμα την περίπτωση αναστολής της ενζυμικής δράσης).

Μία άλλη σημαντική παράμετρος, η οποία επιδρά στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων, αποτελεί η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό. Το νερό επιδρά στα ένζυμα με διαφορετικούς τρόπους, είτε τροποποιώντας τη δομή τους μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών και διαταράσσοντας τους δεσμούς υδρογόνου, είτε τροποποιώντας τη διάχυση των αντιδρώντων, ή επηρεάζοντας τη θέση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης (Zaks & Klibanov, 1988). Συνήθως, η βέλτιστη περιεκτικότητα του μέσου σε νερό κυμαίνεται σε μία μικρή περιοχή τιμών. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί πως ακόμα και στην περίπτωση μη συμβατικού μέσου με μηδενική περιεκτικότητα σε νερό, το τελευταίο δεν απουσιάζει παντελώς από το σύστημα. Και αυτό συμβαίνει γιατί τα δραστικά ένζυμα έχουν πάντοτε επιλεκτικά προσδεδεμένα μόρια νερού επάνω τους, ώστε να μπορούν να διατηρούν την καταλυτικά ενεργή τους διαμόρφωση. Το νερό που βρίσκεται υπό αυτή τη μορφή σε ένα τέτοιο σύστημα λέγεται bound water, ενώ το νερό που μπορεί να υπάρχει στο σύστημα πέραν αυτού, καλείται bulk water (Klibanov, 1988; Stamatis et al., 1999).

Όπως και σε κάθε βιολογικό σύστημα, έτσι και στην περίπτωση των ενζυμικών αντιδράσεων, η θερμοκρασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Η παράμετρος αυτή επηρεάζει τόσο την ενζυμική δραστικότητα όσο και την σταθερότητα. Η αύξηση της τιμής της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης αλλά και σε αύξηση του ρυθμού

απενεργοποίησης του ενζύμου. Σε χαμηλές θερμοκρασίες (συνήθως μέχρι 30 °C) και για μικρά χρονικά διαστήματα επώασης, ο ρυθμός απενεργοποίησης είναι αμελητέος και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας. Ωστόσο, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η συγκέντρωση των ενεργών ενζυμικών μορίων μειώνεται, και σε πολύ υψηλές τιμές (> 60 °C) σε πολλές περιπτώσεις η απενεργοποίηση είναι τόσο γρήγορη που η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης θεωρείται μηδενική. Η σταθερότητα των ενζύμων αποτελεί ιδιότητα εξαρτώμενη από το χρόνο και άρα το θερμοκρασιακό βέλτιστο αναμένεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου επαφής του ενζυμικού μορίου με το μέσο της αντίδρασης (Klibanov et al., 1984).

Οι αντιδράσεις ακυλίωσης που καταλύονται από λιπάσες είναι αντιστρεπτές, έτσι η δυνατότητα μετατόπισης της θερμοδυναμικής ισορροπίας της ενζυμικής αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η δυνατότητα αυτή παρέχεται με τη ρύθμιση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων, ώστε το ένα από τα δύο να χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Στη πλειοψηφία των αντιδράσεων μεταξύ ενός υδρόφιλου και ενός υδρόφοβου μορίου, συνήθως το υδρόφιλο είναι αυτό που χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Μία εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η χρήση εστέρων των ακυλο-δοτών (Yang & Wang, 2004; Yang & Wang, 2003). Σε αυτή την περίπτωση τα παραγόμενα παραπροϊόντα απομακρύνονται συνήθως υπό μειωμένη πίεση, δυνατότητα η οποία δεν παρέχεται σε αντιδράσεις απευθείας εστεροποίησης, όπου παραπροϊόν αποτελεί το νερό.

3.3.3 Βασικές κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων βιοκατάλυσης

Τα γνωστότερα και πιο πολυχρησιμοποιημένα συστήματα της μη συμβατικής βιοκατάλυσης είναι αυτά που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες. Παρόλα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και διάφορα άλλα μη συμβατικά συστήματα, πολλά από τα οποία έχουν βρει εφαρμογή τα τελευταία κυρίως χρόνια. Στις επόμενες παραγράφους ακολουθεί μια συνοπτική περιγραφή των βασικότερων τέτοιων μέσων.

3.3.3.1 Διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από δύο μακροσκοπικά διακριτές φάσεις, μία υδατική η οποία περιέχει το ένζυμο, και μία δεύτερη ενός μη αναμίξιμου με το νερό οργανικού διαλύτη, όπως οι υδρογονάνθρακες και οι αιθέρες. Στα συστήματα αυτά επιτυγχάνεται αφενός διαχωρισμός του ενζύμου από την οργανική φάση και αφετέρου μετατόπιση της αντίδρασης προς την ολική μετατροπή των υποστρωμάτων, λόγω συνεχούς απομάκρυνσης των προϊόντων. Διφασικά συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση λιποφίλων υποστρωμάτων (Klibanov, 1988).

3.3.3.2 Συστήματα ελεύθερα διαλυτών

Τα συστήματα αυτά (solvent free systems) βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητό να περιοριστεί η χρήση οργανικών διαλυτών, όπως για παράδειγμα σε διεργασίες σύνθεσης προσθέτων τροφίμων. Διάφορα πλεονεκτήματα σχετίζονται με την χρήση συστημάτων ελεύθερων διαλυτών. Η απουσία διαλύτη διευκολύνει τις κατιούσες διαδικασίες, εφόσον λιγότερα συστατικά είναι παρόντα μετά το τέλος της αντίδρασης, ελαχιστοποιώντας έτσι το κόστος της διαδικασίας. Τα συστήματα αυτά, επιπλέον, επιτρέπουν τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων. Ένα σύστημα ελεύθερο διαλυτών μπορεί να είναι ένα μίγμα αντίδρασης αποτελούμενο αποκλειστικά από τα υποστρώματα σε ισομοριακές ποσότητες ή ένα από αυτά να χρησιμοποιείται σε περίσσεια (Erbeldinger et al., 1998; Gupta & Roy, 2002; Klibanov, 1988).

3.3.3.3 Ιοντικά υγρά

Σε μία προσπάθεια αναζήτησης περιβαλλοντικά φιλικών μέσων, σύμφωνων με τις αρχές της πράσινης χημείας, τα ιοντικά υγρά (άλατα τα οποία παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου) έχουν προσελκύσει την τελευταία δεκαετία έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον ως μέσα για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Τα μέσα αυτά επιδεικνύουν σε πολλές περιπτώσεις σημαντικά πλεονεκτήματα και ανώτερες ιδιότητες σε σχέση με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους οργανικούς διαλύτες (Cantone et al., 2007; Jesionowski et al., 2002; Sheldon et al., 2002).

3.3.3.4 Υπερκρίσιμα ρευστά

Αντί για ένα λιπόφιλο οργανικό διαλύτη, υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το διοξείδιο του άνθρακα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες ή συν-διαλύτες για την ενζυμική τροποποίηση λιπόφιλων οργανικών συστατικών. Τα μέσα αυτά συνδυάζουν εξαιρετικά χαμηλό ιξώδες και καλή διάχυση των αερίων μαζί με υψηλή διαλυτότητα των αντιδρώντων και δυνατότητα εύκολης απομόνωσης των προϊόντων (Al-Duri et al., 2001; Dijkstra et al., 2007; Sereti et al., 1997).

4. Ιοντικά υγρά

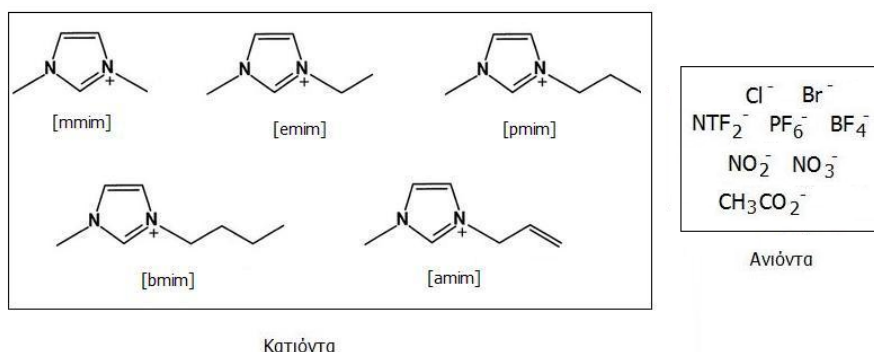
4.1 Εισαγωγή

Τα ιοντικά υγρά είναι οργανικά άλατα τα οποία είναι ρευστά σε συνήθεις θερμοκρασιακές συνθήκες. Ο σύγχρονος ορισμός των ιοντικών υγρών χρησιμοποιεί το σημείο ζέσεώς του νερού ως σημείο αναφοράς και σύμφωνα με αυτόν, τα ιοντικά υγρά αποτελούν άλατα, τα οποία παραμένουν υγρά σε θερμοκρασίες κάτω των 100 °C (Visser et al., 2002; Wang et al., 2007). Στην

πράξη, τα περισσότερα ιοντικά υγρά που έχουν χρησιμοποιηθεί παραμένουν υγρά ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Και στις δύο περιπτώσεις, ο ορισμός των ιοντικών υγρών βασίζεται στη θερμοκρασία και δεν δίνει καμία πληροφορία για τη σύστασή τους, πέραν του ότι αποτελούνται αποκλειστικά από ιόντα.

Διάφορα συνώνυμα χρησιμοποιούνται αντί του όρου «ιοντικό υγρό» όπως «τηγμένο άλας θερμοκρασίας δωματίου» (room temperature molten salt), «τηγμένο άλας χαμηλής θερμοκρασίας» (low temperature molten salt), «υγρό οργανικό άλας» (liquid organic salt). Το χαρακτηριστικό εκείνο που διαθέτουν τα ιοντικά υγρά και τα «τηγμένα άλατα» (molten salts) είναι το εύρος ρευστότητάς τους. Κανένας σχεδόν μοριακός διαλύτης δεν εμφανίζει παρόμοιο εύρος ρευστότητας με εκείνο των ιοντικών υγρών ή τηγμένων αλάτων. Η διαφορά ωστόσο μεταξύ ιοντικών υγρών και τηγμένων αλάτων εντοπίζεται στην κλίμακα θερμοκρασίας για την οποία τα συστατικά αυτά είναι ρευστά, αποδεικνύοντας πως οι δύο όροι δεν είναι ταυτόσημοι (Hao & Zemb, 2007; Holbrey et al., 2002).

Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά αποτελούνται από μόνο-, δι-, και τρι-υποκατεστημένα ιμιδαζολικά κατιόντα. Ωστόσο, τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά δεν αποτελούν τη μοναδική κατηγορία διαθέσιμων μέσων. Ήδη από το 1970 υπάρχουν αναφορές για τετρα-αλκυλφωσφορικά ιοντικά υγρά, και σήμερα υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα ιοντικά υγρά με υποκατεστημένα πυριδινικά, πυρολιδινικά, αμμωνιακά, γουανιδινικά και άλλα κατιόντα. Τα κατιόντα αυτά μπορούν να συνδυάζονται με ένα μεγάλο αριθμό διαθέσιμων ανιόντων, αποτελούμενων από σουλφίδια, σουλφονίδια, αμίδια, ιμίδια, αλογόνα, ενώσεις του βορίου, του φωσφόρου, του αντιμονίου ή και καρβοξυλικές ενώσεις (Park & Kazlauskas, 2001; Swatloski et al., 2002b) (σχήμα 4.1).



Σχήμα 4.1 Κατιόντα και ανιόντα που απαντώνται στα κυριότερα εμπορικά διαθέσιμα ιοντικά υγρά.

Η επέκταση των διαθέσιμων ιοντικών υγρών έχει σε πολύ μεγάλο βαθμό υποβοηθηθεί από την βελτίωση των μεθόδων σύνθεσης των ιοντικών υγρών. Η σημασία του γεγονότος αυτού δεν έγκειται απλά στην δυνατότητα αύξησης του αριθμού των διαθέσιμων ιοντικών υγρών αλλά στη δυνατότητα προσαρμογής και επιλογής των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών μέσω της επιλογής του ανιόντος και

κατιόντος από τα οποία συντίθενται. Η επιλογή του ανιόντος ελέγχει τις χημικές ιδιότητες και τη σταθερότητα του ιοντικού υγρού, ενώ η επιλογή του κατιόντος καθορίζει τις φυσικές τους ιδιότητες (Visser et al., 2002; Wang et al., 2007).

4.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών

Ο σχεδιασμός των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών μέσω επιλογής της ιοντικής τους σύστασης αποτελεί μία δυνατότητα που δεν ισχύει για καμία άλλη κατηγορία μοριακών διαλυτών και συνεπώς ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα της κατηγορίας αυτών των μη συμβατικών μέσων. Εξαιτίας της δυνατότητας αυτής, το κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον της μηχανικής του μέσου για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών, έχει μετατοπιστεί στην εφαρμογή των ιοντικών υγρών. Ο καθορισμός όμως του τρόπου με τον οποίο η διαφοροποίηση του ανιόντος, του κατιόντος και των υποκαταστατών επιδρά στις ιδιότητες των ιοντικών υγρών, καθώς και η πρόβλεψη των επιδράσεων αυτών με ένα συστηματικό τρόπο, αποτελούν αντικείμενο έρευνας.

4.2.1 Σημείο τήξης

Το φορτίο, το μέγεθος και η κατανομή φορτίου μεταξύ των ιόντων αποτελούν παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στα σημεία τήξης των αλάτων. Γενικά στα οργανικά άλατα παρατηρείται πως η αυξημένη συμμετρία των ιόντων τους επιτρέπει τον σχηματισμό κανονικών κρυστάλλων, αυξάνοντας έτσι τα σημεία τήξης. Αντίθετα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ιοντικών υγρών, η αδυναμία σχηματισμού κανονικών κρυστάλλων λόγω ασυμμετρίας των ιόντων αποτελεί την αιτία της εμφάνισης χαμηλών σημείων τήξης των ενώσεων αυτών (Hao & Zemb, 2007; Holbrey et al., 2002).

Οι θερμοκρασίες μετάβασης των ιοντικών υγρών από την στερεή στην υγρή κατάσταση μπορούν να κυμαίνονται κοντά στη θερμοκρασία δωματίου ή να είναι ιδιαίτερα χαμηλές, ακόμη και ίσες με $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το σημείο τήξης των ιοντικών υγρών εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των ιόντων που τα αποτελούν (πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Σημεία τήξης διάφορων ιοντικών υγρών.

Ιοντικό υγρό	Σημείο τήξης ($^{\circ}\text{C}$)
[bmim]Cl	41
[bmim]NO ₃	38
[bmim]NO ₂	55
[bmim]BF ₄	-81
[emim]PF ₆	58
[pmim]PF ₆	40
[bmim]PF ₆	10
[emim]NTF ₂	4
[bmim]NTF ₂	-25
[bmim]OAc	45

Έχει παρατηρηθεί πως αύξηση του μεγέθους του ανιόντος ή/και του κατιόντος, οδηγούν σε μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιόντων, με αποτέλεσμα τη μείωση του σημείου τήξης.

4.2.2 Τάση ατμών

Μία ενδιαφέρουσα ιδιότητα των ιοντικών υγρών αποτελεί η χαμηλή τάση ατμών τους. Είναι προφανές πως η χρήση των μη πτητικών ιοντικών υγρών μπορεί να συμβάλλει θετικά στη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (Jiang et al., 2007; Park & Kazlauskas, 2001). Επιπλέον, μπορεί να διευκολύνει και να απλοποιήσει την απομόνωση πτητικών προϊόντων, μία διαδικασία επίπονη με τη χρήση διαλυτών χαμηλών σημείων ζέσης. Τέλος, η μη πτητικότητα των ιοντικών υγρών επιτρέπει την εφαρμογή τους σε συστήματα με υπερκρίσιμα ρευστά, οδηγώντας σε διαδικασίες που συνδυάζουν δύο περιβαλλοντικά φιλικά μέσα.

4.2.3 Ιξώδες

Το ιξώδες ενός υγρού οφείλεται στην ανάπτυξη διαμοριακών δυνάμεων μεταξύ των μορίων του διαλύτη (αλληλεπίδραση μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων), καθώς και άλλων ασθενών αλληλεπιδράσεων, όπως οι δυνάμεις van der Waals, και εκδηλώνεται μακροσκοπικά με το βαθμό δυσκολίας ροής του υγρού. Με βάση το ιξώδες τα υγρά διακρίνονται σε Νευτώνια και μη-Νευτώνια. Τα Νευτώνια υγρά έχουν σταθερό ιξώδες ανεξάρτητα του ρυθμού παραμόρφωσης και στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και τα ιοντικά υγρά. Η γνώση της τιμής του ιξώδους των ιοντικών υγρών είναι σημαντική καθώς επηρεάζει τα φαινόμενα μεταφοράς των αντιδρώντων στα μέσα αυτά και πρακτικά θέματα, όπως την ανάδευση.

Το ιξώδες των ιοντικών υγρών είναι σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνο των μοριακών διαλυτών και κυμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου από 0.01 Pa s έως και περισσότερο από 1 Pa s. Παρατηρείται και στα ιοντικά υγρά εξάρτηση της τιμής του ιξώδους από τη θερμοκρασία, ωστόσο το μεγάλο εύρος τιμών ιξώδους των ιοντικών υγρών οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία προσμίξεων και τη παρουσία ή μη του νερού. Επίσης, στο ιξώδες φαίνεται να επιδρά και η φύση του ανιόντος και κατιόντος (Park & Kazlauskas, 2001; Swatloski et al., 2002b). Έχει παρατηρηθεί γενικά πως ιοντικά υγρά με υποκαταστάτες μικρότερης αλκυλικής αλυσίδας στο κατιόν εμφανίζουν μικρότερο ιξώδες. Επιπλέον, το ιξώδες μπορεί να μειωθεί και με τροποποίηση της φύσης του ανιόντος κατά τη σειρά, $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- \approx \text{NO}_3^- > \text{NTF}_2^-$.

4.2.4 Πυκνότητα

Η πυκνότητα αποτελεί ενδεχομένως την πιο άμεσα υπολογιζόμενη και αδιαμφισβήτητη φυσική ιδιότητα των ιοντικών υγρών. Οι αναφερόμενες τιμές

πυκνότητας των ιοντικών υγρών κυμαίνονται μεταξύ του 1.12 g/mL και 2.4 g/mL. Η τιμή της πυκνότητας σχετίζεται με το μοριακό βάρος των ανιόντων και αυξάνεται με την αύξηση αυτού. Όσον αφορά το κατιόν, παρατηρείται μείωση της πυκνότητας με την αύξηση του μεγέθους της αλκυλικής αλυσίδας των υποκαταστατών του. Η πυκνότητα του ιοντικού υγρού μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας, ενώ μικρή επίδραση φαίνεται να έχει και η παρουσία νερού (Seddon et al., 2000).

4.2.5 Πολικότητα

Η πολικότητα αποτελεί την ιδιότητα εκείνη η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει τη συμπεριφορά διαλύτη-διαλυμένης ουσίας. Τα ιοντικά υγρά κατατάσσονται ως πολικοί διαλύτες, με τιμές πολικότητας παρόμοιες με εκείνες των μικρών αλκοολών και άλλων πολικών, μη-πρωτικών διαλυτών (DMSO, DMF, κ.α.). Η πολικότητα εξαρτάται από την σύσταση του ιοντικού υγρού. Έχει αναφερθεί κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην μείωση του μήκους της αλυσίδας των αλκυλικών υποκαταστατών του κατιόντος, καθώς και του μεγέθους του ανιόντος, με την αύξηση της πολικότητας (Hao & Zemb, 2007; Seddon et al., 2000). Οι τιμές πολικότητας των ιοντικών υγρών είναι σε πολλές περιπτώσεις ευαίσθητες στην θερμοκρασία και την παρουσία του νερού.

4.2.6 Διαλυτική ικανότητα των ιοντικών υγρών

Τα ιοντικά υγρά πλεονεκτούν έναντι άλλων μέσων, καθώς έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν πληθώρα ανόργανων, οργανικών και πολυμερών συστατικών. Μεταβάλλοντας την ιοντική σύσταση των ιοντικών υγρών είναι δυνατή η αλλαγή της διαλυτότητας των ενώσεων στα μέσα αυτά (Seddon et al., 2000; Zhu et al., 2006). Για παράδειγμα η λιποφιλικότητα των ιοντικών υγρών εξαρτάται από το βαθμό υποκατάστασης του κατιόντος.

Σημαντική παράμετρο αποτελεί και η αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με άλλους διαλύτες. Η διαλυτότητα των ιοντικών υγρών στους οργανικούς διαλύτες εξαρτάται από την τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς (ϵ) του διαλύτη. Έχει παρατηρηθεί πως τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά είναι αναμίξιμα με πολικούς διαλύτες αλλά μη αναμίξιμα με αλκάνια και άλλους μη-πολικούς διαλύτες, με αποτέλεσμα τα μέσα αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διφασικά συστήματα. Η αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με το νερό μπορεί επίσης να μεταβάλλεται, από πλήρη αναμιξιμότητα έως και μηδενική. Η διαλυτότητα των ιοντικών υγρών στο νερό αποτελεί μία κρίσιμη παράμετρο καθώς, εξαιτίας της μη-πηκτητικότητάς τους, αποτελεί το πιο πιθανό τρόπο διείσδυσής τους στο περιβάλλον (Hao & Zemb, 2007; Holbrey et al., 2002). Η αλληλεπίδραση των ιοντικών υγρών με το νερό ελέγχεται κυρίως από το ανιόν του ιοντικού υγρού, με το κατιόν να διαδραματίζει δευτερεύον ρόλο. Η αιτία για το φαινόμενο αυτό είναι πως, ισχυροί δεσμοί υδρογόνου μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ των μορίων του νερού και του ανιόντος του ιοντικού υγρού.

4.2.7 Θερμική σταθερότητα

Η θερμική σταθερότητα καθορίζει την ανώτερη τιμή θερμοκρασίας για την οποία δεν παρατηρείται θερμική αποδιάταξη των ιοντικών υγρών που βρίσκονται στην υγρή φάση. Η αποδιάταξη των ιοντικών υγρών γίνεται μέσω μίας διαδικασίας, η οποία είναι ουσιαστικά αντίστροφη της $SN2$ πυρηνόφιλης υποκατάστασης που οδηγεί στο σχηματισμό του ιοντικού υγρού. Η θερμοκρασία αποδιάταξης διαφοροποιείται ανάλογα με το ανιόν. Για κάποια από τα περισσότερο ευρέως απαντώμενα ανιόντα, η σειρά σταθερότητας είναι γενικά, $Cl^- < [BF_4]^- \sim [PF_6]^- < [NTf_2]^-$. Ωστόσο, τα περισσότερα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται ως διαλύτες είναι τόσο σταθερά, που το ανώτερο θερμοκρασιακό όριο δεν περιορίζει την επιλογή κάποιου εξ' αυτών και επιπλέον τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες (Seddon et al., 2000).

4.3 Εφαρμογές των ιοντικών υγρών

Τα χαρακτηριστικά που είδαμε πως έχουν τα ιοντικά υγρά, τα καθιστούν ιδανικά για χρήση σε ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών. Τα μέσα αυτά βρήκαν αρχικά εφαρμογή σε ηλεκτροχημικές διεργασίες, εξαιτίας των ηλεκτροχημικών τους δυναμικών, της καλής αγωγιμότητας και ιδιοτήτων μεταφοράς. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες εκχύλισης και απομόνωσης μεταλλικών ιόντων, οργανικών μορίων και βιομορίων, αποθείωσης καυσίμων, και διαχωρισμού αερίων. Πολυάριθμες είναι οι αναφορές για την εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε ποικίλες αντιδράσεις οργανικής κατάλυσης, ανόργανης σύνθεσης ή πολυμερισμού, όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες, καταλύτες, ενεργοποιητές καταλυτών ή ως συν-καταλύτες, επιτυγχάνοντας υψηλούς καταλυτικούς ρυθμούς και εκλεκτικότητα (Holbrey et al., 2002; van Rantwijk et al., 2003).

4.3.1 Εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

Η πρώτη βιοκαταλυτική διεργασία σε ιοντικό υγρό πραγματοποιήθηκε πριν δεκα περίπου χρόνια. Το ιοντικό υγρό $[bmim]PF_6$ χρησιμοποιήθηκε σε διφασικό σύστημα σαν δεξαμενή υποστρώματος, ενώ ολόκληρα κύτταρα του μικροοργανισμού *Rhodococcus* R312, παρόντα στην υδατική φάση, κατέλυσαν τον βιομετασχηματισμό του 1,3-δικυανοβενζενίου. Σχεδόν παράλληλα, τα ιοντικά υγρά κέντρισαν το ενδιαφέρον των συγγραφέων εξαιτίας της μη πτητικής τους φύσης, η οποία τα καθιστά μία περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική των οργανικών διαλυτών, και μελέτησαν την καταλυόμενη από το ένζυμο θερμολυσίνη σύνθεση της Ζ-ασπαρτάμης. Το ένζυμο όχι μόνο διατήρησε τη δραστηριότητά του στο κορεσμένο με νερό ιοντικό υγρό $[bmim]PF_6$ αλλά επέδειξε και ιδιαίτερα υψηλή σταθερότητα, μεγαλύτερη και από εκείνη στον οργανικό διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας) (Cantone et al., 2007; Garcia et al., 2004). Στα τέλη του 2000 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή της λιπάσης Β από το

μικροοργανισμό *Candida antarctica* (σε ακινητοποιημένη και λυοφιλομένη μορφή) σε άνυδρα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά για την κατάλυση αντιδράσεων αλκοόλυσης, αμμωνιόλυσης και υπερυδρόλυσης, οδηγώντας σε καταλυτικούς ρυθμούς συγκρίσιμους ή και υψηλότερους σε σχέση με συμβατικούς οργανικούς διαλύτες (Park & Kazlauskas, 2003).

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών άνοιξαν το δρόμο σε ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο εφαρμογής των ιοντικών υγρών ως μέσων για την πραγματοποίηση ποικίλων αντιδράσεων, καταλυόμενων από ένζυμα πρακτικά όλων των κατηγοριών ή και από ολόκληρα κύτταρα. Τα ιοντικά υγρά ωστόσο βρίσκουν εφαρμογή στην βιοκατάλυση όχι απλά ως μέσα, αλλά ως προσδέτες υποστρωμάτων, ως πρόσθετα κατά τη διαδικασία λυοφιλοποίησης των ενζύμων, στην παρασκευή των ILCE (Ionic Liquid Coated Enzyme), σε τριαδικά συστήματα και σε SILM (supported ionic liquid membranes) (Lozano et al., 2004a; Park & Kazlauskas, 2003).

Διάφορα ιοντικά υγρά έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα σε πλήθος βιοκαταλυτικών αντιδράσεων καταλυόμενων από ένζυμα κάθε κατηγορίας. Οι λιπάσες αποτελούν την κατηγορία εκείνη των ενζύμων με τις περισσότερες εφαρμογές σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, εξαιτίας της ικανότητας διατήρησης της δραστηριότητάς τους και της ανθεκτικότητάς τους στην παρουσία μη συμβατικών μέσων. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν και την πλειοψηφία των ενζύμων που έχουν μελετηθεί σε ιοντικά υγρά (πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2 Ενδεικτικές εφαρμογές βιοκαταλυτικών διεργασιών σε ιοντικά υγρά.

Ιοντικό υγρό	Ένζυμο	Καταλυόμενη αντίδραση
[bmim]PF ₆	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B, <i>Candida rugosa</i>	Μετεστεροποίηση και σύνθεση πολυεστέρων
[bmim]BF ₄	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Μετεστεροποιήσεις με βινυλεστέρα του οξικού οξέος
[bmim]PF ₆ , [bmim]BF ₄	<i>Candida rugosa</i>	Εναντιοεκλεκτική υδρόλυση
[bmim]PF ₆ , [emim]NTF ₂	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B, <i>Rhizomucor miehei</i>	Μετεστεροποίηση
[bmim]PF ₆ , [bmim]BF ₄ , [bmim]NTF ₂	<i>Candida cylindracea</i> , Porcine pancreatic lipase	Ακυλίωση σουλφαμιδίων

Για τη πραγματοποίηση των προαναφερόμενων αντιδράσεων τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα είτε σε καθαρή μορφή, είτε σε μονοφασικά συστήματα με νερό ή οργανικούς διαλύτες, είτε σε διφασικά συστήματα,

οδηγώντας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε αυξημένη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες. Οι μελέτες αυτές επεσήμαναν την επίδραση ποικίλων παραμέτρων στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων σε ιοντικά υγρά. Τέτοιες είναι η καθαρότητα των ιοντικών υγρών, η πολικότητα τους, το ιξώδες τους και φυσικά η ιοντική τους σύσταση.

4.3.1.1 Πλεονεκτήματα της χρήσης ιοντικών υγρών στις βιοκαταλυτικές διεργασίες

Τα σημαντικότερα στοιχεία του συνόλου των χαρακτηριστικών που επιδεικνύουν τα ιοντικά υγρά ως μέσα βιοκατάλυσης, είναι (i) η αυξημένη σταθερότητα που συνήθως έχουν τα ένζυμα σε τέτοια περιβάλλοντα και (ii) η διαλυτότητα υποστρωμάτων που δεν διαλύονται εύκολα σε άλλα μη συμβατικά μέσα (Garcia et al., 2004).

Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν την υψηλή σταθερότητα των ενζύμων στα ιοντικά υγρά. Τα αποτελέσματα των πρώτων μελετών κατέδειξαν πως η σταθερότητα των ενζύμων είναι περισσότερο αυξημένη στα υδρόφοβα ιοντικά υγρά. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στη μεγαλύτερη τάση των υδρόφοβων μέσων να διατηρούν το απαραίτητο στρώμα νερού, μειώνοντας έτσι την άμεση επαφή πρωτεΐνης-ιοντικού υγρού. Σε μετέπειτα μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες ενεργότητας του νερού, οι διαφορές στη σταθερότητα των ενζύμων μεταξύ διαφόρων ιοντικών υγρών και οργανικών διαλυτών, δεν μπορούσαν να αποδοθούν στο διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης του ενζύμου. Η αυξημένη σταθερότητα αποδόθηκε σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου με αποτέλεσμα μία πιο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης, χωρίς ωστόσο να αποδεικνύεται η υπόθεση αυτή με δομικές μελέτες. Επιπλέον, η παρατηρούμενη, σε κάποιες περιπτώσεις, ενεργοποίηση των ενζύμων στα ιοντικά υγρά δεν μπορούσε απλά να εξηγηθεί με βάση την υδροφοβικότητά τους. Η ενεργοποίηση αποδόθηκε είτε στην αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με το ενεργό κέντρο των ενζύμων είτε στον σχηματισμό ενός ισχυρού ιοντικού πλέγματος, το οποίο περιέχει αλλά δεν διαλυτοποιεί τα ένζυμα, παρέχοντας ένα ικανοποιητικό μικροπεριβάλλον για την καταλυτική τους δράση (Garcia et al., 2004; Jesionowski et al., 2002).

Ένα από τα πλεονεκτήματα των ιοντικών υγρών αφορά στην ικανότητα διαλυτοποίησης διαφόρων ενώσεων. Η δυνατότητα αυτή φάνηκε να έχει θετική επίδραση στην πορεία βιοκαταλυτικών αντιδράσεων με διάφορα υποστρώματα. Για την αντίδραση ακυλίωσης της γλυκόζης, η σημαντική βελτίωση της απόδοσης στα ιοντικά υγρά, σε σχέση με εκείνη στους οργανικούς διαλύτες, αποδόθηκε στην ικανότητα των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν μεγάλες ποσότητες υδρόφιλων συστατικών, όπως ορισμένοι υδαάνθρακες μικρού μοριακού βάρους. Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση διαλύτη-διαλυμένης ουσίας τα ιοντικά υγρά φαίνεται να δρουν σαν μη πολικά μέσα με μη πολικές ενώσεις, και να επιδεικνύουν πολικό χαρακτήρα με πολικές ενώσεις, σε τέτοιο βαθμό ώστε να θεωρούνται ως ενώσεις αποτελούμενες από μικροδομές με πολικό και μη πολικό χαρακτήρα (Cantone et al., 2007; Jesionowski et al., 2002; Swatloski et al., 2002c).

Έχει διατυπωθεί η άποψη πως η ικανότητα των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν πολύπλοκες ενώσεις, εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα του ανιόντος να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου. Ωστόσο, και η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε ιμιδαζολικά κατιόντα και το υπόστρωμα έχει αναφερθεί να συμβάλλει στην αύξηση της διαλυτότητάς τους (Garcia et al., 2004; Sheldon et al., 2002).

4.4 Αξιοποίηση των ιοντικών υγρών για την επεξεργασία κυτταρινούχων υποστρωμάτων

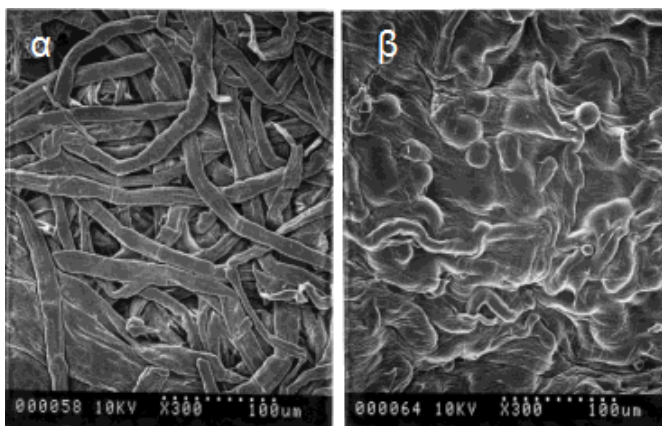
Τα τελευταία χρόνια, παράλληλα με την εξέλιξη των ιοντικών υγρών, αποδείχθηκε πως η φυσική κυτταρίνη - ανεπεξέργαστη ή μη - δύναται να διαλυθεί σε ορισμένα υδρόφιλα ιοντικά υγρά, με πιο χαρακτηριστικά τα [bmim]Cl (1-butyl-3-methylimidazolium chloride) και [amim]Cl (1-allyl-3-methylimidazolium chloride) (Barthel & Heinze, 2006; Cuissinat et al., 2008) (πίνακας 4.3). Η διαλυτότητα της κυτταρίνης εξαρτάται από τη σύσταση και τη δομή του κατιόντος και του ανιόντος του ιοντικού υγρού. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως μπορούν να παρασκευαστούν διαλύματα κυτταρίνης σε [bmim]Cl με περιεκτικότητα έως και 25% w/w, υπό θέρμανση. Το σημαντικότερο ίσως ρόλο στο μηχανισμό διάλυσης της κυτταρίνης στο [bmim]Cl, τον παίζει το ανιόν του χλωρίου (Cl⁻). Η έντονη δραστηριότητα του σε συνδυασμό με το μικρό του μέγεθος, τον έντονα ηλεκτραρνητικό χαρακτήρα του και τη μεγάλη περιεκτικότητά του σε διαλύματα του [bmim]Cl, το καθιστούν ικανό για να διασπάσει το ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται ανάμεσα στις αλυσίδες κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό η κυτταρίνη αποδιατάσσεται και μπορεί να διαλυθεί στο συγκεκριμένο περιβάλλον (Swatloski et al., 2002a; Zhao et al., 2009). Η συμπεριφορά αυτή έχει πιστοποιηθεί σε ατομικό επίπεδο από φασματοσκοπικές αναλύσεις ¹³C NMR.

Πίνακας 4.3 Ενδεικτικές τιμές διαλυτότητας της φυσικής κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά.

Ιοντικό υγρό	Διαλυτότητα % (w/w)
[bmim]Cl	10
[bmim]Br	5 - 7
[bmim]SCN	5
[bmim]BF ₄	αδιάλυτη
[bmim]PF ₆	αδιάλυτη
[emim]OAc	5
[amim]PF ₆	αδιάλυτη

Η κυτταρίνη μπορεί να παραληφθεί από το διάλυμα της σε [bmim]Cl μέσω καταβύθισης, με προσθήκη νερού, αιθανόλης ή ακετόνης. Η αναγεννημένη πλέον κυτταρίνη εξακολουθεί και έχει τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού, κάτι που δεν συμβαίνει όταν αναγεννάται από αλκαλικά διαλύματα της. Αυτό που αλλάζει κυρίως μετά την αναγέννηση της από τα διαλύματα σε [bmim]Cl είναι η διατακτική δομή της (μειωμένη κρυσταλλικότητα), αλλά και η μορφολογία της

(σχήμα 4.2). Ανάλογα με το ιοντικό υγρό και τη διαδικασία αναγέννησης/ανάκτησης, η κυτταρίνη μπορεί να είναι υπό τη μορφή σκόνης, ινών, νιφάδων ή και φιλμ. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, το ιοντικό υγρό μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί (Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006).



Σχήμα 4.2 Εικόνες SEM που απεικονίζουν φυσική κυτταρίνη πριν (α) και μετά (β) την επεξεργασία της σε διάλυμα $[bmim]Cl$.

Η ουσιαστικότερη αλλαγή που επιφέρει στην κυτταρίνη μία τέτοιου είδους επεξεργασία σε ιοντικά υγρά είναι η αλλαγή της μικροδομής της. Σαν συνέπεια αυξάνεται η επιφάνεια της η οποία μπορεί να είναι προσβάσιμη από διάφορα μόρια (χημικές ουσίες, υποστρώματα, ενζυμα κλπ). Έως τώρα οι τεχνικές αυτές έχουν αναπτυχθεί για την αξιοποίηση της κυτταρίνης ως πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης. Ειδικότερα, με την επεξεργασία αυτή είναι δυνατή η εύκολη, ταχεία και πλήρης υδρόλυση της κυτταρίνης από κυτταρινάσες, με σκοπό τη μετατροπή της σε ζυμώσιμη γλυκόζη (Swatloski et al., 2002a; Zhao et al., 2009).

5. Υπερκρίσιμα ρευστά

5.1 Εισαγωγή

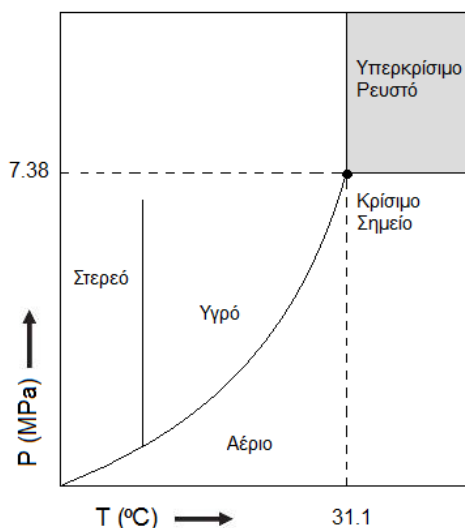
Ως υπερκρίσιμα, χαρακτηρίζονται τα ρευστά που βρίσκονται σε τιμές θερμοκρασίας και πίεσης πάνω από τις αντίστοιχες κρίσιμες τιμές τους T_c και P_c αντίστοιχα. Κρίσιμη θερμοκρασία (T_c) είναι η θερμοκρασία πάνω από την οποία ένα αέριο δεν είναι δυνατό να υγροποιηθεί με αύξηση της πίεσης, ενώ η αντίστοιχη πίεση ονομάζεται κρίσιμη πίεση (P_c). Στην κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση, δηλαδή στο κρίσιμο σημείο, η αέρια και η υγρή φάση συνυπάρχουν σε ισορροπία.

Το πλέον σύνηθες από τα χρησιμοποιούμενα υπερκρίσιμα ρευστά είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (supercritical carbon dioxide/scCO₂). Το ρευστό αυτό βρίσκει πολλές εφαρμογές ως διαλύτης, ως μέσο εκχύλισης και ως

μέσο αντίδρασης (Erkey, 2000; Pourmortazavi & Hajimirsadeghi, 2005; Sauceau et al., 2011). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα του είναι πως δεν είναι τοξικό και μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί με εκτόνωση από τη διεργασία στην οποία συμμετείχε. Επίσης, οι ρυθμοί διάχυσης που επιτυγχάνονται στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι αρκετά μεγαλύτεροι από πολλά άλλα κοινά ρευστά. Τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν ιδιότητες που μοιάζουν με αυτές των μη πολικών οργανικών διαλυτών (π.χ. εξάνιο). Ακόμα, η διαλυτότητα των υποστρωμάτων μίας αντίδρασης που λαμβάνει χώρα σε υπερκρίσιμο ρευστό μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη μίας μικρής ποσότητας οργανικών συνδιαλυτών. Το μοναδικό ίσως μειονέκτημα των υπερκρίσιμων ρευστών είναι η χρήση ειδικών αντιδραστήρων και εξοπλισμού, λόγω των υψηλών πιέσεων που απαιτούνται (Lucien & Foster, 2000; Ramsey et al., 2009).

5.2 Χαρακτηριστικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών

Ένα ρευστό ονομάζεται υπερκρίσιμο όταν η θερμοκρασία και η πίεση του λάβουν τιμές ανώτερες των αντίστοιχων κρίσιμων τιμών T_c και P_c αντίστοιχα (σχήμα 5.1). Μόλις το ρευστό περάσει στην υπερκρίσιμη περιοχή, τότε με αύξηση της πίεσης μεταβάλλεται η πυκνότητα του. Σε σχετικά χαμηλές πιέσεις η πυκνότητα του υπερκρίσιμου ρευστού έχει τιμές παρόμοιες με την πυκνότητα των αερίων, ενώ σε υψηλότερες πιέσεις η πυκνότητα γίνεται αντίστοιχη με αυτή των υγρών. Αυτό το φαινόμενο έχει ως αποτέλεσμα τα υπερκρίσιμα ρευστά να εμφανίζουν αφενός παρόμοια διαλυτική ικανότητα με τα υγρά και αφετέρου ικανότητα διείσδυσης και κινητικότητα ανάλογες με αυτές των αερίων (Cantone et al., 2007; Gordillo et al., 2005; Lucien & Foster, 2000).



Σχήμα 5.1 Διάγραμμα φάσεων του CO₂.

Σημαντικό χαρακτηριστικό των υπερκρίσιμων ρευστών είναι το γεγονός ότι οι ιδιότητες που αφορούν στη μεταφορά μάζας εμφανίζουν συνήθως τιμές

ενδιάμεσες των αντίστοιχων τιμών που αφορούν στα υγρά και τα αέρια. Γενικά είναι γνωστό πως οι συντελεστές διάχυσης σε υπερκρίσιμα ρευστά είναι 1-2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτεροι από αυτούς των υγρών, το ιξώδες τους είναι 1 τάξη μεγέθους μικρότερο από αυτό των υγρών και η θερμική αγωγιμότητα μεταβάλλεται με την πίεση και τη θερμοκρασία κατά τρόπο ανάλογο με αυτόν του ιξώδους. Στην περίπτωση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, αναφέρεται πως ακόμα και σε υψηλές πιέσεις το ιξώδες παραμένει σε χαμηλές τιμές. Οι παραπάνω ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών, σε συνδυασμό με τη μηδενική επιφανειακή τάση που εμφανίζουν, προσδίδουν σε αυτά υψηλή διαλυτική ικανότητα, η οποία σε συνδυασμό με άλλα πλεονεκτήματα (**πίνακας 5.1**) οδήγησαν στην εφαρμογή των υπερκρίσιμων ρευστών ως μέσα για διεργασίες διαχωρισμού και για τη διεξαγωγή αντιδράσεων (Pitla et al., 1998; Ramsey et al., 2009).

Πίνακας 5.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των υπερκρίσιμων ρευστών για τη χρήση τους σε διάφορες διεργασίες.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Χαμηλές θερμοκρασίες	Υψηλές πιέσεις
Ευκολία απομάκρυνσης	Υψηλό κόστος εγκατάστασης
Χαμηλό ενεργειακό κόστος	Φτωχή βάση δεδομένων
Εκλεκτικότητα	

Θα πρέπει βεβαίως να τονιστούν και οι δυσκολίες που αφορούν στη χρήση των υπερκρίσιμων ρευστών σε διάφορες διεργασίες. Καταρχήν η διαλυτότητα διαφόρων ουσιών στα υπερκρίσιμα ρευστά εξαρτάται άμεσα από τις τιμές της θερμοκρασίας και κυρίως της πίεσης. Αν αυτές αλλάξουν έστω και λίγο, τότε η διαλυτότητα μίας ουσίας μπορεί να μεταβληθεί αρκετά. Οι διαλυτότητες των περισσότερων ουσιών είναι αρκετά χαμηλές στα υπερκρίσιμα ρευστά και απαιτούνται πιέσεις της τάξεως των 20-60 MPa ώστε να επιτευχθούν διαλυτότητες παρόμοιες με αυτές των υγρών. Επιπλέον η έως τώρα περιορισμένη βάση δεδομένων σχετικά με τη διαλυτότητα και άλλες θερμοδυναμικές ιδιότητες διαφόρων χημικών ουσιών σε υπερκρίσιμα ρευστά, δυσχεραίνει το σχεδιασμό των ανάλογων διεργασιών (Lucien & Foster, 2000).

5.3 Βιοκατάλυση σε υπερκρίσιμα ρευστά

Η θερμοευαίσθητη φύση των ενζύμων καθιστά ορισμένα υπερκρίσιμα ρευστά ως εν δυνάμει μέσα αντίδρασης. Πράγματι, κάποια από αυτά υφίστανται σε ήπιες θερμοκρασίες (~30 °C) ώστε να μπορούν να φιλοξενήσουν διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις, χωρίς να υπάρχει το πρόβλημα της θερμικής μετουσίωσης του βιοκαταλύτη. Τέτοια ρευστά είναι το αιθάνιο, το αιθυλένιο, το διοξείδιο του άνθρακα, το φρέον 13 και το φρέον 23. Από αυτά, το διοξείδιο του άνθρακα είναι αυτό που σε υπερκρίσιμη κατάσταση εμφανίζεται πιο κατάλληλο για βιοκαταλυτικές εφαρμογές. Μερικοί λόγοι που συνιστούν την επιλογή του είναι η μη τοξικότητα του, η συμβατότητα του με το περιβάλλον, το χαμηλό κόστος του,

η δυνατότητα εύκολης ανάκτησης των προϊόντων και η ανακυκλωσιμότητα του (Dijkstra et al., 2007; Hobbs et al., 2007; Lozano et al., 2004b; Reetz et al., 2002). Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι ένας μη πολικός διαλύτης που έχει χαρακτηριστική συμπεριφορά κ-εξανίου. Στη συνέχεια παρατίθενται τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η εφαρμογή του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ως μέσου για ενζυμικές αντιδράσεις, σε διάφορες περιπτώσεις.

Τα πλεονεκτήματα του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα σε αντιπαραβολή με τα υδατικά μέσα είναι:

- α) Η χρησιμοποίηση υδροφόρων και μη υδατοδιαλυτών ουσιών.
- β) Το ότι η ενεργότητα του νερού και η θερμοδυναμική ισορροπία κάποιων αντιδράσεων μπορούν να ρυθμιστούν αλλάζοντας την περιεκτικότητα του διοξειδίου του άνθρακα σε νερό.
- γ) Το ότι τα ένζυμα δεν διαλύονται και έτσι μπορούν εύκολα να ανακτηθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν.

Τα πλεονεκτήματα του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα σε αντιπαραβολή με τους υγρούς οργανικούς διαλύτες είναι:

- α) Η μη τοξικότητα, το χαμηλό κόστος και η μη ευφλεκτότητα του διοξειδίου του άνθρακα.
- β) Το γεγονός ότι δεν παραμένουν υπολείμματα διαλύτη στα προϊόντα.

Τα πλεονεκτήματα του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα σε αντιπαραβολή με όλα τα μέσα αντίδρασης που βρίσκονται σε υγρή φάση είναι:

- α) Οι υψηλοί ρυθμοί διάχυσης, η χαμηλή πυκνότητα και η μηδενική επιφανειακή τάση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα που αναμένεται να επιταχύνουν τις αντιδράσεις με την ελεγχόμενη μεταφορά μάζας.
- β) Το ότι η κλασμάτωση των προϊόντων και ο καθαρισμός τους γίνεται κατευθείαν από το μείγμα της αντίδρασης. Μάλιστα στην έξοδο ροής του αντιδραστήρα, ο διαλύτης μπορεί να συλλεχθεί και να ανακυκλωθεί.
- γ) Το γεγονός πως όλη η διεργασία λειτουργεί σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ($T_c = 31.1^\circ\text{C}$) προστατεύει τις θερμοευαίσθητες ουσίες και φυσικά και τα ίδια τα ένζυμα. Η κρίσιμη θερμοκρασία του διοξειδίου του άνθρακα και η τυπική θερμοκρασία δράσης των ενζύμων, συμπίπτουν άψογα.

Μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις σε περιβάλλοντα διοξειδίου του άνθρακα, με ή χωρίς συνδιαλύτες. Οι κυριότεροι τύποι τέτοιων αντιδράσεων είναι οξειδώσεις, υδρολύσεις, εστεροποιήσεις και μετεστεροποιήσεις. Επίσης τα ένζυμα που έχουν κυρίως εμπλακεί σε αυτές τις αντιδράσεις είναι οι λιπάσες (Blattner et al., 2006; Garcia et al., 2004; Sereti et al., 1997). Γενικά μπορεί να αναφερθεί πως τα ένζυμα και ιδιαιτέρως τα ακινητοποιημένα, παραμένουν σταθερά κάτω από τις ανάλογες υπερκρίσιμες συνθήκες, ενώ η δραστηρότητά τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες.

5.4 Παράγοντες που επιδρούν στην ενζυμική ενεργότητα σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα

Η ενζυμική ενεργότητα σε περιβάλλοντα υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως είναι το pH, η

περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό, η πίεση, η θερμοκρασία και τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας.

Η δράση των ενζύμων είναι ευαίσθητη σε αλλαγές του pH αφού η βιοκατάλυση σε υδατικά συστήματα εξαρτάται από τον ιονισμό των αμινοξέων της πρωτεΐνης. Σε μη υδατικά συστήματα, η ενζυμική δράση εξαρτάται από το pH του μικροϋδατικού περιβάλλοντος που είναι σε άμεση επαφή με το ενζυμικό μόριο. Το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να διαλυθεί σε αυτό το υδατικό στρώμα και κατά συνέπεια να αλλάξει το τοπικό pH. Παρόλα αυτά, στις περισσότερες περιπτώσεις η ενεργότητα των ενζύμων δεν μεταβάλλεται για ένα μεγάλο εύρος τιμών pH. Μόνο στις περιπτώσεις που η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό είναι πάνω από 50% η ενεργότητα των ενζύμων μειώνεται κατά το ήμισυ ή και περισσότερο. Αυτό όμως δεν δείχνει να οφείλεται στο pH αλλά στην ίδια την περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό (Wimmer & Zarevucka, 2010).

Η επίδραση της περιεκτικότητας του νερού επάνω στην ενεργότητα των ενζύμων σε συστήματα υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα έχει συνδεθεί με την απενεργοποίηση των ενζύμων. Αυτό όμως δεν είναι απόλυτο καθώς όταν η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό είναι σε χαμηλά επίπεδα (< 20%) η αρχική ταχύτητα της αντίστοιχης ενζυμικής δράσης είναι υψηλότερη από ότι σε απουσία νερού. Επίσης η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό επηρεάζει και έμμεσα την ενζυμική αντίδραση μέσω μετατόπισης της θέσης χημικής ισορροπίας της αντίδρασης, όταν στην τελευταία συμμετέχει το νερό ως υπόστρωμα ή ως προϊόν (Marty et al., 1992; Wimmer & Zarevucka, 2010).

Μία πολύ σημαντική παράμετρος στα συστήματα ενζυμικών αντιδράσεων σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα είναι η πίεση. Η επίδραση της μπορεί να είναι θετική ή αρνητική. Συγκεκριμένα, σε σχετικά χαμηλές πιέσεις - εντός της υπερκρίσιμης περιοχής - η ταχύτητα μίας ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται με την πίεση. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη προσρόφηση των μορίων υποστρώματος από τα μόρια του ενζύμου. Αντίθετα, σε σχετικά υψηλές πιέσεις (> 30 MPa) παρατηρείται μείωση της ενεργότητας των ενζύμων, άρα και της ταχύτητας της αντίδρασης, με αύξηση της πίεσης. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται από την αλλαγή του όγκου του ενζυμικού μορίου λόγω της μεταβολής του μήκους των δεσμών και των γωνιών που σχηματίζουν στην αλυσίδα του ενζύμου. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας είναι η αλλαγή της υδατικής στιβάδας στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου (Garcia et al., 2004; Yin et al., 2007).

Σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των ενζύμων σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, ισχύει γενικά ότι και σε άλλα συστήματα περιορισμένης περιεκτικότητας σε νερό. Παρατηρείται λοιπόν αύξηση της θερμοσταθερότητας των περισσότερων ενζύμων εξαιτίας της αυξημένης μοριακής ακαμψίας του βιοκαταλύτη, η οποία οφείλεται στην έλλειψη νερού που δρα ως μοριακός λιπαντής. Φυσικά με αύξηση της θερμοκρασίας εντός ορίων, η ταχύτητα της ενζυμικής δράσης αυξάνει λόγω αύξησης της κινητικότητας των αντιδρώντων. Μετά από κάποιο όριο όμως ξεκινά η θερμική μετουσίωση του ενζύμου και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης φθίνει. Στην περίπτωση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα όμως, παίζουν σημαντικό ρόλο στην έκφραση της ενζυμικής δράσης και οι θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενες φυσικές ιδιότητες του μέσου. Έτσι η αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης με αύξηση της

θερμοκρασίας οφείλεται και στην παράλληλη μείωση της πυκνότητας του ρευστού (Dijkstra et al., 2007; Wimmer & Zarevucka, 2010).

Τέλος, ένας ακόμα ουσιαστικός παράγοντας που επιδρά στην αποτελεσματικότητα μίας ενζυμικής δράσης είναι τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Η σημαντικότητα του παράγοντα αυτού αυξάνει στην περίπτωση αντιδράσεων με περιορισμούς στη μεταφορά μάζας. Δηλαδή σε περιπτώσεις υποστρωμάτων τα οποία είναι λίγο έως και καθόλου διαλυτά ή και σε περιπτώσεις ενζύμων που είναι ακινητοποιημένα σε στερεούς φορείς. Στις περιπτώσεις αυτές λοιπόν το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα λειτουργεί καταλυτικά καθώς οι ρυθμοί διάχυσης είναι αυξημένοι σε σχέση με μία αντίστοιχη αντίδραση σε υγρό διαλύτη, υπό ανάδευση (Garcia et al., 2004; Reetz et al., 2002).

5.5 Αξιοποίηση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα για την επεξεργασία κυτταρινούχων υποστρωμάτων

Τα τελευταία χρόνια έχουν υπάρξει βιβλιογραφικές αναφορές βάση των οποίων το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χρησιμοποιείται για την επεξεργασία κυτταρίνης με σκοπό τη χημική τροποποίηση της δομής της. Ειδικότερα γίνεται ειδική μνεία για την ικανότητα που έχει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα να διογκώνει τη φυσική κυτταρίνη (swelling) (Nishino et al., 2011; Yin et al., 2007). Είναι γνωστό πως το συγκεκριμένο ρευστό είναι αρκετά συμπιεστό και οι διάφορες θερμοδυναμικές και φυσικοχημικές του ιδιότητες μπορούν να μεταβάλλονται με μεταβολή της θερμοκρασίας και κυρίως της πίεσης του. Σε πιέσεις μεγαλύτερες από 14 MPa το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα αποκτά τέτοιες ρεολογικές ιδιότητες που μπορεί να παρεισφρήσει ανάμεσα στις αλυσίδες της κυτταρίνης και να την διογκώσει. Παράλληλα, εφόσον επιχειρείται και η διεξαγωγή κάποιας χημικής αντίδρασης στον πολυσακχαρίτη, το ρευστό δύναται να λειτουργήσει και ως μέσο αντίδρασης. Ανάλογα με τα αντίστοιχα υποστρώματα μπορεί να απαιτηθεί και η παρουσία κάποιου συνδιαλύτη.

Οι παραπάνω ερευνητικές δραστηριότητες είχαν σαν συνέπεια τη χημική εστεροποίηση φυσικής κυτταρίνης. Αφενός επετεύχθη εστεροποίηση ινώδους κυτταρίνης με ουρία, συνεπικουρούμενη από προκατεργασία των αντιδρώντων σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, παρουσία αιθανόλης ως συνδιαλύτη (Yin et al., 2007). Ακόμα, πραγματοποιήθηκε χημική ακετυλίωση φυσικής κυτταρίνης σε ινώδη μορφή ($DS = 1.9$), με ακυλο-δότη τον οξικό ανυδρίτη (Nishino et al., 2011). Στην περίπτωση αυτή το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χρησίμευσε ως παράγοντας διόγκωσης της κυτταρίνης αλλά και ως μέσο αντίδρασης. Η διόγκωση της κυτταρίνης θεωρείται μεγάλης σημασίας διότι έτσι δημιουργείται προσβασιμότητα στις αλυσίδες της και αυξάνει η δραστηριότητα των υδροξυλίων της. Η ικανότητα διόγκωσης της φυσικής κυτταρίνης από το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα αναφέρεται πως ξεκινάει ως φαινόμενο σε τιμές πίεσης περί τα 14 MPa και αυξάνει με την πίεση έως τα 18 MPa περίπου. Στη συνέχεια, με περαιτέρω αύξηση της πίεσης το φαινόμενο αρχίζει να αντιστρέφεται.

Υλικά και Μέθοδοι

6. Υλικά

6.1 Ένζυμα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες λιπάσες:

- Λυοφιλωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, ειδικής ενεργότητας 3.8 U/mg, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Λυοφιλωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, ειδικής ενεργότητας 5.4 U/mg, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Λυοφιλωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, ειδικής ενεργότητας 3.0 U/mg, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Λυοφιλωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ειδικής ενεργότητας 2.4 U/mg, προϊόν της εταιρείας Sigma.
- Λιπάση B από *Candida antarctica*, ακινητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη, με ειδική ενεργότητα 1.8 U/mg, προϊόν της εταιρείας Sigma.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω υδρολάσες:

- Λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (porcine liver esterase), ειδικής ενεργότητας 1.5 U/mg, προϊόν της εταιρείας Sigma.
- Εστεράση από ήπαρ χοίρου (hog liver esterase), ακινητοποιημένη σε Eupergit, με ειδική ενεργότητα 0.9 U/mg, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, ακινητοποιημένη σε μακροπορώδες πολυπροπυλένιο (Accurel EP 100), με ειδική ενεργότητα 1.4 U/mg, προϊόν της εταιρείας Unilever.

1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία απελευθερώνει 1μmol λαυρικού οξέως / min, σε pH=7.5 και θερμοκρασία T=40 °C. Ως αρχικό υπόστρωμα χρησιμοποιείται λαυρικός βινυλ-εστέρας σε περίσσεια.

6.2 Κυτταρινούχα υποστρώματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εμπορικά διαθέσιμες κυτταρίνες:

- Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη Avicel (PH-101), μέσου βαθμού πολυμερισμού DP=225, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Ινώδης φυσική κυτταρίνη (fibrous cellulose, long), μέσου βαθμού πολυμερισμού DP=730, προϊόν της εταιρείας Sigma.

6.3 Ακυλο-δότες

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ως ακυλο-δότες στις αντιδράσεις εστεροποίησης της κυτταρίνης είναι οι ακόλουθες:

- Προπιονικός βινυλ-εστέρας (vinyl propionate), καθαρότητας 98%, προϊόν της εταιρείας Sigma.

- Δωδεκανοϊκός ή λαυρικός βινυλ-εστέρας (vinyl laurate), καθαρότητας 99%, προϊόν της εταιρείας Fluka.
- Δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός βινυλ-εστέρας (vinyl stearate), καθαρότητας >99%, προϊόν της εταιρείας Sigma.

6.4 Ιοντικά υγρά

Για τις ανάγκες τις παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά:

- [bmim]PF₆: 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro phosphate), προϊόν της εταιρείας Fluka.
- [bmim]BF₄: 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο (1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoro borate), προϊόν της εταιρείας Fluka.
- [bmim]Cl: 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο χλώριο (1-butyl-3-methylimidazolium chloride), προϊόν της εταιρείας Fluka.
- [emim]OAc: 1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο οξικό (1-ethyl-3-methylimidazolium acetate), προϊόν της εταιρείας Aldrich.

6.5 Οργανικοί διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck, Sigma, LabScan και Fisher Scientific.

6.6 Λοιπά αντιδραστήρια / υλικά

Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων (οξέα, βάσεις, άλατα, ρυθμιστικά διαλύματα), ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προϊόντα των εταιρειών Sigma και Fluka.

Ως υπόστρωμα στις υδρολυτικές αντιδράσεις των ενζύμων που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ο δωδεκανοϊκός (λαυρικός) εστέρας της π-νιτροφαινόλης (pNP laurate), καθαρότητας >98%, προϊόν της εταιρείας Sigma. Ως πρότυπη ουσία για την εξαγωγή της ανάλογης καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η π-νιτροφαινόλη (pNP), καθαρότητας φασματοφωτομετρικής βαθμίδας (spectrophotometric grade), προϊόν της εταιρείας Fluka.

Για τη διεξαγωγή των απαραίτητων τιτλοδοτήσεων, χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης η φαινολφθαλεΐνη (phenolphthalein), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich.

Για την παρασκευή παστίλιων του FTIR, χρησιμοποιήθηκε ως κύριο υλικό το βρωμιούχο κάλλιο (KBr), καθαρότητας φασματοσκοπικής βαθμίδας (spectroscopic grade), προϊόν της εταιρείας Merck.

7. Μεθοδολογία

7.1 Προσδιορισμός της ενεργότητας των υδρολυτικών ενζύμων

Η ενεργότητα των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, εκφράζεται και προσδιορίζεται μέσω της υδρόλυσης του λαυρικού εστέρα της π-νιτροφαινόλης (pNP-laurate), σε υδατικό περιβάλλον με pH=7.5 και θερμοκρασία T=40 °C. Η π-νιτροφαινόλη (pNP) που απελευθερώνεται, προσδιορίζεται φωτομετρικά σε μήκος κύματος 410 nm με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου μικροκυψελίδων (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA).

Το κάθε αντιδρών μείγμα συνίσταται από 174 μL ρυθμιστικού διαλύματος citrate-phosphate 25 mM (pH=7.5), 16 μL διαλύματος pNP-laurate σε αιθανόλη, συγκέντρωσης 5mM και 10μL κατάλληλα αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα. Το μείγμα της αντίδρασης υδρόλυσης του pNP-laurate επωάζεται σε θερμοκρασία T=40 °C και η έναρξη της αντίδρασης σηματοδοτείται με την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος. Η εξέλιξη της αντίδρασης υδρόλυσης του pNP-laurate σε pNP και λαυρικό οξύ παρακολουθείται on-line από το προαναφερόμενο φασματοφωτόμετρο, παράλληλα με τυφλό δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί ένζυμο, ώστε να προσδιοριστεί η μη ενζυμική υδρόλυση του pNP-laurate. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν. Να σημειωθεί πως στην περίπτωση ακινητοποιημένων ενζύμων, η παρασκευή διαλύματος τους με επιθυμητή περιεκτικότητα δεν είναι εφικτή διότι οι αντίστοιχες αραιώσεις δεν μπορεί να είναι ακριβείς. Συνεπώς, στην παραπάνω αντίδραση αντί για κατάλληλα αραιωμένο ενζυμικό διάλυμα, προστίθεται απευθείας κατάλληλη ποσότητα του ενζυμικού σκευάσματος.

Η χρονική διάρκεια της αντίδρασης τοποθετείται στα 15 min και το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται έτσι ώστε να πραγματοποιεί μετρήσεις σε μήκος κύματος 410 nm, ανά 30 sec. Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίζεται βάσει της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από τη κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης της αύξησης της απορρόφησης της pNP συναρτήσει του χρόνου.

7.2 Προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού των κυτταρινούχων υλικών

Ο προσδιορισμός του μέσου βαθμού πολυμερισμού DP των διάφορων κυτταρινούχων υποστρωμάτων έγινε ιξωδομετρικά. Τα δείγματα κυτταρίνης υφίστανται κατεργασία με διάλυμα CuEn (Cuprieethylenediamine) για 18 h σε θερμοκρασία 40 °C. Ακολουθεί μέτρηση του χρόνου εκροής των αντίστοιχων διαλυμάτων, με χρήση ιξωδόμετρου τριχοειδούς σωλήνα Ubbelohde (Brown & Wikstrom), υπό θερμοκρασία 25 °C. Το ιξώδες υπολογίζεται με εφαρμογή της παρακάτω εξίσωσης (ISO/DS 5351/1):

$$[\eta] = 7.5 \cdot 10^{-3} \cdot DP$$

εξίσωση 7.1

$[\eta]$ είναι το ιξώδες του μείγματος που διέρχεται από τον τριχοειδή σωλήνα και υπολογίζεται με τη σειρά του από την ακόλουθη εξίσωση (Martin, 1942):

$$\eta_a = [\eta] \cdot C \cdot 10^{0.14 \cdot [\eta] \cdot C} \quad \text{εξίσωση 7.2}$$

η_a είναι η σχετική αύξηση του ιξώδους και C είναι η περιεκτικότητα κυτταρίνης (g/100mL) στο μείγμα της με CuEn.

7.3 Μέτρηση του δείκτη κρυσταλλικότητας των κυτταρινούχων υλικών με περίθλαση ακτίνων Χ (XRD)

7.3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η περίθλαση με ακτίνες Χ είναι μια τεχνική ανάλυσης με κύρια εφαρμογή στη μελέτη της κρυσταλλικής δομής διαφόρων υλικών. Όταν ακτίνες Χ διέρχονται από έναν κρύσταλλο, τότε μέρος από την ενέργεια τους απορροφάται από αυτόν. Η ενέργεια αυτή επανεκπέμπεται από τον κρύσταλλο, καθώς οι δομικές του μονάδες καθίστανται δευτερογενείς πηγές ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως περίθλαση ακτίνων Χ (X-Ray Diffraction/ XRD).

Ένα τυπικό περιθλασίμετρο ακτίνων Χ περιέχει καταρχήν μία πηγή. Αυτή είναι μία καθοδική λυχνία συνοδευόμενη από φίλτρο ώστε η ακτινοβολία να είναι αυστηρά μονοχρωματική. Το δείγμα, σε μορφή σκόνης, εισάγεται σε ειδικό υποδοχέα ο οποίος έχει τη δυνατότητα να περιστρέφεται. Η ακτινοβολία, αφού διέλθει από το μονοχρωμάτορα, προσπίπτει στην κρυσταλλική ουσία. Η περιθλάμενη από το δείγμα ακτινοβολία, αφού διέλθει με τη σειρά της από μια σειρά σχισμών, καταλήγει στον ανιχνευτή. Η ενίσχυση της ακτινοβολίας για μια δεδομένη γωνία πρόσπτωσης των ακτίνων Χ ως προς το δείγμα, γίνεται αντιληπτή με καταγραφή υψηλής έντασης από τον ανιχνευτή.

7.3.2 Πειραματική διαδικασία

Ο προσδιορισμός του δείκτη ή βαθμού κρυσταλλικότητας (Crl) πραγματοποιήθηκε σε όργανο περίθλασης ακτίνων Χ (Siemens D5000) χρησιμοποιώντας ακτινοβολία Cu-Kα. Το δείγμα του κυτταρινούχου υλικού τοποθετείται σε κατάλληλο δειγματοφορέα στο κέντρο του γωνιόμετρου, το οποίο περιστρέφεται με σταθερή ταχύτητα θ στο επίπεδο ανάκλασης των ακτίνων Χ. Με τον τρόπο αυτό η επιφάνεια του δείγματος εκτίθεται στη μονοχρωματική ακτινοβολία μήκους κύματος $\lambda=1.5405 \text{ \AA}$, ενώ η γωνία θ αυξάνεται συνεχώς, με επιλεγμένο βήμα $0.01^\circ/\text{s}$ μεταξύ προεπιλεγμένων τιμών $2\theta=5-40^\circ$. Σημειώνεται ότι δεν περιστρέφεται μόνο το δοκίμιο αλλά και ο ανιχνευτής κατά γωνία 2θ , ώστε να ανιχνεύει τις ανακλώμενες ακτίνες. Για γωνία $2\theta=22.7^\circ$ εμφανίζεται η κορυφή του επιπέδου ανάκλασης (002) (κρυσταλλική περιοχή), ενώ για γωνία $2\theta=18^\circ$ εμφανίζεται η άμορφη περιοχή. Έτσι λαμβάνεται διάγραμμα που αποτυπώνει την ένταση της ανακλώμενης ακτινοβολίας I

συναρτήσει της γωνίας 2θ , από το οποίο προσδιορίζεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας. Ειδικότερα ο δείκτης κρυσταλλικότητας προσδιορίζεται με εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης (Segal et al., 1959):

$$CrI \% = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] \cdot 100 \quad \text{εξίσωση 7.3}$$

I_{002} είναι η μέγιστη ένταση του επιπέδου ανάκλασης 002 για $2\theta = 22.7^\circ$ και I_{am} είναι η ένταση της άμορφης περιοχής.

7.4 Μελέτη της μορφολογίας των κυτταρινούχων υλικών με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)

7.4.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (Scanning Electron Microscope/SEM), είναι ένας τύπος ηλεκτρονικού μικροσκοπίου το οποίο απεικονίζει ένα δείγμα σαρώνοντας το με μία υψηλής ενέργειας δέσμη ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με τα διάφορα - επιφανειακά κυρίως - άτομα του δείγματος, παράγοντας χαρακτηριστικά σήματα που αφορούν πρωτίστως στη μορφολογία της επιφάνειας του υλικού και δευτερευόντως σε άλλες ιδιότητες όπως η στοιχειακή του σύσταση. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης μπορεί να απεικονίσει λεπτομέρειες στην μορφολογία της επιφάνειας με διαστάσεις μικρότερες και από 1 nm.

Η δέσμη ηλεκτρονίων εστιάζεται και σχηματίζει μία πολύ λεπτή γραμμή που σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος. Κατά τη διάρκεια της σάρωσης, ηλεκτρόνια ανακρούονται από τα άτομα του δείγματος και συγκεντρώνονται από μία άνοδο συλλογής. Το ρεύμα στην άνοδο συλλογής ενισχύεται και χρησιμοποιείται για να διαμορφώσει μία δέσμη ηλεκτρονίων σε καθοδικό σωλήνα, ο οποίος σαρώνεται σε συγχρονισμό με τη δέσμη του μικροσκοπίου. Συνεπώς ο καθοδικός σωλήνας παρουσιάζει ένα εξαιρετικά μεγεθυμένο είδωλο του υλικού-δείγματος. Η παραγωγή των ανακρουόμενων ηλεκτρονίων εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της αρχικής δέσμης. Έτσι οι μικρογραφίες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έχουν πολύ καλή τρισδιάστατη εμφάνιση. Ολόκληρη η συσκευή, περιλαμβανομένου και του δείγματος, θα πρέπει να βρίσκεται σε κενό αλλιώς τα ηλεκτρόνια θα συγκρούονταν με τα μόρια του αέρα και θα υπήρχαν αλλοιώσεις στις απεικονίσεις.

7.4.2 Πειραματική διαδικασία

Η μορφολογία της επιφάνειας των κυτταρινούχων υλικών που αφορούν στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (Quanta 200 FEI (2004), OR, USA), με τιμή επιταχυνόμενου δυναμικού 25 kV. Κατάλληλη ποσότητα του προς μελέτη υλικού (<10 mg), υφίσταται επιχρυσωση σε ειδική συσκευή (SC7620 Mini Sputter Coater, Quorum Technologies, West Sussex, UK). Έπειτα το επιχρυσωμένο πλέον υλικό

τοποθετείται σε δειγματοφορέα του SEM και αφού δημιουργηθεί κενό στο εσωτερικό της όλης διάταξης, ξεκινά η διαδικασία σάρωσης.

7.5 Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης που έχει υποστεί προκατεργασία σε ιοντικά υγρά

7.5.1 Προκατεργασία κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά

7.5.1.1 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl

Προετοιμάζονται μείγματα κυτταρίνης Avicel σε ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα 2, 5 και 10% (w/w). Κατάλληλη ποσότητα του κάθε μείγματος τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο στη συνέχεια πωματίζεται. Ακολουθεί εμφύσηση του φιαλιδίου σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 120 °C, όπου και παραμένει για χρονική διάρκεια 15, 30 ή 40 min, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της θερμικής κατεργασίας, στο ομογενές υγρό μείγμα που έχει προκύψει, προστίθεται 10πλάσιος όγκος θερμού απιονισμένου νερού και παρατηρείται άμεση καταβύθιση της κυτταρίνης. Το μείγμα [bmim]Cl/H₂O απομακρύνεται από την κυτταρίνη με τη βοήθεια διήθησης υπό κενό. Η κυτταρίνη που συλλέγεται στη συνέχεια, υπόκειται σε 3 διαδοχικές πλύσεις με θερμό απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν και τα όποια ίχνη του ιοντικού υγρού. Τέλος, η κυτταρίνη ξηραίνεται σε ήπια θερμοκρασία (40 °C) ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλαμβάνεται και για το άλλο κυτταρινούχο υπόστρωμα, την ινώδη κυτταρίνη.

7.5.1.2 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc

Προετοιμάζονται μείγματα κυτταρίνης Avicel σε ιοντικό υγρό [emim]OAc, με περιεκτικότητα 2 και 5% (w/w). Κατάλληλη ποσότητα του κάθε μείγματος τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο, το οποίο στη συνέχεια πωματίζεται. Ακολουθεί εμφύσηση του φιαλιδίου σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας 120 °C, όπου και παραμένει για χρονική διάρκεια 15, 30 ή 40 min, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας της θερμικής κατεργασίας, στο ομογενές υγρό μείγμα που έχει προκύψει, προστίθεται 10πλάσιος όγκος θερμού απιονισμένου νερού και παρατηρείται άμεση καταβύθιση της κυτταρίνης. Το μείγμα [emim]OAc/H₂O απομακρύνεται από την κυτταρίνη με τη βοήθεια διήθησης υπό κενό. Η κυτταρίνη που συλλέγεται στη συνέχεια, υπόκειται σε 3 διαδοχικές πλύσεις με θερμό απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν και τα όποια ίχνη του ιοντικού υγρού. Τέλος, η κυτταρίνη ξηραίνεται σε ήπια θερμοκρασία (40 °C) ώστε να απομακρυνθεί η υγρασία. Η ίδια ακριβώς διαδικασία επαναλαμβάνεται και για το άλλο κυτταρινούχο υπόστρωμα, την ινώδη κυτταρίνη.

7.5.2 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης

Σε γυάλινη σφαιρική φιάλη όγκου 25 mL, τοποθετούνται από 100 έως 200 mg κυτταρίνης (Avicel ή ινώδης) που έχει προεπεξεργαστεί στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl ή [emim]OAc. Στη συνέχεια προστίθενται 10 mL διαλύματος ακυλο-δότη (vinyl propionate, vinyl laurate ή vinyl stearate), σε μία σειρά διαλυτών-μέσων αντίδρασης (εξάνιο, ακετονιτρίλιο, [bmim]PF₆, [bmim]BF₄). Η συγκέντρωση του ακυλο-δότη σε αυτά τα μέσα κυμαίνεται από 0.1 έως 1 M. Επίσης προετοιμάστηκαν και συστήματα ελεύθερα διαλυτών (solvent free), στα οποία 10 mL του εκάστοτε ακυλο-δότη προστίθενται απευθείας στην κατάλληλη ποσότητα κυτταρίνης. Στο τέλος, σε κάθε ένα από τα παραπάνω συστήματα προστίθενται από 0.1 έως 0.4 U ενζύμου/mg κυτταρίνης*. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*.

Το κάθε αντιδρών μείγμα, αφού πωματιστεί, τοποθετείται σε ανακινούμενο επωαστήρα θερμοκρασίας 40, 50 ή 60 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm). Η χρονική διάρκεια της επώασης για κάθε αντίδραση είναι 70 h. Η αντίδραση τερματίζεται με απενεργοποίηση του βιοκαταλύτη, μέσω βρασμού για 10 min. Στην περίπτωση που με ποιοτικό έλεγχο του κυτταρινούχου υλικού ανιχνευθεί εστερικός δεσμός σε αυτό, τότε η αντίδραση επαναλαμβάνεται έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί και ποσοτική ανάλυση του σχηματιζόμενου εστέρα ως προς τη χρονική εξέλιξη της αντίδρασης. Επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό της κυτταρίνης παραμένει αδιάλυτο, η δειγματοληψία δεν μπορεί να είναι ακριβής ώστε να μην αλλάξει η σύσταση του αντιδρώντος μείγματος. Για αυτόν το λόγο, για κάθε έναν τύπο αντίδρασης προετοιμάστηκαν πανομοιότυπα αντιδρώντα συστήματα, τόσα όσες και οι δειγματοληψίες που επρόκειτο να πραγματοποιηθούν. Έτσι σε κάθε χρονική στιγμή που είναι επιθυμητή η ανάλυση του προϊόντος, λαμβάνεται και το αντίστοιχο αντιδρών μείγμα.

Επίσης πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες (i) δεν χρησιμοποιήθηκε ένζυμο ή (ii) χρησιμοποιήθηκε κυτταρίνη που δεν υπέστη προκατεργασία σε ιοντικά υγρά.

* Η τυπική συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιείται σε όλες τις αντιδράσεις είναι 0.25 U/mg κυτταρίνης. Μόνο στις περιπτώσεις που σχηματίστηκε προϊόν, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αντιδράσεις με συγκέντρωση βιοκαταλύτη από 0.1 - 0.4 U/mg κυτταρίνης.

7.5.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος

7.5.3.1 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, το κάθε δείγμα φυγοκεντρείται και διαχωρίζεται το υπερκείμενο υγρό από το εναπομείναν στερεό υπόλειμμα (κυτταρινούχο υλικό). Το τελευταίο υφίσταται αρχικά δυο εκπλύσεις με μεθανόλη και έπειτα δυο εκπλύσεις με εξάνιο, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο βινυλ-εστέρας που δεν αντέδρασε. Το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει από την παραπάνω φυγοκέντρωση, καθώς και τα διηθήματα των εκπλύσεων, εξατμίζονται υπό κενό έτσι ώστε να ανιχνευθεί η οποιαδήποτε ποσότητα στερεού κυτταρινούχου προϊόντος που θα μπορούσε να έχει διαλυθεί στη φάση του οργανικού διαλύτη. Τέλος, όλο το κυτταρινούχο υλικό τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 40 °C ώστε να ξηρανθεί.

7.5.3.2 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις αντιδράσεις σε ιοντικά υγρά

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, στο κάθε δείγμα προστίθεται 4πλάσιος όγκος μεθανόλης στην περίπτωση του [bmim]PF₆ ή απιονισμένου νερού στην περίπτωση του [bmim]BF₄, ώστε να καταβυθιστεί το προϊόν που μπορεί να έχει σχηματιστεί και διαλυθεί στη φάση του ιοντικού υγρού. Επίσης η συγκεκριμένη προσθήκη του νερού βοηθά στην περαιτέρω απομάκρυνση της φάσης αυτής. Έτσι στη συνέχεια το όλο σύστημα φυγοκεντρείται και διαχωρίζεται η υπερκείμενη υγρή φάση από το εναπομείναν στερεό κυτταρινούχο υπόλειμμα. Το τελευταίο υφίσταται αρχικά δυο εκπλύσεις με μεθανόλη και έπειτα δυο εκπλύσεις με εξάνιο, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο βινυλ-εστέρας που δεν αντέδρασε. Τα διηθήματα των εκπλύσεων εξατμίζονται υπό κενό, έτσι ώστε να ανιχνευθεί η οποιαδήποτε ποσότητα στερεού κυτταρινούχου προϊόντος που θα μπορούσε να έχει διαλυθεί στους συγκεκριμένους οργανικούς διαλύτες. Τελικά, το κυτταρινούχο υλικό που έχει συλλεχθεί, τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 40 °C ώστε να ξηρανθεί.

7.5.3.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος από τις ελεύθερες διαλυτών αντιδράσεις

Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης, το κάθε δείγμα φυγοκεντρείται και διαχωρίζεται το υπερκείμενο υγρό από το εναπομείναν στερεό υπόλειμμα (κυτταρινούχο υλικό). Το τελευταίο υφίσταται αρχικά δυο εκπλύσεις με μεθανόλη και έπειτα δυο εκπλύσεις με εξάνιο, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο βινυλ-εστέρας που δεν αντέδρασε. Τα διηθήματα των εκπλύσεων εξατμίζονται υπό κενό, έτσι ώστε να ανιχνευθεί η οποιαδήποτε ποσότητα στερεού κυτταρινούχου προϊόντος που θα μπορούσε να έχει διαλυθεί στη φάση των

οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Τέλος, όλο το κυτταρινούχο υλικό τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 40 °C ώστε να ξηρανθεί.

7.5.4 Ποιοτική ανάλυση του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR)

7.5.4.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση της δομής διαφόρων ουσιών. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει την ακτινοβολήση ενός δείγματος με υπέρυθρη ακτινοβολία και την ανίχνευση των μηκών κύματος (ή των κυματαριθμών) της ακτινοβολίας στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος που απορροφώνται από το δείγμα. Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση οφείλεται σε δονήσεις χημικών ομάδων καθώς και σε εκτάσεις ή κάμψεις των δεσμών που υπάρχουν σε αυτές. Η κύρια περιοχή του φάσματος που παρουσιάζει ενδιαφέρον για αναλυτικούς σκοπούς είναι αυτή με κυματαριθμούς από 4000-400 cm^{-1} , καθώς εκεί παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων, λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας. Στην παρούσα μελέτη, η συγκεκριμένη περιοχή που μας ενδιαφέρει είναι αυτή μεταξύ των κυματαριθμών 1760-1730 cm^{-1} , διότι εκεί εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του καρβονυλίου των εστερικών δεσμών.

7.5.4.2 Πειραματική διαδικασία

Για τον έλεγχο της ύπαρξης εστερικού δεσμού στα καθαρισμένα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων, εφαρμόσθηκε η φασματοσκοπία υπέρυθρου FTIR. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο MAGNA-IR 560, της εταιρείας Nicolet. Για το κάθε κυτταρινούχο δείγμα σχηματίζεται μείγμα του σε KBr, με περιεκτικότητα 2% (w/w), το οποίο και ομογενοποιείται. Στη συνέχεια, ποσότητα του μείγματος ίση με 100 mg τοποθετείται σε υδραυλική πρέσα ώστε να σχηματιστεί ένα δισκίο. Το δισκίο αυτό εισάγεται στον κατάλληλο δειγματοφορέα του FTIR και υποβάλλεται σε μέτρηση. Τα φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή από 4000-400 cm^{-1} ως ο μέσος όρος 100 σαρώσεων σε ανάλυση 4 cm^{-1} . Κάθε δείγμα αναλύεται εις τριπλούν.

7.5.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα

Ο προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα επί της εστεροποιημένης κυτταρίνης, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου σαπωνοποίησης. Σε 4 mL αιθανόλης τοποθετούνται περίπου 0.1 g εστεροποιημένης κυτταρίνης και θερμαίνονται στους 55 °C για 30 min. Στη συνέχεια προστίθενται 2.5 mL διαλύματος NaOH 0.5 N. Το μείγμα αρχικά θερμαίνεται και έπειτα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 72 h. Η περίσσεια του NaOH υπολογίζεται μέσω τιτλοδότησης με διάλυμα HCl 0.5 N, χρησιμοποιώντας φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη. Ύστερα προστίθεται επιπλέον 1 mL διαλύματος HCl 0.5 N και το μείγμα αφήνεται ξανά για 12 h, όπου τότε ξανατιτλοδοτείται με διάλυμα NaOH 0.5 N. Το

% ποσοστό του εστέρα προσδιορίζεται σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση (Tanghe et al., 1963):

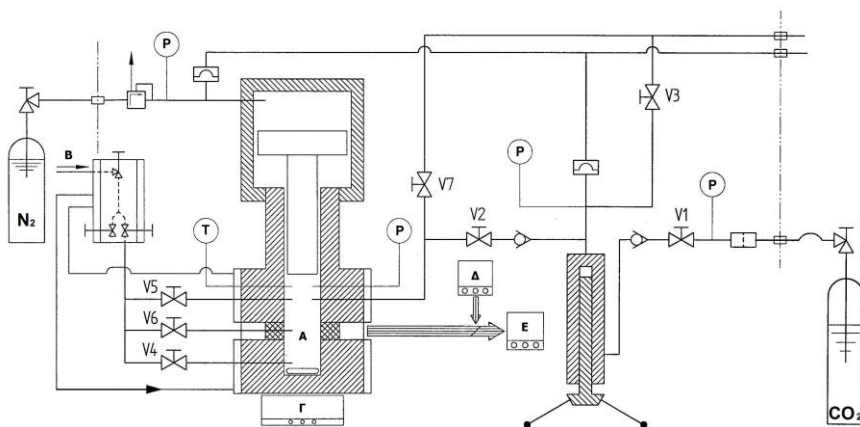
$$\text{ποσοστό εστέρα \%} = [(A-B) \cdot N_B - (C-D) \cdot N_A] \cdot M / (10 \cdot W) \quad \text{εξίσωση 7.4}$$

A και B είναι αντίστοιχα οι όγκοι των διαλυμάτων του NaOH (mL) που προστίθενται στο δείγμα και στο σύστημα αναφοράς αντίστοιχα. N_B είναι η κανονικότητα (N) του διαλύματος NaOH που χρησιμοποιείται. C και D είναι αντίστοιχα οι όγκοι των διαλυμάτων HCl (mL) που προστίθενται στο δείγμα και στο σύστημα αναφοράς αντίστοιχα. N_A είναι η κανονικότητα (N) του διαλύματος HCl που χρησιμοποιείται. M είναι το μοριακό βάρος του ανιόντος του καρβοξυλικού εστέρα. W είναι η ακριβής μάζα (g) του κυτταρινούχου δείγματος. Το % ποσοστό του εστέρα εκφράζει το ποσοστό μάζας του ανιόντος της ακυλομάδας ως προς τη συνολική μάζα της εστεροποιημένης κυτταρίνης.

7.6 Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($scCO_2$)

7.6.1 Αντιδραστήρας $scCO_2$

Για την επεξεργασία και τη χημική εστεροποίηση της κυτταρίνης σε περιβάλλον $scCO_2$, χρησιμοποιήθηκε ειδικός αντιδραστήρας διαλείποντος έργου, σχεδιασμένος και κατασκευασμένος από την εταιρεία SITEC-Sieber Engineering AG (CH-8124, Maur/Zurich, Switzerland) (σχήμα 7.1).



Σχήμα 7.1 Διάγραμμα ροής του συστήματος διαλείποντος έργου του αντιδραστήρα υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($scCO_2$), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. A: κελί αντιδραστήρα, B: βαλβίδα εκτόνωσης, Γ: μαγνητικός αναδευτήρας, Δ: πηγή φωτός, E: οθόνη μικροκάμερας.

Το θερμοστατούμενο κελί του αντιδραστήρα έχει όγκο 50mL και οι μέγιστες τιμές θερμοκρασίας και πίεσης λειτουργίας του είναι 120 °C και 50 MPa

αντίστοιχα. Το κελί του αντιδραστήρα είναι επίσης εφοδιασμένο με δυο παράθυρα, κατασκευασμένα από ζαφείρι, τα οποία επιτρέπουν αφενός τον απευθείας οπτικό έλεγχο του εσωτερικού του αντιδραστήρα και αφετέρου την παρατήρηση και καταγραφή του με μικροκάμερα. Ακόμα, στο εσωτερικό του κελιού υπάρχουν αισθητήρες πίεσης και θερμοκρασίας και παρέχεται η δυνατότητα ανάδευσης με μαγνητικό αναδευτήρα. Για την επίτευξη της επιθυμητής πίεσης, το CO₂ συμπιέζεται με μία χειροκίνητη αντλία και στη συνέχεια εισέρχεται στο εσωτερικό του αντιδραστήρα (σχήμα 7.1). Οι υπερκρίσιμες συνθήκες μπορούν να πάψουν με εκτόνωση του CO₂, μέσω της ανάλογης βαλβίδας.

7.6.2 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης σε περιβάλλον scCO₂

Στο κελί του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου που περιγράφηκε παραπάνω και το οποίο έχει όγκο 50 mL, προστίθενται 100-200 mg ινώδους κυτταρίνης. Ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλου όγκου του εκάστοτε ακυλο-δότη (vinyl propionate, vinyl laurate, vinyl stearate), έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση στο σύστημα να είναι από 0.1 έως 1 M. Στο τέλος προστίθενται 0.1 U ενζύμου/mg κυτταρίνης*. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*.

Στη συνέχεια το κελί του αντιδραστήρα κλείνεται με ειδική κεφαλή. Για να απομακρυνθεί ο εγκλωβισμένος στο κελί αέρας, εισάγεται σε αυτό αέριο CO₂ και στη συνέχεια απομακρύνεται με τη βοήθεια ειδικών βαλβίδων, συμπαρασύροντας τον αέρα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πέντε φορές. Έπειτα εισάγεται στο κελί συμπιεσμένο CO₂ μέχρις ότου η πίεση φτάσει στα επιθυμητά επίπεδα. Παράλληλα, με τη βοήθεια θερμαινόμενης πλάκας και εξωτερικού υδατόλουτρου, ρυθμίζεται και διατηρείται η θερμοκρασία στο εσωτερικό του κελιού. Οι τιμές πίεσης που αναπτύχθηκαν ήταν από 16 έως 20 MPa και η θερμοκρασία της αντίδρασης ήταν 40 ή 50 °C. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό έντονη ανάδευση αλλά και απουσία αυτής. Η κάθε αντίδραση διαρκεί 9 h και ο τερματισμός της επιτυγχάνεται με εκτόνωση του υπερκρίσιμου ρευστού και παραλαβή του υπολείμματος. Για κάθε συνθήκη αντίδρασης, εκτελέστηκαν και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου απουσία ενζύμου.

Εξαιτίας της στερεάς φύσης του κυτταρινούχου υλικού και εξαιτίας της κατασκευής του αντιδραστήρα, δεν είναι εφικτή η δειγματοληψία κατά τη διάρκεια της κάθε αντίδρασης. Επομένως, για να παρατηρηθεί η εξέλιξη μίας αντίδρασης με το χρόνο, προετοιμάζεται και εκτελείται η ίδια αντίδραση τόσες φορές όσες και οι επιθυμητές δειγματοληψίες. Φυσικά η διάρκεια διαφέρει από τη μία αντίδραση στην άλλη, φτάνοντας τις 9 h.

* Η τυπική συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιείται σε όλες τις αντιδράσεις είναι 0.1 U/mg κυτταρίνης. Μόνο στις περιπτώσεις που σχηματίστηκε προϊόν, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω αντιδράσεις με συγκέντρωση βιοκαταλύτη 0.3 U/mg κυτταρίνης.

7.6.3 Απομόνωση και καθαρισμός του προϊόντος

Μετά τον τερματισμό κάθε αντίδρασης, το υλικό που παραμένει στο κελί του αντιδραστήρα συλλέγεται και φυγοκεντρείται. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το στερεό υπόλειμμα εκπλένεται με μεθανόλη και εξάνιο ώστε να απομακρυνθεί ο βινυλ-εστέρας που δεν αντέδρασε. Τα υγρά έκπλυσης συλλέγονται και εξατμίζονται υπό κενό για να διαπιστωθεί αν υπάρχει στερεό προϊόν που μπορεί να είχε διαλυθεί στους οργανικούς διαλύτες. Επίσης, θα πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη διαδικασία εκτόνωσης του CO₂, στην αντίστοιχη έξοδο τοποθετείται δοχείο για να συλλεχθεί προϊόν που πιθανόν να έχει σχηματιστεί και συμπαρασυρθεί από το CO₂. Στο τέλος των καθαρισμών του κυτταρινούχου υλικού, το τελευταίο συλλέγεται και τοποθετείται σε φούρνο θερμοκρασίας 40 °C ώστε να ξηρανθεί.

7.6.4 Ποιοτική ανάλυση του προϊόντος μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR)

Για τον έλεγχο της ύπαρξης εστερικού δεσμού στα καθαρισμένα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων, εφαρμόστηκε η φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR. Το φασματοφωτόμετρο που χρησιμοποιήθηκε είναι το μοντέλο MAGNA-IR 560, της εταιρείας Nicolet. Για το κάθε κυτταρινούχο δείγμα σχηματίζεται μείγμα του σε KBr, με περιεκτικότητα 2% (w/w), το οποίο και ομογενοποιείται. Στη συνέχεια, ποσότητα του μείγματος ίση με 100 mg τοποθετείται σε υδραυλική πρέσα ώστε να σχηματιστεί ένα δισκίο. Το δισκίο αυτό εισάγεται στον κατάλληλο δειγματοφορέα του FTIR και υποβάλλεται σε μέτρηση. Τα φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή από 4000-400 cm⁻¹ ως ο μέσος όρος 100 σαρώσεων σε ανάλυση 4 cm⁻¹. Κάθε δείγμα αναλύεται εις τριπλούν.

7.6.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα

Ο προσδιορισμός του % ποσοστού του εστέρα επί της εστεροποιημένης κυτταρίνης, πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου σαπωνοποίησης. Σε 4 mL αιθανόλης τοποθετούνται περίπου 0.1 g εστεροποιημένης κυτταρίνης και θερμαίνονται στους 55 °C για 30 min. Στη συνέχεια προστίθενται 2.5 mL διαλύματος NaOH 0.5 N. Το μείγμα αρχικά θερμαίνεται και έπειτα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 72 h. Η περίσσεια του NaOH υπολογίζεται μέσω τιτλοδότησης με διάλυμα HCl 0.5 N, χρησιμοποιώντας φαινολοφθαλεΐνη ως δείκτη. Ύστερα προστίθεται επιπλέον 1 mL διαλύματος HCl 0.5 N και το μείγμα αφήνεται ξανά για 12 h, όπου τότε ξανατιτλοδοτείται με διάλυμα NaOH 0.5 N. Το % ποσοστό του εστέρα προσδιορίζεται σύμφωνα με την **εξίσωση 7.4** που παρουσιάστηκε σε προηγούμενη παράγραφο (7.5.5). Το % ποσοστό του εστέρα εκφράζει το ποσοστό μάζας του ανιόντος της ακυλο-ομάδας ως προς τη συνολική μάζα της εστεροποιημένης κυτταρίνης.

7.7 Υπολογισμός του μέτρου ελαστικότητας (Young's modulus) των εστέρων κυτταρίνης

7.7.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Το μέτρο ελαστικότητας Young (E) είναι ένα μέγεθος χαρακτηριστικό της δυσκαμψίας ή σκληρότητας του υλικού στο οποίο αναφέρεται. Μαθηματικά ορίζεται ως το πηλίκο της μονοαξονικής τάσης (σ) που εφαρμόζεται εφελκυστικά ή θλιπτικά στο υλικό, προς την αντίστοιχη μονοαξονική παραμόρφωση (ϵ) που αυτό αποκτά (**εξίσωση 7.5**). Πειραματικά, το μέτρο ελαστικότητας Young υπολογίζεται από την εφαπτομένης της ευθείας γραμμής που προκύπτει από το διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης. Η τάση που εφαρμόζεται ορίζεται από την ορθή δύναμη που ασκείται στην επιφάνεια του εξεταζόμενου υλικού, προς την επιφάνεια του τελευταίου. Εκφράζεται λοιπόν σε μονάδες πίεσης. Η δε παραμόρφωση είναι ουσιαστικά ανηγμένο μέγεθος καθώς ισούται με το λόγο της πραγματικής μονοαξονικής παραμόρφωσης του υλικού προς το αρχικό του πάχος. Πρόκειται δηλαδή για ένα αδιάστατο μέγεθος. Συνεπώς το μέτρο ελαστικότητας Young έχει μονάδες πίεσης.

$$E = \sigma / \epsilon$$

εξίσωση 7.5

σ είναι η τάση που ασκείται στο υλικό και ϵ είναι η ανηγμένη παραμόρφωση που αυτό υφίσταται.

Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, το μέτρο ελαστικότητας Young αναφέρεται στην αλλαγή της διάστασης ενός ισότροπου υλικού που βρίσκεται υπό την επίδραση εφελκυστικών ή θλιπτικών φορτίων. Έτσι προβλέπεται το πόσο εύκολα εκτείνεται το υλικό υπό συνθήκες εφελκισμού ή πόσο εύκολα συρρικνώνεται λόγω θλίψης. Πιο πρακτικά, όσο μεγαλύτερη τιμή έχει το μέτρο ελαστικότητας Young ενός υλικού, τόσο πιο σκληρό ή δύσκαμπτο είναι. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως ο χάλυβας (S 220) έχει μέτρο ελαστικότητας Young ίσο με 200 GPa, το καθαρό αλουμίνιο 70 GPa, το ξύλο οξιάς 10 GPa και το πολυπροπυλένιο 1.5 GPa.

7.7.2 Πειραματική διαδικασία

Για τον πειραματικό υπολογισμό του μέτρου ελαστικότητας των αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκε ειδική πρέσα θλίψης (BOSE electroforce, 3100), ονομαστικού φορτίου 22 N. Το ελεύθερο άκρο της μετατοπίζεται +/- 2 mm. Το ειδικό εξάρτημα με το οποίο γίνεται η θλιπτική δοκιμή (loadcell, Honeywell) είναι ονομαστικού φορτίου 250 g. Το προς εξέταση υλικό, γνωστού πάχους, τοποθετείται στο δειγματοφορέα και στη συνέχεια με ειδική ακίδα υπόκειται σε αυξανόμενα θλιπτικά φορτία. Παράλληλα υπολογίζεται και καταγράφεται η παραμόρφωση που υφίσταται το μελετώμενο υλικό. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν (τάση-παραμόρφωση), υπολογίζεται το αντίστοιχο μέτρο ελαστικότητας Young.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί πως ο εστέρας κυτταρίνης που παράγεται είναι σε μορφή σκόνης· συνεπώς δεν μπορεί να εξεταστεί το μέτρο ελαστικότητας του. Για να γίνει αυτό θα πρέπει πρώτα να θερμομορφωθεί ως συμπαγές στερεό υλικό με συγκεκριμένες διαστάσεις. Για το λόγο αυτό κατάλληλη ποσότητα του κυτταρινούχου εστέρα τοποθετείται σε ειδικό δοκίμιο και στη συνέχεια υποβάλλεται σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας (150-200 °C), υπό πίεση. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε ειδική θερμαινόμενη πρέσα (PDC-96) και διαρκεί 5 min. Στη συνέχεια το δοκίμιο ψύχεται μέχρι τους 25-30 °C και παραλαμβάνεται το σχηματισμένο υλικό.

Αποτελέσματα και Σχόλια

8. Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης που έχει υποστεί προκατεργασία σε ιοντικά υγρά

8.1 Προκατεργασία κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά

Ο στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ενζυμική εστεροποίηση της κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες. Τα κυτταρινούχα υποστρώματα που έχουν επιλεγεί για μελέτη είναι η κυτταρίνη Avicel και η ινώδης κυτταρίνη (παράγραφος 6.2). Η κυτταρίνη Avicel είναι ουσιαστικά μικροκρυσταλλική κυτταρίνη· δηλαδή φυσική κυτταρίνη που έχει υποστεί ετερογενή χημική υδρόλυση ώστε να μειωθεί ο μέσος βαθμός πολυμερισμού της. Πρόκειται λοιπόν για ένα προϊόν υποβιβασμού του μεγέθους της κυτταρινούχου ίνας, το οποίο βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Η ινώδης κυτταρίνη προέρχεται και αυτή από υποβιβασμό του μεγέθους κυτταρινούχου ίνας που έχει όμως επεξεργαστεί κάτω από ηπιότερες συνθήκες σε σχέση με την περίπτωση της Avicel. Σαν αποτέλεσμα προκύπτει κυτταρίνη με ινώδη μορφή και μέσο βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο από αυτόν της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης. Επίσης ο βαθμός κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης είναι σχετικά μεγαλύτερος από αυτόν της μικροκρυσταλλικής. Συνεπώς η ινώδης κυτταρίνη προσιδιάζει περισσότερο στην φυσική κυτταρίνη. Θα πρέπει να σημειωθεί πως και στα δυο αυτά είδη κυτταρίνης, το μεγαλύτερο ποσοστό τους είναι α-κυτταρίνη.

Το κύριο δομικό χαρακτηριστικό της κυτταρίνης είναι το εκτενές δίκτυο δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσεται καθ' όλο το μήκος των αλυσίδων της. Ως αποτέλεσμα, τα υδροξύλια του πολυσακχαρίτη δεν είναι εύκολα προσπελάσιμα σε μοριακό επίπεδο και συνεπώς δεν εμφανίζουν σχεδόν καμία χημική δραστηριότητα. Το φαινόμενο αυτό εκφράζεται και από τον υψηλό δείκτη κρυσταλλικότητας που συνήθως ξεπερνά το 90%. Τα παραπάνω δεδομένα εξηγούν το αρνητικό αποτέλεσμα ορισμένων πειραματικών προσπαθειών για την ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης με λιπαρά οξέα (Sereti et al., 2001). Πιο συγκεκριμένα, αποπειράθηκε η εστεροποίηση ακατέργαστης κυτταρίνης με λιπαρά οξέα, σε διάφορους οργανικούς διαλύτες - πολικούς και μη - και με διάφορες λιπάσες και πρωτεάσες ως βιοκαταλύτες, χωρίς όμως να σχηματιστεί τελικά ο επιθυμητός εστέρας. Καθίσταται λοιπόν σαφές το ότι η προκατεργασία της κυτταρίνης με σκοπό την αύξηση της προσπελασιμότητας των υδροξυλίων της, είναι ουσιαστική για την περαιτέρω ενζυμική εστεροποίηση της με αλειφατικές αλυσίδες μεγάλου κυρίως μήκους ($C>6$).

Με βάση σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα, η κυτταρίνη μπορεί να υποστεί επεξεργασία σε συγκεκριμένα ιοντικά υγρά (παράγραφος 4.4) που τροποποιούν τη δομή της και τη διαλύουν (Cuissinat et al., 2008; Dadi et al., 2006). Στη συνέχεια, με ανάκτηση του κυτταρινούχου υλικού, προκύπτει προϊόν με αυξημένη προσπελασιμότητα των υδροξυλίων και με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Από την παραπάνω κατηγορία ιοντικών υγρών επιλέχθηκαν για μελέτη τα [bmim]Cl και [emim]OAc. Η επιλογή αυτή έγινε διότι τα συγκεκριμένα ιοντικά υγρά αναφέρεται πως έχουν την υψηλότερη διαλυτική ικανότητα ως προς την κυτταρίνη, σε σχέση με τα υπόλοιπα της ίδιας κατηγορίας (Cuissinat et al., 2008; Dadi et al., 2006; Granstrom et al., 2008; Swatloski et al.,

2002a). Επίσης πρόκειται για δύο ιοντικά υγρά με εντελώς διαφορετικής σύστασης ανιόντα. Στη μία περίπτωση έχουμε το ανιόν χλωρίου και στην άλλη το οργανικό οξικό ανιόν· συνεπώς καλύπτονται δυο ξεχωριστές περυπτώσεις. Τέλος, τα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc χαρακτηρίζονται από υψηλή εμπορική διαθεσιμότητα.

8.1.1 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl

Το ιοντικό υγρό [bmim]Cl έχει την ικανότητα να διαλύει τη φυσική κυτταρίνη σε τιμές περιεκτικότητας έως και 10% (w/w) (Dadi et al., 2006; Granstrom et al., 2008; Swatloski et al., 2002a). Παρασκευάστηκαν λοιπόν μείγματα κυτταρίνης Avicel και ινώδους κυτταρίνης σε [bmim]Cl, με περιεκτικότητα 2, 5 και 10% (w/w). Καθένα από αυτά τα μείγματα επωάστηκε στους 120 °C για χρονική διάρκεια ίση με 15, 30 και 40 min. Με το πέρας της θερμικής κατεργασίας, το κυτταρινούχο προϊόν καταβυθίζεται και στη συνέχεια καθαρίζεται και ξηραίνεται υπό ήπιες συνθήκες (παράγραφος 7.3.1.1). Η κυτταρίνη που προκύπτει αναφέρεται ως αναγεννημένη (regenerated cellulose). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός της πλήρους διάλυσης της κυτταρίνης σε λιγότερο από 5 min, σε όλες τις παραπάνω συνθήκες κατεργασίας των μειγμάτων που παρασκευάστηκαν. Επίσης, το τελικό ξηρό προϊόν στην περίπτωση της κυτταρίνης Avicel έχει μακροσκοπική υφή μεταξύ κόκκου και ίνας, ενώ στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης η μακροσκοπική υφή παραμένει σχεδόν αναλλοίωτη.

Η περιεκτικότητα της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl έως το όριο διαλυτότητας της, καθώς και η χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας, επιλέχθηκαν ως βασικές παράμετροι για τη μελέτη της επίδρασης τους στα χαρακτηριστικά του προκύπτοντος υλικού. Γενικότερα, στη σχετική βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως οι παράγοντες αυτοί δύνανται να επηρεάσουν τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της αναγεννημένης κυτταρίνης (Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006). Από την άλλη πλευρά, για τα συγκεκριμένα κυτταρινούχα υποστρώματα που μας ενδιαφέρουν (κυτταρίνη Avicel και ινώδης κυτταρίνη), δεν υπάρχουν αναλυτικές μελέτες που να παρουσιάζουν τις ακριβείς μεταβολές που υφίστανται ορισμένες ιδιότητες του αναγεννημένου πολυσακχαρίτη, λόγω των διαφορετικών συνθηκών κατεργασίας στα ιοντικά υγρά. Οι ιδιότητες αυτές, οι οποίες εξετάζονται στη συνέχεια, είναι ο βαθμός πολυμερισμού, ο δείκτης κρυσταλλικότητας και η μορφολογία της αναγεννημένης κυτταρίνης. Τα χαρακτηριστικά αυτά κρίνονται ουσιαστικής σημασίας για την ποιότητα του τελικού προϊόντος, το οποίο θα αποτελέσει στη συνέχεια το εν δυνάμει υπόστρωμα για την επιθυμητή ενζυμική ακυλίωση. Όσον αφορά στη θερμοκρασία κατεργασίας, αυτή διατηρείται σταθερή και ίση με 120 °C, καθώς με βάση το σύνολο της σχετικής βιβλιογραφίας είναι η ενδεδειγμένη (Dadi et al., 2006; Wu et al., 2004; Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006). Η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι αρκούντως υψηλή για να διαλυθεί η κυτταρίνη και να τροποποιηθεί κατάλληλα η μικροδομή της, αλλά είναι και σχετικά χαμηλή ώστε να μην υπάρξουν χημικές αλλοιώσεις τόσο στην κυτταρίνη όσο και στο ιοντικό υγρό.

8.1.1.1 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στον βαθμό πολυμερισμού του αναγεννημένου προϊόντος

Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά πως στην περίπτωση της αναγεννημένης κυτταρίνης από ιοντικά υγρά, οι συνθήκες κατεργασίας επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος (Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006). Το γεγονός αυτό είναι εύλογο διότι το έντονα δραστικό και πυρηνόφιλο ανιόν που έχουν τα συγκεκριμένα ιοντικά υγρά ([bmim]Cl, [amim]OAc κλπ), μπορεί θεωρητικά να αλληλεπιδράσει και με τους γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ των μονομερών της κυτταρίνης. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν αναφορές για το ότι συνήθως δεν μεταβάλλεται ο μέσος βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης που αναγεννάται από τα σχετικά ιοντικά υγρά (Dadi et al., 2006; Zhu et al., 2006). Έτσι έγιναν μετρήσεις του μέσου βαθμού πολυμερισμού των κυτταρινών που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή, πριν και μετά την προκατεργασία τους στο [bmim]Cl, υπό διάφορες συνθήκες συγκέντρωσης κυτταρίνης και χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας στο ιοντικό υγρό. Ο βαθμός πολυμερισμού αναφέρεται στο μέγεθος του μεγαλομορίου και η διατήρηση του είναι προφανώς σημαντική, καθώς έτσι εξασφαλίζεται η μη υποβάθμιση του προϊόντος.

Ο αρχικός βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης Avicel είναι 225. Το προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία (120 °C) στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl για περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15, 30 και 40 min, έχει σχεδόν τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού με την αρχική κυτταρίνη. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τις κατεργασίες μειγμάτων κυτταρίνης με περιεκτικότητα 5 και 10% (πίνακας 8.1).

Πίνακας 8.1 Τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης Avicel, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία 120 °C.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	DP
2	15	224
	30	225
	40	225
5	15	223
	30	225
	40	224
10	15	225
	30	225
	40	224

Φαίνεται λοιπόν πως η διάλυση της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl και η παράλληλη θερμική κατεργασία της σε αυτό, δεν επηρεάζουν το βαθμό πολυμερισμού του πολυσακχαρίτη στις παραπάνω συνθήκες που μελετήθηκαν. Η διαπίστωση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η προκατεργασία στο ιοντικό υγρό γίνεται με αποκλειστικό σκοπό την αλλαγή της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης. Τυχόν προϊόν με μειωμένο βαθμό

πολυμερισμού θα αλλοίωνε το μέσο μέγεθος του κυτταρινούχου υποστρώματος, γεγονός που δεν είναι επιθυμητό εφόσον απώτερος σκοπός της εργασίας είναι η εστεροποίηση του ακέραιου πολυσακχαρίτη.

Όσον αφορά στην ινώδη κυτταρίνη, ο αρχικός βαθμός πολυμερισμού της είναι 730. Το κυτταρινούχο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$) στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl για περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15, 30 και 40 min, έχει σχεδόν τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού με την αρχική κυτταρίνη. Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα που αφορούν στην κατεργασία των μειγμάτων κυτταρίνης με τιμές περιεκτικότητας 5 και 10% (πίνακας 8.2).

Πίνακας 8.2 Τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού της ινώδους κυτταρίνης, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία $120\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	DP
2	15	730
	30	728
	40	730
5	15	728
	30	728
	40	729
10	15	729
	30	730
	40	730

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα, φαίνεται πως και στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης η διάλυση της στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl και η παράλληλη θερμική κατεργασία της σε αυτό, δεν επηρεάζουν το βαθμό πολυμερισμού της. Φυσικά, το γεγονός αυτό εξακολουθεί να είναι μεγάλης σημαντικότητας διότι και για την ινώδη κυτταρίνη η ενδεχόμενη μείωση του μεγέθους του μορίου της θα αλλοίωνε τα αρχικά δεδομένα του σχεδιασμού των περαιτέρω πειραμάτων.

Συνοψίζοντας, η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, στις συνθήκες χρονικής διάρκειας και περιεκτικότητας του πολυσακχαρίτη που μελετήθηκαν, δεν φάνηκε να επηρεάζει το μέγεθος του μακρομορίου. Μάλιστα, η παρατήρηση αυτή ισχύει για δυο διαφορετικά είδη κυτταρίνης, με εντελώς διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού. Επομένως η συγκεκριμένη θερμική κατεργασία δεν υποβιβάζει το μέγεθος της κυτταρίνης είτε αυτή είναι κοκκώδης, είτε είναι ινώδης. Επίσης αυτό ισχύει χωρίς κάποια προϋπόθεση για τον αρχικό βαθμό πολυμερισμού, όταν αυτός κυμαίνεται στο διάστημα 225-730.

8.1.1.2 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στο δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος

Ο κύριος λόγος για τον οποίο πραγματοποιήθηκε η θερμική προκατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, είναι η αποδιάταξη της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης, με απώτερο σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας των υδροξυλίων της σε μοριακό επίπεδο. Από τη στιγμή που η κυτταρίνη διαλύεται στο [bmim]Cl, το εκτενές δίκτυο δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις αλυσίδες της καταστρέφεται και έτσι τα περισσότερα υδροξύλια είναι χημικώς προσβάσιμα. Το ερώτημα όμως είναι τι συμβαίνει με την κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης, όταν αυτή αναγεννάται από το προαναφερόμενο περιβάλλον. Για το λόγο αυτό, με τη βοήθεια της περίθλασης ακτίνων Χ, μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψαν μετά από τη θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Το μέγεθος αυτό είναι χαρακτηριστικό της μικροδομής της κυτταρίνης.

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μετρήθηκε με περιθλασίμετρο ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3) και βρέθηκε ίσος με 85.6%. Όταν όμως μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας των αναγεννημένων κυτταρινών, προϊόντων της θερμικής κατεργασίας της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, η τιμή του ήταν αισθητά μειωμένη για όλες τις συνθήκες προκατεργασίας. Αναλυτικότερα, το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 46.6%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 45.2 και 44.8% αντίστοιχα. Παρατηρείται δηλαδή μία σημαντική μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel μετά την προκατεργασία της στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl· μία μείωση της τάξης του 50%. Μάλιστα με αύξηση του χρόνου της θερμικής κατεργασίας στο ιοντικό υγρό, ο δείκτης κρυσταλλικότητας εξακολουθεί να μειώνεται με μικρότερο όμως ρυθμό. Επίσης αποδεικνύεται πως ο χρόνος κατεργασίας παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη μικροδομή της αναγεννημένης κυτταρίνης. Με αύξηση του χρόνου κατεργασίας, μειώνεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Ανάλογα με τη χρονική διάρκεια μπορεί να παραληφθεί κυτταρίνη με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας έως πρακτικά άμορφη κυτταρίνη. Για την τελευταία βέβαια περίπτωση απαιτείται χρόνος κατεργασίας ορισμένων ημερών (Zhu et al., 2006). Πολύ σημαντικός είναι επίσης και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η καταβύθιση του πολυσακχαρίτη με το πέρας της θερμικής κατεργασίας. Η προσθήκη κατάλληλου όγκου θερμού απιονισμένου νερού πρέπει να γίνεται άμεσα ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα ανακρυστάλλωσης της κυτταρίνης (Swatloski et al., 2002a; Zhu et al., 2006).

Παρόμοια συμπεριφορά επιδεικνύεται και στα αναγεννημένα κυτταρινούχα προϊόντα που προέρχονται από τα μείγματα κυτταρίνης-[bmim]Cl με τιμές περιεκτικότητας 5 και 10% (πίνακας 8.3). Έτσι το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 5% και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 46.4%. Για χρόνους κατεργασίας 30 και 40 min, ο

δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 45.3 και 45.0% αντίστοιχα.

Πίνακας 8.3 Τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία 120 °C. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6%.

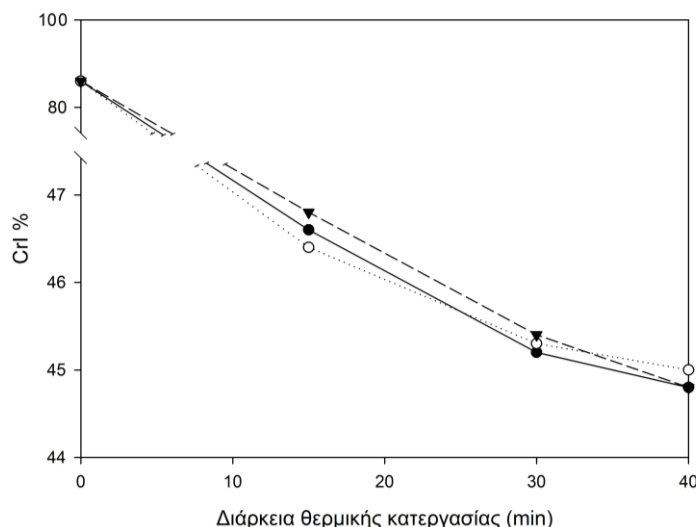
Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	CrI %
2	15	46.6
	30	45.2
	40	44.8
5	15	46.4
	30	45.3
	40	45.0
10	15	46.8
	30	45.4
	40	44.8

Τέλος το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 10% και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 46.8%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 45.4 και 44.8% αντίστοιχα.

Η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, καθώς και η επακόλουθη αναγέννηση της από αυτό, οδηγεί στο σχηματισμό κυτταρίνης με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Για χρόνους κατεργασίας από 15 έως 40 min, ο βαθμός κρυσταλλικότητας μειώνεται κατά 50% περίπου. Μάλιστα με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας πέραν των 15 min, μειώνεται περαιτέρω ο δείκτης κρυσταλλικότητας. Πιο πρακτική για την περίπτωση αυτή είναι η απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης ως συνάρτηση της χρονικής διάρκειας της αντίστοιχης κατεργασίας (**σχήμα 8.1**). Συγκεκριμένα ο δείκτης κρυσταλλικότητας μετά από θερμική κατεργασία διάρκειας 15 min φθίνει σημαντικά σε σχέση με αυτόν της ακατέργαστης κυτταρίνης. Με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στα 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης μειώνεται και άλλο με ελαττωμένο όμως ρυθμό. Η συμπεριφορά αυτή δηλώνει πως η κυτταρίνη, από τη στιγμή που θα διαλυθεί στο [bmim]Cl, στους 120°C και στη συνέχεια θα αναγεννηθεί μέσω καταβύθισης με θερμό απιονισμένο νερό, έχει εκ των πραγμάτων διαφορετική μικροδομή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας.

Η παραπέρα μείωση του τελευταίου εξαρτάται πλέον από τη χρονική διάρκεια της εν λόγω κατεργασίας. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα είναι πως η περιεκτικότητα της κυτταρίνης Avicel στο αρχικό μείγμα της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, δεν επηρεάζει το δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος, εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της. Για διαφορετικές τιμές

της περιεκτικότητας της και για την ίδια χρονική διάρκεια κατεργασίας, η αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel παρουσιάζει σχεδόν τον ίδιο βαθμό κρυσταλλικότητας. Ενδεικτικά φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ που αφορούν στις παραπάνω μετρήσεις, παρατίθενται στο **παράρτημα Α**.



Σχήμα 8.1 Απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel ως προς τη χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας των αντίστοιχων μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία 120 °C. Η αρχική περιεκτικότητα της κυτταρίνης στα παραπάνω μείγματα είναι 2 (●) , 5 (○) και 10% (▼). Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6%.

Ο μηχανισμός της διάλυσης της κυτταρίνης και της μείωσης του δείκτη κρυσταλλικότητας της στο περιβάλλον του [bmim]Cl, στηρίζεται στα χαρακτηριστικά του ίδιου του ιοντικού υγρού. Η φύση του ιμιδαζολικού κατιόντος και ο ισχυρός ηλεκτρωνητικός χαρακτήρας του ανιόντος χλωρίου μαζί με το μικρό του μέγεθος, συνεισφέρουν στον παραπάνω μηχανισμό. Ειδικότερα, το μικρό μέγεθος ηλεκτρωνητικό ανιόν χλωρίου εισχωρεί ανάμεσα στις αλυσίδες κυτταρίνης και προσβάλλοντας τα ελεύθερα υδροξύλια της, τα αποπρωτονιώνει. Με αυτόν τον τρόπο καταστρέφονται παράλληλα και οι δεσμοί υδρογόνου. Επιπροσθέτως, το ιμιδαζολικό κατιόν με τα π ηλεκτρόνια που διαθέτει, αλληλεπιδρά μη δεσμικά με τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων της κυτταρίνης, εμποδίζοντας τον επανασηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της (Cuissinat et al., 2008; Dadi et al., 2006; Swatloski et al., 2002b). Για να διασφαλιστεί η συγκεκριμένη μικροδομή της κυτταρίνης στο μέγιστο δυνατό βαθμό και μετά την αναγέννηση της, θα πρέπει η τελευταία να γίνει με άμεση και ταχεία καταβύθιση της κυτταρίνης.

Οι παραπάνω διαπιστώσεις είναι πολύ σημαντικές διότι υποδεικνύουν την προκατεργασία της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σαν ένα προκαταρκτικό βήμα με απώτερο σκοπό την ενζυμική της εστεροποίηση. Η χρησιμότητα της προκατεργασίας αυτού του είδους είναι αναμφισβήτητη.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα υδροξύλια της αναγεννημένης κυτταρίνης που παράγεται με αυτό τον τρόπο, έχουν αυξημένη προσβασιμότητα εξαιτίας του μειωμένου βαθμού κρυσταλλικότητας και της αυξημένης εκτιθέμενης επιφάνειας του πολυσακχαρίτη (Dadi et al., 2006; Zhu et al., 2006).

Αναφορικά με την ακατέργαστη ινώδη κυτταρίνη, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της μετρήθηκε με περιθλασίμετρο ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3) και βρέθηκε ίσος με 90.7%. Όταν όμως μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας των αναγεννημένων κυτταρινών, προϊόντων της θερμικής κατεργασίας της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, η τιμή του ήταν σημαντικά ελαττωμένη για όλες τις συνθήκες προκατεργασίας που δοκιμάστηκαν. Αναλυτικότερα, το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 55.4%. Για χρόνους κατεργασίας 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 54.4 και 54.1% αντίστοιχα. Παρατηρείται δηλαδή μία σημαντική μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης μετά την προκατεργασία της στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl· μία μείωση της τάξης του 40%. Μάλιστα με αύξηση του χρόνου της θερμικής κατεργασίας πέραν των 15 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας εξακολουθεί να μειώνεται με αρκετά μικρότερο όμως ρυθμό. Επίσης αποδεικνύεται και πάλι πως ο χρόνος κατεργασίας παίζει ιδιαίτερο ρόλο στη μικροδομή της αναγεννημένης κυτταρίνης. Με αύξηση του χρόνου κατεργασίας, μειώνεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Εξίσου σημαντικός είναι και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η καταβύθιση του πολυσακχαρίτη στο τέλος της θερμικής κατεργασίας. Η προσθήκη κατάλληλου όγκου θερμού απιονισμένου νερού πρέπει να γίνεται άμεσα ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα ανακρυστάλλωσης της κυτταρίνης (Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006).

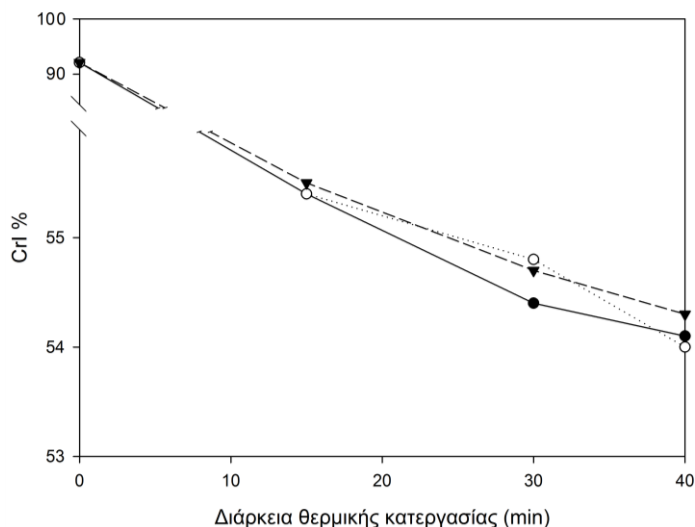
Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα αναγεννημένα κυτταρινούχα προϊόντα που προέρχονται από τα μείγματα ινώδους κυτταρίνης-[bmim]Cl με τιμές περιεκτικότητας 5 και 10% (πίνακας 8.4).

Πίνακας 8.4 Τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία 120 °C. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης είναι 90.1%.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	Crl %
2	15	55.4
	30	54.4
	40	54.1
5	15	55.4
	30	54.8
	40	54.0
10	15	55.5
	30	54.7
	40	54.3

Έτσι το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 5% και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 55.4%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 54.8 και 54.0% αντίστοιχα. Τέλος το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 10% και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 55.5%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 54.7 και 54.3% αντίστοιχα.

Η διάλυση και η θερμική κατεργασία της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, καθώς και η επακόλουθη αναγέννηση της από αυτό, οδηγεί στο σχηματισμό κυτταρίνης με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Για χρόνους κατεργασίας από 15 έως 40 min, ο βαθμός κρυσταλλικότητας μειώνεται κατά 40% περίπου. Μάλιστα με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας πέραν των 15 min, μειώνεται περαιτέρω ο δείκτης κρυσταλλικότητας (σχήμα 8.2).



Σχήμα 8.2 Απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης ως προς τη χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας των αντίστοιχων μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε θερμοκρασία 120 °C. Η αρχική περιεκτικότητα της κυτταρίνης στα παραπάνω μείγματα είναι 2 (●) , 5 (○) και 10% (▼). Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης είναι 90.1%.

Συγκεκριμένα ο δείκτης κρυσταλλικότητας μετά από θερμική κατεργασία διάρκειας 15 min φθίνει σημαντικά σε σχέση με αυτόν της ακατέργαστης κυτταρίνης. Με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στα 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης μειώνεται και άλλο, με φθίνοντα όμως ρυθμό. Η συμπεριφορά αυτή δηλώνει πως η κυτταρίνη, από τη στιγμή που θα διαλυθεί στο [bmim]Cl, στους 120 °C και στη

συνέχεια θα αναγεννηθεί μέσω καταβύθισης με θερμό απιονισμένο νερό, έχει εκ των πραγμάτων διαφορετική μικροδομή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας. Η παραπέρα μείωση του τελευταίου εξαρτάται πλέον από τη χρονική διάρκεια της εν λόγω κατεργασίας. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα είναι πως η περιεκτικότητα της ινώδους κυτταρίνης στο αρχικό μείγμα της με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, δεν επηρεάζει το δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος, εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της. Για διαφορετικές τιμές της περιεκτικότητας της και για την ίδια χρονική διάρκεια κατεργασίας, η αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη παρουσιάζει σχεδόν τον ίδιο βαθμό κρυσταλλικότητας. Ο μηχανισμός διαλυτοποίησης και μείωσης του βαθμού κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, είναι ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω για την κυτταρίνη Avicel. Επίσης, τα φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ που αφορούν ενδεικτικά στις παραπάνω μετρήσεις, παρατίθενται στο **παράρτημα Α**.

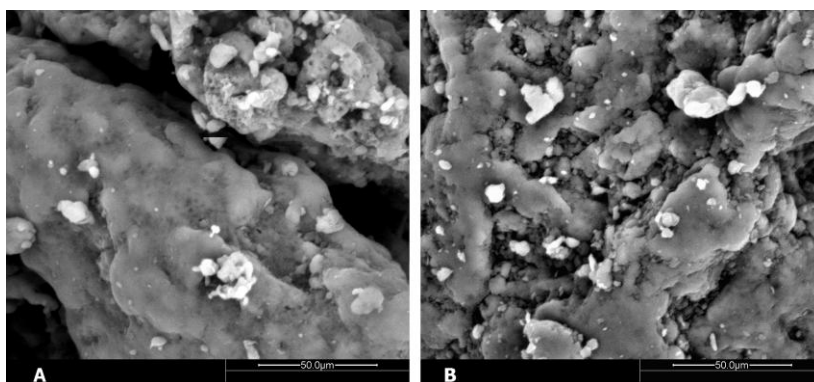
Ξεχωριστό ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά των δυο τύπων κυτταρίνης στην επίδραση της θερμικής κατεργασίας επί του βαθμού κρυσταλλικότητας. Ειδικότερα, με εφαρμογή των προαναφερόμενων συνθηκών κατεργασίας, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel μειώνεται κατά 50% περίπου· το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης για την ινώδη κυτταρίνη φτάνει το 40%. Η μικρή αλλά αξιοσημείωτη αυτή διαφορά, μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φύση των δυο κυτταρινών. Η κυτταρίνη Avicel είναι κοκκώδης, έχει μέσο βαθμό πολυμερισμού 225 και ο αρχικός δείκτης κρυσταλλικότητας της είναι 85.6%. Από την άλλη πλευρά, η ινώδης κυτταρίνη έχει προφανώς ινώδη υφή, μεγαλύτερο μέγεθος (DP=730) και σχετικά υψηλότερη κρυσταλλικότητα (90.7%). Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν δυσκολότερες τις όποιες φυσικοχημικές μεταβολές για την ινώδη κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό είναι λίγο έως πολύ αναμενόμενο, αφού η τελευταία προσεγγίζει περισσότερο το δομικό χαρακτήρα της φυσικής κυτταρίνης που βρίσκεται στα φυτά.

8.1.1.3 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στη μορφολογία του αναγεννημένου προϊόντος

Η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, έχουν σαν συνέπεια την παραγωγή αναγεννημένης κυτταρίνης με τροποποιημένη μικροδομή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αναμένεται να έχει λοιπόν και η εξέταση της μορφολογίας της κυτταρίνης μετά από τη θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό και μάλιστα σε σύγκριση με τη μορφολογία της ακατέργαστης κυτταρίνης.

Για τη διερεύνηση της μορφολογίας της ακατέργαστης κυτταρίνης, αλλά και των αναγεννημένων κυτταρινών που προέκυψαν από την ανάλογη προκατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (παράγραφος 7.4). Στην εικόνα που προκύπτει από τη σάρωση της επιφάνειας της κυτταρίνης Avicel, φαίνεται μία αδρή επιφάνεια με αυλακώσεις και ορισμένα εξογκώματα (**σχήμα 8.3 Α**). Η αντίστοιχη απεικόνιση των επιφανειών των αναγεννημένων κυτταρινών παρουσιάζουν μία διαφορετική μορφολογία. Η αδρότητα της επιφάνειας

αυξήθηκε, οι αυλακώσεις έγιναν μικρότερες σε μέγεθος και περισσότερες σε αριθμό, ενώ και τα εξογκώματα έγιναν λίγο πιο έντονα.

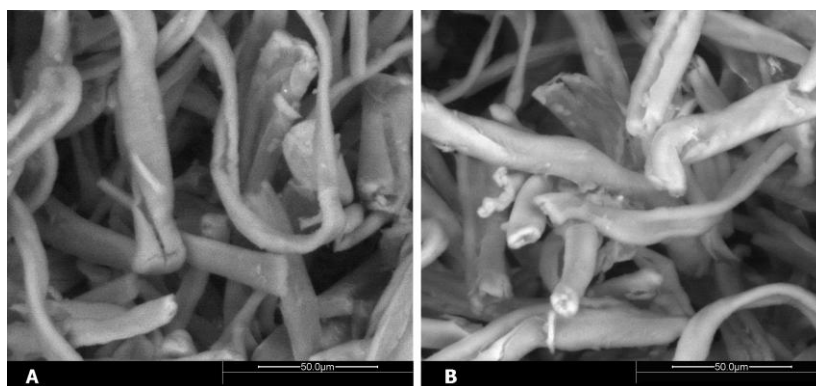


Σχήμα 8.3 Εικόνες SEM της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel (A) και της αντίστοιχης αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl (B).

Μία ιδιαίτερη παρατήρηση αφορά στη μορφολογία της επιφάνειας των αναγεννημένων κυτταρινών που προκύπτουν από τις διάφορες θερμικές κατεργασίες που ακολουθήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία. Με βάση την εκάστοτε απεικόνιση από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μορφολογία της επιφάνειας όλων των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης είναι ακριβώς η ίδια. Στο διάστημα των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, η μορφολογία της αναγεννημένης κυτταρίνης είναι η ίδια ανεξαρτήτως περιεκτικότητας κυτταρίνης Avicel στο μείγμα κυτταρίνη-[bmim]Cl και ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας. Έτσι, παρουσιάζεται ενδεικτικά και αντιπροσωπευτικά η εικόνα που προκύπτει από την ηλεκτρονική σάρωση της επιφάνειας της κυτταρίνης Avicel που αναγεννάται από μείγμα της με το [bmim]Cl (περιεκτικότητα κυτταρίνης 5%, χρονική διάρκεια κατεργασίας 30 min, θερμοκρασία 120 °C) (**σχήμα 8.3 B**).

Παράλληλα εξετάζεται και η μορφολογία της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης και των αντίστοιχων αναγεννημένων κυτταρινών που προκύπτουν από την κατεργασία της στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Καταρχήν η ινώδης κυτταρίνη - ακατέργαστη και μη - έχει εμφανή ινώδη μορφή (**σχήμα 8.4**). Η ακατέργαστη ινώδης κυτταρίνη έχει τις ίνες της σχετικά τακτικά διατεταγμένες και οι τελευταίες έχουν ελαφρώς λεία επιφάνεια (**σχήμα 8.4 A**). Αντιθέτως, οι αντίστοιχες αναγεννημένες κυτταρίνες έχουν ίνες που διατάσσονται στο χώρο πιο άτακτα και επίσης υπάρχουν και ορισμένες ανωμαλίες στην επιφάνεια των ινών. Σε σύγκριση πάντως με τις ανάλογες περιπτώσεις της κυτταρίνης Avicel, η ινώδης κυτταρίνη υφίσταται λιγότερες μεταβολές στη μορφολογία της επιφάνειας της, λόγω της κατεργασίας της στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στον λιγότερο επιρρεπή, σε φυσικοχημικές μεταβολές, χαρακτήρα της ινώδους κυτταρίνης. Υπάρχει όμως και μία σημαντική ομοιότητα της ινώδους κυτταρίνης με την κυτταρίνη Avicel, ως προς τη μορφολογία των αναγεννημένων

μορφών τους. Η μορφολογία της επιφάνειας όλων των δειγμάτων της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης είναι ακριβώς η ίδια.



Σχήμα 8.4 Εικόνες SEM της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης (A) και της αντίστοιχης αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl (B).

Για τις τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν, η μορφολογία της αναγεννημένης κυτταρίνης είναι η ίδια, ανεξαρτήτως περιεκτικότητας της ινώδους κυτταρίνης στο μείγμα κυτταρίνη-[bmim]Cl και ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας. Έτσι, παρουσιάζεται ενδεικτικά και αντιπροσωπευτικά η εικόνα που προκύπτει από την ηλεκτρονική σάρωση της επιφάνειας της ινώδους κυτταρίνης που αναγεννάται από μείγμα της με το [bmim]Cl (περιεκτικότητα κυτταρίνης 5%, χρονική διάρκεια κατεργασίας 30 min, θερμοκρασία 120 °C) (σχήμα 8.4 B).

Συμπερασματικά μπορεί να ειπωθεί πως η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης Avicel και της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, επιφέρει αλλαγές στη μορφολογία της επιφάνειας τους. Με κριτήριο τις απεικονίσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων, οι αναγεννημένες κυτταρίνες που προκύπτουν έχουν μία πιο άτακτη δομή και μία πιο αδρή επιφάνεια. Τα χαρακτηριστικά αυτά μάλιστα είναι εντονότερα την περίπτωση της κυτταρίνης Avicel. Τέλος, φαίνεται πως η συγκεκριμένη μεταβολή στη μορφολογία των αναγεννημένων κυτταρινών είναι ανεξάρτητη της περιεκτικότητας της κυτταρίνης στα μείγματα κυτταρίνη-ιοντικό υγρό, εντός των ορίων διαλυτότητας, καθώς και ανεξάρτητη της χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας για χρόνο έως 40 min.

8.1.2 Προκατεργασία κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc

Το ιοντικό υγρό [emim]OAc έχει την ικανότητα να διαλύει την κυτταρίνη σε τιμές περιεκτικότητας έως και 5% (w/w) (Dadi et al., 2006; Granstrom et al., 2008; Swatloski et al., 2002a). Παρασκευάστηκαν λοιπόν μείγματα κυτταρίνης Avicel και ινώδους κυτταρίνης σε [emim]OAc, με περιεκτικότητα 2 και 5% (w/w). Καθένα

από αυτά τα μείγματα επωάστηκε στους 120 °C για χρονική διάρκεια ίση με 15, 30 και 40 min. Με το πέρας της θερμικής κατεργασίας, το κυτταρινούχο προϊόν καταβυθίζεται και στη συνέχεια καθαρίζεται και ξηραίνεται υπό ήπιες συνθήκες (παράγραφος 7.5.1.2). Η κυτταρίνη που προκύπτει αναφέρεται ως αναγεννημένη (regenerated cellulose). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός της πλήρους διάλυσης της κυτταρίνης σε λιγότερο από 8 min, σε όλες τις παραπάνω συνθήκες κατεργασίας των μειγμάτων που παρασκευάστηκαν. Επίσης, το τελικό ξηρό προϊόν στην περίπτωση της κυτταρίνης Avicel έχει μακροσκοπική υφή μεταξύ κόκκου και ίνας, ενώ στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης η μακροσκοπική υφή παραμένει σχεδόν αναλλοίωτη.

Η περιεκτικότητα της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc έως το όριο διαλυτότητας της, καθώς και η χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας, επιλέχθηκαν ως βασικές παράμετροι για τη μελέτη της επίδρασης τους στα χαρακτηριστικά του προκύπτοντος υλικού. Η θερμοκρασία διατηρείται σταθερή και ίση με 120 °C, καθώς με βάση το σύνολο της σχετικής βιβλιογραφίας είναι η ενδεδειγμένη για μία τέτοιου είδους κατεργασία (Dadi et al., 2006; Zhu et al., 2006). Η συγκεκριμένη θερμοκρασία είναι αρκούντως υψηλή για να διαλυθεί η κυτταρίνη και να τροποποιηθεί κατάλληλα η μικροδομή της, αλλά είναι και σχετικά χαμηλή ώστε να μην υπάρξουν χημικές αλλοιώσεις τόσο στην κυτταρίνη όσο και στο ιοντικό υγρό.

8.1.2.1 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στον βαθμό πολυμερισμού του αναγεννημένου προϊόντος

Ο αρχικός βαθμός πολυμερισμού της κυτταρίνης Avicel είναι 225. Το προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία (120 °C) στο ιοντικό υγρό [emim]OAc για περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15, 30 και 40 min, έχει σχεδόν τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού με την αρχική κυτταρίνη. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και για τις κατεργασίες των μειγμάτων κυτταρίνης με περιεκτικότητα 5% (πίνακας 8.5).

Πίνακας 8.5 Τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού της κυτταρίνης Avicel, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	DP
2	15	225
	30	225
	40	223
5	15	224
	30	225
	40	224

Συνεπώς, με κριτήριο τα παραπάνω αποτελέσματα, η διάλυση της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [emim]OAc και η παράλληλη θερμική κατεργασία της σε

αυτό, δεν επηρεάζουν το βαθμό πολυμερισμού του πολυσακχαρίτη στις παραπάνω συνθήκες που μελετήθηκαν. Η διαπίστωση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς η προκατεργασία στο ιοντικό υγρό γίνεται με αποκλειστικό σκοπό την αλλαγή της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης. Τυχόν προϊόν με μειωμένο βαθμό πολυμερισμού θα αλλοίωνε το μέσο μέγεθος του κυτταρινούχου υποστρώματος, γεγονός που δεν είναι επιθυμητό εφόσον απώτερος σκοπός της εργασίας είναι η εστεροποίηση του ακέραιου πολυσακχαρίτη.

Σχετικά με την ινώδη κυτταρίνη, ο αρχικός βαθμός πολυμερισμού της είναι 730. Το κυτταρινούχο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία (120 °C) στο ιοντικό υγρό [emim]OAc για περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15, 30 και 40 min, έχει τον ίδιο βαθμό πολυμερισμού με την αρχική κυτταρίνη. Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα που αφορούν στην κατεργασία των μειγμάτων κυτταρίνης με περιεκτικότητα 5% (πίνακας 8.6).

Πίνακας 8.6 Τιμές του μέσου βαθμού πολυμερισμού της ινώδους κυτταρίνης, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	DP
2	15	729
	30	730
	40	730
5	15	730
	30	729
	40	729

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται πως και στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης η διάλυση της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc και η παράλληλη θερμική κατεργασία της σε αυτό, δεν επηρεάζουν το βαθμό πολυμερισμού της. Φυσικά, το γεγονός αυτό εξακολουθεί να είναι μεγάλης σημαντικότητας διότι και για την ινώδη κυτταρίνη η ενδεχόμενη μείωση του μεγέθους του μορίου της θα αλλοίωνε τα αρχικά δεδομένα του σχεδιασμού των περαιτέρω πειραμάτων.

Η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, στις συνθήκες περιεκτικότητας του πολυσακχαρίτη και χρονικής διάρκειας που μελετήθηκαν, δεν φάνηκε να επηρεάζει το μέγεθος του μακρομορίου. Μάλιστα, η παρατήρηση αυτή ισχύει για δυο διαφορετικά είδη κυτταρίνης, με εντελώς διαφορετικούς βαθμούς πολυμερισμού. Μπορεί λοιπόν να ειπωθεί πως η συγκεκριμένη θερμική κατεργασία δεν υποβιβάζει το μέγεθος της κυτταρίνης είτε αυτή είναι κοκκώδης, είτε είναι ινώδης. Επίσης αυτό ισχύει χωρίς κάποια προϋπόθεση για τον αρχικό βαθμό πολυμερισμού, όταν αυτός κυμαίνεται στο διάστημα 225-730. Τέλος, σε σχέση με τις αντίστοιχες κατεργασίες στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, η συμπεριφορά του [emim]OAc ως προς την επίδραση στον βαθμό πολυμερισμού των κυτταρινούχων υλικών, είναι η ίδια.

8.1.2.2 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στο δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψαν μετά από τη θερμική κατεργασία της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, μετρήθηκε με τη βοήθεια της περίθλασης ακτίνων Χ. Το μέγεθος αυτό είναι χαρακτηριστικό της μικροδομής της κυτταρίνης και αποτελεί ένδειξη για το τι συμβαίνει με την κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης, όταν αυτή αναγεννάται από το προαναφερόμενο περιβάλλον.

Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μετρήθηκε με περιθλασίμετρο ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3) και βρέθηκε ίσος με 85.6%. Όταν όμως μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας των αναγεννημένων κυτταρινών, προϊόντων της θερμικής κατεργασίας της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, η τιμή του ήταν αρκετά μειωμένη για όλες τις συνθήκες προκατεργασίας. Αναλυτικότερα, το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 52.3%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 51.8 και 51.6% αντίστοιχα. Παρατηρείται δηλαδή μία σημαντική μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel μετά την προκατεργασία της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc· μία μείωση της τάξης του 40%. Με περαιτέρω αύξηση του χρόνου της θερμικής κατεργασίας στο ιοντικό υγρό, ο δείκτης κρυσταλλικότητας εξακολουθεί να μειώνεται ελαφρά, με αρκετά μικρότερο όμως ρυθμό. Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν πως ο χρόνος κατεργασίας επηρεάζει τη μικροδομή της αναγεννημένης κυτταρίνης. Με αύξηση του χρόνου κατεργασίας, μειώνεται ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης.

Παρόμοια συμπεριφορά επιδεικνύεται και στα αναγεννημένα κυτταρινούχα προϊόντα που προέρχονται από τα μείγματα κυτταρίνης-[emim]OAc με περιεκτικότητα 5% (πίνακας 8.7).

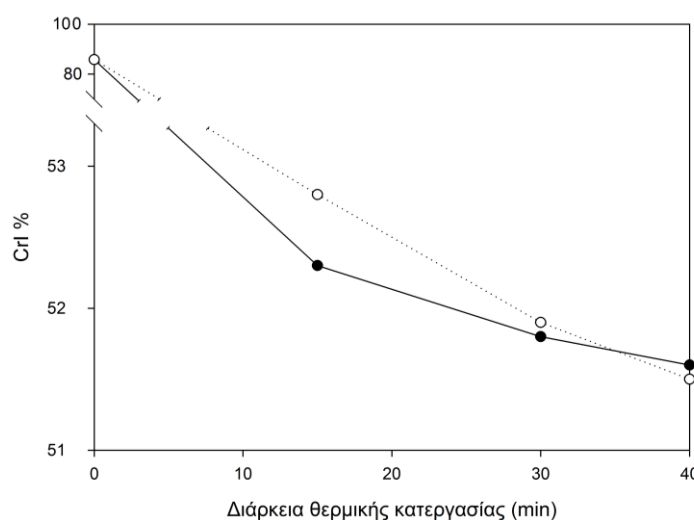
Πίνακας 8.7 Τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6%.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	CrI %
2	15	52.3
	30	51.8
	40	51.6
5	15	52.8
	30	51.9
	40	51.5

Έτσι το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 5% και

για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 52.8%. Για χρόνους κατεργασίας 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 51.9 και 51.5% αντίστοιχα.

Η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης Avicel στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, καθώς και η επακόλουθη αναγέννηση της από αυτό, οδηγεί στο σχηματισμό κυτταρίνης με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Για χρόνους κατεργασίας από 15 έως 40 min, ο βαθμός κρυσταλλικότητας μειώνεται κατά 40% περίπου. Μάλιστα με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας πέραν των 15 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας μειώνεται περαιτέρω, με μικρότερο όμως ρυθμό. Πιο πρακτική για την περίπτωση αυτή είναι η απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης ως συνάρτηση της χρονικής διάρκειας της αντίστοιχης κατεργασίας (σχήμα 8.5).



Σχήμα 8.5 Απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel ως προς τη χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας των αντίστοιχων μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C. Η αρχική περιεκτικότητα της κυτταρίνης στα παραπάνω μείγματα είναι 2 (●) και 5% (○). Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6%.

Συγκεκριμένα ο δείκτης κρυσταλλικότητας μετά από θερμική κατεργασία διάρκειας 15 min φθίνει σημαντικά σε σχέση με αυτόν της ακατέργαστης κυτταρίνης. Με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στα 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης εξακολουθεί να μειώνεται, με ελαττωμένο όμως ρυθμό. Η συμπεριφορά αυτή δηλώνει πως η κυτταρίνη, από τη στιγμή που θα διαλυθεί στο [emim]OAc, στους 120 °C και στη συνέχεια θα αναγεννηθεί μέσω καταβύθισης με θερμό απιονισμένο νερό, έχει εκ των πραγμάτων διαφορετική μικροδομή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα είναι πως η περιεκτικότητα της κυτταρίνης Avicel στο αρχικό μείγμα της με το ιοντικό υγρό

[emim]OAc, δεν επηρεάζει το δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος, εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της. Η συμπεριφορά αυτή είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στις κατεργασίες με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Για διαφορετικές τιμές της περιεκτικότητας της και για την ίδια χρονική διάρκεια κατεργασίας, η αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel παρουσιάζει σχεδόν τον ίδιο βαθμό κρυσταλλικότητας.

Αναφορικά με τον μηχανισμό διάλυσης και μείωσης του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης στο περιβάλλον του [emim]OAc, αυτός είναι παρεμφερής με τον αντίστοιχο του ιοντικού υγρού [bmim]Cl. Το ηλεκτραρνητικό οξικό ανιόν προσβάλλει τα ελεύθερα υδροξύλια της κυτταρίνης και τα αποπρωτονώνει. Με αυτόν τον τρόπο καταστρέφονται παράλληλα και οι δεσμοί υδρογόνου. Επιπροσθέτως, το ιμιδαζολικό κατιόν με τα ηλεκτρόνια που διαθέτει, αλληλεπιδρά μη δεσμικά με τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων της κυτταρίνης, εμποδίζοντας τον επανασχηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της (Dadi et al., 2006). Για να διασφαλιστεί η συγκεκριμένη μικροδομή της κυτταρίνης στο μέγιστο δυνατό βαθμό και μετά την αναγέννηση της, θα πρέπει η τελευταία να γίνει με άμεση και ταχεία καταβύθιση της κυτταρίνης.

Συγκρίνοντας το μέσο δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel που προέκυψε από την κατεργασία στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, είναι μειωμένος ως προς τον αντίστοιχο δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από κατεργασία στο [bmim]Cl. Συγκεκριμένα, η κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl επέφερε μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel κατά 50% περίπου. Η ανάλογη κατεργασία στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας κατά 40%. Με δεδομένη την προτίμηση για μία προκατεργασμένη κυτταρίνη με όσο το δυνατόν μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, είναι προφανής η υπεροχή του ιοντικού υγρού [bmim]Cl ως μέσου κατεργασίας. Η διαφορά αυτή έγκειται στο διαφορετικό ανιόν του κάθε ιοντικού υγρού. Το ανιόν χλωρίου είναι καταρχήν πιο μικρό σε μέγεθος από το οξικό ανιόν. Αυτό του επιτρέπει να παρεισφρέει καλύτερα στο πυκνό δίκτυο που σχηματίζεται από τις αλυσίδες της κυτταρίνης. Επίσης το ανιόν του χλωρίου έχει μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα από το οξικό ανιόν και επομένως είναι πιο δραστικό στην προσβολή των υδροξυλομάδων της κυτταρίνης. Ως προς το ιμιδαζολικό κατιόν των δυο ιοντικών υγρών δεν υπάρχει κάποια διαφορά καθώς είναι το ίδιο. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκε για την προκατεργασία της κυτταρίνης Avicel το ιοντικό υγρό [emim]OAc, με σκοπό την περαιτέρω ενζυμική της εστεροποίηση.

Σχετικά με την ακατέργαστη ινώδη κυτταρίνη, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της μετρήθηκε με περιθλασίμετρο ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3) και βρέθηκε ίσος με 90.7%. Όταν όμως μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας των αναγεννημένων κυτταρινών, προϊόντων της θερμικής κατεργασίας της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, η τιμή του ήταν σημαντικά ελαττωμένη για όλες τις συνθήκες προκατεργασίας που δοκιμάστηκαν. Αναλυτικότερα, το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 2% (w/w) και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 59.4%. Για χρόνους κατεργασίας 30 και 40

min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 58.5 και 58.1% αντίστοιχα. Παρατηρείται δηλαδή μία σημαντική μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης μετά την προκατεργασία της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc· μία μείωση της τάξης του 35%. Μάλιστα με αύξηση του χρόνου της θερμικής κατεργασίας πέραν των 15 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας εξακολουθεί να μειώνεται με αρκετά μικρότερο όμως ρυθμό. Επίσης αποδεικνύεται και πάλι πως ο χρόνος κατεργασίας παίζει ρόλο στη μικροδομή της αναγεννημένης κυτταρίνης. Με αύξηση του χρόνου κατεργασίας, μειώνεται ελαφρά ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Εξίσου σημαντικός είναι και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η καταβύθιση του πολυσακχαρίτη στο τέλος της θερμικής κατεργασίας. Η προσθήκη κατάλληλου όγκου θερμού απιονισμένου νερού πρέπει να γίνεται άμεσα ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα ανακρυστάλλωσης της κυτταρίνης (Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006).

Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα αναγεννημένα κυτταρινούχα προϊόντα που προέρχονται από τα μείγματα ινώδους κυτταρίνης-[emim]OAc με περιεκτικότητα 5% (πίνακας 8.8).

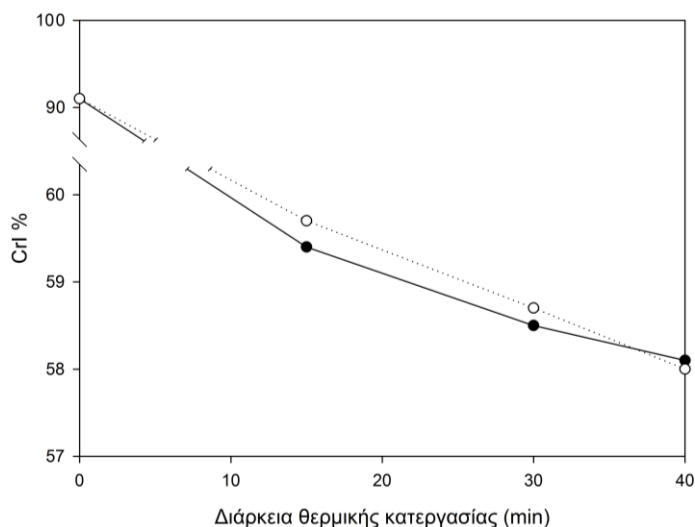
Πίνακας 8.8 Τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης, μετά τη θερμική κατεργασία μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης είναι 90.1%.

Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Χρονική διάρκεια θερμικής κατεργασίας (min)	Crl %
2	15	59.4
	30	58.5
	40	58.1
5	15	59.7
	30	58.7
	40	58.0

Έτσι το αναγεννημένο προϊόν που προκύπτει μετά από θερμική κατεργασία στους 120 °C, στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, με περιεκτικότητα κυτταρίνης 5% και για χρόνο 15 min έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 59.7%. Για χρόνους κατεργασίας ίσους με 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας του κάθε προϊόντος είναι ίσος με 58.7 και 58.0% αντίστοιχα.

Η διάλυση και η θερμική κατεργασία της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, καθώς και η επακόλουθη αναγέννηση της από αυτό, οδηγεί στο σχηματισμό κυτταρίνης με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Για χρόνους κατεργασίας από 15 έως 40 min, ο βαθμός κρυσταλλικότητας μειώνεται κατά 35% περίπου. Μάλιστα με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας πέραν των 15 min, υπάρχει μία μικρή μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας (σχήμα 8.6). Πιο αναλυτικά, ο δείκτης κρυσταλλικότητας μετά από θερμική κατεργασία διάρκειας 15 min φθίνει σημαντικά σε σχέση με αυτόν της ακατέργαστης κυτταρίνης. Με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στα 30 και 40 min, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης μειώνεται και άλλο, με φθίνοντα όμως ρυθμό. Η συμπεριφορά αυτή δηλώνει πως

η κυτταρίνη, από τη στιγμή που θα διαλυθεί στο [emim]OAc, στους 120 °C και στη συνέχεια θα αναγεννηθεί μέσω καταβύθισης με θερμό απιονισμένο νερό, έχει εκ των πραγμάτων διαφορετική μικροδομή που χαρακτηρίζεται από μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας.



Σχήμα 8.6 Απεικόνιση του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης ως προς τη χρονική διάρκεια της θερμικής κατεργασίας των αντίστοιχων μειγμάτων της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, σε θερμοκρασία 120 °C. Η αρχική περιεκτικότητα της κυτταρίνης στα παραπάνω μείγματα είναι 2 (●) και 5% (○). Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης είναι 90.1%.

Η παραπέρα μείωση του τελευταίου εξαρτάται πλέον από τη χρονική διάρκεια της εν λόγω κατεργασίας. Ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα είναι πως η περιεκτικότητα της ινώδους κυτταρίνης στο αρχικό μείγμα της με το ιοντικό υγρό [emim]OAc, δεν επηρεάζει το δείκτη κρυσταλλικότητας του αναγεννημένου προϊόντος, εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της. Το γεγονός αυτό παρουσιάζεται και στην περίπτωση όπου η κατεργασία γίνεται με το ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Για διαφορετικές τιμές της περιεκτικότητας της και για την ίδια χρονική διάρκεια κατεργασίας, η αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη παρουσιάζει σχεδόν τον ίδιο βαθμό κρυσταλλικότητας. Ο μηχανισμός διαλυτοποίησης και μείωσης του βαθμού κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, είναι ο ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω για την κυτταρίνη Avicel.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορά των δυο τύπων κυτταρίνης στην επίδραση της θερμικής κατεργασίας επί του βαθμού κρυσταλλικότητας. Ειδικότερα, με εφαρμογή των προαναφερόμενων συνθηκών κατεργασίας, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel μειώνεται κατά 40% περίπου· το αντίστοιχο ποσοστό μείωσης για την ινώδη κυτταρίνη φτάνει το 35%. Η μικρή αλλά αξιοσημείωτη αυτή διαφορά, μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φύση

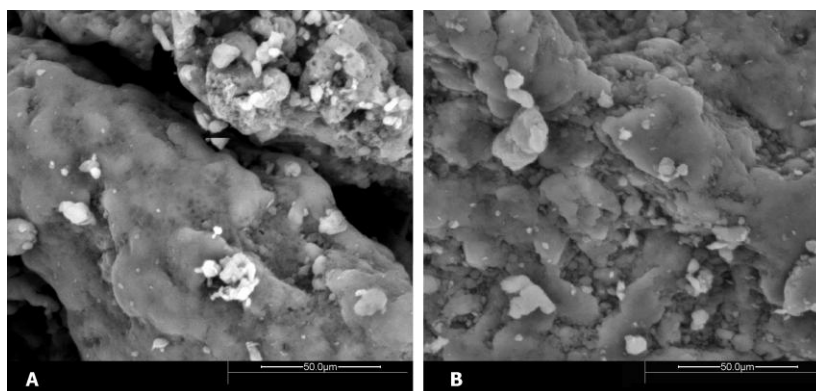
των δυο κυτταρινών. Η κυτταρίνη Avicel είναι κοκκώδης, έχει μέσο βαθμό πολυμερισμού 225 και ο αρχικός δείκτης κρυσταλλικότητας της είναι 85.6%. Από την άλλη πλευρά, η ινώδης κυτταρίνη έχει προφανώς ινώδη υφή, μεγαλύτερο μέγεθος ($DP=730$) και σχετικά υψηλότερη κρυσταλλικότητα (90.7%). Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν δυσκολότερες τις όποιες φυσικοχημικές μεταβολές για την ινώδη κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό είναι λίγο έως πολύ αναμενόμενο, αφού η τελευταία προσεγγίζει περισσότερο το δομικό χαρακτήρα της φυσικής κυτταρίνης που βρίσκεται στα φυτά.

Ο μέσος δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης που προέκυψε από την κατεργασία στο ιοντικό υγρό $[emim]OAc$, είναι μειωμένος ως προς τον αντίστοιχο δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από την ανάλογη κατεργασία στο $[bmim]Cl$. Συγκεκριμένα, η κατεργασία στο ιοντικό υγρό $[bmim]Cl$ επέφερε μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης κατά 40% περίπου. Η ανάλογη κατεργασία στο ιοντικό υγρό $[emim]OAc$, είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας κατά 35%. Με δεδομένη την προτίμηση για μία προκατεργασμένη κυτταρίνη με όσο το δυνατόν μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, είναι προφανής η υπεροχή του ιοντικού υγρού $[bmim]Cl$ ως μέσου κατεργασίας. Η διαφορά αυτή έγκειται στο διαφορετικό ανιόν του κάθε ιοντικού υγρού. Το ανιόν χλωρίου είναι καταρχήν πιο μικρό σε μέγεθος από το οξικό ανιόν. Αυτό του επιτρέπει να παρεισφρέει καλύτερα στο πυκνό δίκτυο που σχηματίζεται από τις αλυσίδες της κυτταρίνης. Επίσης το ανιόν του χλωρίου έχει μεγαλύτερη ηλεκταρνητικότητα από το οξικό ανιόν και επομένως είναι πιο δραστικό στην προσβολή των υδροξυλομάδων της κυτταρίνης. Ως προς το ιμιδαζολικό κατιόν των δυο ιοντικών υγρών δεν υπάρχει κάποιο διαφορά καθώς είναι το ίδιο.

8.1.2.3 Επίδραση της περιεκτικότητας της κυτταρίνης και της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας στη μορφολογία του αναγεννημένου προϊόντος

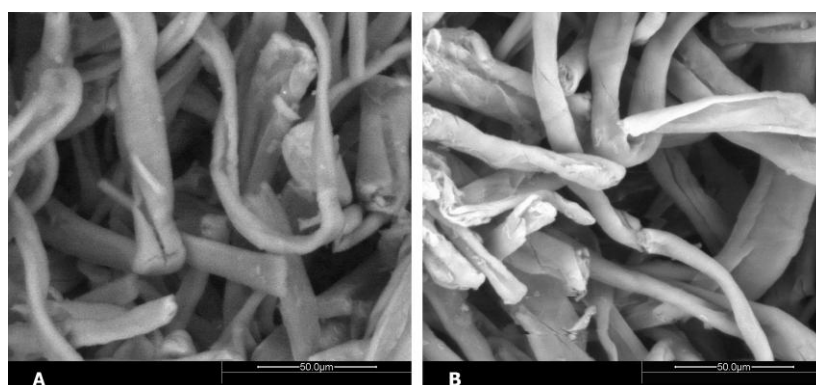
Για τη μελέτη της μορφολογίας της ακατέργαστης κυτταρίνης, αλλά και των αναγεννημένων κυτταρινών που προέκυψαν από την ανάλογη προκατεργασία στο ιοντικό υγρό $[emim]OAc$, χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (παράγραφος 7.4). Στην εικόνα που προκύπτει από τη σάρωση της επιφάνειας της κυτταρίνης Avicel, φαίνεται μία αδρή επιφάνεια με αυλακώσεις και ορισμένα εξογκώματα (**σχήμα 8.7 Α**). Η αντίστοιχη απεικόνιση των επιφανειών των αναγεννημένων κυτταρινών παρουσιάζουν μία διαφορετική μορφολογία. Η αδρότητα της επιφάνειας αυξήθηκε, οι αυλακώσεις ελαχιστοποιήθηκαν, ενώ και τα εξογκώματα έγιναν πιο έντονα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι η μορφολογία της επιφάνειας όλων των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης είναι ακριβώς η ίδια, σύμφωνα με τις αντίστοιχες απεικονίσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Στο διάστημα των τιμών των παραμέτρων που μελετήθηκαν, η μορφολογία της αναγεννημένης κυτταρίνης είναι η ίδια· ανεξαρτήτως περιεκτικότητας κυτταρίνης Avicel στο μείγμα κυτταρίνη- $[emim]OAc$ και ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας. Έτσι, παρουσιάζεται ενδεικτικά και αντιπροσωπευτικά η εικόνα που

προκύπτει από την ηλεκτρονική σάρωση της επιφάνειας της κυτταρίνης Avicel που αναγεννάται από μείγμα της με το [emim]OAc (περιεκτικότητα κυτταρίνης 5%, χρονική διάρκεια κατεργασίας 30 min, θερμοκρασία 120 °C) (σχήμα 8.7 B).



Σχήμα 8.7 Εικόνες SEM της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel (A) και της αντίστοιχης αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [emim]OAc (B).

Παράλληλα εξετάζεται και η μορφολογία της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης και των αντίστοιχων αναγεννημένων κυτταρινών που προκύπτουν από την κατεργασία της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc. Καταρχήν η ινώδης κυτταρίνη, ακατέργαστη και μη, έχει εμφανή ινώδη μορφή (σχήμα 8.8). Η ακατέργαστη ινώδης κυτταρίνη έχει τις ίνες της σχετικά τακτικά διατεταγμένες και οι τελευταίες έχουν ελαφρώς λεία επιφάνεια (σχήμα 8.8 A). Οι αντίστοιχες αναγεννημένες κυτταρίνες από την άλλη πλευρά, έχουν ίνες που διατάσσονται στο χώρο ελαφρώς πιο άτακτα και επίσης υπάρχουν αρκετές ανωμαλίες στην επιφάνεια των ινών.



Σχήμα 8.8 Εικόνες SEM της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης (A) και της αντίστοιχης αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψε από θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [emim]OAc (B).

Σε σύγκριση πάντως με τις ανάλογες περιπτώσεις της κυτταρίνης Avicel, η ινώδης κυτταρίνη υφίσταται λιγότερες μεταβολές στη μορφολογία της επιφάνειας της, λόγω της κατεργασίας της στο ιοντικό υγρό [emim]OAc. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποδοθεί στον λιγότερο επιρρεπή, σε φυσικοχημικές μεταβολές, χαρακτήρα της ινώδους κυτταρίνης. Υπάρχει όμως και μία σημαντική ομοιότητα της ινώδους κυτταρίνης με την κυτταρίνη Avicel, ως προς τη μορφολογία των αναγεννημένων μορφών τους. Η μορφολογία της επιφάνειας όλων των δειγμάτων της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης είναι ακριβώς η ίδια. Για τις τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν, η μορφολογία της αναγεννημένης κυτταρίνης είναι η ίδια, ανεξαρτήτως περιεκτικότητας της ινώδους κυτταρίνης στο μείγμα κυτταρίνη-[emim]OAc και ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας. Έτσι, παρουσιάζεται ενδεικτικά και αντιπροσωπευτικά η εικόνα που προκύπτει από την ηλεκτρονική σάρωση της επιφάνειας της ινώδους κυτταρίνης που αναγεννάται από μείγμα της με το [emim]OAc (περιεκτικότητα κυτταρίνης 5%, χρονική διάρκεια κατεργασίας 30 min, θερμοκρασία 120 °C) (σχήμα 8.8 B).

Φαίνεται λοιπόν πως η κατεργασία της κυτταρίνης (Avicel και ινώδους) στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, επιφέρει αλλαγές στη μορφολογία της, παρόμοιες με αυτές που προκαλεί και το [bmim]Cl. Με κριτήριο τις απεικονίσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων, οι αναγεννημένες κυτταρίνες που προκύπτουν έχουν μία πιο άτακτη δομή και μία πιο αδρή επιφάνεια. Η νέα αυτή διαμόρφωση είναι ταυτόσημη με μία πιο ανοιχτή και επιρρεπή σε τροποποιήσεις δομή. Τα χαρακτηριστικά αυτά μάλιστα είναι εντονότερα την περίπτωση της κυτταρίνης Avicel. Τέλος, φαίνεται πως η συγκεκριμένη μεταβολή στη μορφολογία των αναγεννημένων κυτταρινών είναι ανεξάρτητη της περιεκτικότητας της κυτταρίνης στα μείγματα κυτταρίνη-ιοντικό υγρό, εντός των ορίων διαλυτότητας, καθώς και ανεξάρτητη της χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας για χρόνο έως 40 min.

8.2 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης

8.2.1 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά κυτταρίνης Avicel

Η προκατεργασία της κυτταρίνης Avicel στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc έχει σαν στόχο την τροποποίηση της μικροδομής της κυτταρίνης, έτσι ώστε τα υδροξύλια της να γίνουν προσβάσιμα και να καταστεί ευκολότερη η ενζυμική τους εστεροποίηση με αλειφατικές αλυσίδες. Από τη συγκεκριμένη προκατεργασία προκύπτει αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel με σημαντικά μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας (πίνακας 8.9), γεγονός ενδεικτικό της μερικής αποδιάταξης της δομής του πολυσακχαρίτη. Από τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχθηκε πως η αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel, ως προϊόν κατεργασίας στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, χαρακτηρίζεται από δείκτη κρυσταλλικότητας της τάξης του 46%. Αντίστοιχα, όταν η κατεργασία έγινε στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel ήταν της τάξεως του 52%.

Πίνακας 8.9 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του δείκτη κρυσταλλικότητας του συνόλου των δειγμάτων αναγεννημένης κυτταρίνης που προέκυψαν από την προκατεργασία της κυτταρίνης Avicel και της ινώδους κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc. Ο δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6% και της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης είναι 90.7%

[bmim]Cl				[emim]OAc			
Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Διάρκεια κατεργασίας (min)	Κυτταρίνη Avicel CrI %	Ινώδης κυτταρίνη CrI %	Περιεκτικότητα κυτταρίνης % (w/w)	Διάρκεια κατεργασίας (min)	Κυτταρίνη Avicel CrI %	Ινώδης κυτταρίνη CrI %
2	15	46.6	55.4	2	15	52.3	59.4
	30	45.2	54.4		30	51.8	58.5
	40	44.8	54.1		40	51.6	58.1
5	15	46.4	55.4	5	15	52.8	59.7
	30	45.3	54.8		30	51.9	58.7
	40	45.0	54.0		40	51.5	58.0
10	15	46.8	55.5				
	30	45.4	54.7				
	40	44.8	54.3				

Ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες προκατεργασίας προέκυπτε ένα πλήθος μεμονωμένων τιμών του δείκτη κρυσταλλικότητας. Και πάλι όμως, για κάθε ένα από τα δύο ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν, οι τιμές αυτές είχαν ελάχιστη διαφορά μεταξύ τους. Ειδικότερα, όταν η κατεργασία έγινε στο [bmim]Cl, η μέση τιμή του δείκτη κρυσταλλικότητας ήταν 45.6% με τη διακύμανση να βρίσκεται στο 0,79. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το ιοντικό υγρό [emim]OAc για την κατεργασία της κυτταρίνης Avicel, η μέση τιμή του δείκτη κρυσταλλικότητας των αναγεννημένων κυτταρινών που προέκυψαν ήταν 51.9%, με διακύμανση 0.48. Να σημειωθεί πως ο αρχικός δείκτης κρυσταλλικότητας της ακατέργαστης κυτταρίνης Avicel είναι 85.6%. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία μείωση του μέσου βαθμού πολυμερισμού των αναγεννημένων κυτταρινών, σε καμία από τις διαφορετικές συνθήκες προκατεργασίας.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, για τις περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης της κυτταρίνης, επιλέγεται ως κυτταρινούχο υπόστρωμα η αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel με το μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας που προέκυψε. Η κυτταρίνη αυτή προέρχεται από κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl και έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%.

8.2.1.1 Αντιδράσεις σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη

Η αντίδραση που επιχειρείται να πραγματοποιηθεί είναι μία αντίδραση σύνθεσης (εστεροποίηση). Συνεπώς οι υδρολάσες που χρησιμοποιούνται ως βιοκαταλύτες στην συγκεκριμένη εργασία πρέπει να δράσουν σε ένα μη συμβατικό σύστημα. Τα πλέον κλασικά συστήματα που χρησιμοποιούνται ευρέως σε τέτοιου είδους αντιδράσεις, είναι οι οργανικοί διαλύτες. Για την περίπτωση της ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν δυο κοινοί διαλύτες οι οποίοι απαντώνται συχνά σε τέτοιου είδους αντιδράσεις. Το εξάνιο και το ακετονιτρίλιο. Καταρχήν και οι δυο αυτοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενζυμικές αντιδράσεις χωρίς να μετουσιώνουν σημαντικά το ένζυμο, ώστε να περιορίζεται η δραστηριότητά του (Ikeda & Klibanov, 1993; Klibanov, 1988; Kontogianni et al., 2001; Louwrier et al., 1996). Το εξάνιο επιλέγεται σαν ένας υδρόφοβος διαλύτης που μπορεί να διαλύει τα λιπαρά υποστρώματα αλλά όχι και την κυτταρίνη, η οποία έχει πολικό χαρακτήρα και φυσικά είναι ένα μεγαλομόριο. Η τελευταία όμως δεν διαλύεται ούτε και στο ακετονιτρίλιο, το οποίο αποτελεί την υδρόφιλη επιλογή για οργανικό διαλύτη.

Ένα τυπικό σύστημα αντίδρασης αποτελείται από 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης, 10 mL διαλύματος βινυλ-εστέρα σε εξάνιο ή ακετονιτρίλιο, με συγκέντρωση 0.6 M και 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Οι βινυλ-εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά είναι οι: προπιονικός βινυλ-εστέρας (vinyl propionate), δωδεκανοϊκός ή λαυρικός βινυλ-εστέρας (vinyl laurate) και δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός βινυλ-εστέρας (vinyl stearate). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα είναι τα ακόλουθα: λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ

χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις επιτελέστηκε σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σετ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σετ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη κυτταρίνη ήταν ακατέργαστη. Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Για κανέναν από τους τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες και με κανένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα δεν σχηματίστηκε ο ανάλογος εστέρας κυτταρίνης, σε περιβάλλον εξανίου ή ακετονιτρίλιου.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν παρόμοια αντιδρώντα μείγματα στα οποία άλλαξε η συγκέντρωση του βινυλ-εστέρα. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την αρχική· συγκεντρώσεις ίσες με 0.8 και 1 M. Ακόμα δοκιμάστηκαν και τιμές συγκέντρωσης βινυλ-εστέρα μικρότερες από την αρχική (0.1, 0.2 και 0.4 M), για να ελεγχθεί η πιθανότητα παρεμπόδισης της ενζυμικής δράσης από το υπόστρωμα. Και πάλι όμως τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς τη δημιουργία εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης.

Συνεπώς, οι αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης κυτταρίνης Anicel στους οργανικούς διαλύτες εξάνιο και ακετονιτρίλιο δεν επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα (**πίνακας 8.10**). Η αιτία πηγάζει προφανώς από το ότι το κυτταρινούχο υπόστρωμα, αν και με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας, δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι δεν είναι εφικτή η προσέγγιση του από το εκάστοτε ένζυμο και το ανάλογο υπόστρωμα. Απεναντίας το τελευταίο βρίσκεται στη φάση του οργανικού διαλύτη, απομακρυσμένο από τα μόρια κυτταρίνης. Φαίνεται λοιπόν πως σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες, η προκατεργασία της κυτταρίνης Anicel σε ιοντικά υγρά, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας και δραστηριότητας των υδροξυλίων της, δεν είναι ικανή για την ενζυμική εστεροποίηση της με αλειφατικές αλυσίδες.

8.2.1.2 Αντιδράσεις σε περιβάλλον ιοντικών υγρών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο κεφάλαιο 4, τα ιοντικά υγρά πρόσφατα άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως μέσο βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Το συνηθέστερο είδος υποστρωμάτων είναι οι μονο- και ολιγοσακχαρίτες, οι οποίοι παρουσιάζουν ικανοποιητική διαλυτότητα στα πολικά ιοντικά υγρά. Έτσι δημιουργείται ένα μη συμβατικό σύστημα στο οποίο μπορεί να επιτευχθεί η επιθυμητή ενζυμική τροποποίηση των υποστρωμάτων (Garcia et al., 2004; Jesionowski et al., 2002; Kaar et al., 2003; Lozano et al., 2004; van Rantwijk et al., 2003). Μία σημαντική παράμετρος στην παραπάνω θεώρηση είναι η φύση του ιοντικού υγρού σε σχέση με τη διατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου. Υπάρχουν ιοντικά υγρά στα οποία η σταθερότητα του ενζύμου είναι παρόμοια ή και υψηλότερη από αυτήν σε υδατικό περιβάλλον, αλλά υπάρχουν και ιοντικά υγρά τα οποία μετουσιώνουν το ένζυμο μόλις έρθουν σε επαφή με αυτό.

Πίνακας 8.10 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιδράσεων ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης κυτταρίνης Anicel, σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη.

Βιοκαταλύτης	Οργανικός διαλύτης	CrI % αναγεννημένης κυτταρίνης	Βινυλ-εστέρας (ακυλο-δότης)	Αποτέλεσμα αντίδρασης
Το σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία	εξάνιο	44.8	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό
	ακετονιτρίλιο	44.8	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό

Αναφορικά με τον τύπο αντιδράσεων που ενδιαφέρουν την παρούσα εργασία, θα ήταν ιδεατό να γίνονταν η προκατεργασία της κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl ή [emim]OAc και στη συνέχεια να πραγματοποιούνταν και η ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης στο ίδιο σύστημα. Όμως, τα ιοντικά υγρά που έχουν αναφερθεί πως διαλυτοποιούν την κυτταρίνη, μετουσιώνουν απευθείας τα ένζυμα μόρια (Kaar et al., 2003; Sheldon et al., 2002; Wang et al., 2007; Zhao et al., 2009). Μάλιστα ο κύριος λόγος στον οποίο στηρίζεται ο μηχανισμός διάλυσης της κυτταρίνης (υψηλή δραστηριότητα των ηλεκτρονιόφιλων ανιόντων), είναι παράλληλα και η αιτία για τη μετουσίωση των ενζύμων. Έτσι όπως διασπώνται οι δεσμοί υδρογόνου στην κυτταρίνη, με τον ίδιο τρόπο καταστρέφονται και οι ανάλογοι δεσμοί του πρωτεϊνικού μορίου, με αποτέλεσμα την καταστροφή της τριτοταγούς και δευτεροταγούς δομής του. Από την άλλη πλευρά πάλι, τα ιοντικά υγρά που δεν αναφέρεται να αδρανοποιούν τα ένζυμα, αδυνατούν να διαλυτοποιήσουν μεγαλομόρια όπως η κυτταρίνη (Jesionowski et al., 2002; Lozano et al., 2001; Swatloski et al., 2002a; Wu et al., 2004; Zhu et al., 2006). Συνεπώς η προκατεργασία της κυτταρίνης, με σκοπό τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της και η ταυτόχρονη ενζυμική της τροποποίηση, είναι δύο ασύμβατες έννοιες όταν αναφερόμαστε στο ίδιο ιοντικό υγρό.

Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, για την αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel επιλέχθηκαν δύο ιοντικά υγρά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την ενζυμική τροποποίηση μονο- και ολιγοσακχαριτών· το [bmim]PF₆ και το [bmim]BF₄ (Jesionowski et al., 2002; Lau et al., 2000). Η βασική διαφορά τους είναι πως το [bmim]PF₆ είναι περισσότερο υδρόφοβο από το ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, το οποίο είναι αναμίξιμο με το νερό.

Ένα τυπικό σύστημα αντίδρασης αποτελείται από 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης, 10 mL διαλύματος βινυλ-εστέρα σε [bmim]PF₆ ή [bmim]BF₄, με συγκέντρωση 0.6 M και 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Οι βινυλ-εστέρες που δοκιμάστηκαν είναι οι: προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις επιτελέστηκε σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σετ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σετ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη κυτταρίνη ήταν ακατέργαστη. Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Για κανέναν από τους τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες και με κανένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα δεν σχηματίστηκε ο ανάλογος εστέρας κυτταρίνης, στο περιβάλλον του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ ή [bmim]BF₄.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν παρόμοια αντιδρώντα μείγματα στα οποία άλλαζε η συγκέντρωση του βινυλ-εστέρα, ώστε να ελεγχθεί μήπως το ποσοστό παρουσίας του είναι περιοριστικός παράγοντας. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την αρχική· συγκεντρώσεις ίσες με 0.8 και 1 M.

Ακόμα δοκιμάστηκαν και τιμές συγκέντρωσης βινυλ-εστέρα μικρότερες από την αρχική (0.1, 0.2 και 0.4 M), για να ελεγχθεί η πιθανότητα παρεμπόδισης της ενζυμικής δράσης από το υπόστρωμα. Και πάλι όμως τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς τη δημιουργία εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης.

Συνεπώς, οι αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ δεν επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα (πίνακας 8.11). Η αιτία έγκειται προφανώς στο ότι το κυτταρινούχο υπόστρωμα, αν και με σημαντικά μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας, δεν παρουσίασε διαλυτότητα στα συγκεκριμένα ιοντικά υγρά. Τα τελευταία είναι αρκετά πολικά ώστε να διαλύουν πολικά μόρια όπως τα σάκχαρα. Το συγκριτικά πολύ μεγάλο μέγεθος της κυτταρίνης όμως, την καθιστά πρακτικά αδιάλυτη ακόμα και σε αυτά τα μέσα. Έτσι δεν είναι εύκολη η προσέγγιση των υδροξυλίων του πολυσακχαρίτη από το εκάστοτε ένζυμο και το ανάλογο υπόστρωμα. Φαίνεται λοιπόν πως σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις σε επιλεγμένα ιοντικά υγρά, η προκατεργασία της κυτταρίνης Avicel, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας και δραστηριότητας των υδροξυλίων της, δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ενζυμική εστεροποίηση της με αλειφατικές αλυσίδες.

8.2.1.3 Αντιδράσεις σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών

Οι δοκιμές των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, σε περιβάλλον οργανικών διαλυτών και ιοντικών υγρών, δεν επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Με γνώμονα τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα, φάνηκε πως σε υγρά μέσα αντίδρασης με διαφορετική κάθε φορά φύση και σύσταση, καθώς και με διαφορετική πολικότητα, δεν είναι εφικτή η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης. Έτσι, το επόμενο βήμα που επιλέχθηκε είναι η δοκιμή της αντίδρασης σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών. Το συγκεκριμένο είδος μη συμβατικού συστήματος βιοκατάλυσης είναι απαλλαγμένο από κάποιον τρίτο διαλύτη και το ρόλο του μέσου της αντίδρασης τον αναλαμβάνει ένα από τα υποστρώματα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ρόλος αυτός διαδραματίζεται από τους βινυλ-εστέρες των καρβοξυλικών οξέων, οι οποίοι βρίσκονται σε υγρή φάση για τις θερμοκρασιακές συνθήκες των αντιδράσεων που μας ενδιαφέρουν ($T \geq 40$ °C). Το χαρακτηριστικό αυτών των συστημάτων είναι η άμεση διαθεσιμότητα του υποστρώματος-μέσου αντίδρασης προς το ένζυμο αλλά και πιθανόν προς το δεύτερο υπόστρωμα, την κυτταρίνη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρεμβάλλεται κάποιος τρίτος διαλύτης στον οποίο θα βρίσκονταν ο βινυλ-εστέρας, ώστε ο τελευταίος να έπρεπε να έρθει έμμεσα σε επαφή με το ένζυμο και κατ' επέκταση με την κυτταρίνη.

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων απουσία διαλύτη (solvent free), χρησιμοποιήθηκαν οι προπιονικός, λαυρικός και στεατικός βινυλ-εστέρας, ως υποστρώματα και μέσα αντίδρασης ταυτόχρονα. Το κάθε αντιδρών μείγμα αποτελούνταν από 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης και 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα. Στο τέλος προστίθενται 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης.

Πίνακας 8.11 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιδράσεων ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης κυτταρίνης *Anicel*, σε περιβάλλον ιοντικών υγρών.

Βιοκαταλύτης	Ιοντικό υγρό	CrI % αναγεννημένης κυτταρίνης	Βινυλ-εστέρας (ακυλο-δότης)	Αποτέλεσμα αντίδρασης
Το σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία	[bmim]PF ₆	44.8	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό
	[bmim]BF ₄	44.8	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: λυοφιλωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις επιτέλεστηκε σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σετ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σετ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη κυτταρίνη Avicel ήταν ακατέργαστη.

Στις περιπτώσεις όπου ως βιοκαταλύτες επιλέχθηκαν τα ένζυμα λυοφιλωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei* και ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του ανάλογου εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης η λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, η αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης ήταν επιτυχής. Συγκεκριμένα, για την αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%, σχηματίστηκε εστέρας της με βάση τον ανάλογο ακυλο-δότη. Από τις παραπάνω επιτυχείς ενζυμικές αντιδράσεις παράχθηκε προπιονικός, δωδεκανοϊκός ή λαυρικός και δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός εστέρας της κυτταρίνης (**πίνακας 8.12**). Η ανίχνευση του σχηματισθέντος εστερικού δεσμού και η παράλληλη επιβεβαίωση της διεξαγωγής της ανάλογης αντίδρασης έγινε με φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR (παράγραφος 7.5.4).

Πράγματι στα φάσματα FTIR των απομονομένων προϊόντων των παραπάνω ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, παρουσιάζεται μία κορυφή με κυματαριθμό γύρω στα 1750 cm⁻¹ (**σχήμα 8.9 & παράρτημα Β**). Η κορυφή αυτή είναι χαρακτηριστική της ομάδας καρβονυλίου του εστερικού δεσμού και απουσιάζει από το φάσμα της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel που προέκυψε από την αντίστοιχη αντίδραση ελέγχου, απουσία ενζύμου. Αυτό προφανώς υποδηλώνει την πραγματοποίηση της ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης. Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως τα φάσματα FTIR των κυτταρινούχων προϊόντων των αντιδράσεων ελέγχου είναι πανομοιότυπα με αυτό της αντίστοιχης αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό για το ότι δεν υπήρξε καμία χημική τροποποίηση της κυτταρίνης στα αντίστοιχα συστήματα.

Πίνακας 8.12 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με διάφορους ακυλο-δότες (Α,Β,Γ), σε περιβάλλον ελεύθερο διαλύτη.

Α

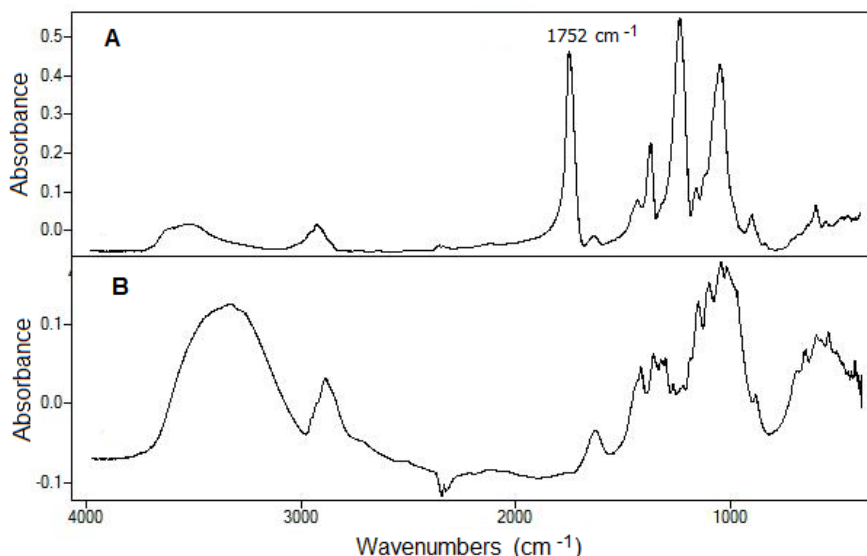
Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
προπιονικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	προπιονική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	προπιονική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	προπιονική κυτταρίνη

Β

Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
λαυρικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	λαυρική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	λαυρική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	λαυρική κυτταρίνη

Γ

Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
στεατικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	στεατική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	στεατική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	στεατική κυτταρίνη

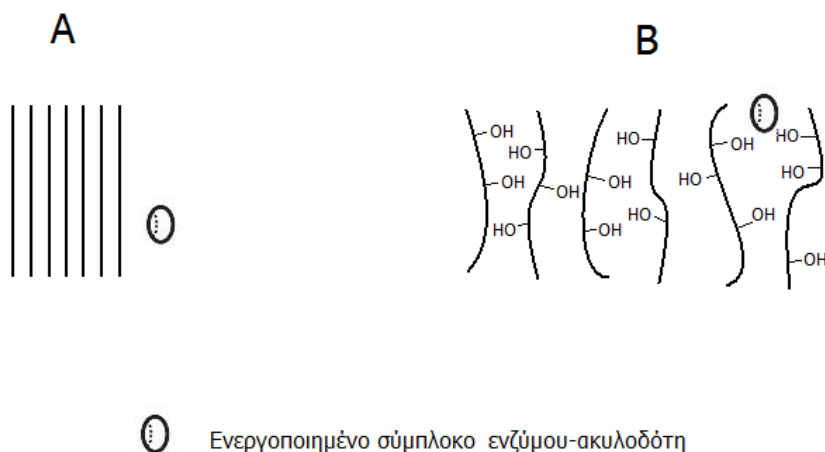


Σχήμα 8.9 Χαρακτηριστικά φάσματα FTIR της προπιονικής κυτταρίνης (A) και της κυτταρίνης Avicel που προέκυψε από αντίστοιχη αντίδραση ελέγχου με προπιονικό βινυλ-εστέρα, απουσία βιοκαταλύτη (B).

Επίσης στις αντιδράσεις ελέγχου που περιείχαν ένζυμο αλλά η κυτταρίνη Avicel ήταν ανεπεξέργαστη, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός εστερικού δεσμού στον πολυσακχαρίτη. Από αυτές τις δύο διαπιστώσεις εξάγονται δυο σημαντικά συμπεράσματα. Πρώτον, οι επιτυχείς αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel οφείλονται στη δράση των αντίστοιχων ενζύμων. Δεύτερον, η προκατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl με σκοπό τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας του πολυσακχαρίτη, είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Σε περίπτωση που το κυτταρινούχο υπόστρωμα συμμετέχει στην αντίδραση ως έχει, η αντίδραση δεν πραγματοποιείται. Φαίνεται λοιπόν πως η ιδέα της προκατεργασίας της κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά είναι δόκιμη. Το εκτεταμένο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου έχει συρρικνωθεί μετά από την προκατεργασία στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc, με συνεπακόλουθο την αλλαγή της μικροδομής της κυτταρίνης. Η τακτικότητα που είχε η συγκεκριμένη δομή αλλοιώθηκε, παράλληλα με τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Έτσι, η τελευταία έχει πλέον μεγαλύτερη εκτιθέμενη επιφάνεια και πολλά από τα υδροξύλια της έγιναν τελικά προσβάσιμα από, ενεργοποιημένα με ακυλο-δότη, μόρια ενζύμου (σχήμα 8.10).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός της αδυναμίας διεξαγωγής των αντιδράσεων ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης, στην περίπτωση που ως βιοκαταλύτες χρησιμοποιούνται τα ένζυμα λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei* και ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*. Αντιθέτως, όταν

χρησιμοποιούνται τα ένζυμα λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, η ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel είναι επιτυχής. Κοινώς, φαίνεται πως το ένζυμο λιπάση δεν μπορεί να εστεροποιήσει την κυτταρίνη στις συνθήκες αντίδρασης που επιχειρήθηκαν, ενώ η εστεράση και η κουτινάση μπορούν.



λιπάσες, προσδίδει στις εστεράσες και τις κουτινάσες έναν σχετικά πιο υδρόφιλο χαρακτήρα (Carvalho et al., 1999a; Creveld et al., 2001; Egmond & de Vlieg, 2000; Krisch, 1963; Prompers et al., 1999; Thodi et al., 2008). Το υδατανθρακικό υπόστρωμα πάλι, δηλαδή η κυτταρίνη, είναι εξ' ορισμού υδρόφιλο εξαιτίας του πλήθους των υδροξυλομάδων που διαθέτει. Συνεπώς, υπάρχει μία προτίμηση της σχετικά υδρόφιλης εστεράσης και κουτινάσης στο να προσεγγίσουν τα υδροξύλια της αναγεννημένης κυτταρίνης και να αλληλεπιδράσουν μαζί της. Μία προτίμηση σε σχέση με τις πιο υδρόφοβου χαρακτήρα λιπάσες. Έτσι τα (περισσότερο) υδρόφιλα ένζυμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αγκιστεία με την εξαιρετικά υδρόφιλη κυτταρίνη. Επιπροσθέτως, σε αντίθεση με τις λιπάσες, η καταλυτική τριάδα αμινοξέων της εστεράσης και της κουτινάσης (Ser-His-Asp) δεν βρίσκεται κρυμμένη κάτω από πεπτίδια, αλλά είναι εκτεθειμένη και άμεσα προσβάσιμη.

Οι ουσιαστικές διαφορές όμως μεταξύ της λιπάσης και των δύο άλλων ενζύμων (εστεράση, κουτινάση), ως προς την υπεροχή των τελευταίων για την ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, δεν σταματούν εδώ. Οι κουτινάσες είναι συνήθως πρωτεΐνες μικρότερου μοριακού βάρους και όγκου απ' ό,τι οι λιπάσες (Abergel et al., 1990; Carvalho et al., 1999a; Egmond & de Vlieg, 2000; Gupta et al., 2004; Song et al., 2008). Συγκεκριμένα το μοριακό βάρος της κουτινάσης *Fusarium solani pisi* είναι 22 KDa, ενώ η λιπάση B από *Candida antarctica* έχει μοριακό βάρος 33 KDa. Επίσης δεν θα πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός πως στην περίπτωση των ακινητοποιημένων ενζύμων παίζει ρόλο και ο φορέας ακινητοποίησης, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο είναι ακινητοποιημένα τα ένζυμα (φυσικός εγκλωβισμός, ομοιοπολική πρόσδεση κ.α.). Σύμφωνα με τις προδιαγραφές των τριών διαφορετικών ακινητοποιημένων ενζύμων που χρησιμοποιούνται, ο φορέας ακινητοποίησης της λιπάσης B από *Candida antarctica* (Lewatit, 10-30 mesh) είναι αρκετά μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους φορείς της ακινητοποιημένης εστεράσης από ήπαρ χοίρου (Eupergit, 80-120 mesh) και της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* (Accurel, 60-80 mesh). Και πάλι όμως το μέγεθος των ίδιων των πρωτεϊνών είναι σημαντικό διότι και στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις, το μεγαλύτερο ποσοστό των ενζύμων είναι προσδεμένο στην επιφάνεια των αντίστοιχων φορέων και έρχεται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα του (Bandmann et al., 2000; Barbosa et al., 2011; Carvalho et al., 1999c; Goncalves et al., 1997; Handayani et al., 2011). Για όλους τους παραπάνω λόγους, φαίνεται ότι η προσέγγιση του δικτύου των μορίων κυτταρίνης από τις λιπάσες (ελεύθερες και ακινητοποιημένες) είναι πιο δύσκολη σε σχέση με τις εστεράσες και την κουτινάση.

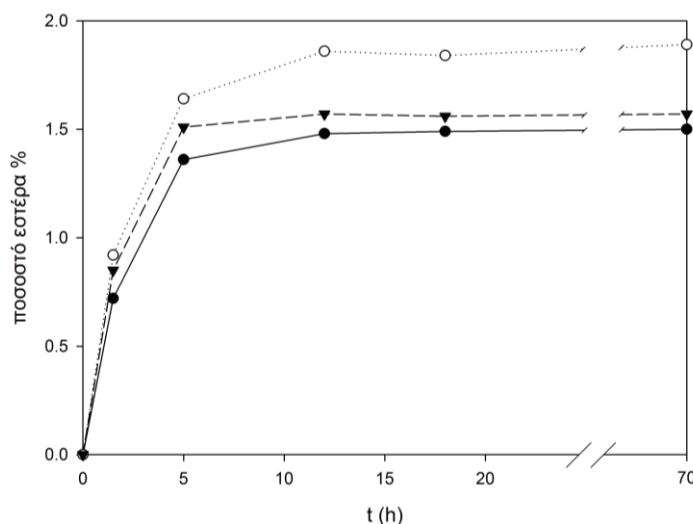
Σχετικά με το άλλο υπόστρωμα της αντίδρασης, τον ακυλο-δότη, επιλέχθηκαν οι βινυλ-εστέρες τριών καρβοξυλικών οξέων με διαφορετικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας. Ο βινυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος (vinyl propionate), ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (vinyl laurate) και ο βινυλ-εστέρας του στεατικού οξέος (vinyl stearate). Η επιλογή των βινυλ-εστέρων ως ακυλο-δοτών, έναντι των ελεύθερων λιπαρών οξέων, έγινε κυρίως διότι έτσι δεν παράγεται H₂O κατά την αντίδραση ακυλίωσης η οποία είναι ουσιαστικά μία αντίδραση συμπύκνωσης. Επομένως με αύξηση της συγκέντρωσης του ύδατος θα ξεκίναγε συστηματικά και μία αντίδραση υδρόλυσης των σχηματισθέντων εστέρων. Επίσης η βινυλική αλκοόλη που απελευθερώνεται σε περίπτωση εστεροποίησης της κυτταρίνης με

την αντίστοιχη ακυλο-ομάδα, ταυτομερίζεται αμέσως σε ακεταλδεΐδη (Yang & Wang, 2004; Yang & Wang, 2003). Έτσι η αλκοόλη αυτή δεν μπορεί να συνδεθεί ξανά με κάποιο ενεργοποιημένο σύμπλοκο ενζύμου-ακυλο-ομάδας και να δράσει ανταγωνιστικά ως προς την ακυλίωση κάποιου υδροξυλίου της κυτταρίνης. Ακόμα, η εστεροποίηση της κυτταρίνης είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκότερη όταν ο ακυλο-δότης είναι ένας βινυλ-εστέρας σε σχέση με το αντίστοιχο ελεύθερο καρβοξυλικό οξύ. Η μετεστεροποίηση είναι μία διαδικασία που απαιτεί λιγότερη ενέργεια σε σχέση με την απευθείας εστεροποίηση (συμπύκνωση) (Fox et al., 2011; Han & Rhee, 1986; Lamare et al., 1997; Louwrier et al., 1996; Yang & Wang, 2003). Ένα πρόσθετο προτέρημα των βινυλ-εστέρων έναντι των ελεύθερων οξέων είναι το ότι βρίσκονται συνήθως σε υγρή φάση. Γι' αυτό το λόγο είναι εφικτή και η πραγματοποίηση αντιδράσεων σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών.

Αναφερόμενοι στο ελεύθερο διαλύτη αντιδρών σύστημα, πρέπει να τονιστεί πως είναι το μόνο στο οποίο επιτεύχθηκε η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες καρβοξυλικών οξέων. Όταν επιχειρήθηκαν οι αντίστοιχες αντιδράσεις σε συστήματα με οργανικούς διαλύτες (8.2.1.1) και ιοντικά υγρά (8.2.1.2), δεν υπήρξε κανένα θετικό αποτέλεσμα ως προς την ακυλίωση της κυτταρίνης. Οι εξηγήσεις των αποτελεσμάτων αυτών στηρίζονται κυρίως στη μη διαλυτότητα του πολυσακχαρίτη και στο ότι δεν ήταν εφικτή η προσέγγιση του διαλυμένου υδρόφοβου ακυλο-δότη στην αδιάλυτη υδρόφιλη κυτταρίνη. Στην περίπτωση των ελεύθερων διαλύτη συστημάτων, η αναγεννημένη κυτταρίνη εξακολουθεί να μην είναι διαλυτή. Όμως τώρα, σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, η ποσότητα του ακυλο-δότη έρχεται σε άμεση επαφή με τη στερεή κυτταρίνη, γεγονός που υποβοηθάται και από την έντονη ανάδευση. Η γειτνίαση μορίων του ακυλο-δότη, αλλά και ενεργοποιημένων μορίων ενζύμου με την αδιάλυτη κυτταρίνη είναι πλέον άμεση και δεν περιορίζεται από κάποιον τρίτο διαλύτη που περιέχει το βινυλ-εστέρα και μεσολαβεί ανάμεσα τους. Σαν αποτέλεσμα, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ενζύμου-ακυλο-ομάδας μπορεί να πλησιάσει κάποιο από τα εκτεθειμένα υδροξύλια της αναγεννημένης κυτταρίνης και να το εστεροποιήσει. Έτσι εξηγείται η διεξαγωγή της αντίδρασης ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών. Μίας αντίδρασης που όπως αποδείχθηκε και αναφέρθηκε παραπάνω, δεν είναι εφικτή απουσία ενζύμου ή παρουσία ενζύμου αλλά με μη προεπεξεργασμένη κυτταρίνη. Και αυτό χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι περιορισμοί που ούτως ή άλλως θέτει η κρυσταλλική δομή της κυτταρίνης.

Στη συνέχεια παρουσιάζεται και σχολιάζεται η χρονική εξέλιξη των επιτυχών αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%. Τα **σχήματα 8.11, 8.12 και 8.13**, απεικονίζουν την πορεία του σχηματισμού των εστερικών δεσμών επί της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%. Οι ανάλογες αντιδράσεις καταλύθηκαν από τα ένζυμα λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, με ακυλο-δότες τους βινυλ-εστέρες του προπιονικού, του λαυρικού και του στεατικού οξέως. Η χρονική πορεία των αντιδράσεων εκφράζεται με βάση το % ποσοστό του εστέρα (**εξίσωση 7.4**). Όπως φαίνεται στο **σχήμα 8.11**, η ακυλίωση της κυτταρίνης με τον προπιονικό βινυλ-εστέρα φτάνει

στις 70 h έως το ποσοστό εστέρα 1.5%, όταν χρησιμοποιούνται ως καταλύτες τα ένζυμα λυοφιλιωμένη και ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου. Στην περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, τότε το ποσοστό εστέρα της παραχθείσας προπιονικής κυτταρίνης προσεγγίζει το 1.9%, στις 70 h αντίδρασης. Βέβαια όπως φαίνεται, όλες οι αντιδράσεις πρακτικά σταθεροποιούνται ως προς την εξέλιξη τους σε χρόνο αρκετά μικρότερο από τις 70 h. Στις 12 h περίπου, οι αντιδράσεις ακυλίωσης έχουν πιάσει πλατό.



Σχήμα 8.11 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Anicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο θινυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (O). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

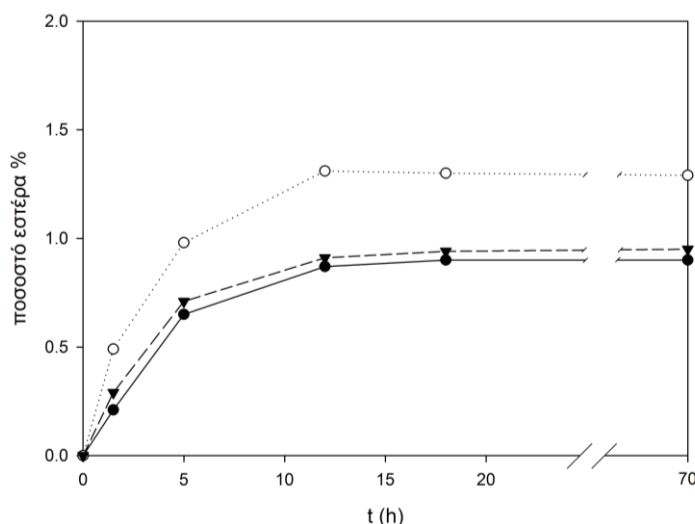
Αξιοσημείωτη είναι η υπεροχή της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* έναντι των δυο εστερασών, ως προς την αρχική ταχύτητα αντίδρασης που επιδεικνύει (μεγαλύτερη κλίση στο αρχικό γραμμικό κομμάτι), αλλά κυρίως ως προς το τελικό ποσοστό σε εστέρα το οποίο φτάνει το 1.9%. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται πιθανότατα στην προτίμηση που έχουν φυσικά οι κουτινάσες για τα μεγαλομόρια (Egmond & de Vlieg, 2000; Fernando et al., 1984; Poulsen et al., 2006; Purdy & Kolattukudy, 1975). Το φυσικό υπόστρωμα της κουτινάσης είναι η κουτίνη· ένα βιοπολυμερές που οι δομικές του μονάδες αποτελούνται από υδροξυ- και επόξυ- λιπαρά οξέα και συνδέονται μεταξύ τους με εστερικούς δεσμούς. Ειδικότερα, οι κουτινάσες διασπούν την κουτίνη μέσω της υδρόλυσης των ανάλογων εστερικών δεσμών. Ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι πως η οξυανιονική οπή του, λαμβάνει και σταθεροποιεί από μόνη της την κατάλληλη καταλυτική διαμόρφωση.

Αντίθετα, στις εστεράσες και τις λιπάσες η απαραίτητη αυτή διαμόρφωση επάγεται όταν συνδεθεί κατάλληλα το εκάστοτε υπόστρωμα (Borreguero et al., 2001; Carvalho et al., 1999a; Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Mannesse et al., 1995). Το συγκεκριμένο γεγονός προσδίδει από μόνο του ένα συγκριτικό πλεονέκτημα στην καταλυτική δράση της κουτινάσης. Επίσης το ένζυμο αυτό είναι και αρκετά πιο σταθερό σε μη υδατικά συστήματα, σε σχέση με τις υπόλοιπες σερίνο-υδρολάσες (Carvalho et al., 1999b; Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 1999c; Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Melo et al., 1998; Sereti et al., 1997).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η σύγκριση των γραφημάτων που αντιστοιχούν στις αντιδράσεις ακυλίωσης με βιοκαταλύτες τη λυοφιλιωμένη και την ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (**σχήμα 8.11**). Αν και σε γενικές γραμμές οι πορείες των δυο αυτών αντιδράσεων δεν διαφέρουν κατά πολύ, υπάρχει εντούτοις μία σχετική υπεροχή της ελεύθερης λυοφιλιωμένης εστεράσης, ως προς την αρχική ταχύτητα των αντιδράσεων και ως προς τις τιμές του % ποσοστού του εστέρα κατά την εξέλιξη αυτών. Η προφανής αιτία είναι ο ελεύθερος χαρακτήρας του λυοφιλιωμένου ενζύμου. Το τελευταίο όντας ελεύθερο είναι σαφώς πιο ευέλικτο από το ακινητοποιημένο, καθώς δεν βρίσκεται σε κάποιον στερεό φορέα ακινητοποίησης και μπορεί να έρχεται σε επαφή με το κυτταρινούχο υπόστρωμα πιο εύκολα.

Μία ακόμα αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι πως οι παραπάνω αντιδράσεις, μετά από τις 12 h περίπου, παρουσιάζουν πλατό και δεν εξελίσσονται περαιτέρω ως προς το σχηματισμό νέων εστερικών ομάδων. Φαίνεται δηλαδή σαν να έχει επέλθει ισορροπία. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη κατάσταση μπορεί να αποδοθεί περισσότερο στο ότι τα στερεοχημικά κυρίως εμπόδια που εξακολουθεί να έχει η δομή της κυτταρίνης, δεν επιτρέπουν στα ενζυμικά μόρια να ακυλώσουν περαιτέρω τον πολυσακχαρίτη. Είναι σαν να εξαντλούνται τα πραγματικά προσβάσιμα και δραστικά υδροξύλια της κυτταρίνης και έτσι ανάλογα με το είδος του βιοκαταλύτη και του ακυλο-δότη, η αντίδραση διεξάγεται μέχρι ενός ορίου. Έτσι λοιπόν δεν πρόκειται για μία κατάσταση χημικής ισορροπίας με την αυστηρή θερμοδυναμική έννοια, καθώς η αντίδραση μεταξύ μίας υδροξυλομάδας και ενός ενεργοποιημένου ακυλο-δότη, θα είχε μεγάλο δυναμικό.

Αντίστοιχη συμπεριφορά επιδεικνύουν και οι ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης με τους μεγαλύτερου μήκους ακυλο-δότες: το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα. Στην περίπτωση που ακυλο-δότης είναι ο λαυρικός βινυλ-εστέρας, το ποσοστό του εστέρα στις 70 h, όταν βιοκαταλύτης είναι η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου ανέρχεται σε 1.1%, ενώ όταν χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου το αντίστοιχο ποσοστό φτάνει το 0.9% (**σχήμα 8.12**). Στην περίπτωση του λαυρικού βινυλ-εστέρα λοιπόν, η ελεύθερη εστεράση έχει σαφώς καλύτερη απόδοση αλλά και αρχική ταχύτητα απ' ότι η ακινητοποιημένη. Η καλύτερη όμως απόδοση παρατηρείται όταν ως ένζυμο χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, με ποσοστό εστέρα στις 70 h, ίσο με 1.3%. Και πάλι λοιπόν η κουτινάση επιδεικνύει καλύτερα καταλυτικά χαρακτηριστικά από τις δυο εστεράσες.

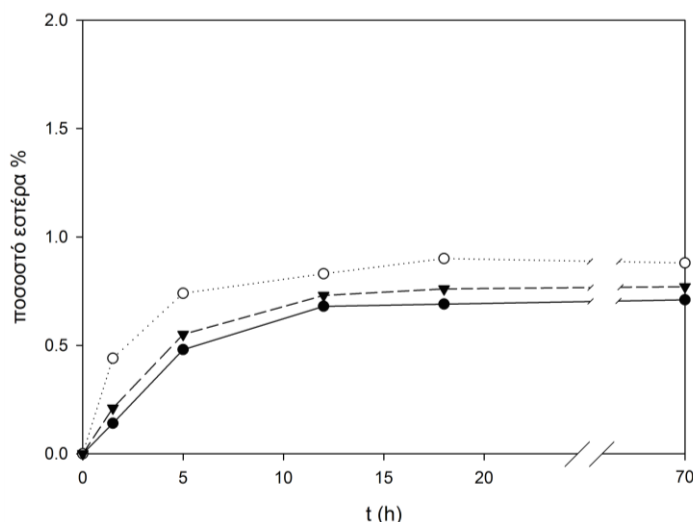


Σχήμα 8.12 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (○). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Στην περίπτωση που ως ακυλο-δότης χρησιμοποιείται ο στεατικός βινυλ-εστέρας, το ποσοστό του εστέρα στις 70 h αντίδρασης είναι 0.6% για τη λυοφιλιωμένη και την ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (**σχήμα 8.13**). Όταν χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, τότε το ποσοστό της κυτταρίνης σε εστέρα ανέρχεται στο 0.9%. Και πάλι διακρίνεται η υπεροχή της κουτινάσης σε σχέση με τις εστεράσες που χρησιμοποιήθηκαν για την εστεροποίηση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel. Αναφορικά με τις δύο εστεράσες, φαίνεται γενικά πως δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση στην τιμή του τελικού ποσοστού σε εστέρα. Η μεγαλύτερη διαφορά τους έγκειται στον αρχικό ρυθμό της αντίδρασης όπου η ελεύθερη λυοφιλιωμένη εστεράση, όντας πιο ευέλικτη και διαχυτική, καταφέρνει να ακυλίώσει τις υδροξυλομάδες της κυτταρίνης σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

Παρατηρώντας τα τρία παραπάνω διαγράμματα και συγκρίνοντας τα μεταξύ τους, είναι έκδηλη η μείωση της απόδοσης της αντίδρασης με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη. Μάλιστα αυτή η παρατήρηση ισχύει και για τους τρεις βιοκαταλύτες. Το μέγιστο ποσοστό σε εστέρα που έχει η προπιονική κυτταρίνη είναι 1.9%, ενώ τα μέγιστα ποσοστά εστέρα της λαυρικής και της στεατικής κυτταρίνης είναι 1.3 και 0.9% αντίστοιχα. Φαίνεται λοιπόν πως όσο αυξάνει το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη, αυξάνεται και η στερεοχημική παρεμπόδιση από την πλευρά της δομικά δύσκολης κυτταρίνης. Επίσης το ενεργοποιημένο ένζυμο με την μακρύτερη αλειφατική αλυσίδα, είναι

πιο δύσκολο να προσεγγίσει την υδρόφιλη κυτταρίνη αφού όσο μακρύτερη είναι η αλειφατική αλυσίδα, τόσο πιο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει.



Σχήμα 8.13 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του στεατικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (○). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Μία γενικότερη παρατήρηση για το σύνολο των παραπάνω αντιδράσεων είναι πως το μέγιστο για κάθε περίπτωση ποσοστό του εστέρα, βρίσκεται σε σχετικά χαμηλό επίπεδο. Η καλύτερη απόδοση απαντάται στην προπιονική κυτταρίνη, με ένζυμο την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* και ποσοστό εστέρα στις 70 h αντίδρασης, ίσο με 1.9%. Οι αντίστοιχες μέγιστες τιμές του ποσοστού σε εστέρα για τη λαυρική και τη στεατική κυτταρίνη είναι 1.3 και 0.9% αντίστοιχα, όταν βιοκαταλύτης είναι και πάλι η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την απουσία διαλυτότητας του αρχικού κυτταρινούχου υποστρώματος στο σύστημα αντίδρασης, οδηγούν σε ένα αρκετά πιθανό συμπέρασμα· η ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel υπό τις παραπάνω συνθήκες, έλαβε χώρα κυρίως στην επιφάνεια του πολυσακχαρίτη και ελάχιστα εξελίχθηκε στα ενδότερα του δικτύου των κυτταρινικών μορίων. Βέβαια και στην περίπτωση αυτή η προκατεργασία της κυτταρίνης ήταν απαραίτητη.

Τέλος, για να επαλυθευτεί η θεώρηση πως οι παραπάνω ενζυμικές αντιδράσεις σταματούν να εξελίσσονται μετά τις 12 h περίπου εξαιτίας της εξάντλησης των διαθέσιμων δραστικών υδροξυλίων της κυτταρίνης, έγινε μία σειρά από επιπλέον δοκιμές. Παράλληλα με τις αντιδράσεις που μελετήθηκαν

προηγούμενως, πραγματοποιήθηκαν και όμοιες αντίστοιχες αντιδράσεις με μόνη διαφορά το δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης Avicel. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel με το μεγαλύτερο δείκτη κρυσταλλικότητας που προέκυψε (52.8%), σε αντιπαραβολή με αυτή που έχει ως τώρα χρησιμοποιηθεί και έχει τη μικρότερη τιμή δείκτη κρυσταλλικότητας (44.8%). Οι εν λόγω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία των ενζύμων λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Ως αντιπροσωπευτικός ακυλοδότης χρησιμοποιήθηκε ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέως. Έτσι, μετά το πέρας των αντιδράσεων (70 h) μετρήθηκε το % ποσοστό του εστέρα των ανάλογων προϊόντων (πίνακας 8.13).

Πίνακας 8.13 Ποσοστό (%) του λαυρικού εστέρα της κυτταρίνης, μετά από διάρκεια 70 h των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8 και 52.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

CrI %	Ένζυμο	Ποσοστό εστέρα %
44.8	εστεράση από ήπαρ χοίρου	1.1
	ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.9
	ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	1.3
52.8	εστεράση από ήπαρ χοίρου	1.0
	ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.7
	ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	1.0

Παρατηρώντας την τιμή του % ποσοστού του λαυρικού εστέρα στις 70 h αντίδρασης για κάθε βιοκαταλύτη ξεχωριστά, αποδεικνύεται πως όταν το κυτταρινούχο υπόστρωμα έχει υψηλότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, τότε το αντίστοιχο ποσοστό του εστέρα είναι χαμηλότερο. Συνεπώς η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης Avicel ευνοείται όταν η τελευταία έχει λιγότερο κρυσταλλική δομή. Με άλλα λόγια, η αλλοίωσης της συμπαγούς δομής της κυτταρίνης αποτελεί ελέγχον στάδιο για την προσέγγιση ενζύμου και λιπαρού υποστρώματος στα υδροξύλια της.

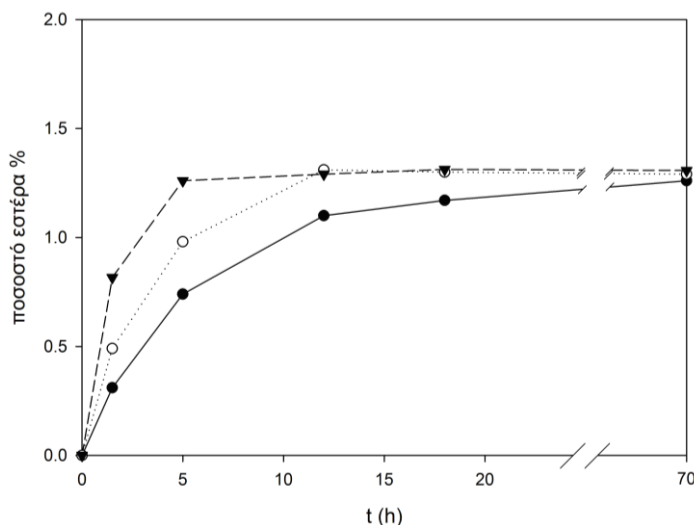
8.2.1.3.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Στην προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκαν και μελετήθηκαν οι ελεύθερες διαλύτη αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με τον οξικό, το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα, χρησιμοποιώντας ως

βιακαταλύτες τα ένζυμα λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Επίσης αποδείχθηκε πως η πραγματοποίηση των παραπάνω αντιδράσεων οφείλεται στη δράση του ενζύμου. Είναι λοιπόν σημαντικό το να μελετηθεί και η επίδραση που έχει η ενζυμική συγκέντρωση στην εξέλιξη και την πορεία των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Για το λόγο αυτό προετοιμάστηκαν αντιδρώντα συστήματα πανομοιότυπα με τα προηγούμενα, με μόνη διαφορά τη συγκέντρωση του ενζύμου. Για κάθε σύστημα, 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel αναμείχθηκαν με 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα και στο τέλος προστέθηκαν 0.1, 0.25 ή 0.4 U/mg κυτταρίνης. Προφανώς τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν ήταν αυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να καταλύουν τη συγκεκριμένη αντίδραση, δηλαδή η λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία επώασης του συνόλου των αντιδράσεων ήταν 50 °C και υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm). Τέλος, η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου

Στην περίπτωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%, για κάθε έναν από τους τρεις βινυλ-εστέρες και για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζεται η ίδια χαρακτηριστική συμπεριφορά. Για ευνόητους λόγους λοιπόν κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστεί μόνο ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα στο οποίο να φαίνεται η πρόοδος της αντίδρασης, μεταβαλλόμενης της συγκέντρωσης του ενζύμου. Έτσι στο **σχήμα 8.14** φαίνεται η εξέλιξη της ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με το λαυρικό βινυλ-εστέρα και με βιοκαταλύτη την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*.

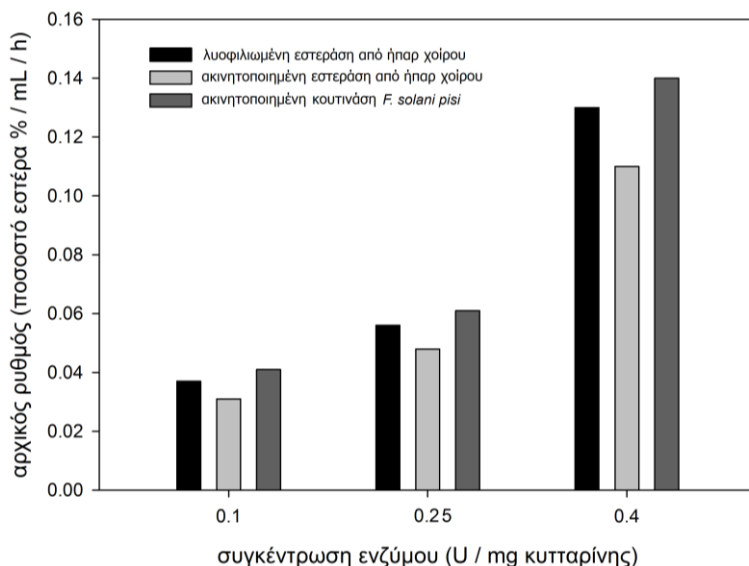
Παρατηρείται πως και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης), η εξέλιξη της αντίδρασης έχει παρόμοια πορεία. Στις πρώτες ώρες το ποσοστό του εστέρα αυξάνει με σχετικά υψηλό ρυθμό και στη συνέχεια σταθεροποιείται γύρω από μία τελική τιμή. Αυτό που αλλάζει με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενζύμου όμως δεν είναι το τελικό ποσοστό του εστέρα, αλλά ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ενζύμου, αυξάνεται και η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης εστεροποίησης. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το ότι ο συγκεκριμένος τύπος αντίδρασης ελέγχεται κινητικά από την παρουσία του ενζύμου. Έτσι όταν υπάρχουν περισσότερα units ενζύμου, το τελικό ποσοστό εστεροποίησης της ανάλογης αντίδρασης επιτυγχάνεται πιο σύντομα. Το ίδιο το ποσοστό δεν αλλάζει και αυτό είναι εύλογο. Όπως φάνηκε, η συγκεκριμένη αντίδραση προχωράει μέχρι ενός ορίου. Το ένζυμο είναι ο καταλύτης που όσο περισσότερος είναι, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται και η αντίδραση. Για ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, όταν υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός ενζύμων, συνάπτονται και περισσότεροι εστερικοί δεσμοί. Αντίστροφα, για να επιτευχθεί κάποιο συγκεκριμένο ποσοστό εστεροποίησης, απαιτείται λιγότερος χρόνος. Άρα έχουμε αυξημένη ταχύτητα. Το τελικό ποσοστό του εστέρα δε μεταβάλλεται ιδιαίτερα γιατί καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα και το πλήθος των ενεργών υδροξυλίων και όχι από τη συγκέντρωση του βιοκαταλύτη.



Σχήμα 8.14 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL), ενώ ο βιοκαταλύτης ήταν η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm). Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.1 (●), 0.25 (○) και 0.4 U/mg κυτταρίνης (▼).

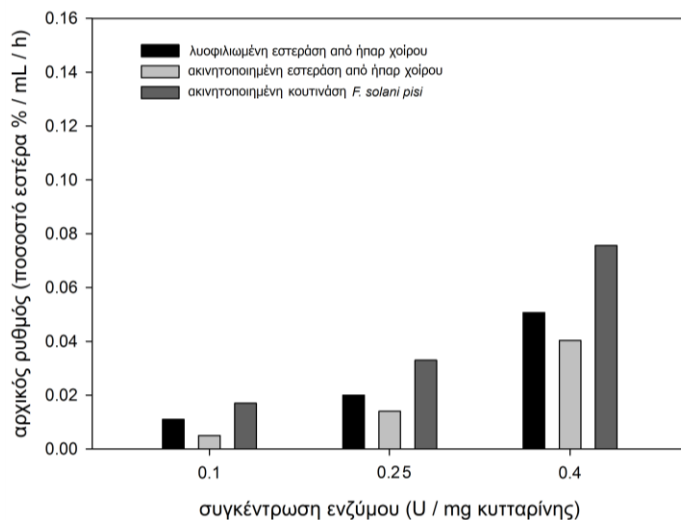
Με βάση τα παραπάνω, είναι σκόπιμο να συγκριθούν οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων ακυλίωσης της κυτταρίνης, για κάθε ακυλο-δότη και για κάθε ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε. Η ταχύτητα της αντίδρασης ορίζεται ως το % ποσοστό του εστέρα που σχηματίστηκε ανά μονάδα όγκου της αντίδρασης (mL) και ανά μονάδα χρόνου (h).

Στο **σχήμα 8.15** παρατίθενται οι τιμές των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (δείκτης κρυσταλλικότητας 44.8%), με τον προπιονικό βινυλ-εστέρα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Όπως φαίνεται και για τους τρεις βιοκαταλύτες, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ενζύμου, αυξάνεται ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης. Επίσης για κάθε μία από τις τιμές συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου εμφανίζει το μικρότερο αρχικό ρυθμό αντίδρασης, με την λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου να έχει μεγαλύτερη αρχική ταχύτητα. Ο συνολικά μεγαλύτερος αρχικός ρυθμός όμως παρουσιάζεται από την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Και πάλι αναδεικνύεται η συγκριτική υπεροχή της ακινητοποιημένης κουτινάσης έναντι των δυο άλλων εστερασών, ανεξάρτητα με το αν είναι ακινητοποιημένες ή ελεύθερες.

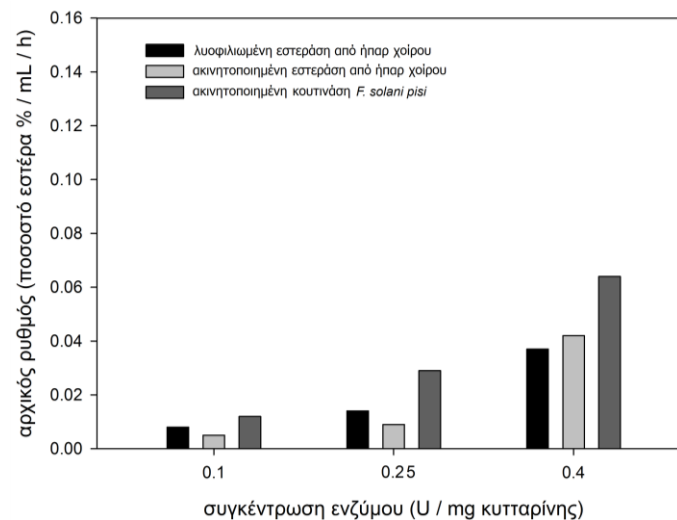


Σχήμα 8.15 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%, σε περιβάλλον ελεύθερο διαλύτη. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο προπιονικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).

Εντελώς αντίστοιχα είναι και τα ανάλογα αποτελέσματα των ακυλίωσεων με το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα (σχήματα 8.16 και 8.17). Η μοναδική επιπλέον παρατήρηση αφορά στη μείωση της τάξης μεγέθους των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων, καθώς αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται αφενός στην εντονότερη στερεοχημική παρεμπόδιση που απαντάται στα μεγαλύτερου μήκους μόρια και αφετέρου στον αυξημένο υδρόφοβο χαρακτήρα που αυτά έχουν. Το τελευταίο είναι μειονέκτημα για την εξέλιξη της αντίδρασης, εφόσον το άλλο υπόστρωμα που πρέπει να προσεγγιστεί είναι η εξαιρετικά υδρόφιλη κυτταρίνη.



Σχήμα 8.16 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλυτή αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο λαυρικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).



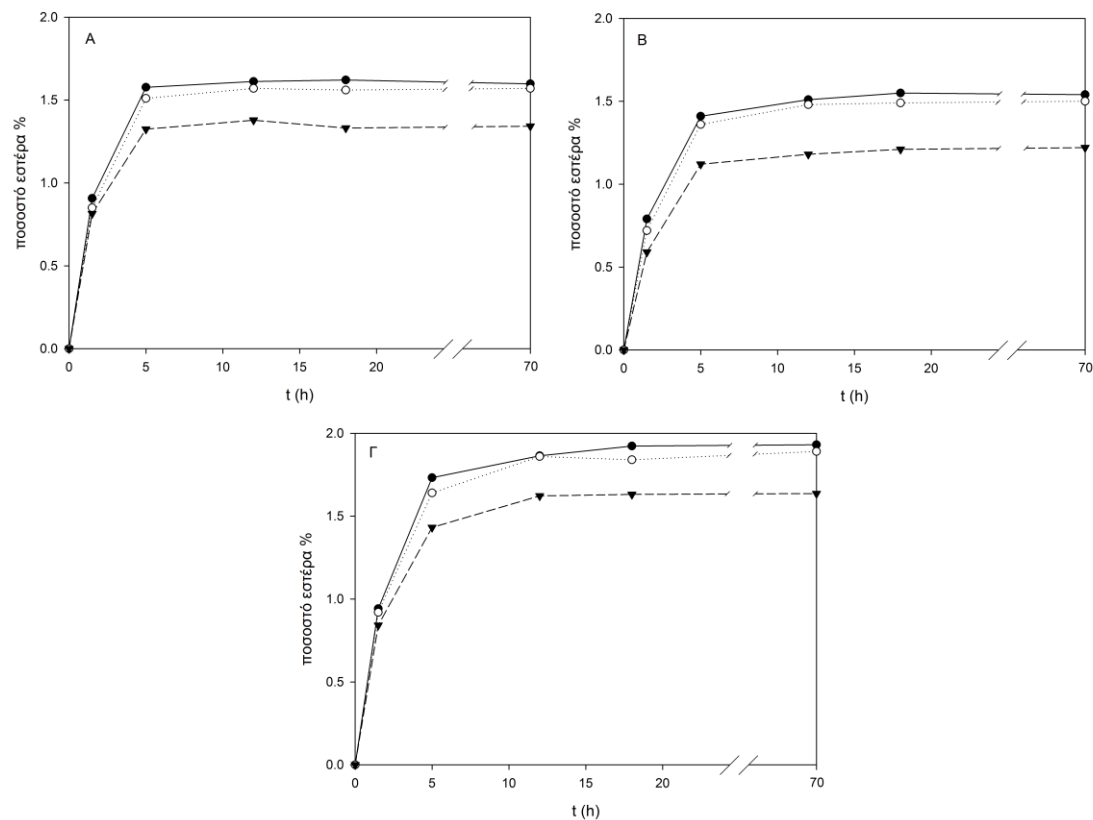
Σχήμα 8.17 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλυτή αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο στεατικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).

8.2.1.3.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

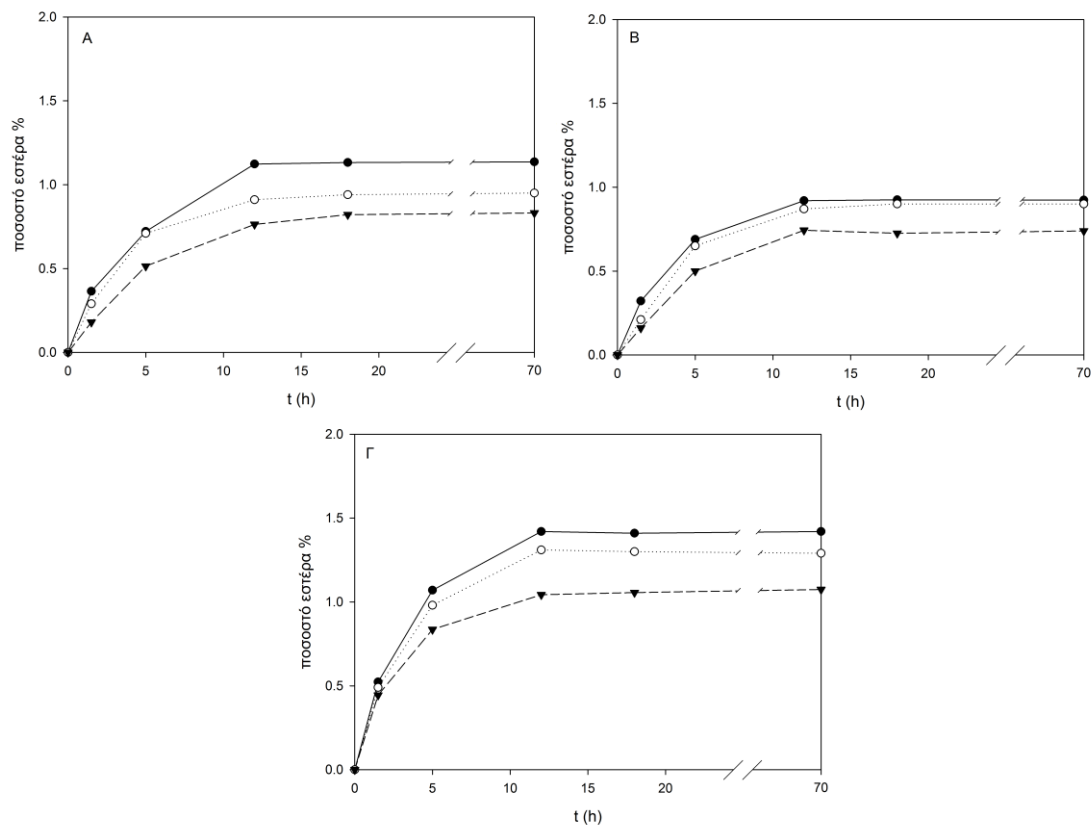
Στο πλαίσιο της μελέτης των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, εξετάζεται μία ακόμα παράμετρος. Η αρχική ποσότητα του πολυσακχαρίτη που προστίθεται στο αντιδρών μείγμα. Για το λόγο αυτό, προετοιμάστηκαν συστήματα που το κάθε ένα περιείχε 10 mL βινυλ-εστέρα και 100, 150 ή 200 mg αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8%. Στο τέλος προσθέτονταν και ο βιοκαταλύτης, με συγκέντρωση 0.25 U/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η λυοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία επώασης του συνόλου των αντιδράσεων ήταν 50 °C και υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm). Τέλος, η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου. Στην περίπτωση που ακυλο-δότης είναι ο προπιονικός βινυλ-εστέρας και για κάθε ένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, παρατηρείται αύξηση του τελικού ποσοστού του κυτταρινούχου εστέρα, όταν η αρχική ποσότητα της κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα ελαττώνεται από τα 200 στα 100 mg (**σχήμα 8.18**).

Όταν στα 10 mL βινυλ-εστέρα, η ποσότητα της κυτταρίνης είναι 100 mg, τότε το τελικό ποσοστό του σχηματιζόμενου εστέρα κυτταρίνης είναι υψηλότερο από αυτό που αντιστοιχεί σε αντίδραση με το ίδιο ένζυμο και αρχική ποσότητα κυτταρίνης ίση με 150 mg. Επίσης ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης είναι ελαφρά αυξημένος στις αντιδράσεις με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel. Αντίθετα, όταν η αρχική ποσότητα της κυτταρίνης στο ανάλογο αντιδρών σύστημα αυξάνεται στα 200 mg, τότε παρατηρείται σημαντική μείωση στο τελικό ποσοστό του εστέρα. Αντίστοιχη μειωτική τάση έχει και ο ανάλογος αρχικός ρυθμός της αντίδρασης αυτής. Με βάση την παραπάνω συμπεριφορά αποδεικνύεται πως όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα της μεγαλομοριακής κυτταρίνης στο αντιδρών σύστημα, τόσο πιο δύσκολα διεξάγεται η ενζυμική της ακυλίωση. Ο πλέον προφανής λόγος είναι πως με αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης που είναι ένα πολυμερές, αυξάνεται το φαινόμενο ιξώδες του όλου συστήματος και έτσι η κινητικότητα των ενζυμικών μορίων και των μορίων του βινυλ-εστέρα μειώνεται. Δηλαδή τεχνηέντως αυξάνονται οι αντιστάσεις στη μεταφορά μάζας· κάτι που είναι ιδιαίτερος ανεπιθύμητο σε περιπτώσεις που το υπόστρωμα είναι αδιάλυτο, όπως εδώ. Παράλληλα όμως με την αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης στο δεδομένο όγκο του βινυλ-εστέρα, μειώνεται ουσιαστικά και η διαθεσιμότητα του τελευταίου. Αυτό συμβαίνει διότι ταυτόχρονα μειώνεται η σχετική μοριακή αναλογία βινυλ-εστέρα/κυτταρίνης.

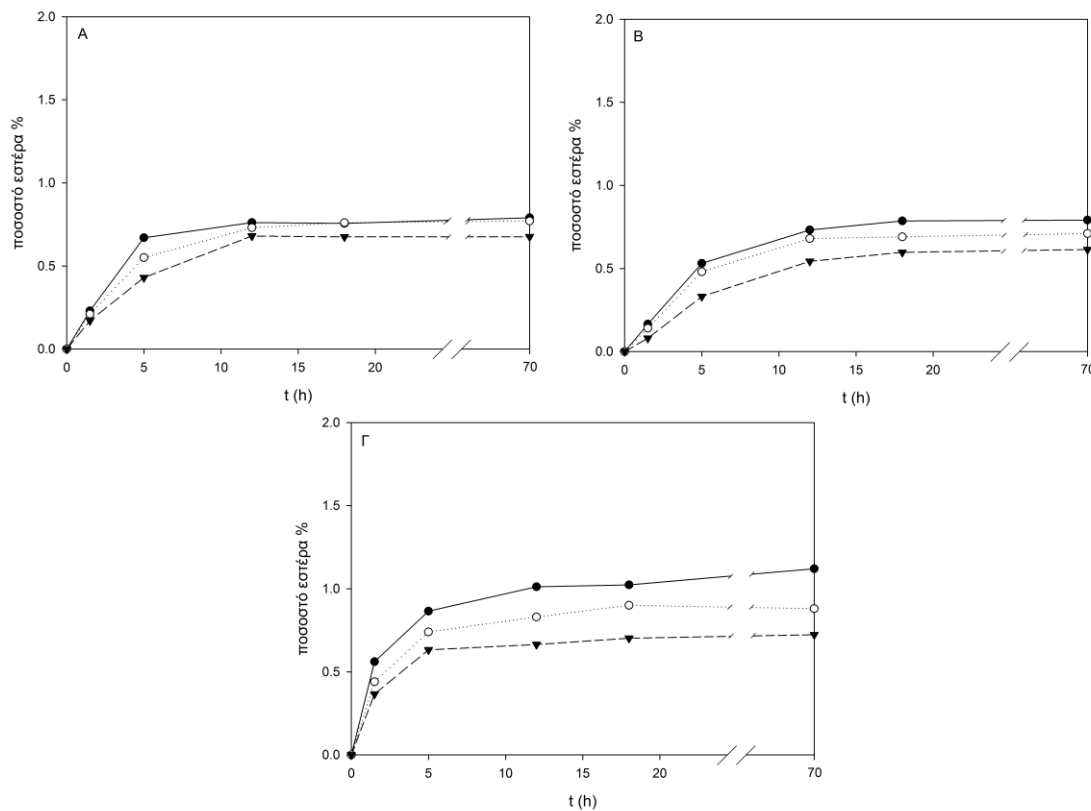
Παρόμοια συμπεριφορά επιδεικνύουν και οι αντιδράσεις στις οποίες το ρόλο του ακυλο-δότη τον παίζουν οι λιπαροί βινυλ-εστέρες του λαυρικού και του στεατικού οξέος (**σχήματα 8.19** και **8.20**). Ο κανόνας που φαίνεται να ισχύει για τις συνθήκες που μελετήθηκαν, είναι πως αυξανόμενης της ποσότητας της κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα, μειώνεται ο ρυθμός της ενζυμικής ακυλίωσης αλλά και η τελική τιμή του ποσοστού του σχηματισθέντος εστέρα της κυτταρίνης.



Σχήμα 8.18 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλοδότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Α), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Β) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



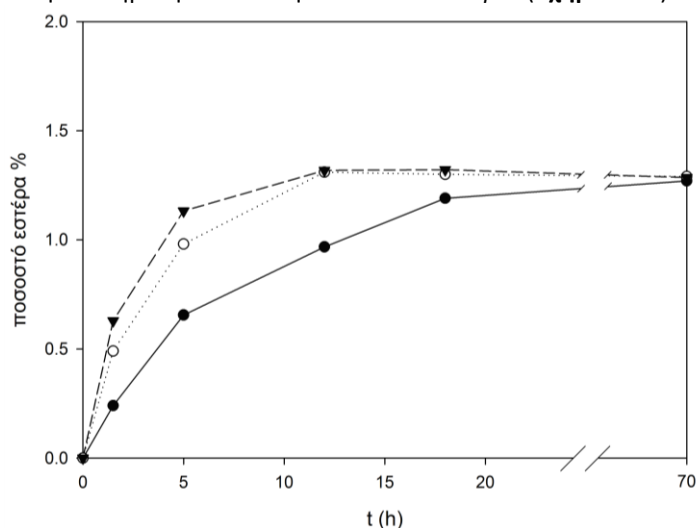
Σχήμα 8.19 Πρόσδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Α), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Β) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.20 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Anicel, με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του στεατικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυσοφιλωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Α), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Β) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

8.2.1.3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Η θερμοκρασία διεξαγωγής μίας αντίδρασης αποτελεί μία από τις βασικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την ταχύτητα και την απόδοση της. Όταν μάλιστα πρόκειται για μία ενζυμική αντίδραση, τότε η θερμοκρασιακή εξάρτηση της πορείας της αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Έτσι, για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην εξέλιξη των ενζυμικών ακυλίωσεων της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, προετοιμάστηκαν αντιδρώντα συστήματα αποτελούμενα από 150 mg της κυτταρίνης και 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα. Έπειτα προστέθηκαν 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Φυσικά, τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτά τα οποία έχουν την ικανότητα να καταλύουν τη συγκεκριμένη αντίδραση, δηλαδή η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας επώασης που δοκιμάστηκαν ήταν 40, 50 και 60 °C. Ακόμα υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm) και η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου. Με κριτήριο τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατηρείται πως για κάθε έναν βινυλ-εστέρα και για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα, η τιμή του τελικού ποσοστού εστεροποίησης στις 70 h αντίδρασης δεν μεταβάλλεται σημαντικά ως προς τη θερμοκρασία. Αντιπροσωπευτικά παρατίθεται το σχετικό διάγραμμα που αφορά στην ακυλίωση της κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα, χρησιμοποιώντας το ένζυμο ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* (σχήμα 8.21).



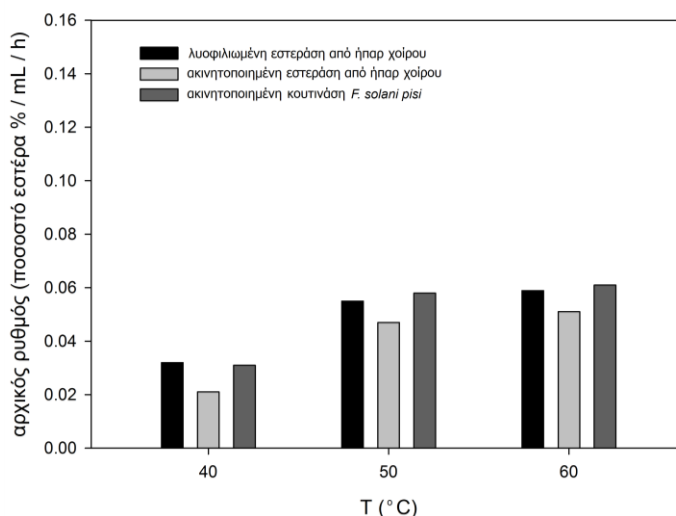
Σχήμα 8.21 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL) και ο βιοκαταλύτης ήταν η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40 (●), 50 (○) και 60 °C (▼). Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Αντιθέτως, ο αρχικός ρυθμός των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης δείχνει να επηρεάζεται από τις θερμοκρασιακές μεταβολές. Για το λόγο αυτό είναι πιο εποικοδομητικό να παρουσιαστούν συγκριτικά οι τιμές της αρχικής ταχύτητας των συγκεκριμένων αντιδράσεων, ως προς τη θερμοκρασία διεξαγωγής αυτών.

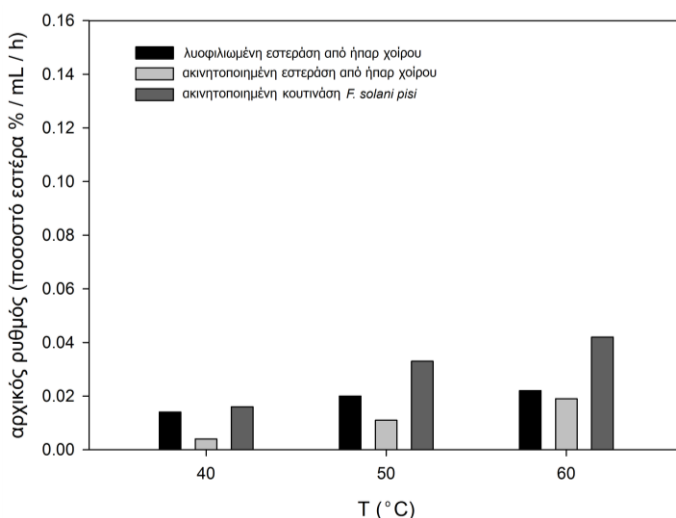
Παρατηρώντας το παραπάνω σχήμα φαίνεται γενικά πως αυξανόμενης της θερμοκρασίας, αυξάνεται και ο ρυθμός της ενζυμικής ακυλίωσης. Παρόλα αυτά όμως, μετά τους 50 °C η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται, αλλά όχι αναλογικά. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα που αφορούν στην αντίδραση που επιτελείται στους 50 °C δεν διαφέρουν ιδιαίτερα από αυτά των 60 °C. Με μία πρώτη σκέψη αυτό δεν είναι πολύ λογικό διότι σύμφωνα με τον κανόνα του Arrhenius, όσο αυξάνεται η θερμοκρασία διεξαγωγής μίας αντίδρασης, αυξάνεται αναλογικά και η ταχύτητα της. Επίσης οι εστεροποιήσεις από μόνες τους είναι αντιδράσεις που ευνοούνται από τις υψηλές θερμοκρασίες (Kraai et al., 2008; Lamare et al., 1997; Sigurgisladottir et al., 1993; Stamatis et al., 1993). Τι είναι αυτό που συμβαίνει λοιπόν; Η εξήγηση είναι απλή αν λάβει κανείς υπ' όψη του την πρωτεϊνική φύση των ενζύμων. Οι βέλτιστες τιμές θερμοκρασίας στις οποίες τα περισσότερα ένζυμα είναι σταθερά, κυμαίνονται γύρω στους 35-40 °C. Συνυπολογίζοντας λοιπόν τις δυο παραπάνω αντικρουόμενες θεωρήσεις, προκύπτει το συμπέρασμα πως οι ενζυμικές δράσεις παρουσιάζουν κάποια βέλτιστη θερμοκρασιακή περιοχή. Για αυτό το λόγο, αν και θα αναμένονταν στους 60 °C η ταχύτητα της αντίδρασης να είναι αισθητά υψηλότερη απ' ό τι στους 50 °C, σε αυτές τις δύο τιμές θερμοκρασίας η πορεία των ανάλογων αντιδράσεων είναι παρόμοια. Προφανώς μετά τους 50 °C, το φαινόμενο της θερμικής μετουσίωσης των ενζύμων που χρησιμοποιούνται αρχίζει να γίνεται αισθητό.

Η συμπεριφορά αυτή επαναλαμβάνεται για την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* και με τους άλλους δύο βινυλ-εστέρες (προπιονικός και στεατικός). Τα ίδια ισχύουν επίσης και για τα αλλά δύο ένζυμα, την ελεύθερη και την ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, με τους τρεις διαφορετικούς ακυλο-δότες (**σχήματα 8.22, 8.23 και 8.24**).

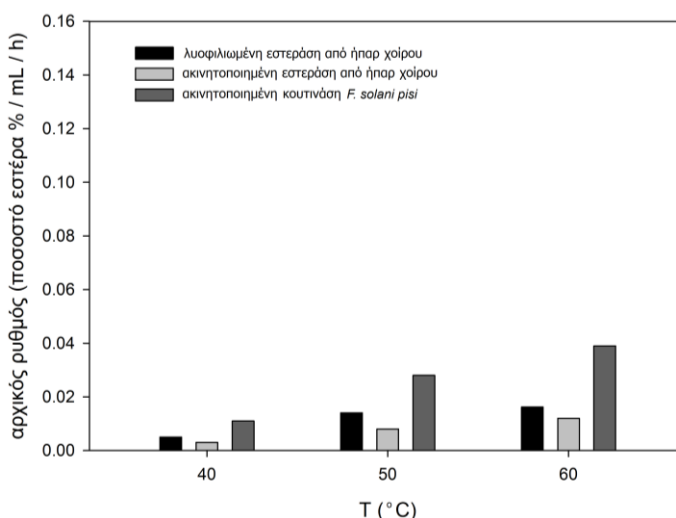
Η αρχική ταχύτητα της ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης αυξάνεται αισθητά με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 50 °C. Μικρότερη αύξηση παρατηρείται όταν η θερμοκρασία ανέρχεται από τους 50 στους 60 °C. Βέβαια και σε αυτήν την περίπτωση, όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο η αντίστοιχη αύξηση της αρχικής ταχύτητας είναι υψηλότερη απ' όταν είναι ελεύθερο. Αυτό δικαιολογείται καθώς ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενζύμων είναι η αυξημένη θερμική τους σταθερότητα.



Σχήμα 8.22 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο προπιονικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.23 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο λαυρικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.24 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 44.8%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο στεατικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

8.2.2 Ενζυμική εστεροποίηση της προεπεξεργασμένης σε ιοντικά υγρά ινώδους κυτταρίνης

Όπως και στην περίπτωση της κυτταρίνης Avicel, έτσι και η προκατεργασία της ινώδους κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc έχει σαν στόχο την τροποποίηση της μικροδομής της, έτσι ώστε τα υδροξύλια της να γίνουν προσβάσιμα και να καταστεί ευκολότερη η ενδεχόμενη ενζυμική τους εστεροποίηση με αλειφατικές αλυσίδες. Από τη συγκεκριμένη προκατεργασία προκύπτει αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη με σημαντικά μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας, γεγονός ενδεικτικό της μερικής αποδιάταξης της δομής του πολυσακχαρίτη. Από τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχθηκε πως η αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη, ως προϊόν κατεργασίας στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, χαρακτηρίζεται από δείκτη κρυσταλλικότητας της τάξης του 54%. Αντίστοιχα, όταν η κατεργασία έγινε στο ιοντικό υγρό [emim]OAc, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης ήταν της τάξεως του 58-59%. Ο αρχικός δείκτης κρυσταλλικότητας του ακετέργαστου πολυσακχαρίτη είναι 90.7%.

Με βάση τα παραπάνω, για τις περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης της κυτταρίνης, επιλέγεται ως κυτταρινούχο υπόστρωμα η αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη με το μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας που προέκυψε

(πίνακας 8.9). Η κυτταρίνη αυτή προέρχεται από κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl και έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%.

8.2.2.1 Αντιδράσεις σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη

Σχετικά με την ενζυμική εστεροποίηση της κυτταρίνης σε οργανικούς διαλύτες, χρησιμοποιήθηκαν δυο κοινοί διαλύτες οι οποίοι απαντώνται συχνά σε μη συμβατικές βιοκαταλυτικές δράσεις. Το εξάνιο και το ακετονιτρίλιο. Καταρχήν και οι δυο αυτοί διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενζυμικές αντιδράσεις χωρίς να μετουσιώνουν σημαντικά το ένζυμο, ώστε να περιορίζεται η δραστηριότητά του (Ikeda & Klibanov, 1993; Klibanov, 1988; Sereti et al., 1998; Sereti et al., 2001). Το εξάνιο επιλέγεται σαν ένας υδρόφοβος διαλύτης που μπορεί να διαλύει τα λιπαρά υποστρώματα, ενώ το ακετονιτρίλιο έχει έναν πιο υδρόφιλο χαρακτήρα. Βέβαια η κυτταρίνη παραμένει αδιάλυτη και στα δύο αυτά διαφορετικά μέσα.

Ένα τυπικό σύστημα αντίδρασης αποτελείται από 150 mg αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, 10 mL διαλύματος βινυλ-εστέρα σε εξάνιο ή ακετονιτρίλιο, με συγκέντρωση 0.6 M και 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Οι βινυλ-εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά είναι οι: προπιονικός βινυλ-εστέρας (vinyl propionate), δωδεκανοϊκός ή λαυρικός βινυλ-εστέρας (vinyl laurate) και δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός βινυλ-εστέρας (vinyl stearate). Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν μεμονωμένα είναι τα ακόλουθα: λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις επιτελέστηκε σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σετ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σετ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη κυτταρίνη ήταν ακατέργαστη. Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Για κανένα από τους τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες και με κανένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα δεν σχηματίστηκε ο ανάλογος εστέρας κυτταρίνης, σε περιβάλλον εξανίου ή ακετονιτρίλιου.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν παρόμοια αντιδρώντα μείγματα στα οποία άλλαζε η συγκέντρωση του βινυλ-εστέρα. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την αρχική· συγκεντρώσεις ίσες με 0.8 και 1 M. Ακόμα δοκιμάστηκαν και τιμές συγκέντρωσης βινυλ-εστέρα μικρότερες από την αρχική (0.1, 0.2 και 0.4 M), για να ελεγχθεί η πιθανότητα παρεμπόδισης της ενζυμικής δράσης από το υπόστρωμα. Και πάλι όμως τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς τη δημιουργία εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης.

Συνεπώς, οι αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης στους οργανικούς διαλύτες εξάνιο και ακετονιτρίλιο δεν

επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα (πίνακας 8.14). Η αιτία πηγάζει προφανώς από το ότι το κυτταρινούχο υπόστρωμα, αν και με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας, δεν είναι διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι δεν είναι εφικτή η προσέγγιση του από το εκάστοτε ένζυμο και το ανάλογο υπόστρωμα. Απεναντίας το τελευταίο βρίσκεται στη φάση του οργανικού διαλύτη, απομακρυσμένο από τα μόρια κυτταρίνης. Φαίνεται λοιπόν πως σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες, η προκατεργασία της ινώδους κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας και δραστηριότητας των υδροξυλίων της, δεν είναι ικανή για την ενζυμική εστεροποίηση της με αλειφατικές αλυσίδες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ταυτόσημα με τα ανάλογα που αφορούσαν στην αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel.

Πίνακας 8.14 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιδράσεων ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη.

Βιοκαταλύτης	Οργανικός διαλύτης	Cri % αναγεννημένης κυτταρίνης	Βινυλ-εστέρας (ακυλο-δότης)	Αποτέλεσμα αντίδρασης
Το σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία	εξάνιο	54.0	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό
	ακετονιτρίλιο	54.0	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό

8.2.2.2 Αντιδράσεις σε περιβάλλον ιοντικών υγρών

Για λόγους που αναφέρθηκαν και αναλύθηκαν σε προηγούμενη παράγραφο (8.2.1.2), επιχειρήθηκε η αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης σε δύο ιοντικά υγρά που έχουν αποδεδειγμένα χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την ενζυμική τροποποίηση μικρότερων σακχάρων: το [bmim]PF6 και το [bmim]BF4. Η βασική διαφορά τους είναι πως το [bmim]PF6 είναι περισσότερο υδρόφοβο από το ιοντικό υγρό [bmim]BF4, το οποίο είναι αναμίξιμο με το νερό.

Ένα τυπικό σύστημα αντίδρασης αποτελείται από 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης, 10 mL διαλύματος βινυλ-εστέρα σε [bmim]PF6 ή [bmim]BF4, με συγκέντρωση 0.6 M και 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Οι βινυλ-εστέρες που δοκιμάστηκαν είναι οι: προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις επιτελέστηκε σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σετ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σετ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη κυτταρίνη ήταν ακατέργαστη. Σε κανένα από τα παραπάνω συστήματα δεν ανιχνεύθηκε το επιθυμητό προϊόν. Για κανέναν από τους τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες και με κανένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα δεν σχηματίστηκε ο ανάλογος εστέρας κυτταρίνης, στο περιβάλλον του ιοντικού υγρού [bmim]PF6 ή [bmim]BF4.

Στη συνέχεια προετοιμάστηκαν παρόμοια αντιδρώντα μείγματα στα οποία άλλαζε η συγκέντρωση του βινυλ-εστέρα, ώστε να ελεγχθεί μήπως το ποσοστό παρουσίας του είναι περιοριστικός παράγοντας. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την αρχική· συγκεντρώσεις ίσες με 0.8 και 1 M. Ακόμα δοκιμάστηκαν και τιμές συγκέντρωσης βινυλ-εστέρα μικρότερες από την αρχική (0.1, 0.2 και 0.4 M), για να ελεγχθεί η πιθανότητα παρεμπόδισης της ενζυμικής δράσης από το υπόστρωμα. Και πάλι όμως τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά ως προς τη δημιουργία εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης.

Συνεπώς, οι αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά [bmim]PF6 και [bmim]BF4, δεν επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα (**πίνακας 8.15**). Η αιτία έγκειται προφανώς στο ότι το κυτταρινούχο υπόστρωμα, αν και με σημαντικά μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας, δεν παρουσίασε διαλυτότητα στα συγκεκριμένα ιοντικά υγρά. Τα τελευταία είναι αρκετά πολικά ώστε να διαλύουν πολικά μόρια όπως τα σάκχαρα.

Πίνακας 8.15 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των αντιδράσεων ενζυμικής εστεροποίησης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, σε περιβάλλον ιοντικών υγρών.

Βιοκαταλύτης	Ιοντικό υγρό	CrI % αναγεννημένης κυτταρίνης	Βινυλ-εστέρας (ακυλο-δότης)	Αποτέλεσμα αντίδρασης
Το σύνολο των υδρολυτικών ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία	[bmim]PF ₆	54.0	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό
	[bmim]BF ₄	54.0	προπιονικός	αρνητικό
			λαυρικός	αρνητικό
			στεατικός	αρνητικό

Το συγκριτικά πολύ μεγάλο μέγεθος της κυτταρίνης όμως, την καθιστά πρακτικά αδιάλυτη ακόμα και σε αυτά τα μέσα. Έτσι δεν είναι εύκολη η προσέγγιση των υδροξυλίων του πολυσακχαρίτη από το εκάστοτε ένζυμο και το ανάλογο υπόστρωμα. Φαίνεται λοιπόν πως σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις σε επιλεγμένα ιοντικά υγρά, η προκατεργασία της ινώδους κυτταρίνης, με σκοπό την αύξηση της προσβασιμότητας και δραστηριότητας των υδροξυλίων της, δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την ενζυμική εστεροποίηση της με αλειφατικές αλυσίδες. Τα ίδια αρνητικά αποτελέσματα προέκυψαν και όταν είχε εξεταστεί η αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel. Το γεγονός αυτό δίνει περισσότερη έμφαση στην παραπάνω εξήγηση για τη μη πραγματοποίηση των ακυλίσεων στο περιβάλλον των ιοντικών υγρών [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄. Κι αυτό διότι φαίνεται πως για τα αρνητικά αποτελέσματα δεν ευθύνεται η ινώδης ή όχι υφή της κυτταρίνης, αλλά ούτε και το σχεδόν τριπλάσιο μέγεθος της σε σχέση με την Avicel.

8.2.2.3 Αντιδράσεις ελεύθερες διαλύτη

Οι απόπειρες της ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, σε περιβάλλον οργανικών διαλυτών και ιοντικών υγρών, δεν επέφεραν κάποιο θετικό αποτέλεσμα. Με γνώμονα τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα, φάνηκε πως σε υγρά μέσα αντίδρασης με διαφορετική κάθε φορά φύση και σύσταση, καθώς και με διαφορετική πολικότητα, δεν είναι εφικτή η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης. Έτσι, το επόμενο λογικό βήμα είναι η δοκιμή της αντίδρασης σε συστήματα ελεύθερα διαλυτών. Το συγκεκριμένο είδος μη συμβατικού συστήματος βιοκατάλυσης είναι απαλλαγμένο από κάποιον τρίτο διαλύτη και το ρόλο του μέσου της αντίδρασης τον αναλαμβάνει ένα από τα υποστρώματα. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο ρόλος αυτός διαδραματίζεται από τους βινυλ-εστέρες των καρβοξυλικών οξέων, οι οποίοι βρίσκονται σε υγρή φάση για τις θερμοκρασιακές συνθήκες των αντιδράσεων που μας ενδιαφέρουν ($T \geq 40^\circ\text{C}$). Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτών των συστημάτων είναι η άμεση διαθεσιμότητα του υποστρώματος-μέσου αντίδρασης προς το ένζυμο αλλά και πιθανόν προς το δεύτερο υπόστρωμα, την κυτταρίνη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν παρεμβάλλεται κάποιος τρίτος διαλύτης στον οποίο θα βρίσκονταν ο βινυλ-εστέρας, ώστε ο τελευταίος να έπρεπε να έρθει έμμεσα σε επαφή με το ένζυμο και κατ' επέκταση με την κυτταρίνη.

Για την πραγματοποίηση των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων, χρησιμοποιήθηκαν οι βινυλ-εστέρες του προπιονικού, του λαυρικού και του στεατικού οξέως, ως υποστρώματα και μέσα αντίδρασης ταυτόχρονα. Το κάθε αντιδρών μείγμα αποτελούνταν από 150 mg αναγεννημένης κυτταρίνης και 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα. Στο τέλος προστίθενται 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα: λυοφιλιωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*,

λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η κάθε μία από τις παραπάνω αντιδράσεις έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 50 °C, υπό έντονη ανάδευση (2000 rpm). Η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα προετοιμάστηκαν και αντιδρώντα μείγματα ελέγχου, δυο διαφορετικών ειδών. Το πρώτο σερ αποτελούνταν από αντιδρώντα μείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο και το δεύτερο σερ από συστήματα στα οποία η περιεχόμενη ινώδης κυτταρίνη ήταν ακατέργαστη.

Όταν ως βιοκαταλύτες επιλέχθηκαν τα ένζυμα λυοφιλιωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei* και ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός του ανάλογου εστερικού δεσμού επί της κυτταρίνης. Επίσης δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του επιθυμητού προϊόντος στις αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, η αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης ήταν επιτυχής. Συγκεκριμένα, για την αναγεννημένη ινώδη κυτταρίνη με δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%, σχηματίστηκε εστέρας της με βάση τον ανάλογο ακυλοδότη. Από τις παραπάνω επιτυχείς ενζυμικές αντιδράσεις παράχθηκε προπιονικός, δωδεκανοϊκός ή λαυρικός και δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός εστέρας της κυτταρίνης (**πίνακας 8.16**).

Η ανίχνευση του σχηματισθέντος εστερικού δεσμού και η παράλληλη επιβεβαίωση της διεξαγωγής της ανάλογης αντίδρασης έγινε με φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR (παράγραφος 7.5.4). Πράγματι στα φάσματα FTIR των απομονωμένων προϊόντων των παραπάνω ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, παρουσιάζεται μία κορυφή με κυματαριθμό γύρω στα 1750 cm⁻¹ (**παράρτημα Β**). Η κορυφή αυτή είναι χαρακτηριστική της ομάδας καρβονυλίου του εστερικού δεσμού και απουσιάζει από το φάσμα της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης που προέκυψε από την αντίστοιχη αντίδραση ελέγχου, απουσία ενζύμου. Αυτό προφανώς υποδηλώνει την πραγματοποίηση της ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης. Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως τα φάσματα FTIR των κυτταρινούχων προϊόντων των αντιδράσεων ελέγχου είναι πανομοιότυπα με αυτό της αντίστοιχης αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης. Το γεγονός αυτό είναι ενδεικτικό για το ότι δεν υπήρξε καμία χημική τροποποίηση της κυτταρίνης στα αντίστοιχα συστήματα.

Θα πρέπει βέβαια να τονισθεί πως για τις επιτυχείς αντιδράσεις, οι αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου στις οποίες δεν υπήρχε ένζυμο, δεν πραγματοποιήθηκαν. Επίσης στις αντιδράσεις ελέγχου που περιείχαν ένζυμο αλλά η ινώδης κυτταρίνη ήταν ανεπεξέργαστη, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός εστερικού δεσμού στον πολυσακχαρίτη. Από αυτές τις δύο διαπιστώσεις εξάγονται δυο σημαντικά συμπεράσματα.

Πίνακας 8.16 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης με διάφορους ακυλο-δότες (Α,Β,Γ), σε περιβάλλον ελεύθερο διαλύτη.

Α

Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
προπιονικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	προπιονική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	προπιονική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	προπιονική κυτταρίνη

Β

Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
λαυρικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	λαυρική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	λαυρική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	λαυρική κυτταρίνη

Γ

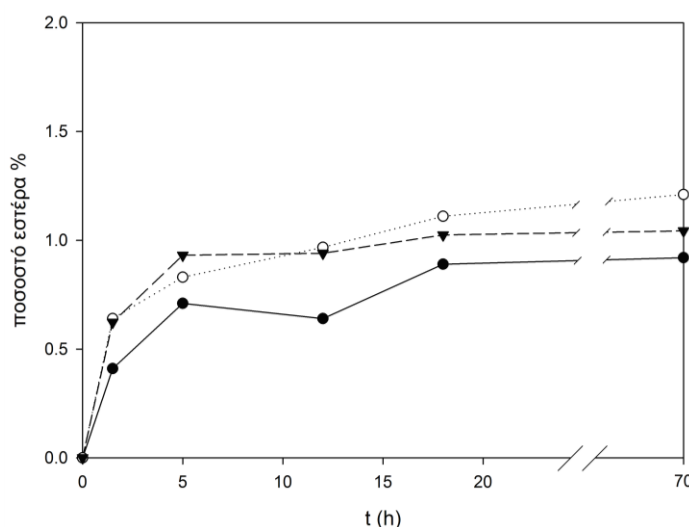
Ακυλο-δότης	Ένζυμο	Προϊόν
στεατικός βινυλ-εστέρας	λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	λιπάση <i>Candida cylindracea</i>	-
	λιπάση <i>Aspergillus niger</i>	-
	λιπάση <i>Rhizomucor miehei</i>	-
	ακίνητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
	εστεράση από ήπαρ χοίρου	στεατική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	στεατική κυτταρίνη
	ακίνητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	στεατική κυτταρίνη

Πρώτον, οι επιτυχείς αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης οφείλονται στη δράση των αντίστοιχων ενζύμων. Δεύτερον, η προκατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl με σκοπό τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας του πολυσακχαρίτη, είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Σε περίπτωση που το κυτταρινούχο υπόστρωμα συμμετέχει στην αντίδραση ως έχει, η αντίδραση δεν πραγματοποιείται. Φαίνεται λοιπόν πως η ιδέα της προκατεργασίας της ινώδους κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά είναι δόκιμη. Το εκτεταμένο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου έχει συρρικνωθεί μετά από την προκατεργασία στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc, με συνεπακόλουθο την αλλαγή της μικροδομής της κυτταρίνης. Η τακτικότητα που είχε η συγκεκριμένη δομή αλλοιώθηκε, παράλληλα με τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Έτσι, όπως και στην κυτταρίνη Avicel, η ινώδης κυτταρίνη έχει πλέον μεγαλύτερη εκτιθέμενη επιφάνεια και πολλά από τα υδροξύλια της έγιναν τελικά προσβάσιμα από, ενεργοποιημένα με ακυλο-δότη, μόρια ενζύμου (σχήμα 8.10).

Φυσικά θα πρέπει να σταθούμε και στο γεγονός της αδυναμίας διεξαγωγής των αντιδράσεων ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, όταν οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιούνται είναι τα ένζυμα λυοφιλιωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Aspergillus niger*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei* και ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*. Αντιθέτως, όταν χρησιμοποιούνται τα ένζυμα λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, η ακυλίωση της κυτταρίνης είναι επιτυχής. Όπως φαίνεται λοιπόν, το ένζυμο λιπάση δεν μπορεί να εστεροποιήσει την κυτταρίνη στις συνθήκες αντίδρασης που επιχειρήθηκαν, ενώ οι εστεράσες και η κουτινάση μπορούν. Η συγκεκριμένη επιλεκτικότητα παρατηρήθηκε κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο και στις αντιδράσεις με αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel.

Συνοψίζοντας λοιπόν, πρέπει να αναφερθεί πως το σύστημα απουσία διαλύτη είναι το μόνο αντιδρών σύστημα από αυτά που δοκιμάστηκαν, στο οποίο επιτεύχθηκε η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης με τρεις διαφορετικούς βινυλ-εστέρες καρβοξυλικών οξέων. Όταν επιχειρήθηκαν οι αντίστοιχες αντιδράσεις σε συστήματα με οργανικούς διαλύτες (8.2.2.1) και ιοντικά υγρά (8.2.2.2), δεν υπήρξε κανένα θετικό αποτέλεσμα ως προς την ακυλίωση της κυτταρίνης. Οι εξηγήσεις για εκείνα τα αρνητικά αποτελέσματα στηρίζονται τόσο στη μη διαλυτότητα του πολυσακχαρίτη, όσο και στο ότι δεν ήταν εύκολη η προσέγγιση της αδιάλυτης υδρόφιλης κυτταρίνης από το διαλυμένο υδρόφοβο ακυλο-δότη. Στην περίπτωση των ελεύθερων διαλύτη συστημάτων, η αναγεννημένη κυτταρίνη εξακολουθεί να μην είναι διαλυτή. Όμως τώρα, σε αντίθεση με τις προηγούμενες περιπτώσεις, η ποσότητα του ακυλο-δότη έρχεται σε άμεση επαφή με τη στερεή κυτταρίνη, γεγονός που υποβοηθάται και από την έντονη ανάδευση. Η γειννίαση μορίων του ακυλο-δότη, αλλά και ενεργοποιημένων ενζύμων με την αδιάλυτη κυτταρίνη είναι πλέον άμεση και δεν περιορίζεται από κάποιον τρίτο διαλύτη που περιέχει το βινυλ-εστέρα και μεσολαβεί ανάμεσα τους. Σαν αποτέλεσμα, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ενζύμου-ακυλο-ομάδας μπορεί να πλησιάσει κάποιο από τα εκτεθειμένα υδροξύλια της αναγεννημένης κυτταρίνης και να το εστεροποιήσει.

Αυτή είναι η πιθανότερη εξήγηση της διεξαγωγής της αντίδρασης ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης στα ελεύθερα διαλύτη συστήματα που δοκιμάστηκαν. Μίας αντίδρασης που όπως αποδείχθηκε και αναφέρθηκε πιο πριν, δεν είναι εφικτή απουσία ενζύμου ή παρουσία ενζύμου αλλά με μη προκατεργασμένη κυτταρίνη. Η διαπίστωση αυτή είναι σημαντική αλλά και εύλογη καθώς οι αντιδράσεις εστεροποίησης για να πραγματοποιηθούν από μόνες τους απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες που συνήθως ξεπερνούν τους 150 °C. Και αυτό χωρίς να λαμβάνονται υπόψη οι περιορισμοί που ούτως ή άλλως θέτει η κρυσταλλική δομή της ινώδους κυτταρίνης. Στα **σχήματα 8.25, 8.26 και 8.27**, παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν στην πορεία του σχηματισμού των εστερικών δεσμών επί της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, με δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%.



Σχήμα 8.25 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (○). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

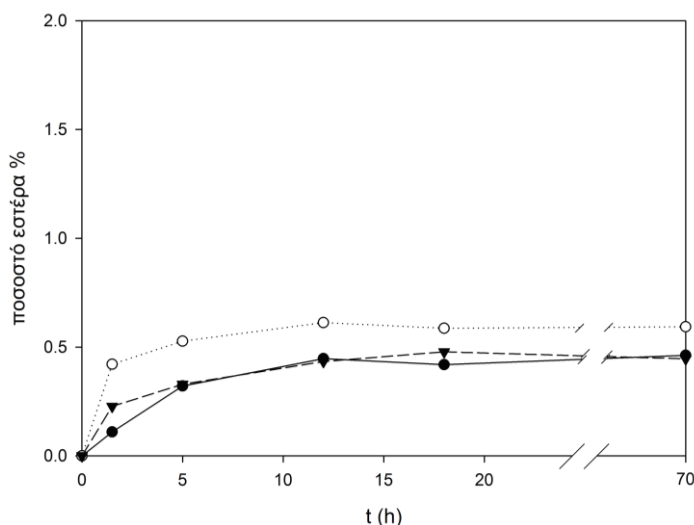
Οι ανάλογες αντιδράσεις καταλύθηκαν από τα ένζυμα λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, με ακυλο-δότες τους βινυλ-εστέρες του προπιονικού, του λαυρικού και του στεατικού οξέως. Η χρονική πορεία των αντιδράσεων εκφράζεται με βάση το % ποσοστό του εστέρα (**εξίσωση 7.4**). Όπως φαίνεται στο **σχήμα 8.25**, η ακυλίωση της κυτταρίνης με τον προπιονικό βινυλ-εστέρα φτάνει στις 70 h έως το ποσοστό εστέρα 1.0 και 0.9%, όταν χρησιμοποιούνται ως καταλύτες τα ένζυμα λυοφιλιωμένη και

ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου αντίστοιχα. Στην περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, τότε το ποσοστό εστέρα της παραχθείσας προπιονικής κυτταρίνης προσεγγίζει το 1.2%, στις 70 h αντίδρασης. Βέβαια όπως φαίνεται, όλες οι αντιδράσεις πρακτικά σταθεροποιούνται ως προς την εξέλιξη τους σε χρόνο αρκετά μικρότερο από τις 70 h. Στις 5-12 h περίπου, οι αντιδράσεις ακυλίωσης έχουν πιάσει πλατό. Αξιοσημείωτη είναι η υπεροχή της ακίνητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* έναντι των δυο εστερασών, ως προς την αρχική ταχύτητα αντίδρασης που επιδεικνύει (μεγαλύτερη κλίση στο αρχικό γραμμικό κομμάτι), αλλά κυρίως ως προς το τελικό ποσοστό σε εστέρα το οποίο φτάνει το 1.2%. Όπως σχολιάστηκε και στην παράγραφο 8.2.1.3, η συμπεριφορά αυτή οφείλεται πιθανότατα στην προτίμηση που έχουν οι κουτινάσες για τα μεγαλομόρια (Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Koller et al., 1982; Lin & Kolattukudy, 1978; Silva et al., 2005).

Ενδιαφέρουσα είναι και η σύγκριση των γραφημάτων που αντιπροσωπεύουν στις αντιδράσεις ακυλίωσης με βιοκαταλύτες τη λυοφιλιωμένη και την ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (**σχήμα 8.25**). Αν και σε γενικές γραμμές οι πορείες των δυο αυτών αντιδράσεων δεν διαφέρουν κατά πολύ, υπάρχει εντούτοις μία σχετική υπεροχή της ελεύθερης λυοφιλιωμένης εστεράσης, ως προς την αρχική ταχύτητα των αντιδράσεων και ως προς τις τιμές του % ποσοστού του εστέρα κατά την εξέλιξη αυτών. Η προφανής αιτία είναι ο ελεύθερος χαρακτήρας του λυοφιλιωμένου ενζύμου. Το τελευταίο όντας ελεύθερο είναι σαφώς πιο ευέλικτο από το ακίνητοποιημένο, καθώς δεν βρίσκεται σε κάποιον στερεό φορέα ακινητοποίησης και μπορεί να έρχεται σε επαφή με το κυτταρινούχο υπόστρωμα πιο εύκολα.

Επίσης οι παραπάνω αντιδράσεις, μετά από τις 12 h περίπου, παρουσιάζουν πλατό και δεν εξελίσσονται περαιτέρω ως προς το σχηματισμό νέων εστερικών ομάδων. Φαίνεται δηλαδή σαν να έχει επέλθει ισορροπία. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη κατάσταση μπορεί να αποδοθεί περισσότερο στο ότι τα στερεοχημικά κυρίως εμπόδια που εξακολουθεί να έχει η δομή της κυτταρίνης, δεν επιτρέπουν στα ενζυμικά μόρια να ακυλιώσουν περαιτέρω τον πολυσακχαρίτη. Είναι σαν να εξαντλούνται τα πραγματικά προσβάσιμα και δραστικά υδροξύλια της κυτταρίνης και έτσι ανάλογα με το είδος του βιοκαταλύτη και του ακυλο-δότη, η αντίδραση διεξάγεται μέχρι ενός ορίου. Έτσι λοιπόν δεν πρόκειται για μία κατάσταση χημικής ισορροπίας με την αυστηρή θερμοδυναμική έννοια, καθώς η αντίδραση μεταξύ μίας υδροξυλομάδας και ενός ενεργοποιημένου ακυλο-δότη, θα είχε μεγάλο δυναμικό.

Παρόμοια είναι η συμπεριφορά που επιδεικνύουν και οι ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης με τους μεγαλύτερου μήκους ακυλο-δότες· το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα. Στην περίπτωση που ακυλο-δότης είναι ο λαυρικός βινυλ-εστέρας, το ποσοστό του εστέρα στις 70 h, όταν βιοκαταλύτης είναι η λυοφιλιωμένη και η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου ανέρχεται σε 0.4% (**σχήμα 8.26**). Καλύτερη είναι η τελική απόδοση όταν ως ένζυμο χρησιμοποιείται η ακίνητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, με ποσοστό εστέρα στις 70 h, ίσο με 0.6%.

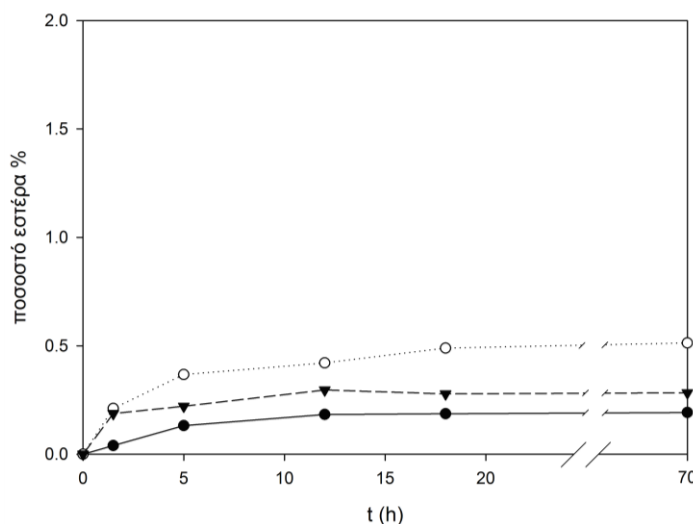


Σχήμα 8.26 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (○). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Όταν πάλι χρησιμοποιείται ως ακυλο-δότης ο στεατικός βινυλ-εστέρας, το ποσοστό του εστέρα στις 70 h αντίδρασης είναι 0.2 και 0.3% για τη λυοφιλιωμένη και την ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου αντίστοιχα (σχήμα 8.27). Όταν χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, τότε το ποσοστό της κυτταρίνης σε εστέρα ανέρχεται στο 0.5%. Και πάλι διακρίνεται η υπεροχή της κουτινάσης σε σχέση με τις εστεράσες που χρησιμοποιήθηκαν για την εστεροποίηση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης. Αναφορικά με τις δύο εστεράσες, φαίνεται γενικά πως δεν υπάρχει μεγάλη απόκλιση στην τιμή του τελικού ποσοστού σε εστέρα. Η μεγαλύτερη διαφορά τους έγκειται στον αρχικό ρυθμό της αντίδρασης όπου η ελεύθερη λυοφιλιωμένη εστεράση, όντας πιο ευέλικτη και διαχυτική, καταφέρνει να ακυλιώσει τις υδροξυλομάδες της κυτταρίνης σε συντομότερο χρονικό διάστημα.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα 8.25, 8.26 και 8.27 μεταξύ τους, είναι έκδηλη η μείωση της απόδοσης της αντίδρασης με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη. Μάλιστα αυτή η παρατήρηση ισχύει και για τους τρεις βιοκαταλύτες. Το μέγιστο ποσοστό σε εστέρα που έχει η προπιονική κυτταρίνη είναι 1.2%, ενώ τα μέγιστα ποσοστά εστέρα της λαυρικής και της στεατικής κυτταρίνης είναι 0.6 και 0.5% αντίστοιχα. Φαίνεται λοιπόν πως όσο αυξάνει το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη, αυξάνεται και η στερεοχημική παρεμπόδιση από την πλευρά της δομικά δύσκολης κυτταρίνης. Επίσης το ενεργοποιημένο ένζυμο με την μακρύτερη αλειφατική αλυσίδα, είναι πιο

δύσκολο να προσεγγίσει την υδρόφιλη κυτταρίνη αφού όσο μακρύτερη είναι η αλειφατική αλυσίδα, τόσο πιο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει.



Σχήμα 8.27 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του στεατικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (▼), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (●) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (○). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Και πάλι, όπως στην περίπτωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, παρατηρείται πως το μέγιστο για κάθε περίπτωση ποσοστό του εστέρα, βρίσκεται σε σχετικά χαμηλό επίπεδο. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την απουσία διαλυτότητας του αρχικού κυτταρινούχου υποστρώματος στο σύστημα αντίδρασης, οδηγούν σε ένα αρκετά πιθανό συμπέρασμα· η ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης υπό τις παραπάνω συνθήκες, έλαβε χώρα κυρίως στην επιφάνεια του πολυσακχαρίτη και ελάχιστα εξελίχθηκε στα ενδότερα του δικτύου των κυτταρινικών μορίων. Βέβαια και στην περίπτωση αυτή η προκατεργασία της κυτταρίνης ήταν απαραίτητη. Τέλος, υπάρχει μία εμφανής μείωση του τελικού ποσοστού του εστέρα σε σχέση με τις αντίστοιχες αντιδράσεις με την κυτταρίνη Avicel. Φαίνεται δηλαδή πως η ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης είναι δυσκολότερη. Η ινώδης φύση της, το σχεδόν τριπλάσιο μοριακό της βάρος και ο υψηλότερος δείκτης κρυσταλλικότητας σε σχέση με την αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel που μελετήθηκε προηγουμένως, αποτελούν τους βασικότερους παράγοντες για τη μειωμένη διαθεσιμότητα δραστικών υδροξυλίων που επιδεικνύει η ινώδης κυτταρίνη.

Για την επαλήθευση της παρατήρησης πως οι παραπάνω ενζυμικές αντιδράσεις σταματούν να εξελίσσονται μετά τις 12 h εξαιτίας της εξάντλησης των διαθέσιμων δραστικών υδροξυλίων της κυτταρίνης, έγινε μία σειρά από επιπλέον δοκιμές. Παράλληλα με τις αντιδράσεις που μελετήθηκαν προηγουμένως, πραγματοποιήθηκαν και όμοιες αντίστοιχες αντιδράσεις με μόνη διαφορά το δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης. Ειδικότερα χρησιμοποιήθηκε αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη με το μεγαλύτερο δείκτη κρυσταλλικότητας που προέκυψε (59.7%), σε αντιπαραβολή με αυτή που έχει ως τώρα χρησιμοποιηθεί και έχει τη μικρότερη τιμή δείκτη κρυσταλλικότητας (54.0%). Οι εν λόγω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία των ενζύμων λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Ως αντιπροσωπευτικός ακυλοδότης χρησιμοποιήθηκε ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέως. Έτσι, μετά το πέρας των αντιδράσεων (70 h) μετρήθηκε το % ποσοστό του εστέρα των ανάλογων προϊόντων (πίνακας 8.17).

Πίνακας 8.17 Ποσοστό (%) του λαυρικού εστέρα της κυτταρίνης, μετά από διάρκεια 70 h των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0 και 59.7%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

CrI %	Ένζυμο	Ποσοστό εστέρα %
54.0	εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.4
	ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.4
	ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	0.6
59.7	εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.3
	ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	0.2
	ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	0.4

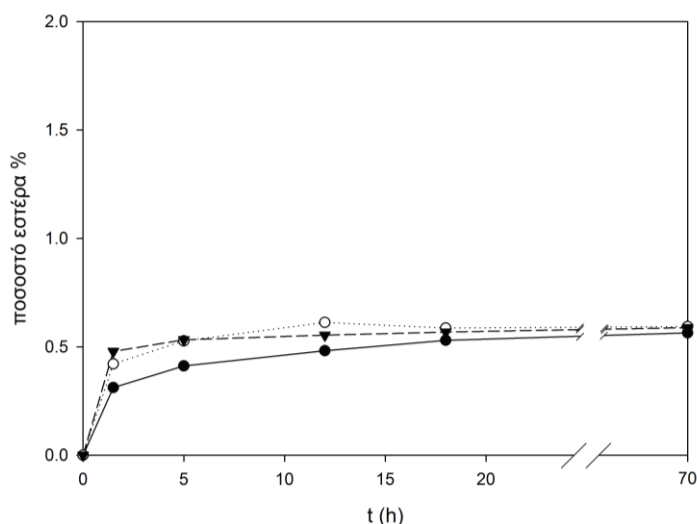
Παρατηρώντας την τιμή του % ποσοστού του λαυρικού εστέρα στις 70 h αντίδρασης για κάθε βιοκαταλύτη ξεχωριστά, αποδεικνύεται πως όταν το κυτταρινούχο υπόστρωμα έχει υψηλότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, τότε το αντίστοιχο ποσοστό του εστέρα είναι χαμηλότερο. Επομένως η ενζυμική ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης ευνοείται όταν η τελευταία έχει λιγότερο κρυσταλλική δομή. Με άλλα λόγια, η αλλοίωσης της συμπαγούς δομής της κυτταρίνης αποτελεί ελέγχον στάδιο για την προσέγγιση ενζύμου και λιπαρού υποστρώματος στα υδροξύλια της. Η αναγεννημένη ινώδης κυτταρίνη με σχετικά χαμηλότερο δείκτη κρυσταλλικότητας, έχει περισσότερα ενεργά υδροξύλια.

8.2.2.3.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Στην προηγούμενη παράγραφο παρουσιάστηκαν και μελετήθηκαν οι ελεύθερες διαλύτη αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης με τον οξικό, το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα, χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτες τα ένζυμα λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Επίσης αποδείχθηκε πως η πραγματοποίηση των παραπάνω αντιδράσεων οφείλεται στη δράση του ενζύμου. Είναι λοιπόν σημαντικό το να μελετηθεί και η επίδραση που έχει η ενζυμική συγκέντρωση στην εξέλιξη και την πορεία των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Για το λόγο αυτό προετοιμάστηκαν αντιδρώντα συστήματα πανομοιότυπα με τα προηγούμενα, με μόνη διαφορά τη συγκέντρωση του ενζύμου. Για κάθε σύστημα, 150 mg αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης αναμείχθηκαν με 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα και στο τέλος προστέθηκαν 0.1, 0.25 ή 0.4 U/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία επώασης του συνόλου των αντιδράσεων ήταν 50 °C και υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm). Τέλος, η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου.

Για την αναγεννημένη ιώδη κυτταρίνη με δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%, για κάθε έναν από τους τρεις βινυλ-εστέρες και για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα που χρησιμοποιούνται, παρουσιάζεται η ίδια χαρακτηριστική συμπεριφορά. Έτσι κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστεί μόνο ένα αντιπροσωπευτικό διάγραμμα στο οποίο να φαίνεται η πρόοδος της αντίδρασης καθώς μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ενζύμου. Έτσι στο **σχήμα 8.28** φαίνεται η εξέλιξη της ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα και με βιοκαταλύτη την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*.

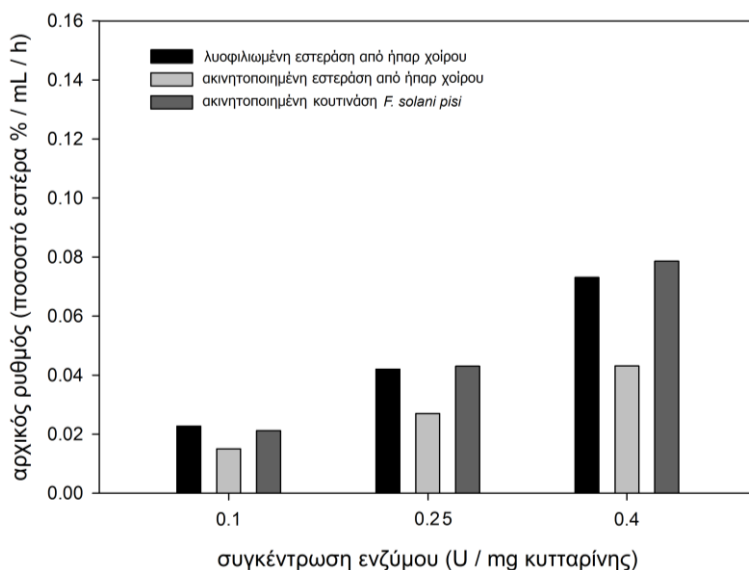
Παρατηρείται πως και για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζύμου (0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης), η εξέλιξη της αντίδρασης έχει παρόμοια πορεία. Στις πρώτες ώρες το ποσοστό του εστέρα αυξάνει με σχετικά υψηλό ρυθμό και στη συνέχεια σταθεροποιείται γύρω από μία τελική τιμή. Αυτό που αλλάζει με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του ενζύμου όμως δεν είναι το τελικό ποσοστό του εστέρα, αλλά ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης. Αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ενζύμου, αυξάνεται και η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης εστεροποίησης. Αυτή η παρατήρηση συνάδει με το ότι ο συγκεκριμένος τύπος αντίδρασης ελέγχεται κινητικά από την παρουσία του ενζύμου. Έτσι όταν υπάρχουν περισσότερα units ενζύμου, το τελικό ποσοστό εστεροποίησης της ανάλογης αντίδρασης επιτυγχάνεται πιο σύντομα. Το ίδιο το ποσοστό δεν αλλάζει και αυτό είναι εύλογο. Όπως φάνηκε, η συγκεκριμένη αντίδραση προχωράει μέχρι ενός ορίου. Το ένζυμο είναι ο καταλύτης που όσο περισσότερος είναι, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται και η αντίδραση. Το τελικό ποσοστό του εστέρα δε μεταβάλλεται ιδιαίτερα γιατί όπως φαίνεται καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα και το πλήθος των ενεργών υδροξυλίων και όχι από τη συγκέντρωση του βιοκαταλύτη.



Σχήμα 8.28 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL), ενώ ο βιοκαταλύτης ήταν η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm). Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.1 (●), 0.25 (○) και 0.4 U/mg κυτταρίνης (▼).

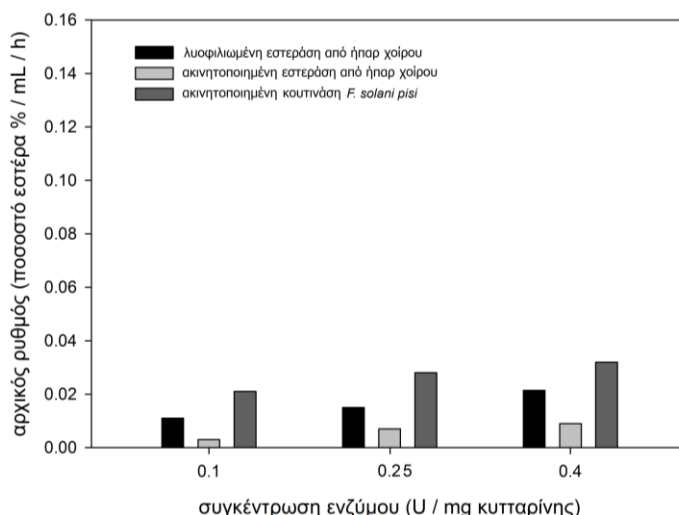
Με κριτήριο τα παραπάνω, είναι σκόπιμο να συγκριθούν οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων ακυλίωσης της κυτταρίνης, για κάθε ακυλο-δότη και για κάθε ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε. Η ταχύτητα της αντίδρασης ορίζεται ως το % ποσοστό του εστέρα που σχηματίστηκε ανά μονάδα όγκου της αντίδρασης (mL) και ανά μονάδα χρόνου (h).

Στο **σχήμα 8.29** παρουσιάζονται συγκριτικά οι τιμές των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (δείκτης κρυσταλλικότητας 54.0%), με τον προπιονικό βινυλ-εστέρα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Όπως φαίνεται και για τους τρεις βιοκαταλύτες, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του ενζύμου, αυξάνεται ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης. Επίσης για κάθε μία από τις τιμές συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου εμφανίζει το μικρότερο αρχικό ρυθμό αντίδρασης, με την λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου να έχει μεγαλύτερη αρχική ταχύτητα. Ο συνολικά μεγαλύτερος αρχικός ρυθμός όμως παρουσιάζεται από την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Και πάλι αναδεικνύεται η συγκριτική υπεροχή της ακινητοποιημένης κουτινάσης έναντι των δυο άλλων εστερασών, ανεξάρτητα με το αν είναι ακινητοποιημένες ή ελεύθερες.

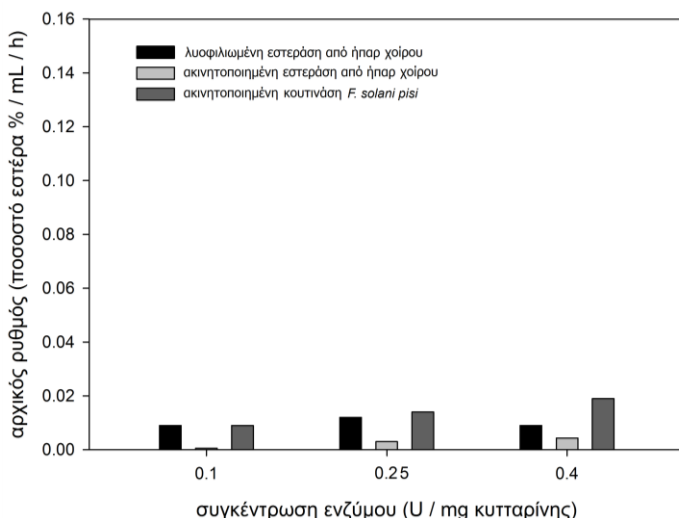


Σχήμα 8.29 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο προπιονικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλική εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτρινάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κυτταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).

Εντελώς αντίστοιχα είναι και τα ανάλογα αποτελέσματα των ακυλίσεων με το λαυρικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα (σχήματα 8.30 και 8.31). Η μοναδική επιπλέον παρατήρηση αφορά στη μείωση της τάξης μεγέθους των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων, καθώς αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του ακυλο-δότη. Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται αφενός στην εντονότερη στερεοχημική παρεμπόδιση που απαντάται στα μεγαλύτερου μήκους μόρια και αφετέρου στον αυξημένο υδρόφοβο χαρακτήρα που αυτά έχουν. Το τελευταίο είναι μειονέκτημα για την εξέλιξη της αντίδρασης, εφόσον το άλλο υπόστρωμα που πρέπει να προσεγγιστεί είναι η εξαιρετικά υδρόφιλη κυτταρίνη. Τέλος επισημαίνεται πως οι τιμές των αρχικών ρυθμών των παραπάνω αντιδράσεων είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες που αφορούν στην αναγεννημένη κυτταρίνη Avicel.



Σχήμα 8.30 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κντταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο λαυρικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτνιάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κντταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).

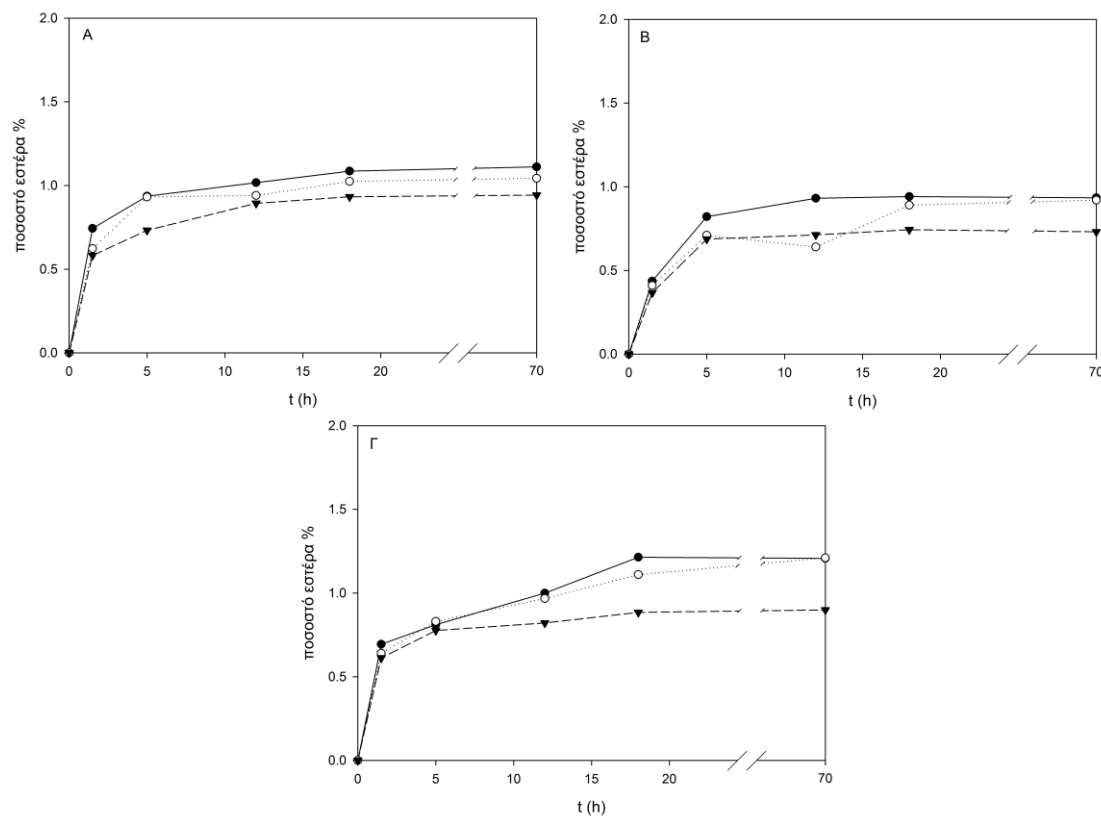


Σχήμα 8.31 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κντταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο στεατικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτνιάση από *Fusarium solani pisi*, σε τιμές συγκέντρωσης 0.1, 0.25 και 0.4 U/mg κντταρίνης. Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm).

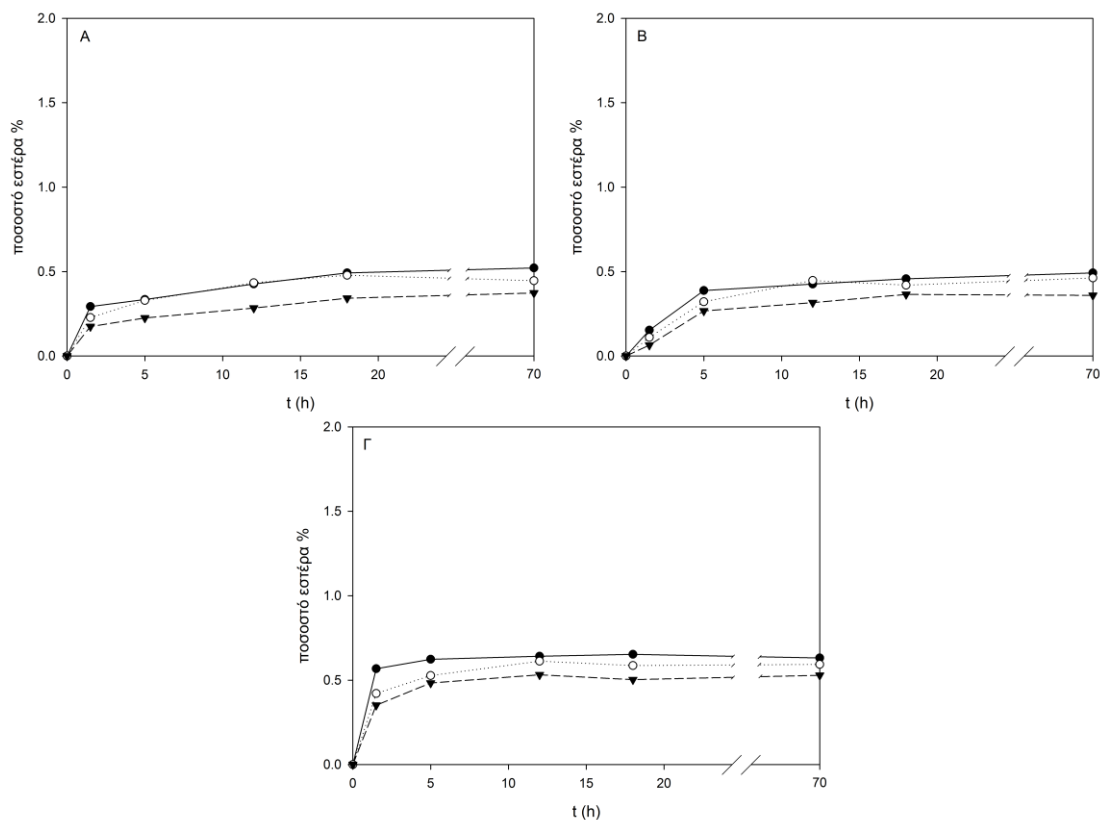
8.2.2.3.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Όπως και στην περίπτωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel, έτσι και τώρα με την ινώδη κυτταρίνη εξετάζεται η παράμετρος της αρχικής ποσότητας του πολυσακχαρίτη που προστίθεται στο αντιδρών μείγμα. Για το λόγο αυτό, προετοιμάστηκαν συστήματα που το κάθε ένα περιείχε 10 mL βινυλ-εστέρα και 100, 150 ή 200 mg αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης με δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%. Στο τέλος προσθέτονταν και ο βιοκαταλύτης, με συγκέντρωση 0.25 U/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία επώασης του συνόλου των αντιδράσεων ήταν 50 °C και υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm). Τέλος, η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου.

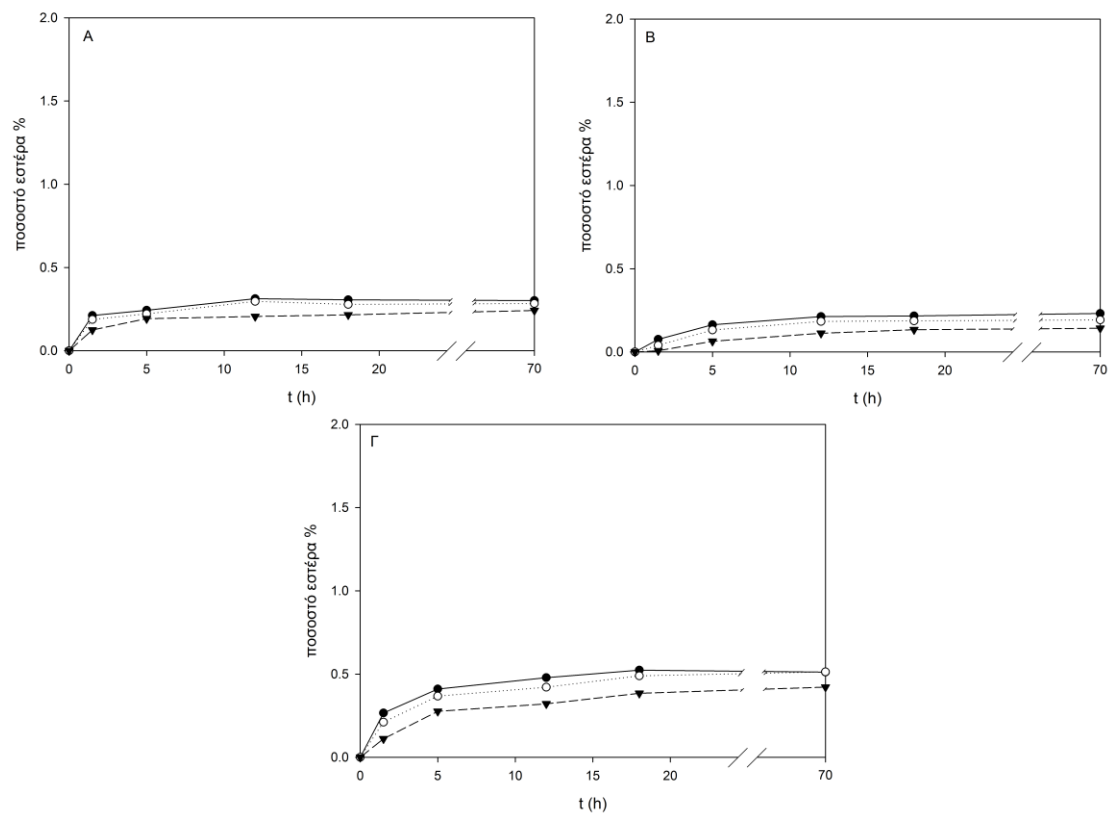
Όταν ακυλο-δότης είναι ο προπιονικός βινυλ-εστέρας και για κάθε ένα από τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, παρατηρείται αύξηση του τελικού ποσοστού του κυτταρινούχου εστέρα, καθώς η αρχική ποσότητα της κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα ελαττώνεται από τα 200 στα 100 mg (σχήμα 8.32). Όταν στα 10 mL βινυλ-εστέρα, η ποσότητα της κυτταρίνης είναι 100 mg, τότε το τελικό ποσοστό του σχηματιζόμενου εστέρα κυτταρίνης είναι υψηλότερο από αυτό που αντιστοιχεί σε αντίδραση με το ίδιο ένζυμο και αρχική ποσότητα κυτταρίνης ίση με 150 mg. Επίσης ο αρχικός ρυθμός της αντίδρασης είναι ελαφρά αυξημένος στις αντιδράσεις με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε αναγεννημένη ινώδη κυτταρίνη. Αντίθετα, όταν η αρχική ποσότητα της κυτταρίνης στο ανάλογο αντιδρών σύστημα αυξάνεται στα 200 mg, τότε παρατηρείται μείωση στο τελικό ποσοστό του εστέρα. Αντίστοιχη μειωτική τάση έχει και ο ανάλογος αρχικός ρυθμός της αντίδρασης αυτής. Με βάση την παραπάνω συμπεριφορά αποδεικνύεται πως όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα της μεγαλομοριακής κυτταρίνης στο αντιδρών σύστημα, τόσο πιο δύσκολα διεξάγεται η ενζυμική της ακυλίωση. Ο κυριότερος λόγος είναι πως με αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης που είναι ένα πολυμερές, αυξάνεται το φαινόμενο ιξώδες του όλου συστήματος και έτσι η κινητικότητα των ενζυμικών μορίων και των μορίων του βινυλ-εστέρα μειώνεται. Αυξάνονται δηλαδή οι αντιστάσεις στη μεταφορά μάζας. Παράλληλα όμως με την αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης στο δεδομένο όγκο του βινυλ-εστέρα, μειώνεται ουσιαστικά και η διαθεσιμότητα του τελευταίου. Αυτό συμβαίνει διότι ταυτόχρονα μειώνεται η σχετική μοριακή αναλογία βινυλ-εστέρα/κυτταρίνης. Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά που επιδεικνύουν οι αντιδράσεις στις οποίες το ρόλο του ακυλο-δότη τον παίζουν οι λιπαροί βινυλ-εστέρες του λαυρικού και του στεατικού οξέος (σχήματα 8.33 και 8.34). Ο κανόνας που φαίνεται να ισχύει για τις συνθήκες που μελετήθηκαν, είναι πως αυξανόμενης της ποσότητας της κυτταρίνης στο αντιδρών μείγμα, μειώνεται ο ρυθμός της ενζυμικής ακυλίωσης αλλά και η τελική τιμή του ποσοστού του σχηματισθέντος εστέρα της κυτταρίνης.



Σχήμα 8.32 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλοδότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του προπιονικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (A), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (B) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



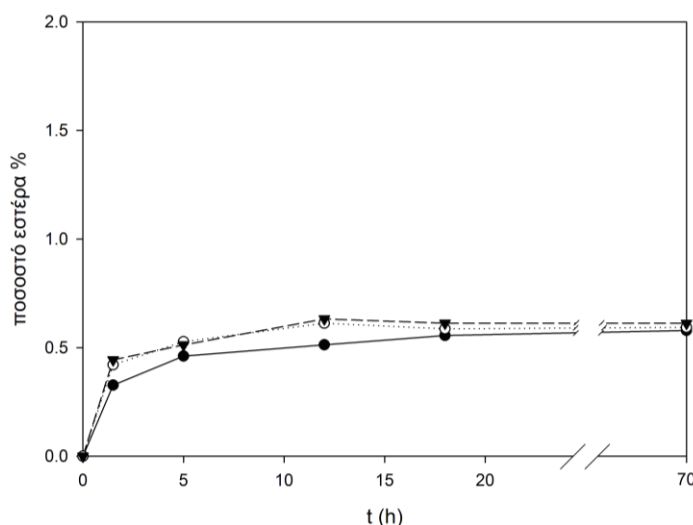
Σχήμα 8.33 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλοδότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Α), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Β) και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.34 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλοδότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του στεατικού οξέος (10 mL). Σε κάθε μία περίπτωση οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Α), η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (Β) και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi* (Γ). Η ποσότητα της κυτταρίνης στα 10 mL του βινυλ-εστέρα ήταν 100 (●), 150 (○) και 200 mg (▼). Η αντίδραση επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 50 °C, υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

8.2.2.3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην εξέλιξη των ενζυμικών ακυλίωσεων της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης, προετοιμάστηκαν αντιδρώντα συστήματα αποτελούμενα από 150 mg της κυτταρίνης και 10 mL του εκάστοτε βινυλ-εστέρα. Έπειτα προστέθηκαν 0.25 U ενζύμου/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας επώασης που μελετήθηκαν ήταν 40, 50 και 60 °C. Ακόμα υπήρχε έντονη ανάδευση (2000 rpm) και η συνολική χρονική διάρκεια των αντιδράσεων ήταν 70 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου. Σύμφωνα με τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατηρείται πως για κάθε έναν βινυλ-εστέρα και για κάθε ένα από τα τρία ένζυμα, η τιμή του τελικού ποσοστού εστεροποίησης στις 70 h αντίδρασης δεν μεταβάλλεται σημαντικά ως προς τη θερμοκρασία. Αντιπροσωπευτικά παρατίθεται το σχετικό διάγραμμα που αφορά στην ακυλίωση της κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα, χρησιμοποιώντας το ένζυμο ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* (σχήμα 8.35).

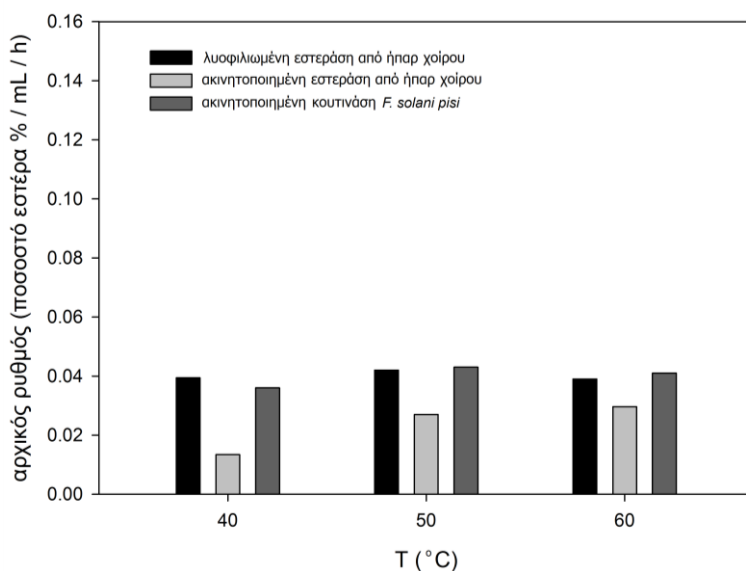


Σχήμα 8.35 Πρόοδος των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ο ακυλο-δότης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος (10 mL) και ο βιοκαταλύτης ήταν η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40 (●), 50 (○) και 60 °C (▼). Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

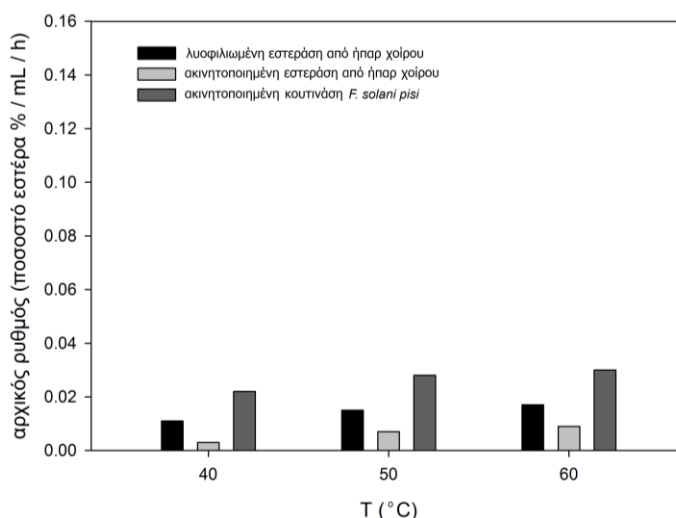
Ο αρχικός ρυθμός των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης δείχνει να επηρεάζεται από τις θερμοκρασιακές μεταβολές. Για το λόγο αυτό είναι πιο ενδιαφέρον να παρουσιαστούν συγκριτικά οι τιμές της αρχικής ταχύτητας των συγκεκριμένων αντιδράσεων, ως προς τη θερμοκρασία διεξαγωγής τους.

Όπως φάνηκε στο **σχήμα 8.35**, αυξανόμενης της θερμοκρασίας αυξάνεται ελαφρά και ο αρχικός ρυθμός της ενζυμικής ακυλίωσης. Η συγκεκριμένη συμπεριφορά αναδεικνύεται σαφέστερα και για τους τρεις βινυλ-εστέρες, παρατηρώντας τα **σχήματα 8.36, 8.37 και 8.38**.

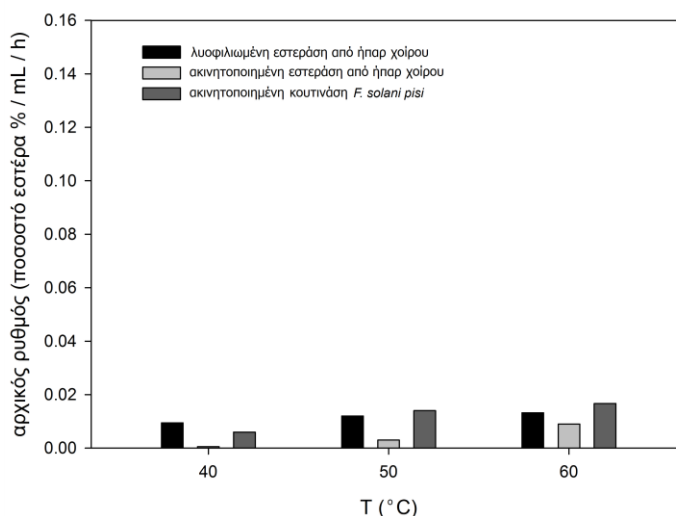
Η αρχική ταχύτητα της ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 στους 50 °C. Μικρότερη αύξηση παρατηρείται όταν η θερμοκρασία ανέρχεται από τους 50 στους 60 °C. Βέβαια και σε αυτήν την περίπτωση, όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο η αντίστοιχη αύξηση της αρχικής ταχύτητας είναι υψηλότερη απ' όταν είναι ελεύθερο. Αυτό δικαιολογείται καθώς ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενζύμων είναι η αυξημένη θερμική τους σταθερότητα. Η επίδραση που έχει η διαφορετική θερμοκρασία στις τιμές των αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης είναι ποικίλα όμοια με αυτήν που παρατηρείται και στις ανάλογες δράσεις με την κυτταρίνη Avicel. Η μόνη διαφορά είναι πως στην ινώδη κυτταρίνη οι αντίστοιχες τιμές είναι αισθητά χαμηλότερες απ' ότι στην Avicel.



Σχήμα 8.36 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο προπιονικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.37 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο λαυρικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.



Σχήμα 8.38 Σύγκριση των αρχικών ρυθμών των ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης (150 mg), με βαθμό κρυσταλλικότητας 54.0%. Ως ακυλο-δότης χρησιμοποιήθηκε ο στεατικός βινυλ-εστέρας (10 mL) και οι βιοκαταλύτες ήταν η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακίνητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Οι τιμές θερμοκρασίας της αντίδρασης ήταν 40, 50, και 60 °C. Οι αντιδράσεις έγιναν υπό ανάδευση (2000 rpm) και η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.25 U/mg κυτταρίνης.

Η ινώδης υφή, το μεγαλύτερο μέγεθος ($DP=730$) και ο μεγαλύτερος δείκτης κρυσταλλικότητας (54.0%), είναι χαρακτηριστικά που καθιστούν δυσκολότερες τις όποιες φυσικοχημικές μεταβολές στην ινώδη κυτταρίνη. Το γεγονός αυτό είναι λίγο έως πολύ αναμενόμενο, αφού η τελευταία προσεγγίζει περισσότερο το δομικό χαρακτήρα της φυσικής κυτταρίνης που βρίσκεται στα φυτά.

9. Ενζυμική εστεροποίηση κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($scCO_2$)

Σύμφωνα με ένα σημαντικό αριθμό βιβλιογραφικών αναφορών, οι αλειφατικοί εστέρες της κυτταρίνης αποτελούν υλικά με εξαιρετικές θερμοπλαστικές ιδιότητες (Edgar, 2001; Edgar et al., 2001; Gradwell, 2004; Jandura et al., 2000; Qiu et al., 2004; Satge et al., 2004; Vaca-Garcia et al., 2003). Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται άμεσα από τον ανάλογο βαθμό υποκατάστασης και από το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας του εστέρα. Πιο συγκεκριμένα, οι αλειφατικές αλυσίδες μεγάλου μήκους και οι σχετικά υψηλοί βαθμοί υποκατάστασης, αναφέρεται πως προσδίδουν στον αντίστοιχο εστέρα της κυτταρίνης καλύτερες θερμοπλαστικές ιδιότητες και αυξημένη θερμική σταθερότητα (Edgar, 2001; Shiraishi et al., 1982; Vaca-Garcia & Borredon, 1999; Vaca-Garcia et al., 2003). Το φαινόμενο αυτό αποδίδεται στο ότι οι μακριές ευθείες ανθρακικές αλυσίδες που είναι τοποθετημένες ακτινικά ως προς το διαμήκη άξονα του εστεροποιημένου πολυσακχαρίτη, λειτουργούν ως εσωτερικοί πλαστικοποιητές. Έτσι δεν απαιτείται η χρήση κάποιου εξωγενούς πλαστικοποιητή, ώστε να θερμομορφωθεί το αντίστοιχο θερμοπλαστικό (Edgar et al., 2001; Marson & El Seoud, 1999; Satge et al., 2004).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στα κεφάλαια 1 και 2, το κυριότερο εμπόδιο στην παραγωγή τέτοιου είδους μορίων είναι η χημικά δυσπρόσιτη δομή της κυτταρίνης. Γεγονός που εκφράζεται και από τις υψηλές τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της. Έως τώρα, η παραγωγή αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης στηρίζεται σε ετερογενή κυρίως συστήματα αντίδρασης που περιέχουν ισχυρούς διαλύτες και επικίνδυνες ουσίες (πυριδίνη, N,N-dimethylacetamide κ.α.). Επιπροσθέτως οι τεχνικές αυτές περιορίζονται συνήθως στην ακυλίωση της κυτταρίνης με ανθρακικές αλυσίδες που περιέχουν μέχρι και έξι άτομα άνθρακα.

Στο πλαίσιο εύρεσης ενός εναλλακτικού τρόπου παραγωγής αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης, με σχετικά μακριές ανθρακικές αλυσίδες, προτείνεται και μελετάται η χρήση της μη συμβατικής βιοκατάλυσης. Οι βιοκαταλυτικές εφαρμογές αποτελούν εξ' ορισμού μία απλή, αποδοτική και πράσινη προσέγγιση για διάφορους τύπους χημικών αντιδράσεων. Η χρήση των ενζύμων ιδιαίτερα, χαρακτηρίζεται από σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η εξειδικευμένη δράση, η λειτουργία κάτω από ήπιες θερμοκρασιακές συνθήκες και ο περιορισμός των παράπλευρων αντιδράσεων που οδηγούν σε παραγωγή παραπροϊόντων (Begley & Tsai, 2003; Cantone et al., 2007; Cheng & Gross, 2003; de Carvalho, 2011; DeSantis & Davis, 2006). Στη συγκεκριμένη ενότητα λοιπόν θα παρουσιαστεί η χρήση της ενζυμικής κατάλυσης με σκοπό την ακυλίωση της κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες μεγάλου μήκους, σε ένα ιδιαίτερο αντιδρών σύστημα· στο

υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (scCO_2). Αυτό είναι και το χαρακτηριστικό γνώρισμα της παρούσας εργασίας.

Τα υπερκρίσιμα ρευστά και ιδιαιτέρως το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, αποτελούν μία κατηγορία μη συμβατικών μέσων βιοκατάλυσης που τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται όλο και περισσότερο (Al-Duri et al., 2001; Blattner et al., 2006; Dijkstra et al., 2007; Garcia et al., 2004; Hobbs et al., 2007; Lozano et al., 2004b). Τα χαρακτηριστικά και τα πλεονεκτήματα της χρήσης τους παρουσιάζονται εκτενώς στο κεφάλαιο 5. Τα πιο σημαντικά αφορούν στη διατήρηση της ενεργότητας πολλών κατηγοριών ενζύμων σε αυτά, στους υψηλούς συντελεστές μεταφοράς μάζας, στη μη τοξικότητα τους και στο ότι μπορούν να απομακρυνθούν με μία απλή εκτόνωση. Το μόνο ουσιαστικό μειονέκτημα που μπορεί να τους αποδοθεί είναι οι υψηλές τιμές πίεσης που εφαρμόζονται, με συνέπεια να απαιτούνται αντιδραστήρες ειδικών προδιαγραφών. Οι κρίσιμες τιμές πίεσης και θερμοκρασίας για το διοξείδιο του άνθρακα είναι 7.38 MPa και 31.1 °C αντίστοιχα.

Ο σημαντικότερος όμως λόγος για τον οποίο επιλέγεται το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ως μέσο για τις αντιδράσεις ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης, είναι οι διογκωτικές ιδιότητες που έχει επιδειξει επί αυτής. Έχουν υπάρξει αναφορές βάση των οποίων το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να διογκώσει την κυτταρίνη (swelling), με συνέπεια να έρθουν σε επαφή με τα υδροξύλια της διάφορες ουσίες και να γίνει η ανάλογη χημική αντίδραση (Nishino et al., 2011; Yin et al., 2007). Είναι γνωστό πως το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι αρκετά συμπιεστό και έτσι οι ρεολογικές και φυσικοχημικές του ιδιότητες μπορούν να μεταβληθούν με αλλαγή των τιμών της θερμοκρασίας και κυρίως της πίεσης του. Σε τιμές πίεσης άνω των 14 MPa, το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να διογκώνει την κυτταρίνη και ταυτόχρονα να λειτουργεί ως διαλύτης και μέσο αντίδρασης, ανάλογα με τα αντιδρώντα. Από την άλλη πλευρά έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές σύμφωνα με τις οποίες σε αντίστοιχες υπερκρίσιμες συνθήκες έχουν πραγματοποιηθεί ενζυμικές αντιδράσεις σε διάφορα μόρια, τα οποία όμως είναι διαλυτά και έχουν πολύ μικρότερο μέγεθος από την κυτταρίνη (Blattner et al., 2006; Dijkstra et al., 2007; Lozano et al., 2004a; Lozano et al., 2004c; Marty et al., 1992; Sereti et al., 1997).

Συνοψίζοντας, στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται ένα σύστημα στο οποίο επιχειρείται η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια προκατεργασία ώστε να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των δραστικών υδροξυλίων της. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα κυτταρίνη που να προσιδιάζει όσο περισσότερο γίνεται στη φυσική. Αυτό το σκεπτικό πηγάζει από την ιδεατή ανάγκη για χρησιμοποίηση της φυσικής κυτταρίνης, η οποία δεν έχει υποστεί κάποια ιδιαίτερη επεξεργασία. Ένας ακόμα λόγος για τον οποίο χρησιμοποιείται μόνο η ινώδης κυτταρίνη και όχι η Anicel, είναι πως η τελευταία εξαιτίας της λεπτόκοκκης υφής της, παρουσίαζε δυσκολίες κατά την ανάκτηση της από τον αντιδραστήρα που χρησιμοποιήθηκε στις συγκεκριμένες αντιδράσεις (υπερκρίσιμες συνθήκες). Επίσης, σύμφωνα με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός αλειφατικού εστέρα κυτταρίνης (ικανοποιητική θερμοπλαστικότητα), χρησιμοποιούνται ακυλο-δότες μακριάς ανθρακικής αλυσίδας. Συνεπώς, οι αντιδράσεις που επιχειρούνται έχουν απόλυτα στοχευμένο και συγκεκριμένο χαρακτήρα ως προς το επιθυμητό προϊόν.

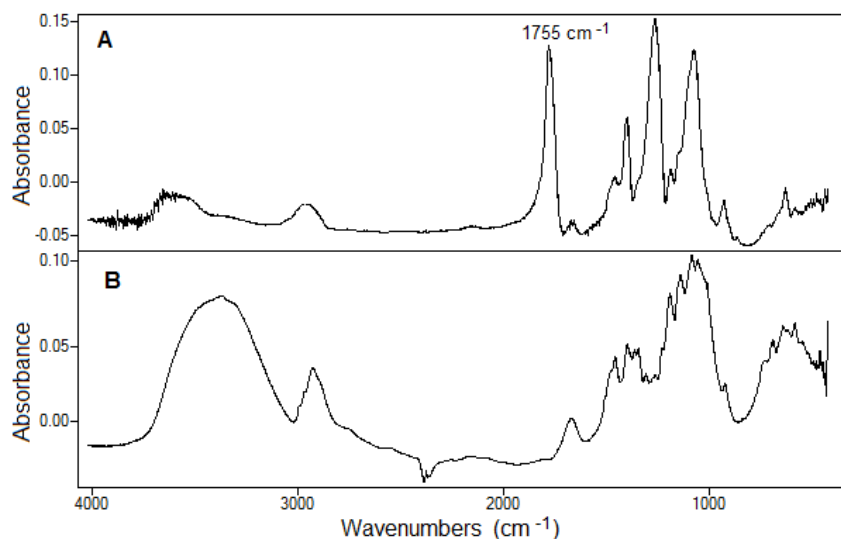
Το κυτταρινούχο υπόστρωμα είναι η ινώδης κυτταρίνη και ο βασικός ακυλο-δότης είναι ο δωδεκανοϊκός ή λαυρικός βινυλ-εστέρας.

Ο συνολικός όγκος του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα είναι 50 mL. Προφανώς αυτός είναι και ο ενεργός αντιδρών όγκος, καθώς το υπερκρίσιμο ρευστό στο οποίο διεξάγεται η αντίδραση καταλαμβάνει όλο το χώρο του αντιδραστήρα (**σχήμα 7.1**). Ένα τυπικό αντιδρών σύστημα αποτελείται από 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα (ακυλο-δότης) ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ένζυμο με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά είδη ακινητοποιημένων υδρολυτικών ενζύμων που ειδικεύονται στους εστερικούς δεσμούς. Η επιλογή των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών και η ταυτόχρονη απουσία αντίστοιχων ενζύμων σε ελεύθερη μορφή δεν είναι τυχαία. Έχει αναφερθεί πως σε περιβάλλον υπερκρίσιμων ρευστών όπου η πίεση λαμβάνει πολύ υψηλότερες τιμές από την ατμοσφαιρική, τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν σαφώς μεγαλύτερη σταθερότητα απ' ό,τι τα ελεύθερα (Dijkstra et al., 2007; Lozano et al., 2004a; Marty et al., 1992; Reetz et al., 2002; Sereti et al., 1997; Wimmer & Zarevucka, 2010). Επίσης, στο προηγούμενο κεφάλαιο που παρουσιάστηκαν οι αντιδράσεις ενζυμικής ακυλίωσης της -αναγεννημένης από ιοντικά υγρά- ινώδους κυτταρίνης, φάνηκε πως η καταλυτική απόδοση της ελεύθερης εστεράσης είναι παρεμφερής με το αντίστοιχο ακινητοποιημένο ένζυμο. Ένα ακόμα συγκριτικό πλεονέκτημα της χρήσης των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι η ευκολία της ανάκτησης τους από το αντιδρών μείγμα, όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 40 °C και η πίεση του συστήματος 18 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες). Προφανώς το μέσο της αντίδρασης είναι το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Η συνολική διάρκεια της αντίδρασης ορίστηκε στις 9 h. Η κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό έντονη ανάδευση αλλά και απουσία αυτής. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης. Όταν πραγματοποιήθηκε η παραπάνω αντίδραση υπό έντονη ανάδευση, στο αντίστοιχο προϊόν ανιχνεύθηκε η ύπαρξη εστερικού δεσμού, και για τους τρεις χρησιμοποιούμενους βιοκαταλύτες. Τα φάσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση του προϊόντος με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR), πιστοποίησαν το σχηματισμό εστερικών δεσμών μεταξύ των υδροξυλίων της ινώδους κυτταρίνης και της καρβοξυλομάδας του λιπαρού ακυλο-δότη. Η εμφάνιση μίας κορυφής σε κυματαριθμό 1755 cm⁻¹ είναι χαρακτηριστική του εστερικού δεσμού (**σχήμα 9.1 & παράρτημα Β**).

Αντίθετα, όταν αναλύθηκαν τα προϊόντα των αντιδράσεων που έγιναν απουσία ανάδευσης, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός εστερικού δεσμού στην ινώδη κυτταρίνη, ανεξάρτητα από το επιλεγμένο ένζυμο (**πίνακας 9.1**). Επίσης, σε καμία από τις αντιδράσεις ελέγχου δεν ανιχνεύθηκε εστερικός δεσμός επί της κυτταρίνης. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι εξαιρετικά σημαντικές διότι αποκαλύπτουν δυο ιδιαίτερα στοιχεία που αφορούν στην μελετώμενη αντίδραση. Καταρχήν η αντίδραση ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με τον

λαυρικό βινυλ-εστέρα πραγματοποιείται. Και μάλιστα πραγματοποιείται ενζυμικά εφόσον απουσία ενζύμου δεν παρατηρείται ο σχηματισμός εστέρα της κυτταρίνης.



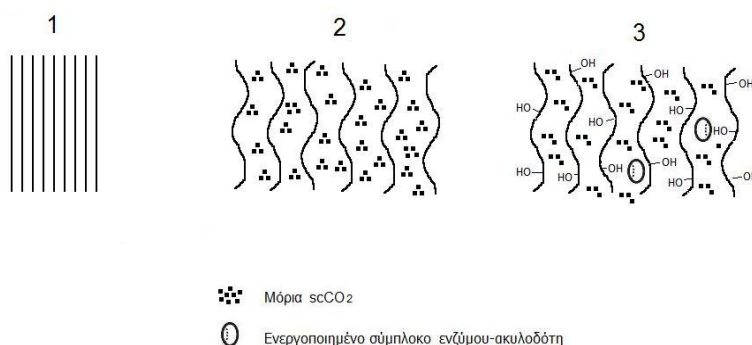
Σχήμα 9.1 Φάσματα FTIR της λαυρικής κυτταρίνης που προέκυψε από την ενζυμική ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα, σε περιβάλλον $scCO_2$ (A) και του κυτταρινούχου προϊόντος που προέκυψε από την αντίστοιχη αντίδραση ελέγχου, απουσία βιοκαταλύτη (B). Το φάσμα B είναι πανομοιότυπο με αυτό της καθαρής ινώδους κυτταρίνης.

Πίνακας 9.1 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με ακυλο-δότη το λαυρικό βινυλ-εστέρα, σε περιβάλλον $scCO_2$.

Ακυλο-δότης	Ανάδευση	Ένζυμο	Προϊόν
λαυρικός βινυλ-εστέρας	✓	ακινητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	λαυρική κυτταρίνη
		ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	λαυρική κυτταρίνη
		ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	λαυρική κυτταρίνη
	x	ακινητοποιημένη λιπάση B <i>Candida antarctica</i>	-
		ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου	-
		ακινητοποιημένη κουτινάση <i>Fusarium solani pisi</i>	-

Η παρατήρηση αυτή είναι μοναδική καθώς δεν απαιτείται προκατεργασία της κυτταρίνης για να «ανοίξει» η δομή της και να μπορέσει να γίνει δραστική. Η ανάλογη προκατεργασία διεξάγεται από το ίδιο το υπερκρίσιμο ρευστό, παράλληλα με την αντίδραση. Φαίνεται λοιπόν πως το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα κατόρθωσε να εισχωρήσει ανάμεσα στις αλυσίδες της κυτταρίνης και να διογκώσει την τελευταία, καταστρέφοντας ένα μεγάλο ποσοστό των δεσμών υδρογόνου που κανονικά συμβάλλει στην τακτική και συμπαγή δομή της.

Έπειτα, τα ενεργοποιημένα με ομάδες του ακυλο-δότη ενζυμικά μόρια, προσεγγίζουν τα πλέον εκτεθειμένα υδροξύλια και τα ακυλιώνουν (σχήμα 9.2). Με άλλα λόγια η υπόθεση βάση της οποίας το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να λειτουργήσει ως παράγοντας διόγκωσης της κυτταρίνης και ταυτόχρονα ως μέσο για την ενζυμική της ακυλίωση, επαληθεύεται.



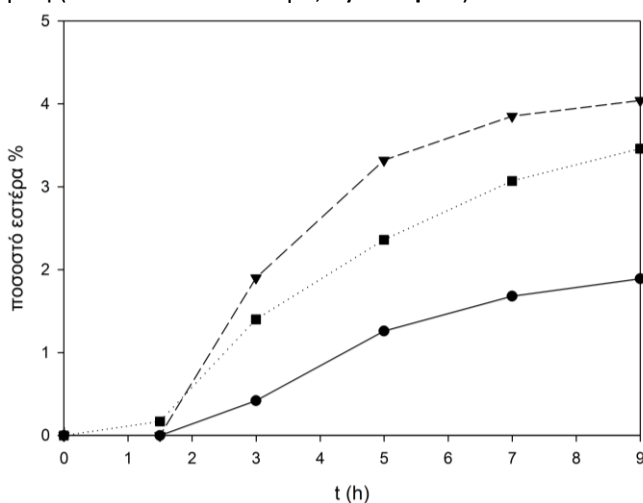
Σχήμα 9.2 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας διόγκωσης της ινώδους κυτταρίνης από το scCO_2 και της περαιτέρω ενζυμικής της ακυλίωσης.

Το δεύτερο, πολύ σημαντικό, συμπέρασμα που προκύπτει από τα αποτελέσματα των παραπάνω αντιδράσεων είναι πως η έντονη ανάδευση είναι απαραίτητη για την επίτευξη της συγκεκριμένης ακυλίωσης. Το ίδιο ακριβώς σύστημα παράγει την εστεροποιημένη ινώδη κυτταρίνη υπό ανάδευση, ενώ απουσία αυτής δεν συμβαίνει καμία αντίδραση. Ο αρχικός λόγος για τον οποίο δοκιμάστηκαν οι αντιδράσεις απουσία ανάδευσης ήταν οι εξαιρετικές τιμές διαχυτότητας και συντελεστών μεταφοράς μάζας που έχει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (Al-Duri et al., 2001; Cantone et al., 2007; Erkey, 2000; Lozano et al., 2004c; Ramsey et al., 2009). Όπως φάνηκε όμως, τα χαρακτηριστικά αυτά από μόνα τους δεν είναι ικανά για την πραγματοποίηση της ενζυμικής ακυλίωσης. Το συμπέρασμα αυτό δεν είναι παράλογο καθώς η στερεή ινώδης κυτταρίνη εξακολουθεί να παραμένει αδιάλυτη στο υπερκρίσιμο περιβάλλον. Εάν λοιπόν πρόκειται να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση με ένα τουλάχιστον αδιάλυτο υπόστρωμα, τότε πρέπει να της δοθεί επιπλέον ενέργεια, υπό τη μορφή ανάδευσης. Στην περίπτωση αντιδράσεων στερεάς κατάστασης, οι αντιστάσεις στη μεταφορά μάζας είναι πολύ υψηλές και η μόνη πιθανότητα για να καμφθούν έγκειται στην έντονη ανάδευση, ώστε τα αντιδρώντα να έρθουν σε επαφή.

Ένα ακόμα προσόν της ανάδευσης είναι πως διευκολύνει τη διάχυση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα προς τις αλυσίδες της κυτταρίνης,

ενισχύοντας το φαινόμενο της διόγκωσης του πολυσακχαρίτη. Επίσης το λιπαρό υπόστρωμα (λαυρικός βινυλ-εστέρας) είναι διαλυτό στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, το οποίο έχει διαλυτικά χαρακτηριστικά παρόμοια με αυτά του εξανίου. Έτσι, όσον αφορά στον ακυλο-δότη, δεν υπάρχει κανένας ιδιαίτερος περιορισμός στη μεταφορά μάζας. Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα συνδυάζει το τερπνό μετά του ωφελίμου· διόγκωση της κυτταρίνης ώστε να αυξηθεί η προσβασιμότητα των υδροξυλίων της, διάλυση και μεταφορά του λιπαρού υποστρώματος, προσέγγιση και εισχώρηση στο δίκτυο των αλυσίδων κυτταρίνης και τέλος φιλοξενία των ενζυμικών δράσεων.

Αναφερόμενοι στο λιπαρό υπόστρωμα, επιλέχθηκε ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέος διότι από θερμοδυναμική άποψη είναι καλύτερος ακυλο-δότης απ' ό,τι το ελεύθερο λαυρικό οξύ (Yang & Wang, 2004; Yang & Wang, 2003). Επίσης, κατά τη διάρκεια του καταλυτικού μηχανισμού του ενζύμου, οι ομάδες βινυλικής αλκοόλης που απελευθερώνονται, ταυτομερίζονται στην αντίστοιχη αλδεΐδη (ακεταλδεΐδη) (Yang & Wang, 2004). Συνεπώς δεν υφίσταται καμία πιθανότητα για τον επανασηματισμό εστερικού δεσμού μεταξύ βινυλικής αλκοόλης και λαυρικού οξέος· μίας διαδικασίας που θα λειτουργούσε ανταγωνιστικά προς την ενζυμική σύνθεση της λαυρικής κυτταρίνης. Τα αποτελέσματα που αφορούν στη χρονική εξέλιξη των παραπάνω επιτυχών αντιδράσεων παρατίθενται στο διάγραμμα του **σχήματος 9.3**. Η πορεία της κάθε αντίδρασης εκφράζεται ως προς το % ποσοστό της μάζας του συνολικού αλειφατικού τμήματος του εστέρα επί της ολικής μάζας του εστεροποιημένου πολυσακχαρίτη (% ποσοστό του εστέρα, **εξίσωση 7.4**).



Σχήμα 9.3 Πρόοδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό βινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον $scCO_2$. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* (●), η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (■) και η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* (▼). Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με $40^\circ C$, πίεση 18 MPa και με συγκέντρωση ενζύμου 0.1 U/mg κυτταρίνης. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό έντονη ανάδευση.

Η αντίδραση ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης, με το λαυρικό βινυλ-εστέρα ως ακυλο-δότη και την ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* ως βιοκαταλύτη, δεν αποφέρει κανένα αποτέλεσμα μέχρι τις 1.5 h. Στη συνέχεια όμως ο λαυρικός εστέρας της κυτταρίνης αρχίζει να σχηματίζεται, φτάνοντας το ποσοστό εστεροποίησης 1.8% στις 9 h αντίδρασης. Φαίνεται λοιπόν πως αρχικά υπάρχει μία φάση υστέρησης (lag phase). Αντίστοιχη σιγμοειδής συμπεριφορά παρουσιάζεται και για τη χρονική εξέλιξη της ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με ένζυμο την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Εμφανίζεται μία φάση υστέρησης που διαρκεί περίπου 1.5 h και έπειτα ξεκινά η ενζυμική εστεροποίηση του πολυσακχαρίτη. Στις 9 h αντίδρασης, το αντίστοιχο ποσοστό του εστέρα φτάνει το 4.0%.

Αξιολογώντας τα παραπάνω αποτελέσματα, σε συνδυασμό με το ρόλο που έχει φανεί ότι παίζει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, οδηγούμαστε σε ένα πιθανό συμπέρασμα ύψιστης σημασίας. Η υστέρηση που παρουσιάζεται στο αρχικό στάδιο των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης οφείλεται στην εξέλιξη της διαδικασίας διόγκωσης της από το υπερκρίσιμο ρευστό. Προφανώς το φαινόμενο αυτό δεν είναι άμεσο και στιγμιαίο. Τα ενεργοποιημένα μόρια του ενζύμου δεν μπορούν να προσεγγίσουν τη συμπαγή δομή της κρυσταλλικής κυτταρίνης και κατ' επέκταση δε μπορούν να έχουν πρόσβαση στα υδροξύλια της έως ότου «ανοίξει» η δομή της, λόγω της διόγκωσης. Η διόγκωση αυτή αποδίδεται στη δράση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα και με κριτήριο τα πειραματικά μας αποτελέσματα φαίνεται πως απαιτείται χρόνος περί τις 1.5 h ώστε να γίνει η προαναφερόμενη δομική αλλαγή. Φυσικά, αυτή η παρατήρηση δεν σημαίνει ότι η διόγκωση του κυτταρινούχου υποστρώματος ολοκληρώνεται στο χρόνο αυτό. Η κυτταρίνη παραμένει διογκωμένη καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, η οποία εξελίσσεται συνεχώς. Μάλιστα υπάρχει και η πιθανότητα της κλιμάκωσης του φαινομένου της διόγκωσης πέραν των 1.5 h.

Όταν ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, διακρίνεται μία μικρή διαφοροποίηση της κινητικής συμπεριφοράς της αντίδρασης, σε σχέση με τα άλλα δυο ένζυμα. Πιο συγκεκριμένα, για χρόνο αντίδρασης ίσο με 1.5 h δεν εμφανίζεται κάποια ξεκάθαρη υστέρηση, αλλά φαίνεται πως επικρατεί μία λανθάνουσα κατάσταση, κάτι σαν ελέγχον στάδιο (limiting step). Στο χρόνο αυτό έχει ξεκινήσει η εστεροποίηση της κυτταρίνης και το αντίστοιχο ποσοστό του εστέρα είναι της τάξης του 0.2%. Παρόλα αυτά η εξέλιξη της ακυλίωσης δεν συνεχίζεται με ομαλή αυξητική τάση, αλλά ξαφνικά ο ρυθμός της αυξάνει κατακόρυφα. Από τις 3 h και μετά, η αντίδραση ακολουθεί μία πορεία που είναι κλασική για ενζυμικές δράσεις. Τέλος, στις 9 h αντίδρασης το ποσοστό του εστέρα που έχει σχηματισθεί είναι 3.5%. Σύμφωνα με τις επισημάνσεις περί διόγκωσης κυτταρίνης που προηγήθηκαν, τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα καταδεικνύουν πως η διάνοιξη της δομής της κυτταρίνης είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για τη μετέπειτα ενζυμική ακυλίωση της. Το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα εισχωρεί στις αλυσίδες κυτταρίνης, τις απομακρύνει μεταξύ τους διασπώντας τους ανάλογους δεσμούς υδρογόνου που τις συγκρατούν και στη συνέχεια τα μόρια του ενζύμου και του ακυλο-δότη μπορούν να προσεγγίσουν τα ελεύθερα υδροξύλια της κυτταρίνης και να τα εστεροποιήσουν. Σε αντίθεση όμως με τα άλλα δυο χρησιμοποιούμενα ένζυμα, η

ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου δείχνει πως μπορεί να προσεγγίσει και να εστεροποιήσει κάποια υδροξύλια - προφανώς επιφανειακά - προτού περάσει ο χρόνος που φαίνεται πως απαιτείται για τη διόγκωση της κυτταρίνης (1.5 h). Η συγκεκριμένη ιδιαιτερότητα που επιδεικνύει η εστεράση είναι πιθανό να οφείλεται στο σχετικά υδρόφιλο χαρακτήρα της, στο σχετικά μικρό της μέγεθος (φορέας ακινητοποίησης) και στη θέση του ενεργού της κέντρου που είναι εκτεθειμένο προς το εξωτερικό περιβάλλον (Fett et al., 2000; Floyd et al., 1979; Keay & Crook, 1965; Krisch, 1963; Thodi et al., 2008). Ως αποτέλεσμα, η ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης ξεκινά νωρίτερα σε σχέση με την ακίνητοποιημένη λιπάση και κουτινάση.

Συγκρίνοντας τα προφίλ των ανωτέρω αντιδράσεων (σχήμα 9.3) είναι ξεκάθαρο πως μετά την κανονική ή τη φαινόμενη φάση υστέρησης, ο ρυθμός των ακυλίωσεων που γίνονται με ένζυμα την ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και την ακίνητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, είναι σημαντικά υψηλότερος απ' όταν χρησιμοποιείται η η ακίνητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*. Επιπλέον, στις 9 h αντίδρασης, το ποσοστό του εστέρα όταν χρησιμοποιείται η ακίνητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* είναι 1.8%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τις αντιδράσεις με την ακίνητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και την ακίνητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* είναι 3.5 και 4.0%. Η συγκεκριμένη υπεροχή της ακίνητοποιημένης εστεράσης οφείλεται λίγο έως πολύ στους παράγοντες που αναφέρθηκαν στην αμέσως προηγούμενη παράγραφο. Για τη δε κουτινάση, η καταλυτικά πλεονεκτική της θέση έγκειται πιθανότατα στην ιδιαίτερη εκλεκτικότητα που φυσικά δείχνει προς τα πολυμερή μόρια (Egmond & de Vlieg, 2000; Fernando et al., 1984; Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Koller et al., 1982). Παράλληλα, η ακίνητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* παρουσιάζει έναν πιο υδρόφοβο χαρακτήρα από τα άλλα δύο ένζυμα, λόγω ύπαρξης του υδρόφοβου πεπτιδικού καλλύματος και επίσης το ενεργό της κέντρο βρίσκεται σχετικά βαθιά σε αντίθεση με αυτό της εστεράσης και της κουτινάσης που είναι εκτεθειμένο στο εξωτερικό περιβάλλον. Με άλλα λόγια η προσέγγιση της υδρόφιλης κυτταρίνης από τη λιπάση είναι δυσκολότερη. Στα παραπάνω πρέπει να συνυπολογιστεί και το μέγεθος των ακίνητοποιημένων βιοκαταλυτών, συμπεριλαμβανομένου του φορέα ακινητοποίησης. Ειδικότερα, ο φορέας ακινητοποίησης της λιπάσης Β από *Candida antarctica* (Lewatit, 10-30 mesh) είναι αρκετά μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους φορείς της ακίνητοποιημένης εστεράσης από ήπαρ χοίρου (Eupergit, 80-120 mesh) και της ακίνητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* (Accurel, 60-80 mesh). Και πάλι όμως το μέγεθος των ίδιων των πρωτεϊνών εξακολουθεί να παίζει ρόλο διότι και στις τρεις παραπάνω περιπτώσεις, το μεγαλύτερο ποσοστό των ενζύμων είναι προσδεμένο στην επιφάνεια των αντίστοιχων φορέων και έρχεται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα του.

Ενδιαφέρουσα πάντως είναι και η επίδειξη δραστικότητας της ακίνητοποιημένης λιπάσης Β από *Candida antarctica*, ως προς την ικανότητα της να εστεροποιεί την ινώδη κυτταρίνη στο σύστημα του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Το ενδιαφέρον προέρχεται από την αδυναμία που επέδειξε το ίδιο ένζυμο στο να ακυλίωσε την (αναγεννημένη από ιοντικά υγρά) ινώδη κυτταρίνη με το λαυρικό βινυλ-εστέρα στο αντίστοιχο σύστημα απουσία διαλύτη (κεφάλαιο 8). Η ουσιαστική διαφορά έγκειται στον τρόπο επεξεργασίας της κυτταρίνης και

στο περιβάλλον της κάθε αντίδρασης. Σε σχέση με την προκατεργασία σε ιοντικά υγρά, η διόγκωση της ινώδους κυτταρίνης από το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα δείχνει πιο ικανή ώστε το συγκεκριμένο ένζυμο να μπορεί να εστεροποιήσει τον πολυσακχαρίτη. Ενδεχομένως με την τεχνική αυτή να δημιουργείται περισσότερος διαθέσιμος χώρος, ώστε η ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* να μπορεί να προσεγγίσει ικανό αριθμό κυτταρινικών υδροξυλομάδων και να τις ακυλώσει. Επίσης εικάζεται πως οι υψηλές τιμές διαχυτότητας και συντελεστών μεταφοράς μάζας που εξασφαλίζει το περιβάλλον του υπερκρίσιμου ρευστού, παίζουν ιδιαίτερο ρόλο στην επίδειξη ενεργότητας από το σχετικά μεγάλο μεγέθους εξεταζόμενο ένζυμο (Dijkstra et al., 2007; Lozano et al., 2004c; Marty et al., 1992).

Μία γενικότερη παρατήρηση σχετικά με τη χρονική εξέλιξη των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, αφορά στον τρόπο με τον οποίο οδεύουν οι αντιδράσεις σε χρόνους κοντά στις 9 h (**σχήμα 9.3**). Φαίνεται πως οι εκάστοτε τιμές του % ποσοστού του εστέρα τείνουν προς μία σταθεροποίηση· οι αντιδράσεις πιάνουν πλατό σε κάποια συγκεκριμένη τιμή. Αν και αυτό μοιάζει με αποκατάσταση χημικής ισορροπίας, στην πραγματικότητα είναι περισσότερο κάτι σαν οριακό σημείο. Ένα οριακό σημείο που δεν εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του λιπαρού υποστρώματος, καθώς το τελευταίο βρίσκεται σε περίσσεια. Η πιο πιθανή εξήγηση προέρχεται από τα χωροταξικά χαρακτηριστικά του αντιδρώντος συστήματος· ένα είδος στερεοχημικής παρεμπόδισης δυσχεραίνει την περαιτέρω ενζυμική δράση. Στις 9 h περίπου, το πλήθος των λαυρικών ομάδων που έχουν συνδεθεί ομοιοπολικά με την κυτταρίνη είναι τέτοιο ώστε να προκαλεί ενός είδους συμφόρηση. Η παρουσία των μακρών αλειφατικών αλυσίδων λειτουργεί ως εμπόδιο και επιβραδύνει ή μπλοκάρει εντελώς την ενζυμική δράση. Σε αυτήν την κατάσταση θα πρέπει να συνυπολογιστεί και η γενικότερη φύση του δικτύου των αλυσίδων κυτταρίνης που ούτως ή άλλως δυσχεραίνει την προσέγγιση των ενεργοποιημένων ενζύμων στα κυτταρινικά υδροξύλια. Τέλος φαίνεται πως για κάθε έναν από τους τρεις διαφορετικούς βιοκαταλύτες που δοκιμάζονται, αυτό το κρίσιμο ποσοστό εστεροποίησης μεταβάλλεται ανάλογα με το μέγεθος, την εκλεκτικότητα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που επιδεικνύουν.

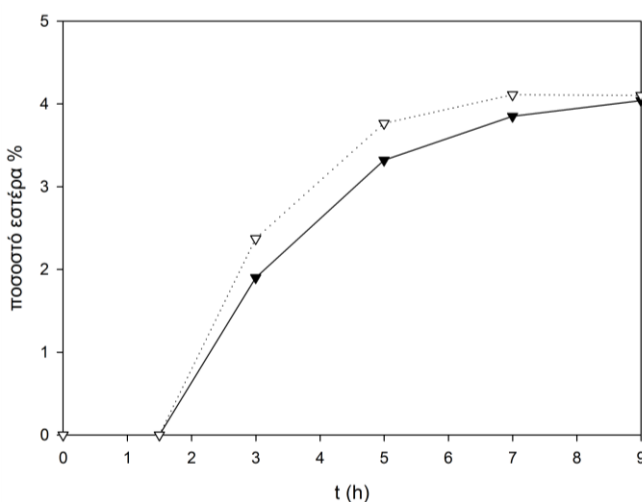
Εξαιτίας της συγκριτικής υπεροχής της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* ως προς το % ποσοστό εστεροποίησης που επιτυγχάνεται στις 9 h αντίδρασης και ως προς το ρυθμού με τον οποίο αυτό επιτυγχάνεται (**σχήμα 9.3**), κρίνεται σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη της εξεταζόμενης αντίδρασης με το ένζυμο αυτό. Έτσι στη συνέχεια ελέγχεται η επίδραση που έχουν διάφορες παράμετροι στην αντίδρασης ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, χρησιμοποιώντας το ένζυμο ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*.

9.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Όπως αποδείχθηκε, η ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα υπό τις μελετώμενες συνθήκες, οφείλεται

σε ενζυμική δράση. Στα αντίστοιχα συστήματα ελέγχου από τα οποία απουσίαζε ο βιοκαταλύτης, δεν υπήρξε σχηματισμός του ανάλογου αλειφατικού εστέρα της κυτταρίνης. Είναι λοιπόν σημαντικό το να μελετηθεί και η επίδραση που έχει η ενζυμική συγκέντρωση στην εξέλιξη και την πορεία των συγκεκριμένων αντιδράσεων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις στις οποίες μεταβάλλεται η ενζυμική συγκέντρωση. Το κάθε αντιδρών σύστημα συνίσταται από 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ένζυμο με συγκέντρωση 0.1 και 0.3 U/mg κυτταρίνης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 40 °C, η πίεση του συστήματος 18 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες) και υπήρχε έντονη ανάδευση. Ο αντιδρών όγκος προφανώς είναι ίσος με 50 mL. Η συνολική διάρκεια της κάθε αντίδρασης ορίστηκε στις 9 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης.

Τα αποτελέσματα των εν λόγω αντιδράσεων αναμένεται να έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας της περιέργης σιγμοειδούς συμπεριφοράς που επιδεικνύουν στο αρχικό τους στάδιο. Στην περίπτωση της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi*, εξακολουθεί να υφίσταται η φάση υστέρησης ως τις 1.5 h (σχήμα 9.4).



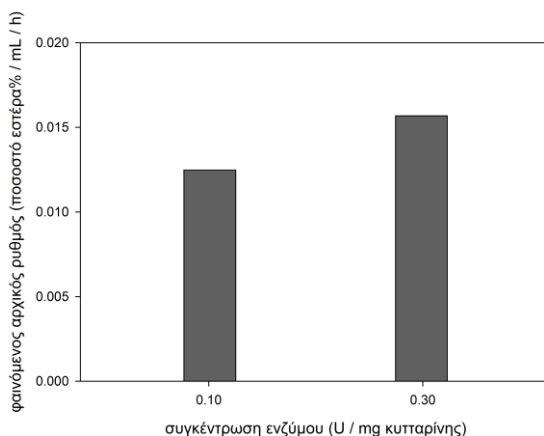
Σχήμα 9.4 Πρόοδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό βινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον $scCO_2$. Ως ένζυμο χρησιμοποιήθηκε η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 40 °C και πίεση 18 MPa. Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.1 (▼) και 0.3 U/mg κυτταρίνης (▽). Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL και οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό έντονη ανάδευση.

Από εκεί και πέρα με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου από τα 0.1 στα 0.3 U/mg κυτταρίνης, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού των αντιδράσεων, όχι

όμως και του τελικού ποσοστού του εστέρα που παραμένει σχεδόν ίδιο. Κινητικά λοιπόν πρόκειται για μία ενζυμικά ελεγχόμενη αντίδραση. Φαίνεται πως όταν σε δεδομένο όγκο αντίδρασης υπάρχουν περισσότερα units ενζύμου, το τελικό ποσοστό εστεροποίησης της ανάλογης αντίδρασης επιτυγχάνεται πιο σύντομα. Όσο περισσότερο είναι το ένζυμο, τόσο πιο γρήγορα εξελίσσεται η αντίδραση. Για ένα δεδομένο χρονικό διάστημα, όταν υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός ενζυμικών μορίων συνάπτονται και περισσότεροι εστερικοί δεσμοί. Έτσι επιτυγχάνεται η αυξημένη ταχύτητα. Το τελικό ποσοστό του εστέρα δε μεταβάλλεται ιδιαίτερα γιατί, όπως όλα δείχνουν, καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα και το πλήθος των ενεργών υδροξυλίων και όχι από τη συγκέντρωση του βιοκαταλύτη.

Όταν σε μία ενζυμική αντίδραση μεταβάλλεται η συγκέντρωση του ενζύμου, τότε αυτό που συνήθως διαφοροποιείται είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Υπ' αυτές τις συνθήκες, η σύγκριση των τιμών των αρχικών ρυθμών των διαφόρων αντιδράσεων αποκτά ιδιαίτερο πρακτικό ενδιαφέρον. Όμως για τις αντιδράσεις που μας αφορούν στην προκειμένη περίπτωση, αυτό δεν μπορεί να εφαρμοστεί άμεσα. Για τις πρώτες 1.5 h, οι αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχει η ακινητοποιημένη κουτινάση δεν παρουσιάζουν καμία πρόοδο. Από το χρονικό σημείο αυτό και έπειτα, η αντίδραση πορεύεται κανονικά ως τις 9 h. Μάλιστα οι ανάλογοι ρυθμοί είναι τέτοιοι ώστε να φαίνεται πως η αντίδραση ξεκινάει σε αυτό το σημείο (~ 3 h). Φυσικά αυτή η κατάσταση οφείλεται στη φάση υστέρησης που εκδηλώνεται.

Μία σύγκριση που θα έχει νόημα για την ιδιάζουσα αυτή μορφή αποτελεσμάτων, είναι μεταξύ των ρυθμών που υπολογίζονται ως το % ποσοστό εστεροποίησης ανά μονάδα όγκου αντίδρασης (mL) και ανά μονάδα χρόνου (h), για χρονική διάρκεια 3 h. Τα συγκριτικά αποτελέσματα που αφορούν στις διαφορετικές ενζυμικές συγκεντρώσεις για την ακινητοποιημένη κουτινάση, παρατίθενται στο ραβδόγραμμα του **σχήματος 9.5**.



Σχήμα 9.5 Σύγκριση των φαινόμενων αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό θινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον scCO_2 και ένζυμο την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 40°C και πίεση 18 MPa. Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 0.1 και 0.3 U/mg κυτταρίνης. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό έντονη ανάδευση.

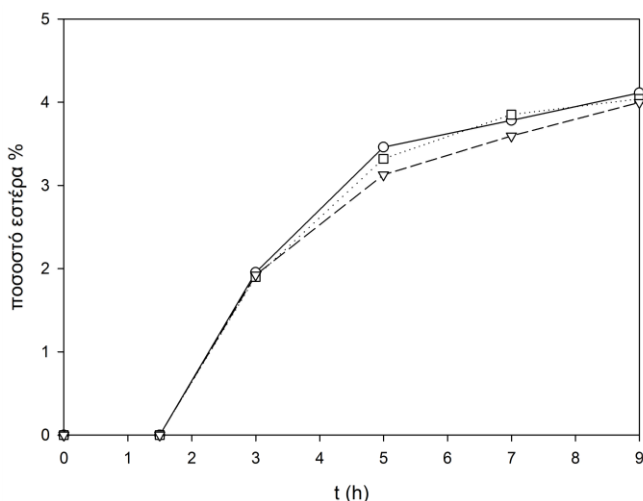
Φυσικά δεν πρόκειται για αρχικές ταχύτητες, αλλά το μέγεθος αυτό έτσι όπως ορίζεται είναι αντιπροσωπευτικό της αρχικής πορείας της όλης διαδικασίας (διόγκωση κυτταρίνης και ενζυμική δράση), με μεταβαλλόμενη συγκέντρωση ενζύμου. Ουσιαστικά πρόκειται για ένα φαινόμενο αρχικό ρυθμό. Γι' αυτό το λόγο συμπεριλαμβάνεται και το αρχικό χρονικό κομμάτι των 1.5 h.

9.2 Επίδραση της ποσότητας της κυτταρίνης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Η ινώδης κυτταρίνη παραμένει αδιάλυτη στο περιβάλλον του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($T=40^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$), όπου λαμβάνουν χώρα η διόγκωση και η ενζυμική ακυλίωση της. Μία παράμετρος της οποίας η μελέτη έχει ενδιαφέρον, είναι η αρχική ποσότητα της ινώδους κυτταρίνης που κάθε φορά προστίθεται στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Έτσι, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με μεταβαλλόμενη ποσότητα κυτταρινούχου υποστρώματος. Το εκάστοτε αντιδρών σύστημα περιελάμβανε 100, 150 ή 200 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ένζυμο με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 40°C και η πίεση του συστήματος 18 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες). Επίσης υπήρχε έντονη ανάδευση. Η συνολική διάρκεια της κάθε αντίδρασης ορίστηκε στις 9 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης. Υπενθυμίζεται και πάλι πως ο αντιδρών όγκος είναι ίσος με τον όγκο του αντιδραστήρα, δηλαδή 50 mL.

Με βιοκαταλύτη την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, η πορείες των αντιδράσεων με αρχική ποσότητα κυτταρίνης ίση με 100 και 150 mg, είναι ταυτόσιμες (σχήμα 9.6). Παρόμοιοι είναι και οι αντίστοιχοι ρυθμοί των δυο αντιδράσεων. Όταν όμως η αρχική ποσότητα της κυτταρίνης αυξάνεται στα 200 mg, διακρίνεται μία ελαφριά ύφεση στο τελικό % ποσοστό του εστέρα (9 h). Ειδικότερα, το ποσοστό του εστέρα στις 9 h, για τις αντιδράσεις με αρχική ποσότητα ινώδους κυτταρίνης ίση με 100, 150 και 200 mg είναι 4.1, 4.0 και 3.8% αντίστοιχα.

Φαίνεται λοιπόν πως στον αντιδρώντα όγκο των 50 mL, με αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης πέραν των 150 mg, παρατηρείται μία μικρή μείωση του τελικού ποσοστού του εστέρα. Σύμφωνα με την παραπάνω συμπεριφορά αποδεικνύεται πως από ένα σημείο και μετά, όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα της μεγαλομοριακής κυτταρίνης στο αντιδρών σύστημα, τόσο πιο δύσκολα διεξάγεται η ενζυμική της ακυλίωση. Ο πιθανότερος λόγος είναι πως με αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης που είναι ένα πολυμερές, αυξάνονται οι δυσκολίες στη μεταφορά μάζας του συστήματος και οι ρυθμοί διάχυσης μειώνονται.



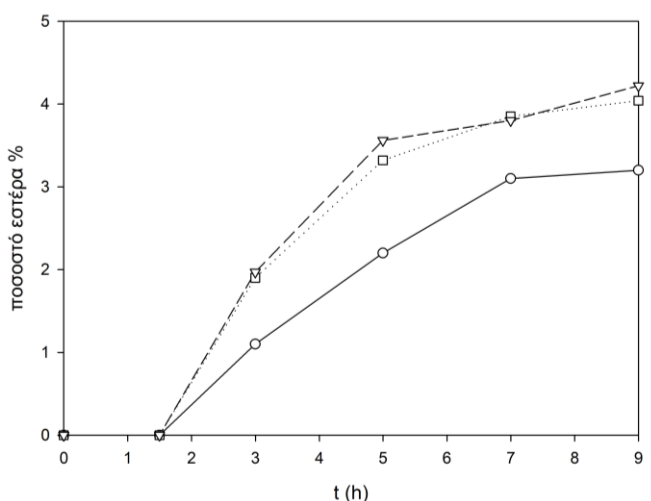
Σχήμα 9.6 Πρόσδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον $scCO_2$. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, πίεση 18 MPa και με συγκέντρωση ενζύμου 0.1 U/mg κυτταρίνης. Η αρχική ποσότητα της ινώδους κυτταρίνης ήταν 100 (O), 150 (□) και 200 mg (▽), σε όγκο αντίδρασης ίσο με 50 mL. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν υπό έντονη ανάδευση.

Και πάλι όμως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του παραπάνω διαγράμματος, το φαινόμενο αυτό δεν είναι ιδιαίτερα έντονο στις τιμές περιεκτικότητας κυτταρίνης που εξετάζονται.

9.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Μετά την εξέταση της επίδρασης της περιεκτικότητας των μελετώμενων ενζυμικών αντιδράσεων σε κυτταρίνη, είναι εύλογο να μελετηθεί και η ανάλογη επίδραση που έχει το έτερο υπόστρωμα· ο βινυλ-εστέρας του λαυρικού οξέως. Για το σκοπό αυτό εκτελέστηκαν αντιδράσεις με διαφορετική συγκέντρωση του ακυλο-δότη. Το εκάστοτε αντιδρών σύστημα περιελάμβανε 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.1, 0.4 ή 1 M και ένζυμο με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, η πίεση του συστήματος 18 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες) και υπήρχε έντονη ανάδευση. Η συνολική διάρκεια της κάθε αντίδρασης ορίστηκε στις 9 h. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης. Ο αντιδρών όγκος είναι ίσος με τον όγκο του αντιδραστήρα, δηλαδή 50 mL.

Στο **σχήμα 9.7** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης του λαυρικού βινυλ-εστέρα, στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$). Η γενική εικόνα που παρουσιάζεται, υποδηλώνει πως με αύξηση της συγκέντρωσης του διαλυτού λιπαρού βινυλ-εστέρα, αυξάνεται το % ποσοστό του εστέρα. Για συγκέντρωση του ακυλο-δότη ίση με 0.1 M , το ποσοστό του εστέρα στις 9 h αντίδρασης είναι ίσο με 3.2% . Τα αντίστοιχα ποσοστά για τις τιμές συγκέντρωσης του λαυρικού βινυλ-εστέρα 0.4 και 1 M , είναι 4.0 και 4.2% .



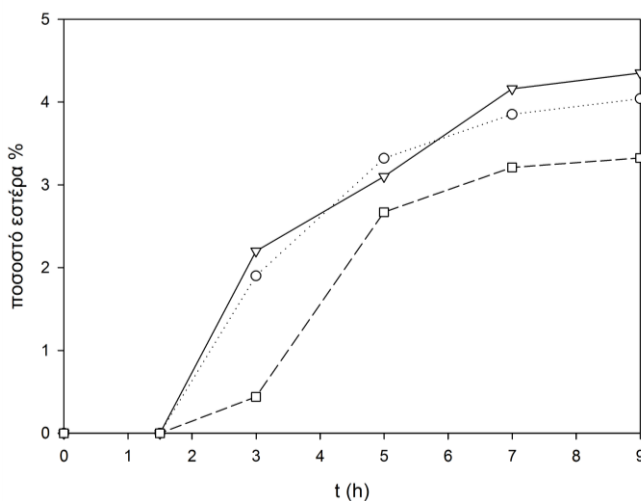
Σχήμα 9.7 Πρόοδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό βινυλ-εστέρα, σε περιβάλλον scCO_2 . Η συγκέντρωση του ακυλο-δότη ήταν 0.1 (O), 0.4 (□) και 1 M (▽). Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ και πίεση 18 MPa , υπό έντονη ανάδευση. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL .

Με αύξηση της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη, αυξάνονται οι πιθανότητες για την προσέγγιση του στα υδροξύλια της κυτταρίνης. Πάντως φαίνεται πως αυξάνοντας τη συγκέντρωση πέραν των 0.4 M , η ανάλογη αύξηση του % ποσοστού του εστέρα δεν είναι μεγάλη. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση βάσης της οποίας υπάρχει κάποιο όριο στο διαθέσιμο πλήθος των υδροξυλίων που δημιουργείται λόγω διόγκωσης της κυτταρίνης από το υπερκρίσιμο ρευστό. Επίσης ο φαινόμενος αρχικός ρυθμός των παραπάνω αντιδράσεων, έτσι όπως ορίστηκε στη παράγραφο 9.1, είναι σχεδόν ίδιος για τις τιμές συγκέντρωσης του ακυλο-δότη 0.4 και 1 M . Από την άλλη, ο φαινόμενος αρχικός ρυθμός που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση λαυρικού βινυλ-εστέρα ίση με 0.1 M , δείχνει αρκετά μικρότερος, συγκρίνοντας τις κλίσεις των αντίστοιχων διαγραμμάτων του **σχήματος 9.7**.

9.4 Επίδραση του μήκους της αλυσίδας του ακυλο-δότη στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Στην αρχή του παρόντος κεφαλαίου αναφέρθηκε ο κύριος στόχος των ενζυμικών αντιδράσεων σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Σύμφωνα με αυτόν, είναι επιθυμητή η ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες σχετικά μεγάλου μήκους. Έτσι ως βασικός ακυλο-δότης των αντιδράσεων, επιλέχθηκε ο βινυλ-εστέρας του δωδεκανοϊκού ή λαυρικού οξέος. Παρόλα αυτά, η εξέταση της επίδρασης που έχει το μήκος της αλειφατικής αλυσίδας του ακυλο-δότη στο μελετώμενο τύπο αντίδρασης, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Για τον λόγο αυτό, πέραν του λαυρικού, δοκιμάζονται ως ακυλο-δότες οι προπιονικός και δεκαοκτανοϊκός ή στεατικός βινυλ-εστέρας.

Οι αντιδράσεις που διεξάχθηκαν γι' αυτό το σκοπό, είχαν την ακόλουθη σύσταση: 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα προπιονικού, λαυρικού ή στεατικού βινυλ-εστέρα, ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Ο αντιδραστήρας όγκου 50 mL, πληρώνεται με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$). Καθ' όλη τη διάρκεια των αντιδράσεων (9 h) επιβάλλεται έντονη ανάδευση. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης.



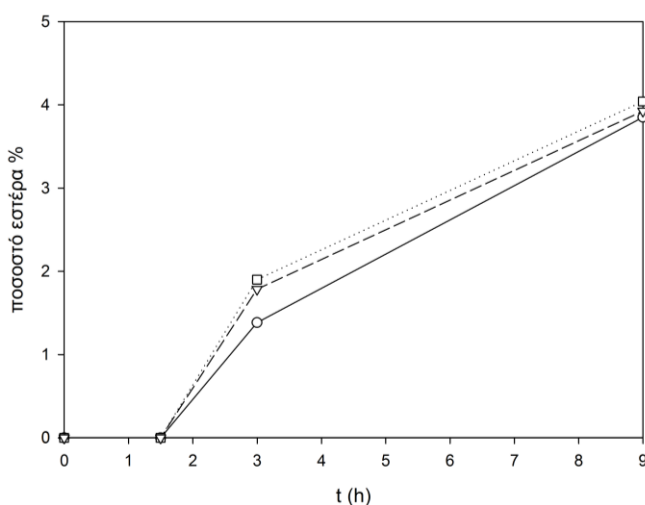
Σχήμα 9.8 Πρόοδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με τον προπιονικό (▽), το λαυρικό (O) και το στεατικό βινυλ-εστέρα (□), σε περιβάλλον $scCO_2$. Η συγκέντρωση του ακυλο-δότη ήταν 0.4 M. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ και πίεση 18 MPa, υπό έντονη ανάδευση. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, διαπιστώνεται καταρχήν ο σχηματισμός της προπιονικής και της στεατικής κυτταρίνης ως προϊόν της

ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με τους αντίστοιχους βινυλ-εστέρες σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Επίσης, όπως με λιπαρό υπόστρωμα το λαυρικό βινυλ-εστέρα, έτσι και με τους προπιονικό και στεατικό διακρίνεται εμφανώς μία φάση υστέρησης που διαρκεί περί τις 1.5 h (σχήμα 9.8). Μετά από το σημείο αυτό οι αντιδράσεις ακολουθούν μία ομαλή εξέλιξη ως τις 9 h αντίδρασης, όπου η προπιονική κυτταρίνη έχει ποσοστό εστέρα 4.4%, η λαυρική κυτταρίνη 4.0% και η στεατική 3.3%. Στην περίπτωση του προπιονικού βινυλ-εστέρα, μετά από τη χαρακτηριστική φάση υστέρησης, η ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης παρουσιάζει τον υψηλότερο ρυθμό (μεγαλύτερη αρχική κλίση). Ακολουθεί η αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα και τέλος, στην περίπτωση που ακυλο-δότης είναι ο στεατικός βινυλ-εστέρας, παρατηρείται ο μικρότερος ρυθμός αντίδρασης. Επίσης το τελικό % ποσοστό του εστέρα στη στεατική κυτταρίνη είναι χαμηλότερο από αυτό της λαυρικής κυτταρίνης και αυτό χαμηλότερο από το αντίστοιχο της προπιονικής. Φαίνεται λοιπόν πως όταν η αλειφατική αλυσίδα του ακυλο-δότη είναι μακρύτερη, τότε τα φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης στο σύστημα που μελετάται είναι πιο έντονα, με συνέπεια τη δυσχέρεια της ενζυμικής ακυλίωσης της μεγαλομοριακής κυτταρίνης.

9.5 Επίδραση της πίεσης στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Στις αντιδράσεις που μελετώνται, το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα έχει διττό ρόλο. Αφενός χρησιμεύει ως παράγοντας διόγκωσης της κυτταρίνης και αφετέρου λειτουργεί ως διαλύτης και μέσο για την ενζυμική αντίδραση. Η σημαντικότερη ίσως παράμετρος που επηρεάζει έντονα τα χαρακτηριστικά του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, είναι η πίεση του. Με αλλαγή της τιμής της πίεσης ενός υπερκρίσιμου ρευστού, μπορεί να αλλάξει εντελώς η φυσικοχημική του συμπεριφορά (Cantone et al., 2007; Erkey, 2000; Lozano et al., 2004; Lucien & Foster, 2000; Pitla et al., 1998). Το ζητούμενο λοιπόν είναι να διερευνηθεί η επίδραση που μπορεί να έχει η αλλαγή της πίεσης στην πορεία των μελετώμενων αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν ανάλογες αντιδράσεις σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, υπό διαφορετικές κάθε φορά τιμές πίεσης. Το εκάστοτε αντιδρών σύστημα περιελάμβανε 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ένζυμο με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 40 °C, ενώ η πίεση του συστήματος ήταν στα 16, 18 ή 20 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες). Επίσης υπήρχε έντονη ανάδευση στο εσωτερικό του αντιδραστήρα. Η συνολική διάρκεια της κάθε αντίδρασης ορίστηκε στις 9 h. Για πρακτικούς λόγους όμως δεν ήταν εύκολη η πραγματοποίηση των αντιδράσεων υπ' αυτές τις συνθήκες και γι' αυτό οι χρονικές στιγμές στις οποίες ελέγχθηκε η πορεία τους, ήταν περιορισμένες (0, 1.5, 3 και 9 h). Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης. Ο αντιδρών όγκος είναι ίσος με τον όγκο του αντιδραστήρα, δηλαδή 50 mL.



Σχήμα 9.9 Πρόοδος των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό θινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον $scCO_2$. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*, με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε θερμοκρασία ίση με 40 °C και πίεση 16 (O), 18 (□) ή 20 MPa (▽), υπό έντονη ανάδευση. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL.

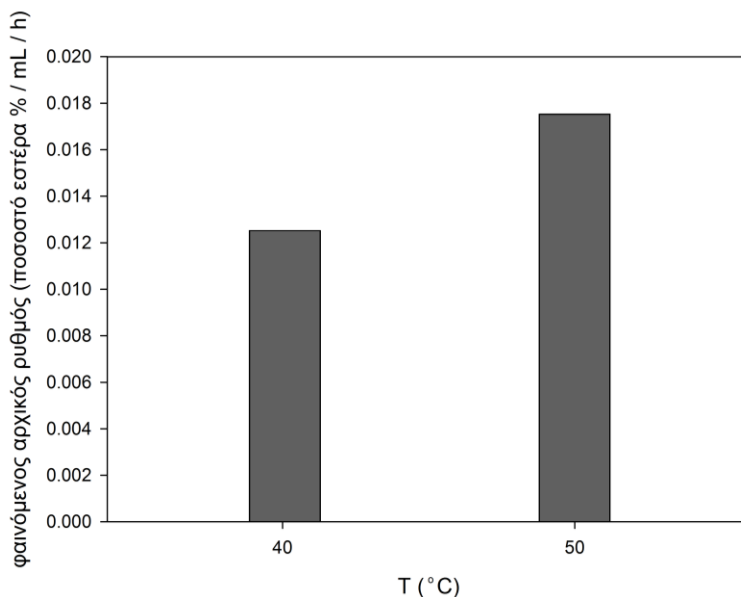
Σύμφωνα με τα σχετικά αποτελέσματα που παρατίθενται στο **σχήμα 9.9**, παρατηρείται πως με αυξομείωση της πίεσης στις τιμές που δοκιμάστηκαν, δεν επηρεάζεται η ύπαρξη και η διάρκεια της φάσης υστέρησης. Απεναντίας, οι ενδιαμέσες αλλά και οι τελικές τιμές του % ποσοστού του εστέρα φαίνεται πως επηρεάζονται από τη διαφορετική πίεση που επικρατεί. Στις 9 h αντίδρασης, το ποσοστό του εστέρα της λαυρικής κυτταρίνης είναι 3.8% για πίεση ίση με 16 MPa, 4.0% για πίεση ίση με 18 MPa και 3.9% για πίεση ίση με 20 MPa. Επομένως διακρίνεται μία βέλτιστη τιμή πίεσης, ως προς το τελικό ποσοστό του εστέρα. Εντός της υπερκρίσιμης περιοχής και για τιμές πίεσης κάτω των 18 MPa, το ρευστό προφανώς διογκώνει την κυτταρίνη σε μικρότερο βαθμό. Από την άλλη πλευρά, όταν ξεπεραστούν τα 18 MPa το φαινόμενο της διόγκωσης αρχίζει να αντιστρέφεται. Η πίεση αποκτά σχετικά υψηλές τιμές και έτσι δημιουργείται πλέον η τάση για συμπίεση του δικτύου αλυσίδων της κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται εμπόδια στην ενζυμική ακυλίωση του πολυσακχαρίτη και το πλεονέκτημα που προσέφερε το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χάνεται (Wimmer & Zarevucka, 2010; Yin et al., 2007).

9.6 Επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των αντιδράσεων ακυλίωσης

Η θερμοκρασία διεξαγωγής μίας ενζυμικής αντίδρασης αποτελεί μία από τις βασικότερες παραμέτρους που επηρεάζουν την κινητική της εξέλιξη. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία μίας αντίδρασης, τότε αυξάνεται η κινητικότητα των αντιδρώντων και επομένως αυξάνεται ο ρυθμός διεξαγωγής της. Αυτό όμως δεν

μπορεί να ισχύει επ' αόριστον. Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργικότητα στηρίζεται στην τριτοταγή τους δομή. Με συνεχή αύξηση της θερμοκρασίας το πρωτεϊνικό μόριο αρχίζει να μετουσιώνεται, χάνοντας την αρχική τριτοταγή δομή του και επομένως και την καταλυτική του ικανότητα. Υπάρχει λοιπόν κάποιο θερμοκρασιακό όριο πέραν του οποίου η ενζυμική δράση φθίνει. Για τις αντιδράσεις ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα που μας αφορούν, ελέγχθηκε η επήρεια που μπορεί να έχει επάνω τους η διαφορετική θερμοκρασία. Το θερμοκρασιακό εύρος που εξετάστηκε είναι σχετικά μικρό (40-50 °C): εντούτοις οι επιλεγμένες τιμές είναι απολύτως δόκιμες διότι είναι σχετικά υψηλές (υψηλοί ρυθμοί δράσης), αλλά ταυτόχρονα εντός των θεωρητικά μέγιστων ορίων ώστε να μη μετουσιώνεται ο βιοκαταλύτης (Dijkstra et al., 2007; Sigurgisladottir et al., 1993).

Γ' αυτό το σκοπό διεξήχθη η ίδια ποιοτική αντίδραση σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες. Στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου, όγκου 50 mL, προστέθηκαν 150 mg ινώδους κυτταρίνης, κατάλληλη ποσότητα λαυρικού βινυλ-εστέρα ώστε η συγκέντρωση του στο αντιδρών μείγμα να είναι 0.4 M και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* με συγκέντρωση 0.1 U/mg κυτταρίνης. Η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης ήταν 40 ή 50 °C, ενώ η πίεση του συστήματος ήταν ρυθμισμένη στα 18 MPa (υπερκρίσιμες συνθήκες). Στο εσωτερικό του αντιδραστήρα επιβάλλεται έντονη ανάδευση. Παράλληλα με κάθε αντίδραση έλαβαν χώρα και αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου, στις οποίες απουσιάζει ο βιοκαταλύτης.



Σχήμα 9.10 Σύγκριση των φαινόμενων αρχικών ρυθμών των αντιδράσεων ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης (150 mg) με το λαυρικό βινυλ-εστέρα (0.4 M), σε περιβάλλον scCO₂ και ένζυμο την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* (0.1 U/mg κυτταρίνης). Οι αντιδράσεις επιτελούνταν σε τιμές θερμοκρασίας ίσες με 40 και 50 °C, η πίεση ήταν 18 MPa και υπήρχε έντονη ανάδευση. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 50 mL.

Το τελικό ποσοστό του εστέρα στις συγκεκριμένες αντιδράσεις είναι σχεδόν το ίδιο (~ 4.0%). Αντίθετα υπάρχει κάποια απόκλιση στους φαινόμενους αρχικούς ρυθμούς (παράγραφος 9.1) των αντιδράσεων που εκτελέστηκαν σε διαφορετική θερμοκρασία (**σχήμα 9.10**). Όπως ήταν αναμενόμενο, η θερμοκρασιακή αύξηση της αντίδρασης από τους 40 στους 50 °C δημιούργησε αύξηση της μοριακής κινητικότητας του ενζύμου και του διαλυτού ακυλο-δότη.

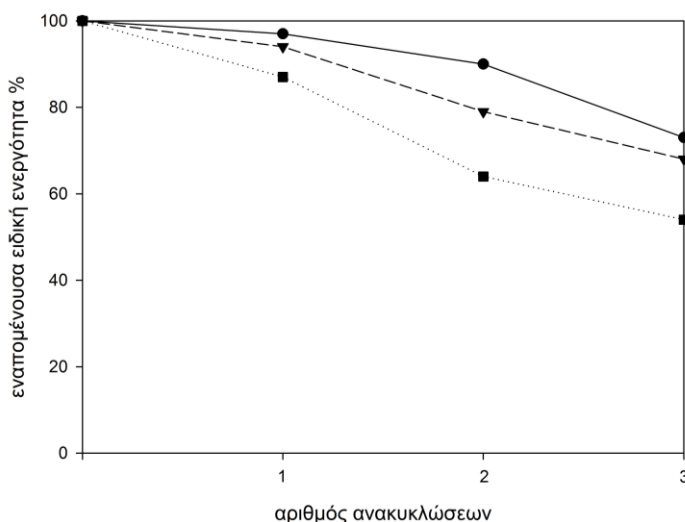
Επίσης η συγκεκριμένη αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνει τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του υπερκρίσιμου ρευστού και ενισχύει τη μεταφορά μάζας προς τη στερεή και αδιάλυτη ινώδη κυτταρίνη (Lucien & Foster, 2000; Nishino et al., 2011; Ramsey et al., 2009; Wimmer & Zarevucka, 2010; Yin et al., 2007).

9.7 Μελέτη της σταθερότητας των βιοκαταλυτών μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις

Μία σημαντική παράμετρος που λαμβάνεται υπόψη στις ενζυμικές διεργασίες, είναι η λειτουργική σταθερότητα που επιδεικνύει ο βιοκαταλύτης. Ο παράγοντας αυτός είναι καθοριστικής σημασίας για τη μεγιστοποίηση της ανακύκλωσης και αναχρησιμοποίησης ενός ενζύμου. Γι' αυτό το λόγο άλλωστε τα τελευταία χρησιμοποιούνται ευρέως σε ακινητοποιημένη μορφή. Για να αυξάνεται κατά το δυνατόν η σταθερότητα και η ανακυκλωσιμότητα τους (Barbosa et al., 2011; Dijkstra et al., 2007; Graber et al., 2008; Jesionowski et al., 2002; Reetz et al., 2002). Η ανάγκη για εκτίμηση της σταθερότητας ενός ενζύμου μετά από πολλαπλές χρήσεις, είναι αυξημένη σε σχετικά αντίξοα μέσα αντίδρασης (υδρόφιλοι οργανικοί διαλύτες, υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές πιέσεις, ακραίες τιμές pH κ.α.).

Μία τέτοιου είδους μελέτη κρίνεται ενδεδειγμένη για τις αντιδράσεις ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, που επιτελούνται στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας. Ο κυριότερος λόγος για αυτή τη μελέτη είναι οι ασυνήθιστα υψηλές τιμές πίεσης στις οποίες λειτουργεί ο ευπαθής βιοκαταλύτης. Συγκεκριμένα εξετάζεται η εναπομένουσα ειδική ενεργότητα του κάθε βιοκαταλύτη, μετά από πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης. Έτσι μετά από τον τερματισμό μίας αντίδρασης στις συνήθεις υπερκρίσιμες συνθήκες που εφαρμόστηκαν ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$), ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης συλλέχθηκε και στη συνέχεια μετρήθηκε η ενζυμική του ενεργότητα, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 7.1. Στη συνέχεια η συγκεκριμένη ποσότητα του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη επαναχρησιμοποιήθηκε κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες που εφαρμόζονται στις αντιδράσεις ακυλίωσης που μας αφορούν. Στο τέλος κάθε κύκλου επανασυλλέγεται το ένζυμο και υπολογίζεται και πάλι η ειδική του ενεργότητα. Στο **σχήμα 9.11** παρουσιάζονται τα σχετικά αποτελέσματα που αφορούν στους τρεις βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Την ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, την ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως προς την % εναπομένουσα ενζυμική ενεργότητα του κάθε βιοκαταλύτη, με σημείο αναφοράς την αρχική ενεργότητα που είχαν πριν συμμετάσχουν στις αντιδράσεις ακυλίωσης.



Σχήμα 9.11 Απεικόνιση της % εναπομένουσας ενεργότητας των ενζύμων ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* (●), ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου (■) και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* (▼), μετά από 3 κύκλους λειτουργίας στις παρακάτω συνθήκες: 150 mg ινώδους κυτταρίνης, λαυρικός βινυλ-εστέρας (0.4 M), συγκέντρωση ενζύμου 0.1 U/mg κυτταρίνης, περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$) και έντονη ανάδευση. Ο όγκος του αντιδραστήρα διαλείποντος έργου ήταν 50 mL.

Μετά από 3 κύκλους λειτουργίας, το πιο ανθεκτικό ένζυμο αποδεικνύεται πως είναι η ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* με ποσοστό εναπομένουσας ενεργότητας 73%. Ακολουθεί η ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* με ποσοστό 68% και τέλος η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου έχει ποσοστό εναπομένουσας ενεργότητας ίσο με 54%.

9.8 Έλεγχος της επίδρασης των υπερκρίσιμων συνθηκών στη δομή της κυτταρίνης

Στο πλαίσιο της ενδελεχούς μελέτης της ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$), κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί αν η διόγκωση που φαίνεται πως προκαλείται στην κυτταρίνη, είναι αντιστρεπτή ή όχι. Με άλλα λόγια εξετάζεται το ενδεχόμενο του να προκαλούνται αναντίστροφες μεταβολές στη δομή της κυτταρίνης από τις υπερκρίσιμες συνθήκες στις οποίες υποβάλλεται, ανεξάρτητα από την ενζυμική αντίδραση της ακυλίωσης. Για το σκοπό αυτό, κατάλληλη ποσότητα ινώδους κυτταρίνης (150 mg) προστέθηκε στον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε συνθήκες υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα με πίεση 18 MPa και θερμοκρασία $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, για 3 και 9 h. Η συγκεκριμένες διεργασίες πραγματοποιήθηκαν παρουσία και απουσία ανάδευσης. Προφανώς δεν προστέθηκε ακυλο-δότης, ούτε και ένζυμο καθώς στη

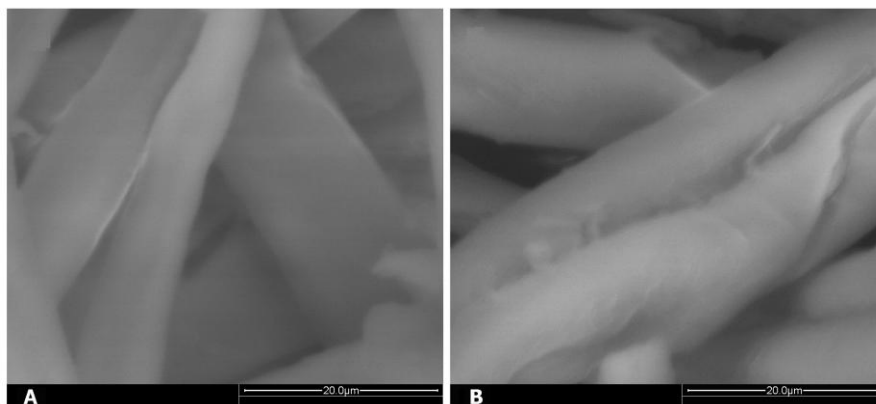
συγκεκριμένη περίπτωση εξετάζεται η επίδραση που έχουν οι υπερκρίσιμες συνθήκες από μόνες τους, επί της δομής της κυτταρίνης.

Μετά το πέρας των παραπάνω κατεργασιών, τα αντίστοιχα κυτταρινούχα υλικά παραλήφθηκαν και στη συνέχεια μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας τους με περίθλαση ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, δεν παρατηρείται καμία αλλαγή στο δείκτη κρυσταλλικότητας μεταξύ των κατεργασμένων στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα κυτταρινών και στην ακατέργαστη ινώδη κυτταρίνη (**πίνακας 9.2**). Να σημειωθεί πως η ακατέργαστη ινώδης κυτταρίνη έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 90.7%. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ του αντιστρεπτού χαρακτήρα της διόγκωσης που προκαλεί στην κυτταρίνη το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Φαίνεται πως η ινώδης κυτταρίνη διογκώνεται μόνο όταν είναι στο περιβάλλον του υπερκρίσιμου ρευστού. Μόλις το τελευταίο απομακρυνθεί μέσω εκτόνωσης, τότε το φαινόμενο της διόγκωσης παύει.

Πίνακας 9.2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα του δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης που έχει προηγουμένως υποβληθεί σε συνθήκες υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$).

Χρονική διάρκεια (h)	Ανάδευση	CrI %
3	✓	90.6
	x	90.6
9	✓	90.4
	x	90.7

Συμπληρωματικά με τις παραπάνω μετρήσεις, τα κυτταρινούχα δείγματα που προέκυψαν από τις συγκεκριμένες κατεργασίες στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, εξετάστηκαν και ως προς τη μορφολογία τους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM) (παράγραφος 7.4).



Σχήμα 9.12 Εικόνες SEM της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης (A) και της αντίστοιχης κυτταρίνης που προέκυψε μετά από παρουσία διάρκειας 9 h, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$), υπό ανάδευση.

Οι απεικονίσεις που προέκυψαν δεν είχαν καμία ουσιαστική διαφορά από την αντίστοιχη απεικόνιση της ακατέργαστης ινώδους κυτταρίνης. Μόνο η κυτταρίνη που προέκυψε μετά από τις 9 h παρουσίας στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, υπό ανάδευση, είχε κάποιες επιπλέον μικροανωμαλίες και ραβδώσεις στην επιφάνεια της, σε σχέση πάντα με την ακατέργαστη ινώδη κυτταρίνη (σχήμα 9.12). Προφανώς οι δομικές αυτές αλλαγές, αν και μηδαμινές, προέρχονται από την αντίστοιχη κατεργασία στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

10. Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης

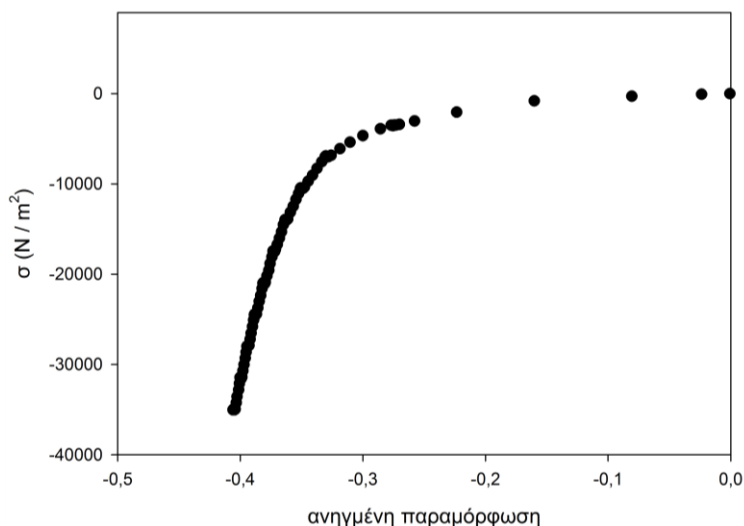
10.1 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς τη μηχανική τους συμπεριφορά

Η μηχανική συμπεριφορά των στερεών υλικών αφορά κυρίως στις ιδιότητες που καθορίζουν την απόκριση του υλικού, υπό την επίδραση εξωτερικών μηχανικών φορτίων (Amitay-Sadovsky & Wagner, 1998). Τέτοιες επιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε αντιστρεπτές ή μη παραμορφώσεις, ή ακόμα και σε θραύση του υλικού. Σε γενικές γραμμές η μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων αναφέρεται σε μία σειρά δοκιμασιών του υλικού, οι οποίες καταλήγουν σε συσχετισμούς τάσης-παραμόρφωσης. Τα μεγέθη που εκφράζουν τις ανάλογες συμπεριφορές είναι τα μέτρα ελαστικότητας. Ανάλογα με το είδος της φόρτισης ενός υλικού και ανάλογα με το είδος των παραμορφώσεων που εξετάζονται, υπάρχει και το αντίστοιχο μέτρο ελαστικότητας. Το απλούστερο είδος καταπόνησης που μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα υλικό είναι ο μονοαξονικός εφελκυσμός και η μονοαξονική θλίψη (Leone & Caprino, 2003; Masubuchi et al., 1998). Στην περίπτωση αυτή, ο λόγος της εφαρμοζόμενης τάσης προς την αντίστοιχη παραμόρφωση καλείται μέτρο ελαστικότητας Young (Young's modulus) και έχει μονάδες δύναμης ανά επιφάνεια, δηλαδή πίεσης. Το συγκεκριμένο μέγεθος εκφράζει το πόσο σκληρό ή εύκαμπτο είναι το εξεταζόμενο υλικό και εφαρμόζεται κατά κόρον στη μελέτη των μηχανικών ιδιοτήτων των πολυμερών βιομηχανικού και εμπορικού ενδιαφέροντος (Bronnikov et al., 1993; Bronnikov et al., 1988; Tranchida et al., 2006). Όσο μεγαλύτερη τιμή έχει το μέτρο ελαστικότητας Young ενός υλικού, τόσο πιο εύκαμπτο είναι.

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης της μηχανικής συμπεριφοράς των αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης που παράχθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, υπολογίζεται η τιμή του μέτρου ελαστικότητας Young που αυτά έχουν. Για το λόγο αυτό, κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε κυτταρινούχου εστέρα θερμομορφώνεται και στη συνέχεια υποβάλλεται σε θλιπτικές δοκιμές (παράγραφος 7.7). Οι εστέρες κυτταρίνης που επιλέχθηκαν για τις συγκεκριμένες δοκιμές είναι οι προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Ειδικότερα επιλέχθηκαν τα δείγματά τους με το υψηλότερο ποσοστό εστέρα και τα οποία προέκυψαν από ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης σε συστήματα ελεύθερα διαλύτη (παράγραφος 8.2.2.3) και από ενζυμική ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (κεφάλαιο 9). Γενικότερα, στις συγκεκριμένες

δοκιμές αλλά και σε εκείνες που θα ακολουθήσουν, χρησιμοποιήθηκαν οι εστέρες της ινώδους κυτταρίνης και όχι της Avicel, καθώς αποτελούν προϊόντα που παράγονται από μία φυσική πρώτη ύλη, με όσο το δυνατόν λιγότερα ενδιάμεσα στάδια. Γι' αυτόν το λόγο οι ιδιότητες τους παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

Μετά το πέρας κάθε μέτρησης προκύπτει ένα διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται οι τιμές της ανηγμένης μονοαξονικής παραμόρφωσης και οι τιμές της αντίστοιχης μονοαξονικής τάσης που την προκάλεσε. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να υπενθυμίσουμε πως η ανηγμένη παραμόρφωση ισούται με το λόγο της πραγματικής μονοαξονικής παραμόρφωσης του υλικού προς το αρχικό του πάχος (Bronnikov et al., 1993; Guillot & Trivett, 2003; Irvine & Smith, 1986; Tranchida et al., 2006). Πρόκειται δηλαδή για ένα αδιάστατο μέγεθος. Το μέτρο ελαστικότητας Young προκύπτει από την κλίση της ανάλογης ευθείας του διαγράμματος. Ενδεικτικά παρατίθεται το διάγραμμα τάσης-παραμόρφωσης που προκύπτει μετά από δοκιμή της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.0% (**σχήμα 10.1**).



Σχήμα 10.1 Διάγραμμα τάσης-ανηγμένης παραμόρφωσης της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.0%.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων σχετικά με την τιμή του μέτρου ελαστικότητας των μελετώμενων υλικών, παρατίθεται στον **πίνακα 10.1**. Καταρχήν η προπιονική κυτταρίνη, ανεξαρτήτως ποσοστού εστεροποίησης, δεν μπόρεσε να θερμομορφωθεί και κατά συνέπεια να μετρηθεί το μέτρο ελαστικότητας Young του ανάλογου υλικού. Μετά την απόπειρα θερμομόρφωσης, η προπιονική κυτταρίνη παρέμεινε στο καλούπι υπό την αρχική της μορφή· δηλαδή ως σκόνη. Αυτό είναι εύλογο καθώς οι εστέρες κυτταρίνης με αλειφατικές αλυσίδες μικρού μήκους απαιτούν την παρουσία εξωτερικού πλαστικοποιητή για να αποκτήσουν θερμοπλαστικές ιδιότητες. Αντίθετα η λαυρική και η στεατική κυτταρίνη, αν και με σχετικά χαμηλά ποσοστά εστέρα, σχημάτισαν ενός είδους πλαστικό. Η

λαυρική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.6% έχει μέτρο ελαστικότητας Young ίσο με 9.8 GPa, ενώ όταν το ποσοστό εστέρα αυξάνεται στο 4.0% το μέτρο ελαστικότητας μειώνεται στα 4.6 GPa.

Πίνακας 10.1 Τιμές του μέτρου ελαστικότητας Young (E), για τους αλειφατικούς εστέρες κυτταρίνης που παράχθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Εστέρας κυτταρίνης	Ποσοστό εστέρα %	E (GPa)
προπιονική κυτταρίνη	1.2	-
	4.4	-
λαυρική κυτταρίνη	0.6	9.8
	4.0	4.6
στεατική κυτταρίνη	0.5	8.4
	3.3	3.9

Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτά τα αποτελέσματα είναι πως με αύξηση του ποσοστού ακυλίωσης, ο αντίστοιχος εστέρας κυτταρίνης είναι λιγότερο δύσκαμπτος. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και τα αποτελέσματα που αφορούν στη στεατική κυτταρίνη. Με ποσοστό εστέρα 0.5% το μέτρο ελαστικότητας είναι 8.4 GPa, ενώ για ποσοστό εστέρα ίσο με 3.3% η αντίστοιχη τιμή του μέτρου ελαστικότητας είναι 3.9 GPa. Συγκρίνοντας τις τιμές των μέτρων ελαστικότητας που έχουν τα δύο διαφορετικά είδη εστέρα (λαυρικός, στεατικός), με παραπλήσιο % ποσοστό εστέρα, προκύπτει κι ένα ακόμα συμπέρασμα. Με αύξηση του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας του εστέρα της κυτταρίνης, μειώνεται η σκληρότητα του ανάλογου πολυμερούς. Όταν το μήκος της εστερομάδας αυξήθηκε από 12 σε 18 άνθρακες, τότε το μέτρο ελαστικότητας Young μειώθηκε. Συνεπώς παρατηρείται βελτίωση των θερμοπλαστικών ιδιοτήτων των εστέρων κυτταρίνης, με αύξηση του βαθμού εστεροποίησης και του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας.

Επίσης παρασκευάστηκαν μείγματα των συγκεκριμένων εστέρων κυτταρίνης με φθαλικό διαιθυλεστέρα και στη συνέχεια θερμομορφώθηκαν. Ο φθαλικός διαιθυλεστέρας έχει το ρόλο του πλαστικοποιητή και η περιεκτικότητα του στο κάθε μείγμα με τον εστέρα κυτταρίνης ήταν 25% w/w. Οι πλαστικοποιητές είναι οργανικές ουσίες μικρού μοριακού βάρους που με την παρουσία τους μειώνουν τη θερμοκρασία τήξης του σύνθετου υλικού στο οποίο συμμετέχουν (παράγραφος 2.1). Η συγκεκριμένη ουσία επιλέχθηκε διότι χρησιμοποιείται ευρέως ως εξωτερικός πλαστικοποιητής σε εστέρες οξικής κυτταρίνης και επίσης διότι στην περιεκτικότητα που επιλέχθηκε, είναι πλήρως αναμίξιμη με τους εξεταζόμενους εστέρες που παράχθηκαν. Τα προκύπτοντα σύνθετα υλικά υπέστησαν στη συνέχεια θλιπτικές δοκιμές για να μετρηθεί το αντίστοιχο μέτρο ελαστικότητας Young (E) που τα χαρακτηρίζει. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **πίνακα 10.2**. Όπως διακρίνεται, το μέτρο ελαστικότητας του κάθε υλικού που αποτελείται από έναν συγκεκριμένο εστέρα κυτταρίνης και τον εξωτερικό πλαστικοποιητή, είναι εμφανώς μικρότερο από το μέτρο ελαστικότητας του ίδιου του εστέρα, απουσία πλαστικοποιητή.

Πίνακας 10.2 Τιμές του μέτρου ελαστικότητας Young (E), για τους αλειφατικούς εστέρες κυτταρίνης που παράχθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, παρουσία εξωτερικού πλαστικοποιητή.

Εστέρας κυτταρίνης	Ποσοστό εστέρα %	Περιεκτικότητα πλαστικοποιητή* % (w/w)	E (GPa)
προπιονική κυτταρίνη	1.2	25	2.3
	4.4	25	0.9
λαυρική κυτταρίνη	0.6	25	2.6
	4.0	25	1.7
στεατική κυτταρίνη	0.5	25	2.5
	3.3	25	1.3

* Ως εξωτερικός πλαστικοποιητής χρησιμοποιήθηκε ο φθαλικός διαιθυλεστέρας.

Συγκρίνοντας μεταξύ τους τις τιμές του μέτρου ελαστικότητας Young που αφορά στους εστέρες κυτταρίνης παρουσία πλαστικοποιητή, παρατηρούμε πως για το ποιοτικά ίδιο είδος εστέρα (προπιονικός, λαυρικός ή στεατικός), με αύξηση του % ποσοστού του εστέρα μειώνεται το μέτρο ελαστικότητας. Δηλαδή και πάλι, το αυξημένο ποσοστό εστεροποίησης οδηγεί σε ένα πιο μαλακό υλικό. Ο πλαστικοποιητής απλά προσδίδει μία επιπλέον ευκαμψία στο υλικό αυτό. Επίσης στην περίπτωση της προπιονικής κυτταρίνης όπου το μήκος των αλειφατικών αλυσίδων είναι σχετικά μικρό, για ποσοστό εστέρα 1.2 και 4.4%, παρουσία φθαλικού διαιθυλεστέρα (25% w/w), τα αντίστοιχα υλικά μπορούν πλέον να θερμομορφωθούν και τα προκύπτοντα προϊόντα έχουν μέτρο ελαστικότητας Young ίσο με 2.3 και 0.9 GPa αντίστοιχα.

Αξιοσημείωτο πρακτικό ενδιαφέρον έχει και η σύγκριση των τιμών του μέτρου ελαστικότητας των παραχθέντων αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης χωρίς εξωτερικό πλαστικοποιητή, με τις αντίστοιχες τιμές του μέτρου ελαστικότητας άλλων παρεμφερών υλικών (πίνακας 10.3).

Πίνακας 10.3 Τιμές του μέτρου ελαστικότητας Young (E), για ορισμένα χαρακτηριστικά πολυμερή του εμπορίου.

Πολυμερές	Περιεκτικότητα πλαστικοποιητή* % (w/w)	E (GPa)
οξική κυτταρίνη (DS=2)	25	0.8
προπιονική κυτταρίνη (DS=2)	25	0.7
πολυπροπυλένιο	-	1.5
πολυστυρένιο	-	3.3
plexiglass	-	4.0

* Ως εξωτερικός πλαστικοποιητής χρησιμοποιήθηκε ο φθαλικός διαιθυλεστέρας.

Τα υλικά αυτά είναι εστέρες οξικής και προπιονικής κυτταρίνης μαζί με εξωτερικό πλαστικοποιητή, καθώς και άλλα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως στο εμπόριο. Οι αλειφατικοί εστέρες κυτταρίνης που προέκυψαν από την παρούσα εργασία είναι αρκετά πιο σκληρά υλικά από την οξική και προπιονική κυτταρίνη του εμπορίου. Επίσης επιδεικνύουν μεγαλύτερη σκληρότητα και από άλλα «κλασικά» πολυμερή όπως το πολυπροπυλένιο και το πολυστυρένιο. Οι παραχθείσες λαυρική και στεατική κυτταρίνη, με τα υψηλότερα ποσοστά εστέρα δείχνουν να έχουν σκληρότητα ανάλογη με το plexiglass. Πάντως δεν πρέπει να αγνοείται το γεγονός ότι τα μόρια αυτά παρουσιάζουν σχετικά χαμηλά ποσοστά εστέρα (<5%) και επίσης ότι θερμομορφώθηκαν απουσία εξωτερικού πλαστικοποιητή.

Τέλος τα υλικά που αποτελούνται από τους παραχθέντες εστέρες κυτταρίνης και τον εξωτερικό πλαστικοποιητή, έχουν τιμές μέτρου ελαστικότητας Young που προσιδιάζουν σε αυτές του πολυπροπυλενίου, του πολυστυρενίου και φυσικά της οξικής ή προπιονικής κυτταρίνης του εμπορίου (σύνθετα υλικά με πλαστικοποιητή).

10.2 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς το δείκτη κρυσταλλικότητας τους

Διευρύνοντας τη μελέτη σχετικά με την αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς ορισμένες βασικές ιδιότητες τους, μετράται ο δείκτης κρυσταλλικότητας τους. Αυτή η μέτρηση αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον από τη στιγμή που τα συγκεκριμένα προϊόντα προέρχονται από την υψηλού δείκτη κρυσταλλικότητας κυτταρίνη. Έτσι κατάλληλη ποσότητα των κυτταρινούχων εστέρων που μελετήθηκαν, μετρήθηκε με περιθλασίμετρο ακτίνων Χ (παράγραφος 7.3). Οι εστέρες κυτταρίνης που επιλέχθηκαν για τις συγκεκριμένες δοκιμές είναι οι προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Ειδικότερα επιλέχθηκαν τα δείγματα τους με το υψηλότερο ποσοστό εστέρα, τα οποία προέκυψαν από τις αντιδράσεις (i) ενζυμικής ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης σε συστήματα ελεύθερα διαλύτη (παράγραφος 8.2.2.3) και (ii) ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (κεφάλαιο 9).

Τα αποτελέσματα που αφορούν στις παραπάνω μετρήσεις παρουσιάζονται στον **πίνακα 10.4**. Παρατηρώντας τις τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της προπιονικής, της λαυρικής ή της στεατικής κυτταρίνης, φαίνεται πως με αύξηση του % ποσοστού του εκάστοτε εστέρα, μειώνεται ο βαθμός κρυσταλλικότητας του αντίστοιχου υλικού. Το γεγονός αυτό εξηγείται από το ότι ο μεγαλύτερος βαθμός εστεροποίησης συνεπάγεται και περισσότερες διακλαδώσεις κατά το μήκος της κάθε αλυσίδας κυτταρίνης. Ακολουθως, όσο περισσότερες είναι οι διακλαδώσεις, τόσο πιο πολλές είναι οι αταξίες που δημιουργούνται στη δομή των κυτταρινούχων μορίων. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η μείωση του ανάλογου δείκτη κρυσταλλικότητας.

Η χαμηλότερη τιμή του % ποσοστού του εστέρα εμφανίζεται για την προπιονική κυτταρίνη (32.3%). Μάλιστα η τιμή αυτή είναι χαμηλότερη από τις τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της λαυρικής και στεατικής κυτταρίνης. Η

προπιονική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 1.2 και 4.4%, έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 46.1 και 32.3% αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά η λαυρική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.6 και 4.0% έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 67.5 και 54.2% αντίστοιχα. Επίσης η στεατική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.5 και 3.3% έχει δείκτη κρυσταλλικότητας 78.6 και 59.3% αντίστοιχα.

Πίνακας 10.4 Τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας των αλειφατικών εστέρων κυτταρίνης που παράχθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Εστέρας κυτταρίνης	Ποσοστό εστέρα %	CrI %
προπιονική κυτταρίνη	1.2	46.1
	4.4	32.3
λαυρική κυτταρίνη	0.6	67.5
	4.0	54.2
στεατική κυτταρίνη	0.5	78.6
	3.3	59.3

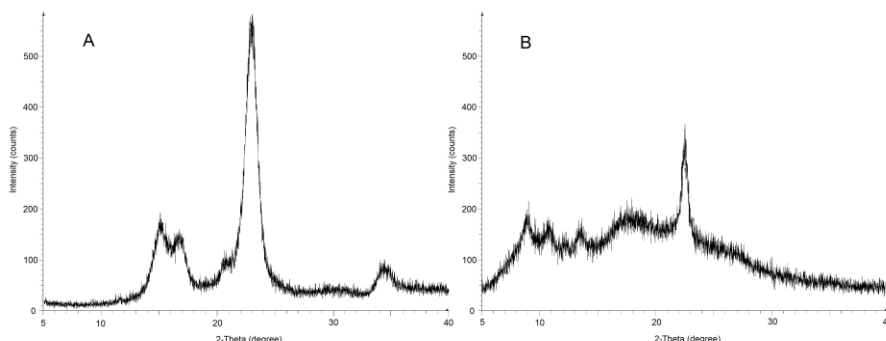
Συγκρίνοντας τα δεδομένα αυτά μεταξύ τους παρατηρείται πως για παρεμφερείς τιμές του ποσοστού του εστέρα, με μείωση του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας, μειώνεται περαιτέρω και ο δείκτης κρυσταλλικότητας. Φαίνεται λοιπόν πως οι διακλαδώσεις μικρού μήκους επηρεάζουν ισχυρά τη δυνατότητα κρυστάλλωσης των ανάλογων πολυμερών στα οποία ανήκουν. Αυτό εξηγείται διότι κάθε σημείο διακλάδωσης δημιουργεί μία τοπική διαταραχή στο κρυσταλλικό πλέγμα. Στην περίπτωση όμως που οι διακλαδώσεις είναι σχετικά μεγάλου μεγέθους, η κρυσταλλική δομή δεν επηρεάζεται τόσο έντονα καθώς, μετά το σημείο της διαταραχής, το υπόλοιπο τμήμα της διακλάδωσης τοποθετείται με μεγαλύτερη κανονικότητα στο κρυσταλλικό πλέγμα.

Μία αξιοσημείωτη παρατήρηση αφορά στις σημαντικά μειωμένες τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης σε σχέση με αυτόν της ινώδους κυτταρίνης. Η τελευταία έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 90.7%. Προφανώς αυτή η διαφορά οφείλεται στην αλλοίωση της κρυσταλλικής δομής της ινώδους κυτταρίνης, λόγω των τοπικών διαταραχών που δημιουργούνται στο κρυσταλλικό πλέγμα από τους εστερικούς δεσμούς και τις ανάλογες αλειφατικές αλυσίδες. Στη συνέχεια παρατίθενται χαρακτηριστικά τα φάσματα της περίθλασης ακτίνων Χ της ινώδους κυτταρίνης και της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.0% (σχήμα 10.2).

Παρατηρώντας τα φάσματα, φαίνεται καταρχήν η μεγαλύτερη ένταση που έχει η κορυφή της κρυσταλλικής περιοχής ($2\theta=22.7^\circ$) της ινώδους κυτταρίνης σε σχέση με τη λαυρική. Παράλληλα η άμορφη περιοχή ($2\theta\approx 18^\circ$) στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης έχει μικρότερη ένταση από αυτήν της λαυρικής κυτταρίνης.

Επίσης, στην ινώδη κυτταρίνη εμφανίζονται κορυφές για $2\theta=14.8^\circ$, 16.5° , 22.7° και 34.5° . Οι συγκεκριμένες κορυφές είναι χαρακτηριστικές της κρυσταλλικής δομής τύπου I της κυτταρίνης, δηλαδή της δομής που εμφανίζει και η φυσική κυτταρίνη. Αντιθέτως, στο φάσμα της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό

εστέρα 4.0% εμφανίζονται και νέες κορυφές στις γωνίες $2\theta=8.8^\circ$, 11° , 12.5° , 13.7° και 18° , ενώ οι κορυφές στις γωνίες $2\theta=16.5^\circ$ και 34.5° που υπήρχαν στην ινώδη κυτταρίνη, τώρα εξαφανίστηκαν.



Σχήμα 10.2 Φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ της ινώδους κυτταρίνης (Α) και της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.0% (Β).

Αυτή η αλλαγή υποδηλώνει αλλαγή στη δομή του κρυσταλλικού πλέγματος και είναι τυπική της μεταβολής της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης από τύπο Ι σε τύπο ΙΙ, ο οποίος είναι ενεργειακά σταθερότερος (Nishino et al., 2011; Nishiyama et al., 2002; Yin et al., 2007). Στην κρυσταλλική δομή τύπου Ι οι κρυσταλλίτες διατάσσονται στην ίνα με τον νοητό άξονα της μεγάλης τους διάστασης παράλληλα προς τη διεύθυνση της ίνας. Αντίθετα, στη δομή τύπου ΙΙ, οι γειτονικές αλυσίδες είναι αντιπαράλληλες μεταξύ τους (παράγραφος 1.4.2). Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί πως η φυσική κυτταρίνη έχει κρυσταλλική δομή τύπου Ι, ενώ η δομή τύπου ΙΙ απαντάται σε κυτταρίνες ή κυτταρινούχα προϊόντα που έχουν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία (π.χ. κατεργασία σε αλκαλικά διαλείματα ή τροποποίηση της δομής μέσω υποκατάστασης των υδροξυλίων με νέες λειτουργικές ομάδες).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η σύγκριση του δείκτη κρυσταλλικότητας των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης, σε σχέση με το δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης που έχει προκύψει (i) από την προκατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl και (ii) από την παρουσία στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Με αυτόν τον τρόπο θα διακριθεί καλύτερα η επίδραση του κάθε σταδίου χωριστά (προκατεργασία στο [bmim]Cl ή στο υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα / εγγενής ενζυμική ακυλίωση), στο δείκτη κρυσταλλικότητας του υδατανθρακικού μεγαλομορίου. Η προπιονική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 1.2% και δείκτη κρυσταλλικότητας 46.1%, η λαυρική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.6% και δείκτη κρυσταλλικότητας 67.5% και η στεατική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.5% και δείκτη κρυσταλλικότητας 78.6%, προέρχονται από την ενζυμική ακυλίωση της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης που έχει δείκτη κρυσταλλικότητας ίσο με 54.0% (πίνακας 8.9). Όπως φαίνεται, η προκατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl μειώνει το δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης από 90.7 σε 54.0% (παράγραφος 8.1.1.2). Από εκεί και πέρα η ενζυμική της ακυλίωση στα ανάλογα ελεύθερα διαλύτη συστήματα, προκαλεί

περαιτέρω μεταβολή του δείκτη κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης πλέον κυτταρίνης. Όταν η ακυλο-ομάδα είναι σχετικά μικρού μήκους (προπιονική κυτταρίνη), τότε ο δείκτης κρυσταλλικότητας μειώνεται από 54.0 σε 46.1%. Αντιθέτως, όταν πρόκειται για τη λαυρική και τη στεατική κυτταρίνη (ακυλο-ομάδες αρκετά μεγαλύτερου μήκους), ο δείκτης κρυσταλλικότητας του αρχικού υποστρώματος αυξάνει από 54.0 σε 67.5 και 78.6% αντίστοιχα. Συνεπώς οι υποκαταστάτες μεγάλου μήκους οδηγούν σε αύξηση της κανονικότητας της κρυσταλλικής δομής του τροποποιημένου πολυσακχαρίτη.

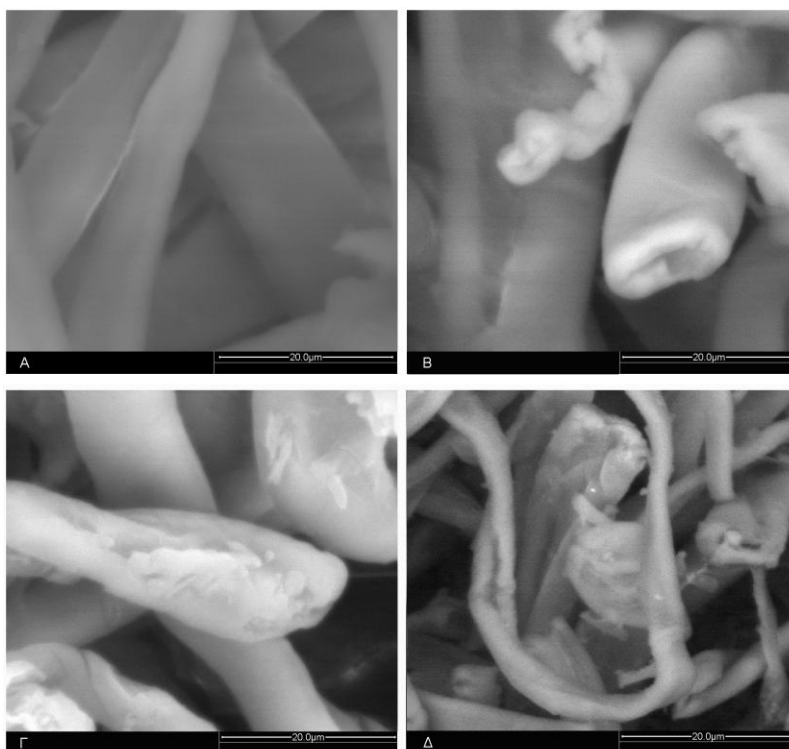
Η παρατήρηση αυτή όμως δεν φαίνεται να ισχύει όταν η αντίδραση ακυλίωσης γίνεται σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Στην περίπτωση αυτή, η παρουσία του υπερκρίσιμου ρευστού δεν προκαλεί από μόνη της κάποια μεταβολή στο δείκτη κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης (παράγραφος 9.8). Αντιθέτως, όταν συνδυάζεται με την αντίδραση ενζυμικής ακυλίωσης οδηγεί σε προϊόν με σημαντικά μειωμένο δείκτη κρυσταλλικότητας (**πίνακας 10.4**). Προφανώς η αντίστοιχη αταξία της δομής του σύνθετου μεγαλομορίου οφείλεται στη σύναψη των ανάλογων εστερικών δεσμών (οι διακλαδώσεις στην αλυσίδα της κυτταρίνης, δημιουργούν τοπικές διαταραχές).

10.3 Αξιολόγηση των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης ως προς τη μορφολογία της επιφάνειάς τους

Η δομική αλλαγή που υπέστη η κυτταρίνη εξαιτίας της ακυλίωσης της αναμένεται να έχει δημιουργήσει διαφοροποιήσεις και στη μορφολογία της επιφάνειάς της. Για τη διερεύνηση της μορφολογίας των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης, χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM, παράγραφος 7.4). Οι εστέρες κυτταρίνης που επιλέχθηκαν για τις συγκεκριμένες δοκιμές είναι οι προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Ειδικότερα επιλέχθηκαν τα δείγματα τους με το υψηλότερο ποσοστό εστέρα, τα οποία προέκυψαν από τις αντιδράσεις (i) ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης ινώδους κυτταρίνης σε συστήματα ελεύθερα διαλύτη (παράγραφος 8.2.2.3) και (ii) ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (κεφάλαιο 9). Στο ακόλουθο σχήμα (**σχήμα 10.3**) απεικονίζονται οι επιφάνειες της ινώδους κυτταρίνης και των εστέρων της με την προπιονική (4.4%), τη λαυρική (4.0%) και τη στεατική ομάδα (3.3%). Όσον αφορά στην προπιονική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 1.2%, τη λαυρική κυτταρίνη με ποσοστό εστέρα 0.6% και τη στεατική με ποσοστό εστέρα 0.5%, οι μορφολογίες των επιφανειών τους είναι σχεδόν πανομοιότυπες με τις αντίστοιχες που αναφέρονται στους ποιοτικά ίδιους εστέρες, αλλά παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά εστεροποίησης.

Στην περίπτωση της ινώδους κυτταρίνης (**σχήμα 10.3 Α**) οι ίνες της είναι λείες και συμπαγείς. Οι ίνες της προπιονικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.4% εμφανίζουν κάποιες ελαφριές συστροφές και υπάρχουν κάποιες ανωμαλίες στην επιφάνειά τους μαζί με ορισμένα εξογκώματα (**σχήμα 10.3 Β**). Όταν εξετάζεται η μορφολογία της επιφάνειας των ινών της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστεροποίησης 4.0%, οι ανωμαλίες στη δομή που παρουσιάζονται και στην

προπιονική κυτταρίνη είναι ακόμα εντονότερες και επιπροσθέτως υπάρχουν και αρκετές αυλακώσεις (σχήμα 10.3 Γ).



Σχήμα 10.3 Εικόνες SEM της ινώδους κυτταρίνης (Α), της προπιονικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.4%(Β), της λαυρικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 4.0% (Γ) και τη στεατικής κυτταρίνης με ποσοστό εστέρα 3.3% (Δ).

Τέλος, οι ίνες της στεατικής κυτταρίνης έχουν τα ίδια σχεδόν μορφολογικά χαρακτηριστικά με τη λαυρική κυτταρίνη· έντονες αυλακώσεις, εξογκώματα και επιφανειακές ανωμαλίες (σχήμα 10.3 Δ). Είναι προφανές πως ο σχηματισμός των εστερικών δεσμών επί των μορίων της ινώδους κυτταρίνης προκαλεί αυτού του είδους τις αλλαγές στη δομή των αντίστοιχων ινών. Μάλιστα φαίνεται πως με αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας της ακυλομάδας από τους τρεις στους δώδεκα και έπειτα στους δεκαοκτώ άνθρακες, η τραχύτητα της επιφάνειας των αντίστοιχων ινών του εστέρα της κυτταρίνης αυξάνεται. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η μεγαλύτερου μεγέθους ακυλομάδα καλύπτει μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας της ίνας και κατ' αυτόν τον τρόπο, η όποια μορφολογική αλλοίωση της τελευταίας έχει μεγαλύτερη έκταση.

Συμπεράσματα

11. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοκαταλυτική ακυλίωση της κυτταρίνης. Η παραγωγή των αντίστοιχων αλειφατικών εστέρων είναι ιδιαίτερης σημασίας, διότι τα μόρια αυτά έχουν αξιοσημείωτες θερμοπλαστικές ιδιότητες (Edgar, 2006; Edgar et al., 2001; Vaca-Garcia et al., 2003). Οι βασικές δυσκολίες που αντιμετωπίζονται στην επεξεργασία των κυτταρινούχων υλικών έγκεινται στην ίδια τη δομή τους. Οι γραμμικές αλυσίδες της κυτταρίνης συνδέονται πολύ στενά μεταξύ τους, εξαιτίας των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στα υδροξύλια των μονομερών τους. Ως αποτέλεσμα η κυτταρίνη παρουσιάζει μία δομή σχεδόν αδιαπέραστη από την πλειοψηφία των χημικών ουσιών, κάτι που εκφράζεται και με τις υψηλές τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας της.

Για να εξαλειφθούν οι παραπάνω δυσκολίες στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό, σχεδιάστηκαν δυο διαφορετικά συστήματα στα οποία επιχειρήθηκε η ενζυμικά καταλύομενη ακυλίωση της κυτταρίνης. Η φιλοσοφία των συστημάτων αυτών αφορά στη διάνοιξη της συμπαγούς μοριακής δομής της κυτταρίνης, με σκοπό την αύξηση της διαθεσιμότητας και της δραστηριότητας των υδροξυλίων της. Το πρώτο σύστημα στηρίζεται στην προκατεργασία της κυτταρίνης σε συγκεκριμένα ιοντικά υγρά ([bmim]Cl, [emim]OAc). Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Dadi et al., 2006; Granstrom et al., 2008; Swatloski et al., 2002; Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006), αυτό το είδος προκατεργασίας προκαλεί μερική καταστροφή στο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων κυτταρίνης, με παράλληλη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της τελευταίας. Το προϊόν που προκύπτει καλείται πλέον αναγεννημένο. Η αναγεννημένη κυτταρίνη ανακτάται και επιχειρείται η ενζυμική της ακυλίωση σε διάφορους τύπους μη συμβατικών συστημάτων βιοκατάλυσης. Το δεύτερο σύστημα που σχεδιάστηκε αποτελείται από ένα μόνο στάδιο και στηρίζεται στην ταυτόχρονη διόγκωση και ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα.

Αναφορικά με την προκατεργασία στα ιοντικά υγρά, χρησιμοποιήθηκαν δυο είδη εμπορικά διαθέσιμης κυτταρίνης: η κυτταρίνη Avicel και η ινώδης κυτταρίνη. Η κυτταρίνη Avicel είναι ουσιαστικά μικροκρυσταλλική κυτταρίνη, δηλαδή φυσική κυτταρίνη που έχει υποστεί ετερογενή χημική υδρόλυση ώστε να μειωθεί ο μέσος βαθμός πολυμερισμού της. Πρόκειται λοιπόν για ένα προϊόν υποβιβασμού του μεγέθους της κυτταρινούχου ίνας, το οποίο μακροσκοπικά βρίσκεται σε μορφή σκόνης. Η ινώδης κυτταρίνη προέρχεται και αυτή από υποβιβασμό του μεγέθους της κυτταρινούχου ίνας που έχει όμως επεξεργαστεί κάτω από ηπιότερες συνθήκες σε σχέση με την περίπτωση της Avicel. Σαν αποτέλεσμα προκύπτει κυτταρίνη με ινώδη μορφή και μέσο βαθμό πολυμερισμού μεγαλύτερο από αυτόν της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης. Επίσης ο βαθμός κρυσταλλικότητας της ινώδους κυτταρίνης είναι σχετικά μεγαλύτερος από αυτόν της μικροκρυσταλλικής. Συνεπώς η ινώδης κυτταρίνη προσιδιάζει περισσότερο στην φυσική κυτταρίνη.

Τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν για να τροποποιηθεί η δομή της κυτταρίνης είναι το [bmim]Cl και το [emim]OAc. Για την ανάλογη προκατεργασία των δειγμάτων κυτταρίνης (Avicel και ινώδους), προετοιμάστηκαν μείγματα του κάθε ιοντικού υγρού με την κυτταρίνη, με διάφορες τιμές περιεκτικότητας της

τελευταίας (2-10% w/w). Επίσης διαφοροποιήθηκε και η χρονική διάρκεια των συγκεκριμένων κατεργασιών (0-40 min), ενώ η θερμοκρασία ήταν ίση με 120 °C για όλες τις περιπτώσεις. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις, παρουσιάζει η επίδραση που έχει η θερμική κατεργασία στα ιοντικά υγρά, επί ορισμένων μεγεθών που είναι χαρακτηριστικά της δομής της κυτταρίνης. Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν για το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, προκύπτει πως η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης σε αυτό δεν επηρεάζει το μέσο βαθμό πολυμερισμού της, ανεξάρτητα από τη χρονική διάρκεια και την περιεκτικότητα του πολυσακχαρίτη. Η παρατήρηση αυτή ισχύει και για τα δύο μελετώμενα είδη κυτταρίνης (Avicel και ινώδους), με εντελώς διαφορετικό μέγεθος (DPAvicel = 225, DPινώδους κυτταρίνης = 730).

Αντίθετα, η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, καθώς και η επακόλουθη αναγέννηση της από αυτό, οδηγούν στο σχηματισμό προϊόντος με μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας. Ειδικότερα, με αύξηση της χρονικής διάρκειας της κατεργασίας ελαττώνεται περαιτέρω ο δείκτης κρυσταλλικότητας της αναγεννημένης κυτταρίνης. Από την άλλη πλευρά, η διαφορετική περιεκτικότητα της κυτταρίνης - εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της στο ιοντικό υγρό - δεν επηρεάζει την τιμή του δείκτη κρυσταλλικότητας. Τα συμπεράσματα αυτά είναι σημαντικά, καθώς ο στόχος της προκατεργασίας της κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά είναι η μείωση του βαθμού κρυσταλλικότητας της. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο διαφορετικός βαθμός επίδρασης της θερμικής κατεργασίας στο δείκτη κρυσταλλικότητας, για τα δύο είδη κυτταρίνης που εξετάζονται. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική φύση των δυο πολυσακχαριτών. Η κυτταρίνη Avicel είναι κοκκώδης, έχει μέσο βαθμό πολυμερισμού 225 και ο αρχικός δείκτης κρυσταλλικότητας της είναι 85.6%. Από την άλλη πλευρά, η ινώδης κυτταρίνη έχει προφανώς ινώδη υφή, μεγαλύτερο μέγεθος (DP=730) και σχετικά υψηλότερη κρυσταλλικότητα (90.7%). Τα χαρακτηριστικά αυτά καθιστούν δυσκολότερες τις όποιες φυσικοχημικές μεταβολές για την ινώδη κυτταρίνη.

Επίσης, η διάλυση και η θερμική κατεργασία της κυτταρίνης Avicel και της ινώδους κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl, επιφέρει αλλαγές στη μορφολογία της επιφάνειάς τους. Με κριτήριο τις απεικονίσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης ηλεκτρονίων, οι αναγεννημένες κυτταρίνες που προκύπτουν έχουν μία πιο άτακτη δομή και μία πιο αδρή επιφάνεια. Τα χαρακτηριστικά αυτά μάλιστα είναι εντονότερα την περίπτωση της κυτταρίνης Avicel. Τέλος, φαίνεται πως η συγκεκριμένη μεταβολή στη μορφολογία των αναγεννημένων κυτταρινών είναι ανεξάρτητη της περιεκτικότητας της κυτταρίνης στα μείγματα κυτταρίνη-ιοντικό υγρό, εντός των ορίων διαλυτότητας, καθώς και ανεξάρτητη της χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας για χρόνο έως 40 min.

Σχετικά με τη χρήση του ιοντικού υγρού [emim]OAc, η επίδραση της ανάλογης θερμικής κατεργασίας στο βαθμό πολυμερισμού, το δείκτη κρυσταλλικότητας και τη μορφολογία της κυτταρίνης, είναι εντελώς ανάλογη με αυτήν που επιδεικνύεται στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl. Ειδικότερα ο μέσος βαθμός πολυμερισμού της Avicel και της ινώδους κυτταρίνης, δεν επηρεάζεται από την κατεργασία· ανεξάρτητα από τη χρονική της διάρκεια και από την περιεκτικότητα της κυτταρίνης. Αντίθετα, ο δείκτης κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης (Avicel και

ινώδους), μειώνεται με αύξηση της χρονικής διάρκειας της θερμικής κατεργασίας. Η διαφορετική περιεκτικότητα της κυτταρίνης - εφόσον βρίσκεται στα όρια διαλυτότητας της στο ιοντικό υγρό - δεν επηρεάζει την τιμή του δείκτη κρυσταλλικότητας. Τέλος, όσον αφορά στη μορφολογία των αναγεννημένων κυτταρινών που προκύπτουν, παρατηρείται μία πιο άτακτη δομή και μία πιο αδρή επιφάνεια, σε σχέση με τις ακατέργαστες κυτταρίνες. Οι αλλαγές αυτές όμως είναι ανεξάρτητες από τη χρονική διάρκεια της κατεργασίας και την περιεκτικότητα της κυτταρίνης.

Σε γενικές γραμμές η επίδραση που είχαν τα δυο ιοντικά υγρά στα εξεταζόμενα χαρακτηριστικά της αναγεννημένης κυτταρίνης, ήταν σχεδόν η ίδια. Με μία πιο προσεκτική παρατήρηση όμως φαίνεται πως το ιοντικό υγρό [bmim]Cl, σε αντίστοιχες συνθήκες επιφέρει μεγαλύτερη μείωση στο βαθμό κρυσταλλικότητας των κυτταρινών και αλλοιώνει περισσότερο τη μορφολογία τους, σε σχέση πάντα με τη δράση του ιοντικού υγρού [emim]OAc. Η διαπίστωση αυτή στηρίζεται στο μηχανισμό διάλυσης της κυτταρίνης από το ιοντικό υγρό. Όπως έχει αναφερθεί, το ηλεκτραρνητικό ανιόν εισχωρεί ανάμεσα στις αλυσίδες κυτταρίνης και προσβάλλοντας τα ελεύθερα υδροξύλια της, τα αποπρωτονιώνει (Dadi et al., 2006; Zhao et al., 2009; Zhu et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο καταστρέφονται παράλληλα και οι δεσμοί υδρογόνου. Επιπροσθέτως, το ιμιδαζολικό κατιόν με τα π ηλεκτρόνια που διαθέτει, αλληλεπιδρά μη δεσμικά με τα άτομα οξυγόνου των υδροξυλίων της κυτταρίνης, εμποδίζοντας τον επανασχηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων της (Dadi et al., 2006). Συνεπώς το ανιόν χλωρίου που είναι πιο μικρό σε μέγεθος από το οξικό ανιόν, εισέρχεται ευκολότερα στο πυκνό δίκτυο που σχηματίζεται από τις αλυσίδες της κυτταρίνης. Επίσης το ανιόν του χλωρίου έχει μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα από το οξικό ανιόν και επομένως είναι πιο δραστικό στην προσβολή των υδροξυλομάδων της κυτταρίνης. Ως προς το ιμιδαζολικό κατιόν των δυο ιοντικών υγρών δεν υπάρχει κάποιο διαφορά καθώς είναι το ίδιο.

Απώτερος σκοπός των παραπάνω θερμικών προκατεργασιών της κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά, είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αλλοίωση της κρυσταλλικής δομής της κυτταρίνης. Στη συνέχεια η προκύπτουσα αναγεννημένη κυτταρίνη, όπως αναμένεται, είναι πιο δραστική από την ακατέργαστη και έτσι μπορεί να ακυλωθεί ενζυμικά. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν οι αναγεννημένες κυτταρίνες με το μικρότερο δείκτη κρυσταλλικότητας που προέκυψε από τις διεργασίες θερμικής κατεργασίας τους στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc. Συγκεκριμένα, για την κυτταρίνη Avicel επιλέχθηκε το αντίστοιχο αναγεννημένο προϊόν με δείκτη κρυσταλλικότητας 44.8% και για την ινώδη κυτταρίνη, το αναγεννημένο προϊόν με δείκτη κρυσταλλικότητας 54.0%.

Τα αναγεννημένα κυτταρινούχα υλικά με τους ελάχιστους δυνατούς δείκτες κρυσταλλικότητας, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως υποστρώματα για τις ενζυμικές αντιδράσεις ακυλίωσης. Τα συστήματα στα οποία επιχειρήθηκαν οι αντιδράσεις ήταν οργανικοί διαλύτες (εξάνιο ακετονιτρίλιο), ιοντικά υγρά ([bmim]PF₆, [bmim]BF₄) και συστήματα ελεύθερα διαλυτών (solvent free). Ως ακυλο-δότες χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι βινυλ-εστέρες: προπιονικός, λαυρικός και στεατικός. Επίσης δοκιμάστηκε ένα πλήθος από ελεύθερα και ακινητοποιημένα ένζυμα: λυοφιλιωμένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Candida cylindracea*, λυοφιλιωμένη λιπάση από

Aspergillus niger, λυοφιλιωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*.

Στις αντιδράσεις που έγιναν στους οργανικούς διαλύτες και στα ιοντικά υγρά δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός εστερικού δεσμού στην κυτταρίνη (Avicel ή ινώδη). Η αιτία έγκειται στο ότι το κυτταρινούχο υπόστρωμα, αν και με σημαντικά μειωμένο βαθμό κρυσταλλικότητας, δεν παρουσίασε διαλυτότητα στα συγκεκριμένα μέσα, διότι δεν είναι εύκολη η προσέγγιση των υδροξυλίων του πολυσακχαρίτη από το εκάστοτε ένζυμο και το ανάλογο υπόστρωμα. Απεναντίας το τελευταίο βρίσκεται στη φάση του εκάστοτε διαλύτη, απομακρυσμένο από τα μόρια κυτταρίνης.

Αντίθετα, οι ελεύθερες διαλύτη αντιδράσεις είχαν ως αποτέλεσμα την ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης (Avicel και ινώδους) και με τους τρεις ακυλιδότες που χρησιμοποιήθηκαν. Τα προϊόντα που παράχθηκαν ήταν η προπιονική, η λαυρική και η στεατική κυτταρίνη. Από τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν, μόνο η λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*, λειτούργησαν και οδήγησαν στην ακυλίωση της κυτταρίνης. Οι υπόλοιπες λιπάσες που χρησιμοποιήθηκαν είτε ελεύθερες είτε σε ακινητοποιημένη μορφή δεν είχαν καταλυτική δράση. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την ικανότητα των άλλων υδρολασών (λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*) να ακυλιώνουν την κυτταρίνη στις μελετώμενες συνθήκες, οδηγεί στην διατύπωση της παρακάτω υπόθεσης, όσον αφορά τον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου. Οι λιπάσες διαθέτουν ένα υδρόφοβο πεπτιδικό κάλυμμα (καπάκι), το οποίο καλύπτει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Beer et al., 1996; De Diego et al., 2005; Gonzalez-Sabin et al., 2004). Για να μπορέσει η λιπάση να ενεργοποιηθεί, πρέπει πρώτα να έρθει σε επαφή με το υδρόφοβο υπόστρωμα, στη συνέχεια να ανοίξει το καπάκι μέσω διεπιφανειακής ενεργοποίησης και στη συνέχεια, αφού το ένζυμο θα έχει πάρει την καταλυτική του διαμόρφωση, να προχωρήσει η αντίδραση. Λόγω της παρουσίας του υδρόφοβου πεπτιδικού καλύμματος και του βασικού ρόλου που παίζει στη διεξαγωγή της αντίδρασης, η λιπάση ως ενεργό ένζυμο έχει έναν σχετικά υδρόφοβο χαρακτήρα. Από την άλλη πλευρά, οι εστεράσες και οι κουτινάσες είναι υδρολυτικά ένζυμα τα οποία δε διαθέτουν το υδρόφοβο αυτό καπάκι και το ενεργό τους κέντρο είναι άμεσα εκτεθειμένο στο εξωτερικό τους περιβάλλον. Η ιδιαιτερότητα αυτή, σε αντιπαράβολή με τις λιπάσες, προσδίδει στις εστεράσες και τις κουτινάσες έναν σχετικά πιο υδρόφιλο χαρακτήρα (Borreguero et al., 2001; Fojan et al., 2002; Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Melo et al., 1998; Micaelo et al., 2005; Silva et al., 2005; Thodi et al., 2008). Το υδατανθρακικό υπόστρωμα πάλι, δηλαδή η κυτταρίνη, είναι εξ' ορισμού υδρόφιλο εξαιτίας του πλήθους των υδροξυλομάδων που διαθέτει. Συνεπώς, υπάρχει μία προτίμηση της σχετικά υδρόφιλης εστεράσης και κουτινάσης στο να προσεγγίσουν τα υδροξύλια της αναγεννημένης κυτταρίνης και να αλληλεπιδράσουν μαζί της. Μία προτίμηση σε σχέση με τις πιο υδρόφοβους χαρακτήρα λιπάσες. Επίσης, σε αντίθεση με τις λιπάσες, η καταλυτική τριάδα αμινοξέων της εστεράσης και της κουτινάσης (Ser-

His-Asp) δεν βρίσκεται κρυμμένη κάτω από πεπτίδια, αλλά είναι εκτεθειμένη και άμεσα προσβάσιμη.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως για τις επιτυχείς αντιδράσεις, οι αντίστοιχες αντιδράσεις ελέγχου στις οποίες δεν υπήρχε ένζυμο, δεν πραγματοποιήθηκαν. Επίσης στις αντιδράσεις ελέγχου που περιείχαν ένζυμο αλλά η κυτταρίνη Avicel ήταν ανεπεξέργαστη, δεν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός εστερικού δεσμού στον πολυσακχαρίτη. Από αυτές τις δύο διαπιστώσεις εξάγονται δυο σημαντικά συμπεράσματα. Πρώτον, οι επιτυχείς αντιδράσεις ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel οφείλονται στη δράση των αντίστοιχων ενζύμων. Δεύτερον, η προκατεργασία της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl με σκοπό τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας του πολυσακχαρίτη, είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της αντίδρασης. Σε περίπτωση που το κυτταρινούχο υπόστρωμα συμμετέχει στην αντίδραση ως έχει, η αντίδραση δεν πραγματοποιείται. Φαίνεται λοιπόν πως η ιδέα της προκατεργασίας της κυτταρίνης σε ιοντικά υγρά είναι δόκιμη. Το εκτεταμένο δίκτυο των δεσμών υδρογόνου έχει συρρικνωθεί μετά από την προκατεργασία στα ιοντικά υγρά [bmim]Cl και [emim]OAc, με συνεπακόλουθο την αλλαγή της μικροδομής της κυτταρίνης. Η τακτικότητα που είχε η συγκεκριμένη δομή αλλοιώθηκε, παράλληλα με τη μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας της κυτταρίνης. Έτσι, η τελευταία έχει πλέον μεγαλύτερη εκτιθέμενη επιφάνεια και πολλά από τα υδροξύλια της έγιναν τελικά προσβάσιμα από, ενεργοποιημένα με ακυλο-δότη, μόρια ενζύμου.

Το ποσοστό του εστέρα - έτσι όπως ορίζεται στην παράγραφο 7.5.5 - για την προπιονική κυτταρίνη στις 70 h αντίδρασης, είναι 1.5% όταν χρησιμοποιούνται ως καταλύτες τα ένζυμα λυοφιλιωμένη και ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και 1.9% στην περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Αντίστοιχα, το ποσοστό του εστέρα για τη λαυρική κυτταρίνη στις 70 h αντίδρασης, είναι 1.1% όταν χρησιμοποιείται το ένζυμο λυοφιλιωμένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, 0.9% όταν χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και 1.3% όταν βιοκαταλύτης είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Τέλος, στην περίπτωση της στεατικής κυτταρίνης το ποσοστό του εστέρα στις 70 h αντίδρασης, είναι 0.6% όταν χρησιμοποιούνται ως καταλύτες τα ένζυμα λυοφιλιωμένη και ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και 0.9% στην περίπτωση που ο βιοκαταλύτης είναι η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Μία αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι πως οι παραπάνω αντιδράσεις, μετά από τις 12 h περίπου, παρουσιάζουν πλατό και δεν εξελίσσονται περαιτέρω ως προς το σχηματισμό νέων εστερικών ομάδων. Φαίνεται δηλαδή σαν να έχει επέλθει ισορροπία. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη κατάσταση μπορεί να αποδοθεί περισσότερο στο ότι τα στερεοχημικά κυρίως εμπόδια που εξακολουθεί να έχει η δομή της κυτταρίνης, δεν επιτρέπουν στα ενζυμικά μόρια να ακυλώσουν περαιτέρω τον πολυσακχαρίτη. Είναι σαν να εξαντλούνται τα πραγματικά προσβάσιμα και δραστικά υδροξύλια της κυτταρίνης και έτσι ανάλογα με το είδος του βιοκαταλύτη και του ακυλο-δότη, η αντίδραση διεξάγεται μέχρι ενός ορίου.

Έτσι λοιπόν δεν πρόκειται για μία κατάσταση χημικής ισορροπίας με την αυστηρή θερμοδυναμική έννοια, καθώς η αντίδραση μεταξύ μίας υδροξυλομάδας και ενός ενεργοποιημένου ακυλο-δότη, θα είχε μεγάλο δυναμικό. Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα αφορούν σε ακυλίωση της

αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel. Στην περίπτωση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται η ινώδης κυτταρίνη, ακολουθείται η ίδια συμπεριφορά με μόνη διαφορά τις μειωμένες αντίστοιχες τιμές του αρχικού ρυθμού και του τελικού ποσοστού του εστέρα. Αυτό δικαιολογείται καθώς η ινώδης υφή, το μεγαλύτερο μέγεθος (DP=730) και ο μεγαλύτερος δείκτης κρυσταλλικότητας (54.0%), είναι χαρακτηριστικά που καθιστούν δυσκολότερες τις όποιες φυσικοχημικές μεταβολές στην αναγεννημένη ινώδη κυτταρίνη.

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν προηγουμένως και με την πορεία που ακολουθεί η χρονική πρόοδος των αντίστοιχων αντιδράσεων, συμπεραίνεται πως για δεδομένο βιοκαταλύτη, αυξανόμενου του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας του ακυλο-δότη, μειώνεται ο ρυθμός της αντίδρασης και κυρίως το τελικό ποσοστό του εστέρα, λόγω αυξημένης στερεοχημικής παρεμπόδισης. Επίσης το ενεργοποιημένο σύμπλοκο του ενζύμου με την υπόστρωμα με την μακρύτερη αλειφατική αλυσίδα, είναι πιο δύσκολο να προσεγγίσει την υδρόφιλη κυτταρίνη αφού όσο μακρύτερη είναι η αλειφατική αλυσίδα, τόσο πιο υδρόφοβο χαρακτήρα έχει.

Αξιοσημείωτη είναι και η υπεροχή της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi* έναντι των δυο εστερασών, ως προς την αρχική ταχύτητα αντίδρασης που επιδεικνύει (μεγαλύτερη κλίση στο αρχικό γραμμικό κομμάτι), αλλά κυρίως ως προς το τελικό ποσοστό του εστέρα, για δεδομένο ακυλο-δότη. Αυτό το φαινόμενο οφείλεται πιθανότατα στην προτίμηση που έχουν φυσικά οι κουτινάσες για τα μεγαλομόρια (Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Silva et al., 2005). Ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό του ενζύμου αυτού είναι πως η οξυανιονική οπή του, λαμβάνει και σταθεροποιεί από μόνη της την κατάλληλη καταλυτική διαμόρφωση. Αντίθετα, στις εστεράσες και τις λιπάσες η απαραίτητη αυτή διαμόρφωση επάγεται όταν συνδεθεί κατάλληλα το εκάστοτε υπόστρωμα (Chow et al., 1999; Krisch, 1963; Louwrier et al., 1996; Thodi et al., 2008). Το συγκεκριμένο γεγονός προσδίδει από μόνο του ένα συγκριτικό πλεονέκτημα στην καταλυτική δράση της κουτινάσης. Επίσης το ένζυμο αυτό είναι και αρκετά πιο σταθερό σε μη υδατικά συστήματα, σε σχέση με τις υπόλοιπες σερίνο-υδρολάσες (Egmond & de Vlieg, 2000; Lamare et al., 1997; PintoSousa et al., 1996; Sereti et al., 1997).

Στις αντιδράσεις που μελετώνται παρατηρείται επίσης μία σχετική υπεροχή της ελεύθερης λυοφιλιωμένης εστεράσης σε σχέση με την ακινητοποιημένη, ως προς την αρχική ταχύτητα των αντιδράσεων και ως προς τις τιμές του % ποσοστού του εστέρα κατά την εξέλιξη αυτών. Η προφανής αιτία είναι η μορφή του μορίου του λυοφιλιωμένου ενζύμου. Το τελευταίο όντας ελεύθερο είναι σαφώς πιο ευέλικτο από το ακινητοποιημένο, καθώς δεν βρίσκεται σε κάποιον στερεό φορέα ακινητοποίησης και μπορεί να έρχεται σε επαφή με το κυτταρινούχο υπόστρωμα πιο εύκολα.

Αναφορικά με την τάξη μεγέθους του βαθμού εστεροποίησης που επιτυγχάνεται στις παραπάνω αντιδράσεις, προκύπτει ένα ακόμα συμπέρασμα. Το μέγιστο για κάθε περίπτωση ποσοστό του εστέρα, βρίσκεται σε σχετικά χαμηλό επίπεδο. Η καλύτερη απόδοση απαντάται στη σύνθεση της προπιονικής κυτταρίνης, μέσω της ακινητοποιημένης κουτινάσης *Fusarium solani pisi*, με ποσοστό εστέρα στις 70 h αντίδρασης ίσο με 1.9%. Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με την απουσία διαλυτότητας του αρχικού κυτταρινούχου

υποστρώματος στο σύστημα αντίδρασης, οδηγούν σε ένα αρκετά πιθανό συμπέρασμα· η ακυλίωση της αναγεννημένης κυτταρίνης Avicel υπό τις παραπάνω συνθήκες, έλαβε χώρα κυρίως στην επιφάνεια του πολυσακχαρίτη και ελάχιστα εξελίχθηκε στα ενδότερα του δικτύου των κυτταρινικών μορίων. Βέβαια και στην περίπτωση αυτή η προκατεργασία της κυτταρίνης ήταν απαραίτητη.

Ως επέκταση της μελέτης των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης (Avicel και ινώδους) στα “ελεύθερα διαλύτη” συστήματα, εξετάζεται η επίδραση που μπορεί να έχουν ορισμένοι παράγοντες, στην πορεία της αντίδρασης. Με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου, παρατηρείται αύξηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης εστεροποίησης. Από την άλλη πλευρά, το τελικό ποσοστό του εστέρα δε μεταβάλλεται ιδιαίτερα γιατί καθορίζεται από τη διαθεσιμότητα και το πλήθος των ενεργών υδροξυλίων και όχι από τη συγκέντρωση του βιοκαταλύτη.

Ένας ακόμα παράγοντας που μελετήθηκε ήταν η αρχική συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη που προστίθεται στο μείγμα της αντίδρασης. Με βάση τα ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα αποδεικνύεται πως όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα της μεγαλομοριακής κυτταρίνης στο σύστημα της αντίδρασης, τόσο πιο δύσκολα διεξάγεται η ενζυμική της ακυλίωση. Ο πλέον προφανής λόγος είναι πως με αύξηση της ποσότητας της κυτταρίνης που είναι ένα πολυμερές, αυξάνεται το ιώδες του όλου συστήματος και έτσι η κινητικότητα των ενζυμικών μορίων και των μορίων του βινυλ-εστέρα μειώνεται.

Τέλος εξετάστηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας στην πορεία των μελετώμενων αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της αναγεννημένης κυτταρίνης (Avicel και ινώδους). Αξιολογώντας τα σχετικά αποτελέσματα, προκύπτει μία βέλτιστη θερμοκρασιακή περιοχή περί τους 50 °C.

Το δεύτερο σύστημα που σχεδιάστηκε για την ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης είναι αυτό που βασίζεται στην ανάπτυξη υπερκρίσιμων συνθηκών (T=40 °C, P=18 MPa). Στη φάση αυτή η παραγωγή του επιθυμητού εστέρα κυτταρίνης είναι πιο στοχευμένη. Σκοπός του συγκεκριμένου συστήματος είναι να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα κυτταρίνη που να προσιδιάζει όσο περισσότερο γίνεται στη φυσική. Αυτή η προσέγγιση πηγάζει από την ιδέα της χρησιμοποίησης φυσικής κυτταρίνης, η οποία δεν έχει υποστεί κάποια ιδιαίτερη επεξεργασία. Όσον αφορά στο αλειφατικό κομμάτι του εστέρα, αναφέρεται πως οι ανθρακικές αλυσίδες μεγάλου μήκους προσδίδουν στον αντίστοιχο εστέρα της κυτταρίνης καλύτερες θερμοπλαστικές ιδιότητες και αυξημένη θερμική σταθερότητα (Edgar et al., 2001; Vaca-Garcia et al., 2003). Έτσι χρησιμοποιείται ακυλο-δότης μακριάς ανθρακικής αλυσίδας. Συνοψίζοντας, το κυτταρινούχο υπόστρωμα που επιλέχθηκε ήταν η ινώδης κυτταρίνη και ο βασικός ακυλο-δότης ήταν ο λαυρικός βινυλ-εστέρας.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν είναι η ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*, η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου και η ακινητοποιημένη κουτινάση από *Fusarium solani pisi*. Επιλέχθηκαν τρία διαφορετικά είδη ακινητοποιημένων υδρολυτικών ενζύμων που ειδικεύονται στους εστερικούς δεσμούς. Η επιλογή των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών και η ταυτόχρονη απουσία αντίστοιχων ενζύμων σε ελεύθερη μορφή έγινε επειδή έχει αναφερθεί πως σε περιβάλλον υπερκρίσιμων ρευστών όπου η πίεση λαμβάνει

πολύ υψηλότερες τιμές από την ατμοσφαιρική, τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν σαφώς μεγαλύτερη σταθερότητα απ' ό,τι τα ελεύθερα (Lozano et al., 2004; Sereti et al., 1997; Wimmer & Zarevucka, 2010).

Όταν πραγματοποιήθηκε η παραπάνω αντίδραση υπό έντονη ανάδευση, στο αντίστοιχο προϊόν ανιχνεύθηκε η ύπαρξη εστερικού δεσμού, και στα τρία συστήματα των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν. Από την άλλη πλευρά, όταν αναλύθηκαν τα προϊόντα των αντιδράσεων που έγιναν απουσία ανάδευσης, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός εστερικού δεσμού στην ινώδη κυτταρίνη, ανεξαρτήτως του επιλεγμένου ενζύμου. Επίσης σε καμία από τις αντιδράσεις ελέγχου από τις οποίες απουσίαζε ο βιοκαταλύτης, δεν ανιχνεύθηκε εστερικός δεσμός επί της κυτταρίνης. Από τα δεδομένα αυτά προκύπτουν ορισμένα σημαντικά συμπεράσματα. Καταρχήν φαίνεται ότι είναι δυνατή η αντίδραση ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με τον λαυρικό βινυλ-εστέρα. Απουσία ενζύμου δεν παρατηρείται ο σχηματισμός εστέρα της κυτταρίνης. Η παρατήρηση αυτή είναι ιδιαίτερη καθώς δεν απαιτείται προκατεργασία της κυτταρίνης για να «ανοίξει» η δομή της και να μπορέσει να γίνει δραστική. Η ανάλογη προκατεργασία διεξάγεται από το ίδιο το υπερκρίσιμο ρευστό, παράλληλα με την αντίδραση. Φαίνεται λοιπόν πως το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα κατόρθωσε να εισχωρήσει ανάμεσα στις αλυσίδες της κυτταρίνης και να διογκώσει την τελευταία, καταστρέφοντας ένα μεγάλο ποσοστό των δεσμών υδρογόνου που κανονικά συμβάλλει στην τακτική και συμπαγή δομή της. Έπειτα, τα ενεργοποιημένα με ομάδες του ακυλο-δότη ενζυμικά μόρια, προσεγγίζουν τα πλέον εκτεθειμένα υδροξύλια και τα ακυλίζουν.

Το δεύτερο, πολύ σημαντικό, συμπέρασμα που προκύπτει από τα αποτελέσματα των παραπάνω αντιδράσεων είναι πως η έντονη ανάδευση είναι απαραίτητη για την επίτευξη της συγκεκριμένης ακυλίωσης. Το ίδιο ακριβώς σύστημα παράγει την εστεροποιημένη ινώδη κυτταρίνη υπό ανάδευση, ενώ απουσία αυτής δεν συμβαίνει καμία αντίδραση. Ο αρχικός λόγος για τον οποίο δοκιμάστηκαν οι αντιδράσεις απουσία ανάδευσης ήταν οι εξαιρετικές τιμές διαχυτότητας και συντελεστών μεταφοράς μάζας που έχει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (Al-Duri et al., 2001; Cantone et al., 2007; Erkey, 2000; Pitla et al., 1998). Όπως φάνηκε όμως, τα χαρακτηριστικά αυτά από μόνα τους δεν είναι ικανά για την πραγματοποίηση της ενζυμικής ακυλίωσης. Το συμπέρασμα αυτό στηρίζεται στο ότι η στερεή ινώδης κυτταρίνη εξακολουθεί να παραμένει αδιάλυτη στο υπερκρίσιμο περιβάλλον. Για να πραγματοποιηθεί κάποια αντίδραση με ένα τουλάχιστον αδιάλυτο υπόστρωμα, θα πρέπει να της δοθεί επιπλέον ενέργεια, υπό τη μορφή ανάδευσης.

Σύμφωνα με τα διαγράμματα που περιγράφουν την πορεία των παραπάνω αντιδράσεων (% ποσοστό του εστέρα = $f(t)$), παρατηρείται μία ιδιόζουσα συμπεριφορά. Η αντίδραση ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα ως ακυλο-δότη και τις ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* και ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi* ως βιοκαταλύτες, δεν αποφέρει κανένα αποτέλεσμα μέχρι τις 1.5 h. Στη συνέχεια όμως ο λαυρικός εστέρας της κυτταρίνης αρχίζει να σχηματίζεται, φτάνοντας στις 9 h αντίδρασης το ποσοστό εστεροποίησης 1.8 και 4.0% με την ακινητοποιημένη λιπάση και την ακινητοποιημένη κουτινάση αντίστοιχα. Φαίνεται λοιπόν πως αρχικά υπάρχει μία φάση υστέρησης (lag phase). Η υστέρηση που παρουσιάζεται στο αρχικό στάδιο

των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης οφείλεται στην εξέλιξη της διαδικασίας διόγκωσης της από το υπερκρίσιμο ρευστό. Προφανώς το φαινόμενο αυτό δεν είναι άμεσο και στιγμιαίο. Τα ενεργοποιημένα μόρια του ενζύμου δεν μπορούν να προσεγγίσουν τη συμπαγή δομή της κρυσταλλικής κυτταρίνης και κατ' επέκταση δε μπορούν να έχουν πρόσβαση στα υδροξύλια της έως ότου «ανοίξει» η δομή της, λόγω της διόγκωσης. Η διόγκωση αυτή αποδίδεται στη δράση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα και με κριτήριο τα πειραματικά μας αποτελέσματα φαίνεται πως απαιτείται χρόνος περί τις 1.5 h ώστε να γίνει η προαναφερόμενη δομική αλλαγή. Φυσικά, αυτή η παρατήρηση δεν σημαίνει ότι η διόγκωση του κυτταρινούχου υποστρώματος ολοκληρώνεται στο χρόνο αυτό. Η κυτταρίνη παραμένει διογκωμένη καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, η οποία εξελίσσεται συνεχώς.

Στην περίπτωση που ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου, δεν εμφανίζεται κάποια ξεκάθαρη υστέρηση στο αρχικό στάδιο της αντίδρασης, αλλά φαίνεται πως επικρατεί μία λανθάνουσα κατάσπαση, καθώς στο χρόνο αυτό έχει ξεκινήσει η εστεροποίηση της κυτταρίνης. Το πιθανότερο συμπέρασμα που προκύπτει από αυτήν τη συμπεριφορά είναι πως η ακινητοποιημένη εστεράση από ήπαρ χοίρου δύναται να προσεγγίσει και να εστεροποιήσει κάποια υδροξύλια - προφανώς επιφανειακά - προτού περάσει ο χρόνος που φαίνεται πως απαιτείται για τη διόγκωση της κυτταρίνης (1.5 h). Η συγκεκριμένη ιδιαιτερότητα που επιδεικνύει η εστεράση είναι πιθανό να οφείλεται στο σχετικά υδρόφιλο χαρακτήρα της, στο σχετικά μικρό της μέγεθος (φορέας ακινητοποίησης) και στη θέση του ενεργού της κέντρου που είναι εκτεθειμένο προς το εξωτερικό περιβάλλον του μορίου (Fett et al., 2000; Krisch, 1963; Krisch, 1966; Thodi et al., 2008). Ως αποτέλεσμα, η ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης ξεκινά νωρίτερα σε σχέση με τα άλλα δυο ακινητοποιημένα ένζυμα.

Συγκρίνοντας τις τελικές τιμές του ποσοστού του εστέρα και τις τιμές των ρυθμών των παραπάνω αντιδράσεων, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο βιοκαταλύτη, προκύπτει το συμπέρασμα πως η ακινητοποιημένη κουτινάση υπερτερεί καταλυτικά έναντι των δυο άλλων ενζύμων. Η συγκεκριμένη υπεροχή της ακινητοποιημένης κουτινάσης έγκειται στην ιδιαίτερη εκλεκτικότητα που φυσικά δείχνει προς τα πολυμερή μόρια (Fernando et al., 1984; Guebitz & Cavaco-Paulo, 2008; Koller et al., 1982; Purdy & Kolattukudy, 1975), στο σχετικά υδρόφιλο χαρακτήρα της και στο μικρό της μέγεθος· ειδικά ως προς την ακινητοποιημένη λιπάση. Αξιοσημείωτο είναι όμως και το γεγονός της επίδειξης δραστηριότητας από την ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica*, από τη στιγμή που το ίδιο ένζυμο αδυνατούσε να ακυλώσει την αναγεννημένη ιώδη κυτταρίνη σε περιβάλλον ελεύθερων διαλύτη αντιδράσεων. Προφανώς με τη διόγκωση που προκαλεί το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, δημιουργείται περισσότερος διαθέσιμος χώρος ώστε η ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* να μπορεί να προσεγγίσει ικανό αριθμό κυτταρινικών υδροξυλομάδων και να τις ακυλώσει.

Για το συγκεκριμένο τύπο αντιδράσεων αποδείχθηκε επίσης πως η διόγκωση και η ανάλογη αλλαγή της δομής της κυτταρίνης από το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα είναι αντιστρεπτή και έχει ισχύ μόνο όταν ο πολυσακχαρίτης βρίσκεται στο συγκεκριμένο περιβάλλον.

Ακόμα αποδείχθηκε πως οι τρεις ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, διατηρούν πάνω από το 50% της αρχικής τους ενεργότητας, όταν υποβάλλονται σε τρεις συνεχόμενους κύκλους αντιδράσεων στις υπερκρίσιμες συνθήκες που δοκιμάζονται ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P=18\text{ MPa}$).

Στη συνέχεια παρατίθενται ορισμένα συμπληρωματικά συμπεράσματα σχετικά με την πορεία της αντίδρασης ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα και με βιοκαταλύτη το ένζυμο που επέδειξε την καλύτερη καταλυτική συμπεριφορά: την ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Καταρχήν με αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού των αντιδράσεων, όχι όμως και του τελικού ποσοστού του εστέρα που παραμένει σχεδόν ίδιο.

Με αύξηση της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη παρατηρείται αύξηση του τελικού ποσοστού του εστέρα της κυτταρίνης. Αυτό συμβαίνει γιατί με αύξηση της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη, αυξάνονται οι πιθανότητες για την προσέγγιση του στα υδροξύλια της κυτταρίνης. Πάντως φαίνεται πως αυξάνοντας περαιτέρω την εν λόγω συγκέντρωση, η ανάλογη αύξηση του % ποσοστού του εστέρα δεν είναι μεγάλη. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση βάσει της οποίας υπάρχει κάποιο όριο στο διαθέσιμο πλήθος των υδροξυλίων που δημιουργείται λόγω διόγκωσης της κυτταρίνης από το υπερκρίσιμο ρευστό.

Επίσης επετεύχθη και η ενζυμική ακυλίωση της ινώδους κυτταρίνης με ακυλο-δότες τον προπιονικό και το στεατικό βινυλ-εστέρα, σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Η κατάλυση της συγκεκριμένης αντίδρασης πραγματοποιήθηκε από το ένζυμο ακινητοποιημένη κουτινάση *Fusarium solani pisi*. Συγκρίνοντας τα προφίλ των παραπάνω αντιδράσεων μεταξύ τους (αρχική ταχύτητα, % ποσοστό σε εστέρα) αποδεικνύεται πως όταν η αλειφατική αλυσίδα του ακυλο-δότη είναι μακρύτερη, τότε τα φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης στο σύστημα που μελετάται είναι πιο έντονα, με συνέπεια τη δυσχέρεια της ενζυμικής ακυλίωσης της μεγαλομοριακής κυτταρίνης.

Μία αρκετά σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε ως προς την επίδραση της στην τελική απόδοση της ενζυμικής ακυλίωσης που εξετάζεται, είναι η πίεση του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα. Βρέθηκε πως το υψηλότερο ποσοστό του λαυρικού εστέρα επί της κυτταρίνης, επιτυγχάνεται σε μία βέλτιστη τιμή πίεσης (18 MPa). Για τιμές πίεσης εκατέρωθεν αυτής, τα αντίστοιχα τελικά ποσοστά του εστέρα είναι ελαφρώς χαμηλότερα. Εντός της υπερκρίσιμης περιοχής και για τιμές πίεσης μικρότερες της βέλτιστης, το ρευστό προφανώς διογκώνει την κυτταρίνη σε μικρότερο βαθμό. Από την άλλη πλευρά, όταν ξεπεραστεί η βέλτιστη αυτή τιμή, το φαινόμενο της διόγκωσης αρχίζει να αντιστρέφεται. Η πίεση αποκτά σχετικά υψηλές τιμές και έτσι δημιουργείται πλέον η τάση για συμπίεση του δικτύου αλυσίδων της κυτταρίνης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργούνται εμπόδια στην ενζυμική ακυλίωση του πολυσακχαρίτη και το πλεονέκτημα που προσέφερε το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα χάνεται.

Τέλος εξετάζεται και η επίδραση της θερμοκρασίας του συστήματος του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, ως προς την πορεία της αντίδρασης ενζυμικής ακυλίωσης της ινώδους κυτταρίνης με το λαυρικό βινυλ-εστέρα. Η θερμοκρασιακή αύξηση της αντίδρασης δημιουργεί αύξηση της μοριακής κινητικότητας του ενζύμου και του διαλυτού ακυλο-δότη. Επίσης η συγκεκριμένη

αύξηση της θερμοκρασίας βελτιώνει τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του υπερκρίσιμου ρευστού και ενισχύει τη μεταφορά μάζας προς τη στερεή και αδιάλυτη ινώδη κυτταρίνη (Lucien & Foster, 2000; Nishino et al., 2011; Pitla et al., 1998; Yin et al., 2007).

Συνοψίζοντας αναφέρεται πως το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα συνδυάζει τη δυνατότητα διόγκωσης της κυτταρίνης ώστε να αυξηθεί η προσβασιμότητα των υδροξυλίων της, τη διάλυση και μεταφορά του λιπαρού υποστρώματος, την προσέγγιση και εισχώρηση στο δίκτυο των αλυσίδων κυτταρίνης και τέλος τη δυνατότητα το ενζυμικό μόριο να παραμείνει σταθερό.

Από τη σύγκριση των ποσοστών του εστέρα που επιτυγχάνονται μεταξύ των δύο διαφορετικών συστημάτων ακυλίωσης (προκατεργασία σε ιοντικά υγρά και περαιτέρω ενζυμική ακυλίωση σε ελεύθερα διαλυτή συστήματα, και ενζυμική ακυλίωση σε υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα), υπό ανάλογες συνθήκες και με τους αντίστοιχους βιοκαταλύτες, προκύπτει διαφορά. Η διαφορά αυτή έγκειται στους πολύ υψηλούς ρυθμούς μεταφοράς μάζας, στην ιδιαίτερη διαχυτική ικανότητα και πιθανόν στην εντονότερη διάνομιξη της δομής της κυτταρίνης, που προσφέρει το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα.

Ολοκληρώνοντας τη μελέτη των συγκεκριμένων αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης, αποφασίστηκε να αξιολογηθούν τα προκύπτοντα υλικά ως προς τη μηχανική τους συμπεριφορά. Για το λόγο αυτό οι αλειφατικοί εστέρες που παράχθηκαν θερμομορφώθηκαν απουσία και παρουσία εξωτερικού πλαστικοποιητή και στη συνέχεια μετρήθηκε το μέτρο ελαστικότητας Young των ανάλογων υλικών. Σύμφωνα με τα σχετικά αποτελέσματα αποδείχθηκε ότι αυξανόμενου του ποσοστού ακυλίωσης και του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας, το μέτρο ελαστικότητας μειώνεται. Δηλαδή ο αντίστοιχος εστέρας κυτταρίνης είναι λιγότερο δύσκαμπτο υλικό.

Τέλος μετρήθηκε ο δείκτης κρυσταλλικότητας και μελετήθηκε η μορφολογία της επιφάνειας των παραχθέντων εστέρων κυτταρίνης (προπιονικός, λαυρικός και στεατικός). Σύμφωνα με τα ανάλογα αποτελέσματα συμπεραίνεται πως η ακυλίωση της κυτταρίνης οδηγεί σε σημαντική μείωση του δείκτη κρυσταλλικότητας του ανάλογου μεγαλομορίου σε σχέση με την αρχική ακατέργαστη κυτταρίνη. Επίσης με αύξηση του % ποσοστού του εστέρα μειώνεται περαιτέρω ο δείκτης κρυσταλλικότητας, ενώ τα σχετικά μικρά μήκη της ακυλομάδας του εκάστοτε εστέρα ευνοεί τις μικρότερες τιμές του δείκτη κρυσταλλικότητας. Όσον αφορά στη μορφολογία της επιφάνειας των εστέρων της κυτταρίνης προέκυψε το συμπέρασμα πως με την αντίδραση ακυλίωσης οι ίνες της κυτταρίνης γίνονται αδρές, αποκτούν αυλακώσεις και έχουν ορισμένα εξογκώματα, τη στιγμή που η ίδια η κυτταρίνη έχει ομαλές και λείες ίνες. Μάλιστα με αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του αλειφατικού εστέρα παρατηρείται και εντονότερη αλλοίωση της μορφολογίας του αντίστοιχου υλικού.

Με βάση τη γνώση που έχει αποκτηθεί στο πεδίο αυτό, ορισμένες μελλοντικές προοπτικές που προτείνονται περιλαμβάνουν:

Την πραγματοποίηση των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης της κυτταρίνης υπό συνθήκες υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής ώστε στο τέλος της αντίδρασης να επιχειρηθεί η ανάκτηση του προϊόντος

από το ίδιο το διοξείδιο του άνθρακα. Σε περίπτωση επιτυχίας της συγκεκριμένης διαδικασίας αποφεύγονται οι καθαρισμοί με οργανικούς διαλύτες.

Την ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης με ποιοτικά περισσότερους ακυλοδότες ποικίλου μήκους και τη μετέπειτα κλιμάκωση των μετρήσεων των διάφορων θερμοπλαστικών και μηχανικών ιδιοτήτων (DSC, TG, DMTA) των συγκεκριμένων υλικών. Με τον τρόπο αυτό θα εξετασθεί η συσχέτιση μεταξύ του μήκους της αλειφατικής αλυσίδας του εστέρα κυτταρίνης και των ιδιοτήτων που επιδεικνύει.

Το συνδυασμό των δυο μεθόδων που σχεδιάστηκαν και αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή, με σκοπό την πιο αποτελεσματική ενζυμική ακυλίωση της κυτταρίνης. Ειδικότερα, η προκατεργασία της κυτταρίνης στα ιοντικά υγρά που μειώνουν το δείκτη κρυσταλλικότητας της, θα ακολουθείται από την εισαγωγή του αναγεννημένου πλέον πολυσακχαρίτη σε περιβάλλον υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα, ώστε να διογκωθεί και να ακυλιωθεί ενζυμικά.

Τη χρησιμοποίηση διαφορετικών βιοκαταλυτών. Αυτό συνεπάγεται τη δοκιμασία διαφορετικών ειδών ενζύμων και στην περίπτωση που τα τελευταία είναι σε ακινητοποιημένη μορφή, τη χρήση διαφορετικών τύπων ακινητοποίησης (π.χ. cross-linking).

Βιβλιογραφία

- Abergel, C., Martinez, C., Fontecillacamps, J., Cambillau, C., Degeus, P., Lauwereys, M. 1990. Crystallization and Preliminary-X-Ray Study of a Recombinant Cutinase from *Fusarium-Solani-Pisi*. *Journal of Molecular Biology*, **215**(2), 215-216.
- Al-Duri, B., Goddard, R., Bosley, J. 2001. Characterisation of a novel support for biocatalysis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **11**(4-6), 825-834.
- Almarsson, O., Klibanov, A.M. 1996. Remarkable activation of enzymes in nonaqueous media by denaturing organic cosolvents. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**(1), 87-92.
- Amitay-Sadovsky, E., Wagner, H.D. 1998. Evaluation of Young's modulus of polymers from Knoop microindentation tests. *Polymer*, **39**(11), 2387-2390.
- Babel, W. 2000. Special issue on the occasion of BIOTECHNOLOGY 2000. *Acta Biotechnologica*, **20**(3-4), 187-187.
- Bandmann, N., Collet, E., Leijen, J., Uhlen, M., Veide, A., Nygren, P.A. 2000. Genetic engineering of the *Fusarium solani pisi* lipase cutinase for enhanced partitioning in PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Journal of Biotechnology*, **79**(2), 161-172.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Torres, R., Fernandez-Lafuente, R. 2011. Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica* in organic media: Enantiospecific production of atenolol acetate. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **71**(3-4), 124-132.
- Barthel, S., Heinze, T. 2006. Acylation and carbanilation of cellulose in ionic liquids. *Green Chemistry*, **8**(3), 301-306.
- Basso, A., Braiucă, P., Cantone, S., Ebert, C., Linda, P., Spizzo, P., Caimi, P., Hanefeld, U., Degrossi, G., Gardossi, L. 2007. In silico analysis of enzyme surface and glycosylation effect as a tool for efficient covalent immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads (R). *Advanced Synthesis & Catalysis*, **349**(6), 877-886.
- Beer, H.D., Wohlfahrt, G., McCarthy, J.E.G., Schomburg, D., Schmid, R.D. 1996. Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants. *Protein Engineering*, **9**(6), 507-517.
- Begley, T.P., Tsai, M.D. 2003. Biocatalysis and biotransformation enzymology in the genomics era - Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**(2), 228-229.
- Blattner, C., Zoumpanioti, M., Kroner, J., Schmeer, G., Xenakis, A., Kunz, W. 2006. Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, **36**(3), 182-193.
- Bludova, O.S., Klenkova, N.I., Matveeva, N.A., Kutsenko, L.I., Volkova, L.A., Borisova, T.I. 1984. Comparative-Assessment of Changes in the Chemical-Structure of Cellulose under the Influence of Carboxylic-Acids of Various Structures .2. Acylation of Cellulose by Certain Aliphatic Carboxylic-Acids in Relation to Structural-Changes of Cellulose. *Journal of Applied Chemistry of the Ussr*, **57**(3), 553-560.

- Borreguero, I., Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S., Sinisterra, J.V., Alcantara, A.R. 2001. Enantioselective properties of *Fusarium solani* pisi cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **11**(4-6), 613-622.
- Bouhdadi, R., Benhadi, S., Molina, S., George, B., El Moussaouiti, M., Merlin, A. 2011a. Chemical Modification of Cellulose by Acylation: Application to Adsorption of Methylene Blue. *Maderas-Ciencia Y Tecnologia*, **13**(1), 105-116.
- Bouhdadi, R., El Moussaouiti, M., George, B., Molina, S., Merlin, A. 2011b. Cellulose acylation by 3-pyridinoyl chloride hydrochloride: Application to lead Pb(2+) adsorption. *Comptes Rendus Chimie*, **14**(6), 539-547.
- Bronnikov, S.V., Kuzmicheva, O.S., Vettegren, V.I. 1998. Scale effect of Young's modulus of highly oriented polymers. *Mechanics of Composite Materials*, **34**(6), 595-600.
- Bronnikov, S.V., Vettegren, V.I. 1999. Temperature and time relaxation of complex Young's modulus of isotropic and oriented polymers. *Mechanics of Composite Materials*, **35**(1), 63-70.
- Bronnikov, S.V., Vettegren, V.I., Frenkel, S.Y. 1993. New Approach to the Description of Young Modulus for Highly Oriented Polymers .2. Relationship between Young Modulus and Thermal-Expansion of Polymers over a Wide Temperature-Range. *Journal of Macromolecular Science-Physics*, **B32**(1), 33-50.
- Bronnikov, S.V., Vettegren, V.I., Korzhavin, L.N., Frenkel, S.Y. 1988. On the Thermofluctuational Nature of Young Modulus Relaxation for Oriented Polymers. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A*, **30**(10), 2115-2119.
- Bronnikov, S.V., Vettegren, V.I., Vorobev, V.M., Korzhavin, L.N., Frenkel, S.Y. 1984. Reasons of Non-Linearity of Temperature Dependences of Young Modulus of Oriented Polymers in the Region of Low-Temperatures. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya B*, **26**(5), 380-384.
- Bueche, F. 1956. Young Modulus of Semicrystalline Polymers. *Journal of Polymer Science*, **22**(100), 113-122.
- Cai, M.Z., Wang, Y.G., Hao, W.Y. 2007. Palladium-catalyzed addition of diaryl disulfides and diselenides to terminal alkynes in room temperature ionic liquids. *Green Chemistry*, **9**(11), 1180-1184.
- Cambou, B., Klibanov, A.M. 1984. Preparative Production of Optically-Active Esters and Alcohols Using Esterase-Catalyzed Stereospecific Trans-Esterification in Organic Media. *Journal of the American Chemical Society*, **106**(9), 2687-2692.
- Cantone, S., Hanefeld, U., Basso, A. 2007. Biocatalysis in non-conventional media-ionic liquids, supercritical fluids and the gas. *Green Chemistry*, **9**(9), 954-971.
- Cardillo, G., Gennari, A., Gentilucci, L., Mosconi, E., Tolomelli, A., Troisi, S. 2010. Synthesis of chiral non-racemic intermediates and Arg-Gly-Asp mimetics by CalB-catalyzed resolution. *Tetrahedron-Asymmetry*, **21**(1), 96-102.
- Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 1999a. Cutinase: From molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*, **66**(1), 17-34.

- Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. 1999b. Cutinase stability in AOT reversed micelles: system optimization using the factorial design methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, **24**(8-9), 569-576.
- Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. 1998. Kinetics and modelling of transesterification reactions catalysed by cutinase in AOT reversed micelles. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **5**(1-4), 361-365.
- Carvalho, C.M.L., Melo, E.P., Costa, S.M.B., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. 1999c. A steady-state fluorescence study of cutinase microencapsulated in AOT reversed micelles at optimal stability conditions. *Biotechnology Letters*, **21**(8), 673-681.
- Casarano, R., Nawaz, H., Possidonio, S., da Silva, V.C., El Seoud, O.A. 2011. A convenient solvent system for cellulose dissolution and derivatization: Mechanistic aspects of the acylation of the biopolymer in tetraallylammonium fluoride/dimethyl sulfoxide. *Carbohydrate Polymers*, **86**(3), 1395-1402.
- Chauvelon, G., Buléon, A., Thibault, J.-F., Saulnier, L. 2003. Preparation of sulfoacetate derivatives of cellulose by direct esterification. *Carbohydrate Research*, **338**(8), 743-750.
- Cheng, H.N., Gross, R.A. 2003. Biocatalysis in polymer science: An overview. *Biocatalysis in Polymer Science*, **840**, 1-32.
- Chodorge, M., Fourage, L., Ullmann, C., Duvivier, V., Masson, J.M., Lefevre, F. 2005. Rational strategies for directed evolution of biocatalysts - Application to Candida antarctica lipase B (CALB). *Advanced Synthesis & Catalysis*, **347**(7-8), 1022-1026.
- Chow, A., Davis, A.J., Gawler, D.J. 1999. Investigating the role played by protein-lipid and protein-protein interactions in the membrane association of the p120(GAP) CalB domain. *Cellular Signalling*, **11**(6), 443-451.
- Christakopoulos, P., Tzalas, B., Mamma, D., Stamatis, H., Liadakis, G.N., Tzia, C., Kekos, D., Kolisis, F.N., Macris, B.J. 1998. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reactions in organic solvents. *Process Biochemistry*, **33**(7), 729-733.
- Ciacco, G.T., Liebert, T.F., Frollini, E., Heinze, T.J. 2003. Application of the solvent dimethyl sulfoxide/tetrabutyl-ammonium fluoride trihydrate as reaction medium for the homogeneous acylation of Sisal cellulose. *Cellulose*, **10**(2), 125-132.
- Coleman, J.O.D., Hiscock, S.J., Dewey, F.M. 1993. Monoclonal-Antibodies to Purified Cutinase from *Fusarium-Solani* F Sp Pisi. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **43**(6), 391-401.
- Crevelde, L.D., Meijberg, W., Berendsen, H.J.C., Pepermans, H.A.M. 2001. DSC studies of *Fusarium solani* pisi cutinase: consequences for stability in the presence of surfactants. *Biophysical Chemistry*, **92**(1-2), 65-75.
- Cuissinat, C., Navard, P., Heinze, T. 2008. Swelling and dissolution of cellulose. Part IV: Free floating cotton and wood fibres in ionic liquids. *Carbohydrate Polymers*, **72**(4), 590-596.

- Cunha, M.T., Cabral, J.M.S., Tjerneld, F., Aires-Barros, M.R. 2000. Effect of salts and surfactants on the partitioning of *Fusarium solani* pisi cutinase in aqueous two-phase systems of thermoseparating ethylene oxide/propylene oxide random copolymer and hydroxypropyl starch. *Bioseparation*, **9**(4), 203-209.
- Cunha, M.T., Costa, M.J.L., Calado, C.R.C., Fonseca, L.P., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 2003. Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani* pisi cutinase fusion proteins. *Journal of Biotechnology*, **100**(1), 55-64.
- Dadi, A.P., Varanasi, S., Schall, C.A. 2006. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. *Biotechnology and Bioengineering*, **95**(5), 904-910.
- Dai, L.Z., Klibanov, A.M. 1999. Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**(17), 9475-9478.
- de Carvalho, C.C.C.R. 2011. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnology Advances*, **29**(1), 75-83.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. 2005. Understanding structure - Stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules*, **6**(3), 1457-1464.
- DeSantis, G., Davis, B.G. 2006. The expanding roles of biocatalysis and biotransformation - Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **10**(2), 139-140.
- Dickman, M.B., Kolattukudy, P.E. 1987. Transformation of *Fusarium-Solani-Pisi* Using the Cutinase Promoter. *Phytopathology*, **77**(12), 1740-1740.
- Dijkstra, Z.J., Merchant, R., Keurentjes, J.T.F. 2007. Stability and activity of enzyme aggregates of Calb in supercritical CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, **41**(1), 102-108.
- Dordick, J.S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M. 1986. Peroxidases Depolymerize Lignin in Organic Media but Not in Water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**(17), 6255-6257.
- Dordick, J.S., Marletta, M.A., Klibanov, A.M. 1987. Polymerization of Phenols Catalyzed by Peroxidase in Nonaqueous Media. *Biotechnology and Bioengineering*, **30**(1), 31-36.
- Edgar, K.J. 2006. Cellulose esters in drug delivery. *Cellulose*, **14**(1), 49-64.
- Edgar, K.J. 2001. Synthesis of long-chain esters of cellulose via sulfonated polystyrene catalysis. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **221**, U181-U181.
- Edgar, K.J., Buchanan, C.M., Debenham, J.S., Rundquist, P.A., Seiler, B.D., Shelton, M.C., Tindall, D. 2001. Advances in cellulose ester performance and application. *Progress in Polymer Science*, **26**(9), 1605-1688.
- Egmond, M.R., de Vlieg, J. 2000. *Fusarium solani* pisi cutinase. *Biochimie*, **82**(11), 1015-1021.
- El-Tahlawy, K., Abdelhaleem, E., Hudson, S.M., Hebeish, A. 2007. Acylation of iminochitosan: Its effect on blending with cellulose acetate. *Journal of Applied Polymer Science*, **104**(2), 727-734.

- El Seoud, O.A., Marson, G.A., Giacco, G.T., Frollini, E. 2000. An efficient, one-pot acylation of cellulose under homogeneous reaction conditions. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **201**(8), 882-889.
- Elegir, G., Kindl, A., Sadocco, P., Orlandi, M. 2008. Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, **43**(2), 84-92.
- Erbeldinger, M., Ni, X.W., Halling, P.J. 1998. Enzymatic synthesis with mainly undissolved substrates at very high concentrations. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**(1-2), 141-148.
- Erkey, C. 2000. Supercritical carbon dioxide extraction of metals from aqueous solutions: a review. *Journal of Supercritical Fluids*, **17**(3), 259-287.
- Fernando, G., Zimmermann, W., Kolattukudy, P.E. 1984. Suberin-Grown Fusarium-Solani F-Sp Pisi Generates a Cutinase-Like Esterase Which Depolymerizes the Aliphatic Components of Suberin. *Physiological Plant Pathology*, **24**(2), 143-155.
- Ferraz, H.M.C., Bianco, G.G., Teixeira, C.C., Andrade, L.H., Porto, A.L.M. 2007. Enzymatic resolution of alpha-tetralols by CALB-catalyzed acetylation. *Tetrahedron-Asymmetry*, **18**(9), 1070-1076.
- Fessner, W.D., Jones, J.B. 2001. Biocatalysis and biotransformation - From discovery to application - Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**(2), 103-105.
- Fett, W.F., Wijey, C., Moreau, R.A., Osman, S.F. 2000. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, **31**(1), 25-29.
- Floyd, R.A., Steward, J.E., Hampton, M.J., Sridhar, R. 1979. Activation of the Carcinogen N-Hydroxy-2-Acetyl-Aminofluorene by Rat-Liver Nuclei, Microsomes and Hog Liver Esterase Via Deacylation. *Federation Proceedings*, **38**(3), 658-658.
- Fojan, P., Rasmussen, T., Sunesen, C.O., Petersen, S.B. 2002. Atomic force microscopy study of the interaction of Fusarium solani pisi cutinase with lipid surfaces. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **2**(2), 229-234.
- Fox, S.C., Li, B., Xu, D., Edgar, K.J. 2011. Regioselective Esterification and Etherification of Cellulose: A Review. *Biomacromolecules*, **12**(6), 1956-1972.
- Garcia, S.I., Louren, N.M.T., Lousa, D., Sequeira, A.F., Mimoso, P., Cabral, J.M.S., Afonso, C.A.M., Barreiros, S. 2004. A comparative study of biocatalysis in non-conventional solvents: Ionic liquids, supercritical fluids and organic media. *Green Chemistry*, **6**(9), 466.
- Gemili, S., Yemenicioglu, A., Altinkaya, S.A. 2009. Development of cellulose acetate based antimicrobial food packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*, **90**(4), 453-462.
- Goncalves, A.M.D., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 2003. Interaction of an anionic surfactant with a recombinant cutinase from Fusarium solani pisi: a spectroscopic study. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**(7), 868-879.

- Goncalves, A.P.V., Lopes, J.M., Lemos, F., Ribeiro, F.R., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., AiresBarros, M.R. 1997. Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani* pisi. *Enzyme and Microbial Technology*, **20**(2), 93-101.
- Gonzalez-Sabin, J., Gotor, V., Rebollo, F. 2004. Kinetic resolution of (+/-)-trans- and (+/-)-cis-2-phenylcyclopentanamine by CALB-catalyzed aminolysis of esters: the key role of the leaving group. *Tetrahedron-Asymmetry*, **15**(3), 481-488.
- Gordillo, M.D., Sanchez-Oneto, J., Pereyra, C., de la Ossa, E.J.M. 2005. Review of the main methods of critical parameter estimation: Application to the correlation of palmitic acid/supercritical carbon dioxide phase equilibrium data. *Reviews in Chemical Engineering*, **21**(2), 71-94.
- Graber, M., Leonard, V., Marton, Z., Cusatis, C., Lamare, S. 2008. Exploring the possibility of predicting CALB activity in liquid organic medium, with the aid of intrinsic kinetic parameters and intrinsic solvent effect data obtained in solid/gaz reactor. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **52-3**, 121-127.
- Gradwell, S. 2004. Surface modification of cellulose fibers: towards wood composites by biomimetics? *Comptes Rendus Biologies*, **327**(9-10), 945-953.
- Granstrom, M., Kavakka, J., King, A., Majoinen, J., Makela, V., Helaja, J., Hietala, S., Virtanen, T., Maunu, S.L., Argyropoulos, D.S., Kilpelainen, I. 2008. Tosylation and acylation of cellulose in 1-allyl-3-methylimidazolium chloride. *Cellulose*, **15**(3), 481-488.
- Guebitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. 2008. Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. *Trends in Biotechnology*, **26**(1), 32-38.
- Guillot, F.M., Trivett, D.H. 2003. A dynamic Young's modulus measurement system for highly compliant polymers. *Journal of the Acoustical Society of America*, **114**(3), 1334-1345.
- Gupta, M.N., Roy, I. 2002. Applied biocatalysis: An overview. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, **39**(4), 220-228.
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**(6), 763-781.
- Gustavsson, M.T., Persson, P.V., Iversen, T., Martinelle, M., Hult, K., Teeri, T.T., Brumer, H. 2005. Modification of cellulose fiber surfaces by use of a lipase and a xyloglucan endotransglycosylase. *Biomacromolecules*, **6**(1), 196-203.
- Han, D., Rhee, J.S. 1986. Characteristics of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Olive Oil in Aot-Isooctane Reversed Micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, **28**(8), 1250-1255.
- Han, S.Y., Pan, Z.Y., Huang, D.F., Ueda, M., Wang, X.N., Lin, Y. 2009. Highly efficient synthesis of ethyl hexanoate catalyzed by CALB-displaying *Saccharomyces cerevisiae* whole-cells in non-aqueous phase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **59**(1-3), 168-172.

- Handayani, N., Miletic, N., Loos, K., Achmad, S., Wahyuningrum, D. 2011. Properties of Immobilized *Candida antarctica* Lipase B on Highly Macroporous Copolymer. *Sains Malaysiana*, **40**(9), 965-972.
- Hao, J.C., Zemb, T. 2007. Self-assembled structures and chemical reactions in room-temperature ionic liquids. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **12**(3), 129-137.
- Harrison, L.A. 1987. Microbial-Degradation of Cellulose Polymers Used in Cosmetics and Toiletries. *International Journal of Cosmetic Science*, **9**(2), 73-84.
- Hauer, B., Roberts, S.M. 2004. Biocatalysis and biotransformation - Probing the potential usefulness and the mechanisms of action of some novel biocatalysts - Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **8**(2), 103-105.
- Heinze, T., Rahn, K., Jaspers, M., Berghmans, H. 1996. p-toluenesulfonyl esters in cellulose modifications: Acylation of remaining hydroxyl groups. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **197**(12), 4207-4224.
- Heinze, T., Schaller, J. 2000. New water soluble cellulose esters synthesized by an effective acylation procedure. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **201**(12), 1214-1218.
- Hernández, F.J., de los Ríos, A.P., Gómez, D., Rubio, M., Villora, G. 2006. A new recirculating enzymatic membrane reactor for ester synthesis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Applied Catalysis B: Environmental*, **67**(1-2), 121-126.
- Hirano, S., Zhang, M., Chung, B.G., Kim, S.K. 2000. The N-acylation of chitosan fibre and the N-deacetylation of chitin fibre and chitin-cellulose blended fibre at a solid state. *Carbohydrate Polymers*, **41**(2), 175-179.
- Hirrien, M., Desbrieres, J., Rinaudo, M. 1996. Physical properties of methylcelluloses in relation with the conditions for cellulose modification. *Carbohydrate Polymers*, **31**(4), 243-252.
- Hobbs, H.R., Kirke, H.M., Poliakoff, M., Thomas, N.R. 2007. Homogeneous biocatalysis in both fluorous biphasic and supercritical carbon dioxide systems. *Angewandte Chemie-International Edition*, **46**(41), 7860-7863.
- Holbrey, J.D., Reichert, W.M., Spear, S.K., Swatloski, R.P., Turner, M.B., Visser, A.E. 2002a. Getting started with ionic liquids: An experience-based tutorial on synthesis and handling. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **224**, U611-U611.
- Holbrey, J.D., Reichert, W.M., Swatloski, R.P., Broker, G.A., Pitner, W.R., Seddon, K.R., Rogers, R.D. 2002b. Efficient, halide free synthesis of new, low cost ionic liquids: 1,3-dialkylimidazolium salts containing methyl- and ethyl-sulfate anions. *Green Chemistry*, **4**(5), 407-413.
- Hult, E.L., Iotti, M., Lenes, M. 2010. Efficient approach to high barrier packaging using microfibrillar cellulose and shellac. *Cellulose*, **17**(3), 575-586.
- Hult, K. 2006. The protein scaffold of CALB as host for new enzyme reactions - Abstracts. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **42**(3-4), 115-115.

- Hussain, M.A., Liebert, T., Heinze, T. 2004. Acylation of cellulose with N,N'-carbonyldiimidazole-activated acids in the novel solvent dimethyl sulfoxide/tetrabutylammonium fluoride. *Macromolecular Rapid Communications*, **25**(9), 916-920.
- Ikeda, I., Klibanov, A.M. 1993. Lipase-Catalyzed Acylation of Sugars Solubilized in Hydrophobic Solvents by Complexation. *Biotechnology and Bioengineering*, **42**(6), 788-791.
- Inaba, C., Maekawa, K., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M. 2009. Efficient synthesis of enantiomeric ethyl lactate by *Candida antarctica* lipase B (CALB)-displaying yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**(5), 859-864.
- Irvine, P.A., Smith, P. 1986. Development of the Axial Young Modulus with Draw Ratio of Flexible-Chain Polymers. *Macromolecules*, **19**(1), 240-242.
- Jandura, P., Kokta, B.V., Riedl, B. 2000. Fibrous long-chain organic acid cellulose esters and their characterization by diffuse reflectance FTIR spectroscopy, solid-state CP/MAS C-13-NMR, and X-ray diffraction. *Journal of Applied Polymer Science*, **78**(7), 1354-1365.
- Jesionowski, A.M., Erbdinger, M., Kaar, J.L., Russell, A.J. 2002. Biocatalysis and enzyme stability in ionic liquids. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **224**, U626-U627.
- Jiang, H.L., Ying, L.Y., Wang, Q., Shen, H.Y., Ying, M., Zeng, T.T. 2007a. Effects of ionic liquids as mobile phase additives on the separation of the plants hormones in high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **35**(9), 1327-1330.
- Jiang, W.Q., Yu, B., Liu, W.M., Hao, J.C. 2007b. Carbon nanotubes incorporated within lyotropic hexagonal liquid crystal formed in room-temperature ionic liquids. *Langmuir*, **23**(16), 8549-8553.
- Jin, Z.W., Wang, S., Wang, J.Q., Xu, M. 2010. The Fabrication and Characterization of Cellulose/Mesoporous Silica Composites Packaging Films with Adjustable Permeability by NMMO Technology. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, **49**(13), 1371-1377.
- Joly, N., Granet, R., Branland, P., Verneuil, B., Krausz, P. 2005. New methods for acylation of pure and sawdust-extracted cellulose by fatty acid derivatives - Thermal and mechanical analyses of cellulose-based plastic films. *Journal of Applied Polymer Science*, **97**(3), 1266-1278.
- Jones, J.B., Wong, C.H. 1998. Biocatalysis and biotransformation exploiting nature's magic - Overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**(1), 67-69.
- Jones, L.D. 1981. Microcrystalline Cellulose in Cosmetics and Toiletries. *Drug & Cosmetic Industry*, **128**(2), 60-&.
- Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton, R., Russell, A.J. 2003. Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society*, **125**(14), 4125-4131.
- Kalantzi, S., Mamma, D., Christakopoulos, P., Kekos, D. 2008. Effect of pectate lyase bioscouring on physical, chemical and low-stress mechanical properties of cotton fabrics. *Bioresource Technology*, **99**(17), 8185-8192.

- Kamper, J.T., Kamper, U., Rogers, L.M., Kolattukudy, P.E. 1994. Identification of Regulatory Elements in the Cutinase Promoter from *Fusarium-Solani* F Sp Pisi (*Nectria-Haematococca*). *Journal of Biological Chemistry*, **269**(12), 9195-9204.
- Keay, L., Crook, E.M. 1965. Effect of Metal Ions on Hog Liver Esterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **111**(3), 626-8.
- Kelly, R.M., Waldmann, H. 1999. Biocatalysis and biotransformation - Editorial overview. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**(1), 9-10.
- Kim, H.S., Quang, A.T.L., Kim, Y.H. 2010. Development of thermostable lipase B from *Candida antarctica* (CalB) through in silico design employing B-factor and RosettaDesign. *Enzyme and Microbial Technology*, **47**(1-2), 1-5.
- Klemm, D., Heinze, T. 1986. Acylation of Carboxymethyl Cellulose Accelerated by 4-Dimethylaminopyridine. *Synthetic Communications*, **16**(12), 1499-1508.
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A. 2005. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International Edition*, **44**(22), 3358-3393.
- Klemm, D., Philipp, B., Fanter, C., Wagenknecht, W., Hartmann, M., Geschwend, G., Schumann, P. 1983. Acylation Reactions of Cellulose in the Presence of 4-Dimethylamino-Pyridine. *Zeitschrift Fur Chemie*, **23**(2), 74-74.
- Klemm, D., Schmitt, S., Rathe, M. 1987. Acylation of Cellulose Swelling in Benzylchloride Pyridine. *Zeitschrift Fur Chemie*, **27**(4), 144-145.
- Klibanov, A.M. 2000. Answering the question: 'Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s?'. *Trends in Biotechnology*, **18**(3), 85-86.
- Klibanov, A.M. 1988. Enzymatic Transformations in Non-Aqueous Media. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **195**, 66-IEC.
- Klibanov, A.M., Cambou, B., Zaks, A. 1984. Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Media at 100-Degrees-C. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **188**(Aug), 29-Mbtd.
- Koller, W., Allan, C.R., Kolattukudy, P.E. 1982a. Protection of *Pisum-Sativum* from *Fusarium-Solani* F Sp Pisi by Inhibition of Cutinase with Organophosphorus Pesticides. *Phytopathology*, **72**(11), 1425-1430.
- Koller, W., Allan, C.R., Kolattukudy, P.E. 1982b. Role of Cutinase and Cell-Wall Degrading Enzymes in Infection of *Pisum-Sativum* by *Fusarium-Solani* F-Sp Pisi. *Physiological Plant Pathology*, **20**(1), 47-8.
- Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kollis, F.N. 2001. Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**(10), 655-660.
- Kozlowski, R., Wladyka-Przybylak, M., Helwig, M., Kurzydowski, K.J. 2004. Composites based on lignocellulosic raw materials. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, **418**, 859-879.
- Kraai, G.N., Winkelman, J.G.M., de Vries, J.G., Heeres, H.J. 2008. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochemical Engineering Journal*, **41**(1), 87-94.
- Krisch, K. 1963. Isolation and Properties of an Esterase from Hog Liver Microsomes. *Clinical Chemistry*, **9**(4), 497-8.

- Krisch, K. 1966. Reaction of a Microsomal Esterase from Hog-Liver with Diethyl P-Nitrophenyl Phosphate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **122**(2), 265-8.
- Kumaresan, J., Kothai, T., Lakshmi, B.S. 2011. In silico approaches towards understanding CALB using molecular dynamics simulation and docking. *Molecular Simulation*, **37**(12), 1053-1061.
- Lamare, S., Lortie, R., Legoy, M.D. 1997. Kinetic studies of *Fusarium solani* pisi cutinase used in a gas/solid system: Transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**(1), 1-8.
- Lau, R.M., van Rantwijk, F., Seddon, K.R., Sheldon, R.A. 2000. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters*, **2**(26), 4189-4191.
- Lee, S.-H., Wang, S. 2006. Biodegradable polymers/bamboo fiber biocomposite with bio-based coupling agent. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, **37**(1), 80-91.
- Leone, C., Caprino, G. 2003. Young's modulus degradation in fatigue of filled polymers for household appliances. *Plastics Rubber and Composites*, **32**(8-9), 345-348.
- Li, D.X., Sirakova, T., Rogers, L., Ettinger, W.F., Kolattukudy, P.E. 2002. Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp pisi (*Nectria haematococca*). *Journal of Biological Chemistry*, **277**(10), 7905-7912.
- Liebert, T., Hussain, M.A., Heinze, T. 2005. Structure determination of cellulose esters via subsequent functionalization and NMR spectroscopy. *Macromolecular Symposia*, **223**, 79-91.
- Liebert, T.F., Heinze, T. 2005. Tailored cellulose esters: Synthesis and structure determination. *Biomacromolecules*, **6**(1), 333-340.
- Lin, T.S., Kolattukudy, P.E. 1979. Direct Evidence for the Presence of Beta-Hydroxyphenylalanine and Beta-Hydroxytyrosine in Cutinase from *Fusarium-Solani-Pisi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **196**(1), 255-264.
- Lin, T.S., Kolattukudy, P.E. 1978. Induction of a Bio-Polyester Hydrolase (Cutinase) by Low-Levels of Cutin Monomers in *Fusarium-Solani-F-Sp-Pisi*. *Journal of Bacteriology*, **133**(2), 942-951.
- Louwrier, A., Drtina, G.J., Klivanov, A.M. 1996. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnology and Bioengineering*, **50**(1), 1-5.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. 2001. Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnology Letters*, **23**(18), 1529-1533.
- Lozano, P., De Diego, T., Carrie, D., Vaultier, M., Iborra, J.L. 2004a. Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, **214**(1), 113-119.
- Lozano, P., de Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. 2004b. Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnology Progress*, **20**(3), 661-669.

- Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L. 2004c. Towards green processes for fine chemicals synthesis: Biocatalysis in ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic systems. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **228**, U65-U66.
- Lozano, P., Villora, G., Gomez, D., Gayo, A.B., Sanchez-Conesa, J.A., Rubio, M., Iborra, J.L. 2004d. Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester synthesis in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, **29**(1-2), 121-128.
- Lucien, F.P., Foster, N.R. 2000. Solubilities of solid mixtures in supercritical carbon dioxide: a review. *Journal of Supercritical Fluids*, **17**(2), 111-134.
- Mannesse, M.L.M., Cox, R.C., Koops, B.C., Verheij, H.M., Dehaas, G.H., Egmond, M.R., Vanderhijden, H.T.W.M., Devlieg, J. 1995. Cutinase from *Fusarium-Solani* Pisi Hydrolyzing Triglyceride Analogs - Effect of Acyl-Chain Length and Position in the Substrate Molecule on Activity and Enantioselectivity. *Biochemistry*, **34**(19), 6400-6407.
- Marson, G.A., El Seoud, O.A. 1999. A novel, efficient procedure for acylation of cellulose under homogeneous solution conditions. *Journal of Applied Polymer Science*, **74**(6), 1355-1360.
- Martin, A.F. 1942. American Chemical Society Meeting, Memphis, April 20-24; discussed by Davis, W.E., Elliott, J.H., 1955. In: Ott, E., Spurlin, H., Grafflin, M.W. (Eds.), *Cellulose and Cellulose Derivatives*, second ed. Interscience, New York, 111, 1216.
- Marty, A., Chulalaksananukul, W., Willemot, R.M., Condoret, J.S. 1992. Kinetics of Lipase-Catalyzed Esterification in Supercritical Co₂. *Biotechnology and Bioengineering*, **39**(3), 273-280.
- Mascheroni, E., Capretti, G., Marengo, M., Iametti, S., Mora, L., Piergiovanni, L., Bonomi, F. 2010. Modification of Cellulose-based Packaging Materials for Enzyme Immobilization. *Packaging Technology and Science*, **23**(1), 47-57.
- Masubuchi, Y., Matsuoka, H., Takimoto, J., Koyama, K., Ohta, Y. 1998. Measurement of Young's modulus and Poisson's ratio of polymers under high pressure. *Materials Science Research International*, **4**(3), 223-226.
- Melo, E.P., Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Costa, S.M.B., Cabral, J.M.S. 1998. Deactivation and conformational changes of cutinase in reverse micelles. *Biotechnology and Bioengineering*, **58**(4), 380-386.
- Melo, E.P., Costa, S.M.B., Cabral, J.M.S. 1995. Structural Effect of Reversed Micelles of Aot over a Recombinant Cutinase from *Fusarium-Solani* Pisi - a Steady-State Fluorescence Study. *Enzyme Engineering Xii*, **750**, 85-88.
- Micaelo, N.M., Teixeira, V.H., Baptista, A.M., Soares, C.M. 2005. Water Dependent Properties of Cutinase in Nonaqueous Solvents: A Computational Study of Enantioselectivity. *Biophysical Journal*, **89**(2), 999-1008.
- Moon, R.J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., Youngblood, J. 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, **40**(7), 3941-3994.
- Nicolini, C. 1998. Engineering of enzyme monolayer for industrial biocatalysis - An overview. *Enzyme Engineering Xiv*, **864**, 435-441.

- Nishino, T., Kotera, M., Suetsugu, M., Murakami, H., Urushihara, Y. 2011. Acetylation of plant cellulose fiber in supercritical carbon dioxide. *Polymer*, **52**(3), 830-836.
- Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose 1 beta from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, **124**(31), 9074-9082.
- Nystrom, D., Lindqvist, J., Stmark, E., Hult, A., Malmstrom, E. 2006. Superhydrophobic bio-fibre surfaces via tailored grafting architecture. *Chemical Communications*(34), 3594.
- Ostmark, E., Harrison, S., Wooley, K.L., Malmstrom, E.E. 2007. Comb polymers prepared by ATRP from hydroxypropyl cellulose. *Biomacromolecules*, **8**(4), 1138-1148.
- Pappas, C., Tarantilis, P.A., Daliani, I., Mavromoustakos, T., Polissiou, M. 2002. Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus rostratus* Sm.). *Ultrasonics Sonochemistry*, **9**(1), 19-23.
- Park, S., Kazlauskas, R.J. 2003. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**(4), 432-437.
- Park, S., Kazlauskas, R.J. 2001. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Journal of Organic Chemistry*, **66**(25), 8395-8401.
- Park, S.T., Choi, Y.S., Joo, J.C., Park, H.J., Yoo, Y.J. 2006. BIOT 383-Screening of stable *Fusarium solani* pisi cutinase using plasmid display system. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **232**.
- Peeters, A., Van Alsenoy, C., Zhang, M.L., Van Doren, V.E. 2000. On the use of supermolecule model for calculation of young's modulus of crystalline polymers. *International Journal of Quantum Chemistry*, **80**(3), 425-431.
- Peng, L.C., Kawagoe, Y., Hogan, P., Delmer, D. 2002. Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, **295**(5552), 147-150.
- Pepermans, H.A.M., Prompers, J.J., Vergeer, J., Groenewegen, A., Hilbers, C.W. 1995. Sequence-Specific Assignments of the Backbone H-1, C-13 and N-15 Resonances and Secondary Structure of *Fusarium-Solani-Pisi* Cutinase by Heteronuclear Multidimensional Nmr. *Journal of Cellular Biochemistry*, 80-80.
- Perepelkin, K.E. 2002. Carbon fibres with specific physical and physicochemical properties based on hydrated cellulose and polyacrylonitrile precursors. A review. *Fibre Chemistry*, **34**(4), 271-280.
- Peydecastaing, J., Vaca-Garcia, C., Borredon, E. 2011. Bi-acylation of cellulose: determining the relative reactivities of the acetyl and fatty-acyl moieties. *Cellulose*, **18**(4), 1015-1021.
- Philipp, B., Wagenknecht, W., Nehls, I., Klemm, D., Schnabelrauch, M., Stein, A. 1990. Homogeneous Acylation of Cellulose in Organic-Solvent Systems. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **199**, 335-POLY.

- Philipp, B., Wagenknecht, W., Nehls, I., Schnabelrauch, M., Klemm, D. 1989. Production of Soluble Cellulose-Phosphate and Cellulose-Sulfate Esters Via Homogenous Reactions in Non-Aqueous Systems. *Papier*, **43**(12), 700-706.
- PintoSousa, A.M., Cabral, J.M.S., AiresBarros, M.R. 1996. Stability of a *Fusarium solani* pisi recombinant cutinase in phosphatidylcholine reversed micelles. *Biotechnology Letters*, **18**(5), 583-586.
- Pio, T.F., Macedo, G.A. 2007. Cutinase production by *Fusarium oxysporum* in liquid medium using central composite design. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**(1), 59-67.
- Pitla, S.S., Robinson, D.M., Groll, E.A., Ramadhyani, S. 1998. Heat transfer from supercritical carbon dioxide in tube flow: A critical review. *Hvac&R Research*, **4**(3), 281-301.
- Plisko, E.A., Nudga, L.A., Petrova, V.A., Petropavlovskii, G.A., Laius, L.A. 1982. Acylation of Water-Soluble Cellulose Ethers by Chlorides of Unsaturated-Acids in the Presence of Alkali, and Properties of Mixed Ethers. *Journal of Applied Chemistry of the Ussr*, **55**(10), 2102-2106.
- Polyakov, D.N., Krasovskii, A.N., Gorodneva, E.N., Varlamov, A.V., Mnatsakanov, S.S. 1993. Effect of Activation and Acylation of Cellulose on the Distribution of Primary and Secondary Hydroxyl-Groups in Cellulose Triacetates with a Low Content of Partially Substituted Glucopyranose Units. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **66**(11), 1944-1948.
- Poulsen, K.R., Sorensen, T.K., Duroux, L., Petersen, E.I., Petersen, S.B., Wimmer, R. 2006. The interaction of *Fusarium solani* pisi cutinase with long chain spin label esters. *Biochemistry*, **45**(30), 9163-9171.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. 2005. Application of supercritical carbon dioxide in energetic materials processes: A review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **44**(17), 6523-6533.
- Prompers, J.J., Groenewegen, A., Hilbers, C.W., Pepermans, H.A.M. 1999. Backbone dynamics of *Fusarium solani* pisi cutinase probed by nuclear magnetic resonance: The lack of interfacial activation revisited. *Biochemistry*, **38**(17), 5315-5327.
- Protopopov, A.V., Kon'shin, V.V., Chemeris, M.M. 2005. Acylation of aspen wood and cellulose with p-aminobenzoic acid in trifluoroacetic acid and thionyl chloride. *Russian Journal of Applied Chemistry*, **78**(10), 1718-1719.
- Purdy, R.E., Kolattukudy, P.E. 1975. Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens - Properties of Cutinase-1, Cutinase-2, and a Nonspecific Esterase Isolated from *Fusarium-Solani-Pisi*. *Biochemistry*, **14**(13), 2832-2840.
- Pyatakina, N.K., Moiseev, Y.V., Zaikov, G.E. 1975. Study of Kinetics and Mechanism of Acylation of Cellulose. *Vysokomolekulyarnye Soedineniya Seriya A*, **17**(7), 1493-1496.
- Qiu, W.L., Zhang, F.R., Endo, T., Hirotsu, T. 2004. Milling-induced esterification between cellulose and maleated polypropylene. *Journal of Applied Polymer Science*, **91**(3), 1703-1709.
- Ramsey, E., Sun, Q.B., Zhang, Z.Q., Zhang, C.M., Gou, W. 2009. Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide. *Journal of Environmental Sciences-China*, **21**(6), 720-726.

- Rariy, R.V., Klibanov, A.M. 1999. Protein refolding in predominantly organic media markedly enhanced by common salts. *Biotechnology and Bioengineering*, **62**(6), 704-710.
- Reetz, M.T., Wiesenhofer, W., Francio, G., Leitner, W. 2002. Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chemical Communications*(9), 992-993.
- Regiani, A.M., Frollini, E., Marson, G.A., Arantes, G.M., El Seoud, O.A. 1999. Some aspects of acylation of cellulose under homogeneous solution conditions. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, **37**(9), 1357-1363.
- Rodionova, G., Lenes, M., Eriksen, O., Gregersen, O. 2011. Surface chemical modification of microfibrillated cellulose: improvement of barrier properties for packaging applications. *Cellulose*, **18**(1), 127-134.
- Rodriguezcouto, S., Toca Herrera, J. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, **24**(5), 500-513.
- Rui, L., Roque, A.C.A., Taipa, M.A., Lowe, C.R. 2006. De novo design, synthesis and screening of a combinatorial library of complementary ligands directed towards the surface of cutinase from *Fusarium solani* pisi. *Journal of Molecular Recognition*, **19**(4), 372-378.
- Samaranayake, G., Glasser, W.G. 1993a. Cellulose Derivatives with Low Ds .1. A Novel Acylation System. *Carbohydrate Polymers*, **22**(1), 1-7.
- Samaranayake, G., Glasser, W.G. 1993b. Cellulose Derivatives with Low Ds .2. Analysis of Alkanoates. *Carbohydrate Polymers*, **22**(2), 79-86.
- Satge, C., Granet, R., Verneuil, B., Branland, P., Krausz, P. 2004. Synthesis and properties of biodegradable plastic films obtained by microwave-assisted cellulose acylation in homogeneous phase. *Comptes Rendus Chimie*, **7**(2), 135-142.
- Sauceau, M., Fages, J., Common, A., Nikitine, C., Rodier, E. 2011. New challenges in polymer foaming: A review of extrusion processes assisted by supercritical carbon dioxide. *Progress in Polymer Science*, **36**(6), 749-766.
- Schauber, T., de Vos, S., Huhn, W., Rieger, B., Moller, M. 1999. Phase behavior and mechanical properties of blends of cellulose propionate and an alternating propene-carbon monoxide copolymer. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **200**(3), 574-579.
- Schenzel, K., Fischer, S. 2002. Differentiation of cellulose using FT Raman spectroscopy, curve-fitting experiments, derivative spectrometry and multivariate data analysis. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **223**, U131-U131.
- Schmidt, W.F., Barone, J.R., Francis, B., Reeves, J.B. 2006. Stearic acid solubility and cubic phase volume. *Chemistry and Physics of Lipids*, **142**(1-2), 23-32.
- Schmitke, J.L., Stern, L.J., Klibanov, A.M. 1998. Organic solvent binding to crystalline subtilisin in mostly aqueous media and in the neat solvents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **248**(2), 273-277.
- Schultz, P., Luning, U. 2002. Acylation of 6-O-functionalized cellulose ethers with diphenylketene. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **203**(7), 961-967.

- Seddon, K.R., Stark, A., Torres, M.J. 2000. Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. *Pure and Applied Chemistry*, **72**(12), 2275-2287.
- Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E., Conrad, C.M. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the x-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, **29**, 786-794.
- Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N. 1997. Improved stability and reactivity of *Fusarium solani* cutinase in supercritical CO₂. *Biotechnology Techniques*, **11**(9), 661-665.
- Sereti, V., Stamatis, H., Koukios, E., Kolisis, F.N. 1998. Enzymatic acylation of cellulose acetate in organic media. *Journal of Biotechnology*, **66**(2-3), 219-223.
- Sereti, V., Stamatis, H., Pappas, C., Polissiou, M., Kolisis, F.N. 2001. Enzymatic acylation of hydroxypropyl cellulose in organic media and determination of ester formation by diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, **72**(4), 495-500.
- Severac, E., Galy, O., Turon, F., Pantel, C.A., Condoret, J.S., Monsan, P., Marty, A. 2011. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology*, **48**(1), 61-70.
- Sheldon, R.A., van Rantwijk, F., Lau, R.M. 2002. Overview of biocatalysis in ionic liquids. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **224**, U626-U626.
- Shimizu, Y., Nakayama, A., Hayashi, J. 1991. Acylation of Cellulose with Carboxylate Salts. *Cellulose Chemistry and Technology*, **25**(5-6), 275-281.
- Shiraishi, N., Aoki, T., Norimoto, M., Okumura, M. 1982. Thermoplasticization of Cellulose and Wood by Graft-Copolymerization and Acylation. *ACS Symposium Series*, **187**, 321-348.
- Sigurðsladóttir, S., Konráðsdóttir, M., Jonsson, A., Kristjánsson, J.K., Matthiasson, E. 1993. Lipase Activity of Thermophilic Bacteria from Icelandic Hot-Springs. *Biotechnology Letters*, **15**(4), 361-366.
- Silva, C., Matamá, T., Guebitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. 2005. Influence of organic solvents on cutinase stability and accessibility to polyamide fibers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **43**(13), 2749-2753.
- Skjot, M., De Maria, L., Chatterjee, R., Svendsen, A., Patkar, S.A., Ostergaard, P.R., Brask, J. 2009. Understanding the Plasticity of the alpha/beta Hydrolase Fold: Lid Swapping on the *Candida antarctica* Lipase B Results in Chimeras with Interesting Biocatalytic Properties. *Chembiochem*, **10**(3), 520-527.
- Song, X., Qi, X., Hao, B., Qu, Y. 2008. Studies of substrate specificities of lipases from different sources. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**(12), 1095-1101.
- Spence, K.L., Venditti, R.A., Rojas, O.J., Habibi, Y., Pawlak, J.J. 2010. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: water interactions and physical properties for packaging applications. *Cellulose*, **17**(4), 835-848.

- Stamatis, H., Xenakis, A. 1999. Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **6**(4), 399-406.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N. 1999. Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases. *Biotechnology Advances*, **17**(4-5), 293-318.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Menge, U., Kolisis, F.N. 1993. Kinetic-Study of Lipase-Catalyzed Esterification Reactions in Water-in-Oil Microemulsions. *Biotechnology and Bioengineering*, **42**(8), 931-937.
- Stevens, E.P., Steuernagel, C.R. 1979. Microcrystalline Cellulose in Cosmetics and Toiletries. *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, **50**(6), 53-&.
- Stevens, E.P., Steuernagel, C.R. 1978. Microcrystalline Cellulose for Cosmetics. *Drug & Cosmetic Industry*, **122**(6), 54-&.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. 2002a. Dissolution of cellulose with ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, **124**(18), 4974-4975.
- Swatloski, R.P., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. 2002b. Ionic liquids: New solvents for non-derivitized cellulose dissolution. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **224**, U622-U622.
- Swatloski, R.P., Visser, A.E., Davis, J.H., Rogers, R.D. 2002c. Actinides in room temperature ionic liquids; Old elements - New solvents. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **223**, B166-B166.
- Swatloski, R.P., Visser, A.E., Reichert, W.M., Broker, G.A., Farina, L.M., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. 2002d. On the solubilization of water with ethanol in hydrophobic hexafluorophosphate ionic liquids. *Green Chemistry*, **4**(2), 81-87.
- Tanghe, L.J., Genung, L.B., Mench, J.W. 1963. Determination of acetyl content and degree of substitution of cellulose acetate. In: Whistler, R.L. (Ed.), *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Academic Press, New York, 201-203.
- Tankhiwale, R., Bajpai, S.K. 2009. Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, **69**(2), 164-168.
- Theodorou, V., Skobridis, K., Tzakos, A.G., Ragoussis, V. 2007. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, **48**(46), 8230-8233.
- Thodi, K., Barbayianni, E., Fotakopoulou, I., Bornscheuer, U.T., Constantinoit-Kokotou, V., Kokotos, G., Moutevelis-Minakakis, P. 2008. Hydrolytic action of *Candida Antarctica* lipase B (CALB) and pig liver esterase (PLE) upon various carboxyl protecting groups. *Journal of Peptide Science*, **14**(8), 53-53.
- Tindall, G.W., Boyd, B.W., Perry, R.L. 2002. Determination of acid substituents and unesterified hydroxyl groups in cellulose esters. *Journal of Chromatography A*, **977**(2), 247-250.
- Tokuda, G., Watanabe, H. 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. *Biology Letters*, **3**(3), 336-339.

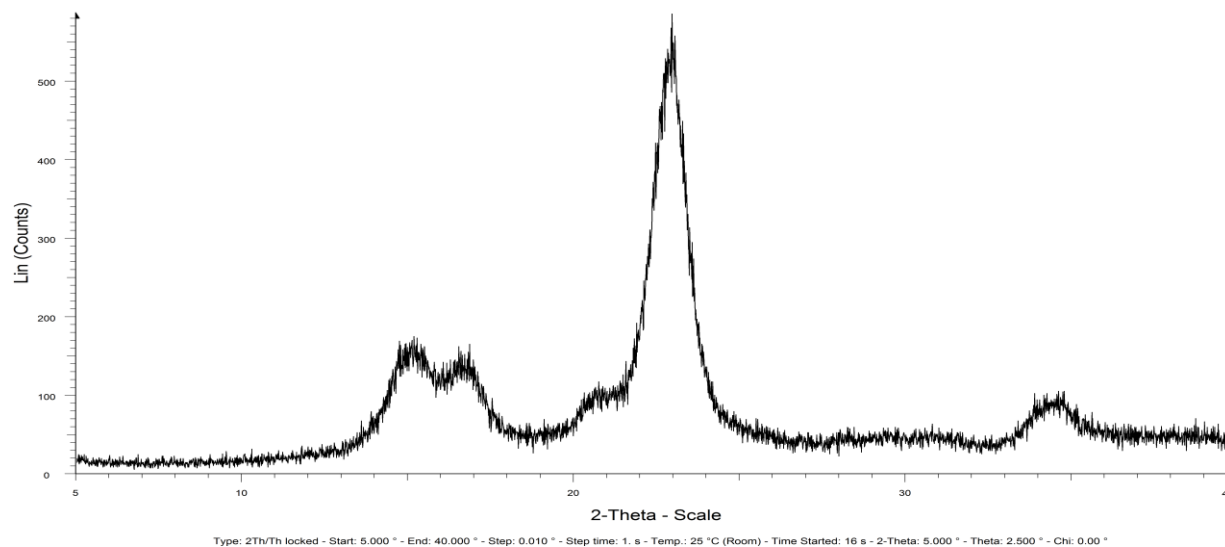
- Tomanová, V., Pielichowski, K., Sroková, I., Žoldaková, A., Sasinková, V., Ebringerová, A. 2007. Microwave-assisted synthesis of carboxymethylcellulose – based polymeric surfactants. *Polymer Bulletin*, **60**(1), 15-25.
- Tranchida, D., Piccarolo, S., Loos, J., Alexeev, A. 2006. Accurately evaluating Young's modulus of polymers through nanoindentations: A phenomenological correction factor to the Oliver and Pharr procedure. *Applied Physics Letters*, **89**(17).
- Turner, M.B., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Daly, D.T., Rogers, R.D. 2005. Ionic liquid-reconstituted cellulose composites as solid support matrices for biocatalyst immobilization. *Biomacromolecules*, **6**(5), 2497-2502.
- Turner, M.B., Spear, S.K., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. 2004. Production of Bioactive Cellulose Films Reconstituted from Ionic Liquids. *Biomacromolecules*, **5**(4), 1379-1384.
- Uhlein, E. 1965. Paper Packaging Cellulose Casein Flexible Barrier Materials. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift Fur Polymere*, **204**(1-2), 145-&.
- Ulbert, O., Bélafi-Bakó, K., Tonova, K., Gubicza, L. 2005. Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation*, **23**(3-4), 177-183.
- Ulijn, R.V., De Martin, L., Gardossi, L., Janssen, A.E.M., Moore, B.D., Halling, P.J. 2002. Solvent selection for solid-to-solid synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, **80**(5), 509-515.
- Vaca-Garcia, C., Borredon, M.E. 1999. Solvent-free fatty acylation of cellulose and lignocellulosic wastes. Part 2: Reactions with fatty acids. *Bioresource Technology*, **70**(2), 135-142.
- Vaca-Garcia, C., Borredon, M.E., Gaseta, A. 2001. Determination of the degree of substitution (DS) of mixed cellulose esters by elemental analysis. *Cellulose*, **8**(3), 225-231.
- Vaca-Garcia, C., Gozzelino, G., Glasser, W.G., Borredon, M.E. 2003. Dynamic mechanical thermal analysis transitions of partially and fully substituted cellulose fatty esters. *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, **41**(3), 281-288.
- van Rantwijk, F., Madeira Lau, R., Sheldon, R.A. 2003. Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology*, **21**(3), 131-138.
- Velonia, K., Flomenbom, O., Loos, D., Masuo, S., Cotlet, M., Engelborghs, Y., Hofkens, J., Rowan, A.E., Klaffer, J., Nolte, R.J.M., de Schryver, F.C. 2005. Single-enzyme kinetics of CALB-catalyzed hydrolysis. *Angewandte Chemie-International Edition*, **44**(4), 560-564.
- Villo, L., Kreen, M., Kudryashova, M., Metsala, A., Tamp, S., Lille, U., Pehk, T., Parve, O. 2011. A chemoenzymatic synthesis of deoxy sugar esters involving stereoselective acetylation of hemiacetals catalyzed by CALB. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **68**(1), 44-51.
- Visser, A.E., Reichert, W.M., Swatloski, R.P., Willauer, H.D., Huddleston, J.G., Rogers, R.D. 2002a. Characterization of hydrophilic and hydrophobic ionic liquids: Alternatives to volatile organic compounds for liquid-liquid separations. *Ionic Liquids*, **818**, 289-308.

- Visser, A.E., Swatoski, R.P., Reichert, W.M., Mayton, R., Sheff, S., Wierzbicki, A., Davis, J.H., Rogers, R.D. 2002b. Task-specific ionic liquids incorporating novel cations for the coordination and extraction of Hg(2+) and Cd(2+): Synthesis, characterization, and extraction studies. *Environmental Science & Technology*, **36**(11), 2523-2529.
- Wagenknecht, W., Philipp, B., Keck, M. 1985. Acylation of Cellulose Dissolved in O-Base Solvent Systems-(G). *Acta Polymerica*, **36**(12), 697-698.
- Wagenknecht, W., Philipp, B., Nehls, I., Schnabelrauch, M., Klemm, D., Hartmann, M. 1991. Investigation of the Formation of Water-Soluble Cellulose Phosphates by Homogeneous Acylation in the System Cellulose/N₂O₄/Dmf .1. The Problem and Results on the Acylation with POCl₃. *Acta Polymerica*, **42**(5), 213-217.
- Wang, H., Malhotra, S.V., Francis, A.J. 2007a. Toxicity study of methoxyethyl methyl imidazolium-based ionic liquids. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **233**, 527-527.
- Wang, Q., Tang, H., Me, Q.J., Tan, L., Zhang, Y.Y., Li, B., Yao, S.Z. 2007b. Room-temperature ionic liquids/multi-walled carbon nanotubes/chitosan composite electrode for electrochemical analysis of NADH. *Electrochimica Acta*, **52**(24), 6630-6637.
- Wescott, C.R., Klibanov, A.M. 1997. Thermodynamic analysis of solvent effect on substrate specificity of lyophilized enzymes suspended in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*, **56**(3), 340-344.
- Wibowo, A.C., Misra, M., Park, H.-M., Drzal, L.T., Schalek, R., Mohanty, A.K. 2006. Biodegradable nanocomposites from cellulose acetate: Mechanical, morphological, and thermal properties. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, **37**(9), 1428-1433.
- Wimmer, Z., Zarevucka, M. 2010. A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxide on Enzyme Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**(1), 233-253.
- Wu, J., Zhang, J., Zhang, H., He, J.S., Ren, Q., Guo, M. 2004. Homogeneous acetylation of cellulose in a new ionic liquid. *Biomacromolecules*, **5**(2), 266-268.
- Xie, J.B., Hsieh, Y.L. 2001. Enzyme-catalyzed transesterification of vinyl esters on cellulose solids. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, **39**(11), 1931-1939.
- Xu, D.Q., Li, B., Tate, C., Edgar, K.J. 2011. Studies on regioselective acylation of cellulose with bulky acid chlorides. *Cellulose*, **18**(2), 405-419.
- Yang, K., Wang, Y.-J. 2004. Lipase-catalyzed transesterification in aqueous medium under thermodynamic and kinetic control using carboxymethyl cellulose acetylation as the model reaction. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**(2-3), 223-231.
- Yang, K., Wang, Y.J. 2003. Lipase-catalyzed cellulose acetylation in aqueous and organic media. *Biotechnology Progress*, **19**(6), 1664-1671.
- Yin, C., Li, J., Xu, Q., Peng, Q., Liu, Y., Shen, X. 2007. Chemical modification of cotton cellulose in supercritical carbon dioxide: Synthesis and characterization of cellulose carbamate. *Carbohydrate Polymers*, **67**(2), 147-154.

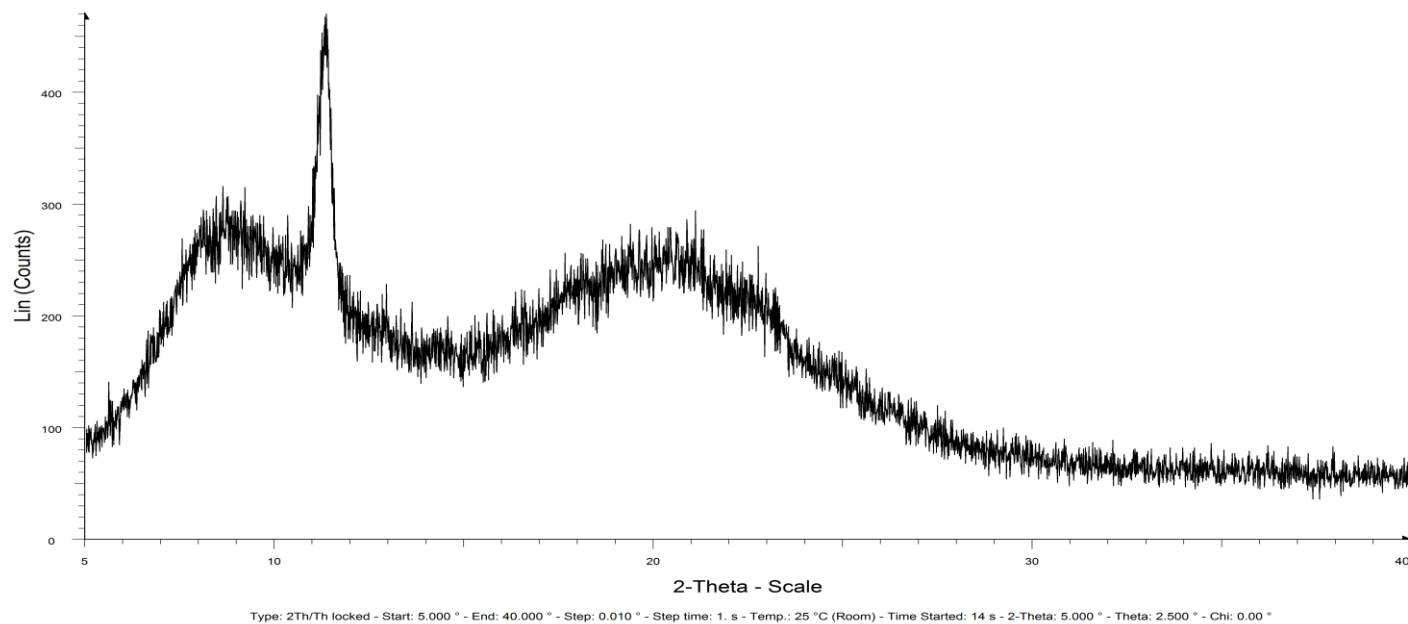
- Yoshida, N. 2009. Development of Chemical Modified Cellulose as Cosmetics Material. *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, **67**(9), 951-957.
- Zaks, A., Klivanov, A.M. 1988. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *Journal of Biological Chemistry*, **263**(17), 8017-8021.
- Zhang, Z.B., McCormick, C.L. 1997. Structopendant unsaturated cellulose esters via acylation in homogeneous lithium chloride N,N-dimethylacetamide solutions. *Journal of Applied Polymer Science*, **66**(2), 293-305.
- Zhao, H., Jones, C.L., Baker, G.A., Xia, S., Olubajo, O., Person, V.N. 2009. Regenerating cellulose from ionic liquids for an accelerated enzymatic hydrolysis. *Journal of Biotechnology*, **139**(1), 47-54.
- Zhao, H., Luo, R.G., Malhotra, S.V. 2003. Kinetic study on the enzymatic resolution of homophenylalanine ester using ionic liquids. *Biotechnology Progress*, **19**(3), 1016-1018.
- Zhou, G.-P., Zhang, Y., Huang, X.-R., Shi, C.-H., Liu, W.-F., Li, Y.-Z., Qu, Y.-B., Gao, P.-J. 2008. Catalytic activities of fungal oxidases in hydrophobic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate based microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **66**(1), 146-149.
- Zhu, S., Wu, Y., Chen, Q., Yu, Z., Wang, C., Jin, S., Ding, Y., Wu, G. 2006. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chemistry*, **8**(4), 325.

Παράρτημα

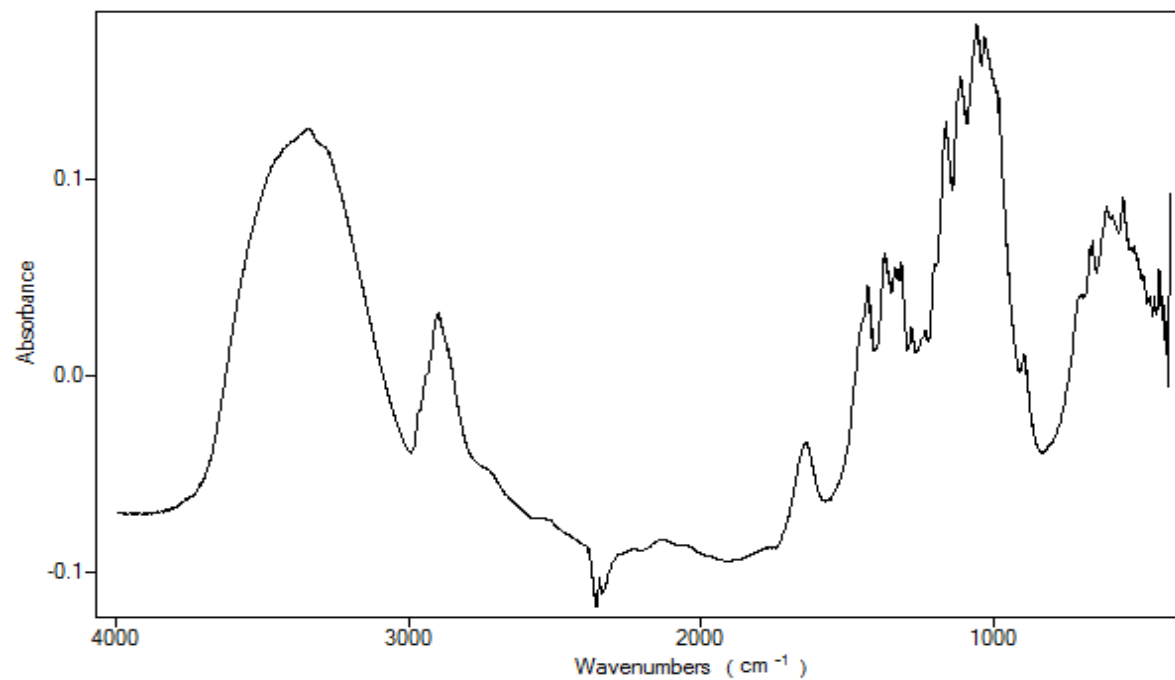
Α. Φάσματα περίθλασης ακτίνων Χ (XRD)



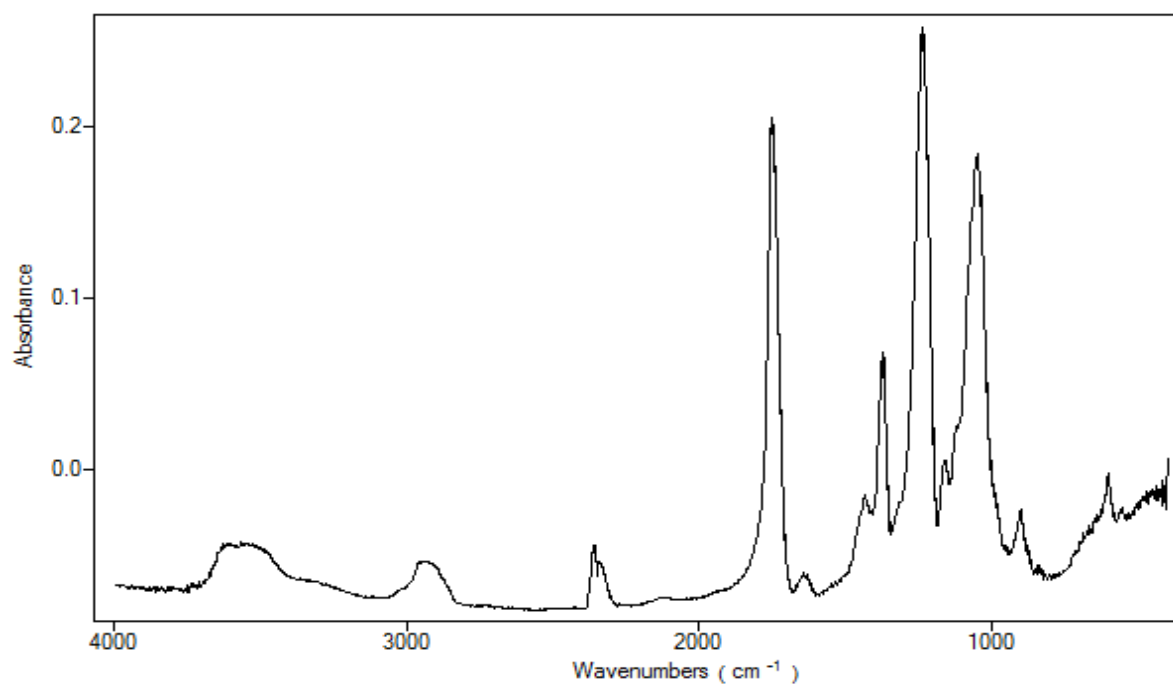
Σχήμα Α1 Φάσμα περίθλασης ακτίνων Χ, που αφορά σε ακατέργαστη κυτταρίνη (δείκτης κρυσταλλικότητας $CrI = 90.7\%$).



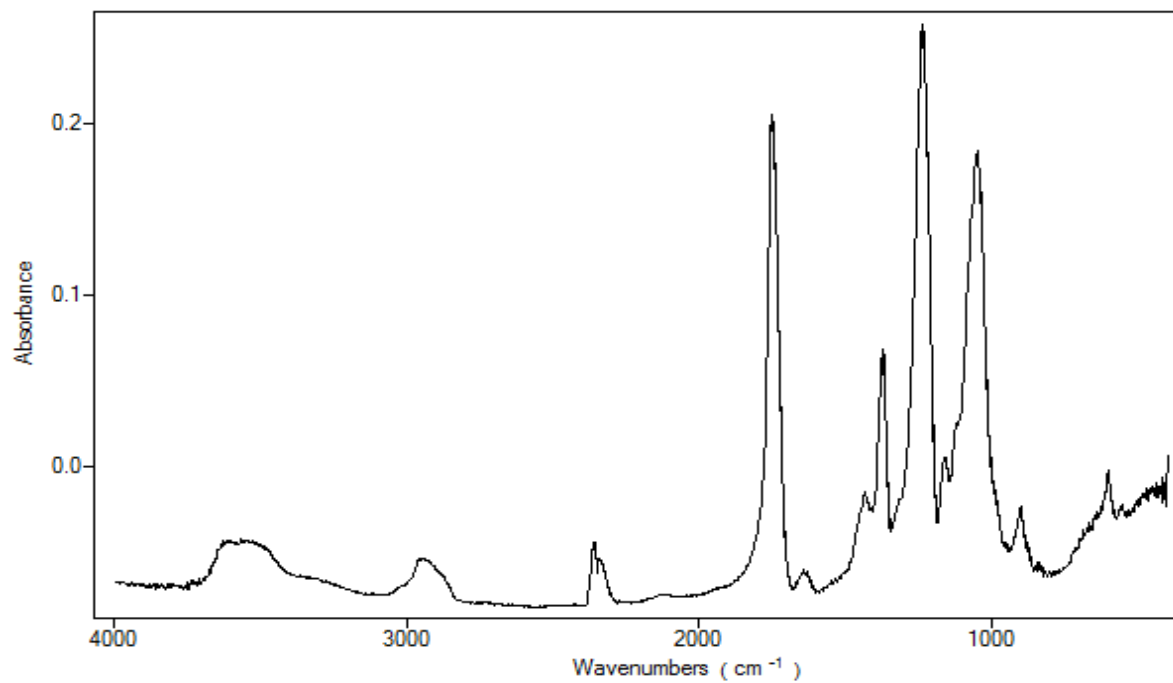
Σχήμα A2 Φάσμα περίθλασης ακτίνων X, που αφορά σε αναγεννημένη κυτταρίνη που προέκυψε από θερμική κατεργασία στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl (CrI = 54.0%).

Β. Φάσματα FTIR

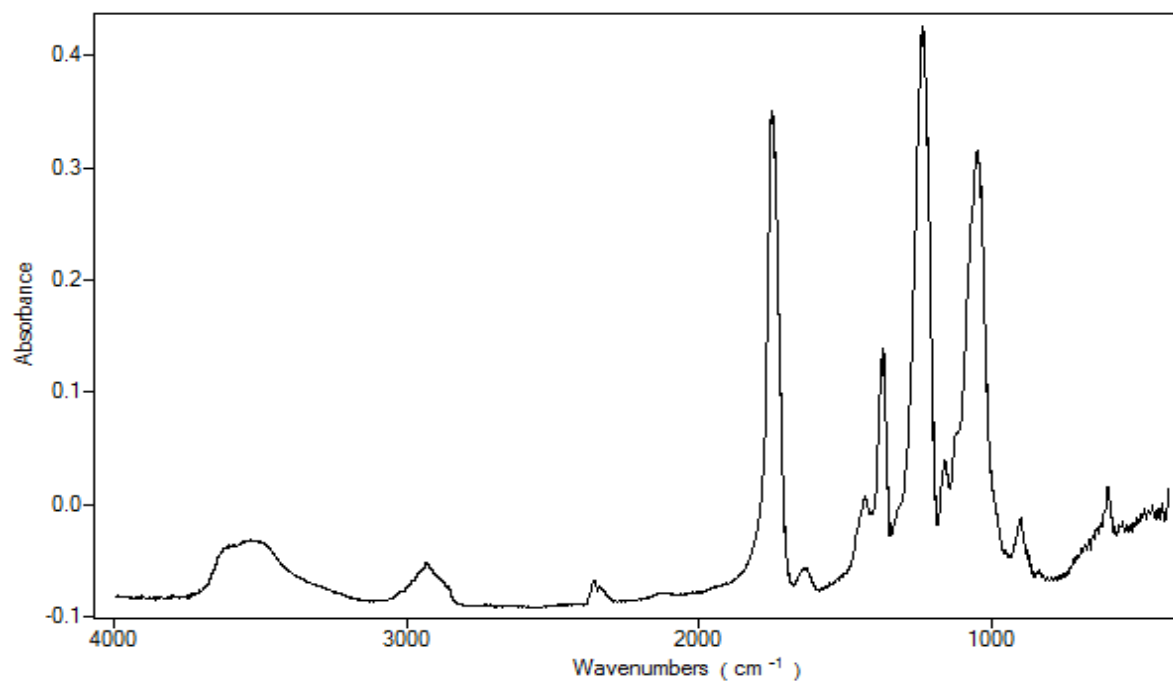
Σχήμα Β1 Φάσμα FTIR που αφορά στην κυτταρίνη.



Σχήμα Β2 Φάσμα FTIR που αφορά στην προπιονική κυτταρίνη. Η κορυφή του εστέρα εντοπίζεται περί τα 1752 cm^{-1} .



Σχήμα Β3 Φάσμα FTIR που αφορά στην δωδεκανοϊκή κυτταρίνη. Η κορυφή του εστέρα εντοπίζεται περί τα 1755 cm^{-1} .



Σχήμα Β4 Φάσμα FTIR που αφορά στην δεκαοκτανοϊκή κυτταρίνη. Η κορυφή του εστέρα εντοπίζεται περί τα 1760 cm⁻¹.