



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

**ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟ-
ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ**

Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών

Διευθυντής: Κωνσταντίνος Δ. Παπασπυρίδης, Καθηγητής ΕΜΠ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη ενζυμικού πολυμερισμού και
μεταπολυμερισμού μάζας με στόχο την παραγωγή
πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα)

Μαρία Ρηγοπούλου

Επιβλέπουσα

Σταματίνα Ν. Βουγιούκα

Επίκουρος Καθηγήτρια Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2017

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη της Επίκουρης Καθηγήτριας Ε.Μ.Π κας Σταματίνας Ν. Βουγιούκα κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-17.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα. Σταματίνα Βουγιούκα, για τις συμβουλές της, την υπομονή της, την καθοδήγησή της αλλά και την ευκαιρία που μου έδωσε να αναλάβω πρωτοβουλίες κατά την εκπόνηση της εργασίας μου. Ακολούθως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ευάγγελο Τόπακα, Επίκουρο Καθηγητή Ε.Μ.Π, ο οποίος συντέλεσε στη διαμόρφωση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας, παρέχοντας υλικά και συνεργάτες από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ε.Μ.Π. κ. Κωνσταντίνο Παπασπυρίδη, Δ/ντη Εργ. Τεχνολογίας Πολυμερών, για την ευκαιρία μιας όμορφης συνεργασίας με το Εργαστήριο Πολυμερών.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Έλλη - Μαρία Μπαραμπούτη, μέλος ΕΔΙΠ, για τη διάθεση και το χρόνο που μου αφιέρωσε σε διάφορα ζητήματα που προέκυπταν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και τον Δρ. Δημήτρη Κορρέ, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών για τη συνεργασία και τις συμβουλές που. Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ ανήκει σε δύο Υποψήφιους Διδάκτορες Ε.Μ.Π., το Στράτο Νικολάιβιτς και την Ελένη Καβέτσου, για τη συνεισφορά τους σε πρακτικούς τομείς της εργασίας, δαπανώντας χρόνο από το ήδη απαιτητικό πρόγραμμά τους. Δεν πρέπει να ξεχάσω φυσικά και όλα τα μέλη των εργαστηρίων Πολυμερών, Βιοτεχνολογίας και Οργανικής Χημείας για το άψογο κλίμα συνεργασίας και τη θετική τους ενέργεια.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Ε.Μ.Π. κ. Δημήτρη Χατζηαβραμίδη και κα. Δήμητρα Δημοτίκαλη για τις προσωπικές σχέσεις που αναπτύξαμε κατά τη διάρκεια των σπουδών μου και συνέβαλαν εν μέρει στη διαμόρφωση της προσωπικότητάς μου. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Κωνσταντίνο Κορδάτο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της διπλωματικής εργασίας και τις βάσεις που μου έδωσε στα μαθήματα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του πρώτου έτους της σχολής, ως διδάσκοντας ενισχυτικής διδασκαλίας.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένειά μου, που μου προσέφερε ανιδιοτελώς όσα χρειάζομαι για την ολοκλήρωση των σπουδών μου και τη στήριξή της. Από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να λείπουν τα αγαπημένα μου πρόσωπα, φίλοι εντός και εκτός σχολής, οι οποίοι με ενθάρρυναν και με υποστήριζαν, ώστε να ολοκληρώσω επιτυχώς τις σπουδές μου. Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω τον Αριστοτέλη Καμτσικάκη (τον Άρι μου) ο οποίος υπήρξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου φίλος, δάσκαλος, καθηγητής και πηγή έμπνευσης και θάρρους.

Περίληψη

Μέσω της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετάται μια εναλλακτική διεργασία παραγωγής πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS), η οποία χωρίζεται σε δύο μέρη. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει τον ενζυμικό προπολυμερισμό της 1,4-βουτανοδιόλης και του ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα, δύο μονομερών που μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Το δεύτερο μέρος αφορά το μεταπολυμερισμό μάζας των προϊόντων του ενζυμικού προπολυμερισμού με στόχο τη βελτίωση των ιδιοτήτων του τελικού βιοδιασπώμενου πολυμερούς.

Τα ένζυμα, τα οποία εξετάζονται ως προς την καταλυτική τους ικανότητα είναι η εμπορική ακινητοποιημένη λιπάση B του μύκητα *Candida antarctica* (CALB, Novozym 435, N435) και η κουτινάση του μύκητα *Fusarium oxysporum* (FoCut5a), η οποία παρασκευάστηκε στα πλαίσια της εργασίας στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ. Στο επίπεδο του ενζυμικού προπολυμερισμού εξετάζεται η καταλληλότητα δύο διαφορετικών διαλυτών, καθώς και η αντίδραση χωρίς διαλύτη, με τεχνική μάζας. Ακόμη, μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση των αντιδράσεων και τις ιδιότητες των προϊόντων. Στα πλαίσια της μελέτης της διεργασίας μεταπολυμερισμού, εφαρμόζονται δύο διακριτά στάδια και ερευνάται ο κατάλληλος χρόνος διεξαγωγής του κάθε σταδίου.

Ένα από τα μεγέθη που υπολογίζονται για την αξιολόγηση των αντιδράσεων είναι η σταθμική απόδοση των διεργασιών. Τα προϊόντα των αντιδράσεων τόσο του ενζυμικού προπολυμερισμού όσο και του μεταπολυμερισμού αναλύονται με τις μεθόδους Διαφορικής Θερμιδομετρίας Σάρωσης (DSC) και Θερμοβαρυμετρικής Ανάλυσης (TGA), προκειμένου να εντοπιστούν οι θερμικές τους ιδιότητες. Ακόμη, χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία Μαγνητικού Πυρηνικού Συντονισμού (NMR) για την ταυτοποίηση των προϊόντων και τον υπολογισμό του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε ιξωδομετρία διαλύματος για τον προσδιορισμό του μέσου-βάρους μοριακού βάρους των προϊόντων του μεταπολυμερισμού.

Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη εναλλακτικής διεργασίας προπολυμερισμού και μεταπολυμερισμού του αλειφατικού πολυεστέρα PBS μέσω βιοκατάλυσης και τεχνολογιών ήπιων συνθηκών ως προς την θερμοκρασία αντίδρασης. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα (περίπου 150 mg προϊόντος) με απλές μεθόδους και σχετικά πτητικούς διαλύτες, ώστε να εντοπιστούν οι κατάλληλες συνθήκες. Έτσι, κατάφερε, τελικά να παρουσιαστεί μια ολοκληρωμένη μέθοδος παραγωγής καθαρού PBS χαμηλού μοριακού βάρους ($\overline{M}_w \approx 5000$ g/mol), το οποίο είναι βιοδιασπώμενο, μπορεί να παραχθεί από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, είναι βιοδιασπώμενο και δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιοϊατρικές εφαρμογές.

Η χρήση του N435 απέδωσε PBS χαμηλού μοριακού βάρους ($\overline{M}_n \approx 1500 - 3900$ g/mol) με αποδόσεις και θερμικές ιδιότητες, που δεν εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία της αντίδρασης ή το χρησιμοποιούμενο διαλύτη. Η χρήση κουτινάσης οδήγησε στο σχηματισμό διμερών και τριμερών του PBS, ανεξάρτητα από

την ενεργότητα του ενζύμου. Τέλος, ο μεταπολυμερισμός μάζας δύο σταδίων ενός προπολυμερούς του ενζυμικού πολυμερισμού κατάφερε να αυξήσει περίπου κατά 60 % το μέσου-βάρους μοριακό του βάρους (από $\overline{M}_w = 1967 \text{ g/mol}$ σε $\overline{M}_w = 4530 \text{ g/mol}$) και να βελτιώσει τις θερμικές του ιδιότητες.

Λέξεις κλειδιά

Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας), PBS, ενζυμικός πολυμερισμός, μεταπολυμερισμός μάζας, ανανεώσιμες πρώτες ύλες, ήπιες συνθήκες, βιοδιασπασιμότητα, λιπάση B *Candida antarctica*, N435, κουτινάση, *FoCut5a*

Abstract

The main objective of this diploma thesis is to study an alternative process for the production of poly(butylene succinate) (PBS) which is divided in two stages. The first stage involves the enzymatic prepolymerization of 1,4-butanediol and diethyl succinate, two monomers which may be derived from renewable raw materials. The second step concerns the bulk post-polymerization of the products of enzyme prepolymerization in order to improve the properties of the final biodegradable polymer.

The enzymes that are tested for their catalytic activity are a commercially available immobilized lipase B of *Candida antarctica* (CALB, Novozym 435, N435) and the cross-linked cutinase aggregates (CLEAS) of *Fusarium oxysporum* (FoCut5a), which was prepared in the framework of this study at the Laboratory of Biotechnology, NTUA. Regarding the enzyme prepolymerization step, the suitability of two different solvents, as well as the bulk polymerization system are examined. Furthermore, the effect of temperature on the performance of the reactions and the properties of the products are studied. As far as the post-polymerization process is concerned, two thermally distinct stages are applied and the appropriate time of each stage is investigated.

One of the sizes calculated to evaluate the reactions is the mass yield of the process. The reaction products of both enzymatic prepolymerization and post-polymerization are analyzed by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetric Analysis (TGA) to identify their thermal properties. Magnetic Nuclear Resonance (NMR) spectroscopy was also used to identify the products and calculate the number average molecular weight. Finally, solution viscometry was used to determine the weight-average molecular weight of the post-polymerization products.

The purpose of this thesis is to develop an alternative process for the prepolymerization and post-polymerization of the aliphatic polyester PBS by biocatalyzing and mild-temperature conditions. Tests were performed on a small laboratory scale (about 150 mg of product) by simple methods and relatively volatile solvents to identify the appropriate conditions. Thus, it is finally managed to present an integrated method of producing pure low molecular weight PBS ($\overline{M}_w \approx 5000$ g/mol), a biodegradable polymer which can be produced from renewable raw materials and with potential biomedical applications.

The use of N435 led to production of PBS of low molecular weight ($\overline{M}_n \approx 1500 - 3900$ g/mol) with yields and thermal properties not significantly dependent on the reaction temperature or the solvent used. The use of cutinase led to the formation of PBS dimers and trimers, regardless of the activity of the enzyme. Finally, the two-step bulk post-polymerization of an enzymatically produced prepolymer managed to increase its weight-average molecular weight by about 60 % (from $\overline{M}_w = 1967$ g/mol to $\overline{M}_w = 4530$ g/mol) and to improve its thermal properties.

Keywords

Poly(butylene succinate), PBS, enzymatic prepolymerization, mass post-polymerization, renewable raw materials, mild conditions, biodegradability, lipase B *Candida antarctica* N435, cutinase, *FoCut5a*

Περιεχόμενα

Πρόλογος	i
Περίληψη	ii
Abstract	iv
Περιεχόμενα.....	vi
Εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 1. Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS).....	3
1.1 Εισαγωγή στον πολυ(ηλεκτρικό βουτυλεστέρα)	3
1.1.1 Μονομερή	3
1.2 Ιδιότητες του PBS και συμπολυμερή	5
1.2.1 Συμπολυμερή	5
1.2.2 Θερμικές Ιδιότητες.....	6
1.2.3 Μηχανικές Ιδιότητες.....	8
1.2.4 Βιοδιασπασιμότητα.....	9
1.3 Εφαρμογές.....	9
Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι παραγωγής PBS	11
2.1 Συμβατικές μέθοδοι παραγωγής PBS	11
2.1.1 Άμεσος πολυμερισμός ηλεκτρικού οξέος και 1,4-βουτανοδιόλης για τη σύνθεση PBS.....	11
2.1.2 Πολυμερισμός μετεστεροποίησης	12
2.1.3 Πολυσυμπύκνωση που ακολουθείται από επέκταση αλυσίδας για το PBS	12
2.2 Εναλλακτικές μέθοδοι παραγωγής PBS.....	13
2.2.1 Ενζυμικός Πολυμερισμός	13
2.2.2 Άμεση πολυεστεροποίηση υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων	13
2.2.3 Μέθοδοι μεταπολυμερισμού για αύξηση του μοριακού βάρους.....	13
Κεφάλαιο 3. Ενζυμικός Πολυμερισμός	15
3.1 Ενζυμική κατάλυση.....	15
3.2 Ενζυμικός πολυμερισμός και αλειφατικοί πολυεστέρες.....	16
3.2.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ενζυμικής κατάλυσης έναντι ανόργανων χημικών καταλυτών	16
3.2.2 Τύπος ενζύμων για τη σύνθεση πολυεστέρων.....	16
3.2.3 Τύποι αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού.....	17
3.2.4 Παράμετροι ενζυμικού πολυμερισμού	17

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος	19
4.1 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	19
4.2 Ενζυμική σύνθεση PBS	19
4.2.1 Υλικά	19
4.2.2 Όργανα και συσκευές	21
4.2.3 Πειραματική διαδικασία	21
4.2.4 Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου <i>Novozym 435</i>	27
4.2.5 Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου <i>FoCut5a</i>	31
4.3 Μεταπολυμερισμός μάζας προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού	33
4.4 Χαρακτηρισμός προϊόντων	34
4.4.1 Προσδιορισμός θερμικών μεταπτώσεων μέσω DSC	34
4.4.2 Προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας μέσω TGA	37
4.4.3 Ταυτοποίηση προϊόντων και προσδιορισμός μέσου-αριθμού Μοριακού Βάρους μέσω Φασματοσκοπίας NMR	39
4.4.4 Προσδιορισμός μέσου-βάρους μοριακού βάρους με ιξωδομετρία διαλύματος	44
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα και σχολιασμός αποτελεσμάτων	50
5.1 Ενζυμική σύνθεση PBS	50
5.1.1 Αποδόσεις αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού	50
5.1.2 Θερμικές μεταπτώσεις προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού	59
5.1.3 Προσδιορισμός μέσου-αριθμού Μοριακού Βάρους μέσω Φασματομετρίας NMR	70
5.2 Μεταπολυμερισμός μάζας προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού	77
5.2.1 Δοκιμές μεταπολυμερισμού με προεπιλεγμένη μέθοδο	77
5.2.2 1 ^ο στάδιο διεργασίας μεταπολυμερισμού	80
5.2.3 2 ^ο στάδιο διεργασίας μεταπολυμερισμού	82
Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα – Προτάσεις	90
6.1 Συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία	90
6.1.1 Προϊόντα αντιδράσεων με χρήση <i>N435</i>	90
6.1.2 Προϊόντα αντιδράσεων με χρήση <i>FoCut5a</i>	91
6.2 Προτάσεις για τροποποιήσεις επί της πειραματικής διαδικασίας	92
6.3 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	92
Παράρτημα	94
Βιβλιογραφία	102

Εισαγωγή

Αντικείμενο εκτεταμένης επιστημονικής έρευνας της σύγχρονης εποχής είναι ο τρόπος με τον οποίο μπορεί να συμβιβαστεί η αξιοποίηση των διαδεδομένων τεχνολογικών προϊόντων ταυτόχρονα με το μικρότερο δυνατό περιβαλλοντικό κόστος από αυτή τη χρήση. Σε αυτή την κατεύθυνση και η βιομηχανία πολυμερών δέχεται κοινωνικές πιέσεις, ώστε να μετριάσει τις περιβαλλοντικές συνέπειες που έχει η παραγωγή πετροχημικών προϊόντων, στρέφοντας το ενδιαφέρον της στην παραγωγή ανάλογων προϊόντων με αειφόρο χαρακτήρα. Στα πλαίσια της αειφορίας εντάσσονται οι ανανεώσιμες πρώτες ύλες (bio-based polymers) και η βιοδιασπασιμότητα (biodegradable polymers) του προϊόντος [1][2].

Τα προϊόντα που εμφανίζουν αυξημένη ζήτηση είναι αυτά που διαθέτουν χαρακτηριστικά αειφορίας και παράλληλα παρουσιάζουν επιθυμητές ιδιότητες. Τέτοια υλικά είναι οι αλειφατικοί πολυεστέρες, καθώς συνδυάζουν υψηλή βιοδιασπασιμότητα και βιοσυμβατότητα με προηγμένες φυσικές και χημικές ιδιότητες, συγκρίσιμες με εκείνες παραδοσιακών, μη βιοδιασπασίμων υλικών [3].

Ένα από τα εμπορικά διαδεδομένα πολυμερή της κατηγορίας των αλειφατικών πολυεστέρων είναι ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS). Η εκτεταμένη χρήση του στην παραγωγή τελικών προϊόντων, σχετίζεται με το σχετικά χαμηλό κόστος παραγωγής του, τις καλές θερμικές και μηχανικές του ιδιότητες και την ευκολία στην επεξεργασία του. Οι πρώτες ύλες του PBS μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πηγές και το ίδιο είναι ιδιαίτερα βιοδιασπασίμο μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης και βιοσυμβατό. Έτσι, βρίσκει εφαρμογή σε πολλούς τομείς, όπως στη συσκευασία τροφίμων αλλά και σε βιοϊατρικά προϊόντα υψηλής τεχνολογίας [4][5].

Η συμβατική παραγωγή PBS, με τη χρήση χημικών καταλυτών, διαθέτει αρκετά μειονεκτήματα, κάτι το οποίο οδήγησε στην ανάπτυξη «πράσινων τεχνικών» ενζυμικής κατάλυσης. Η ενζυμική πολυεστεροποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί κάτω από ηπιότερες θερμοκρασιακές συνθήκες σε σχέση με τη χημική και η χρήση ενζύμων περιορίζει της παράπλευρες αντιδράσεις, λόγω της υψηλής εκλεκτικότητάς τους, με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων αυξημένης καθαρότητας. Τα προηγούμενα σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα προϊόντα του ενζυμικού πολυμερισμού είναι απαλλαγμένα από υπολείμματα χημικών καταλυτών, συνιστούν το προφίλ προϊόντων υψηλής ποιότητας, τα οποία είναι κατάλληλα για βιοϊατρική χρήση [6][7]. Ο βιοκαταλύτης που έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο ως τώρα στη σύνθεση αλειφατικών πολυεστέρων είναι η ακινητοποιημένη λιπάση B του μύκητα *Candida antarctica*, ενώ πλέον ερευνάται και η δράση μιας άλλης κατηγορίας υδρολασών, των κουτινασών [8].

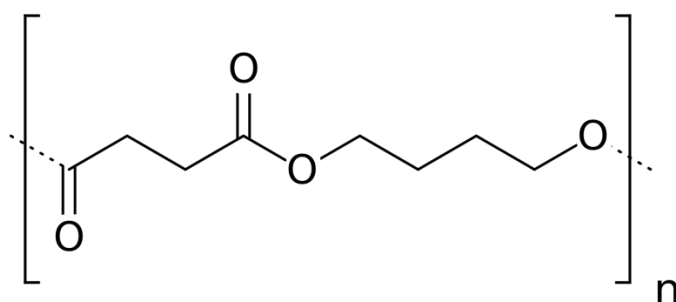
Οι πολυεστέρες, ωστόσο, που προέρχονται από ενζυμικό πολυμερισμό χαρακτηρίζονται, σε γενικές γραμμές, από χαμηλότερα μοριακά βάρη συγκριτικά με τους αντίστοιχους της χημικής κατάλυσης. Έτσι, στην παρούσα εργασία, προτείνεται συνδυα-

σμός ενζυμικού προπολυμερισμού με μεταπολυμερισμό μάζας χαμηλής θερμοκρασίας με στόχο την αναβάθμιση του προϊόντος [6].

Κεφάλαιο 1. Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (PBS)

1.1 Εισαγωγή στον πολυ(ηλεκτρικό βουτυλεστέρα)

Ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene succinate) - PBS) είναι ένας γραμμικός/αλειφατικός και κορεσμένος πολυεστέρας που παράγεται παραδοσιακά μέσω αντιδράσεων πολυσυμπύκνωσης, όπως όλοι οι πολυεστέρες. Οι αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης πραγματοποιούνται ανάμεσα σε διόλες και διοξέα ή παράγωγα διοξέων [9]. Στην περίπτωση του PBS η διόλη είναι η 1,4-βουτανοδιόλη και το διοξύ είναι το ηλεκτρικό οξύ, δηλαδή μονομερή που διαθέτουν το καθένα τέσσερα άτομα άνθρακα στην κύρια αλυσίδα τους και γι' αυτό το PBS μπορεί να αναφέρεται και ως PE 4,4, κατά το γενικό συμβολισμό των πολυεστέρων. Η δομική μονάδα του PBS παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Δομική μονάδα PBS

Το γεγονός ότι η κύρια αλυσίδα της δομικής μονάδας του PBS διαθέτει μόνο κορεσμένους δεσμούς το κατατάσσει στην κατηγορία των θερμοπλαστικών υλικών. Επίσης, η ύπαρξη του εστερικού δεσμού στη δομική του μονάδα, του αποδίδει μεγάλη ποικιλία εφαρμογών και ευελιξία [10]. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του, ωστόσο, είναι η δυνατότητά του να παρασκευάζεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με ήπιες μεθόδους και η αξιοσημείωτη βιοδιασπασιμότητά του. Έτσι, το PBS βρίσκει εφαρμογές σε πολλούς τομείς, αντικαθιστώντας παρωχημένα πολυμερή, όπως το PP και το PET [5].

1.1.1 Μονομερή

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το PBS παράγεται μέσω αντίδρασης πολυσυμπύκνωσης της 1,4-βουτανοδιόλης και του ηλεκτρικού οξέος ή παραγώγων αυτού. Με την έννοια παράγωγα του ηλεκτρικού οξέος, συνήθως, εννοούνται κάποιοι εστέρες του ηλεκτρικού οξέος, όπως ο διμεθυλεστέρας ή ο διαιθυλεστέρας του ηλεκτρικού οξέος. Όσον αφορά την 1,4-βουτανοδιόλη και το ηλεκτρικό οξύ είναι μονομερή τα οποία προέρχονται από ορυκτές αλλά και από ανανεώσιμες πηγές.

I. 1,4-Βουτανοδιόλη (BDO)

Οι συμβατικές εμπορικές διεργασίες για τη σύνθεση της BDO χρησιμοποιούν πετροχημικές πρώτες ύλες. Διάφορες βιομηχανικές διεργασίες αναπτύχθηκαν για τη σύνθεση της BDO με πιο διαδεδομένες τις ακόλουθες [5]:

- Η διεργασία *Reppre*, χρησιμοποιώντας ακετυλένιο και φορμαλδεΰδη (BASF, ISP, DuPont κ.ά.)
- Η τεχνολογία ακετοξυλίωσης *Mitsubishi* του 1,3-βουταδιενίου, από την οποία παράγεται και τετραϋδροφουράνιο (THF)
- Η μέθοδος *Lyondell Basell*, η οποία βασίζεται στο προπυλενοξείδιο (propylene oxide)
- Η τεχνολογία *Davy Process*, η οποία παράγει BDO με πρώτη ύλη μηλεϊνικό ανυδρίτη, ο οποίος συνήθως παράγεται με την οξείδωση του βουτανίου ή του βενζολίου.

Αυτό, όμως, που έχει ενδιαφέρον είναι μια εναλλακτική μέθοδος παραγωγής της 1,4-βουτανοδιόλης, η οποία έχει περιγραφεί από τους Smith, Cooper και Vigon [11] και περιλαμβάνει τρία στάδια. Η γλυκόζη που παράγεται από σιτάρι ζυμώνεται σε ηλεκτρικό οξύ, το οποίο, στη συνέχεια, καθαρίζεται με ηλεκτροδιάλυση και τέλος το καθαρό ηλεκτρικό οξύ υποβαθμίζεται καταλυτικά σε BDO. Επίσης, έχει πραγματοποιηθεί, πλέον, η άμεση ζύμωση της BDO από τη ζάχαρη, μέσω ενός γενετικά τροποποιημένου βακτηρίου (που τροποποιείται από την Genomatica), *E. Coli*, το οποίο μεταβολίζει τη ζάχαρη σε BDO [5].

II. Ηλεκτρικό οξύ

Το ηλεκτρικό οξύ αποτελεί μια σημαντική χημική πλατφόρμα, που προέρχεται από πετροχημικές ή ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Απαντά σε πολλά φυτικά είδη, στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά αλλά και στο ήλεκτρο (κεχριμπάρι) από όπου πήρε και το όνομά του. Η βιομηχανική παραγωγή ηλεκτρικού οξέος μέσω πετροχημικών οδών περιλαμβάνει τις εξής διεργασίες:

- την οξείδωση των παραφινών, η οποία σχηματίζει ένα μίγμα διαφορετικών καρβοξυλικών οξέων, ακολουθούμενη από διαχωρισμό του ηλεκτρικού οξέος
- την καταλυτική υδρογόνωση του μηλεϊνικού οξέος ή trans-μηλεϊνικού οξέος
- την ηλεκτροχημική σύνθεση από ανυδρίτη μηλεϊνικού οξέος σε διπολική μεμβράνη ή μη μεμβρανικό κύτταρο
- την καταλυόμενη παραγωγή από ακετυλένιο, μονοξείδιο του άνθρακα και νερό

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος από τις παραπάνω είναι η ηλεκτροχημική σύνθεση, λόγω των πλεονεκτημάτων που διαθέτει, όπως την υψηλή απόδοση, το χαμηλό κόστος, την υψηλή καθαρότητα του τελικού προϊόντος και το χαμηλό ή καθόλου σχηματισμό αποβλήτων. Έτσι, το ηλεκτρικό οξύ που παράγεται από την ηλεκτροχημική διεργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα.

Το ηλεκτρικό οξύ μπορεί, επίσης, να ληφθεί από μικροβιακή ζύμωση σε ανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως γλυκόζη, άμυλο και ξυλόζη. Τέτοιες μέθοδοι έχουν προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες, εφόσον μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της εξάρτησης από τους ορυκτούς πόρους και της τιμής του προϊόντος. Το

ηλεκτρικό οξύ είναι ένα από τα ενδιάμεσα προϊόντα στο μεταβολικό μονοπάτι των αναερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Διάφοροι μικροοργανισμοί, έχει αναφερθεί, ότι παράγουν ηλεκτρικό οξύ, όπως τυπικά γαστρεντερικά βακτηρίδια, βακτηρίδια αιλουροειδών και κάποια στελέχη λακτοβακίλλου. Μεταξύ αυτών, το *Actinobacillus succinogenes*, το *Anaerobiospirillum succiniciproducens* και τα *Mannheimia succiniciproducens* είναι τα πλέον πολλά υποσχόμενα στελέχη για να παράγουν ηλεκτρικό οξύ σε υψηλές αποδόσεις. Επιπρόσθετα, έχει εισαχθεί μια νέα ιδέα βιολογικής επεξεργασίας που χρησιμοποιεί δημητριακά (π.χ. σιτάρι, καλαμπόκι) ως πρώτη ύλη για την παραγωγή μικροβιακού ηλεκτρικού άλατος. Η βιομηχανική εφαρμογή τέτοιων μεθόδων έχει ήδη ξεκινήσει [12]. Αναμένεται ότι η νέα διαδρομή με βάση τη βιοτεχνολογία θα μπορούσε να οδηγήσει σε 40 % μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων σε σύγκριση με την παραδοσιακή χημική μέθοδο και θα μπορούσε να έχει θετικό αντίκτυπο στη μείωση των εκπομπών CO₂, το οποίο χρησιμοποιείται στη διαδικασία ζύμωσης [12].

Φαίνεται, λοιπόν, πως και τα δύο μονομερή για την παραγωγή του PBS μπορεί να προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες.

1.2 Ιδιότητες του PBS και συμπολυμερή

1.2.1 Συμπολυμερή

Οι ιδιότητες και η βιοδιασπασιμότητα του PBS μπορούν να ρυθμιστούν σε κατάλληλα επίπεδα με τη δημιουργία συμπολυμερών [13]. Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με την παραγωγή συμπολυμερών του PBS, αποσκοπώντας στην τροποποίηση των μηχανικών του ιδιοτήτων, του βαθμού κρυσταλλικότητας και τη βελτίωση της βιοαποικοδομησιμότητάς του. Για παράδειγμα, ο συμπολυμερισμός του PBS με το τερεφθαλικό οξύ οδηγεί σε συμπολυμερή του PBS με βελτιωμένες θερμικές και μηχανικές ιδιότητες και ελεγχόμενη βιοαποικοδόμηση [12][17][18]. Στον Πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένα χαρακτηριστικά συμπολυμερή του PBS.

Η μελέτη του συμπολυμερούς του PBS με το αδιπικό οξύ, PBSA, έχει προσελκύσει μεγάλο μερίδιο του ενδιαφέροντος, καθώς οι μηχανικές του ιδιότητες προσομοιάζουν αυτές των πολυολεφινών. Χαρακτηριστικό είναι το παράδειγμα των Nicolie et al. [14] που προχώρησαν στη σύνθεση του συμπολυμερούς με τη γνωστή διαδικασία της εστεροποίησης και πολυσυμπύκνωσης παρουσία καταλύτη Ti(OBu)₄, όπως στα ομοπολυμερή του PBS. Το αρχικό αντιδρόν μίγμα περιλαμβάνει εκτός από την 1,4-βουτανοδιόλη, το ηλεκτρικό οξύ και τον καταλύτη και το αδιπικό οξύ. Το μέσο μοριακό βάρος των τελικών συμπολυμερών κυμαινόταν από 12000-26000 g/mol, ενώ ο δείκτης πολυδιασποράς κυμαινόταν από 2,3-3,4. Ως εκ τούτου, η χρήση του καταλύτη Ti(OBu)₄ αποδείχθηκε σωστή επιλογή, καθώς πρόκειται για ένα μη τοξικό καταλύτη (ικανή και αναγκαία συνθήκη για την παραγωγή των βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών) και μπορεί να παραληφθεί η χρήση θερμικού σταθεροποιητή. Τα συμπολυμερή PBSA με το χαμηλότερο σημείο τήξης και μεγαλύτερη ενθαλπία τήξης επιδεικνύουν καλύτερη βιοαποικοδόμηση, αφού η πολυμερική αλυσίδα είναι περισσότερο

ευέλικτη, με αποτέλεσμα το ένζυμο να έχει ευκολότερη πρόσβαση κατά την ενζυμική υδρολυτική διάσπαση [14].

Πίνακας 1. Ορισμένα από τα συνήθη συμπολυμερή του PBS και η εταιρία παραγωγής

Manufacturer	Product	Monomers	Production capacity (ton/year)
Hexing Chemical, China	PBS and its copolymers	Succinic acid, butanediol, branched alkanedicarboxylic acid	10,000
Xinfu Pharmaceutical, China	PBS, PBSA	Succinic acid, adipic acid, butanediol	3,000
Jinfa Tech, China	PBSA	Succinic acid, adipic acid, butanediol	300
BASF, Germany	Ecoflex	Adipic acid, terephthalic acid, butanediol	14,000
Eastmann, USA	East Bio	Adipic acid, terephthalic acid, butanediol	15,000
Showa, Japan	Bionolle	Succinic acid, adipic acid, butanediol	5,000
Mitsubishi Chemical, Japan	GS Pla	Succinic acid, lactic acid, butanediol	3,000
Mitsubishi Gas Chemicals, Japan	Iupec	Succinate, carbonate, butanediol	
Nippon Shokubai, Japan	Lunare	Succinic acid, adipic acid, ethylene glycol	
Ube, Japan	ETERNACOLL 3050	Decanedicarboxylic acid, ethylene glycol	
Ire Chemical, Korea	Enpol	Succinic acid, adipic acid, terephthalic acid, butanediol	
SK Chemicals, Korea	Skygreen	Succinic acid, adipic acid, butanediol, ethylene glycol	

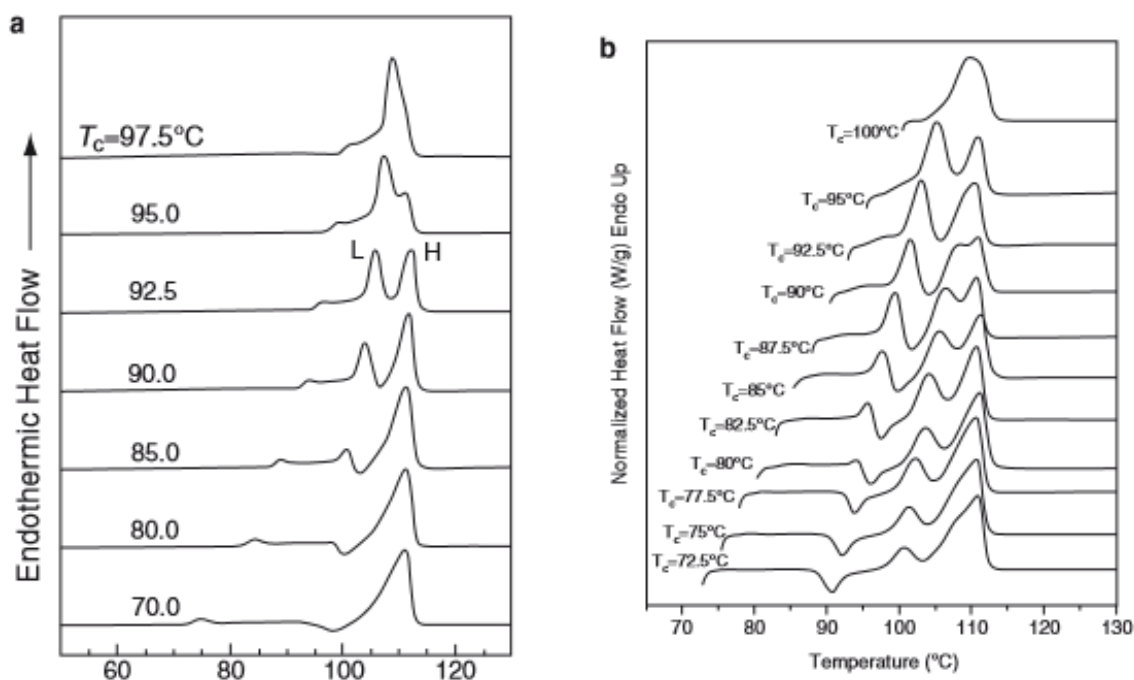
PBSA poly(butylene succinate-co-butylene adipate)

1.2.2 Θερμικές Ιδιότητες

Η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, το σημείο τήξης, η θερμοκρασία θερμικής παραμόρφωσης, η θερμοκρασία θερμοκή αμοιόδομησης κ.λπ. είναι σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν την εφαρμογή και επεξεργασία ημικρυσταλλικών πολυμερικών υλικών. Οι τιμές αυτών των θερμικών ιδιοτήτων μπορούν να ληφθούν μέσω αναλυτικών μεθόδων, όπως η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC), η δυναμική μηχανική ανάλυση (DMA) και η θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA).

Το PBS είναι ένα ημικρυσταλλικό πολυμερές που έχει κορυφή τήξης περίπου στους 112-116 °C. Η θερμοκρασία τήξης εξαρτάται από παράγοντες, όπως το μοριακό βάρος και το θερμικό ιστορικό της προετοιμασίας του δείγματος (π.χ. τις συνθήκες ξήρανσης και τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης) [16]. Ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) παρουσιάζει πολλαπλές κορυφές τήξης, φαινόμενο πολύ συνηθισμένο στα ημικρυσταλλικά πολυμερή (π.χ. PET) είτε αυτά κρυσταλλώνονται ισοθερμοκρασιακά

είτε μη ισοθερμοκρασιακά. Η ύπαρξη πολλαπλών ενδόθερμων κορυφών τήξης αποδίδεται είτε σε μια πιθανή ανακρυστάλλωση κατά τη διάρκεια της θέρμανσης του δείγματος είτε στην ύπαρξη διαφορετικής ποιότητας κρυστάλλων με διαφορετική θερμική σταθερότητα [17][18]. Στο Σχήμα 2 απεικονίζονται καμπύλες τήξης που έχουν προέλθει από DSC για δύο δείγματα PBS με διαφορετικό μοριακό βάρος που έχουν κρυσταλλωθεί ισοθερμοκρασιακά σε διάφορες θερμοκρασίες. Όπως παρατηρείται, το PBS με χαμηλό μοριακό βάρος (b) παρουσιάζει πολλαπλές κορυφές τήξης σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών από εκείνο με υψηλότερο μοριακό βάρος (a), λόγω του ότι μπορεί να αναδιοργανώνεται πιο εύκολα [12][13].



Σχήμα 2. Καμπύλες θέρμανσης μέσω DSC διαφορετικών δειγμάτων PBS που έχουν κρυσταλλωθεί σε διαφορετικές θερμοκρασίες (a) $M_w = 25 \cdot 10^5$ (b) $M_w = 6800$ g/mol [16]

Το PBS βρίσκεται ανάμεσα στους πολυ(αλκυλενο δικαρβοξυλικούς εστέρες) με σημεία τήξης που υπερβαίνουν τους 100 °C, κρίσιμο χαρακτηριστικό για εφαρμογές σε υψηλό θερμοκρασιακό εύρος. Το σημείο τήξης του, όπως αναφέρθηκε, τοποθετείται περίπου στους 112-116 °C. Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολυεστέρες με υψηλότερα σημεία τήξης (π.χ. πολυ(οξαλικός αιθυλεστέρας) – 177 °C), προσελκύουν λιγότερο ενδιαφέρον, λόγω της χαμηλής θερμικής σταθερότητάς τους.

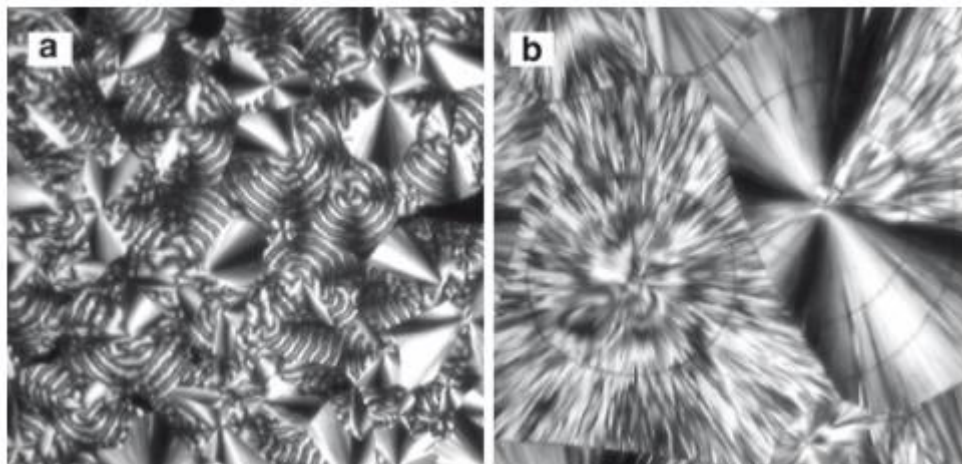
Στον Πίνακα 2 παρατίθενται για λόγους σύγκρισης τα σημεία τήξης και υαλώδους μετάπτωσης για το PBS και το συμπολυμερές του PBSA (poly(butylene succinate-co-butylene adipate)), το PLA και κάποια συμβατικά πολυμερή. Χαρακτηριστικό είναι το αρκετά χαμηλότερο σημείο T_g του PBS και του συμπολυμερούς του PBSA, έναντι του PLA, κάτι που το διακρίνει για πολλές εφαρμογές [5].

Πίνακας 2. Σημείο τήξης και σημείο υαλώδους μετάπτωσης για το PBS και το συμπολυμερές του PBSA (poly(butylene succinate-co-butylene adipate)), το PLA και κάποια συμβατικά πολυμερή [5]

	PBS	PBSA	PLA	PP	HDPE	LDPE
T_g (°C)	-32	-45	55	-5	-120	-120
T_m (°C)	114	96	170-180	163	129	110

1.2.3 Μηχανικές Ιδιότητες

Το PBS είναι ένας ημικρυσταλλικός πολυεστέρας. Οι μηχανικές του ιδιότητες, όπως είναι π.χ. η αντοχή σε εφελκυσμό, η αντοχή σε κρούση, η ελαστικότητα, καθώς επίσης η διαπερατότητα και η βιοαποικοδομησιμότητά του είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τις κρυσταλλικές δομές του πολυεστέρα και με το βαθμό κρυσταλλικότητας [12]. Ο μηχανισμός κρυστάλλωσης του PBS είναι παρόμοιος με αυτόν του πολυαιθυλενίου. Όταν το PBS κρυσταλλώνεται από τήγμα σχηματίζει σφαιρουλίτες (Σχήμα 3). Το μέγεθος και η μορφολογία των σφαιρουλιτών επηρεάζονται πρωτίστως από τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης. Οι σφαιρουλίτες αναπτύσσονται ακτινωτά από το κέντρο προς τα έξω, σχηματίζοντας τελικώς το χαρακτηριστικό σχήμα του σταυρού της Μάλτας. Η ανάλυση των φιλμ του PBS με τη βοήθεια μικροσκοπίου ατομικής δύναμης, αποκαλύπτει σφαιρουλίτες με ακτινική ανάπτυξη, οι οποίοι επεκτείνονται και σχηματίζουν διακλαδώσεις, καλύπτοντας όλο το χώρο που έχουν στη διάθεσή τους σε ζώνες.



Σχήμα 3. Λήψεις με πολωτικό οπτικό μικροσκόπιο μορίων PBS που έχει κρυσταλλωθεί στους a) 70 °C και b) 90 °C [12]

Στον Πίνακα 3 παρατίθενται για λόγους σύγκρισης μηχανικές ιδιότητες για το PBS και το συμπολυμερές του PBSA (poly(butylene succinate-co-butylene adipate)), το PLA και κάποια συμβατικά πολυμερή. Είναι χαρακτηριστικό το πλεονέκτημα του PBS καθώς και του συμπολυμερούς του PBSA στις περισσότερες από τις καταγραφόμενες ιδιότητες [5].

Πίνακας 3. Μηχανικές ιδιότητες για το PBS και το συμπολυμερές του PBSA (poly(butylene succinate-co-butylene adipate)), το PLA και κάποια συμβατικά πολυμερή [5]

	PBS	PBSA	PLA	PP	HDPE	LDPE
Αντοχή σε εφελκυσμό (MPa)	34	19	66	33	28	10
Επιμήκυνση πριν το σπάσιμο (%)	560	807	4	415	700	300
Αντοχή κρούσης Izod (J/m)	300	>400	29	20	40	>400
Βαθμός κρυσταλλικότητας (%)	35-45	20-30		56	69	49

Κάποιες μηχανικές ιδιότητες του PBS εξαρτώνται σημαντικά από το μοριακό του βάρος, όπως το ποσοστό επιμήκυνσης, ενώ άλλες όχι τόσο. Κάποιες ενδεικτικές τιμές δίνονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Μηχανικές ιδιότητες δειγμάτων PBS με διαφορετικά μοριακά βάρη

M_n (g/mol)	Όριο διαρροής (MPa)	Μέγιστη τάση εφελκυσμού (MPa)	Επιμήκυνση (%)
79.000	18,8	37,6	355
57.000	18,1	35,7	221
40.600	18,6	35	167
32.500	18,2	34	25,2

1.2.4 Βιοδιασπασιμότητα

Σε σύγκριση με τα συμβατικά μη βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά, τα περιβαλλοντικά αποικοδομήσιμα πλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του PBS και των συμπολυμερών του, είναι ευνοϊκά για απόρριψη στο περιβάλλον, αφού μπορούν να αποδομηθούν σε CO₂ και νερό μέσω φυσικών αποικοδομητικών ενζύμων των μικροοργανισμών. Κατά συνέπεια, αυτά τα βιοαποικοδομήσιμα πλαστικά αποκτούν όλο και περισσότερη ζήτηση και ανάπτυξη σε ευρείες εφαρμογές, π.χ. ως φιλμ ή αντικείμενα μιας χρήσης. Η αποικοδόμηση του PBS μπορεί να χωριστεί σε υδρολυτική αποικοδομήσιμη, ενζυμική αποικοδόμηση και βιοδιάσπαση σε περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η ταφή, η ενεργοποιημένη ιλύς και το κομπόστ [12]. Ο ρυθμός βιοαποικοδόμησης των συμπολυμερών του PBS ποικίλλει ανάλογα με τη χημική δομή, το βαθμό κρυσταλλικότητας, το μέγεθος του δείγματος και το περιβάλλον βιοαποικοδόμησης [5].

1.3 Εφαρμογές

Το PBS διατίθεται κυρίως από την ιαπωνική εταιρεία, Showa Highpolymer, θυγατρική της Showa Denko και πρωτοπόρο στην παραγωγή του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) και του συμπολυμερούς του με το αδιπικό οξύ (PBSA) υπό την εμπορική ονομασία BionolleTM (σειρά 1000 και 3000, αντίστοιχα). Οι εναλλακτικές φιλικές προς το περιβάλλον λύσεις που δίνει σε σχέση με άλλα πολυμερή, όπως η βιοαποικοδομησιμότητά του το καθιστούν σημαντική αντιπρόταση και επίκεντρο έρευνας. Σε σύ-

γκριση με άλλους αλειφατικούς πολυεστέρες, όπως είναι π.χ. ο πολυ(ηλεκτρικός αιθυλεστέρας), ο πολυ(αδιπικός αιθυλεστέρας) και ο πολυ(αδιπικός βουτυλεστέρας) (PBA), το PBS έχει μεγαλύτερο σημείο τήξης, μεγαλύτερη αντοχή σε εφελκυσμό και μεγαλύτερη σκληρότητα. Κάποιες ποιότητες του Bionolle™ τροποποιούνται με επιμήκυνση αλυσίδας με δισοκυανικούς εστέρες, προς βελτίωση των θερμικών ιδιοτήτων και της σκληρότητας [2].

Η βιοαποικοδομησιμότητα του PBS το καθιστά κατάλληλο για χρήση στον αγροτικό τομέα. Η ενίσχυσή του με πληρωτικά υλικά αμυλούχας βάσης μειώνουν την κρυσταλλικότητά του και αυξάνουν την αποικοδομησιμότητά του. Σαν πληρωτικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί τα άλευρα από το φλοιό του ρυζιού (rice-husk flour, RHF), τα οποία αποτελούν παραπροϊόν της βιομηχανίας παραγωγής ρυζιού και δεν μπορούν να αξιοποιηθούν περαιτέρω και άλευρα από ξύλο [19].

Μια πολύ κοινή χρήση του PBS είναι η παραγωγή ειδικών πλαστικών μεμβρανών (mulching films) [20], οι οποίες προστατεύουν τις καλλιέργειες από τα διάφορα ζιζάνια και παράλληλα βοηθούν στη διατήρηση της υγρασίας και της θερμοκρασίας του εδάφους σε επιθυμητά για τις εκάστοτε καλλιέργειες επίπεδα. Για τέτοια προϊόντα χρησιμοποιείται κυρίως ως πρώτη ύλη το πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας (LDPE). Ωστόσο, το συμπολυμερές του PBS με το αδιπικό οξύ έχει ιδιότητες παρεμφερείς με το LDPE και μπορεί να το αντικαταστήσει, διαθέτοντας επιπλέον το πλεονέκτημα της εύκολης αποδόμησής του υπό την επίδραση της ακτινοβολίας. Οι μεμβράνες προστασίας των καλλιεργειών από PBS δε χρειάζεται να απομακρυνθούν από τις καλλιέργειες πριν αποδομηθούν, καθώς δεν είναι επιβλαβείς για το οικοσύστημα. Με παρόμοιο τρόπο προωθείται η διάδοση του PBS και στον τομέα της πλαστικής συσκευασίας και ειδών περιορισμένης χρήσης, ενός τομέα που αντιμετωπίζει πρόβλημα στην ανακύκλωση των πρώτων υλών. Στο εμπόριο, ήδη, παρασκευάζονται κομποστοποιήσιμες τσάντες με πρώτη ύλη μίγματα του PBS με άμυλο. Αυτή η συνταγή παραγωγής πέρα από αυξημένους ρυθμούς αποικοδόμησης προσφέρει και μειωμένο κόστος παραγωγής. Ακόμη, τα μίγματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκβολή φυσητού φιλμ [12][19].

Το PBS που παράγεται με την τεχνική που περιγράφεται σε αυτή την εργασία, όπως θα διαπιστωθεί και στη συνέχεια, διαθέτει χαμηλό μοριακό βάρος, το οποίο φτάνει το πολύ τα $\overline{M}_w = 5000$ g/mol. Όμως, λόγω της χρήσης ενζυμικού αντί για χημικού τοξικού καταλύτη και σχετικά πτητικών διαλυτών είναι ένα αρκετά καθαρό προϊόν. Άρα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στη βιοϊατρική, τη φαρμακολογία και τη μεταφορά φαρμάκων (drug delivery), όπως το PLA σε μορφή μικροσφαιρών για τη μεταφορά πρωτεϊνών [21]. Ως βιοϋλικό θα μπορούσε να εξεταστεί σε εφαρμογές για σύνθεση ιατρικών ικριωμάτων, που θα αντιστέκονται στη μικροβιακή μόλυνση έχοντας ως βάση το πολυμερές [22]. Καταλυτικό ρόλο στις εφαρμογές της βιοϊατρικής παίζει η βιοαποικοδομησιμότητα του PBS.

Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι παραγωγής PBS

2.1 Συμβατικές μέθοδοι παραγωγής PBS

2.1.1 Άμεσος πολυμερισμός ηλεκτρικού οξέος και 1,4-βουτανοδιόλης για τη σύνθεση PBS

Ο άμεσος πολυμερισμός για την παραγωγή PBS είναι στην ουσία μια αντίδραση πολυσυμπύκνωσης που βασίζεται στη στοιχειομετρική αναλογία της διόλης και του διοξέος και πραγματοποιείται παρουσία καταλύτη. Μιλώντας για συμβατικές μεθόδους και βιομηχανικές εφαρμογές, πρόκειται για χημικό καταλύτη. Ο άμεσος πολυμερισμός μπορεί να διεξαχθεί απευθείας με δύο τρόπους:

- με πολυμερισμό τήγματος μεταξύ ηλεκτρικού οξέος και βουτανοδιόλης και
- με πολυμερισμό διαλύματος με τα ίδια αντιδρώντα και χρήση διαλύτη.

Και οι δύο μέθοδοι έχουν εξεταστεί εντατικά τα τελευταία χρόνια, μελετώντας την αποτελεσματικότητα διαφορετικών θερμοκρασιών και καταλυτών.

I. Πολυμερισμός τήγματος

Ο άμεσος πολυμερισμός τήγματος είναι απλός και οδηγεί, γενικά, σε PBS υψηλότερου μοριακού βάρους και μεγαλύτερης καθαρότητας σε σχέση με τον πολυμερισμό διαλύματος, ενώ δεν απαιτείται και επιπλέον επεξεργασία για την απομάκρυνση του διαλύτη μετά την αντίδραση. Ο άμεσος πολυμερισμός τήγματος θεωρείται η πλέον υποσχόμενη διαδικασία παραγωγής PBS λόγω των οικονομικών παραμέτρων και των πιθανών εφαρμογών σε συσκευασίες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα [12]. Στον άμεσο πολυμερισμό τήγματος, το PBS παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας μια διεργασία δύο σταδίων:

a. Εστεροποίηση

Στο πρώτο στάδιο, η εστεροποίηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία που κυμαίνεται από 150 έως 200 °C υπό ατμοσφαιρική πίεση ή σε χαμηλό κενό.

b. Πολυσυμπύκνωση

Στο δεύτερο στάδιο, ακολουθεί πολυσυμπύκνωση κάτω από υψηλό κενό σε υψηλότερη θερμοκρασία, π.χ., 220-240 °C. Για να αποφευχθεί η οξείδωση, η εστεροποίηση και η πολυσυμπύκνωση θα πρέπει να διεξάγονται σε ατμόσφαιρα αζώτου.

II. Πολυμερισμός διαλύματος

Με τον πολυμερισμό διαλύματος απαιτείται η χρήση διαλύτη, στον οποίο τα μονομερή πρέπει να διαλύονται, όπως και το σχηματιζόμενο πολυμερές. Τέτοιοι διαλύτες είναι το ξυλόλιο και το δεκαϋδρόναφθαλένιο. Η αντίδραση εστεροποίησης και η αντίδραση συμπύκνωσης στον διαλύτη ενισχύουν τα φαινόμενα μεταφοράς στο σύστημα, έτσι ώστε η αντίδραση μπορεί να διεξαχθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία, η

οποία μπορεί να αποφύγει την οξειδωση του PBS, αλλά με το κόστος ενός μεγαλύτερου χρόνου αντίδρασης [12].

Έχουν εξεταστεί διάφοροι καταλύτες και είναι γενικά αποδεκτό ότι οι ενώσεις του αντιμονίου, του κασσίτερου και του τιτανίου είναι οι πιο δραστικοί καταλύτες για πολυσυμπύκνωση. Μεταξύ αυτών των καταλυτών χρησιμοποιούνται συνήθως, οι SnCl_2 , $\text{Ti}(\text{OiPr})_4$, $\text{Ti}(\text{OBu})_4$, $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, $\text{Zr}(\text{Ac})_2$ και π-τολουολοσουλφονικό άλας. Το SnCl_2 έδειξε το πιο ελπιδοφόρο αποτέλεσμα, καθώς παρατηρήθηκε PBS με το υψηλότερο M_w των 79.000 g/mol μετά από αντίδραση για 12 ώρες. Την αύξηση του μοριακού βάρους ενισχύει η χρήση μοριακών κοσκίνων 4Å [5], [12].

2.1.2 Πολυμερισμός μετεστεροποίησης

Ο πολυμερισμός μετεστεροποίησης είναι μια έμμεση τεχνολογία για τη σύνθεση του PBS. Σε αυτή τη μέθοδο πολυμερισμού το PBS συντίθεται ξεκινώντας από στοιχειομετρικές αναλογίες κάποιου ηλεκτρικού εστέρα και της 1,4-βουτανοδιόλης ή χρησιμοποιώντας περίσσεια 1,4-βουτανοδιόλης όχι μεγαλύτερη από 10 %, παρουσία καταλύτη. Η συνθετική διαδικασία μπορεί να διαχωριστεί σε δύο στάδια, αυτό της μετεστεροποίησης και στη συνέχεια, της πολυσυμπύκνωσης. Πριν από την αντίδραση, ο αντιδραστήρας πληρώνεται με άζωτο σε θερμοκρασία δωματίου για να απομακρυνθεί ο αέρας και να αποφευχθεί η οξειδωση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης μετεστεροποίησης. Κατόπιν, το σύστημα της αντίδρασης θερμαίνεται για να ξεκινήσει η μετεστεροποίηση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία κυμαινόμενη από 150 έως 190 °C στην ατμόσφαιρα αζώτου. Απαιτείται η απομάκρυνση του παραπροϊόντος, δηλαδή της παραγόμενης αλκοόλης. Ακολουθεί η πολυσυμπύκνωση υπό κενό σε υψηλότερη θερμοκρασία, π.χ. 200 °C, για να πολυμεριστούν τα oligομερή. Μέσω πολυμερισμού μετεστεροποίησης, μπορούν να συντεθούν PBS με M_n ίσο με 59.500 g/mol και M_w ίσο με 104.100 g/mol [12].

Οι Jacquel et al. [23] μελέτησαν την δραστικότητα οργανομεταλλικών (Ti, Zr, Sn, Hf, και Bi) καταλυτών καθώς και μεταλλικών οξειδίων του γερμανίου και αντιμονίου, στην κατάλυση της αντίδρασης μετεστεροποίησης του PBS. Η σειρά δραστικότητας των καταλυτών που βρέθηκε είναι η ακόλουθη: $\text{Ti} \gg \text{Zr} \sim \text{Sn} > \text{Hf} > \text{Sb} > \text{Bi}$. Ακόμα εξετάστηκε η επίδραση των μεταλλικών οξειδίων του αντιμονίου και του γερμανίου, όμως τα αποτελέσματα δεν ήταν το ίδιο ικανοποιητικά.

2.1.3 Πολυσυμπύκνωση που ακολουθείται από επέκταση αλυσίδας για το PBS

Πρόκειται για μια μέθοδο, που έρχεται να προσθέσει ένα στάδιο στη μέθοδο του άμεσου πολυμερισμού συμπύκνωσης. Κατά το στάδιο αυτό, ένας επιμηκντής αλυσίδας (chain extender) με δύο λειτουργικές ομάδες προστίθεται στο αντιδρών σύστημα, ώστε να αντιδράσει με τις ακραίες ομάδες -OH και -COOH του PBS. Στην ιδανική περίπτωση, ο επιμηκντής θα ενωθεί με δύο αλυσίδες PBS. Η διαδικασία επέκτασης της αλυσίδας είναι μία ήδη αναπτυγμένη μεθοδολογία παραγωγής, που λαμβάνει χώρα για περαιτέρω βελτιστοποίηση του μοριακού βάρους του PBS. Μία ποικιλία από επεκτατικά τμήματα διερευνώνται εδώ και αρκετά χρόνια για τη βελτίωση του μορια-

κού βάρους του PBS. Ένας αντίστοιχος επιμηκυντής αλυσίδας εκτιμάται ότι είναι και το Bisoxazoline με δράση στους 180°C-240°C [12].

2.2 Εναλλακτικές μέθοδοι παραγωγής PBS

2.2.1 Ενζυμικός Πολυμερισμός

Η καταλυόμενη σύνθεση του PBS και άλλων πολυεστέρων από ένζυμα, είναι μια σχετικά πρόσφατα ανεπτυγμένη μέθοδος, η οποία παρουσιάζει ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά, όπως την ανανεωσιμότητα του καταλύτη, τη διεξαγωγή της αντίδρασης σε ήπιες συνθήκες και την υψηλή εκλεκτικότητα του βιοκαταλύτη. Η χρήση ενζύμων αντί χημικών καταλυτών αποτελεί ένα ακόμη άνοιγμα της τεχνολογίας στην «πράσινη» παραγωγή βιοπολυμερών [23]. Η μέθοδος παραγωγής PBS που μελετάται στην παρούσα εργασία βασίζεται στον ενζυμικό πολυμερισμό, οπότε αυτό το θέμα θα αναλυθεί στο επόμενο κεφάλαιο.

2.2.2 Άμεση πολυεστεροποίηση υπό την ακτινοβολία μικροκυμάτων

Η επίδραση μικροκυμάτων για την αντίδραση άμεσης εστεροποίησης ενός δικαρβοξυλικού οξέος και μίας διόλης με χρήση καταλύτη δικασσιτερονοξάνιο είναι μια ακόμη μέθοδος που παρουσιάζει ενδιαφέρον. Πρόκειται για μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο σύνθεσης PBS, που σε συγκεκριμένη έρευνα οδήγησε σε απόδοση 81,3 % και M_w ίσο με 23.500 g/mol. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε ατμόσφαιρα αζώτου με μέγιστη ισχύ μικροκυμάτων τα 200 W [24].

2.2.3 Μέθοδοι μεταπολυμερισμού για αύξηση του μοριακού βάρους

I. Μεταπολυμερισμός στερεάς κατάστασης (SSP)

Τα προϊόντα των συμβατικών τεχνικών πολυμερισμού είναι, συνήθως, πολυεστέρες χαμηλού ή μέτριου μοριακού βάρους. Αυτό προκύπτει από διάφορους παράγοντες που ανακύπτουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, όπως είναι η αύξηση του ιξώδους με αποτέλεσμα τη δυσκολία ανάδευσης και επαφής των oligομερών και η αυξημένη θερμοκρασία του συστήματος, που οδηγεί σε παράπλευρες αντιδράσεις. Η αύξηση του μοριακού βάρους μπορεί να επιτευχθεί μέσω του πολυμερισμού στερεάς κατάστασης (Solid State Polymerization-SSP) σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης και μικρότερες από τη θερμοκρασία έναρξης της τήξης του υλικού. Η πολυσυμπύκνωση εξελίσσεται μέσω της αντίδρασης μεταξύ των άκρων των αλυσίδων στην άμορφη φάση του ημικρυσταλλικού πολυμερούς. Τα παραπροϊόντα της αντίδρασης απομακρύνονται με εφαρμογή κενού ή συμπαρασύρονται από κάποιο διερχόμενο αδρανές αέριο.

Τα πλεονεκτήματα του εμφανίζει ο SSP είναι το χαμηλό κόστος εξοπλισμού, η χαμηλές θερμοκρασίες όπου διεξάγεται με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι παράπλευρες αντιδράσεις και η θερμική αποικοδόμηση του προϊόντος και το γεγονός ότι αποτελεί μια απλή και φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία. Ωστόσο, υστερεί στο ρυθμό της αντίδρασης σε σύγκριση με τον πολυμερισμό τήγματος και ενδέχεται να προκύπτουν

προβλήματα επεξεργασίας των στερεών σωματιδίων που οφείλονται στη σύντηξη και χρίζουν αντιμετώπισης [25].

II. Μεταπολυμερισμός τήγματος

Ο πολυμερισμός συμπύκνωσης με τεχνική μάζας μπορεί να εφαρμοστεί και για την αύξηση του βάρους του προπολυμερούς που έχει προέλθει από κάποια μέθοδο προπολυμερισμού. Σε αυτή την περίπτωση, συνήθως, ο πολυμερισμός συνεχίζεται σε μεγαλύτερη θερμοκρασία από τον προπολυμερισμό, καθώς έχει αυξηθεί και το σημείο τήξης του αρχικού υλικού και δε συμμετέχει καταλύτης.

Στην παρούσα εργασία έχει εφαρμοστεί μέθοδος μεταπολυμερισμού, με τεχνική μάζας και χωρίς καταλύτη, προκειμένου να αυξηθεί το χαμηλό μοριακό βάρος των ποροπολυμερών με τον μεταπολυμερισμό να πραγματοποιείται σε μικροαντιδραστήρα TGA [26].

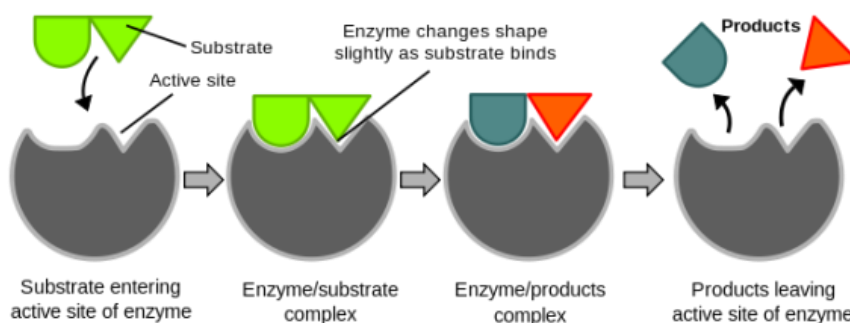
Κεφάλαιο 3. Ενζυμικός Πολυμερισμός

3.1 Ενζυμική κατάλυση

Μικροοργανισμοί, όπως βακτήρια και μύκητες (π.χ. ζύμες) παράγουν ένζυμα, τα οποία δεν είναι παρά πρωτεϊνικοί καταλύτες βιολογικής προέλευσης. Τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις μέσα στον οργανισμό, επιταχύνοντάς τις έως και 100 εκατομμύρια φορές, καθώς ελαττώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης αυτών. Η απομόνωση ενζύμων από τους μικροοργανισμούς για τη δράση τους σε εργαστηριακό επίπεδο είναι μια σημαντική τεχνολογική επιτυχία. Η βιοκατάλυση έχει επεκταθεί με επιτυχία και στον τομέα των πολυμερισμών. Τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης είναι πολλά και συνθέτουν ένα προφίλ φιλικό προς το περιβάλλον [6]. Κάποια από αυτά είναι

- οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες αντιδράσεων (συνήθως έως 100 °C)
- η ικανότητα των ενζύμων να δρουν σε μέτριες τιμές pH (4-9)
- η καθαρότητα του τελικού προϊόντος το οποίο δεν χρειάζεται να καθαριστεί με ιδιαίτερη προσοχή, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των χημικών καταλυτών, οι οποίοι συνήθως είναι τοξικοί
- τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα μεγάλη εκλεκτικότητα και έτσι, δεν ευνοούν την ύπαρξη παράπλευρων αντιδράσεων, οδηγώντας σε καλύτερες αποδόσεις και ευκολία στην παραλαβή του τελικού προϊόντος.

Μια από τις σημαντικές εφαρμογές της βιοκατάλυσης είναι και οι διεργασίες πολυμερισμού. Σε πολλές περιπτώσεις ο ενζυμικός πολυμερισμός διευκολύνει/επιτρέπει τη σύνθεση πολυμερών, τα οποία διαφορετικά είναι δύσκολο να παρασκευαστούν. Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιείται εντατική έρευνα σχετικά με τον ενζυμικό πολυμερισμό, που πλέον αναγνωρίζεται ως ένας νέος τομέας πολυμερικής σύνθεσης. Πολυμερικά υλικά που είναι ήδη υπό μελέτη είναι οι πολυσακχαρίτες, τα πολυ(αμινο οξέα), οι πολυεστέρες, βινυλικά πολυμερή, οι πολυ(ανθρακικές ενώσεις) και οι πολυ(αρωματικές ενώσεις).



Σχήμα 4. Δράση ενζύμων - ενεργά κέντρα

Ο ενζυμικός πολυμερισμός πραγματοποιείται μέσω μη βιοσυνθετικών (μη μεταβολικών) μονοπατιών. Μπορεί να πραγματοποιηθεί με τεχνική μάζας, διαλύματος ή αιωρήματος και αποτελεί μια φιλική προς το περιβάλλον συνθετική διαδικασία πολυμε-

ρών, παρέχοντας ένα μονοπάτι που συμβάλλει στην «πράσινη χημεία πολυμερών» [27].

3.2 Ενζυμικός πολυμερισμός και αλειφατικοί πολυεστέρες

3.2.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ενζυμικής κατάλυσης έναντι ανόργανων χημικών καταλυτών

Ο πολυμερισμός αλειφατικών πολυεστέρων πραγματοποιείται συνήθως με αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης καταλυόμενες από χημικούς καταλύτες, όπως άλατα του μαγγανίου, του ψευδαργύρου, του ασβεστίου, του μαγνησίου και του κοβαλτίου, αλλά και οξειδία αντιμονίου και τιτανίου. Η χρήση χημικών καταλυτών υστερεί στα επόμενα σημεία συγκριτικά με την ενζυμική σύνθεση αλειφατικών πολυεστέρων [28]:

1. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (180 - 280 °C) και μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις όπως αφυδάτωση των χρησιμοποιούμενων διολών ή ακόμα και σχάση εστερικών δεσμών προς σχηματισμό ακραίων ομάδων οξέων και αλκενίων.
2. Οι υψηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν τη χρήση θερμικά ή/και χημικά ασταθών μονομερών και λειτουργικών ομάδων (π.χ βινυλικά).
3. Η χρήση ανόργανων καταλυτών εγείρει αμφιβολίες για την καθαρότητα του τελικού πολυμερούς και επομένως για ενδεχόμενες ανεπιθύμητες επιδράσεις τους στο περιβάλλον, αλλά και σε πιθανά πεδία εφαρμογής τους (π.χ βιοϋλικά).
4. Οι παραδοσιακά χρησιμοποιούμενοι χημικοί καταλύτες συνήθως στερούνται εκλεκτικότητας συγκριτικά με τα ένζυμα.

Από την άλλη μεριά, ωστόσο, ο ενζυμικός πολυμερισμός υστερεί στο γεγονός ότι απαιτούνται συνήθως υψηλοί χρόνοι αντίδρασης, αυστηρές απαιτήσεις για την απομάκρυνση παραπροϊόντων, ενώ σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί επίσης το υψηλό κόστος των ενζύμων.

3.2.2 Τύπος ενζύμων για τη σύνθεση πολυεστέρων

Η καταλυτική δράση των ενζύμων έγκειται στο ότι οι ενζυμικές αντιδράσεις είναι αντιστρεπτές, οπότε η χημική ισορροπία μπορεί να ελεγχθεί επιλέγοντας τις κατάλληλες συνθήκες αντίδρασης. Οι υδρολάσες αποτελούν μία χρήσιμη υποκατηγορία ενζύμων για τη σύνθεση πολυμερών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα καταλύουν στη φύση την υδρόλυση δεσμών και μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντίστροφα οδηγώντας στη σύνθεση μακρομορίων απουσία νερού. Επομένως, τα υδρολυτικά ένζυμα σε άνυδρο περιβάλλον, δηλαδή σε οργανικούς διαλύτες, ευνοούν τη σύνθεση πολυμερών έναντι της σχάσης δεσμών μακρομορίων, αφού η θερμοδυναμική ισορροπία ευνοείται σε αυτές τις συνθήκες προς τη συνθετική μεριά [8].

Οι λιπάσες και οι εστεράσες ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των υδρολασών και συμμετέχουν στην υδρόλυση λιπαρών οξέων και εστέρων σε υδατικό περιβάλλον. Μια ακόμη χρήσιμη υποκατηγορία υδρολασών είναι οι κουτινάσες. Αυτά τα ένζυμα

παρουσία οργανικών διαλυτών και απουσίας νερού ευνοούν την αντίδραση της σύνθεσης μακρομορίων με αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης [28]. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, ο ενζυμικός πολυμερισμός για τη σύνθεση πολυεστέρων βασίζεται κυρίως στη χρήση λιπασών σε μη υδατικά μέσα [29][30]. Μερικά από τα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση πολυεστέρων προέρχονται από μικροοργανισμούς, όπως οι ακόλουθοι: *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Aspergillus niger*, *Porcine pancreas*, *Pseudomonas sp.* και *Candida antarctica* [31].

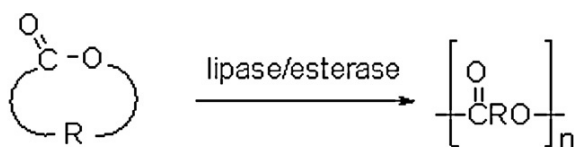
3.2.3 Τύποι αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού

Οι βασικοί τύποι αντιδράσεων για τη σύνθεση πολυεστέρων με ενζυμικό πολυμερισμό είναι ο πολυμερισμός συμπύκνωσης και ο πολυμερισμός διάνοιξης διακτυλίου (ROP) [27]. Όσον αφορά τους πολυμερισμούς συμπύκνωσης, αυτοί διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

1. Αντιδράσεις αυτοσυμπύκνωσης τύπου A-B ενός μονομερούς με υδροξυοξέα ή/και εστέρες τους.
2. Αντιδράσεις τύπου A-A και B-B δύο μονομερών με διαφορετικές δραστικές ομάδες, συνήθως διοξέα ή διεστέρες και διόλες.

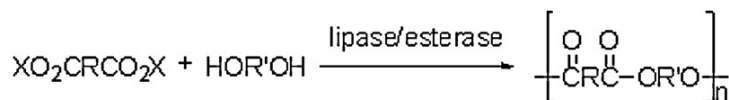
Το Σχήμα 5 συνοψίζει τις τυπικές συνθετικές οδούς ενζυμικού πολυμερισμού για την παραγωγή πολυεστέρων [7]. Στη δεδομένη διπλωματική εργασία επιλέχθηκε η σύνθεση του PBS με μηχανισμό πολυσυμπύκνωσης δύο μονομερών: της 1,4 - βουτανοδιόλης και του ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα (τύπου A-A και B-B).

(1) Ring-opening polymerization of lactones

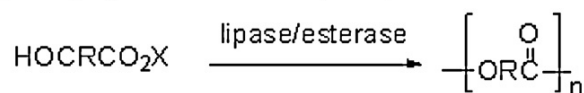


(2) Polycondensation

(i) Polycondensation of diacids or their esters with diols



(ii) Self-polycondensation of hydroxyacids or their esters



Σχήμα 5. Τυπικές συνθετικές οδοί ενζυμικού πολυμερισμού για την παραγωγή πολυεστέρων

3.2.4 Παράμετροι ενζυμικού πολυμερισμού

Στη διεθνή βιβλιογραφία συναντάται μεγάλος αριθμός δημοσιεύσεων που έχουν μελετήσει διάφορες συνθήκες ενζυμικού πολυμερισμού για τη σύνθεση πολυεστέρων. Οι μελετώμενες παράμετροι είναι:

- ο τύπος του ενζύμου,
- η συγκέντρωση του ενζύμου (συνήθως ορίζεται 10 % wt ως προς τη μάζα των μονομερών για τη λιπάση *Candida antarctica* Lipase B (CALB)) [2][32]–[34],
- η θερμοκρασία της αντίδρασης [32][35]–[38],
- ο τύπος του διαλύτη, με κυρίαρχο το διφαινυλαιθέρα [33][38]–[41],
- η παρουσία ενισχυτικών συστατικών [42].

Στη δεδομένη διπλωματική εργασία οι παράμετροι που μελετήθηκαν ήταν ο τύπος του ενζύμου, η θερμοκρασία του πολυμερισμού και ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης.

I. Ακίνητοποίηση ενζύμου

Ένα ακίνητοποιημένο ένζυμο είναι συνδεδεμένο με ένα αδρανές, αδιάλυτο υλικό. Αυτό μπορεί να προσφέρει αυξημένη αντίσταση του ενζύμου στις αλλαγές στις συνθήκες όπως το pH ή η θερμοκρασία. Επιτρέπει, επίσης, τη συγκράτηση των ενζύμων σε όλη την διάρκεια της αντίδρασης, με αποτέλεσμα να είναι εύκολος ο διαχωρισμός τους από τα προϊόντα και η ανακύκλωσή τους. Έτσι, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για καταλυόμενες από ένζυμα αντιδράσεις. Μια εναλλακτική λύση για την ακίνητοποίηση του ενζύμου είναι η ακίνητοποίηση ολόκληρων κυττάρων [43]. Η λιπάση *Candida antarctica* Lipase B που χρησιμοποιείται βρίσκεται ακίνητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη και διαθέτει την εμπορική ονομασία Novozyme 435 (N435) [43].

Στην περίπτωση της κουτινάσης του μύκητα *Fusarium oxisporum* που χρησιμοποιείται, η ακίνητοποίηση έχει επιτευχθεί με τη δημιουργία σταυροδεμένων συσσωματωμάτων ενζύμου (cross-linked enzyme aggregates - CLEAS). Μάλιστα, έχει διαπιστωθεί ότι η ακίνητοποιημένη μορφή του ενζύμου διαθέτει βελτιωμένη θερμική σταθερότητα σε σχέση με την ελεύθερη μορφή [44].

II. Πολικότητα διαλύτη

Μια σημαντική παράμετρος στους πολυμερισμούς με χρήση διαλύτη είναι η πολικότητα του διαλύτη [45]. Ένας πολικός διαλύτης μπορεί να απενεργοποιήσει το ένζυμο, λόγω μεταβολών της διαμόρφωσης των ενεργών του κέντρων. Επίσης, μπορεί να είναι υπεύθυνος για την απελευθέρωση νερού δεσμευμένου στο ένζυμο, το οποίο μπορεί στη συνέχεια να οδηγήσει σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις υδρόλυσης των εστερικών δεσμών. Έτσι, προτιμάται η χρήση διαλυτών χαμηλής πολικότητας, όπως το τολουόλιο και το ισοοκτάνιο. Εξάλλου, το ισοοκτάνιο έχει χρησιμοποιηθεί βιβλιογραφικά σε αντιδράσεις εστεροποίησης με χρήση της ακίνητοποιημένης κουτινάσης *FoCut5a* [44].

Κεφάλαιο 4. Πειραματικό μέρος

4.1 Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Μέσω της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετάται μια εναλλακτική διεργασία παραγωγής πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS), η οποία περιλαμβάνει:

- ένα αρχικό στάδιο ενζυμικού προπολυμερισμού της 1,4-βουτανοδιόλης και του ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα,
- και ένα δεύτερο στάδιο μεταπολυμερισμού μάζας με στόχο τη βελτίωση των ιδιοτήτων του τελικού βιοδιασπώμενου πολυμερούς.

Τα ένζυμα, τα οποία εξετάζονται ως προς την καταλυτική τους ικανότητα είναι η εμπορική ακινητοποιημένη λιπάση B του μύκητα *Candida antarctica* (CALB) με την εμπορική ονομασία Novozym 435 ή N435 και η κουτινάση του μύκητα *Fusarium oxysporum* (FoCut5a) [44][46], η οποία παρασκευάστηκε στα πλαίσια της εργασίας στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ. Στο επίπεδο του ενζυμικού προπολυμερισμού εξετάζεται η καταλληλότητα δύο διαφορετικών διαλυτών και η επίδραση της θερμοκρασίας, ενώ στην περίπτωση του μεταπολυμερισμού ερευνάται ο χρόνος διεξαγωγής των αντιδράσεων.

Όπως θα αναλυθεί και στη συνέχεια, σκοπός δεν είναι η χρήση της τέλει μεθόδου για την παραγωγή και τον μεταπολυμερισμό του PBS, αλλά οι δοκιμές σε μικρή εργαστηριακή κλίμακα (προϊόντα περίπου 150 mg) με απλές μεθόδους και ήπιους διαλύτες, ώστε να εντοπιστούν οι κατάλληλες συνθήκες.

4.2 Ενζυμική σύνθεση PBS

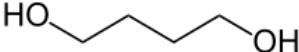
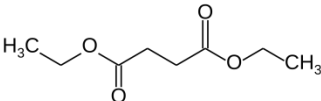
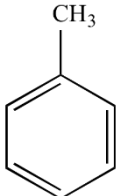
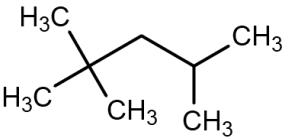
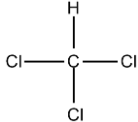
Η προσπάθεια να παρασκευαστούν μόρια πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS) μέσω ενζυμικής κατάλυσης, με διαφορετικές συνθήκες και τεχνικές, αποτελεί το βασικό πυρήνα της εργασίας. Το πρώτο ένζυμο που εξετάζεται είναι η εμπορική ακινητοποιημένη λιπάση Novozym 435 ή N435 του μύκητα *Candida antarctica*, το οποίο είναι ήδη πολύ διαδεδομένο στην κατάλυση της σύνθεσης του PBS [6]. Ωστόσο, επιχειρείται και η σύνθεση PBS με τη χρήση κουτινάσης του μύκητα *Fusarium oxysporum* (FoCut5a), μέθοδος, η οποία δεν έχει γνωρίσει εκτεταμένη μελέτη αλλά παρουσιάζει ενδιαφέρον [8].

4.2.1 Υλικά

Τα μονομερή που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) (PBS) στο στάδιο του ενζυμικού προπολυμερισμού είναι η 1,4-βουτανοδιόλη (BDO) και ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES) και τα δύο σε υγρή μορφή υπό συνθήκες περιβάλλοντος. Ως διαλύτες πολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν το τολουόλιο και το ισοοκτάνιο. Τα ένζυμα που εξετάστηκαν είναι η εμπορική λιπάση B του μύκητα *Candida antarctica* B (Novozym 435, N435) και η κουτινάση του μύκητα *Fusarium oxysporum* (FoCut5a) [1][44], η οποία παρασκευάστηκε στα πλαίσια της εργασίας από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ. Συγκεντρωτικά, τα υλικά

που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων και η προέλευσή τους καταγράφονται στον Πίνακα 5, ενώ στον Πίνακα 6 αναφέρονται το Μοριακό Βάρος και η πυκνότητα των μονομερών και των διαλυτών που χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 5. Υλικά πειραματικής διαδικασίας

Αντιδραστήριο	Προμηθευτής	Δομή
1,4-βουτανοδιόλη (BDO)	ARD L' Innovation Verte	
Ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES)	ARD L' Innovation Verte	
Τολουόλιο	Sigma Aldrich	
Ισοοκτάνιο	Sigma Aldrich	
Χλωροφόρμιο	Sigma Aldrich	
Novozym 435	Novozymes	
FoCut5a	Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ	

Πίνακας 6. Μοριακό Βάρος και πυκνότητα μονομερών και διαλυτών

	MW (g/mol)	Πυκνότητα (g/ml στους 25 °C)
1,4-BDO	90,122	1,017
DES	174,196	1,040
Τολουόλιο	92,141	0,865
Ισοοκτάνιο	114,232	0,692
Χλωροφόρμιο	119,369	1,492

Σημειώνεται ότι, σε αντίθεση με τη χημική κατάλυση της παραγωγής του PBS, στην ενζυμική παραγωγή επιλέγεται η χρήση εστέρα του ηλεκτρικού οξέος, αντί για το ίδιο το οξύ, διότι τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα έχουν εξειδίκευση σε υποστρώματα εστέρων και όχι οξέων [47]. Διεξήχθησαν δοκιμαστικά πειράματα με χρήση ηλεκτρικού οξέος και δεν απέδωσαν προϊόν. Εν προκειμένω, χρησιμοποιείται ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES).

4.2.2 Όργανα και συσκευές

Οι ενζυμικοί πολυμερισμοί πραγματοποιήθηκαν σε επωαστήρες του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ, οι οποίοι διαθέτουν ρυθμίσεις θερμοκρασίας και ανάδευσης. Η ξήρανση των προϊόντων έγινε σε φούρνο κενού του Εργαστηρίου Πολυμερών ΕΜΠ, με χρήση αντλίας κενού. Στο πείραμα αυξημένης εργαστηριακής κλίμακας το προϊόν ξηράνθηκε επιπλέον στην αντλία κενού του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας, η οποία επιτυγχάνει ακόμη υψηλότερο κενό.

Πίνακας 7. Όργανα και Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία

Όργανο/Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Επωαστήρας	Zhicheng	ZHWY – 211C
Φούρνος κενού	Gallenkamp	Vacuum Oven
Αντλία κενού	Buchi Switzerland	Vacuum Pump V-700
Ζυγός ακριβείας	Mettler Toledo	NewClassic MF MS105DU

4.2.3 Πειραματική διαδικασία

Οι αντιδράσεις ενζυμικού πολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν σε μικρά γυάλινα δοχεία (vials) 1,5 ή 3 mL, τα οποία τοποθετήθηκαν σε επωαστήρες, όπου παρέμειναν για 24 h υπό ανάδευση 180 rpm. Οι θερμοκρασίες στις οποίες υποβλήθηκαν τα δείγματα ήταν 40, 50 και 60 °C. Σύμφωνα με τους Stavila et al. [48] η βέλτιστη θερμοκρασία χρήσης μιας κουτινάσης διαφορετικής προέλευσης είναι οι 70 °C. Εν προκειμένω, δεν επιλέχθηκαν πιο υψηλές θερμοκρασίες, στα πλαίσια των δοκιμών σε ήπιες συνθήκες αλλά και γιατί πρόκειται για ένα ενδεδειγμένο εύρος θερμοκρασιών στη χρήση του N435 [43].

Οι παράμετροι που μελετώνται είναι το είδος του ενζύμου, ο διαλύτης και η θερμοκρασία (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Εξεταζόμενες παράμετροι ενζυμικού πολυμερισμού PBS

Ένζυμο	Διαλύτης	Θερμοκρασία
Novozym 435	Τολουόλιο	40 °C
<i>FoCut5a</i>	Ισοοκτάνιο	50 °C
χωρίς ένζυμο	χωρίς διαλύτη	60 °C

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι επιχειρήθηκε η τεχνική πολυμερισμού σε ήπιους διαλύτες (τολουόλιο και ισοοκτάνιο) και όχι, για παράδειγμα, στο διφαινυλαιθέρα, που είναι ένας συνηθισμένος διαλύτης αλλά έχει υψηλό σημείο βρασμού (258 °C), κάτι που τον καθιστά δύσκολο προς απομάκρυνση. Το τολουόλιο και το ισοοκτάνιο είναι πιο πτητικοί διαλύτες (Πίνακας 13) και είναι εύκολο να απομακρυνθούν κατά την ξήρανση του προϊόντος, χωρίς να απαιτείται τεχνική ανακρυστάλλωσης (π.χ. με μεθανόλη). Επίσης, δε χρησιμοποιήθηκε κενό κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και έτσι, δεν υπήρχε απαίτηση για έναν μη πτητικό διαλύτη που να παραμένει στο σύστημα. Η μη εφαρμογή κενού, ωστόσο, έχει το βασικό μειονέκτημα ότι οδηγεί σε περιορισμένες μετατροπές, αφού δεν απομακρύνεται το σχηματιζόμενο παραπροϊόν, δηλαδή η αιθανόλη και η ισορροπία της αντίδρασης δεν μετατοπίζεται προς την κατεύθυνση παραγωγής του προϊόντος, PBS. Έτσι, η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι απλή και αποδίδει ένα σχετικά καθαρό προϊόν, αλλά οδηγεί σε περιορισμένες μετατροπές και αποδόσεις.

Κάθε ολοκληρωμένη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιούνταν σε κάποια θερμοκρασία περιελάμβανε πειράματα με όλους τους πιθανούς συνδυασμούς ενζύμου και διαλύτη. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναφοράς, χωρίς ένζυμο, για λόγους σύγκρισης, καθώς και πειράματα χωρίς διαλύτη, ώστε να μελετηθεί η τεχνική μάζας. Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται όλοι οι συνδυασμοί που δοκιμάστηκαν σε κάθε set πειραμάτων κάθε θερμοκρασίας. Για κάποια πειράματα πραγματοποιήθηκαν επαναληπτικά set, ώστε να ερευνηθεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Πίνακας 9. Αρίθμηση πειραμάτων όλων των συνδυασμών

		Ένζυμο		
		Novozym 435	<i>FoCut5a</i>	χωρίς ένζυμο
Διαλύτης	Τολουόλιο	(1)	(2)	(3)
	Ισοοκτάνιο	(4)	(5)	(6)
	χωρίς διαλύτη	(7)	(8)	(9)

III. Προετοιμασία αντιδρώντος μίγματος

Στα γυάλινα δοχεία τοποθετούνταν τα μονομερή σε στοιχειομετρική αναλογία, τα οποία και ζυγίζονταν για υπολογισμό της σταθμικής απόδοσης της αντίδρασης. Έπει-

τα, προστίθεται το ένζυμο και, τέλος, ο πτητικός διαλύτης. Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα ισοδυναμεί με το 10% της μάζας των μονομερών.

Τα πρώτα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δοχεία χωρητικότητας περίπου 1,5 ml. Έτσι, ο υπολογισμός των ποσοτήτων των υλικών έγινε με γνώμονα τις μεταξύ τους αναλογίες και το άθροισμα των όγκων τους που ορίστηκε 1,5 ml. Ο όγκος του ενζύμου θεωρείται αμελητέος και δεν συνυπολογίζεται στον ολικό όγκο του μίγματος. Οι ακριβείς σχέσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Αναλογίες και σχέσεις μεταξύ των υλικών

Υλικά	Αναλογία
1,4 BDO : DES	1 : 1 (mol/mol)
διαλύτης : μονομερή	2 : 1 (w/w)
ένζυμο : μονομερή	0,1 : 1 (w/w)
χλωροφόρμιο : διαλύτης	1 : 1 (w/w)
Συνολικός Όγκος	
$V_{\text{μικτ.}} = V_{\text{BDO}} + V_{\text{DES}} + V_{\text{διαλύτη}} = 1,5 \text{ ml}$	

Σύμφωνα με τη σχέση και τις αναλογίες του Πίνακα 10, οι όγκοι των μονομερών και των διαλυτών, καθώς και η μάζα του καταλύτη, όπως πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα προκύπτουν κατά τρόπο που καταγράφεται στον Πίνακα 11. Η ακρίβεια 3^{ου} δεκαδικού ψηφίου του ml επιτυγχάνεται με χρήση πιπέτας ογκομέτρησης των 100 μl. Οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων του g. Η προκειμένη ακρίβεια είναι επιθυμητή στα δεδομένα πειράματα, τα οποία οδηγούν σε προϊόντα της τάξης των 100 mg. Πρόκειται για πειράματα της κλίμακας των δεκάδων mg, εφόσον το άθροισμα των μονομερών είναι περίπου 450 mg. Στο εξής θα αναφέρεται ως μικρή κλίμακα για να αποτελεί κλίμακα αναφοράς άλλων κλιμάκων που θα ακολουθήσουν.

Πίνακας 11. Ποσότητες μονομερών, διαλύτη και ενζύμου, όπως υπολογίστηκαν για κάθε πείραμα

	Novozym 435			FoCut5a			Πείραμα Αναφοράς (χ. έ.)		
	Τολουόλιο	Ισοοκτάνιο	χ. δ.	Τολουόλιο	Ισοοκτάνιο	χ. δ.	Τολουόλιο	Ισοοκτάνιο	χ. δ.
$V_{\text{DES}} \text{ (ml)}$	0,289	0,245	0,289	0,289	0,245	0,289	0,289	0,245	0,289
$V_{\text{BDO}} \text{ (ml)}$	0,154	0,130	0,154	0,154	0,130	0,154	0,154	0,130	0,154
$V_{\text{διαλύτη}} \text{ (ml)}$	1,057	1,121	-	1,057	1,121	-	1,057	1,121	-
$m_{\text{ενζύμου}} \text{ (mg)}$	46	39	46	46	39	46	-	-	-
$V_{\text{CHCl}_3} \text{ (ml)}$	0,617	0,521	0,617	0,617	0,521	0,617	0,617	0,521	0,617

χ. δ.: χωρίς διαλύτη, χ. έ.: χωρίς ένζυμο

Προκειμένου να γίνει κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο έρχονται σε επαφή τα μονομερή για να αντιδράσουν, είναι χρήσιμο να διευκρινιστεί κατά πόσο είναι αναμίξιμα μεταξύ τους αλλά και σε συνδυασμό με τους χρησιμοποιούμενους διαλύτες. Τα αποτελέσματα της εξέτασης της αναμιξιμότητας στις αναλογίες που χρησιμοποιούνται

στα πειράματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 12. Στον ίδιο Πίνακα απεικονίζεται και η μη διαλυτότητα των ενζύμων στα μονομερή και τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται.

Πίνακας 12. Αναμιξιμότητες μονομερών και διαλυτών σε συνθήκες περιβάλλοντος

	DES	Τολουόλιο	Ισοοκτάνιο	Χλωροφόρμιο
1,4 BDO	-	-	-	-
DES		+	+	+
PBS	-	-	-	+
Τολουόλιο				+
Novozym 435	-	-	-	-
FoCut5a	-	-	-	-

Στο Σχήμα 6 παρουσιάζονται τα μίγματα προς αντίδραση με N435 αριστερά και FoCut5a δεξιά, πριν μπουν στον επωαστήρα (Σχήμα 7). Στα δείγματα με ισοοκτάνιο (vials 4 και 5) και τα δυο ένζυμα δημιουργούν συσσωματώματα και δεν είναι ευκίνητα, σε αντίθεση με τα δείγματα με τολουόλιο (vials 1 και 2), όπου και τα δυο ένζυμα βρίσκονται σε διασπορά κατά την ανακίνησή τους.



Σχήμα 6. Μίγματα με N435 (αριστερά) και FoCut5a (δεξιά) πριν την αντίδραση



Σχήμα 7. Επωαστήρας

IV. Αντίδραση

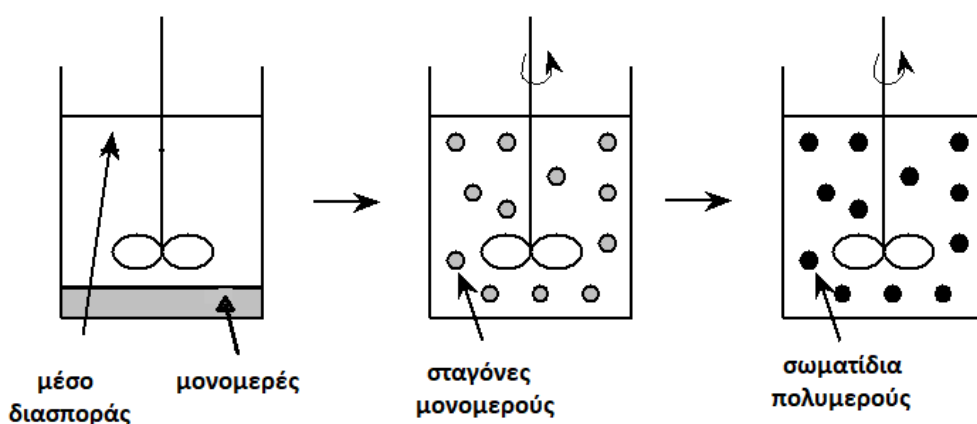
Η παραγωγή του PBS γίνεται με έμμεσο τρόπο, με μηχανισμό μετεστεροποίησης, αφού αντί για ηλεκτρικό οξύ χρησιμοποιείται ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας. Όσον αφορά την τεχνική πολυμερισμού, εφαρμόστηκαν τεχνικές αιωρήματος, χρησιμοποιώντας ως μέσα διασποράς τολουόλιο ή ισοοκτάνιο, καθώς και τεχνική μάζας, απουσία διαλύτη με απευθείας ανάμιξη των μονομερών. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα σε κάθε περίπτωση περιγράφεται στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8. Αντίδραση ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα και 1,4-βουτανοδιόλης υπό την κατάλυση της λιπάσης B *Candida antarctica* προς παραγωγή του PBS

a. Τεχνική αιωρήματος

Από το μονομερή μόνο ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας είναι αναμίξιμος με τους δύο χρησιμοποιούμενους διαλύτες. Η 1,4-βουτανοδιόλη, όπως και το PBS, είναι αδιάλυτα στους δυο διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι, η δεδομένη τεχνική πολυμερισμού είναι τεχνική αιωρήματος σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Κατά την τεχνική αυτή ο πολυμερισμός διεξάγεται σε ένα διαφασικό σύστημα, στο οποίο η βουτανοδιόλη φέρεται σε διάσπαρτη φάση με τη μορφή σταγονιδίων. Σε αυτή την περίπτωση η χρήση του όρου «διαλύτης» είναι καταχρηστική και αντιπροσωπεύει στην ουσία το μέσο διασποράς, το οποίο δεν είναι αναμίξιμο με το ένα μονομερές και ούτε διαλύει το πολυμερές. Το μέσο διασποράς καθίσταται το μέσο μεταφοράς θερμότητας και συμβάλλει στη διατήρηση σχεδόν σταθερού ιξώδους κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ο πολυμερισμός γίνεται στις σταγόνες του αδιάλυτου μονομερούς. Η ανάδευση είναι ικανοποιητική και συνεχής εξασφαλίζοντας στο σύστημα διαχωρισμό φάσεων σε οποιοδήποτε σημείο και εμποδίζοντας τη δημιουργία συσσωματωμάτων.



Σχήμα 9. Σχηματική απεικόνιση πολυμερισμού αιωρήματος

Το μειονέκτημα του πολυμερισμού αιωρήματος σε σχέση με την τεχνική μάζας είναι η ανάγκη για απομάκρυνση του μέσου διασποράς μετά την αντίδραση και η περίπτωση εγκλωβισμού μέρους αυτού ανάμεσα στις μακροαλυσίδες. Ωστόσο, σαν τεχνική πλεονεκτεί στις εξαιρετικές ιδιότητες μεταφοράς θερμότητας και στην ευχέρεια ανάδευσης και ελέγχου της θερμοκρασίας [49].

b. Τεχνική μάζας

Τα μονομερή είναι μη αναμίξιμα μεταξύ τους. Η συνεχής ανάδευση του μίγματος, επιτρέπει στα μόρια των μονομερών να προσεγγίζουν τα ενεργά κέντρα του ενζύμου και να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους. Η παραγωγή του PBS είναι μια αντίδραση σταδιακού πολυμερισμού, οπότε είναι ελαφρά μόνο εξώθερμη και το τήγμα του πολυμερούς που λαμβάνεται δεν παρουσιάζει υψηλές τιμές ιξώδους. Έτσι, η ανάδευση που πραγματοποιείται είναι ικανοποιητική, όπως και ο ρυθμός απαγωγής της θερμότητας. Έτσι, η τεχνική μάζας είναι κατάλληλη για το συγκεκριμένο σύστημα και μάλιστα, διαθέτει το πλεονέκτημα ότι είναι ιδιαίτερα απλή και οδηγεί σε καθαρό προϊόν, από το οποίο δεν χρειάζεται να απομακρυνθεί κάποιος διαλύτης [49].

V. Παραλαβή προϊόντος

Μετά το πέρας της αντίδρασης, ακολούθησε απομάκρυνση του ενζύμου με διήθηση και χρήση χλωροφορμίου για έκπλυση του ενζύμου αλλά και του δοχείου από πιθανές επικαθίσεις προϊόντος. Εδώ, σημειώνεται ότι το χλωροφόρμιο είναι καλός διαλύτης του PBS. Στα πειράματα όπου δεν έγινε χρήση διαλύτη, η ποσότητα χλωροφορμίου που χρησιμοποιήθηκε για έκπλυση ισούται με την αντίστοιχη των πειραμάτων με χρήση τολουολίου. Η ποσότητα του χλωροφορμίου που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση κάθε προϊόντος καταγράφεται στους Πίνακες 10 και 11.

VI. Ξήρανση προϊόντος

Το εκάστοτε προϊόν που παραλαμβάνεται είναι διαλυμένο στο χλωροφόρμιο που χρησιμοποιήθηκε κατά την έκπλυση. Στο λαμβανόμενο μίγμα υγρών υπάρχει, επιπλέον, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε στις περιπτώσεις τεχνικής αιωρήματος, μονομερή που ίσως δεν αντέδρασαν, ολιγομερή (διμερή – τριμερή, που όπως θα αποδειχτεί είναι υγρά) και η παραγόμενη αιθανόλη, που δεν απομακρύνθηκε κατά τη διάρκεια τη αντίδρασης. Για την παραλαβή του καθαρού προϊόντος απαιτείται η απομάκρυνση των υπόλοιπων συστατικών του μίγματος. Για την επίτευξη αυτού του στόχου πρέπει να πραγματοποιηθεί ξήρανση του στερεού προϊόντος PBS από τα υπόλοιπα συστατικά (χλωροφόρμιο, τολουόλιο/ισοοκτάνιο, μονομερή, αιθανόλη) μέσω εξάτμισης. Αυτό σημαίνει πως η ξήρανση πρέπει να πραγματοποιηθεί σε συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, όπου να εξατμίζεται και το λιγότερο πτητικό υγρό, χωρίς να καταπονείται το προϊόν φυσικά σε συνθήκες που να απέχουν από την αποικοδόμησή του. Για την επιλογή αυτών των συνθηκών παρουσιάζεται ο Πίνακας 13, στον οποίο καταγράφονται οι ανάλογες φυσικές ιδιότητες των χρησιμοποιούμενων μονομερών

και διαλυτών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 13, όσο πιο υψηλό είναι το σημείο βρασμού μιας ένωσης τόσο χαμηλότερη είναι η τάση ατμών αυτής σε δεδομένη θερμοκρασία. Οι διαλύτες, με πρωταγωνιστή το χλωροφόρμιο, μπορούν εύκολα να εξατμιστούν στις συνθήκες περιβάλλοντος εργαστηρίου. Ωστόσο, η επιλογή των συνθηκών ξήρανσης γίνεται βάσει του λιγότερο πτητικού υλικού προς απομάκρυνση, που είναι η 1,4-βουτανοδιόλη. Έτσι, η ξήρανση πραγματοποιήθηκε στο φούρνο κενού με χρήση αντλίας κενού (Σχήμα 10) στους 30 °C και 20 mbar.



Σχήμα 10. Αντλία κενού και φούρνος

Πίνακας 13. Σημεία βρασμού και τάσεις ατμών μονομερών και διαλυτών [50]

	T_b (°C)	Τάση Ατμών (mbar στους 25 °C)
1,4 BDO	235	0,014
DES	217	0,585
Τολουόλιο	111	37,860
Ισοοκτάνιο	99	55,000
CHCl₃	61	262,640

Τα δείγματα μετά την ξήρανση και μέχρι τη χρήση τους αποθηκεύονταν σε erendorff στην κατάψυξη, όπου η χαμηλή θερμοκρασία δεν ευνοεί τυχόν αντιδράσεις υδρόλυσης του προϊόντος.

4.2.4 Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου Novozym 435

Στο παρόν υποκεφάλαιο θα παρουσιαστούν τα πειράματα που έλαβαν χώρα με την εμπορική λιπάση Novozym 435, καθώς και κάποια πειράματα αναφοράς που πραγματοποιήθηκαν χωρίς ένζυμο. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν περισσότερες από μία φορές σε κάθε θερμοκρασία, ώστε να δοθεί μια εικόνα της επαναληψιμότητάς τους. Τα περισσότερα από αυτά, διεξήχθησαν στη μικρή κλίμακα που απεικονίζεται στους Πίνακες 10 και 11, με το συνολικό όγκο των υλικών νε είναι περίπου 1,5 ml, ενώ για κάποια άλλα διπλασιάστηκε η κλίμακα, ώστε να αυξηθεί το παραγόμενο προϊόν. Στην πορεία, διεξήχθη σε αρκετά μεγαλύτερη κλίμακα το πείραμα που οδήγησε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικρής κλίμακας, στη μεγαλύτερη

αύξηση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους, M_n , κατά τη διαδικασία του μεταπολυμερισμού.

I. Πειράματα μικρής εργαστηριακής κλίμακας

Αρχικά, ο Πίνακας 14 παρουσιάζει τα δεδομένα κάποιων πειραμάτων αναφοράς, δηλαδή πειραμάτων που δεν περιλάμβαναν ένζυμο και είχαν σκοπό να αναδείξουν την αναγκαιότητα της χρήσης ενζύμου. Όπως θα φανεί και παρακάτω, πρόκειται για δοκιμές χωρίς ανάδειξη προϊόντος. Δοκιμές αναφοράς πραγματοποιήθηκαν για όλους τους διαλύτες και σε όλες τις θερμοκρασίες. Ωστόσο, σε όλες τις δοκιμές επιβεβαιώνεται η αδυναμία ανάδειξης προϊόντος και έτσι, θα αναφερθούν μόνο τα στοιχεία των πειραμάτων αναφοράς μιας σειράς πειραμάτων στους 50 °C.

Πίνακας 14. Μάζες μονομερών και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 50 °C χωρίς ένζυμο

Πείραμα	1,4- Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Διαλύτης (mg)
1	154	301	920 τολουόλιο
4	129	251	770 ισοοκτάνιο
7	129	295	χωρίς διαλύτη

Στη συνέχεια, καταγράφονται τα στοιχεία των πειραμάτων όλων των θερμοκρασιών και συγκεκριμένα, οι μάζες των μονομερών, του διαλύτη και του ενζύμου N435, όπως ζυγίστηκαν για κάθε πείραμα.

a. 40 °C

Τα πειράματα όλων των σειρών πειραμάτων στους 40 °C διεξήχθησαν στη μικρή εργαστηριακή κλίμακα που απεικονίζεται στους Πίνακες 10 και 11, με το συνολικό όγκο των υλικών να είναι περίπου 1,5 ml.

Πίνακας 15. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 40 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Λιαιθυλεστέρας (mg)	N435 (mg)	Διαλύτης (mg)	
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	161	305	43	924	τολουόλιο
	4	132	259	42	771	ισοοκτάνιο
	7	158	301	48		χωρίς διαλύτη
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	301	43	861	τολουόλιο
	4	134	255	42	800	ισοοκτάνιο
	7	161	303	48		χωρίς διαλύτη
3 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	310	47	872	τολουόλιο
	4	133	262	40	801	ισοοκτάνιο
	7	162	310	46		χωρίς διαλύτη
4 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	300	46	912	τολουόλιο
	4	129	257	39	761	ισοοκτάνιο
	7	153	306	45		χωρίς διαλύτη

b. 50 °C

Στους 50 °C οι δύο πρώτες σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στη μικρή εργαστηριακή κλίμακα και η τρίτη σειρά πειραμάτων σε διπλάσια εργαστηριακή κλίμακα.

Πίνακας 16. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 50 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Λιαιθυλεστέρας (mg)	N435 (mg)	Διαλύτης (mg)	
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	313	45	964	τολουόλιο
	4	132	261	40	792	ισοοκτάνιο
	7	155	312	47		χωρίς διαλύτη
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	155	304	49	929	τολουόλιο
	4	134	257	39	769	ισοοκτάνιο
	7	156	302	47		χωρίς διαλύτη
3 ^η (διπλάσια κλίμακα)	1	308	621	93	1930	τολουόλιο
	4	261	520	80	1509	ισοοκτάνιο
	7	311	608	90		χωρίς διαλύτη

c. 60 °C

Στους 60 °C οι δύο πρώτες σειρές πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν στη μικρή κλίμακα και η τρίτη σειρά πειραμάτων στη διπλάσια εργαστηριακή κλίμακα.

Πίνακας 17. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 60 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	N435 (mg)	Διαλύτης (mg)
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	159	305	45	899 τολουόλιο
	4	131	259	39	741 ισοοκτάνιο
	7	152	307	51	χωρίς διαλύτη
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	155	292	49	905 τολουόλιο
	4	133	257	39	748 ισοοκτάνιο
	7	158	303	46	χωρίς διαλύτη
3 ^η (διπλάσια κλίμακα)	1	311	603	94	1886 τολουόλιο
	4	262	516	78	1513 ισοοκτάνιο
	7	316	599	91	χωρίς διαλύτη

II. Πείραμα μεγάλης εργαστηριακής κλίμακας

Σκοπός της αύξησης της κλίμακας ήταν να παραχθεί αρκετή ποσότητα προϊόντος, ώστε να μελετηθεί αναλυτικά ο μεταπολυμερισμός, το δεύτερο δηλαδή στάδιο της προτεινόμενης διεργασίας μεταπολυμερισμού. Αυτή η μελέτη αφορά στο πείραμα που οδήγησε, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μικρής κλίμακας, στη μεγαλύτερη αύξηση του μέσου αριθμού μοριακού βάρους, M_n , κατά τη διαδικασία του μεταπολυμερισμού. Αυτό ήταν το πείραμα στους 50 °C με χρήση ισοοκτανίου. Στο πείραμα μεγάλης κλίμακας, όλα τα υλικά χρησιμοποιούνται σε ποσότητες 14 φορές μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των πειραμάτων μικρής κλίμακας που περιγράφονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 18. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για το πείραμα μεγάλης κλίμακας που διεξήχθη στους 50 °C με χρήση N435

1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	N435 (mg)	Ισοοκτάνιο (mg)
1977	3602	527	10942

Το πείραμα μεγάλης εργαστηριακής κλίμακας πραγματοποιήθηκε σε κωνική φιάλη (Σχήμα 11).



Σχήμα 11. Πείραμα μεγάλης κλίμακας πριν την αντίδραση

4.2.5 Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου *FoCut5a*

Στην περίπτωση των πειραμάτων που έλαβαν χώρα με τη χρήση της κουτινάσης *FoCut5a*, πρέπει να αναφερθεί πως δεν διεξήχθησαν όλες οι σειρές με την ίδια παρτίδα ενζύμου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για ένζυμο το οποίο προέρχεται από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας ΕΜΠ, το οποίο δε διαθέτει εξ' αρχής την απαιτούμενη ποσότητα και χρειάστηκε να επαναληφθεί κάποιες φορές η διαδικασία απομόνωσης και ακινητοποίησης του ενζύμου [44]. Έτσι, συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές παρτίδες κουτινάσης, οι ενεργότητες των οποίων μετρήθηκαν από το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας και αναφέρονται στον Πίνακα 19, μαζί με την ενεργότητα του εμπορικού ενζύμου 435.

Πίνακας 19. Ενεργότητες ενζύμων

Ένζυμο	Ενεργότητα (Units/g)
Novozym 435	1269
<i>FoCut5a</i> ₁	75
<i>FoCut5a</i> ₂	650
<i>FoCut5a</i> ₃	963

Οι περισσότερες σειρές πειραμάτων διεξήχθησαν στη μικρή κλίμακα που απεικονίζεται στον Πίνακα 11 και μια σειρά στη διπλάσια εργαστηριακή κλίμακα, ώστε να αυξηθεί το παραγόμενο προϊόν.

I. Πειράματα μικρής εργαστηριακής κλίμακας

Στους επόμενους Πίνακες καταγράφονται τα στοιχεία των πειραμάτων όλων των θερμοκρασιών που εκτελέστηκαν με χρήση *FoCut5a* και συγκεκριμένα, οι μάζες των μονομερών, του διαλύτη και του ενζύμου, όπως ζυγίστηκαν για κάθε πείραμα. Κάτω από την κάθε σειρά πειραμάτων καταγράφεται και η παρτίδα κουτινάσης που χρησιμοποιήθηκε.

a. 40 °C

Τα πειράματα των τριών πρώτων σειρών πειραμάτων διεξήχθησαν στη μικρή εργαστηριακή κλίμακα, ενώ στην 4^η σειρά η κλίμακα διπλασιάστηκε.

Πίνακας 20. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 40 °C με χρήση *FoCut5a*

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Δι-αιθυλεστέρας (mg)	<i>FoCut5a</i> (mg)	Διαλύτης (mg)	
1 ^η (μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a</i> ₁)	2	162	311	46	906	τολουόλιο
	5	136	260	42	802	ισοοκτάνιο
	8	159	307	50		χωρίς διαλύτη
2 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₂)	2	160	305	43	880	τολουόλιο
	5	134	260	37	814	ισοοκτάνιο
	8	159	312	48		χωρίς διαλύτη
3 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₂)	2	162	310	47	894	τολουόλιο
	5	135	266	39	802	ισοοκτάνιο
	8	159	309	46		χωρίς διαλύτη
4 ^η (διπλάσια κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₃)	2	311	610	92	1834	τολουόλιο
	5	262	522	77	1544	ισοοκτάνιο
	8	305	606	97		χωρίς διαλύτη

b. 50 °C

Στους 50 °C πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων στη μικρή εργαστηριακή κλίμακα με χρήση *FoCut5a*₁

Πίνακας 21. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 50 °C με χρήση *FoCut5a*₁

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	<i>FoCut5a</i> (mg)	Διαλύτης (mg)	
μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a</i> ₁	2	158	310	46	913	τολουόλιο
	5	133	265	39	788	ισοοκτάνιο
	8	162	316	46		χωρίς διαλύτη

c. 60 °C

Στους 60 °C πραγματοποιήθηκαν δύο σειρές πειραμάτων στη μικρή εργαστηριακή κλίμακα.

Πίνακας 22. Μάζες μονομερών, ενζύμου και διαλύτη για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 60 °C με χρήση *FoCut5a*

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	<i>FoCut5a</i> (mg)	Διαλύτης (mg)
1 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₁)	2	164	305	45	936 τολουόλιο
	5	138	258	39	758 ισοοκτάνιο
	8	150	303	45,6	χωρίς διαλύτη
2 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₂)	2	154	295	45	919 τολουόλιο
	5	133	255	37	767 ισοοκτάνιο
	8	154	304	45	χωρίς διαλύτη

4.3 Μεταπολυμερισμός μάζας προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού

Το δεύτερο μέρος της πειραματικής διαδικασίας αφορά στο μεταπολυμερισμό μάζας των προϊόντων του ενζυμικού πολυμερισμού. Σε δοκιμές μεταπολυμερισμού επιδόθηκαν προϊόντα που παράχθηκαν τόσο με τη χρήση N435 όσο και *FoCut5a*. Οι δοκιμές μεταπολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν στο θάλαμο θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA), ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως μικροαντιδραστήρας [26]. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, ο μεταπολυμερισμός έγινε σε δύο διακριτά στάδια. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε την τοποθέτηση υλικού σε κατάλληλα κυλινδρικά καψίδια (pans) αλουμινίου, ζύγιση των δειγμάτων και αεροστεγή σφράγιση των καψιδίων με μεταλλικά καλύμματα με τη βοήθεια ειδικής πρέσας. Στο κάλυμμα δημιουργήθηκε οπή εξαερισμού στο μέγεθος της μύτης βελόνας. Η οπή είναι απαραίτητη για να μπορέσει να διαφύγει η παραγόμενη αιθανόλη. Η ποσότητα του υλικού που χρησιμοποιήθηκε στα διαφορετικά στάδια διέφερε ως εξής:

- Για τη μελέτη του πρώτου σταδίου του μεταπολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν 30 – 40 mg.
- Για τη μελέτη του δεύτερου σταδίου έπρεπε να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες ποσότητες που να αρκούν για τη δημιουργία διαλυμάτων που θα αναλύονταν με ιξωδομετρία διαλύματος. Έτσι, τα καψίδια στα πρώτα πειράματα πληρώνονταν με δείγμα περίπου 80 mg. Αυτή η ποσότητα, όμως, έπρεπε να πακτωθεί αρκετά για να χωρέσει στο καψίδιο και ελλόχευε ο κίνδυνος να μη δίνεται ο κατάλληλος χώρος στο υλικό για να δράσει. Για αυτό το λόγο, τα επόμενα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά καψίδια με υλικό περίπου 45 mg το καθένα (σύνολο περίπου 90 mg) τα οποία τοποθετούνταν ταυτόχρονα στο θερμοζυγό. Αυτό δε δημιουργούσε κάποιο πρόβλημα στη διεργασία, εκτός από το γεγονός ότι δε θα λαμβάνονταν αντιπροσωπευτικά δεδομένα μείωσης της μάζας, καθώς μόνο το ένα καψίδιο θα μετρούταν από το θερμοζυγό. Πρόκειται, όμως, για συμπληρωματικά δεδομένα που δεν είναι απαραίτητα για την αξιολόγηση της αντίδρασης, από την οποία αυτό που ενδιέφερε να μετρηθεί ήταν το μοριακό βάρος τους προϊόντος.

Ο τρόπος πλήρωσης του καψιδίου και η οπή στο καπάκι είναι ορισμένες από τις λεπτομέρειες που πρέπει να γίνονται κάθε φορά με παρόμοιο τρόπο, ώστε η μέθοδος να είναι κατά το δυνατόν επαναλήψιμη. Στην περίπτωση των πειραμάτων που έλαβαν χώρα για τη μελέτη του δεύτερου σταδίου, αυτό το κριτήριο δεν πληρείται αλλά, όπως θα δειχθεί από τα αποτελέσματα δεν υπήρξε καθοριστικό για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων υπήρχε ροή αζώτου 10 ml/min. Το πρώτο στάδιο της διαδικασίας μεταπολυμερισμού πραγματοποιήθηκε στους 80 °C και το δεύτερο στους 90 °C.

4.4 Χαρακτηρισμός προϊόντων

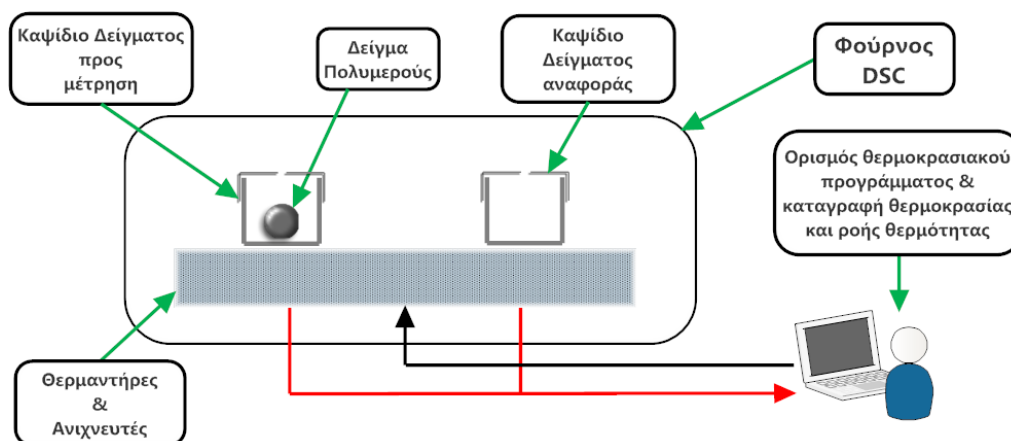
Για τη σωστή διεξαγωγή των πειραμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων πολυμερικών προϊόντων. Έτσι, η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει θερμικές μεθόδους ανάλυσης (DSC, TGA) για τη μελέτη των θερμικών χαρακτηριστικών των προϊόντων, φασματοσκοπία NMR για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους των προϊόντων και ιξωδομετρία διαλύματος, επίσης για τον προσδιορισμό του μέσου-βάρους μοριακού βάρους. Στα επόμενα υποκεφάλαια πραγματοποιείται σύνοψη των γενικών αρχών κάθε μεθόδου και της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

4.4.1 Προσδιορισμός θερμικών μεταπτώσεων μέσω DSC

I. Περιγραφή μεθόδου

Η Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) αποτελεί μία διαδεδομένη μέθοδο θερμικής ανάλυσης πολυμερικών υλικών για τη μελέτη των θερμικών μεταπτώσεών τους. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη εξαιτίας κυρίως της ταχύτητας, της ευκολίας πραγματοποίησης και της διαθεσιμότητάς της [51]. Μέσω της DSC δύναται να προσδιοριστούν φυσικές ή χημικές αλλαγές σε ένα δείγμα ως συνέπεια της μεταβολής της θερμοκρασίας. Σε αυτές τις αλλαγές περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων η θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g), η θερμοκρασία (T_c) και η ενθαλπία (ΔH_c) κρυσταλλώσεως, η θερμοκρασία (T_m) και η ενθαλπία (ΔH_m) τήξης κρυσταλλικών πολυμερών και η θερμοκρασία θερμικής διάσπασης (T_d).

Η διάταξη DSC πραγματοποιεί «σάρωση» μίας ορισμένης από το χρήστη θερμοκρασιακής περιοχής και μελετά τη συμπεριφορά του δείγματος του πολυμερούς καθώς θερμαίνεται. Ειδικότερα, η διάταξη φέρει δύο θερμαινόμενους υποδοχείς στους οποίους τοποθετούνται κατάλληλες κυψελίδες/δειγματοφορείς/καψίδια (pans) αλουμινίου. Η μία κυψελίδα περιέχει το δείγμα, ενώ η άλλη κυψελίδα ονομάζεται κυψελίδα αναφοράς (reference) και είναι συνήθως κενή. Το περιβάλλον των υποδοχέων είναι κλειστό και συνήθως αδρανές γεγονός που επιτυγχάνεται με ροή αζώτου ή ευγενών αερίων. Ο θερμικός ελεγκτής αρχίζει να θερμαίνει ταυτόχρονα τους υποδοχείς που φέρουν τις κυψελίδες με ρυθμό θέρμανσης ορισμένο από το χρήστη. Η θερμοκρασία των υποδοχέων προσδιορίζεται με μεγάλη ακρίβεια μέσω θερμοστοιχείων.



Σχήμα 12. Απεικόνιση διάταξης DSC

Τα δύο καψίδια διαφέρουν ως προς το περιεχόμενό τους (φορτωμένο και κενό) και επομένως το φορτωμένο με δείγμα καψίδιο απαιτεί περισσότερη θερμότητα/ισχύ για να κρατήσει το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας του ίσο με τον αντίστοιχο ρυθμό στο καψίδιο αναφοράς. Η αρχή της DSC βασίζεται στη μέτρηση των διαφορών ροής θερμότητας μεταξύ του δείγματος και του δείγματος αναφοράς σε συνάρτηση με το χρόνο ή/και τη θερμοκρασία, για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας, καθώς τα δύο δείγματα θερμαίνονται ή ψύχονται με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα [51][52]. Στα γραφήματα DSC οι ενδόθερμες διεργασίες, όπως η τήξη, (π.χ τήξη) καταγράφονται ως κορυφές, συνήθως θετικές και οι εξώθερμες, όπως η κρυστάλλωση, συνήθως ως αρνητικές κορυφές. Τα εμβαδά που περικλείονται στις κορυφές εκφράζουν την απορροφούμενη (για ενδόθερμες διεργασίες) ή εκλυόμενη (για εξώθερμες) θερμότητα, η οποία ανάγεται στη μάζα του δείγματος που έχει χρησιμοποιηθεί (διαδικασία κανονικοποίησης) [52][53]. Περισσότερες πληροφορίες για τη διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) ως μέθοδο θερμικού χαρακτηρισμού πολυμερών είναι διαθέσιμες στην αναφορά [53].

II. Πειραματική διαδικασία

Ο χαρακτηρισμός των προϊόντων των αντιδράσεων πραγματοποιήθηκε με χρήση της συσκευής DSC 1 STAR^o System της Mettler Toledo. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε την τοποθέτησή υλικού 5 - 10 mg σε κατάλληλα κυλινδρικά καψίδια (pans) αλουμινίου, ζύγιση των δειγμάτων και αεροστεγή σφράγιση των καψιδίων με μεταλλικά καλύμματα με τη βοήθεια ειδικής πρέσας. Στο κάλυμμα δημιουργήθηκε οπή εξαερισμού στο μέγεθος της μύτης βελόνας. Το μικρό μέγεθος του δείγματος προϋποθέτει μέριμνα ώστε το δείγμα να είναι όσο το δυνατό πιο αντιπροσωπευτικό της κύριας μάζας του προϊόντος. Έπειτα, το εκάστοτε δείγμα είναι έτοιμο προς τοποθέτηση στον αντίστοιχο υποδοχέα της διάταξης DSC.



Σχήμα 13. Συσκευή Mettler DSC 1 STAR[®] System

Οι θερμοκρασιακές συνθήκες πραγματοποίησης των μετρήσεων ήταν τέτοιες, ώστε να αναδεικνύονται οι θερμικές ιδιότητες των προϊόντων. Αυτό σημαίνει ότι τα δείγματα υπεβλήθησαν σε θερμικούς κύκλους, περνώντας από θερμοκρασίες όπου συμβαίνουν θερμικές μεταπτώσεις. Στο περιβάλλον των υποδοχέων δημιουργήθηκε αδρανής ατμόσφαιρα με ροή αζώτου (20 ml min^{-1}). Για το χαρακτηρισμό των περισσότερων δειγμάτων εφαρμόστηκε ο θερμικός κύκλος 1, που περιγράφεται παρακάτω με βήμα μεταβολής της θερμοκρασίας $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$:

- $30 \rightarrow -70 \text{ }^\circ\text{C}$ (ψύξη)
- 2 min στους $-70 \text{ }^\circ\text{C}$
- $-70 \rightarrow 150 \text{ }^\circ\text{C}$ (θέρμανση)
- 2 min στους $150 \text{ }^\circ\text{C}$
- $150 \rightarrow -10 \text{ }^\circ\text{C}$ (ψύξη)
- 2 min στους $-10 \text{ }^\circ\text{C}$
- $-10 \rightarrow 150 \text{ }^\circ\text{C}$ (θέρμανση)

Η πρώτη ψύξη ως τους $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ οφείλεται στο γεγονός ότι κάποια από τα προϊόντα ήταν υγρά ή υδαρά στερεά και ψύχοντας θα μπορούσε να διακριθεί κάποιο φαινόμενο πήξης που να σχετίζεται με τα μονομερή. Η αρχική ψύξη θα μπορούσε, επίσης, να αναδείξει το σημείο υαλώδους μετάπτωσης, T_g , το οποίο για εμπορικά PBS είναι περίπου $-32 \text{ }^\circ\text{C}$ (Πίνακας 2). Η δεύτερη θέρμανση γίνεται με σκοπό να «σβήσει» η θερμική ιστορία του υλικού. Έτσι, τα σημεία κρυστάλλωσης και τήξης της δεύτερης ψύξης και θέρμανσης, αντίστοιχα, αποτελούν εγγενή χαρακτηριστικά του πολυμερούς.

Σε κάποια δείγματα που προέρχονταν από αντιδράσεις με κουτινάση εφαρμόστηκε ένας διαφορετικός θερμικός κύκλος, ο οποίος είχε εφαρμοστεί στο παρελθόν για το χαρακτηρισμό του ηλεκτρικού διαιθυλεστέρα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτά τα δείγματα τέθηκαν για χαρακτηρισμό στις αρχές της εργασίας, οπότε δεν είχαν ληφθεί ακόμη φάσματα NMR, ώστε να υπάρχει καλύτερη εικόνα για την ποιότητα του δείγματος. Έτσι, αυτός ο θερμικός κύκλος (κύκλος 2) χρησιμοποιήθηκε στα δείγματα αυτά κάνοντας την υπόθεση πως το υγρό προϊόν αποτελούταν από μονομερή ή απλό ηλεκτρικό βουτυλεστέρα. Ο κύκλος 2 περιγράφεται ως εξής:

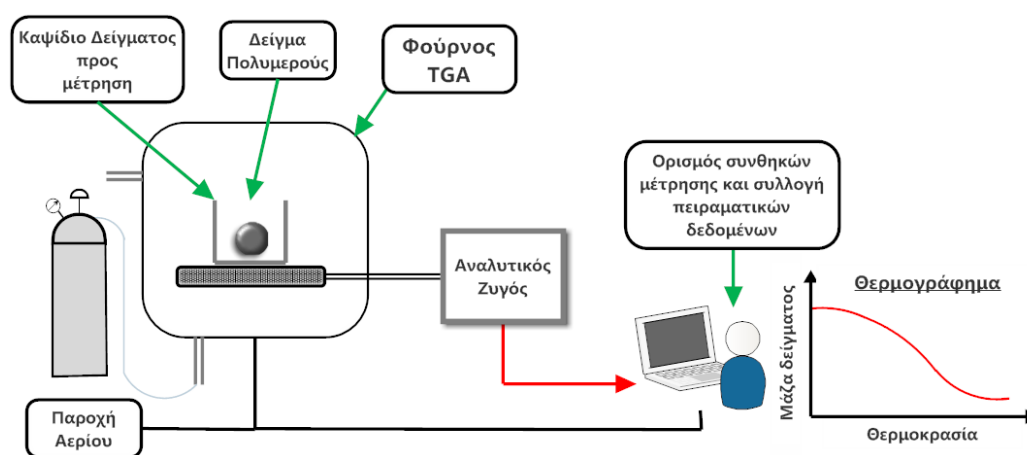
- 30 → -70 °C (ψύξη), -10 °C/min, N₂ 20 ml/min
- 2 min στους -70 °C
- -70 → 180 °C (θέρμανση), 10 °C/min

Για όλα τα δείγματα που προέρχονται από αντιδράσεις με N435 εφαρμόστηκε ο κύκλος 1. Ο ίδιος κύκλος εφαρμόστηκε και σε κάποια δείγματα από αντίδραση με κουτινάση, ενώ ο κύκλος 2 εφαρμόστηκε στα δείγματα αντιδράσεων με χρήση κουτινάσης «τολουόλιο – 50 °C» και «ισοοκτάνιο – 50 °C». Για τα δείγματα κουτινάσης των 60 °C δεν έγιναν χαρακτηρισμοί.

4.4.2 Προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας μέσω TGA

I. Περιγραφή μεθόδου

Η θερμοσταθμική ή θερμοβαρμετρική ανάλυση (Thermogravimetric Analysis - TGA) αποτελεί μία διαδεδομένη θερμική μέθοδο ανάλυσης. Η TGA είναι η τεχνική η οποία καταγράφει τη μάζα (βάρος) του δείγματος, καθώς αυτό θερμαίνεται σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Το βασικότερο τμήμα του οργάνου είναι ένας αναλυτικός ζυγός μεγάλης ακρίβειας μέσα σε ένα φούρνο. Το όργανο καλείται και θερμοζυγός (thermobalance) εξαιτίας του ζυγού που φέρει. Τα κύρια τμήματα μίας σύγχρονης TGA διάταξης είναι ο ζυγός, ο φούρνος και το σύστημα ελέγχου των λειτουργικών παραμέτρων/επεξεργασίας δεδομένων (Σχήμα 14) [52].



Σχήμα 14. Απλοποιημένη απεικόνιση διάταξης TGA

Η θερμοσταθμική ανάλυση μελετά τη θερμική συμπεριφορά των υλικών και πιο συγκεκριμένα εφαρμόζεται συνήθως για τη μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητάς τους, όταν αυτά θερμαίνονται κάτω από διάφορες συνθήκες. Η έκθεση του δείγματος σε ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα οδηγεί στη συλλογή πληροφοριών για τις διεργασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στο βάρος του δείγματος. Αυτές οι διεργασίες δύναται να είναι θερμική διάσπαση του υλικού, οξείδωση του υλικού, αντιδράσεις με αέρια, αφαίρεση της υγρασίας ή διαλυτών και άλλες φυσικές ή χημικές διαδικασίες που σχετίζονται με αλλαγή στο βάρος του

δείγματος. Επιπλέον, χρησιμοποιείται για τη μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων που εμφανίζονται κατά τη θερμική καταπόνηση του υλικού [52].

Κατά την TG ανάλυση το υπό εξέταση δείγμα θερμαίνεται σε ορισμένες από το χρήστη συνθήκες ανάλυσης και καταγράφεται συνεχώς το βάρος του, η θερμοκρασία και ο χρόνος. Οι σημαντικότερες παράμετροι του πειράματος είναι ο ρυθμός θέρμανσης του δείγματος, η αρχική και τελική θερμοκρασία του φούρνου, ο χρόνος ισοθερμοκρασιακής καταπόνησης, το περιβάλλον αερίου μέσα στο φούρνο και η ποσότητα του αναλυόμενου δείγματος [52]. Όσον αφορά το περιβάλλον αερίου δύναται να είναι αδρανές (π.χ He, N₂, Ar), οξειδωτικό (π.χ O₂, αέρας) ή αναγωγικό (π.χ 8 – 10 % H₂ σε N₂) [53].

Ένα τυπικό διάγραμμα θερμοσταθμικής ανάλυσης παρουσιάζει συνήθως την αλλαγή στο βάρος (w) του δείγματος συναρτήσει της θερμοκρασίας και το ρυθμό μεταβολής του βάρους (dw/dT). Οι συχνά παρατηρούμενες απώλειες βάρους του υλικού σε χαμηλές θερμοκρασίες οφείλονται συνήθως σε εκροφήσεις συστατικών, όπως π.χ της υγρασίας γύρω στους 100 °C. Η διάσπαση των πολυμερών που ακολουθεί συνήθως σε υψηλότερες θερμοκρασίες δύναται να είναι ενός ή περισσότερων σταδίων. Ως θερμοκρασία αποικοδόμησης/διάσπασης (T_d) ορίζεται συχνά η θερμοκρασία όπου παρατηρείται η μέγιστη μεταβολή βάρους. Το σημείο αυτό καθορίζεται εύκολα μέσω του γραφήματος της πρώτης παραγώγου της μεταβολής βάρους (dw) ως προς τη θερμοκρασία. Η διαδικασία αξιοποίησης της πρώτης παραγώγου της μεταβολής βάρους (dw) συναρτήσει της θερμοκρασίας για το προσδιορισμό θερμοκρασιών έναρξης και λήξης διεργασιών απώλειας βάρους περιγράφεται κατά ASTM στην αναφορά. Περισσότερες πληροφορίες για τη θερμοβαρυσμική ανάλυση (TGA) ως μέθοδο θερμικού χαρακτηρισμού πολυμερών είναι διαθέσιμες στην παραπομπή [52][53].

II. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με χρήση του θερμοζυγού TGA/DSC 1 STAR^o System της Mettler Toledo (Σχήμα 15). Τα δείγματα που τέθηκαν σε θερμική επεξεργασία, είχαν ξηραθεί προηγουμένως. Τα περισσότερα από αυτά τοποθετούνταν στο θερμοζυγό αμέσως μετά την επεξεργασία τους στη συσκευή DSC, με χρήση του ίδιου καψιδίου. Τα περισσότερα δείγματα θερμάνθηκαν από τους 25 στους 500 °C με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min και ροή φέροντος αερίου αζώτου.



Σχήμα 15. Συσκευή Mettler Toledo TGA/DSC 1 STARe System

Από το θερμογράφημα που προκύπτει εξάγονται με κατάλληλη επεξεργασία η T_d και το επί τοις εκατό υπόλειμμα μάζας (% Y. M) το οποίο προκύπτει ως το % κλάσμα της τελικής μάζας που παραμένει στο θερμοζυγό προς την αρχική μάζα του δείγματος.

4.4.3 Ταυτοποίηση προϊόντων και προσδιορισμός μέσου-αριθμού Μοριακού Βάρους μέσω Φασματοσκοπίας NMR

I. Αρχή λειτουργίας

Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance: NMR) είναι ένα φαινόμενο απορρόφησης ενέργειας που λαμβάνει χώρα όταν πυρήνες συγκεκριμένων ατόμων, οι οποίοι βρίσκονται σε στατικό μαγνητικό πεδίο, εκτεθούν σε δεύτερο μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο. Αυτή η απορρόφηση ενέργειας είναι χαρακτηριστική για κάθε άτομο συζευγμένο ή ελεύθερο και χρησιμοποιείται στον χαρακτηρισμό του μορίου [54].

Πολλά είδη πυρήνων, θετικά φορτισμένων, περιστρέφονται γύρω από κάποιον άξονα και λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες αλληλεπιδρώντας συνεπώς με ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, με αποτέλεσμα να αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Ενδεικτικά ένας περιστρεφόμενος πυρήνας ^1H ή ^{13}C (και κάθε πυρήνας με περιττό αριθμό πρωτονίων και κάθε πυρήνας με περιττό αριθμό νετρονίων) όταν τοποθετηθεί ανάμεσα στους πόλους ενός ισχυρού μαγνήτη, μπορεί να αποκτήσει τέτοιο προσανατολισμό ώστε το δικό του μικρό μαγνητικό πεδίο να διαταχθεί είτε παράλληλα προς το εξωτερικό πεδίο είτε αντιπαράλληλα. Ο παράλληλος προσανατολισμός είναι χαμηλότερης ενέργειας, ευνοώντας σχετικά αυτή την κατάσταση του spin έναντι του αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με κατάλληλης συχνότητας ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, λαμβάνει χώρα απορρόφηση ενέργειας και η κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας αλλάζει φορά προς την κατάσταση υψηλότερης ενέργειας (αναστροφή spin). Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονιστεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία και εξαιτίας αυτού προκύπτει ο όρος «πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός».

Επίσης οι πυρήνες περιβάλλονται από ηλεκτρόνια και, όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία. Αυτά δρουν αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι λίγο μικρότερο από το εξωτερικό. Συνεπώς, οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου λόγω των ηλεκτρονίων που τους περιβάλλουν. Επειδή κάθε πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα. Έτσι λαμβάνουμε διαφορετικό σήμα NMR για κάθε διακριτό πυρήνα άνθρακα ή υδρογόνου κάποιου μορίου.

Σε ένα φάσμα ^1H -NMR ο οριζόντιος άξονας καταγράφει το πραγματικά εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο που υφίστανται οι πυρήνες, ενώ ο κατακόρυφος άξονας δείχνει

την ένταση απορρόφησης της ενέργειας. Κάθε κορυφή στο φάσμα αντιστοιχεί σε έναν χημικά διακριτό πυρήνα του μορίου [55].

Σε ένα φάσμα $^1\text{H-NMR}$ η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά. Έτσι, το αριστερό τμήμα του γραφήματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου και το δεξιό η πλευρά υψηλού πεδίου. Γενικά τα υδρογόνα δίπλα σε κορεσμένα κέντρα εμφανίζονται σε μικρές τιμές (δεξιά πλευρά φάσματος), λόγω της μεγαλύτερης προστασίας τους από τα περιβάλλοντα ηλεκτρόνια. Για το συντονισμό αυτών των υδρογόνων απαιτείται ισχυρότερο μαγνητικό πεδίο. Αντίθετα, τα πρωτόνια που είναι συνδεδεμένα με άνθρακες που έχουν δίπλα τους ηλεκτραρνητικά άτομα (π.χ. N, O) προστατεύονται λιγότερο αποτελεσματικά και χρειάζονται ασθενέστερο εφαρμοζόμενο πεδίο για να συντονισθούν και απορροφούν στην αριστερή πλευρά του φάσματος.

Το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή. Μετρώντας ηλεκτρονικά, δηλαδή ολοκληρώνοντας το εμβαδόν κάθε κορυφής, είναι δυνατό να μετρήσουμε τον σχετικό αριθμό των κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο.

Συχνό φαινόμενο αποτελεί, ωστόσο, η απορρόφηση ενός πρωτονίου (μια κορυφή ενός πυρήνα) να διασπάται σε πολλές στενές κορυφές. Το φαινόμενο αυτό αποκαλείται σχάση spin-spin και προκαλείται από την αλληλεπίδραση ή σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών χημικά ισοδύναμων ατόμων [56].

Τελικά, οι πληροφορίες που δίνει ένα φάσμα NMR είναι:

- *Ο αριθμός των σημάτων:* πόσα διαφορετικά είδη πρωτονίων υπάρχουν
- *Η θέση (χημική μετατόπιση) των σημάτων:* είναι το πρωτόνιο θωρακισμένο ή αποπροστατευμένο
- *Η ένταση (ολοκλήρωση) του σήματος:* ανάλογη του πλήθους πρωτονίων αυτού του είδους
- *Σχάση σήματος (πολλαπλότητα):* ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων

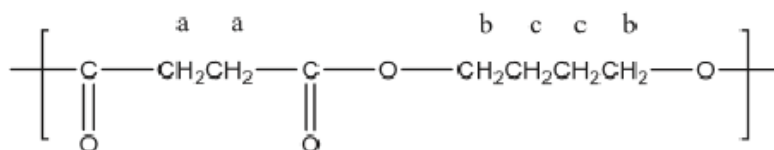
II. Πειραματική διαδικασία

Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε σε δύο συσκευές $^1\text{H-NMR}$ του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, εκ των οποίων η μία λειτουργεί σε συχνότητα 300 MHz και η άλλη στα 600 MHz. Η χρήση διαφορετικών συσκευών μπορεί να είναι αιτία για μετατοπισμένες κορυφές μεταξύ των φασμάτων. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (CDCl_3). Κάθε δείγμα προς ανάλυση ζύγιζε περίπου 10-12 mg.

a. Ταυτοποίηση μορίων PBS

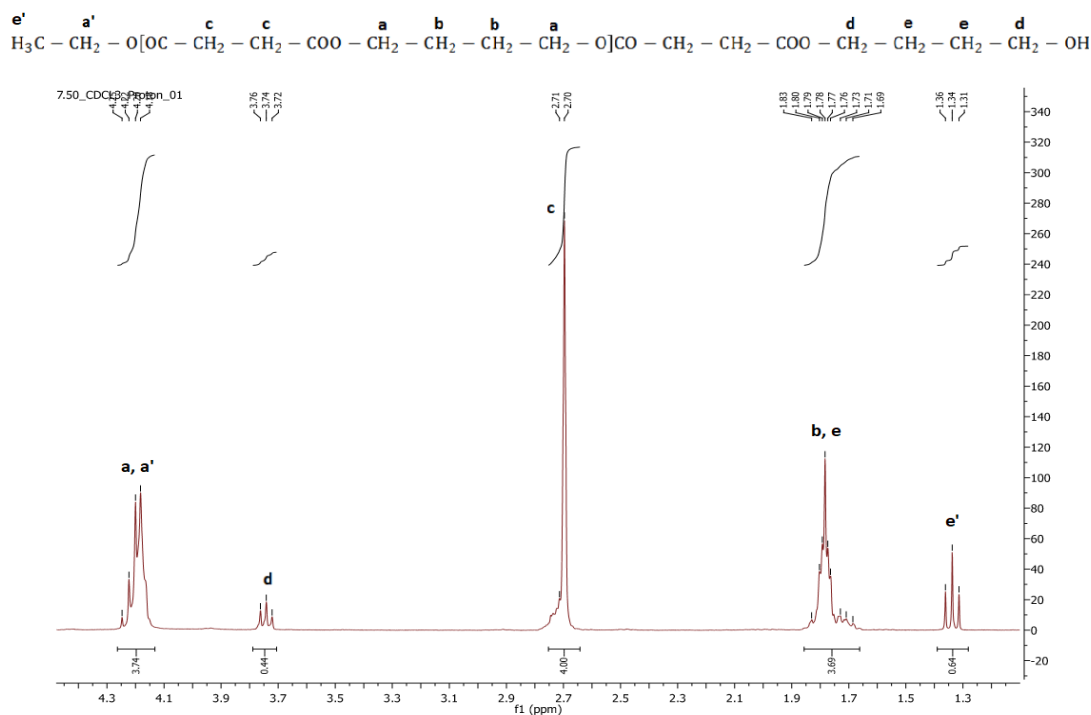
Η δομική μονάδα του PBS παριστάνεται στο Σχήμα 16, όπου κατηγοριοποιούνται τα διάφορα είδη πρωτονίων που συναντώνται σε αυτήν ανάλογα με τη θέση τους στην πολυανθρακική αλυσίδα. Για να αξιολογηθούν όσο το δυνατόν περισσότερες κορυφές στα φάσματα είναι χρήσιμο να δοθεί μια ευρεία εικόνα των μορίων που να περιλαμ-

βάνει και τις ακραίες ομάδες αυτών, όχι με την τυπική έννοια των ακραίων ομάδων αλλά βάσει των ακραίων τμημάτων των αλυσίδων που αναγνωρίζει το όργανο (Σχήμα 17).



Σχήμα 16. Δομική μονάδα PBS'

Το φάσμα ενός δείγματος PBS διαθέτει κάποιες χαρακτηριστικές κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στα διάφορων ειδών υδρογόνα των μορίων ανάλογα με το πού αυτά παρουσιάζουν απορρόφηση. Η θέση στον οριζόντιο άξονα της χημικής μετατόπισης (δ) των πιο σημαντικών κορυφών και τα υδρογόνα στα οποία αντιστοιχούν για ένα τυπικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του PBS παρουσιάζονται στον Πίνακα 23, δίνοντας ενδεικτικά τιμές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία [6][57][58]. Επίσης, το Σχήμα 17 απεικονίζει ένα φάσμα δείγματος PBS που παράχθηκε στα πλαίσια της εργασίας με χρήση N435 και τεχνική μάζας στους $50\text{ }^\circ\text{C}$, ώστε να δοθεί μια γενική εικόνα των φασμάτων που προκύπτουν και να αντιστοιχιστούν τα διάφορα είδη υδρογόνων στις κορυφές. Η κορυφή του χρησιμοποιούμενου διαλύτη, CDCl_3 , τοποθετείται στα $7,26\text{ ppm}$. Όπως παρατηρείται, όσο πιο προστατευμένα είναι τα υδρογόνα, τόσο πιο δεξιά στον οριζόντιο άξονα βρίσκονται οι κορυφές που τα αντιπροσωπεύουν. Για παράδειγμα, τα υδρογόνα a βρίσκονται πιο αριστερά σε σχέση με τα υδρογόνα b, αφού τα πρώτα είναι ιδιαίτερα αποπροστατευμένα λόγω της ύπαρξης ατόμων οξυγόνου κοντά τους.



Σχήμα 17. Φάσμα NMR ενός δείγματος PBS που παράχθηκε με τεχνική μάζας στους $50\text{ }^\circ\text{C}$

Πίνακας 23. Ταξινόμηση υδρογόνων ανάλογα με τη θέση τους μέσα στην αλυσίδα και σημεία όπου απορροφούν ενέργεια.

Χαρακτηριστικά θέσης υδρογόνου	Θέση	Ονομασία υδρογόνων σύμφωνα με το Σχήμα 17.	δ (ppm)	Πολλαπλότητα κορυφής
Ανήκουν σε άτομο C που βρίσκεται δίπλα στον εστερικό δεσμό, εντός της δ.μ.	-CH ₂ CH ₂ C(O)OCH ₂ -	a	4,16	
Ανήκουν σε άτομο C της ακραία αιθυλομάδας, που συνδέεται με O, εκτός της δ.μ.	H ₃ C-CH ₂ -O-[OC-	a'		
Ανήκουν σε άτομο C που βρίσκεται δίπλα σε απλά άτομα C, εντός της δ.μ.	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -	b	1,70	
Ανήκουν στα εσωτερικά άτομα C της ακραίας βουτυλομάδας, εκτός της δ.μ.	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ - OH	e		
Ανήκουν σε άτομο C που βρίσκεται δίπλα στον C του εστερικού δεσμού, εντός της δ.μ.	-CH ₂ CH ₂ C(O)OCH ₂ -	c	2,62	
Ανήκουν σε άτομο C που βρίσκεται δίπλα στον εστερικό δεσμό, εκτός της δ.μ. και στον C που ενώνεται με το ακραίο –OH.	-C(O)OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -OH	d	3,67	
Ανήκουν σε άτομο C της αιθυλομάδας που ενώνεται με άτομο O, εκτός της δ.μ.	-CO]-O-CH ₂ CH ₃	e'	1,26	

b. Προσδιορισμός μέσου-αριθμού Μοριακού Βάρους

Η σχέση από την οποία εξάγεται το μέσου-αριθμού μοριακό βάρος είναι η εξής [59]:

$$\overline{M}_n = n \cdot m_0 + M_{\text{end groups}} \quad (1)$$

όπου

n : ο αριθμός επανάληψης της δομικής μονάδας

m_0 : το μοριακό βάρος της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας, που ισούται με 172 g/mol και

$M_{\text{end groups}}$: το μοριακό βάρος των ακραίων ομάδων σε g/mol.

Στην περίπτωση υπολογισμού του μοριακού βάρους του PBS, τα υδρογόνα των θέσεων c, του εστερικού δεσμού στο εσωτερικό της δομικής μονάδας, πρέπει να εμφανίζουν ένταση απορρόφησης 4 και αυτό ορίζεται, επειδή σε μια δομική μονάδα υπάρχουν 4 τέτοια υδρογόνα. Η κορυφή που αντιστοιχεί σε αυτά τα υδρογόνα επιλέγεται ως κορυφή αναφοράς των ολοκληρώσεων, καθώς αποτελεί την πιο ξεκάθαρη κορυφή του φάσματος. Επίσης, επιλέγεται ακόμη μια κορυφή που αντιστοιχεί σε ακραίες ομάδες (έστω υδρογόνα d) και ο αριθμός επανάληψης της δομικής μονάδας, n , ορίζεται ως εξής:

$$n = \frac{I_{\text{-COO-}}}{I_{\text{end groups}}} \quad (2)$$

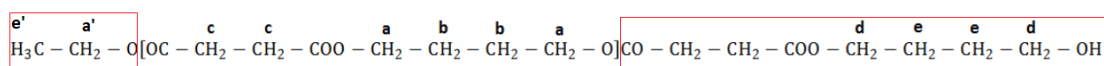
όπου

$I_{\text{-COO-}}$: η ένταση απορρόφησης που αντιστοιχεί στην τριπλέτα των υδρογόνων c εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής ομάδας, η οποία έχει οριστεί 4 και

$I_{\text{end groups}}$: η ένταση απορρόφησης που αντιστοιχεί στην τριπλέτα των υδρογόνων d στη θέση δίπλα από την ακραία υδοξυλομάδα.

Σε αυτή την περίπτωση, τα ακραία τμήματα (Σχήμα 18) έχουν μοριακό βάρος:

$$M_{\text{end groups}} = 218 \text{ g/mol}$$



Σχήμα 18. Ακραίες ομάδες μακρομορίων

Έτσι, το μέσου-αριθμού μοριακό βάρος προκύπτει:

$$\overline{M}_n = m_0 \cdot \frac{I_{\text{-COO-}}}{I_{\text{end groups}}} + M_{\text{end groups}} \quad (3)$$

Η σχέση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους πολυεστέρων [6] αλλά και πολυ(εστεραμιδίων) [60].

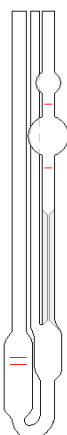
Όπως φαίνεται, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των ακραίων ομάδων και άρα αυξημένη η ένταση της ενέργειας που αυτές απορροφούν, τόσο μικρότερος είναι ο βαθμός πολυμερισμού του πολυμερούς και το μοριακό του βάρος.

4.4.4 Προσδιορισμός μέσου-βάρους μοριακού βάρους με ιξωδομετρία διαλύματος

I. Περιγραφή μεθόδου

Το υψηλό μοριακό βάρος των πολυμερών αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες καθορισμού των χαρακτηριστικών τους ιδιοτήτων. Επομένως, ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους τους αποτελεί μία χρήσιμη αναλυτική διαδικασία. Μια από τις μεθόδους προσδιορισμού είναι η ιξωδομετρία διαλύματος. Πρόκειται για μία ιδιαίτερα διαδεδομένη έμμεση τεχνική προσδιορισμού του μοριακού βάρους των πολυμερών εξαιτίας της ευκολίας υλοποίησής της, της ταχύτητάς της και του χαμηλού κόστους εξοπλισμού της [61][62].

Απαραίτητη προϋπόθεση χρησιμοποίησης της ιξωδομετρίας ως μέθοδο προσδιορισμού του μοριακού βάρους αποτελεί η ύπαρξη κατάλληλου διαλύτη για το εξεταζόμενο πολυμερές [61]. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο του ASTM, για δοκιμές ιξωδομετρίας αραιών διαλυμάτων πρέπει τα πολυμερή να διαλύονται πλήρως στο χρησιμοποιούμενο διαλύτη, να μην αντιδρούν με αυτόν, να μη συμμετέχουν σε αντιδράσεις αποπολυμερισμού και να σχηματίζουν σταθερά διαλύματα σε θερμοκρασίες από 25 °C έως 150 °C [63].



Σχήμα 19. Ιξωδόμετρο τριχοειδούς ροής αιωρούμενης στάθμης τύπου Ubbelohde

Το ιξώδες ενός αραιού διαλύματος πολυμερούς σχετίζεται με το μοριακό βάρος του πολυμερούς με μία γνησίως αύξουσα συμπεριφορά. Επιπλέον, το απόλυτο ιξώδες (η) συσχετίζεται με το χρόνο εκροής του υγρού (t) και με τις διαστάσεις ενός τριχοειδούς ιξωδομέτρου σύμφωνα με την εξίσωση του Poiseuille [61][62]. Επομένως, ο υπολογισμός του μοριακού βάρους του πολυμερούς δύναται να πραγματοποιηθεί έμμεσα με καταγραφή του χρόνου ροής ενός πολυμερικού διαλύματος από ένα τριχοειδές.

$$\eta = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 V L} t \quad (4)$$

όπου:

η : το απόλυτο ιξώδες του ρευστού,

ΔP : η διαφορά πίεσης ανάμεσα στα δύο άκρα του τριχοειδούς,

r : η ακτίνα του τριχοειδούς,

t : ο χρόνος εκροής του ρευστού,

V : ο όγκος του εκρέοντος υγρού,

L : το μήκος του τριχοειδούς του ιξωδομέτρου.

Η εξίσωση του Poiseuille (Εξίσωση 4) μπορεί να γραφεί στην ακόλουθη μορφή [61][62]:

$$\eta = K_V \rho t \quad (5)$$

όπου η το απόλυτο ιξώδες (cP), ρ η πυκνότητα του ρευστού (g ml^{-1}), K_V η σταθερά του ιξωδομέτρου ($\text{mm}^2 \text{s}^{-2}$), που εξαρτάται από τα γεωμετρικά του χαρακτηριστικά και t ο χρόνος εκροής (s).

Βάση της Εξίσωσης 5 προκύπτουν ορισμένες χρήσιμες εκφράσεις ιξώδους οι οποίες υπολογίζονται πειραματικά χρησιμοποιώντας το χρόνο εκροής τόσο του διαλύτη (t_0) όσο και του πολυμερικού διαλύματος (t) γνωστής συγκέντρωσης (C). Ο Πίνακας 24 συνοψίζει αυτές τις εκφράσεις [61], [62]. Η σταθερά του ιξωδομέτρου είναι σταθερή και δεν είναι συνάρτηση της φύσης του εξεταζόμενου ρευστού, επομένως διάλυμα και διαλύτης έχουν ίδια τιμή σταθεράς ιξωδομέτρου K_V .

Μία σημαντική παρατήρηση είναι ότι καθώς η συγκέντρωση του πολυμερούς στο διάλυμα, C , τείνει στο μηδέν, τότε η η πυκνότητα του διαλύματος (ρ) τείνει να αποκτήσει την πυκνότητα του διαλύτη (ρ_0). Αυτή η συμπεριφορά οδηγεί σε απλοποίηση των υπολογισμών αν τα παρασκευαζόμενα πολυμερικά διαλύματα θεωρηθούν αρκούντως αραιά ($\leq 1\% \text{ w/v}$) [61].

Πίνακας 24. Χρήσιμες εκφράσεις ιξώδους για την ιξωδομετρία διαλύματος

Όρος	Μονάδες Μεγεθών	ISO (IUPAC)	BS 5168
$v = \frac{\eta}{\rho}$	η : σε cP ρ : σε $\frac{g}{ml}$ v : σε cSt	Λόγος Ιξώδους - Πυκνότητας	Κινηματικό Ιξώδες
$\eta_{rel} = RV = \frac{\eta}{\eta_0}$	η_0 : απόλυτο ιξώδες διαλύτη σε cP	Λόγος Ιξώδους (Viscosity Ratio)	Σχετικό Ιξώδες (Relative Viscosity)
$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = RV - 1$	-	Σχετική Αύξηση Ιξώδους	Ειδικό Ιξώδες (Specific Viscosity)
$\eta_{red} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 \cdot C} = \frac{\eta_{sp}}{C}$	C : συγκέντρωση διαλύματος σε (g/100ml) η_{red} : σε $\frac{dl}{g}$	Αριθμός Ιξώδους	Ανηγμένο Ιξώδες (Reduced Viscosity)
$\eta_{inh} = \frac{\ln \frac{\eta}{\eta_0}}{C} = \frac{\ln RV}{C}$	η_{inh} : σε $\frac{dl}{g}$	Λογαριθμικός Αριθμός Ιξώδους	Συμφυές Ιξώδες (Inherent Viscosity)
$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{C} = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{red}$	$[\eta]$: σε $\frac{dl}{g}$	Οριακός Αριθμός Ιξώδους (Limiting Viscosity Number)	Εσωτερικό Ιξώδες (Intrinsic Viscosity)

II. Προσδιορισμός οριακού αριθμού ιξώδους

Για άπειρη αραιώση διαλύματος, δηλαδή όταν η συγκέντρωση του πολυμερούς στο διαλύτη τείνει στο μηδέν, τότε η τιμή του αριθμού ιξώδους (η_{red}) ονομάζεται οριακός αριθμός ιξώδους ή εσωτερικό ιξώδες $[\eta]$. Σε αραιά διαλύματα πολυμερών, ($\eta_{sp} \ll 1$, $[\eta] C \ll 1$), ο προσδιορισμός του $[\eta]$ δύναται να πραγματοποιηθεί μέσω της σειράς Huggins [61], [64]:

$$\eta_{red} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C + \dots \quad (6)$$

όπου:

k_H : σταθερά Huggins, ανεξάρτητη του μοριακού βάρους, η οποία εξαρτάται από το σύστημα πολυμερούς-διαλύτη-θερμοκρασίας και λαμβάνει τιμές από 0,3 (πλούσιος διαλύτης) έως 0,5 (φτωχός διαλύτης).

Μία καλή εκτίμηση του οριακού αριθμού ιξώδους $[\eta]$ προκύπτει από μετρήσεις ιξώδους σε μία δεδομένη συγκέντρωση (single point determination) χρησιμοποιώντας πλήθος εκφράσεων [61], [64].

Τέλος, ο οριακός αριθμός ιξώδους $[\eta]$ συνδέεται με το μέσου – ιξώδους μοριακό βάρος μέσω της εξίσωσης των Mark – Houwing – Sakurada [61]:

$$[\eta] = K M_V^a \quad (7)$$

όπου:

K : σταθερά για ορισμένη θερμοκρασία και σύστημα πολυμερούς-διαλύτη με τιμές συνήθως από 0,5 έως $5 \times 10^{-4} (\text{dl g}^{-1})(\text{g mol}^{-1})^{-a}$,

M_V : μέσου – ιξώδους μοριακό βάρος πολυμερούς (g mol^{-1}),

a : σταθερά για ορισμένη θερμοκρασία και σύστημα πολυμερούς-διαλύτη με τιμές από 0,5 (φτωχός διαλύτης) έως 0,8 (πλούσιος διαλύτης).

III. Πειραματική διαδικασία

Τα δείγματα που αναλύθηκαν με ιξωδομετρία διαλύματος ήταν το προϊόν του ενζυμικού πολυμερισμού μεγάλης κλίμακας με χρήση N435, καθώς και τα προϊόντα των δοκιμών μεταπολυμερισμού του αρχικού προϊόντος της μεγάλης κλίμακας, όπως θα εξηγηθεί στη συνέχεια. Οι δοκιμές μεταπολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν στο θερμοζυγό του TGA μέσα στα μεγαλύτερα διαθέσιμα pans των 100 μl. Αυτό σημαίνει πως το προϊόν του μεταπολυμερισμού έπρεπε να είναι αρκετό, ώστε να μπορέσει να δημιουργήσει διάλυμα με συγκέντρωση περίπου 0,5 g/dL. Σε συγκεντρώσεις μικρότερες των 0,4 g/dL δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστεί διαφορά ανάμεσα στους χρόνους εκροής του διαλύματος και του διαλύτη, αφού το μοριακό βάρος των δειγμάτων είναι αρκετά χαμηλό. Έτσι, τα διαλύματα που δημιουργήθηκαν είχαν συγκέντρωση περίπου 0,5 g/dL. Οι ιξωδομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 25 °C, χρησιμοποιώντας για διαλύτη χλωροφόρμιο (CHCl_3).

Αρχικά, ζυγίστηκαν ποσότητες περίπου 70 mg για κάθε δείγμα. Ακολούθησε διάλυσή του σε 15 ml χλωροφορμίου σε εσφυρισμένες κωνικές φιάλες των 50 ml. Τα δείγματα αφέθηκαν για μισή ώρα στις φιάλες με χρήση πώματος υπό ήπια μαγνητική ανάδευση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για να διασφαλιστεί η διάλυση του PBS στο διαλύτη. Ακόμη, ρυθμίστηκε η θερμοκρασία του υδατόλουτρου όπου θα βυθιστεί το ιξωδόμετρο. Η επιλογή της θερμοκρασίας έγινε λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς του πειράματος (π.χ πτητικότητα διαλύτη), αλλά και την τιμή θερμοκρασίας για την οποία υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για τις σταθερές K και a της εξίσωσης των Mark – Houwing – Sakurada (Εξίσωση 7) για το εξεταζόμενο σύστημα διαλύτη-πολυμερούς. Εν προκειμένω, οι σταθερές που επιλέχθηκαν έχουν ξαναχρησιμοποιηθεί εμφανίζοντας καλή προσαρμογή στην προκύπτουσα εξίσωση [57] και συνδέουν τον οριακό αριθμό ιξώδους, $[\eta]$, με το μέσου-βάρους μοριακό βάρος, \overline{M}_w . Στον Πίνακα 25 καταγράφονται οι τιμές των σταθερών, που θα χρησιμοποιηθούν για το σύστημα χλωροφορμίου – PBS στους 25 °C. Επομένως, η θερμοκρασία του υδατόλουτρου ρυθμίστηκε στους 25 °C.

Πίνακας 25. Σταθερές K και a της εξίσωσης Mark - Houwing - Sakurada

Διαλύτης	Πολυμερές	Θερμοκρασία (°C)	$K ((dl/g)(g/mol)^{-a})$	a
Χλωροφόρμιο	PBS	25	$1,28 \times 10^{-4}$	0,78

Με αντικατάσταση των σταθερών στην εξίσωση Mark – Houwing – Sakurada προκύπτει:

$$[\eta] = 1,28 \times 10^{-4} \overline{M}_w^{0,78} \quad (8)$$

με $[\eta]$ σε $(dl\ g^{-1})$ και \overline{M}_w σε $(g\ mol^{-1})$.

Ο προσδιορισμός του οριακού αριθμού ιξώδους $[\eta]$ για το υπό μελέτη σύστημα πραγματοποιείται μέσω της εξίσωσης των Solomon Ciuta [57][65]:

$$[\eta] = \frac{1}{C} \cdot \sqrt{2 \cdot (\eta_{sp} - \ln(\eta_r))} \quad (9)$$

Η παραπάνω εξίσωση σύμφωνα με τις σχέσεις του Πίνακα 24 και την Εξίσωση 5 και δεδομένης της παραδοχής ότι η πυκνότητα, ρ , των αραιών διαλυμάτων είναι ίση με την πυκνότητα του διαλύτη, παίρνει τη μορφή:

$$[\eta] = \frac{1}{C} \cdot \sqrt{2 \cdot \left(\frac{t}{t_0} - \ln \frac{t}{t_0} - 1 \right)} \quad (10)$$

Το ιξωδόμετρο πρέπει να ικανοποιεί την προϋπόθεση ότι το δείγμα και ο καθαρός διαλύτης του θα πρέπει να έχουν χρόνους ροής $t > 100\ sec$ [61]. Έτσι, λόγω του χαμηλού μοριακού βάρους και των χαμηλών συγκεντρώσεων, επιλέχθηκε ιξωδόμετρο με αρκετά λεπτό τριχοειδές, το Ubbelohde C720 (Calibrated UBC Series 9721-R53 Size 0C) με σταθερά $K_V = 0,002807\ mm^2\ s^{-2}$. Εξάλλου, όπως προκύπτει από την Εξίσωση 5, αύξηση της σταθεράς του ιξωδόμετρου K_V συνοδεύεται από μείωση στο χρόνο εκροής του ρευστού. Το ιξωδόμετρο της πειραματικής διαδικασίας ικανοποιούσε τις χρονικές προϋποθέσεις που προαναφέρθηκαν.

Η ιξωδομέτρηση ενός δείγματος απαιτεί τον προσεκτικό καθαρισμό του χρησιμοποιούμενου ιξωδομέτρου και την ξήρανση αυτού με χρήση πεπιεσμένου αέρα.. Η τοποθέτηση του διαλύματος στο ιξωδόμετρο έγινε με χρήση διηθητικού χαρτιού, ώστε να μην εισέλθουν ακαθαρσίες. Το εκάστοτε δείγμα αποχύνεται και πληρώνει το μεγάλο θάλαμο του ιξωδομέτρου, φτάνοντας λίγο πάνω από τη μέση της 1^{ης} χαραγής. Πριν από κάθε μέτρηση το πληρωμένο με δείγμα ιξωδόμετρο παραμένει επί 10 min περίπου μέσα στο υδατόλουτρο (Σχήμα 20) ώστε να αποκτήσει την απαιτούμενη θερμοκρασία, εν προκειμένω τους 25 °C. Στη συνέχεια προσαρμόζεται πουάρ στο σκέλος του τριχοειδούς και το δείγμα αναρροφάται μέχρι να ξεπεράσει κατά 1 με 2 cm την άνω χαραγή του ιξωδομέτρου. Η διαδικασία της αναρρόφησης προϋποθέτει ταυτόχρονα το κλείσιμο του χαρακτηριστικού βοηθητικού σκέλους των τύπου Ubbelohde ιξωδομέτρων, ώστε να γίνει αναρρόφηση. Ακολούθως, ανοίγεται το βοηθητικό σκέ-

λος και διακόπτεται η αναρρόφηση του ρευστού οπότε το υγρό αφήνεται να ρεύσει υπό την επίδραση της βαρυτικής δύναμης. Ο χρόνος εκροής αντιστοιχίζεται στο χρόνο που χρειάζεται το ρευστό, διαλύτης ή πολυμερικό διάλυμα, να διέλθει από την άνω χαραγή έως την κάτω χαραγή του ιζωδομέτρου.



Σχήμα 20. Ιζωδόμετρο τοποθετημένο μέσα σε υδατόλουτρο

Για την εξασφάλιση της κατά το δυνατόν αξιοπιστίας των μετρήσεων τέθηκαν οι εξής προϋποθέσεις:

- *Η καθαρότητα του ιζωδομέτρου, είναι απαραίτητη, διότι η ύπαρξη ακαθαρσιών μέσα σε αυτό μπορεί να παρεμποδίσει τη φυσιολογική ροή, αποτελώντας σημαντικό παράγοντα λανθασμένης διαδικασίας μέτρησης και σφαλμάτων. Έτσι, πριν τη χρήση του ιζωδομέτρου αυτό έπρεπε να ξεπλυθεί με ακετόνη και να ξηραθεί με χρήση αέρα. Επίσης, μετά τη χρήση έπρεπε να ξεπλυθεί με το χρησιμοποιούμενο διαλύτη για την απομάκρυνση υπολειμμάτων πολυμερούς και μετά με ακετόνη.*
- *Η κάθετη τοποθέτηση του ιζωδομέτρου κατά τη διάρκεια της μέτρησης είναι απαραίτητη, ώστε η δύναμη της βαρύτητας να είναι κοινή για όλα τα δείγματα και να μην αναλύεται σε συνιστώσες.*
- *Η απουσία φυσαλίδων ή ασυνεχών τμημάτων στο χώρο μεταξύ των δύο χαραγών ή στο τριχοειδές είναι, επίσης, απαραίτητη προϋπόθεση.*

Από κάθε διάλυμα λαμβάνονται 3 μετρήσεις, η απόκλιση των οποίων δεν πρέπει να ξεπερνά το 2 % [61]. Ως αποτέλεσμα λαμβάνεται ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα και σχολιασμός αποτελεσμάτων

5.1 Ενζυμική σύνθεση PBS

5.1.1 Αποδόσεις αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού

Σε κάθε πειραματική δοκιμή, το παραλαμβανόμενο προϊόν, έπειτα από ξήρανση ζυγίστηκε και ακολούθησε ο υπολογισμός της σταθμική απόδοσης της διεργασίας διαιρώντας με τη θεωρητική μάζα του προϊόντος:

$$\alpha = \frac{\text{πειραματική μάζα (mg)}}{\text{θεωρητική μάζα (mg)}} \times 100\% \quad (11)$$

Η θεωρητική μάζα του προϊόντος προκύπτει υπολογίζοντας τα γραμμομόρια των μονομερών που ζυγίστηκαν. Το μονομερές που κατά τη ζύγιση βρίσκεται σε έλλειμμα (λόγω σφαλμάτων στη χρήση των οργάνων, όπως η πιπέτα) θα καθορίσει τη θεωρητική μάζα του προϊόντος. Για τον υπολογισμό της θεωρητικής μάζας γίνεται η παραδοχή ότι όλη η ποσότητα των μονομερών καταναλώνεται προς παραγωγή μορίων PBS και αιθανόλης, δηλαδή ότι η μετατροπή της αντίδρασης είναι $p = 1$. Οπότε, η θεωρητική μάζα του προϊόντος είναι όση η μάζα του μονομερούς σε έλλειμμα και η στοιχειομετρικά ανάλογη μάζα του μονομερούς σε περίσσεια πλην τη μάζα της παραγόμενης αιθανόλης. Για παράδειγμα, η θεωρητική μάζα του προϊόντος του πειράματος 1 της 1^{ης} σειράς πειραμάτων, που παρουσιάζεται στον Πίνακα 27, όπου σε έλλειμμα βρίσκεται ο διαιθυλεστέρας, προκύπτει ως εξής:

$$m_{\theta} = m_{DES} + n \cdot 90 - 2 \cdot n \cdot 46 \quad (12)$$

όπου m_{θ} είναι η θεωρητική μάζα του προϊόντος, m_{DES} η μάζα του διαιθυλεστέρα, n τα γραμμομόρια του διαιθυλεστέρα (συστατικό σε έλλειμμα) και 90 και 46 τα μοριακά βάρη της 1,4-βουτανодиόλης και της αιθανόλης, αντίστοιχα, σε g/mol.

I. Πειράματα αναφοράς

Στον Πίνακα 26 παρατίθενται τα αποτελέσματα κάποιων πειραμάτων αναφοράς. Οι χαμηλές τιμές των πειραματικών μαζών οφείλονται στο γεγονός ότι δεν σχηματίστηκε προϊόν και τα μονομερή παρέμειναν αυτούσια, με αποτέλεσμα να εξατμιστεί αρκετά μεγάλη ποσότητα αυτών κατά την ξήρανση. Σε αυτήν την περίπτωση δεν έχει νόημα ο ορισμός απόδοσης, αφού η μάζα που απέμεινε δεν είναι προϊόν.

Πίνακας 26. Μάζα πειράματος αναφοράς στους 50 °C

Πείραμα	1,4- Βουτανодиόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)
1	154	301	67	295
4	129	251	72	246
7	129	295	85	247

Το συμπέρασμα ότι δεν παράχθηκε προϊόν προκύπτει και οπτικά, καθώς μετά την ξήρανση, το υλικό εξακολουθεί να είναι υγρό και σχηματίζει δύο φάσεις, κάτι που εξηγείται από το ότι τα μονομερή είναι μη αναμίξιμα (Σχήμα 21).



Σχήμα 21. Δείγμα πειράματος αναφοράς

II. Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου Novozym 435

a. Πειράματα μικρής κλίμακας

Στη συνέχεια, παρουσιάζονται οι Πίνακες, στους οποίους επαναλαμβάνονται οι ποσότητες των μονομερών που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα μικρής κλίμακας για όλες τις θερμοκρασίες και προστίθενται η μάζα του προϊόντος, όπως ζυγίστηκε μετά την ξήρανση, (πειραματική μάζα), η θεωρητική μάζα του προϊόντος και η απόδοση της αντίδρασης. Επιπλέον, γίνεται σχολιασμός των αποτελεσμάτων. Υπενθυμίζεται ότι, όπως περιγράφεται και σε προηγούμενους Πίνακες, τα πειράματα με αριθμό 1 αφορούν χρήση τολουολίου, αυτά με αριθμό 4 αφορούν χρήση ισοοκτανίου και τα πειράματα με αριθμό εφαρμογή χωρίς διαλύτη.

i. 40 °C

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 27, σε κάθε σειρά πειραμάτων που διεξήχθη στους 40 °C, το πείραμα με την καλύτερη απόδοση είναι αυτό το οποίο πραγματοποιήθηκε με χρήση τολουολίου (πειράματα με αριθμό 1).

Πίνακας 27. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 40 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	161	305	159	466	34
	4	132	259	68	391	17
	7	158	301	108	459	24
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	301	214	298	72
	4	134	255	148	252	59
	7	161	303	145	300	48
3 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	310	144	301	48
	4	133	262	95	255	37
	7	162	310	119	306	39
4 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	300	176	297	59
	4	129	257	113	247	46
	7	153	306	145	292	50

ii. 50 °C

Στους 50 °C, τα πειράματα με χρήση τολουολίου (πειράματα με αριθμό 1) είναι αυτά με την καλύτερη απόδοση (Πίνακας 28), όπως και στους 40 °C. Τα πειράματα της 3^{ης} σειράς εμφανίζουν γενικά υψηλότερες αποδόσεις σε σχέση με τις προηγούμενες σειρές, κάτι το οποίο εξηγείται από το ότι η κλίμακα είναι διπλάσια. Η αύξηση των αποδόσεων με την αύξηση της κλίμακας είναι φαινόμενο που παρατηρείται γενικά και γι' αυτό, πειράματα διαφορετικών κλιμάκων δεν θα είναι άμεσα συγκρίσιμα.

Πίνακας 28. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 50 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	158	313	151	302	50
	4	132	261	31	252	12
	7	155	312	104	296	35
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	155	304	165	297	55
	4	134	257	102	254	40
	7	156	302	107	298	36
3 ^η (διπλάσια κλίμακα)	1	308	621	458	588	78
	4	261	520	337	499	67
	7	311	608	449	595	76

iii. 60 °C

Τα πειράματα με τολουόλιο είναι και στην περίπτωση των 60 °C αυτά με τις καλύτερες αποδόσεις (Πίνακας 29). Τα πειράματα της 3^{ης} σειράς εμφανίζουν αυξημένες αποδόσεις λόγω της μεγαλύτερης κλίμακας, όπως εξηγήθηκε και νωρίτερα.

Πίνακας 29. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 60 °C με χρήση N435

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1 ^η (μικρή κλίμακα)	1	159	305	153	301	51
	4	131	259	118	250	47
	7	152	307	115	290	40
2 ^η (μικρή κλίμακα)	1	155	292	171	288	59
	4	133	257	83	254	33
	7	158	303	62	300	21
3 ^η (διπλάσια κλίμακα)	1	311	603	478	595	80
	4	262	516	388	501	77
	7	316	599	479	592	81

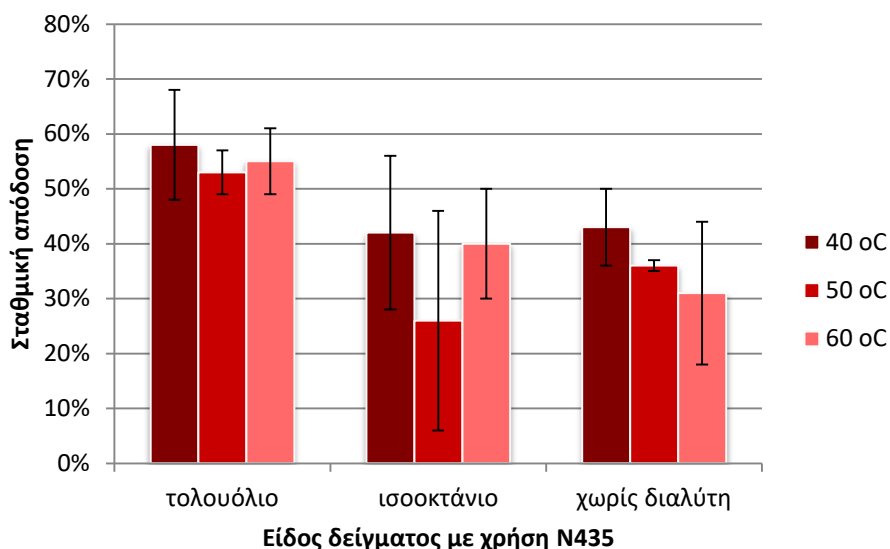
Όλα τα δεδομένα αποδόσεων για τα πειράματα μικρής κλίμακας που παρουσιάστηκαν στους Πίνακες 27, 28 και 29 επεξεργάστηκαν για την εξαγωγή μιας μέσης τιμής και μιας τυπικής απόκλισης για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία και παρουσιάζονται στον Πίνακα 30. Επισημαίνεται πως στη διεξαγωγή μέσων τιμών συμμετέχουν μόνο πειράματα της ίδιας (μικρής) κλίμακας, ώστε να έχει νόημα ο ορισμός του μεγέθους.

Πίνακας 30. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, για τα πειράματα με χρήση N435

	Σταθμική απόδοση (%)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Τολουόλιο	58 ± 10	53 ± 4	55 ± 6
Ισοοκτάνιο	42 ± 14	26 ± 20	40 ± 10
Χωρίς Διαλύτη	43 ± 7	36 ± 1	31 ± 13

Προκειμένου να δοθεί μια συγκεντρωτική εικόνα των αποδόσεων των αντιδράσεων με χρήση του N435, παρουσιάζεται το Διάγραμμα 1. Σε αυτό απεικονίζονται οι μέσες

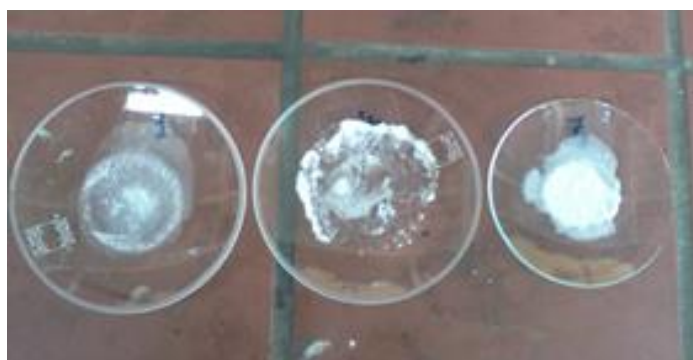
τιμές των αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, μαζί με τις γραμμές σφάλματος.



Διάγραμμα 1. Μέσες τιμές και γραμμές σφάλματος αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, για τα πειράματα με χρήση N435

Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι η υπεροχή του τολουολίου ως διαλύτη για την αύξηση της απόδοσης με μικρή σημασία στην επιλογή θερμοκρασίας. Στην περίπτωση του ισοοκτανίου τα σφάλματα είναι αρκετά μεγάλα, κάτι το οποίο σημαίνει ότι για την αντίδραση δεν αποτελεί καθοριστική παράμετρο η θερμοκρασία.

Η όψη των προϊόντων των πειραμάτων δεν είναι κοινή για όλα τα πειράματα αλλά εμφανίζει χαρακτηριστικές ομοιότητες σε όλες τις θερμοκρασίες. Στο Σχήμα 22 παρουσιάζονται κάποια ενδεικτικά προϊόντα, όπως φαίνονται μετά την ξήρανση.



Σχήμα 22. Προϊόντα χρήσης N435 με τολουόλιο (αριστερά), ισοοκτάνιο (κέντρο) και χωρίς διαλύτη (δεξιά)

Το προϊόν που προέκυψε με χρήση τολουολίου είναι το πιο υδαρό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον εγκλωβισμό διαλύτη ή μονομερών. Επίσης, μπορεί να έχουν σχηματιστεί ολιγομερή αρκετά χαμηλού μοριακού βάρους προσδίδοντας λασπώδη μορφή στο προϊόν. Αντίθετα, το προϊόν του ισοοκτανίου είναι πιο στέρεο και συμπαγές. Την καλύτερη εικόνα διαθέτει το προϊόν της τεχνικής μάζας (χωρίς διαλύτη), το οποίο κατά την ξήρανσή του σχηματίζει φιλμ.

b. Πείραμα μεγάλης κλίμακας

Το κριτήριο για την επιλογή του πειράματος της μεγάλης κλίμακας δεν ήταν η απόδοση αλλά η μεγαλύτερη αύξηση του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους, M_n , όπως υπολογίστηκε με χρήση φασματομετρίας NMR για κάποιες δοκιμές μεταπολυμερισμού (παράγραφος 5.2.1-I). Έτσι, το γεγονός ότι η απόδοση του πειράματος της μεγάλης κλίμακας (Πίνακας 31) δεν είναι το μέγιστο που έχει εμφανιστεί σε αποδόσεις (60 °C, 3^η σειρά πειραμάτων) δεν αποτελεί αντίφαση. Μπορεί, εδώ, να γίνει και μια παρατήρηση σχετικά με τη σχέση κλίμακας και απόδοσης. Η απόδοση του πειράματος μεγάλης κλίμακας που διεξήχθη στους 50 °C ανήκει στο εύρος των αποδόσεων των πειραμάτων της 3^{ης} σειράς στους 50 °C (Πίνακας 28), τα οποία διεξήχθησαν σε πολύ μικρότερη κλίμακα. Δηλαδή, ενώ παρατηρείται αύξηση των αποδόσεων κατά τη μετάβαση από την πρώτη κλίμακα (Πίνακας 11) στη διπλάσια κλίμακα, δεν παρατηρούνται αλλαγές από τη διπλάσια στη μεγάλη (δεκατετραπλάσια) κλίμακα. Ίσως αυτό να σημαίνει ότι η αύξηση της πειραματικής κλίμακας μπορεί να ενισχύσει την απόδοση μέχρι κάποιο σημείο και μετά από αυτό να μην παίζει σημαντικό ρόλο.

Πίνακας 31. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για το πείραμα μεγάλης κλίμακας

1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαλυεστέρης (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1977	3602	2675	3560	75

Το προϊόν του πειράματος μεγάλης κλίμακας (Σχήμα 23), μετά την αντίδραση τοποθετήθηκε σε ένα τρυβλίο petri, για να γίνει η εξάτμιση των διαλυτών και έπειτα ξηράνθηκε περαιτέρω στην αντλία υψηλού κενού του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας. Το ξηραμένο προϊόν είχε πολύ καλή όψη λευκού στερεού.



Σχήμα 23. Προϊόν πειράματος μεγάλης κλίμακας μετά την ξήρανση

III. Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου *FoCut5a*

a. 40 °C

Στην περίπτωση των αποδόσεων των πειραμάτων με χρήση *FoCut5a*, δεν παρατηρείται κάποια συγκεκριμένη συμπεριφορά ανάλογα με το διαλύτη, αφού, όπως φαίνεται στον Πίνακα 32, η καλύτερη απόδοση διαφέρει από σειρά σε σειρά. Ακόμη και στην περίπτωση των σειρών 2 και 3, όπου χρησιμοποιήθηκε η ίδια παρτίδα κουτινάσης (*FoCut5a₂*), οι αποδόσεις δεν είναι ομοιόμορφες. Ο διπλασιασμός της κλίμακας ευνοεί και σε αυτήν την περίπτωση τις αποδόσεις.

Το πείραμα της 2^{ης} σειράς με χρήση ισοοκτανίου (πείραμα 5), μετά από δύο ώρες ξήρανσης στον απαγωγό οδήγησε σε ολική εξάτμιση του υλικού, κάτι το οποίο δε συμφωνεί με τα αντίστοιχα πειράματα των άλλων σειρών, όπου απέδιδαν σε ποσοστό μεγαλύτερο του 20 %.

Πίνακας 32. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 40 °C με χρήση *FoCut5a*

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανодиόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1 ^η (μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a₁</i>)	2	162	311	59	307	19
	5	136	260	67	257	26
	8	159	307	93	303	31
2 ^η (μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a₂</i>)	2	160	305	128	302	42
	5	134	260	0	256	0
	8	159	312	120	304	39
3 ^η (μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a₂</i>)	2	162	310	94	307	31
	5	135	266	97	258	38
	8	159	309	61	304	20
4 ^η (διπλάσια κλίμακα- <i>FoCut5a₃</i>)	2	311	610	321	595	54
	5	262	522	307	500	61
	8	305	606	381	583	65

Το στοιχείο που διέφερε στα προϊόντα διαφορετικών παρτίδων κουτινάσης ήταν κυρίως το χρώμα. Όσο πιο μεγάλη ήταν η ενεργότητα της κουτινάσης, τόσο πιο χρωματισμένο ήταν το τελικό προϊόν, στα πλαίσια πάντα ενός πολύ ελαφρύ πορτοκαλί χρωματισμού. Ενδεικτικά, παρατίθενται οι εικόνες από προϊόντα των τριών διαφορετικών παρτίδων κουτινάσης (Σχήμα 24), με περιορισμένη ικανότητα να αναδείξουν τη χρωματική διαφορά.



Σχήμα 24. Προϊόντα με χρήση κουτινάσης *FoCut5a*₁ (αριστερά), *FoCut5a*₂ (κέντρο), *FoCut5a*₃ (δεξιά)

b. 50 °C

Το πείραμα τολουολίου δεν απέδωσε μετά την ξήρανση. Αυτό, ίσως, οφείλεται σε κάποιο σφάλμα ή λάθος χειρισμό κατά την επεξεργασία του δείγματος.

Πίνακας 33. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 50 °C με χρήση *FoCut5a*

Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
μικρή κλίμακα- <i>FoCut5a</i> ₁	2	158	310	0	302	0
	5	133	265	44	254	17
	8	162	316	89	310	29

c. 60 °C

Ούτε στην περίπτωση των 60 °C παρατηρείται συγκεκριμένη συμπεριφορά των αποδόσεων ανάλογα με το διαλύτη, αφού οι αποδόσεις των δυο σειρών δεν παρουσιάζουν ανάλογη συμπεριφορά. Αυτό που έχει, όμως, ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στα πειράματα της 2^{ης} σειράς, όπου χρησιμοποιείται κουτινάση μεγαλύτερης ενεργότητας από τα αντίστοιχα της 1^{ης} σειράς, δεν παρατηρείται αύξηση της απόδοσης, παρ'όλο που στο πείραμα τολουολίου (πείραμα 1), ενώ στα άλλα δυο πειράματα σημειώνεται μείωση της απόδοσης.

Πίνακας 34. Πειραματική και θεωρητική μάζα προϊόντος και υπολογισμός απόδοσης για τα πειράματα που διεξήχθησαν στους 60 °C με χρήση *FoCut5a*

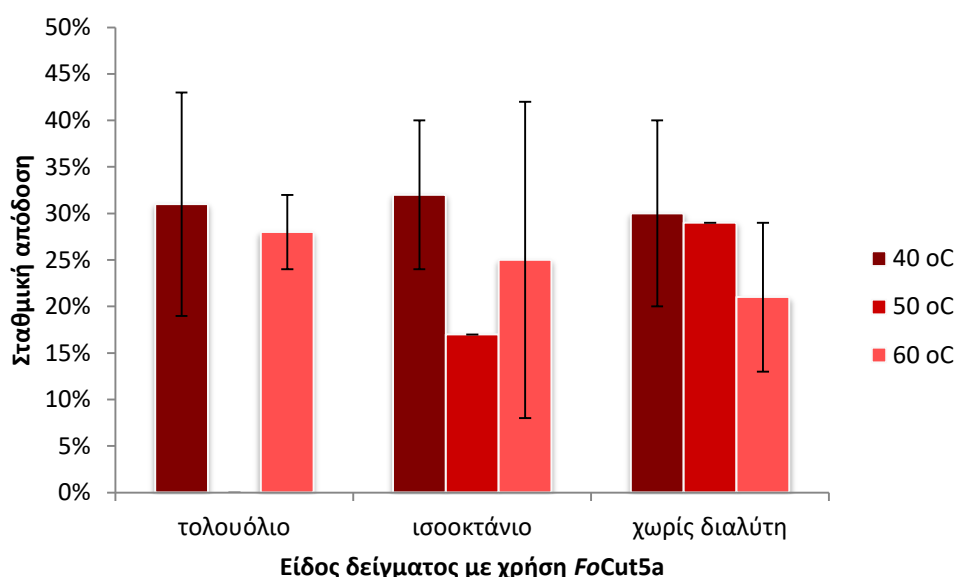
Σειρά Πειραμάτων	Πείραμα	1,4-Βουτανοδιόλη (mg)	Ηλεκτρικός Διαιθυλεστέρας (mg)	Πειραματική μάζα (mg)	Θεωρητική μάζα (mg)	Απόδοση (%)
1 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₁)	2	164	305	74	301	25
	5	138	258	95	255	37
	8	150	303	75	287	26
2 ^η (μικρή κλίμακα - <i>FoCut5a</i> ₂)	2	154	295	91	292	31
	5	133	255	34	252	13
	8	154	304	44	294	15

Στον Πίνακα 35 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων αποδόσεων από τους Πίνακες 32, 33 και 34, με τη μορφή μιας μέσης τιμής και μιας τυπικής απόκλισης για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία. Στη διεξαγωγή μέσων τιμών συμμετέχουν μόνο πειράματα της ίδιας (μικρής) κλίμακας, ώστε να έχει νόημα ο ορισμός του μεγέθους. Στις περιπτώσεις που δε διεξήχθησαν επαναληπτικά πειράματα καταγράφονται οι τιμές από τις μοναδικές μετρήσεις (βλ. πειράματα στους 50 °C).

Πίνακας 35. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, για τα πειράματα με χρήση *FoCut5a*

	Σταθμική απόδοση (%)		
	40 °C	50 °C	60 °C
Τολουόλιο	31 ± 12	0	28 ± 4
Ισοοκτάνιο	32 ± 8	17	25 ± 17
Χωρίς Διαλύτη	30 ± 10	29	21 ± 8

Τα δεδομένα του Πίνακα 35 απεικονίζονται γραφικά στο Διάγραμμα 2, όπου τοποθετούνται οι μέσες τιμές των αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, μαζί με τις γραμμές σφάλματος.



Διάγραμμα 2. Μέσες τιμές και γραμμές σφάλματος αποδόσεων για κάθε διαλύτη σε κάθε θερμοκρασία, για τα πειράματα με χρήση *FoCut5a*

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 2, την καλύτερη μέση απόδοση δίνει η χρήση ισοοκτανίου στους 40 °C, με τη δεύτερη μικρότερη τυπική απόκλιση που καταγράφεται

στο διάγραμμα. Επίσης, παρατηρούνται, γενικά, καλύτερες αποδόσεις στους 40 °C. Οι μεγάλες τιμές τυπικών αποκλίσεων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μάλλον ούτε η θερμοκρασία ούτε ο διαλύτης είναι καθοριστικές παράμετροι αυτών των αντιδράσεων.

Μιλώντας, γενικά, για τα προϊόντα των πειραμάτων κουτινάσης, πρέπει να αναφερθεί πως πρόκειται για υγρά υλικά. Κάτι τέτοιο παραπέμπει είτε στο μη σχηματισμό προϊόντος είτε στο σχηματισμό ολιγομερών, τα οποία λόγω πολύ χαμηλού βαθμού πολυμερισμού είναι υγρά., σε αντίθεση με τη συνήθη στερεή εικόνα του PBS, ακόμα και μέσου βαθμού πολυμερισμού. Ωστόσο, τα προϊόντα έμοιαζαν να είναι πιο παχύρευστα από τα μονομερή και να μη σχηματίζουν διαφορετικές φάσεις. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι, ίσως, υπήρξε σχηματισμός κάποιου προϊόντος, ενδεχομένως πολύ χαμηλού μοριακού βάρους. Επίσης, κάποια από τα προϊόντα είχαν ελαφρώς πορτοκαλί χρώμα, ανάλογα με την παρτίδα κουτινάσης. Ο ελαφρύς χρωματισμός του προϊόντος μπορεί να σημαίνει μερική διάλυση/διασπορά του ενζύμου σε κάποιο από τα συστατικά του μίγματος. Σχετικά με την εικόνα των προϊόντων αλλά και με την απόδοση των αντιδράσεων, δεν γίνεται κάποια σαφής παρατήρηση σε σχέση με τη θερμοκρασία ή το διαλύτη.

5.1.2 Θερμικές μεταπτώσεις προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού

I. Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου Novozym 435

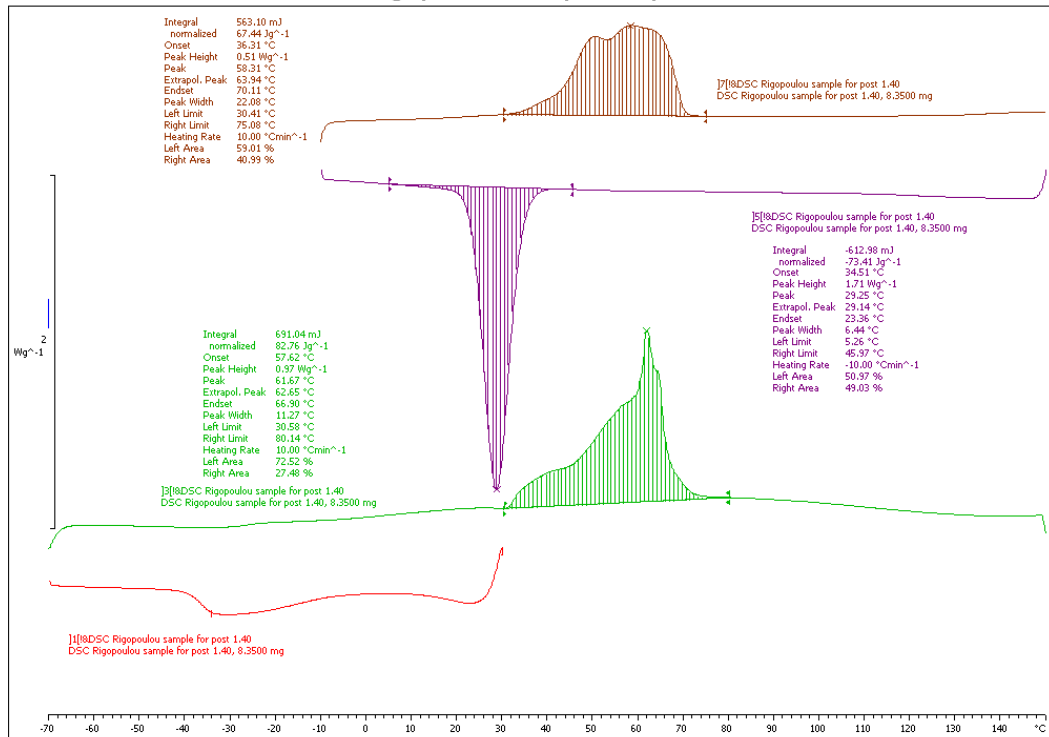
Τα προϊόντα του ενζυμικού πολυμερισμού με χρήση της λιπάσης N435 είναι στερεά. Η DSC και TG ανάλυση αυτών των δειγμάτων έγινε με τρόπο που περιγράφεται στα υποκεφάλαια 4.4.1 και 4.4.2. Σε αυτές τις συνθήκες αναμένεται να ληφθούν γραφήματα που θα αποδίδουν τα σημεία τήξης και κρυστάλλωσης των προϊόντων, τις αντίστοιχες ενθαλπίες και τα σημεία θερμικής διάσπασης. Στα γραφήματα DSC, ωστόσο, δεν εντοπίζεται το σημείο υαλώδους μετάπτωσης, T_d , παρά την ψύξη ως τους -70 °C.

a. Πειράματα μικρής εργαστηριακής κλίμακας

Ακολουθούν, ενδεικτικά, τα γραφήματα DSC και TGA που λήφθηκαν για τα προϊόντα κάποιων από τα διάφορα είδη πειραμάτων που διεξήχθησαν με χρήση του N435. Τα υπόλοιπα γραφήματα παρατίθενται σε Παράρτημα, στο τέλος της εργασίας.

i. Τολουόλιο – 40 °C

^endo DSC Rigopoulou sample for post 1.40 09.11.2016 14:57:00

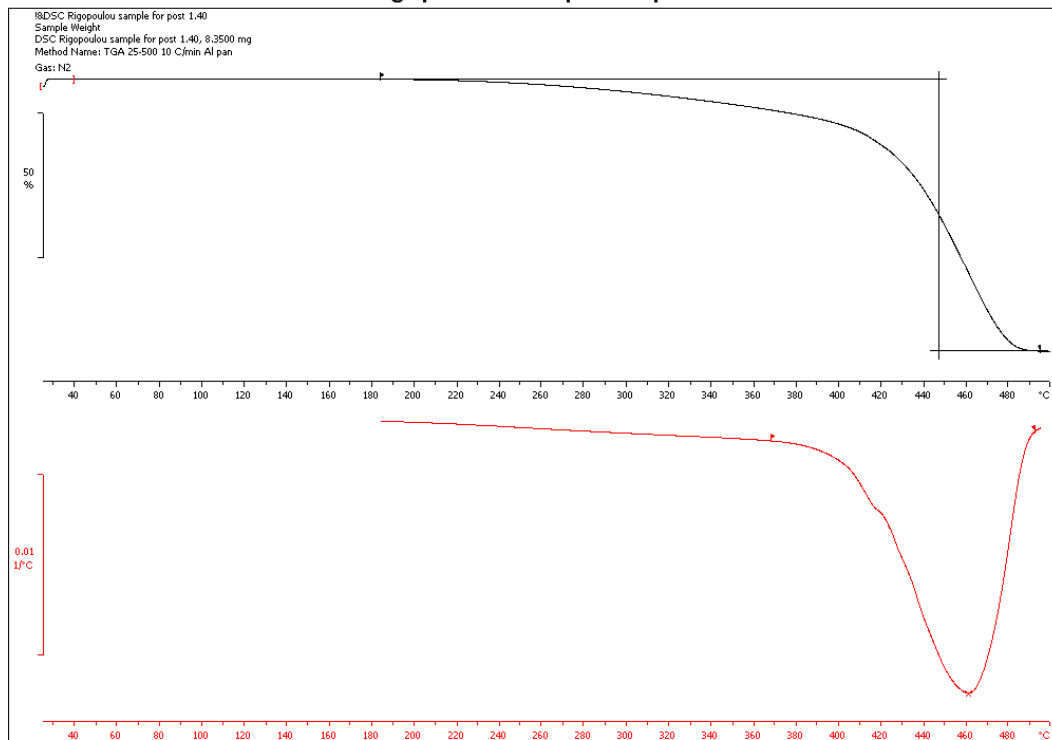


Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 25. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουολίου στους 40 °C

^endo TGA Rigopoulou sample for post 1.40 09.11.2016 15:36:48



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

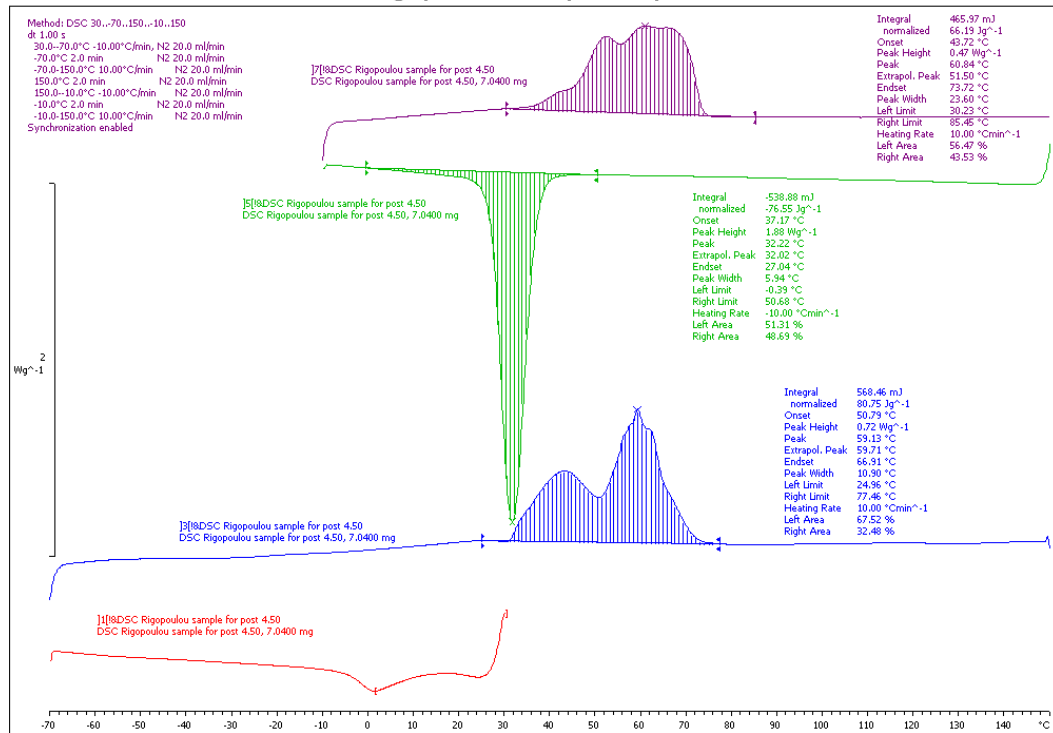
Σχήμα 26. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουολίου στους 40 °C

ii. Ισοοκτανίο – 50 °C

Λendo

DSC Rigopoulou sample for post 4.50

10.03.2017 16:07:52



Lab: METTLER

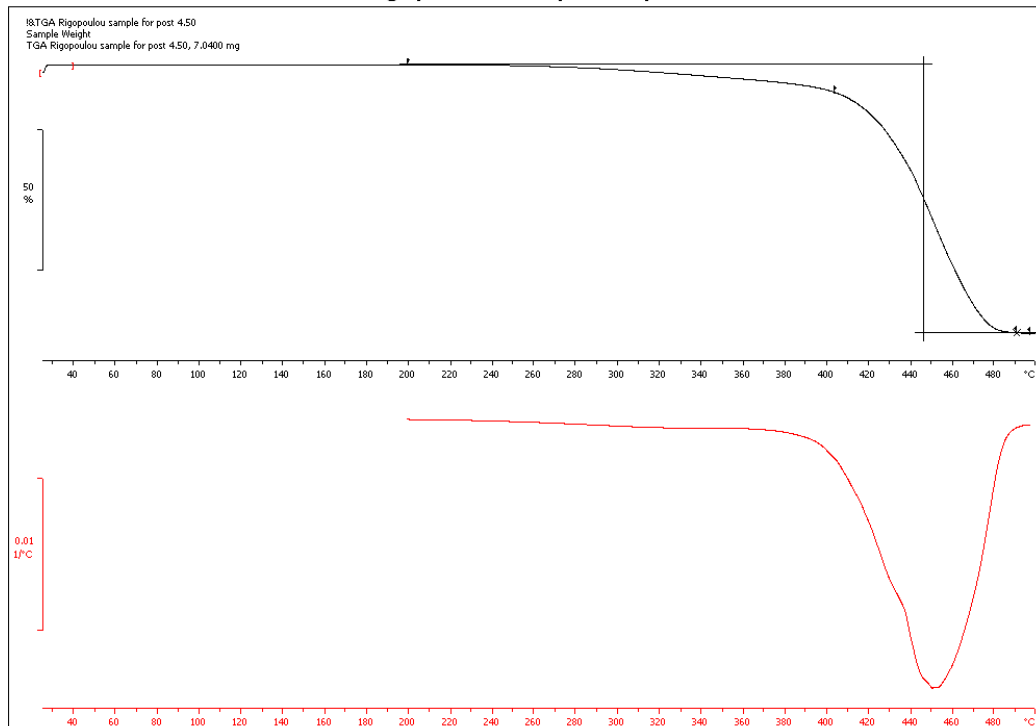
STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 27. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C

Λendo

TGA Rigopoulou sample for post 4.50

15.03.2017 16:06:14



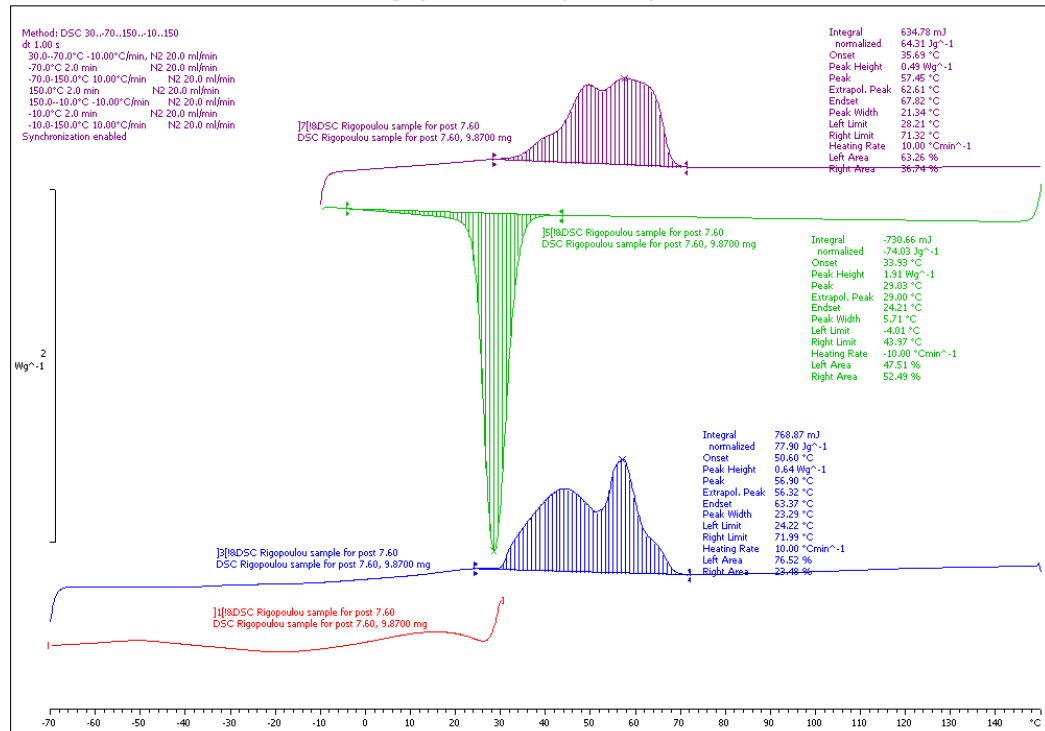
Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 28. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C

iii. Χωρίς διαλύτη - 60 °C

^endo DSC Rigopoulou sample for post 7.60 10.03.2017 16:27:03

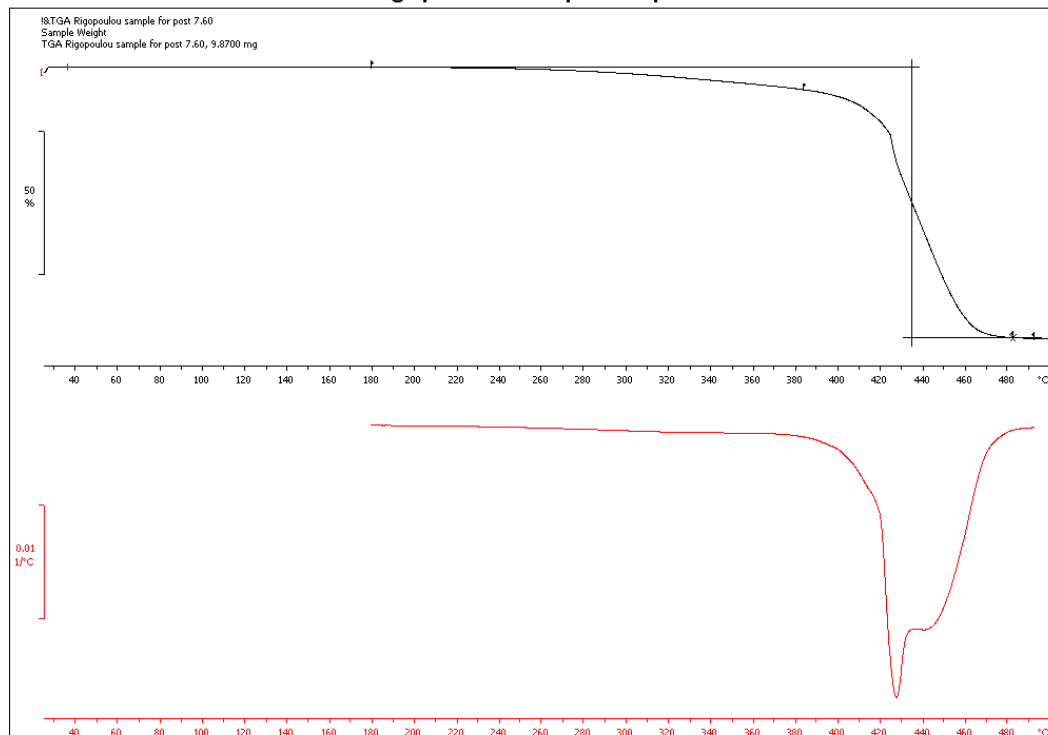


Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 29. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 60 °C

^endo TGA Rigopoulou sample for post 7.60 15.03.2017 16:22:02



Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 30. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 60 °C

Οι θερμικές ιδιότητες των προϊόντων, όπως προκύπτουν από τα γραφήματα DSC και TGA, που παρατέθηκαν παραπάνω αλλά και αυτών που βρίσκονται στο Παράρτημα συγκεντρώνονται στον Πίνακα 36, ενώ δίνεται και ο Πίνακας 37 στον οποίο καταγράφονται οι τιμές κάποιων θερμικών ιδιοτήτων ενός ενδεικτικού δείγματος εμπορικού PBS, όπως βρέθηκαν στη βιβλιογραφία [58][5]. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα μεγέθη που αντλούνται από τα γραφήματα DSC, καταγράφονται οι θερμοκρασίες των κορυφών τήξης (T_{m1} , T_{m2}) και οι αντίστοιχες ενθαλπίες (ΔH_{m1} , ΔH_{m2}) για τον 1^ο και το 2^ο κύκλο θέρμανσης, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης (T_c) και η αντίστοιχη ενθαλπία (ΔH_c) που προκύπτουν από τον 2^ο κύκλο ψύξης και το ποσοστό κρυσταλλικότητας (x_c) που προκύπτει από την ενθαλπία του 2^{ου} κύκλου θέρμανσης. Από τα γραφήματα TGA λαμβάνονται η θερμοκρασία μέγιστου ρυθμού αποδόμησης (T_d) και το ποσοστό του υπολείμματος (% υπόλειμμα) που παραμένει στο τέλος της θερμικής επεξεργασίας. Το κατά μάζα ποσοστό κρυσταλλικότητας (x_c %) των προϊόντων προκύπτει από την εξίσωση:

$$x_c = \frac{\Delta H_{m2}}{\Delta H_0} \cdot 100\% \quad (13)$$

όπου ΔH_0 είναι η ενθαλπία τήξης του 100 % κρυσταλλικού PBS σε J/g, το οποίο βιβλιογραφικά έχει υπολογιστεί 110,5 J/g [66][57].

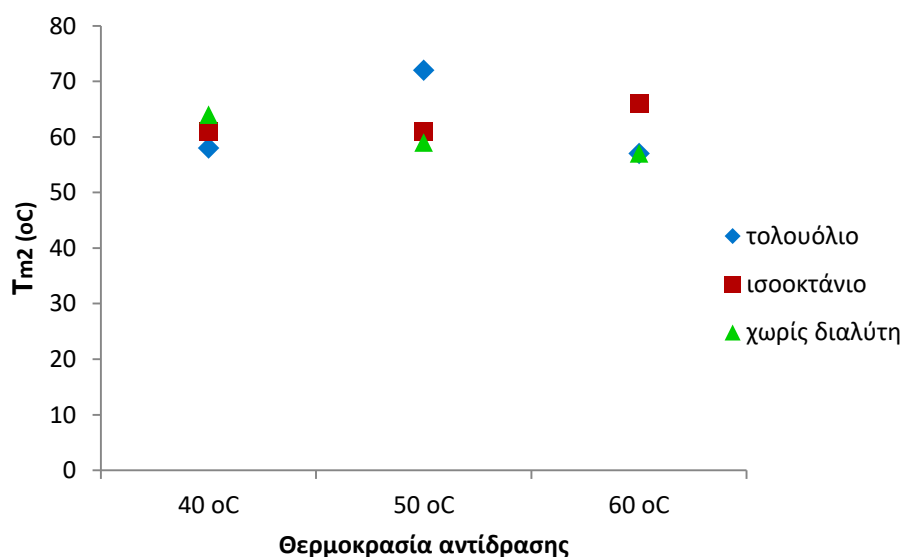
Πίνακας 36. Θερμικές ιδιότητες προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού με χρήση N435

		T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	x_c (%)	T_d (°C)	% Υπόλειμμα	
N435	Τολουόλιο	40 °C	62	83	29	73	58	67	61	409	8,4
		50 °C	69	75	41	85	72	73	66	439	5,3
		60 °C	55	57	27	66	57	58	52	367	6,9
	Ισοοκτάνιο	40 °C	65	94	33	74	61	72	65	440	10,2
		50 °C	59	81	32	77	61	66	60	435	7,3
		60 °C	65	71	34	72	66	64	58	401	1,1
	Χωρίς διαλύτη	40 °C	68	114	39	85	64	85	77	441	7,6
		50 °C	56	64	27	70	59	62	56	435	9,3
		60 °C	57	78	29	74	57	64	58	429	7,2

Πίνακας 37. Θερμικές ιδιότητες εμπορικού PBS [58]

	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	x_c (%)	T_d (°C)
PBS	114	67	75	66	61	400

Οι θερμοκρασίες τήξης και κρυστάλλωσης των προϊόντων των πειραμάτων με N435 είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες ενός συνηθισμένου εμπορικού δείγματος PBS [5][58]. Ωστόσο, εμφανίζουν ενδιαφέρον, αφού κινούνται σε ένα σχετικά περιορισμένο εύρος τιμών. Ωστόσο, οι ενθαλπίες τήξης, το σημείο μέγιστης αποδόμησης και ο βαθμός κρυσταλλικότητας προσεγγίζουν τις τιμές εμπορικών δειγμάτων. Οι θερμοκρασίες τήξης της δεύτερης θέρμανσης μεταβάλλονται σε σχέση με τις αντίστοιχες της πρώτης θέρμανσης αλλά όχι με σημαντικές διαφορές, κάτι που σημαίνει πως ακόμη και οι πρώτες ενδείξεις αφορούν σε μεγάλο βαθμό την εγγενή ποιότητα των δειγμάτων. Στα περισσότερα δείγματα παρατηρείται μείωση της ενθαλπίας της δεύτερης τήξης σε σχέση με την πρώτη, κάτι το οποίο μπορεί να σημαίνει μείωση της κρυσταλλικότητας. Το προϊόν με το υψηλότερο σημείο T_{m2} είναι αυτό που παράχθηκε στους 50 °C με χρήση τολουολίου. Επίσης, όπως φαίνεται από το Διάγραμμα 3, το τολουόλιο επιφέρει ελαφρώς υψηλότερη θερμοκρασία τήξης κατά την αντίδραση στους 60 °C, ενώ η θερμοκρασία δεν είναι σημαντική παράμετρος για τις αντιδράσεις χωρίς διαλύτη.



Διάγραμμα 3. Θερμοκρασίες τήξης σε σχέση με το διαλύτη και τη θερμοκρασία

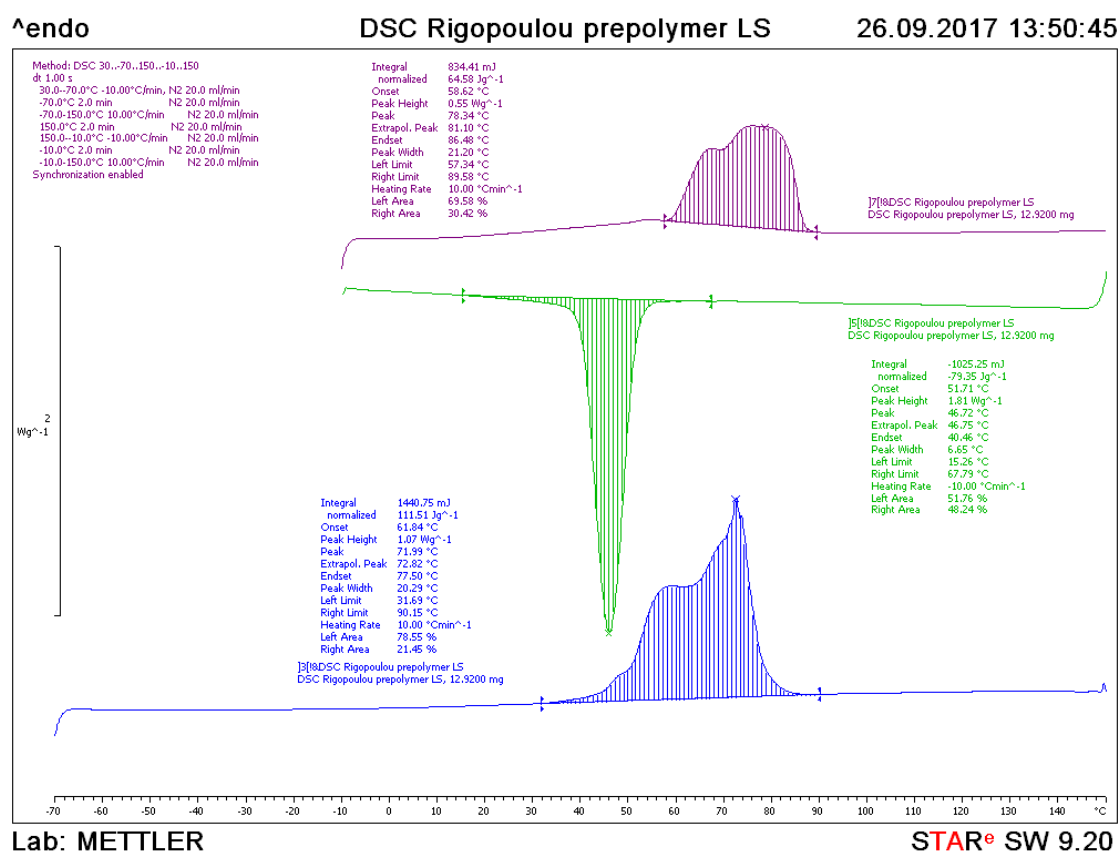
Εδώ πρέπει να αναφερθεί πώς το φαινόμενο της τήξης, που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της θέρμανσης των δειγμάτων, αφορά τις κρυσταλλικές περιοχές του πολυμερούς και πραγματοποιείται σε εύρος θερμοκρασιών. Όσο μεγαλύτεροι είναι οι κρυσταλλίτες τόσο πιο υψηλή είναι η θερμοκρασία στην οποία τήκονται κι έτσι η ύπαρξη της διασποράς στα μεγέθη των κρυσταλλιτών οδηγεί σε εμφάνιση του φαινομένου της τήξης σε μια περιοχή θερμοκρασιών. Το ίδιο ισχύει, αντίστοιχα και για το φαινόμενο της κρυστάλλωσης. Έτσι, οι θερμοκρασίες T_m και T_c αναφέρονται στην κορυφή των καμπυλών και αντιπροσωπεύουν τη θερμοκρασία, όπου παρατηρείται ο μέγιστος ρυθμός του φαινομένου [49].

Κάτι που παρατηρείται έντονα στα δείγματα με χρήση N435 στους 40 °C και για τους δυο διαλύτες και λιγότερο στην τεχνική μάζας είναι ο σχηματισμός μιας καθαρής ενδόθερμης κορυφής τήξης κατά την πρώτη θέρμανση και διεύρυνση του πλάτους της

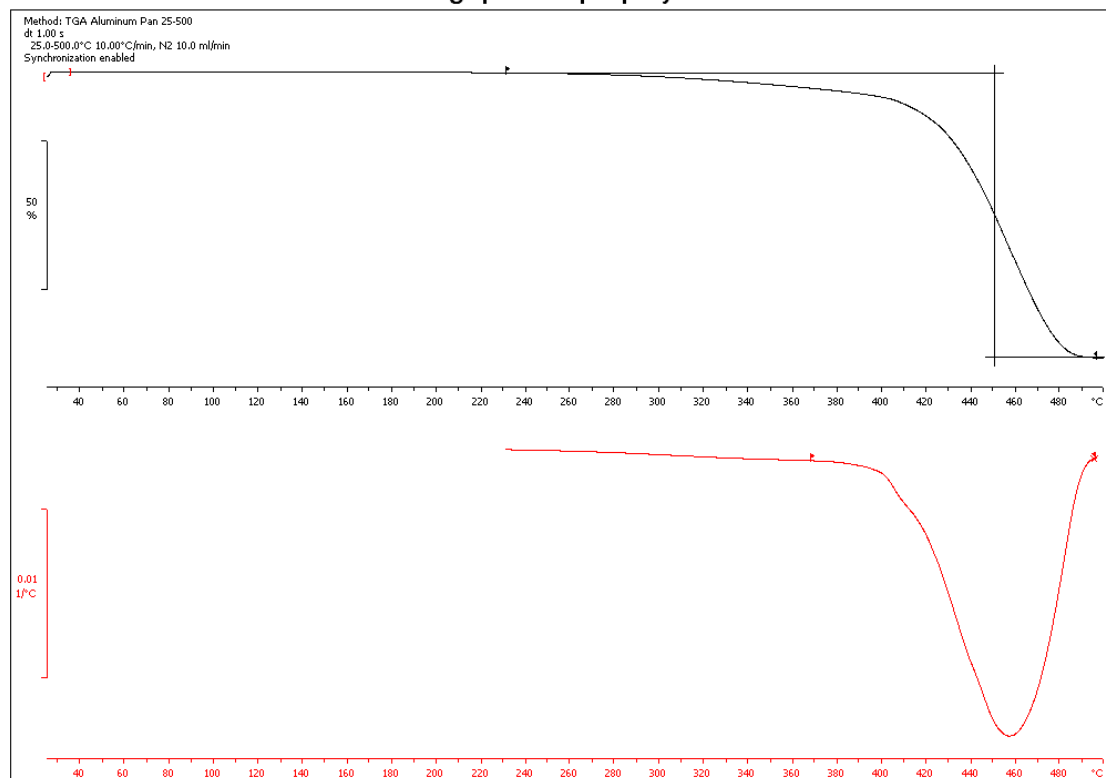
ενδόθερμης καμπύλης και σχηματισμός περισσότερων επικαλυπτόμενων κορυφών κατά τη δεύτερη θέρμανση. Στα προϊόντα των αντιδράσεων στους 50 και 60 °C η καμπύλη της πρώτης θέρμανσης περιλαμβάνει, συνήθως, περισσότερες από μια επικαλυπτόμενες κορυφές και κορυφή της δεύτερης θέρμανσης είναι μεν διευρυμένη αλλά πιο ξεκάθαρη. Η πολλαπλότητα των κορυφών προκύπτει λόγω των διαφορετικής ποιότητας κρυσταλλικών περιοχών που συνθέτουν το δείγμα. Έτσι, στα δείγματα των 50 και 60 °C που παρατηρείται εξάλειψη της πολλαπλότητας των κορυφών κατά τη δεύτερη θέρμανση σημαίνει ότι δημιουργούνται πιο ομοιόμορφες κρυσταλλικές περιοχές από αυτές που είχαν σχηματιστεί κατά την επεξεργασία (ξήρανση) του δείγματος.

b. Πείραμα μεγάλης εργαστηριακής κλίμακας

Το προϊόν της μεγάλης κλίμακας που παράχθηκε με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C αναλύθηκε με τις μεθόδους DSC και TGA. Στα παρακάτω Σχήματα παρουσιάζονται τα φάσματα που λήφθηκαν και στον Πίνακα 38 καταγράφονται οι θερμομικές ιδιότητες.



Σχήμα 31. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης μεγάλης κλίμακας με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 32. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης μεγάλης κλίμακας με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C

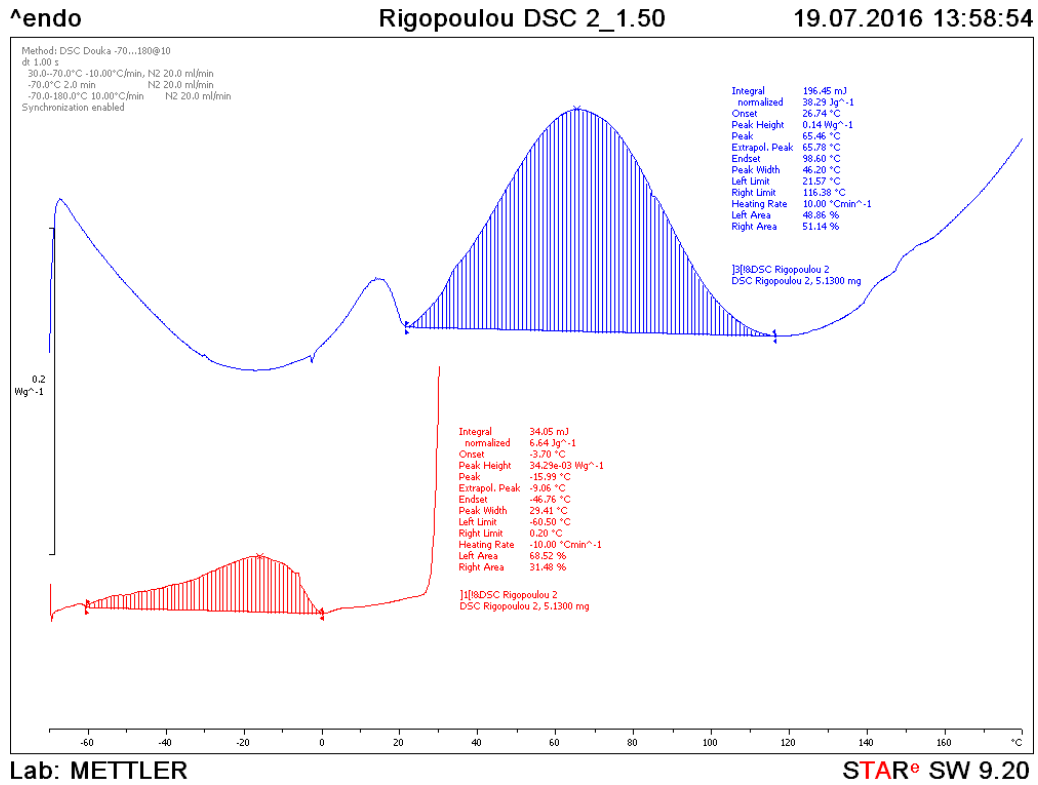
Πίνακας 38. Θερμικές ιδιότητες προϊόντος αντίδρασης μεγάλης κλίμακας

	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	x_c (%)	T_d (°C)	% Υπόλειμμα
Προϊόν PBS μεγάλης κλίμακας	72	112	47	79	78	65	59	441	5,8

II. Σύνθεση PBS με χρήση του ενζύμου *FoCut5a*

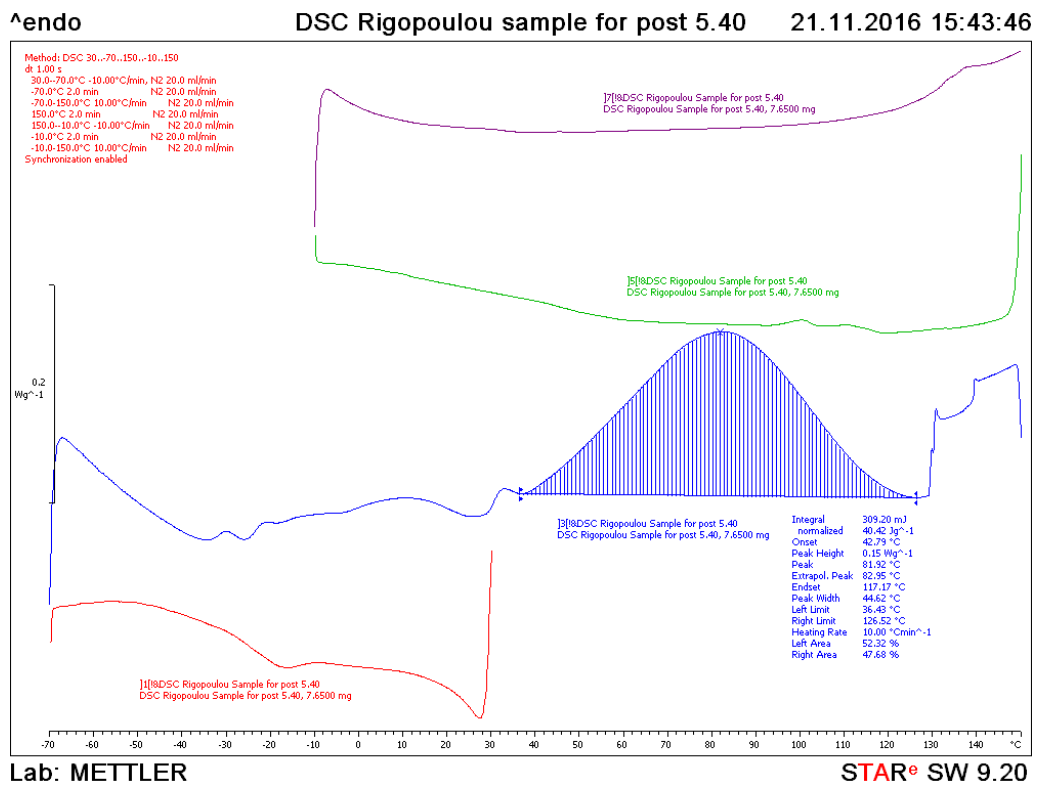
Τα προϊόντα των αντιδράσεων με χρήση του ενζύμου *FoCut5a* είναι υγρά, όπως έχει ήδη σχολιαστεί. Αυτό παραπέμπει είτε στο μη σχηματισμό προϊόντος είτε στο σχηματισμό oligομερών, τα οποία λόγω πολύ χαμηλού βαθμού πολυμερισμού είναι υγρά. Από τα γραφήματα DSC και TGA αναμένεται να εμφανιστούν σημεία βρασμού και όχι τήξης και κρυστάλλωσης, όπως στα στερεά προϊόντα των αντιδράσεων με N435. Ακολουθούν τα γραφήματα DSC και TGA για τα προϊόντα, κάποιων από τα πειράματα που διεξήχθησαν με χρήση του ενζύμου *FoCut5a*. Τα υπόλοιπα γραφήματα βρίσκονται στο Παράρτημα, στο τέλος της εργασίας.

i. Τολουόλιο - 50 °C



Σχήμα 33. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση *FoCut5a* και τολουόλιου στους 50 °C

ii. Ισοοκτάνιο - 40 °C

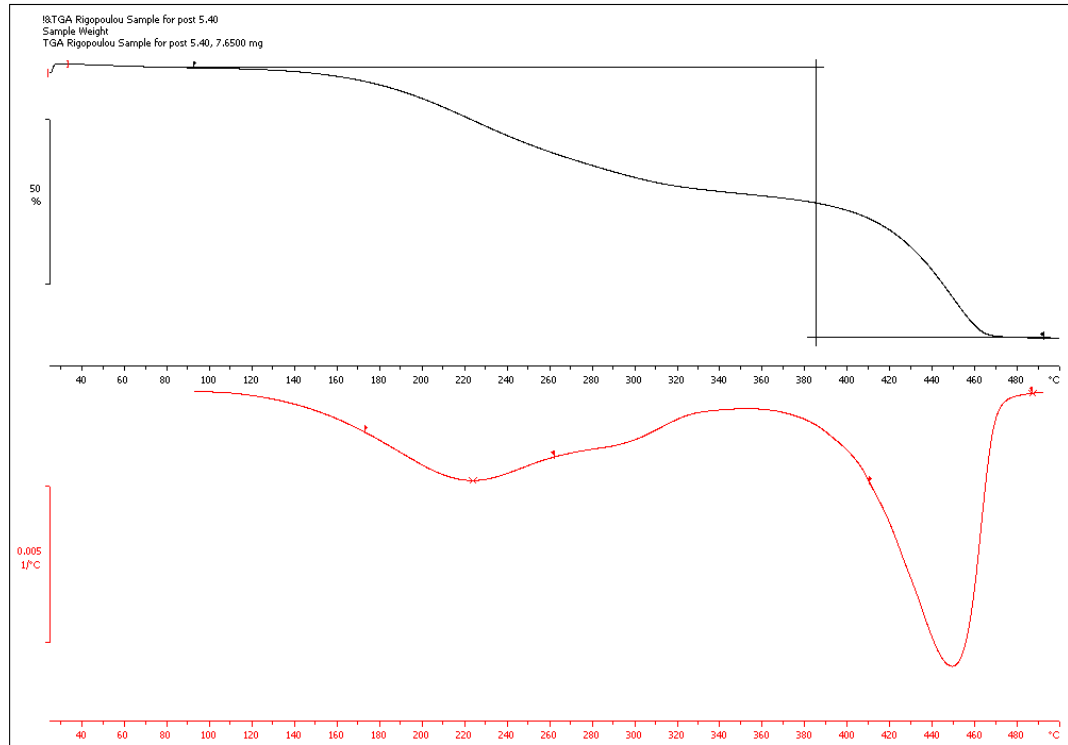


Σχήμα 34. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση *FoCut5a* και ισοοκτανίου στους 40 °C

Λendo

TGA Rigopoulou sample for post 5.40

15.03.2017 17:03:05



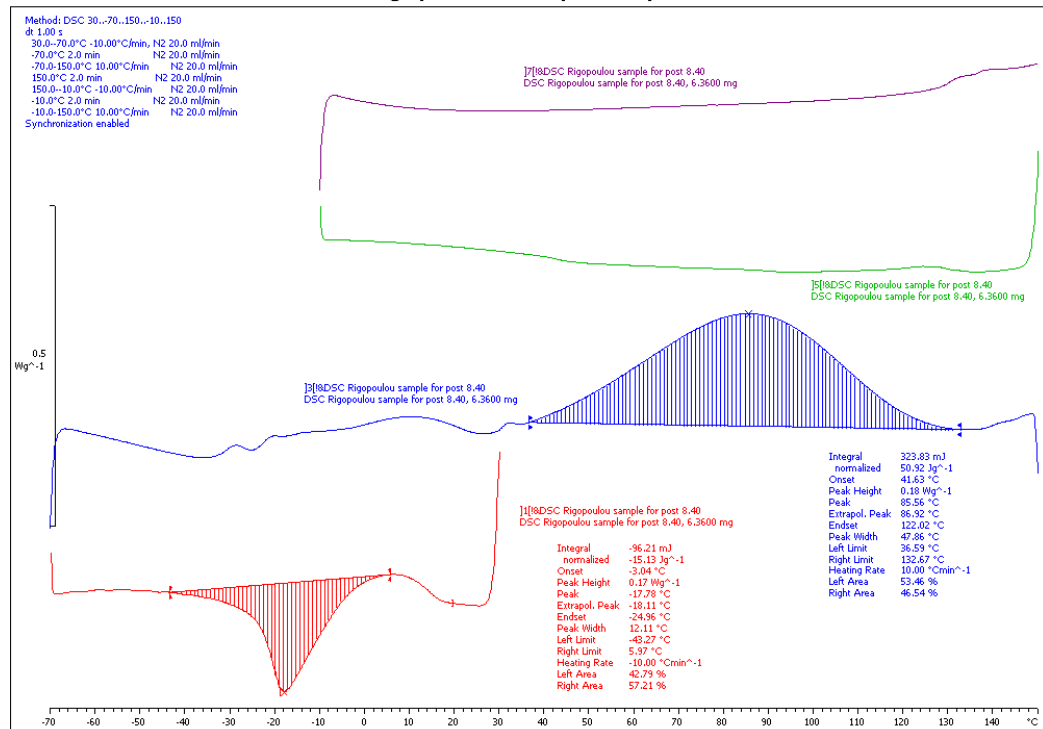
Σχήμα 35. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση FoCut5a και ισοοκτανίου στους 40 °C

iii. Χωρίς διαλύτη - 40 °C

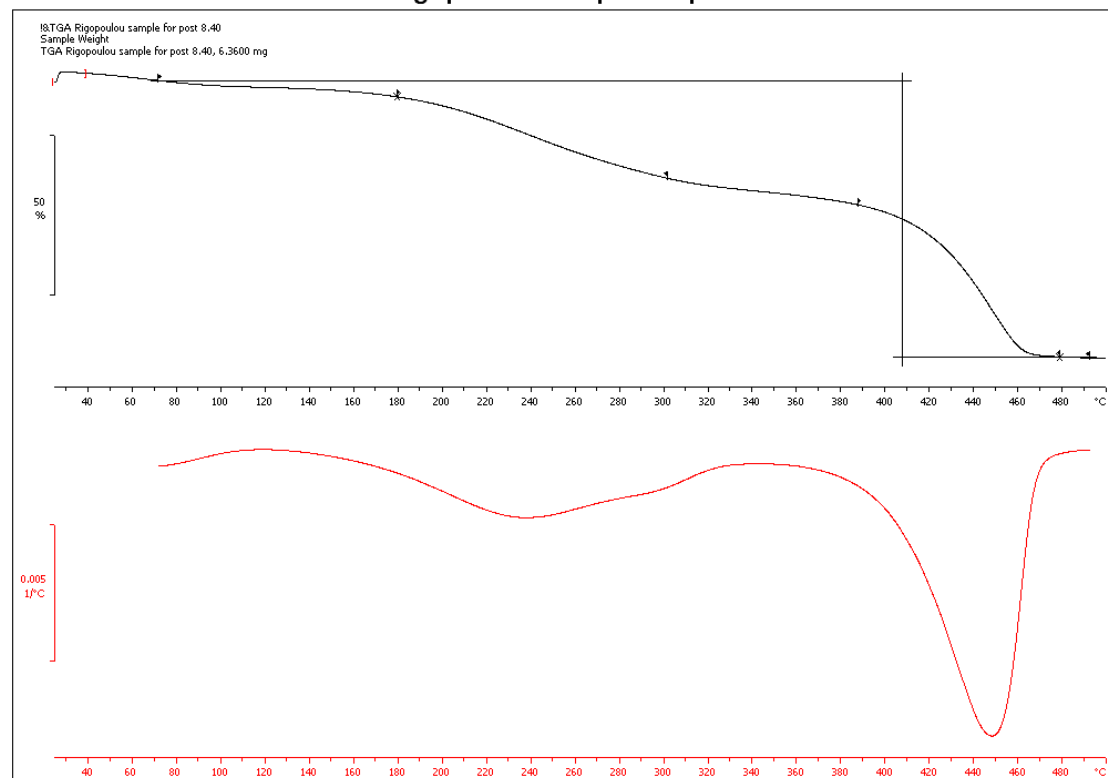
Λendo

DSC Rigopoulou sample for post 8.40

21.11.2016 15:53:39



Σχήμα 36. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση FoCut5a, χωρίς διαλύτη στους 40 °C



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 37. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση FoCut5a, χωρίς διαλύτη στους 40 °C

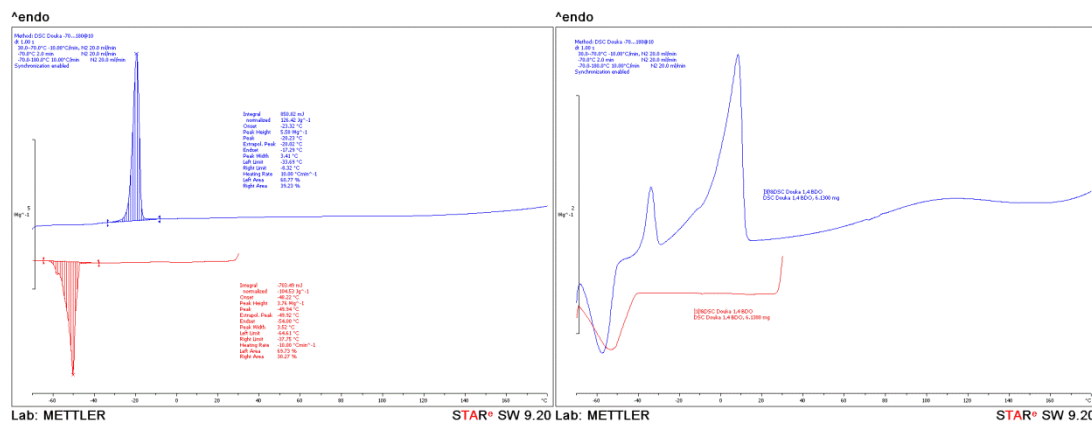
Στον Πίνακα 39 καταγράφονται οι θερμοκρασίες τήξης, T_b και οι θερμοκρασίες έναρξης και τέλους της περιοχής βρασμού, T_1 και T_2 , αντίστοιχα, για τα δείγματα που αναλύθηκαν.

Πίνακας 39. Θερμικές ιδιότητες προϊόντων ενζυμικών αντιδράσεων με χρήση FoCut5a

		T_1 (°C)	T_b (°C)	T_2 (°C)	ΔH_b (J/g)	
	Τολουόλιο	40 °C	9	79	127	65
		50 °C	22	65	116	38
FoCut5a	Ισοοκτάνιο	40 °C	37	82	127	40
		50 °C	12	73	125	27
	Χωρίς διαλύτη	40 °C	37	86	133	51
		50 °C	29	81	121	66

Στα γραφήματα DSC των δειγμάτων που παράχθηκαν με χρήση του ενζύμου FoCut5a αυτό που παρατηρείται σταθερά είναι ένα ενδόθερμο φαινόμενο κατά την (1^η) θέρμανση. Σε κάποια φάσματα, επίσης, όπως σε αυτό του Σχήματος 36 παρατη-

ρείται μια κορυφή με κατεύθυνση προς τα κάτω κατά την πρώτη ψύξη. Αυτό θα μπορούσε να επιβεβαιώνει την ύπαρξη μονομερών στο προϊόν, όπως φαίνεται από τα γραφήματα των μονομερών στο Σχήμα 38. Σε άλλα γραφήματα, όμως, που έχουν ληφθεί με εφαρμογή του κύκλου 2 (βλ. παράγραφο 4.4.1-II), όπως αυτό του Σχήματος 33, κατά την ψύξη παρατηρείται κορυφή με κατεύθυνση προς τα πάνω. Επομένως, τέτοιου είδους κορυφές μπορεί να οφείλονται και σε σφάλματα του οργάνου (artifacts), τα οποία σε χαμηλές θερμοκρασίες είναι αρκετά πιθανό να εμφανιστούν. Από τα γραφήματα TGA φαίνεται πως η αποδόμηση των υλικών ξεκινάει από χαμηλές θερμοκρασίες (< 100 °C).



Σχήμα 38. Γραφήματα DSC μονομερών: DES (αριστερά), 1,4 BDO (δεξιά)

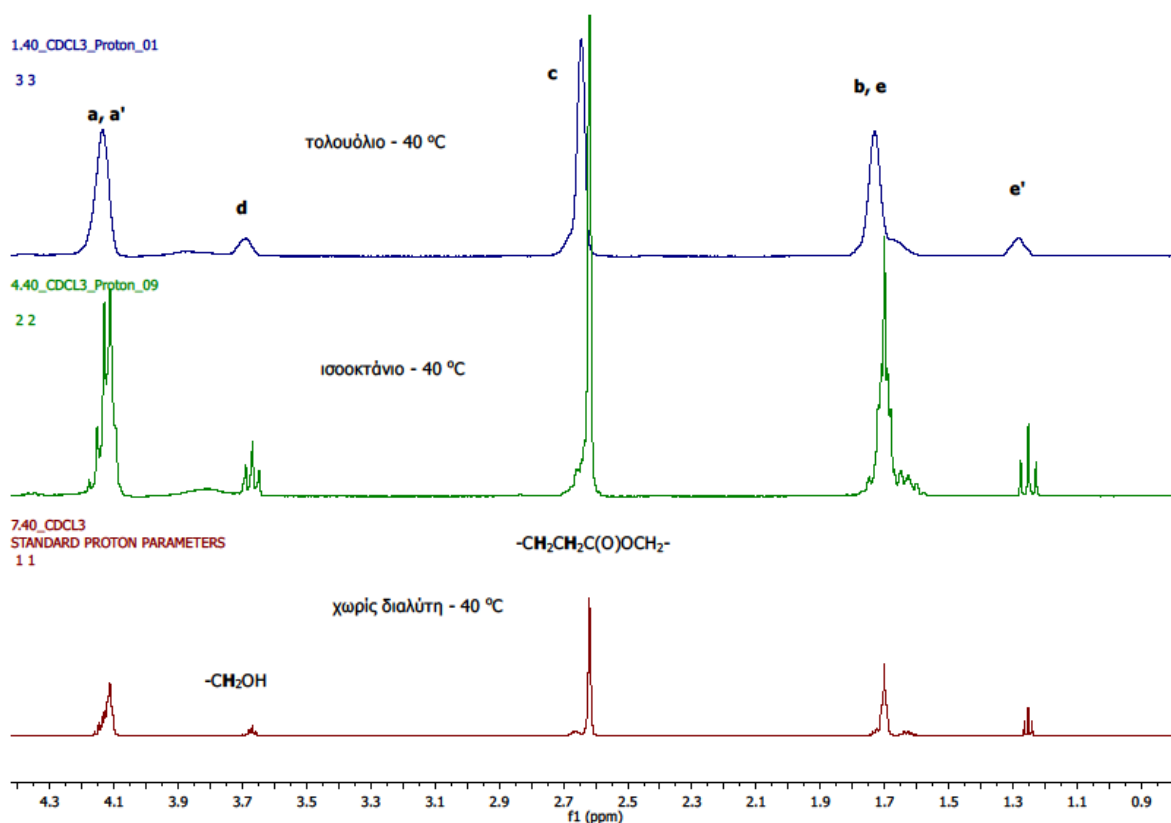
5.1.3 Προσδιορισμός μέσου-αριθμού Μοριακού Βάρους μέσω Φασματομετρίας NMR

Κάποια από τα προϊόντα που παράχθηκαν αναλύθηκαν με τη μέθοδο $^1\text{H-NMR}$. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται κάποια από τα φάσματα που προέκυψαν και καταγράφονται τα μέσου-αριθμού μοριακά βάρη, όπως προέκυψαν, με τρόπο που εξηγείται στο υποκεφάλαιο 4.4.3.

I. Πειράματα με χρήση N435

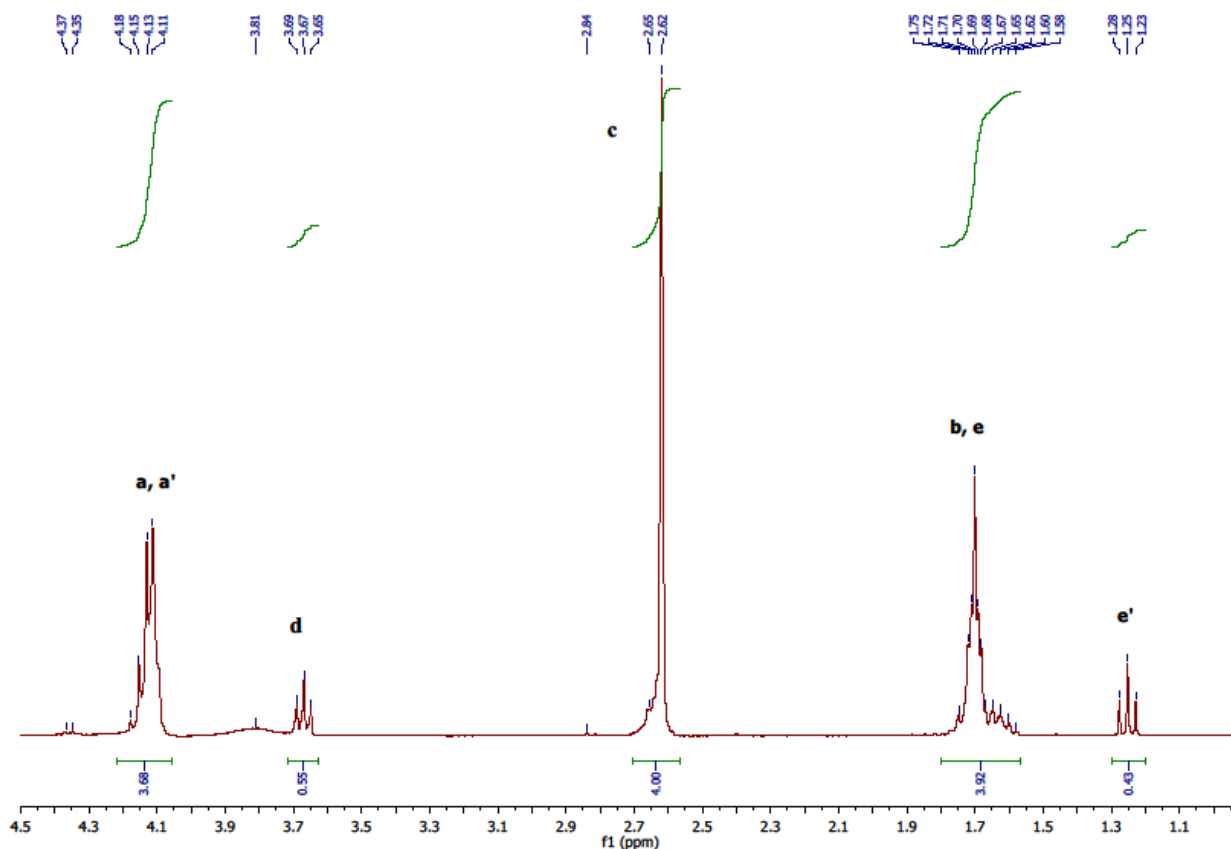
Από τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων με χρήση του ενζύμου N435, γίνεται ταυτοποίηση της δομικής μονάδας του PBS. Βέβαια, κάποια δείγματα εμφανίζουν μετατοπισμένες κορυφές, οι οποίες δεν πέφτουν ακριβώς πάνω στις αντίστοιχες του εμπορικού PBS, το οποίο εμφανίζει σημαντικά υψηλότερα μοριακά βάρη.

Στο Σχήμα 39 παρουσιάζονται τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων στους 40 °C με χρήση τολουολίου, ισοοκτανίου και χωρίς διαλύτη. Στα δείγματα με ισοοκτανίο και χωρίς διαλύτη παρατηρείται σχηματισμός της χαρακτηριστικής τριπλέτας για την κορυφή των υδρογόνων d. Στο δείγμα τολουολίου, όμως η αντίστοιχη κορυφή είναι μονή, δηλαδή δεν παρατηρείται διάσχιση στις τρεις συνήθεις κορυφές που παρατηρούνται για αυτά τα υδρογόνα. Το ίδιο παρατηρείται και για τα υδρογόνα e'.



Σχήμα 39. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ προϊόντων αντιδράσεων με χρήση N435 στους 40 °C με τολουόλιο (πάνω), ισοοκτάνιο (κέντρο) και χωρίς διαλύτη (κάτω)

Στη συνέχεια, παρατίθεται το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προϊόντος της αντίδρασης με χρήση ισοοκτανίου στους 40 °C, ώστε να αναλυθούν οι κορυφές του. Όπως φαίνεται, τα υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση a και αντιστοιχούν στο άτομο του άνθρακα που βρίσκεται δίπλα από τον εστερικό δεσμό ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2-$) εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας, παρουσιάζουν απορρόφηση στα 4,11 – 4,18 ppm, με ένταση απορρόφησης 3,68. Τα υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση c ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2-$) εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας παρουσιάζουν απορρόφηση στα 2,62 – 2,65 ppm και ένταση απορρόφησης 4, όπως τέθηκε για λόγους που έχουν συζητηθεί (παράγραφος 4.4.3-II-b). Τα υδρογόνα b και e μοιράζονται την πολλαπλή κορυφή στα 1,58 – 1,75 ppm και ένταση απορρόφησης 3,92. Τα b ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) αντιπροσωπεύουν υδρογόνα εντός της δομικής μονάδας και τα e ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$) εκτός αυτής. Επίσης, τα σήματα χαμηλής έντασης των κορυφών στα 3,65 – 3,69 ppm και στα 1,23 – 1,28 ppm αντιστοιχούν στα υδρογόνα d ($-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{OH}$) και e' ($-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), αντίστοιχα, που ανήκουν έξω από τη δομική μονάδα. Έξω από τη δομική μονάδα βρίσκονται και τα υδρογόνα a' τα οποία μοιράζονται την ίδια κορυφή με τα υδρογόνα a.

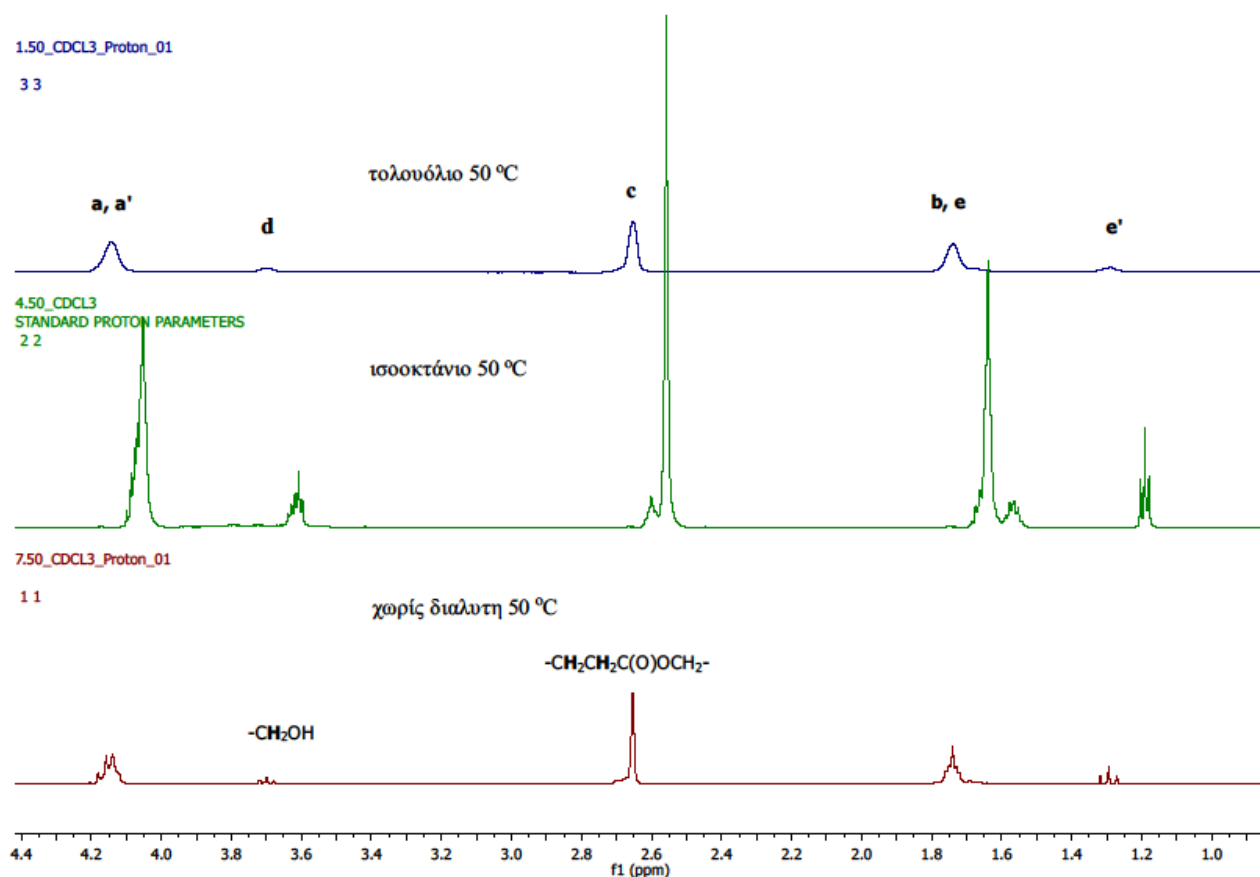


Σχήμα 40. Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του προϊόντος της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοκτανίου στους $40\text{ }^\circ\text{C}$

Παρατηρείται ότι οι ολοκληρώσεις στις κορυφές a-a' και b-e πλησιάζουν κοντά στο 4, κάτι που συμφωνεί με τον αριθμό των υδρογόνων τύπου a και τύπου b που διαθέτει η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα και επιβεβαιώνει την ταυτοποίηση μορίων PBS.

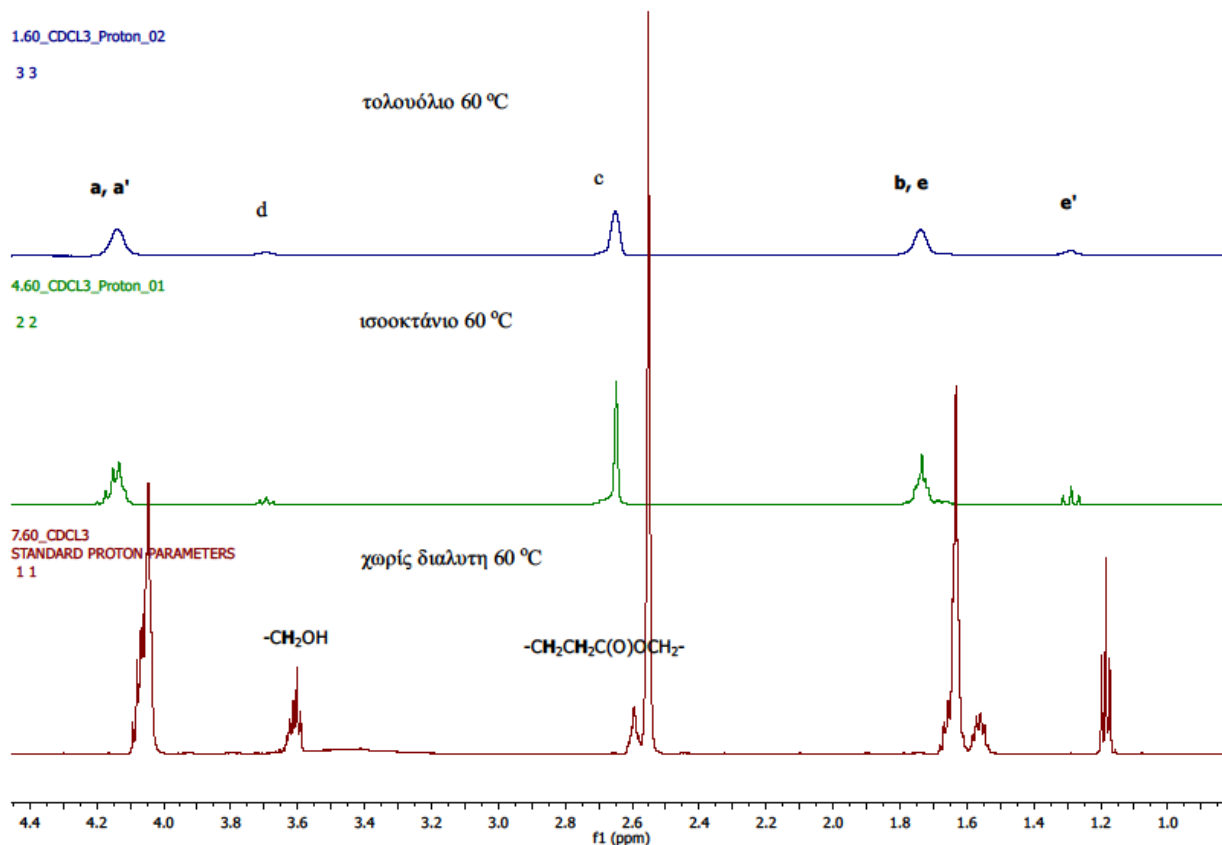
Πρέπει να αναφερθεί ότι η πολλαπλότητα των κορυφών εξαρτάται από το περιβάλλον τους. Η κορυφή ενός πρωτονίου με n ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια διαχωρίζεται σε n+1 κορυφές στο φάσμα NMR [56]. Για παράδειγμα, τα υδρογόνα ε' - $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}_3$ έχουν 2 υδρογόνα στο περιβάλλον τους και θα έπρεπε να εμφανίζουν 3 κορυφές.

Στο Σχήμα 41 παρουσιάζονται τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων στους $50\text{ }^\circ\text{C}$ με χρήση τολουολίου, ισοκτανίου και χωρίς διαλύτη. Στα δείγματα με ισοκτανίο και χωρίς διαλύτη παρατηρείται σχηματισμός της χαρακτηριστικής τριπλέτας για την κορυφή των υδρογόνων d. Στο δείγμα τολουολίου, όμως και πάλι η αντίστοιχη κορυφή είναι μονή. Το ίδιο παρατηρείται και για τα υδρογόνα e'. Επίσης, οι κορυφές του δείγματος με ισοκτανίο είναι ελαφρώς μετατοπισμένες προς τα δεξιά σε σχέση με τα άλλα δύο δείγματα.



Σχήμα 41. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ προϊόντων αντιδράσεων με χρήση N435 στους 50 °C με τολουόλιο (πάνω), ισοοκτάνιο (κέντρο) και χωρίς διαλύτη (κάτω)

Στο Σχήμα 42 παρουσιάζονται τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων στους 60 °C με χρήση τολουολίου, ισοοκτανίου και χωρίς διαλύτη. Στο δείγμα με ισοοκτάνιο παρατηρείται σχηματισμός της χαρακτηριστικής τριπλέτας για την κορυφή των υδρογόνων d. Στο δείγμα τολουολίου, η αντίστοιχη κορυφή είναι μονή και στο δείγμα χωρίς διαλύτη διασπάται σε πολλές κορυφές αλλά με τρεις κύριες. Το ίδιο παρατηρείται και για τα υδρογόνα e', τα οποία, όμως, στο δείγμα χωρίς διαλύτη εμφανίζουν τριπλέτα.



Σχήμα 42. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ προϊόντων αντιδράσεων με χρήση N435 στους $60\text{ }^\circ\text{C}$ με τολουόλιο (πάνω), ισοοκτάνιο (κέντρο) και χωρίς διαλύτη (κάτω)

Το φαινόμενο της εμφάνισης μόνης κορυφής στα δείγματα τολουολίου έναντι των τριπλών κορυφών που δίνουν τα περισσότερα από τα υπόλοιπα δείγματα θα μπορούσε να οφείλεται σε αυξημένα μοριακά βάρη, που στη δεδομένη περίπτωση δε συμβαίνει, αφού τα μοριακά βάρη των δειγμάτων με τολουόλιο είτε δεν είναι μεγαλύτερα είτε είναι ελαφρώς μεγαλύτερα από των άλλων δειγμάτων.

Παρακάτω, στον Πίνακα 40 καταγράφονται τα μέσου-αριθμού μοριακά βάρη για τα προϊόντα για τα οποία λήφθηκε φάσμα $^1\text{H-NMR}$, σύμφωνα με την Εξίσωση (3) που αναλύθηκε στο υποκεφάλαιο 4.4.3:

$$\overline{M}_n = m_0 \cdot \frac{I_{-\text{COO}-}}{I_{\text{end groups}}} + M_{\text{end groups}} \quad (3)$$

καθώς και ο αριθμός επανάληψης της δομικής μονάδας, n , που συνδέεται με το μέσου-αριθμού μοριακό βάρος με την εξής σχέση:

$$n = \frac{\overline{M}_n}{m_0} \quad (14)$$

όπου m_0 είναι το βάρος της δομικής μονάδας (172 g/mol).

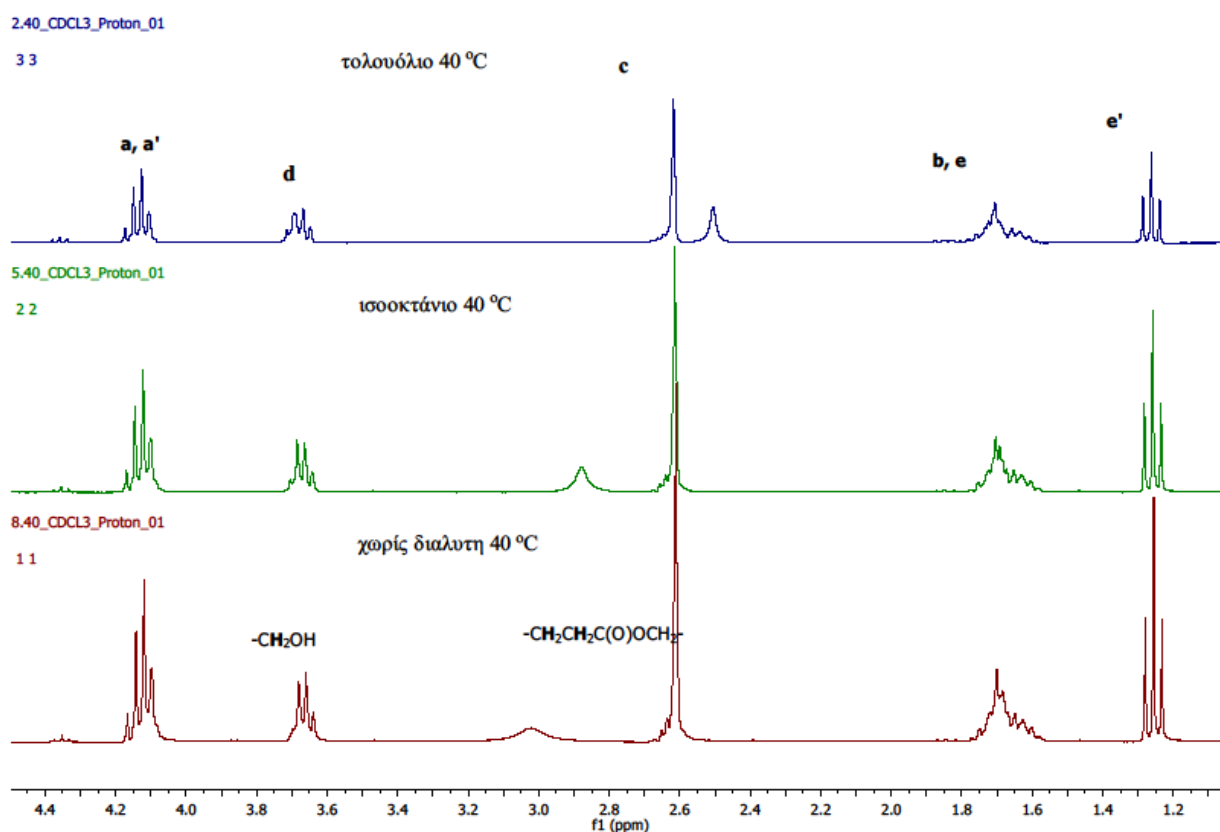
Πίνακας 40. Μέσου-αριθμού μοριακά βάρη και αριθμός επανάληψης της δομικής μονάδας για τα προϊόντα των αντιδράσεων με χρήση N435

		\overline{M}_n (g/mol)	n	
N435	Τολουόλιο	40 °C	1193	7
			1441	8
		50 °C	1347	8
			1614	9
		60 °C	858	5
			551	3
			1551	9
	Ισοοκτάνιο	40 °C	1467	9
			1246	7
		50 °C	1522	9
			1074	6
		60 °C	1718	10
			1551	9
	Χωρίς διαλύ- τη	40 °C	3940	23
		1682	10	
50 °C		1582	9	
		1682	10	
60 °C		820	5	
		1416	8	
		947	6	

II. Πειράματα με χρήση *FoCut5a*

Στα φάσματα των δειγμάτων που προήλθαν από αντιδράσεις με χρήση κουτινάσης αναγνωρίζονται κορυφές στα χαρακτηριστικά ppm, όπου συναντώνται οι κορυφές του PBS. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιες διαφορές, όπως η πολλαπλότητα των κορυφών περίπου στα 1,7 ppm (όπου στο PBS αντιστοιχούν τα υδρογόνα b, e) και η ύπαρξη μιας κορυφής κοντά στην κορυφή των υδρογόνων c (π.χ. όπως φαίνεται στο Σχήμα 43, δεξιά για το δείγμα με τολουόλιο και αριστερά για τα άλλα δύο δείγματα). Πολλαπλότητα εμφανίζουν και οι κορυφές περίπου στα 4,1 ppm, όπου στην περίπτωση του PBS αντιστοιχούν υδρογόνα a και a'.

Στο Σχήμα 43 παρουσιάζονται τα φάσματα των προϊόντων των αντιδράσεων με χρήση κουτινάσης στους 40 °C με χρήση τολουολίου, ισοοκτανίου και χωρίς διαλύτη. Η εικόνα των φασμάτων είναι αρκετά ομοιόμορφη.



Σχήμα 43. Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ προϊόντων αντιδράσεων με χρήση *FoCut5a* στους 40 °C με τολουόλιο (πάνω), ισοοκτάνιο (κέντρο) και χωρίς διαλύτη (κάτω)

Στον Πίνακα 41 καταγράφονται τα μέσου-αριθμού μοριακά βάρη και ο αριθμός επανάληψης της δομικής μονάδας για τα προϊόντα των αντιδράσεων με χρήση *FoCut5a* για τα οποία λήφθηκε φάσμα $^1\text{H-NMR}$.

Πίνακας 41. Μέσου-αριθμού Μοριακά Βάρη για τα προϊόντα των αντιδράσεων με χρήση *FoCut5a*

		\overline{M}_n (g/mol)	<i>n</i>		
<i>FoCut5a</i>	Τολουόλιο	418	2		
		40 °C	460	3	
			393	2	
		60 °C	369	2	
			367	2	
		Ισοοκτάνιο	40 °C	416	2
	478			3	
	60 °C		394	2	
			412	2	
	Χωρίς διαλύτη		40 °C	385	2
				435	3
		60 °C	440	3	
455			3		
		348	2		

5.2 Μεταπολυμερισμός μάζας προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού

Σκοπός του δεύτερου μέρους της πειραματικής εργασίας είναι η εύρεση των κατάλληλων χρόνων για το μεταπολυμερισμό δύο σταδίων. Πριν, όμως, ερευνηθούν οι κατάλληλοι χρόνοι, έγιναν κάποιες δοκιμές μεταπολυμερισμού σε συγκεκριμένες συνθήκες.

5.2.1 Δοκιμές μεταπολυμερισμού με προεπιλεγμένη μέθοδο

Οι δοκιμές μεταπολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν σε συγκεκριμένες συνθήκες που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς και σε άλλες προσπάθειες μεταπολυμερισμού [6]. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε παρουσιάζεται στον Πίνακα 42.

Πίνακας 42. Συνθήκες δοκιμών μεταπολυμερισμού διάφορων δειγμάτων

	T (°C)	t (hr)
1^ο στάδιο	80	2
2^ο στάδιο	90	16

Διάφορα δείγματα τέθηκαν στην παραπάνω μέθοδο μεταπολυμερισμού, προκειμένου να δοθεί εικόνα της αντίδρασης μεταπολυμερισμού σε σχέση με το είδος του δείγματος. Εξετάστηκαν δείγματα που παράχθηκαν με N435 αλλά και κάποια με *FoCut5a*.

I. Δοκιμές μεταπολυμερισμού σε δείγματα που παρήχθησαν με χρήση N435

Η συγκριτική εικόνα των δειγμάτων που τέθηκαν σε δοκιμή μεταπολυμερισμού, πριν και μετά από αυτόν παρουσιάζεται στον Πίνακα 43.

Πίνακας 43. Μέσου-αριθμού μοριακά βάρη για δείγματα πριν και μετά το μεταπολυμερισμό και αύξηση μεγέθους

	\overline{M}_n enz (g/mol)	\overline{M}_n post (g/mol)	$\Delta\overline{M}_n$ (g/mol)
N435 - Τολουόλιο – 40 °C	1440	2870	1430
N435 - Τολουόλιο – 60 °C	3940	4165	225
N435 - Ισοοκτάνιο – 40 °C	1550	2030	480
N435 - Ισοοκτάνιο – 40 °C	1250	1800	550
N435 - Ισοοκτάνιο – 50 °C	1370	3740	2370

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 43, το δείγμα που παρουσίασε τη μεγαλύτερη αύξηση μοριακού βάρους κατά το μεταπολυμερισμό είναι αυτό που παράχθηκε με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C. Παρατηρείται, ότι το δείγμα που εμφάνισε το μεγαλύτερο $\Delta\overline{M}_n$ δεν είναι αυτό που είχε εξ αρχής το υψηλότερο μοριακό βάρος. Αντίθετα, το δεύτερο δείγμα N435 - Τολουόλιο – 40 °C, που εμφάνισε το υψηλότερο μοριακό βάρος κατά τον προπολυμερισμό, παρουσιάζει πολύ μικρή αύξηση κατά το μεταπολυμερισμό.

II. Δοκιμές μεταπολυμερισμού σε δείγματα που παράχθηκαν με χρήση FoCut5a

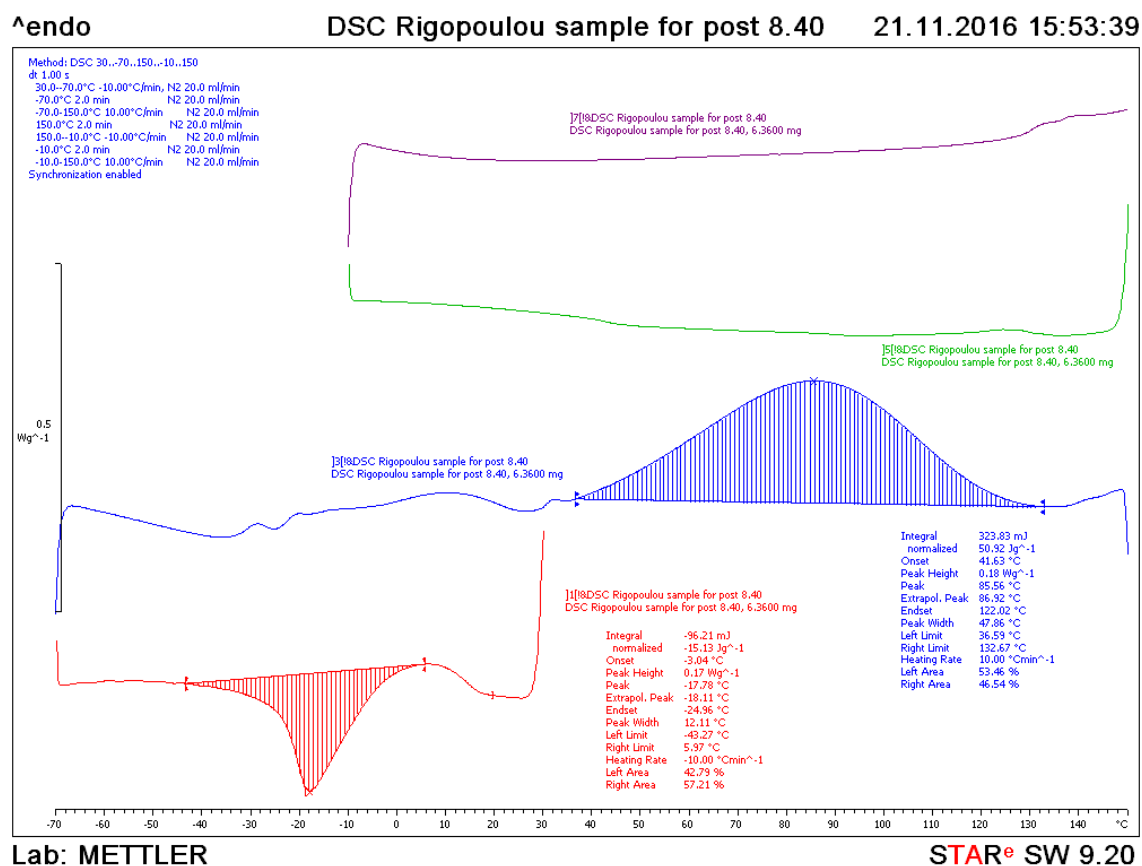
Δύο μόνο δείγματα από αυτά που παράχθηκαν με χρήση FoCut5a τέθηκαν σε δοκιμή μεταπολυμερισμού και τα αποτελέσματα, ως προς το μοριακό βάρος καταγράφονται στον Πίνακα 44.

Πίνακας 44. Μέσου-αριθμού μοριακά βάρη για δείγματα πριν και μετά το μεταπολυμερισμό και αύξηση μεγέθους

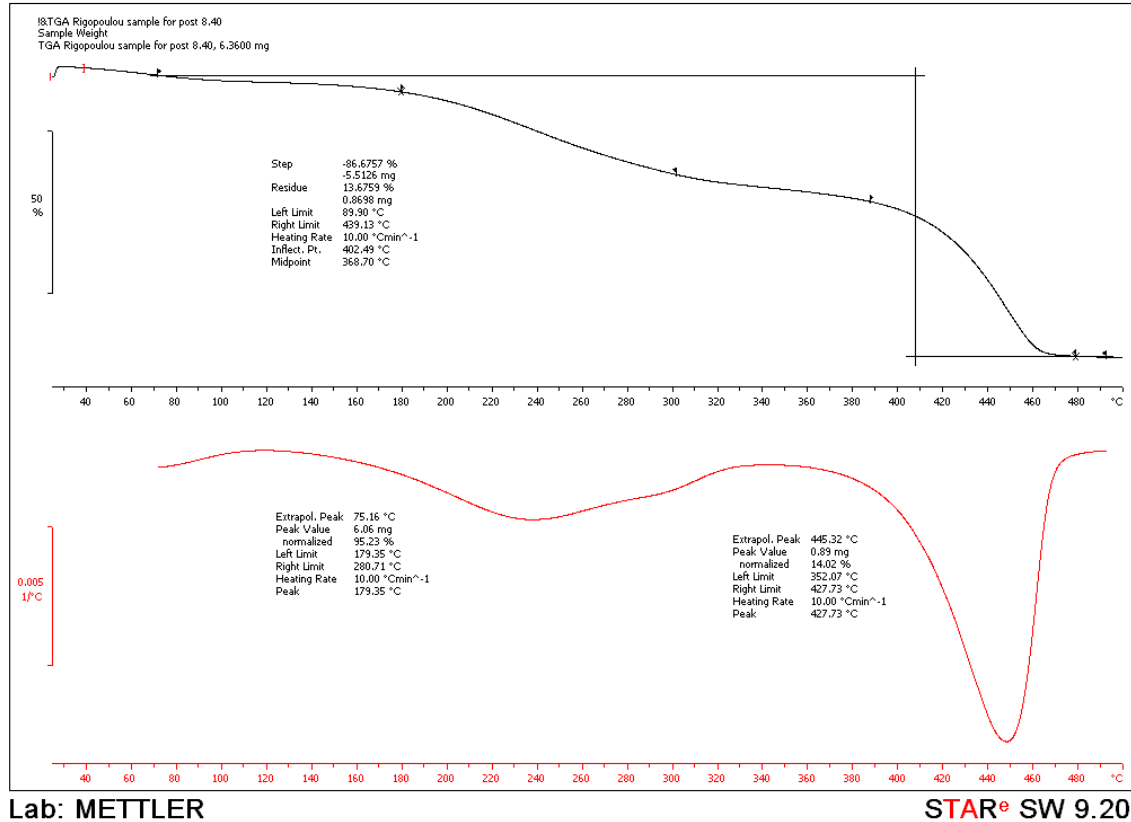
	\overline{M}_n enz (g/mol)	\overline{M}_n post (g/mol)	$\Delta\overline{M}_n$ (g/mol)
FoCut5a - Ισοοκτάνιο – 40 °C	478	565	87
FoCut5a – χωρίς διαλύτη – 40 °C	440	516	76

Αξίζει να παρατηρηθεί η συμπεριφορά των δειγμάτων, όπως απεικονίζεται πριν το μεταπολυμερισμό, στα διαγράμματα DSC και TGA. Ενδεικτικά, παρατίθενται τα α-

ντίστοιχα διαγράμματα για το δείγμα *FoCut5a* – χωρίς διαλύτη – 40 °C (Σχήμα 44, Σχήμα 45). Στο γράφημα DSC φαίνεται ότι τους 80 °C σχηματίζεται ενδόθερμη κορυφή κατά τη θέρμανση του δείγματος, η οποία παραπέμπει μάλλον σε εξάτμιση προϊόντος. Επίσης, στο γράφημα TGA καταγράφεται μείωση της μάζας του δείγματος από του 80 °C. Επομένως, είναι αμφίβολη η ορθότητα της δοκιμής μεταπολυμερισμού αρχικά στους 80 και έπειτα στους 90 °C. Ωστόσο, τα μοριακά βάρη, όπως προσδιορίστηκαν και για αυτά τα δείγματα μέσω NMR, αποκαλύπτουν μια πολύ μικρή αύξηση μετά την προσπάθεια μεταπολυμερισμού, η οποία μπορεί να αποτελεί και μέρος του σφάλματος των μετρήσεων. Πάντως, σίγουρα στην περίπτωση των δειγμάτων που παράχθηκαν με χρήση του *FoCut5a* δεν υπάρχει λόγος να τίθενται σε διεργασία μεταπολυμερισμού. Εξάλλου τα δείγματα πριν τη δοκιμή μεταπολυμερισμού είναι υγρά διμερή, το πολύ τριμερή και έτσι παραμένουν.



Σχήμα 44. Γράφημα DSC για το δείγμα *FoCut5a* – χωρίς διαλύτη – 40 °C

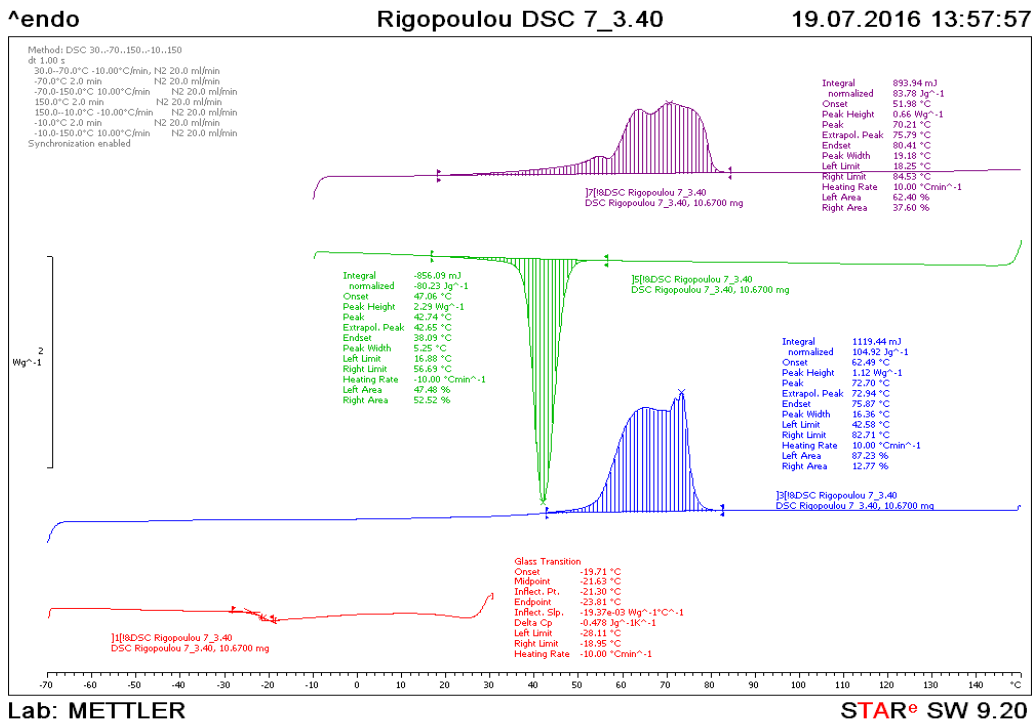


Σχήμα 45. Γράφημα TGA για το δείγμα *FoCut5a* – χωρίς διαλύτη – 40 °C

5.2.2 1^ο στάδιο διεργασίας μεταπολυμερισμού

Εφόσον εκτιμήθηκε ότι η διεργασία μεταπολυμερισμού δεν έχει νόημα για τα δείγματα που παράχθηκαν με χρήση κουτινάσης, η μελέτη του 1^{ου} και του 2^{ου} σταδίου του μεταπολυμερισμού επικεντρώνεται στα δείγματα του N435.

Αρχικά, μελετήθηκε ο χρόνος του πρώτου σταδίου της διεργασίας μεταπολυμερισμού. Επιλέχθηκε ένα δείγμα που είχε σχετικά υψηλό M_n και θερμάνθηκε για διάφορους χρόνους στους 80 °C, ώστε να βρεθεί ο χρόνος αντίδρασης στον οποίο άρχιζε να σταθεροποιείται το σημείο τήξης του υλικού κατά την αύξησή του. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 46, η δεύτερη τήξη του υλικού ξεκινά πριν τους 70 °C, οπότε στους 80 °C που θερμαίνεται το δείγμα, θα είναι σε μορφή τήγματος. Έτσι, ο μεταπολυμερισμός χαρακτηρίζεται ως μεταπολυμερισμός τήγματος.

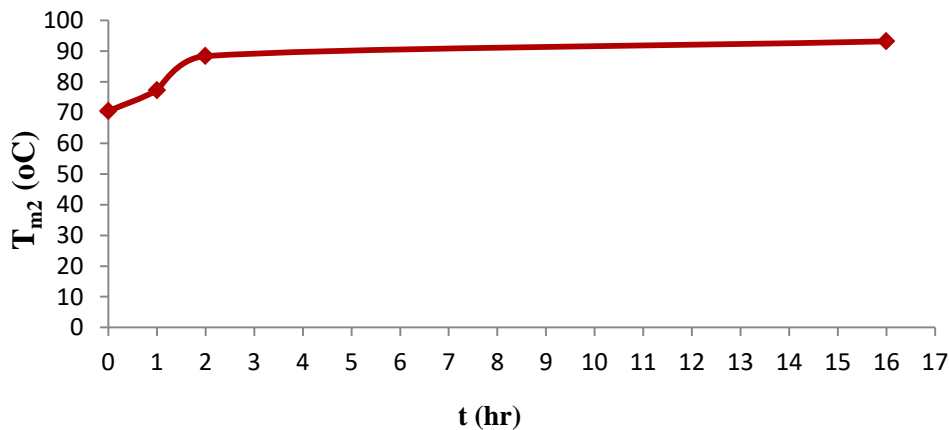


Σχήμα 46. Γράφημα DSC προϊόντος αντίδρασης με N435 στους 40 °C χωρίς διαλύτη

Για την εύρεση του κατάλληλου χρόνου του πρώτου σταδίου έγιναν δοκιμές με χρόνους αντίδρασης 1, 2 και 16 h. Το προπολυμερές που τέθηκε σε δοκιμές μεταπολυμερισμού είναι ένα προϊόν αντίδρασης με χρήση N435 και τεχνική μάζας στους 40 °C. Τα αποτελέσματα των δοκιμών παρατίθενται στον Πίνακα 45 και παρίστανται γραφικά στο Διάγραμμα 4.

Πίνακας 45. Σημεία τήξης για τα προϊόντα των δοκιμών μεταπολυμερισμού στους 80 °C σε δείγματα προπολυμερούς (N435, χωρίς διαλύτη 40 °C)

	προπολυμερές	δοκιμή 1 hr, 80 °C	δοκιμή 2 hr, 80 °C	δοκιμή 16 hr, 80 °C
T_{m2} (°C)	71	77	88	93



Διάγραμμα 4. Γραφική απεικόνιση των σημείων τήξης των δοκιμών μεταπολυμερισμού

Από το Διάγραμμα 4 φαίνεται πως ο χρόνος στον οποίο η θερμοκρασία τήξης, T_{m_2} , προσεγγίζει ικανοποιητικά τη μέγιστη τιμή των 16 hr είναι οι 2 hr. Οπότε, ο κατάλληλος χρόνος για το πρώτο στάδιο είναι 2 hr. Αυτό είναι λογικό, αφού το PBS είναι ένα υλικό που κρυσταλλώνεται αρκετά εύκολα, σε αντίθεση με άλλους πολυεστέρες, όπως το πολυ(γαλακτικό οξύ) (PLA).

Το χρόνο του δεύτερου σταδίου θα τον καθορίσει η σταθεροποίηση του μοριακού βάρους, M_n , του υλικού.

5.2.3 2^ο στάδιο διεργασίας μεταπολυμερισμού

Το δείγμα που έδωσε τη μεγαλύτερη αύξηση του M_n (N435 - Ισοοκτάνιο – 50 °C) κατά τα δοκιμαστικά πειράματα είναι αυτό που επιλέχθηκε για μελέτη του κατάλληλου χρόνου του 2^{ου} σταδίου. Οι μετρήσεις του μέσου-βάρους μοριακού βάρους πραγματοποιήθηκαν έμμεσα, με ιξωδομετρία διαλύματος. Για αυτό το λόγο ήταν απαραίτητο να επαναληφθεί το δεδομένο πείραμα σε μεγαλύτερη κλίμακα, ώστε να παραχθεί αρκετή ποσότητα υλικού και να μπορέσουν να γίνουν όσες δοκιμές μεταπολυμερισμού χρειάζονται. Το πείραμα της μεγάλης εργαστηριακής κλίμακας περιγράφεται ποσοτικά στην παράγραφο 4.2.4-II και η απόδοσή του καθώς και οπτικό υλικό διατίθενται στην παράγραφο 5.1.1-II-b.

Στο 2^ο στάδιο αυτό που μελετάται είναι ο βέλτιστος χρόνος για τον οποίο το M_w αποκτά τιμή που προσεγγίζει τη μέγιστη δυνατή που μπορεί να δώσει η αντίδραση σε εύλογο εύρος χρόνου. Έτσι, οι δοκιμές μεταπολυμερισμού έγιναν ξεκινώντας από το 1^ο στάδιο και συνεχίστηκαν σε 2^ο στάδιο για 8, 16 και 24 h. Όλα τα δείγματα των δοκιμών προέρχονται από το προϊόν του ενζυμικού πολυμερισμού μεγάλης εργαστηριακής κλίμακας που παράχθηκε με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C. Οι συνθήκες που έλαβαν χώρα τα πειράματα συνοψίζονται στον Πίνακα 46. Στον Πίνακα αυτό αναφέρεται και το δείγμα PP0, του μεταπολυμερισμού 1^{ου} σταδίου για λόγους σύγκρισης που θα χρειαστεί στη συνέχεια. Η εικόνα των δειγμάτων τόσο μετά από το πρώτο όσο και μετά από το δεύτερο στάδιο μεταπολυμερισμού για όλες τις δοκιμές είναι αρκετά επαναλήψιμη, χωρίς να παρατηρούνται σημαντικές διαφορές για τα προϊόντα των διάφορων δοκιμών. Τα προϊόντα ήταν ελαφρώς κιτρινισμένα και σε μορφή συμπαγούς μάζας, Σχήμα 47.

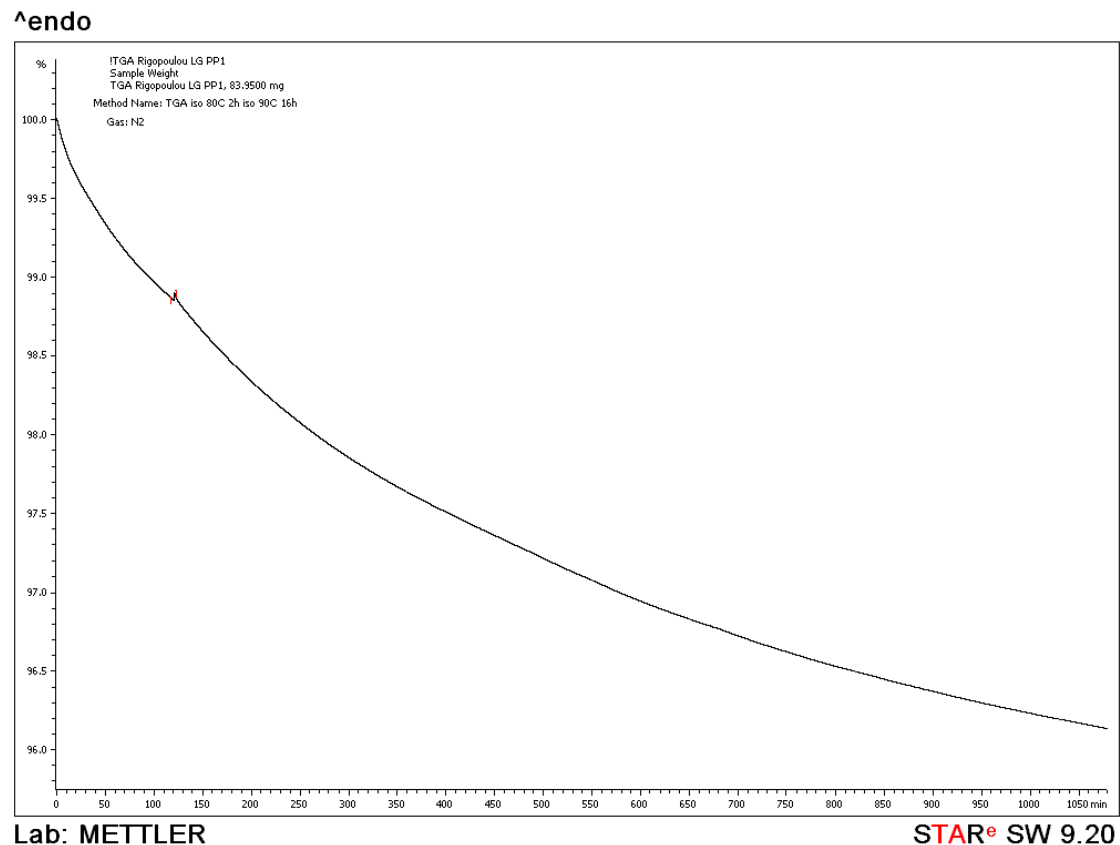
Πίνακας 46. Συνθήκες πειραμάτων μεταπολυμερισμού για τη μελέτη του 2ου σταδίου

Δείγμα	Συνθήκες 1 ^{ου} σταδίου		Συνθήκες 2 ^{ου} σταδίου	
	T (°C)	t (h)	T (°C)	t (h)
PP0	80	2	-	-
PP8	80	2	90	8
PP16	80	2	90	16
PP24	80	2	90	24



Σχήμα 47. Προϊόν μεταπολυμερισμού δύο σταδίων

Οι αντιδράσεις μεταπολυμερισμού πραγματοποιήθηκαν στο θερμοζυγό του οργάνου TGA, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Έτσι, υπήρχε η δυνατότητα να μετριέται η απώλεια μάζας σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης. Η μάζα του δείγματος μεταπολυμερισμού PP16 σε συνάρτηση με το χρόνο της αντίδρασης παρίσταται γραφικά στο Σχήμα 48. Όπως φαίνεται, κατά τη διάρκεια της αντίδρασης χάνεται περίπου το 4 % της αρχικής μάζας του δείγματος, που, λογικά, αντιστοιχεί στην αιθανόλη που είναι το σχηματιζόμενο παραπροϊόν της αντίδρασης. Το σήμα που δίνεται σε χρόνο 120 min οφείλεται στην αλλαγή της θερμοκρασίας.



Σχήμα 48. Γράφημα TGA για την αντίδραση μεταπολυμερισμού του δείγματος PP0.

I. Αποτελέσματα ιξωδομετρίας διαλύματος

Δείγμα από την ενζυμική αντίδραση αλλά και τα προϊόντα των δοκιμών μεταπολυμερισμού αναλύθηκαν μέσω της ιξωδομετρίας διαλύματος με μέθοδο ενός σημείου που περιγράφεται στο υποκεφάλαιο 4.4.4-III. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι, όπως έχει αναφερθεί, το χλωροφόρμιο. Τα αποτελέσματα της ιξωδομετρίας και κατ' επέκταση οι τιμές που προκύπτουν για το οριακό ιξώδες παρουσιάζονται στον Πίνακα 47. Το πρώτο δείγμα είναι αυτό του ενζυμικού προπολυμερισμού, το PP0 είναι το δείγμα που έχει μεταπολυμεριστεί κατά το 1^ο στάδιο (2 h στους 80 °C) και τα επόμενα δείγματα PP8, PP16 και PP24 είναι τα δείγματα που έχουν μεταπολυμεριστεί κατά το 1^ο στάδιο και στη συνέχεια σε 2^ο στάδιο για χρόνους 8, 16 και 24 h, αντίστοιχα.

Πίνακας 47. Πειραματικά αποτελέσματα ιξωδομετρίας διαλύματος

Δείγμα	Συγκέντρωση (g/dl)	Χρόνος εκροής διαλύτη (s)	Χρόνος εκροής διαλύματος (s)	[η] (g/dl)
προπολυμερές	0,5395	132,45 ± 0,06	135,87 ± 0,11	0,047
PP0	0,5013	132,45 ± 0,06	137,48 ± 0,17	0,075
PP8	0,5084	132,16 ± 0,06	138,37 ± 0,74	0,091
PP16	0,4447	132,45 ± 0,06	138,28 ± 0,09	0,098
PP24	0,4733	132,16 ± 0,06	138,98 ± 0,93	0,107

Από τα δεδομένα οριακού ιξώδους του Πίνακα 47 και την Εξίσωση 8, προκύπτουν οι τιμές του μέσου-βάρους μοριακού βάρους των δειγμάτων και η ποσοστιαία αύξηση του βάρους σε σχέση με το προπολυμερές, που παρουσιάζονται στον Πίνακα 48.

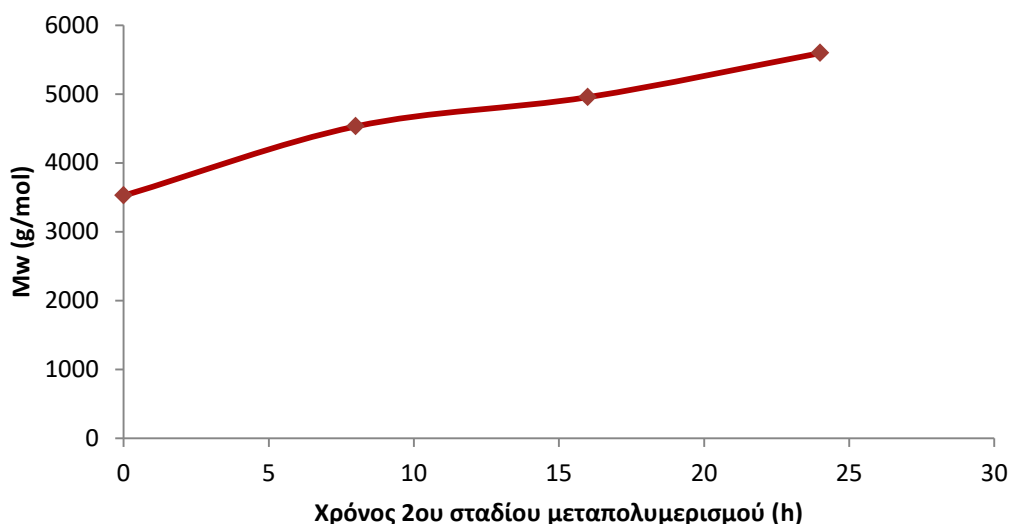
Πίνακας 48. Μέσου-αριθμού μοριακά βάρη για τα δείγματα του μεταπολυμερισμού και το δείγμα προπολυμερούς

Δείγμα	\overline{M}_w (g/mol)	$\Delta \overline{M}_w$ % (g/mol)
προπολυμερές	1967	-
PP0	3525	44
PP8	4530	57
PP16	4955	60
PP24	5595	65

Παρατηρείται πως το πρώτο στάδιο του μεταπολυμερισμού αυξάνει αρκετά το μοριακό βάρος του προπολυμερούς και πως κατά το δεύτερο στάδιο η αύξηση του χρόνου της αντίδρασης μεταπολυμερισμού συνεχίζει να αυξάνει το μοριακό βάρος.

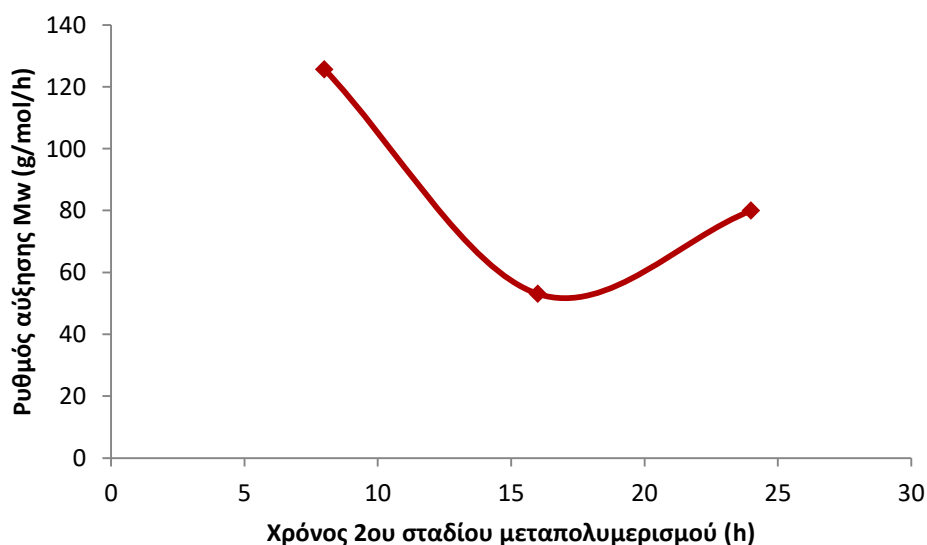
Για την επιλογή του κατάλληλου χρόνου του δεύτερου σταδίου του μεταπολυμερισμού, πρέπει να κριθεί πιο ποσοστό αύξησης είναι ικανοποιητικό σε σχέση με το

χρόνο. Η αύξηση στις 8 h του δεύτερου σταδίου (57 %) είναι αρκετά κοντά στην αύξηση των 24 h (65 %). Τα δεδομένα του Πίνακα 48 για το δείγμα του 1^{ου} σταδίου, PPO, και τα δείγματα του μεταπολυμερισμού δυο σταδίων απεικονίζονται γραφικά στο Διάγραμμα 5. Το δείγμα PPO αποτελεί το σημείο έναρξης για την αξιολόγηση του 2^{ου} σταδίου.



Διάγραμμα 5. Διάγραμμα μέσου-βάρους μοριακού βάρους δειγμάτων σε σχέση με το χρόνο του 2ου σταδίου μεταπολυμερισμού

Κρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 48 και του Διαγράμματος 5, προκύπτει το συμπέρασμα ότι στο διάστημα των 24 h που γίνεται η μελέτη του δεύτερου σταδίου του μεταπολυμερισμού η αύξηση του μοριακού βάρους πραγματοποιείται συνεχώς, χωρίς να παρουσιάζει τάση σταθεροποίησης. Όσον αφορά το ρυθμό αύξησης του μοριακού βάρους, αρχικά μειώνεται και στη συνέχεια αυξάνεται, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 6.



Διάγραμμα 6. Ρυθμός αύξησης μοριακού βάρους σε σχέση με το χρόνο του 2ου σταδίου μεταπολυμερισμού

Πρέπει να ερευνηθούν και μεγαλύτεροι χρόνοι διεξαγωγής του δεύτερου σταδίου του μεταπολυμερισμού, ώστε να εντοπιστεί ο χρόνος που ολοκληρώνεται η αντίδραση και ο χρόνος που τείνει να προσεγγίσει σταθερή τιμή το μοριακό βάρος. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η αύξηση στις 8 h του δεύτερου σταδίου προσεγγίζει ικανοποιητικά την αύξηση των 24. Βέβαια, σε υψηλότερα μοριακά βάρη αυτό το ποσοστό μπορεί να είναι σημαντικό. Δεδομένης της κλίμακας των πειραμάτων και των μεταβολών στα μοριακά βάρη, ο χρόνος που επιλέγεται ως κατάλληλος για το δεύτερο στάδιο είναι 8 h.

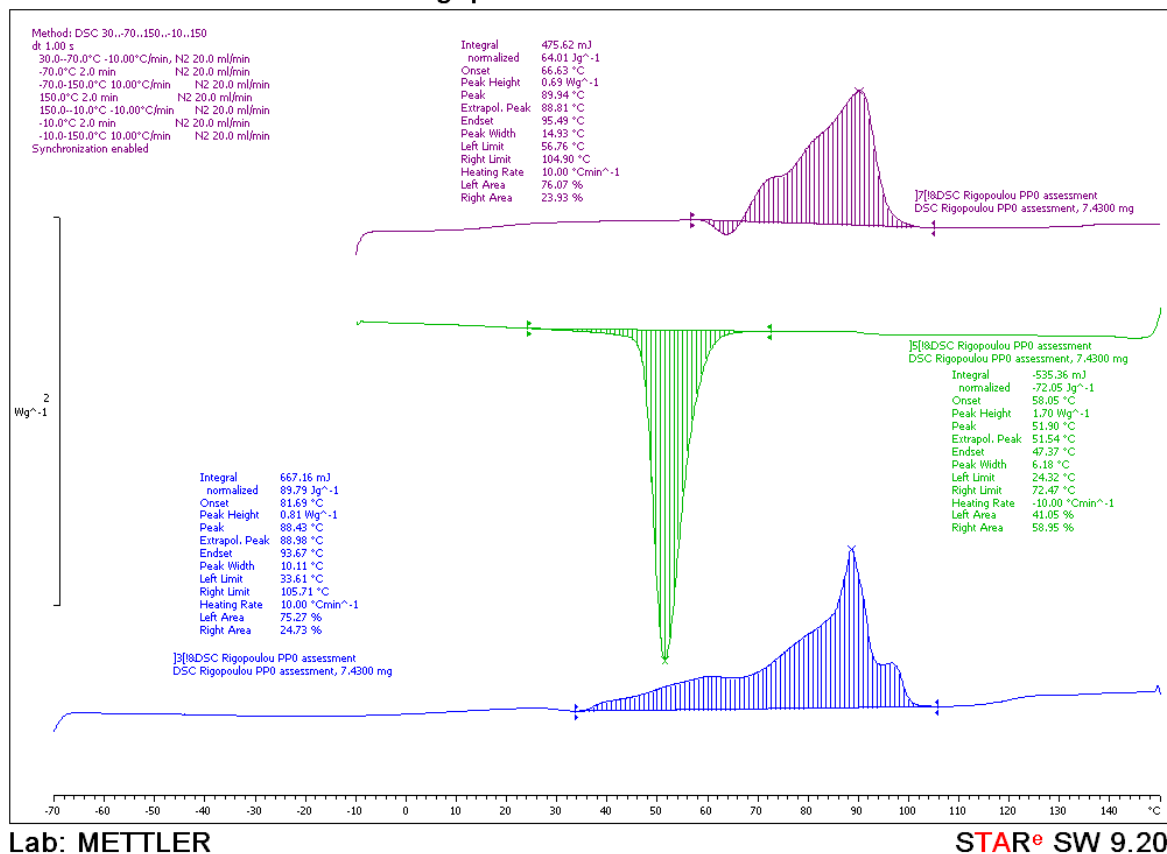
Στον Πίνακα 49 συνοψίζονται οι συνθήκες του μεταπολυμερισμού των δύο σταδίων με τους κατάλληλους χρόνους, όπως επιλέχθηκαν από την επεξεργασία που προηγήθηκε.

Πίνακας 49. Βέλτιστες συνθήκες διεργασίας μεταπολυμερισμού δύο σταδίων

	T (°C)	t (h)
1^ο στάδιο	80	2
2^ο στάδιο	90	8

II. Θερμικές ιδιότητες προϊόντων μεταπολυμερισμού

Πρέπει να αναφερθεί ότι στη δεδομένη μελέτη δεν έγινε αναζήτηση της βέλτιστης θερμοκρασίας για τα στάδια του μεταπολυμερισμού αλλά χρησιμοποιήθηκαν οι θερμοκρασιακές συνθήκες που έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στη βιβλιογραφία για το μεταπολυμερισμό του PBS [6]. Οι θερμοκρασίες του μεταπολυμερισμού έχουν επιλεγεί να είναι χαμηλές στα πλαίσια της «πράσινης» τεχνολογίας. Το προϊόν του ενζυμικού προπολυμερισμού μεγάλης κλίμακας εμφανίζει κορυφή τήξης στους 78 °C (Σχήμα 31, Πίνακας 38), δηλαδή σε μικρότερη θερμοκρασία από τους 80 °C, που γίνεται η θέρμανση στο 1^ο στάδιο. Άρα, αρχικά λαμβάνει χώρα μεταπολυμερισμός τήγματος. Κατά το 1^ο στάδιο του μεταπολυμερισμού, όμως, αυξάνεται η περιοχή τήξης του υλικού με κορυφή στους 90 °C και τερματισμό τήξης στους 105 °C (Σχήμα 49), κάτι που εξηγείται από την αύξηση του μοριακού βάρους, ενώ δεν παρατηρείται αύξηση του ποσοστού κρυσταλλικότητας (Πίνακας 50).



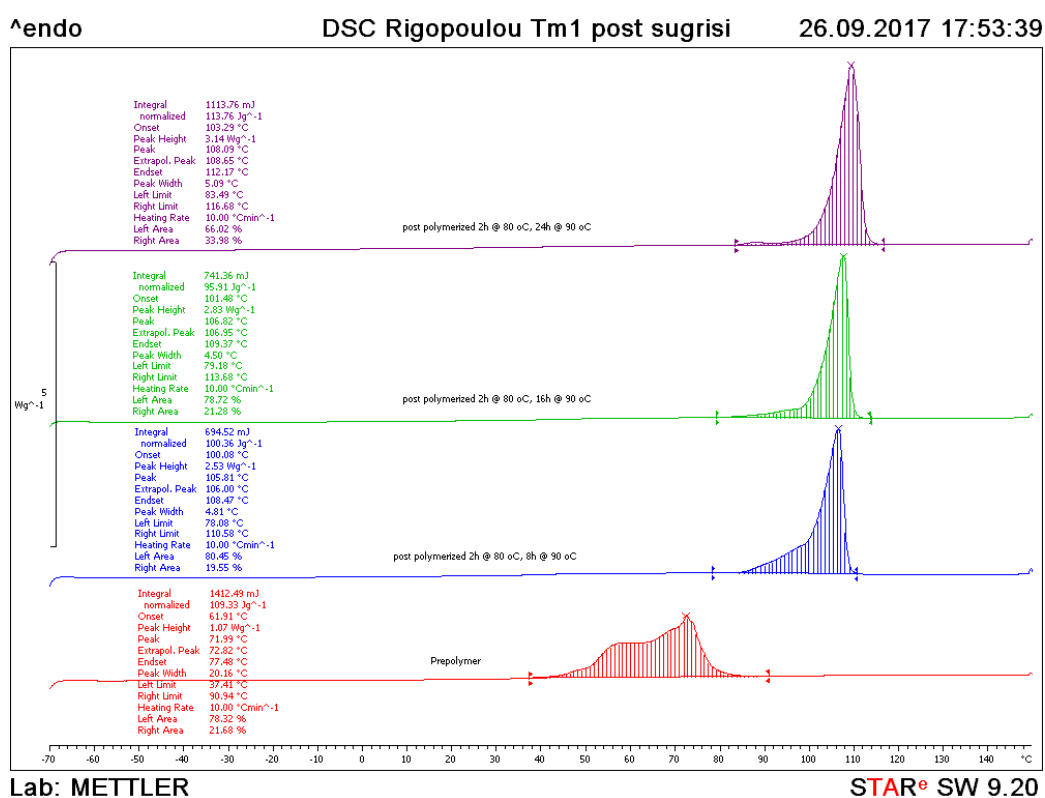
Σχήμα 49. Γράφημα DSC του δείγματος μεταπολυμερισμού 1ου σταδίου

Το δεύτερο στάδιο του μεταπολυμερισμού πραγματοποιείται στους 90. Σε όλα τα δείγματα μεταπολυμερισμού εκτός από το δείγμα PP0 του πρώτου σταδίου, η κορυφή δεύτερης τήξης είναι μεγαλύτερη από 90 °C αλλά το φαινόμενο ξεκινάει περίπου στους 75 °C (left limit) και ολοκληρώνεται περίπου στους 110 °C (right limit). Αυτό σημαίνει ότι ο μεταπολυμερισμός ξεκινάει ως τήγματος και ίσως μετατρέπεται σε στερεάς κατάστασης. Οι θερμικές ιδιότητες των δειγμάτων του μεταπολυμερισμού και του προϊόντος του ενζυμικού προπολυμερισμού για λόγους σύγκρισης παρατίθενται στον Πίνακα 50. Η αύξηση του χρόνου του δεύτερου σταδίου δεν επηρεάζει σημαντικά τις θερμοκρασίες πρώτης και δεύτερης τήξης ούτε τη θερμοκρασία κρυστάλλωσης. Δηλαδή, ενώ το μέσου-βάρους μοριακό βάρος αυξάνεται, οι θερμικές ιδιότητες των δειγμάτων δεν επηρεάζονται ουσιαστικά από το χρόνο του δεύτερου σταδίου μεταπολυμερισμού. Η εικόνα των θερμικών χαρακτηριστικών (T_{m1} , T_c , T_{m2}) των δειγμάτων μεταπολυμερισμού σε απευθείας σύγκριση μεταξύ τους και με το δείγμα του προπολυμερούς παρουσιάζεται στα Σχήματα 50, 51 και 52. Στις κορυφές της δεύτερης τήξης παρατηρείται η εμφάνιση μιας μικρής εξώθερμης κορυφής που προηγείται της ενδόθερμης (Σχήμα 52). Πρόκειται για το φαινόμενο της ανακρυστάλλωσης κατά τη θέρμανση (recrystallization melting), όπου ένα μέρος του δείγματος κρυσταλλώνεται κατά τη θέρμανσή του και εμφανίζεται συχνά κατά την ανάλυση πολυμερών.

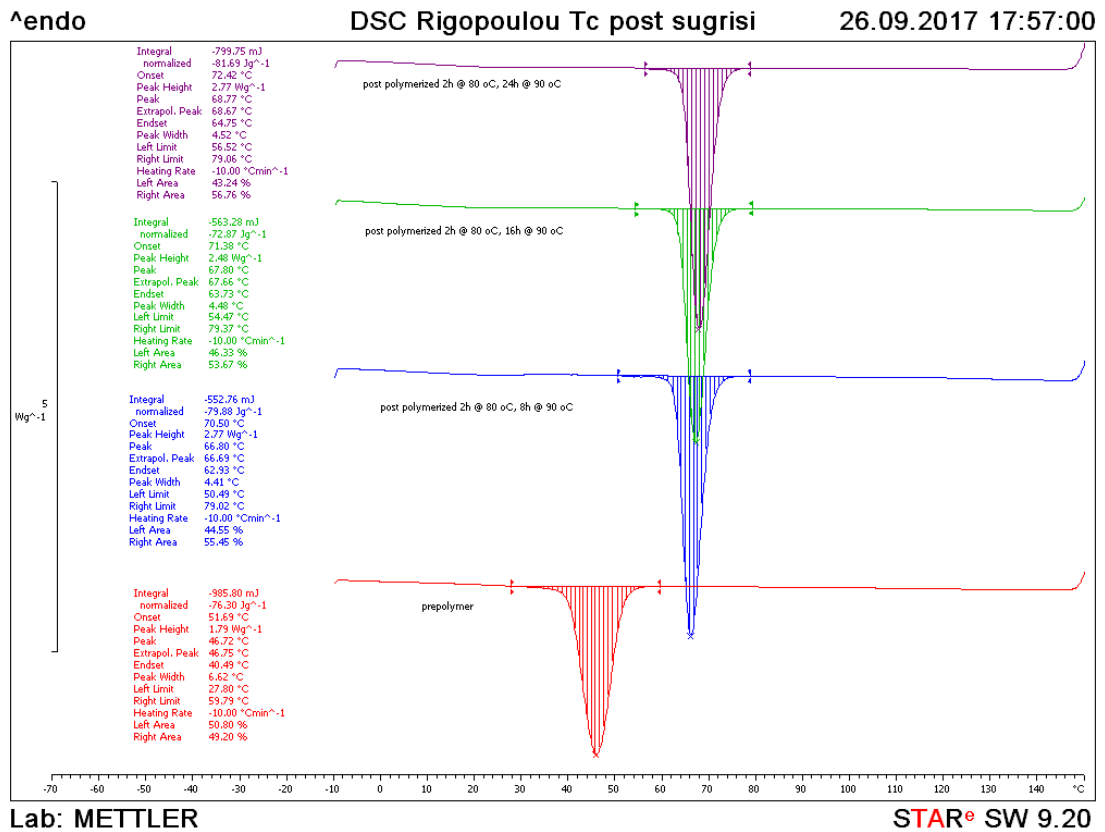
Πίνακας 50. Θερμικές ιδιότητες προϊόντων μεταπολυμερισμού και προϊόντος ενζυμικού προπολυμερισμού

	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)	x_c (%)	T_d (°C)	% Υπόλειμμα
Προϊόν ενζυμικού προπολυμερισμού	72	112	47	79	78	65	59	441	5,8
PP0	88	90	52	72	90	64	58	.*	-
PP8	106	103	67	80	104	74	67	-	-
PP16	107	96	68	74	104	68	62	407	11,4
PP24	108	114	69	83	106	76	69	-	-

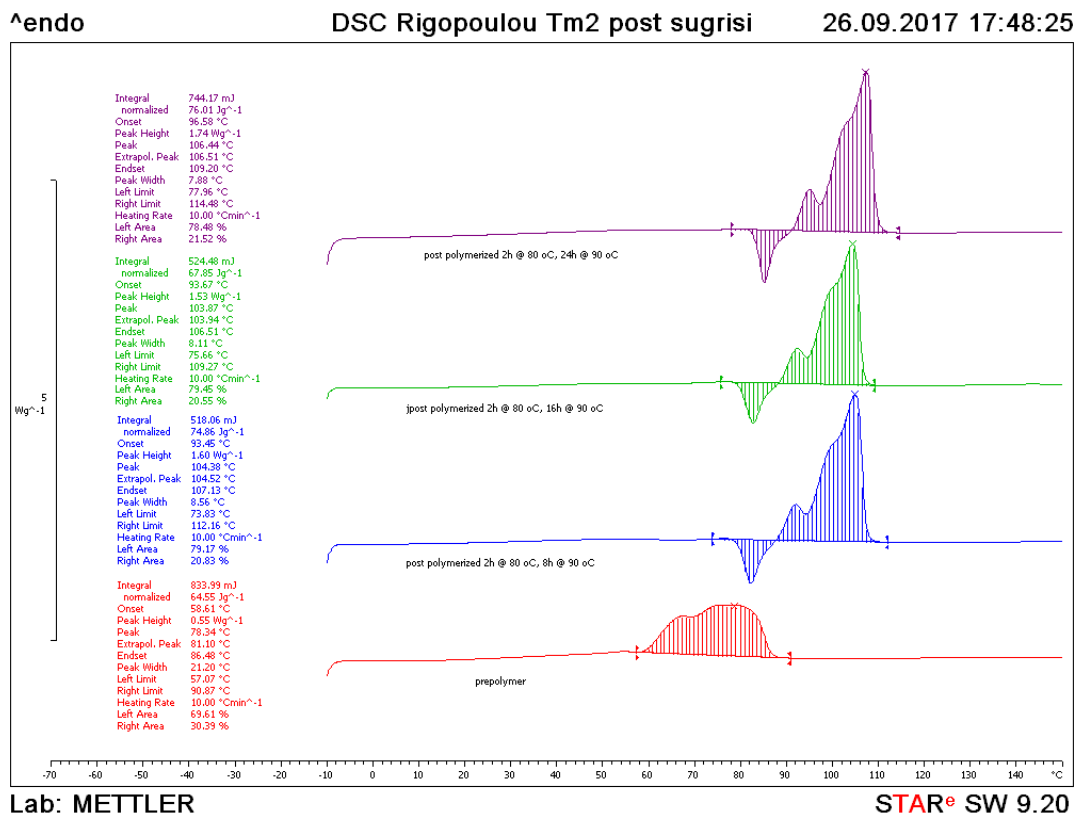
* αυτές οι μετρήσεις δεν πραγματοποιήθηκαν



Σχήμα 50. Συγκριτικό γράφημα της πρώτης τήξης για τα δείγματα μεταπολυμερισμού δύο σταδίων και το προπολυμερές



Σχήμα 51. Συγκριτικό γράφημα της κρυστάλλωσης για τα δείγματα μεταπολυμερισμού δύο σταδίων και το προπολυμερές



Σχήμα 52. Συγκριτικό γράφημα της δεύτερης τήξης για τα δείγματα μεταπολυμερισμού δύο σταδίων και το προ-πολυμερές

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα – Προτάσεις

6.1 Συμπεράσματα που προκύπτουν από την εργασία

6.1.1 Προϊόντα αντιδράσεων με χρήση N435

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με χρήση της εμπορικής ακινητοποιημένης λιπάσης Β του μύκητα *Candida antarctica* (N435), απέδωσαν στερεά προϊόντα λευκού χρώματος και με τη μορφή νιφάδων. Κάποια προϊόντα ήταν πιο ξηρά, ενώ άλλα πιο υδαρά, ανάλογα με τις συνθήκες της εκάστοτε αντίδρασης. Αρχικά, μιλώντας για τη μελέτη του ενζυμικού προπολυμερισμού, πρέπει να αποσαφηνιστεί ο ρόλος του διαλύτη και της θερμοκρασίας στη διεξαγωγή των αντιδράσεων. Όσον αφορά τις αποδόσεις, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις διάφορες επαναλήψεις των πειραμάτων παρουσίασαν μεγάλες τιμές σφαλμάτων (6 – 20 %). Αυτό σημαίνει ότι ο ρόλος του διαλύτη και της θερμοκρασίας δεν είναι ιδιαίτερα σημαντικός. Ωστόσο, οι παρατηρήσεις που προέκυψαν από τη χρήση μέσων τιμών αναδεικνύουν την υπεροχή του τολουολίου ως διαλύτη για την αύξηση της απόδοσης (53 – 58 %) με μικρή σημασία στην επιλογή θερμοκρασίας. Η όψη των προϊόντων των πειραμάτων δεν είναι κοινή για όλα τα πειράματα αλλά εμφανίζει χαρακτηριστικές ομοιότητες σε όλες τις θερμοκρασίες. Το προϊόν που προέκυψε με χρήση τολουολίου είναι το πιο υδαρό. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον εγκλωβισμό διαλύτη ή μονομερών. Αντίθετα, το προϊόν του ισοοκτανίου είναι πιο στέρεο και συμπαγές. Την καλύτερη εικόνα διαθέτει το προϊόν της τεχνικής μάζας (χωρίς διαλύτη), το οποίο κατά την ξήρασή του σχηματίζει φιλμ. Η αύξηση της εργαστηριακής κλίμακας ευνόησε τις αποδόσεις (70 – 80 %).

Σχετικά με την αντίδραση στη μεγάλη εργαστηριακή κλίμακα, απέδωσε κατά 75 %, αρκετά μεγάλο ποσοστό σε σχέση με τις αποδόσεις των πειραμάτων της μικρής εργαστηριακής κλίμακας. Το ξηραμένο προϊόν είχε πολύ καλή όψη λευκών στερεών νιφάδων.

Οι θερμοκρασίες τήξης και κρυστάλλωσης των προϊόντων των πειραμάτων με N435 είναι χαμηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες ενός εμπορικού δείγματος PBS [5][58]. Οι θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων της πειραματικής διαδικασίας κυμαίνονται στο εύρος 57 – 72 °C, ενώ του εμπορικού PBS είναι περίπου 114 °C. Αντίστοιχα, οι θερμοκρασίες τήξης των προϊόντων της πειραματικής διαδικασίας κυμαίνονται στο εύρος 27 – 41 °C, ενώ του εμπορικού PBS είναι περίπου 75 °C. Ωστόσο, οι ενθαλπίες τήξης, το σημείο μέγιστης αποδόμησης και ο βαθμός κρυσταλλικότητας προσεγγίζουν τις τιμές εμπορικών δειγμάτων.

Από τα φάσματα NMR των προϊόντων των αντιδράσεων με χρήση του ενζύμου N435, γίνεται ταυτοποίηση της δομικής μονάδας του PBS. Η χρήση της μεθόδου για τον υπολογισμό των μέσου-αριθμού μοριακών βαρών των προϊόντων έδειξε μοριακά βάρη που κυμαίνονταν από 820 έως 3940 g/mol, επίσης χωρίς σαφή τάση ως προς κάποιο διαλύτη ή θερμοκρασία. Το υψηλότερο μοριακό βάρος ανήκει σε κάποιο προπολυμερές που παράχθηκε χωρίς διαλύτη στους 40 °C (3940 g/mol). Το δείγμα που

αύξησε περισσότερο από όλα το μοριακό του βάρος κατά τη διεργασία του μεταπολυμερισμού προεπιλεγμένων συνθηκών ήταν προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 50 °C, που ξεκίνησε με $\overline{M}_n = 1370$ g/mol πριν τον μεταπολυμερισμό και απέκτησε $\overline{M}_n = 3740$ g/mol.

Κατά τη αναζήτηση κατάλληλων χρόνων για τα δύο στάδια του μεταπολυμερισμού, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η ενδεδειγμένη μέθοδος περιλαμβάνει πρώτο στάδιο για 2 h στους 80 °C και δεύτερο στάδιο για 8 h στους 90 °C. Ο χρόνος του πρώτου σταδίου είναι ικανός να αυξήσει τη θερμοκρασία τήξης του δείγματος (N435 – ισοοκτανίο – 50 °C) από τους 71 °C στους 88 °C και ο χρόνος του δεύτερου σταδίου να επιτύχει ικανοποιητική αύξηση του μέσου-βάρους μοριακού βάρους από $\overline{M}_w = 1967$ g/mol σε $\overline{M}_w = 4530$ g/mol. Η εφαρμογή του δεύτερου σταδίου της αντίδρασης για 24 h αυξάνει ακόμη περισσότερο το μέσου-βάρους μοριακό βάρος του προπολυμερούς στα $\overline{M}_w = 5595$ g/mol.

6.1.2 Προϊόντα αντιδράσεων με χρήση *FoCut5a*

Τα προϊόντα των πειραμάτων κουτινάσης είναι υγρά υλικά και εμφανίζουν ελαφρώς μικρότερη ρευστότητα (μεγαλύτερο ιξώδες) από τα μονομερή, ενώ δε σχηματίζουν διαφορετικές φάσεις. Κάτι τέτοιο παραπέμπει στην εικασία για σχηματισμό ολιγομερών, τα οποία λόγω πολύ χαμηλού βαθμού πολυμερισμού είναι υγρά. Αυτό επιβεβαιώθηκε αργότερα από την ανάλυση NMR.

Σχετικά με την εικόνα των προϊόντων, δεν γίνεται κάποια σαφής παρατήρηση σε σχέση με τη θερμοκρασία ή το διαλύτη. Το στοιχείο που διέφερε στα προϊόντα διαφορετικών παρτίδων κουτινάσης ήταν κυρίως το χρώμα. Όσο πιο μεγάλη ήταν η ενεργότητα της κουτινάσης, τόσο πιο χρωματισμένο ήταν το τελικό προϊόν, στα πλαίσια πάντα ενός πολύ ελαφρύ πορτοκαλί χρωματισμού. Ο ελαφρύς χρωματισμός του προϊόντος μπορεί να σημαίνει μερική διάλυση/διασπορά του ενζύμου σε κάποιο από τα συστατικά του μίγματος.

Οι σταθμικές αποδόσεις των αντιδράσεων των πειραμάτων με χρήση *FoCut5a* κυμαίνονται στο εύρος 21 – 32 %. Δεν παρατηρείται κάποια συγκεκριμένη συμπεριφορά ανάλογα με το διαλύτη και τη θερμοκρασία, αφού η καλύτερη απόδοση διαφέρει από σειρά σε σειρά πειραμάτων. Ακόμη και στην περίπτωση πειραμάτων που διεξήχθησαν με την ίδια παρτίδα κουτινάσης, οι αποδόσεις δεν είναι ομοιόμορφες. Ωστόσο, σύμφωνα με τις παρατηρήσεις που προέκυψαν με τη χρήση μέσων τιμών, την καλύτερη απόδοση δίνει η χρήση ισοοκτανίου στους 40 °C, με σχετικά μικρή τυπική απόκλιση. Επίσης, παρατηρούνται, γενικά, καλύτερες αποδόσεις στους 40 °C. Οι μεγάλες τιμές τυπικών αποκλίσεων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μάλλον ούτε η θερμοκρασία ούτε ο διαλύτης είναι καθοριστικές παράμετροι αυτών των αντιδράσεων. Ο διπλασιασμός της κλίμακας ευνοεί και σε αυτήν την περίπτωση τις αποδόσεις.

Στα διαγράμματα DSC παρατηρήθηκαν φαινόμενα που μάλλον αντιστοιχούν σε βρασμό των δειγμάτων. Από τα φάσματα NMR των προϊόντων των αντιδράσεων με χρήση κουτινάσης, γίνεται ταυτοποίηση της δομικής μονάδας του PBS και προκύπτουν

μοριακά βάρη που αντιστοιχούν σε διμερή και τριμερή. Είναι αξιοσημείωτη η εξειδίκευση του ενζύμου στην παραγωγή διμερών και τριμερών ανεξάρτητα από την ενεργότητα του χρησιμοποιούμενου του ενζύμου.

Ο μεταπολυμερισμός των δειγμάτων που παράχθηκαν με κουτινάση είναι αμφίβολης ορθότητας, αφού τα πρόκειται για δείγματα που είναι και παραμένουν υγρά. Ωστόσο, τα μοριακά βάρη, όπως προσδιορίστηκαν και για αυτά τα δείγματα μέσω NMR, αποκάλυπτουν μια πολύ μικρή αύξηση μετά την προσπάθεια μεταπολυμερισμού, η οποία μπορεί να αποτελεί και μέρος του σφάλματος των μετρήσεων. Πάντως, σίγουρα στην περίπτωση των δειγμάτων που παράχθηκαν με χρήση του *FoCut5a* δεν υπάρχει λόγος να τίθενται σε διεργασία μεταπολυμερισμού.

6.2 Προτάσεις για τροποποιήσεις επί της πειραματικής διαδικασίας

- Ένας σημαντικός παράγοντας που δεν ευνόησε τις μετατροπές των πειραμάτων είναι η διεξαγωγή των αντιδράσεων χωρίς εφαρμογή κενού που θα μπορούσε να απομακρύνει τη σχηματιζόμενη αιθανόλη και να οδηγεί την ισορροπία της αμφίδρομης αντίδρασης προς την κατεύθυνση σχηματισμού προϊόντος PBS. Επίσης, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί παγίδα υγρού αζώτου, για να δεσμεύει την αιθανόλη πριν φτάσει στην αντλία. Πρόκειται για συνηθισμένη τεχνική αλλά θα μπορούσε να συνδυαστεί με τις συνθήκες των δεδομένων πειραμάτων (θερμοκρασία και διαλύτες).
- Στα πειράματα δεν πραγματοποιήθηκε ανακύκλωση των ενζύμων. Τα ένζυμα, όμως, που χρησιμοποιήθηκαν είναι ακινητοποιημένα και συγκρατούνται από το υλικό πάνω στο οποίο έχουν προσδεθεί. Ειδικά, ο τρόπος με τον οποίο είναι ακινητοποιημένο το N435 το καθιστά αδιάλυτο στα περισσότερα υλικά. Έτσι, τα ένζυμα είναι αρκετά εύκολο να ανακυκλωθούν.

6.3 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Στον ενζυμικό προπολυμερισμό θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ένα σύστημα δύο διαλυτών, σε κάθε έναν από τους οποίους θα είναι διαλυτό ένα μονομερές. Ίσως σε διαλυμένη μορφή τα δύο μονομερή να δρουν καλύτερα μεταξύ τους.
- Η συγκεκριμένη τεχνική θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε μια σειρά πολυεστέρων βάσεως ηλεκτρικού οξέος. Ο ηλεκτρικός μεθυλεστέρας έχει ήδη δοκιμαστεί [67], οπότε θα μπορούσε να ερευνηθεί η χρήση εστέρων του ηλεκτρικού οξέος με μεγαλύτερες αλκυλομάδες.
- Θα μπορούσε να δοθεί έμφαση σε περαιτέρω μελέτη του σταδίου του μεταπολυμερισμού. Αρχικά, μπορεί να ερευνηθεί η αύξηση του χρόνου του δεύτερου σταδίου, ώστε να εντοπιστεί ο χρόνος στον οποίο σταθεροποιείται το μοριακό βάρος του υλικού. Επίσης, ενδιαφέρουσα δοκιμή είναι η αύξηση των σταδίων αυξανόμενης θερμοκρασίας.
- Έντονο ενδιαφέρον παρουσιάζει η δυνατότητα εφαρμογής του χαμηλού βάρους PBS που παράγεται από αυτή τη μέθοδο. Άλλα πολυμερή χαμηλού μορι-

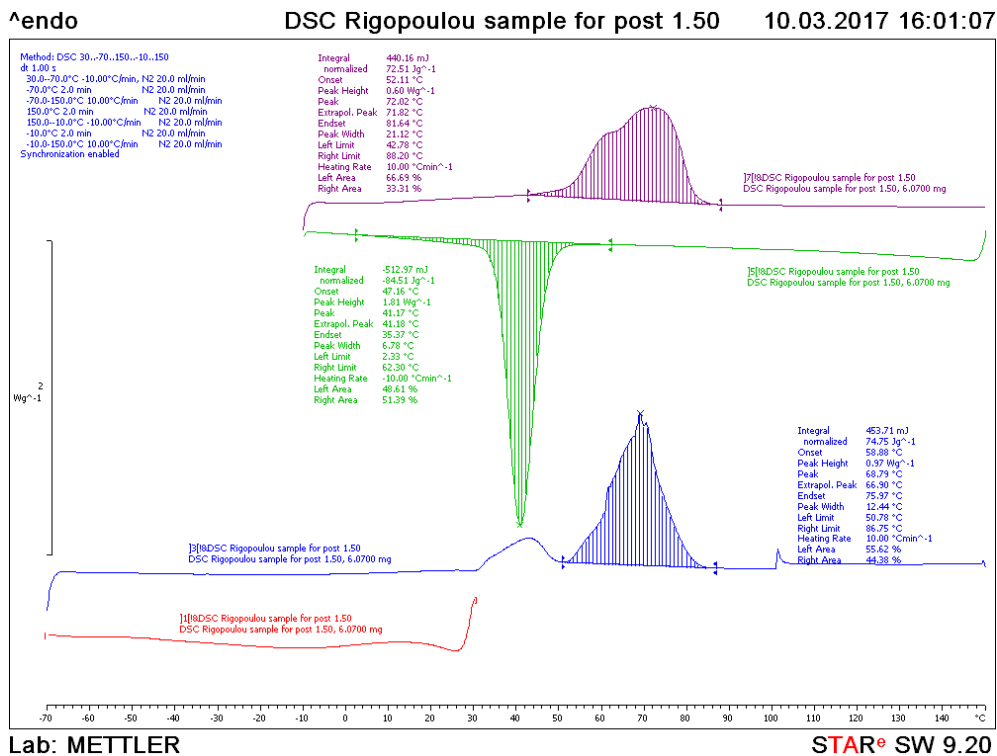
ακού βάρους, όπως το PLA, έχουν χρησιμοποιηθεί σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Αξίζει, λοιπόν, να ερευνηθεί η εφαρμογή ενός χαμηλού βάρους PBS που παράγεται με «καθαρή» μέθοδο, δηλαδή χωρίς τη χρήση τοξικού διαλύτη.

- Η κουτινάση παρουσιάζει μια εξαιρετικού ενδιαφέροντος εξειδίκευση στην παραγωγή διμερών και τριμερών PBS. Τέτοιου είδους εξειδίκευση δεν έχει παρατηρηθεί σε κάποια λιπάση στο παρελθόν. Αντικείμενο έρευνας θα μπορούσε να αποτελέσει η χρησιμότητα μιας τέτοιας εξειδίκευσης και η πιθανότητα της διάθεσης ενός τέτοιου προϊόντος ως ενδιάμεσο προϊόν.

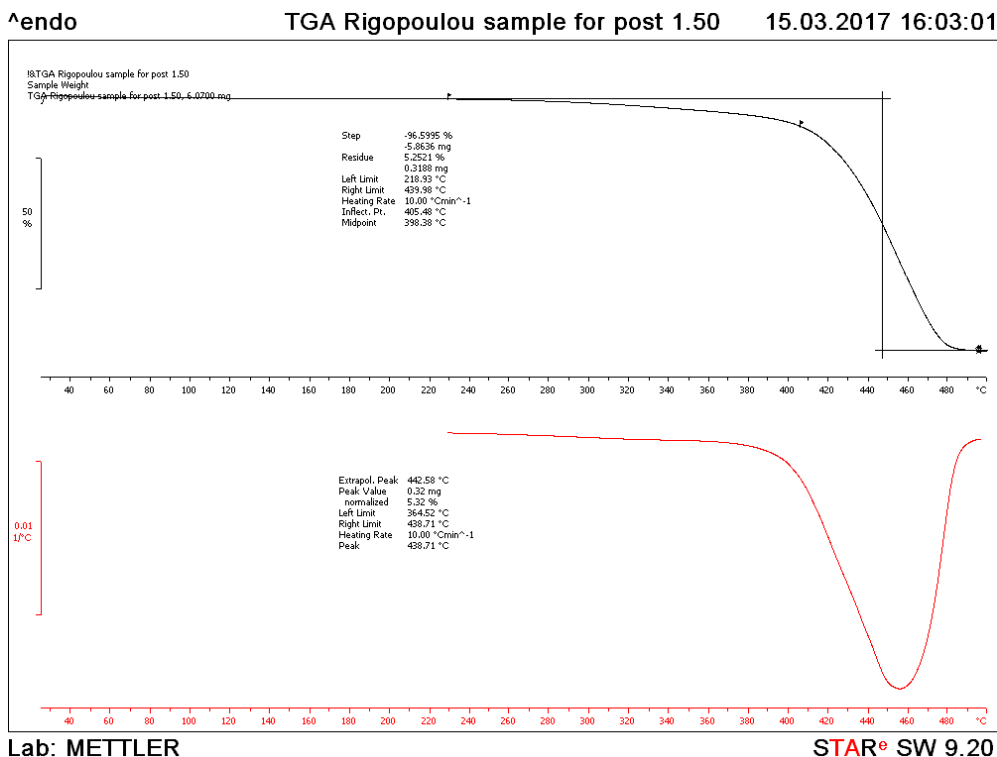
Παράρτημα

I. Γραφήματα προϊόντων που προήλθαν από χρήση του N435

i. Τολουόλιο – 50 °C

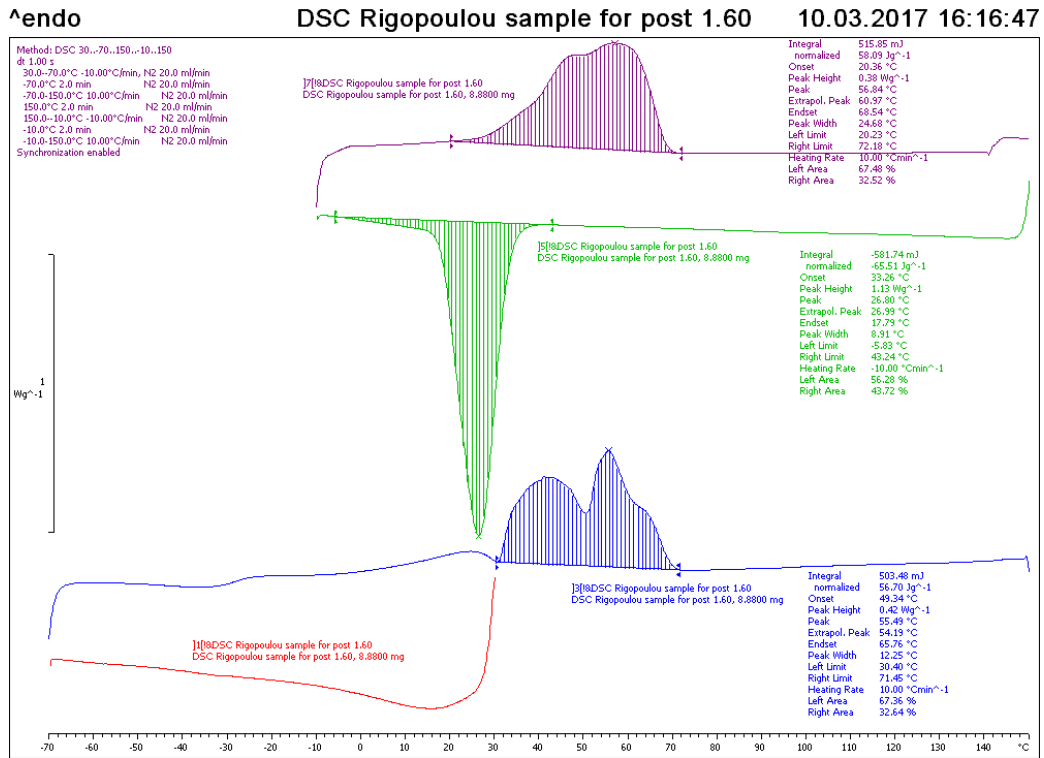


Σχήμα 53. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουολίου στους 50 °C

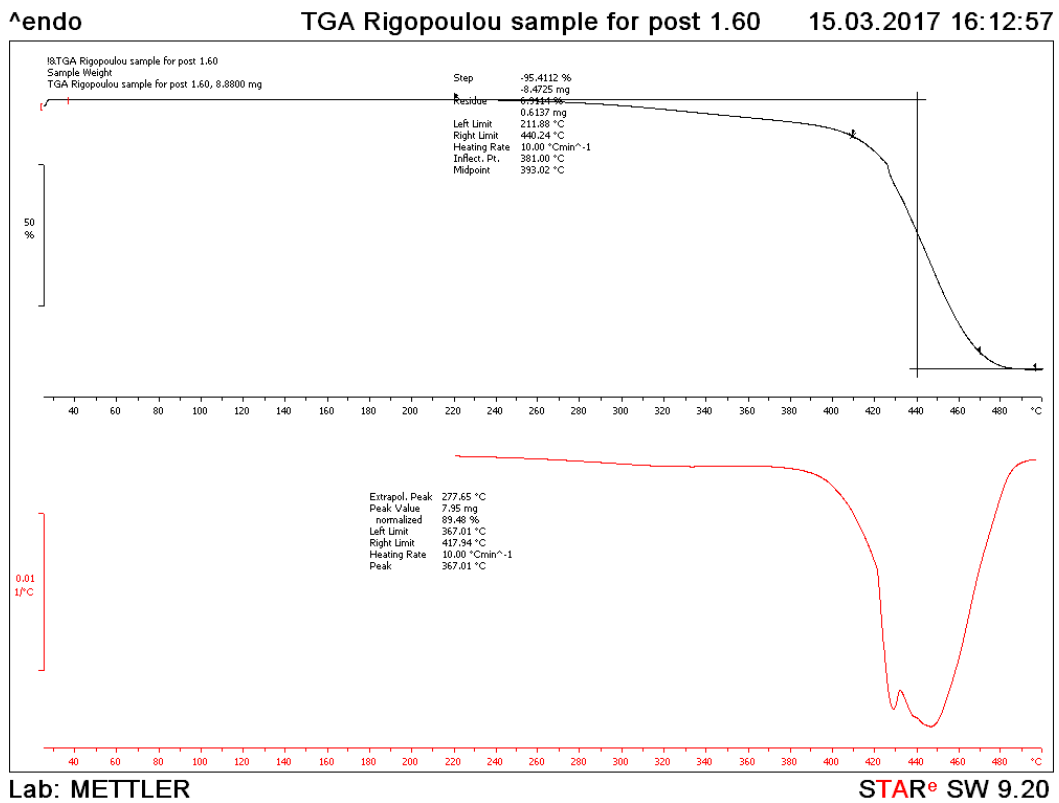


Σχήμα 54. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουολίου στους 50 °C

ii. Τολουόλιο – 60 °C



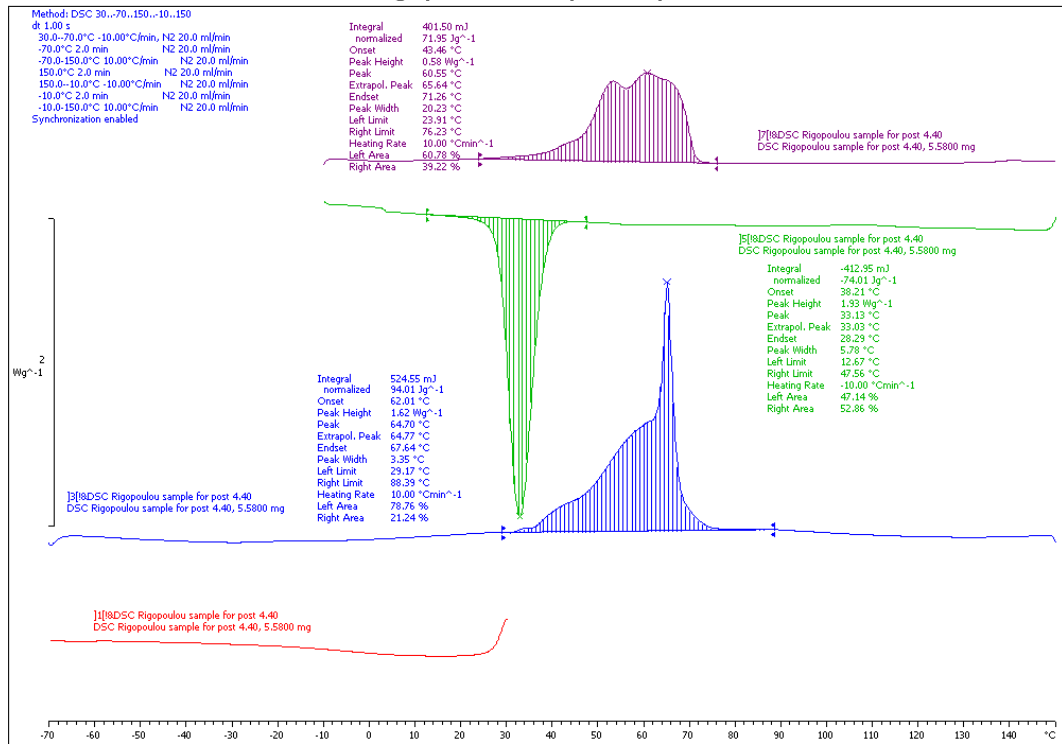
Σχήμα 55. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουόλιου στους 60 °C



Σχήμα 56. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και τολουόλιου στους 60 °C

iii. Ισοοκτανίου – 40 °C

^endo DSC Rigopoulou sample for post 4.40 09.11.2016 16:09:22

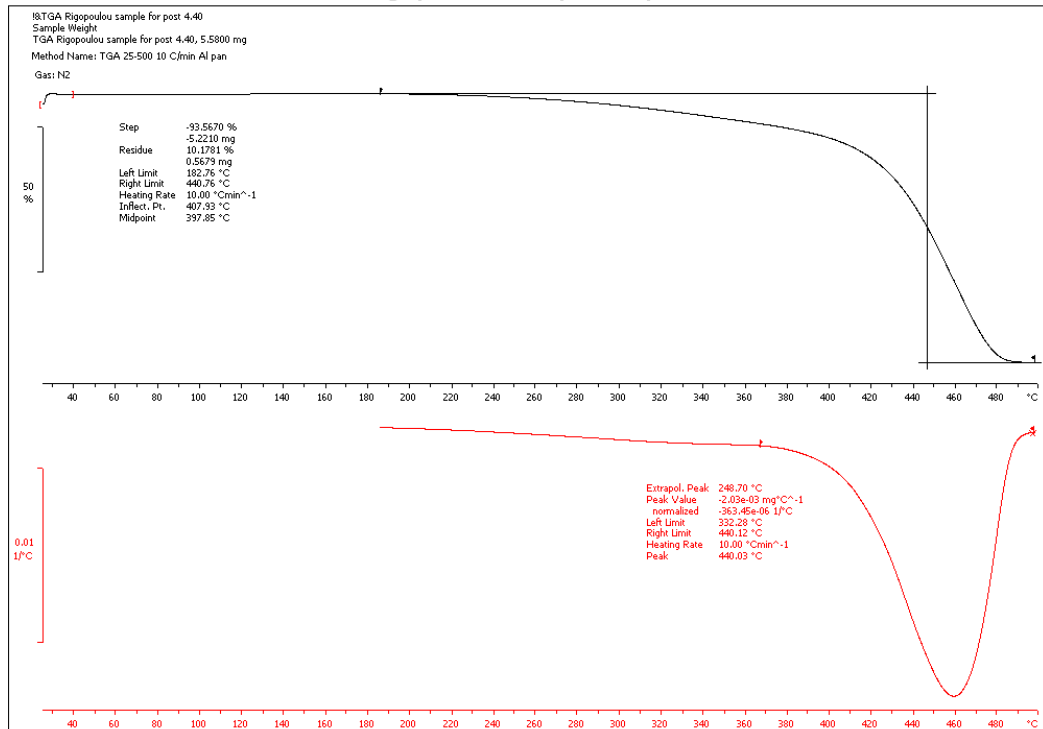


Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 57. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 40 °C

^endo TGA Rigopoulou sample for post 4.40 09.11.2016 16:16:04



Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

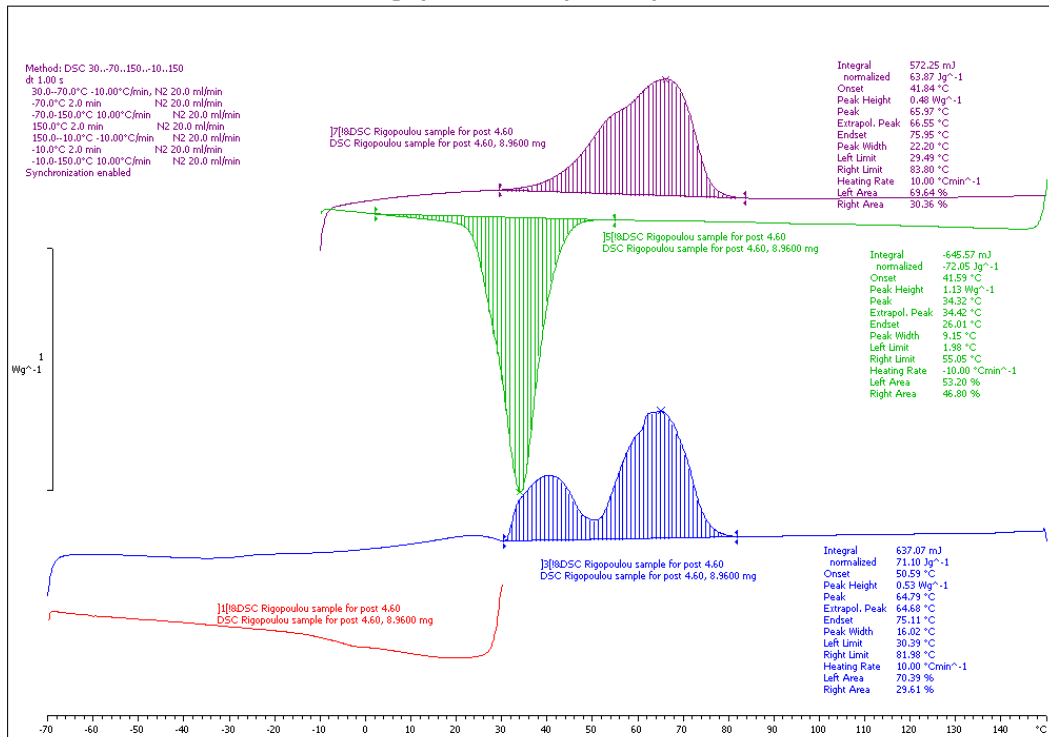
Σχήμα 58. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 40 °C

iv. Ισοοκτανίου – 60 °C

Λendo

DSC Rigopoulou sample for post 4.60

10.03.2017 16:22:12



Lab: METTLER

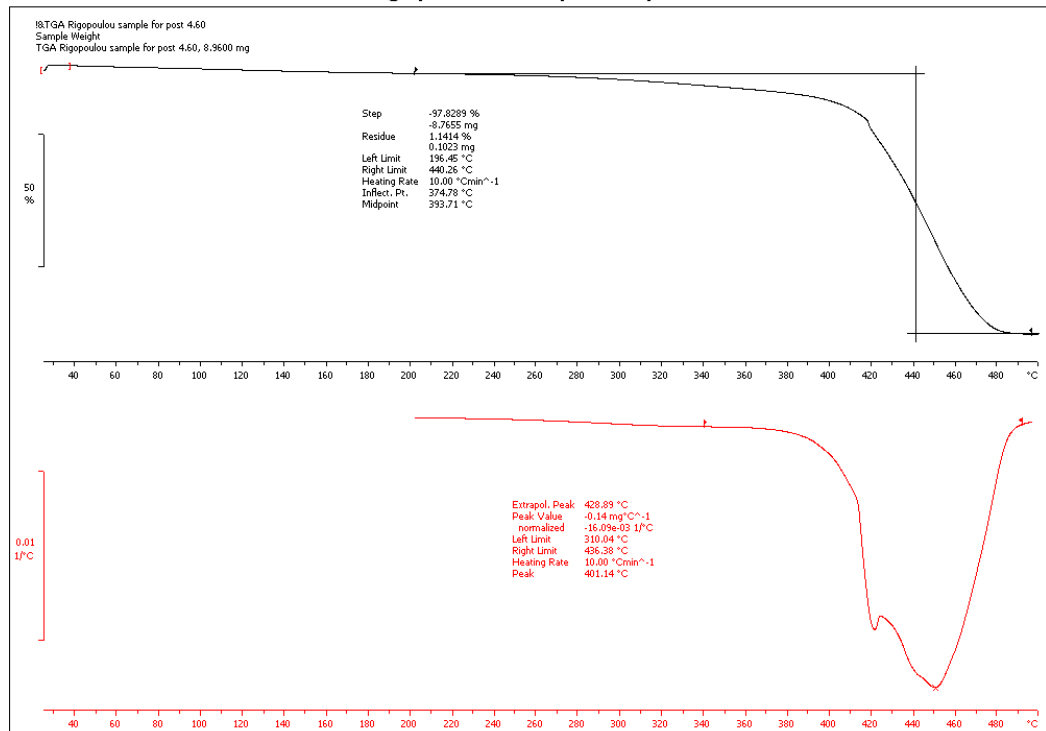
STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 59. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 60 °C

Λendo

TGA Rigopoulou sample for post 4.60

15.03.2017 16:18:50



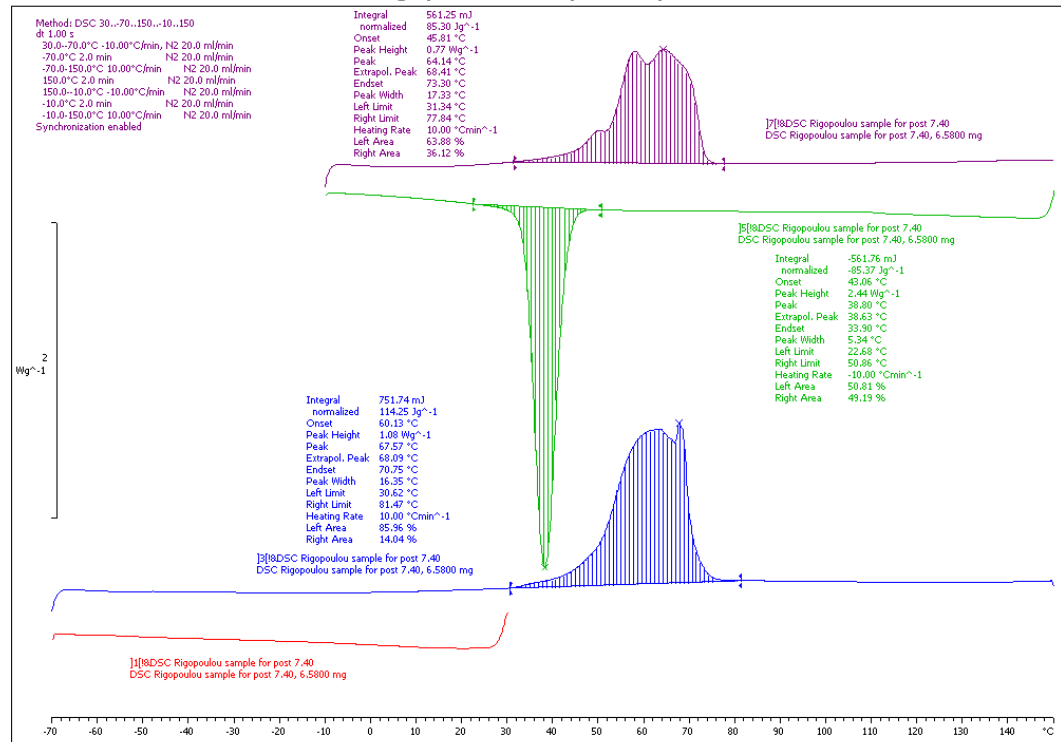
Lab: METTLER

STAR[®] SW 9.20

Σχήμα 60. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435 και ισοοκτανίου στους 60 °C

v. Χωρίς διαλύτη - 40 °C

Λendo DSC Rigopoulou sample for post 7.40 09.11.2016 16:29:28

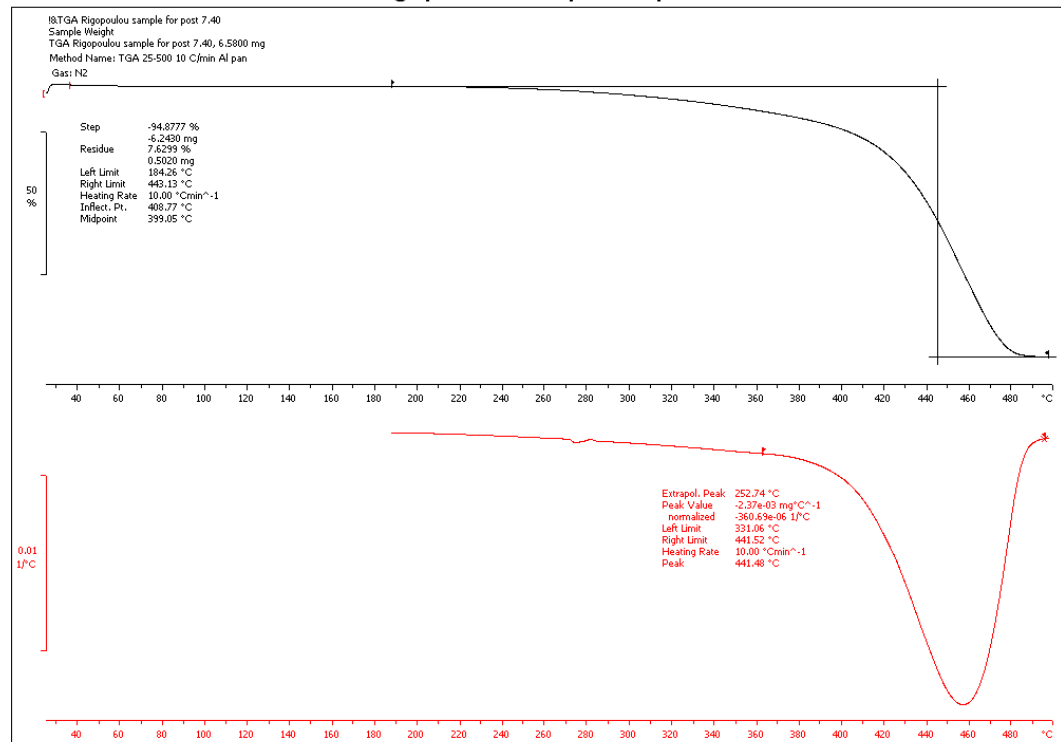


Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 61. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 40 °C

Λendo TGA Rigopoulou sample for post 7.40 09.11.2016 16:33:53



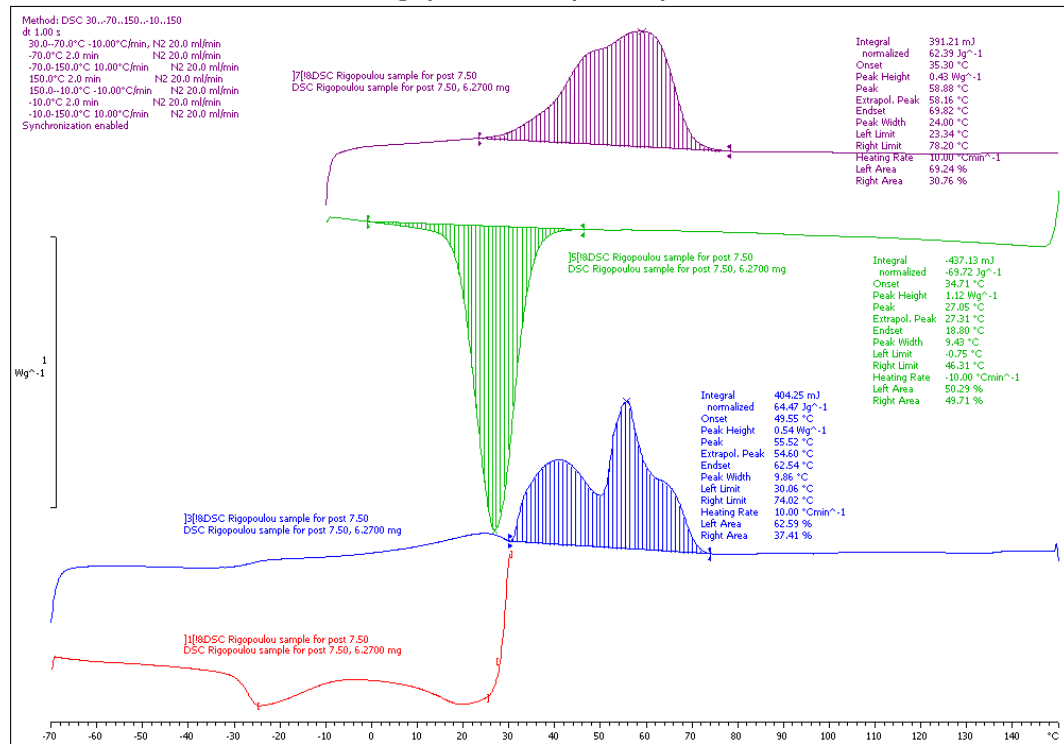
Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 62. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 40 °C

vi. Χωρίς διαλύτη - 50 °C

^endo DSC Rigopoulou sample for post 7.50 10.03.2017 16:12:46

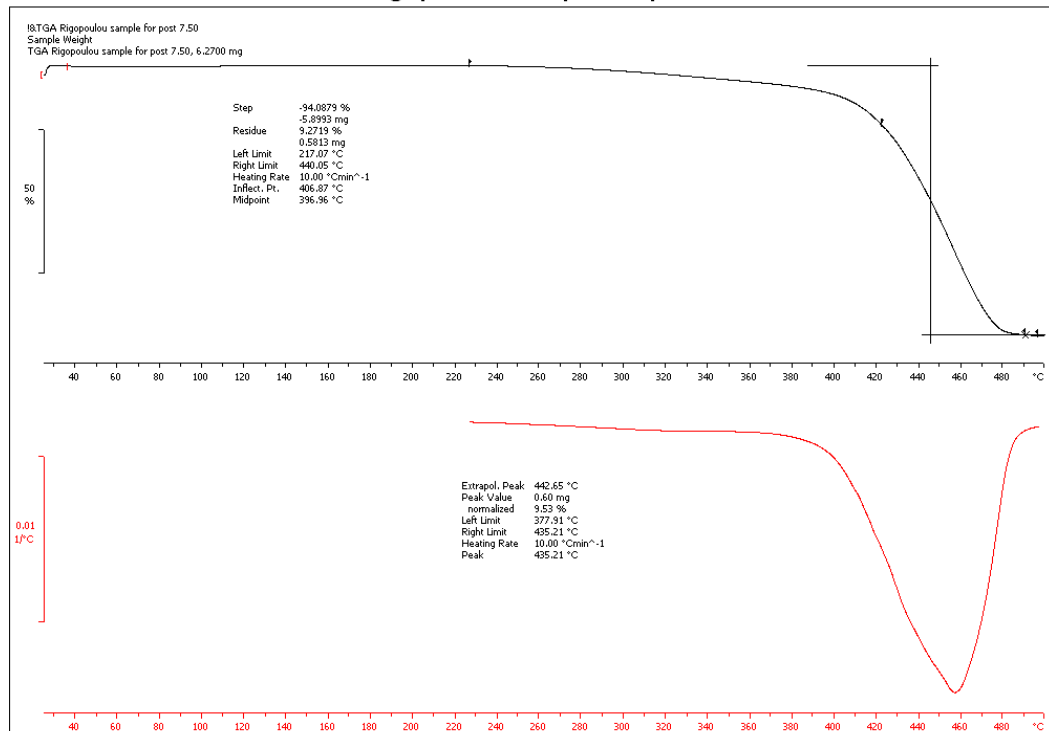


Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

Σχήμα 63. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 50 °C

^endo TGA Rigopoulou sample for post 7.50 15.03.2017 16:09:59



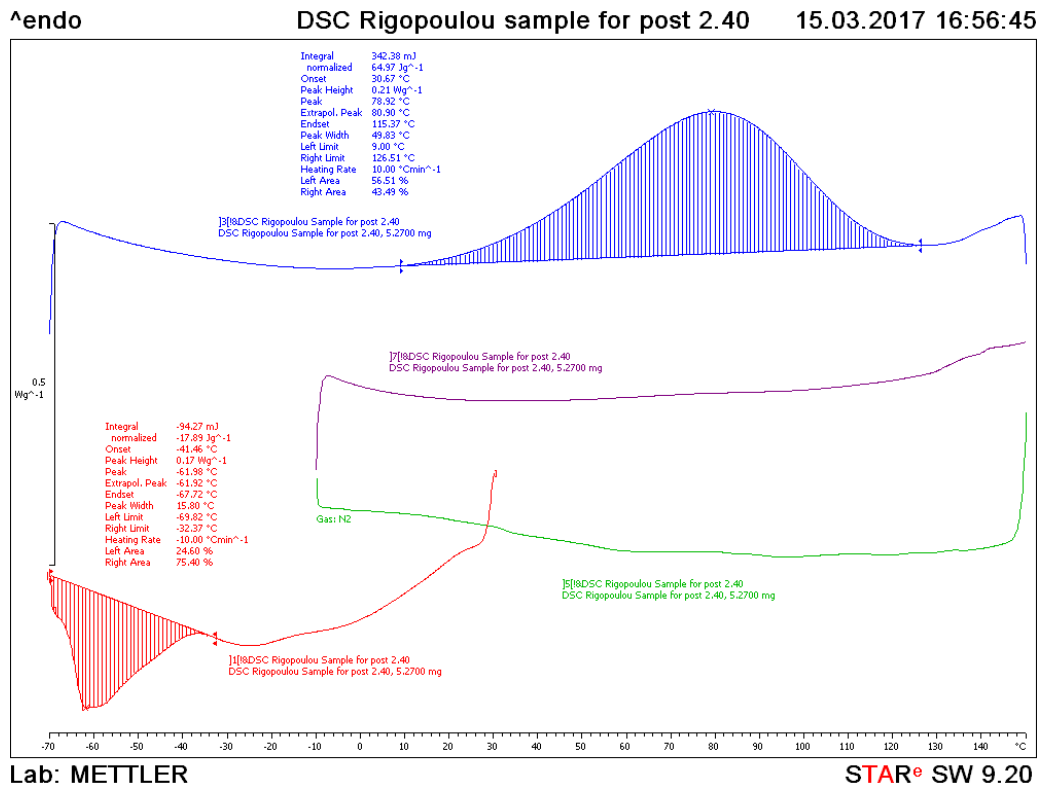
Lab: METTLER

STAR^e SW 9.20

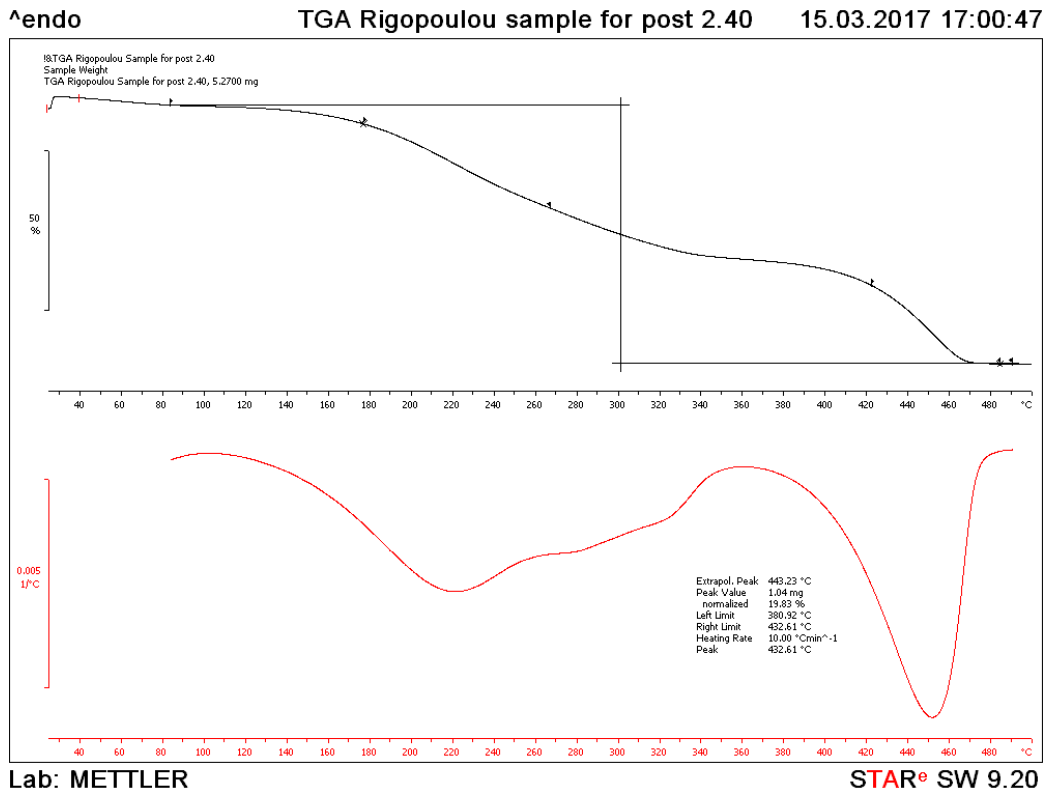
Σχήμα 64. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση N435, χωρίς διαλύτη στους 50 °C

II. Γραφήματα προϊόντων που προήλθαν από χρήση του *FoCut5a*

i. Τολουόλιο - 40 °C

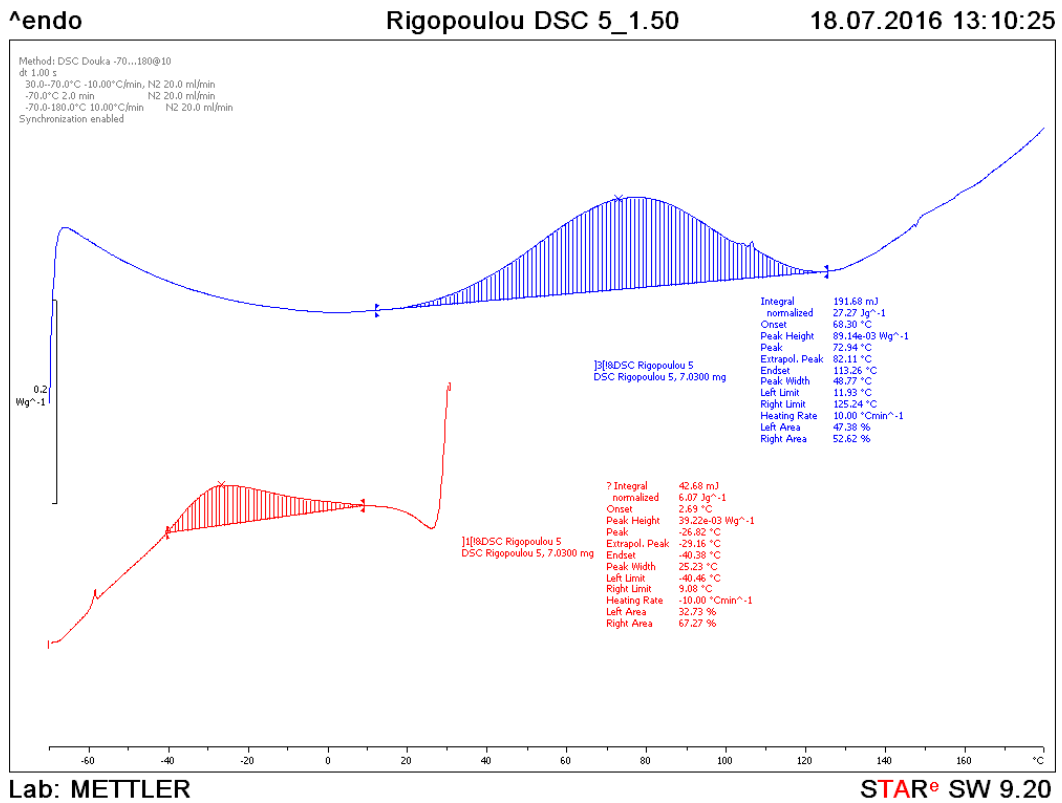


Σχήμα 65. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση *FoCut5a* και τολουόλιου στους 40 °C



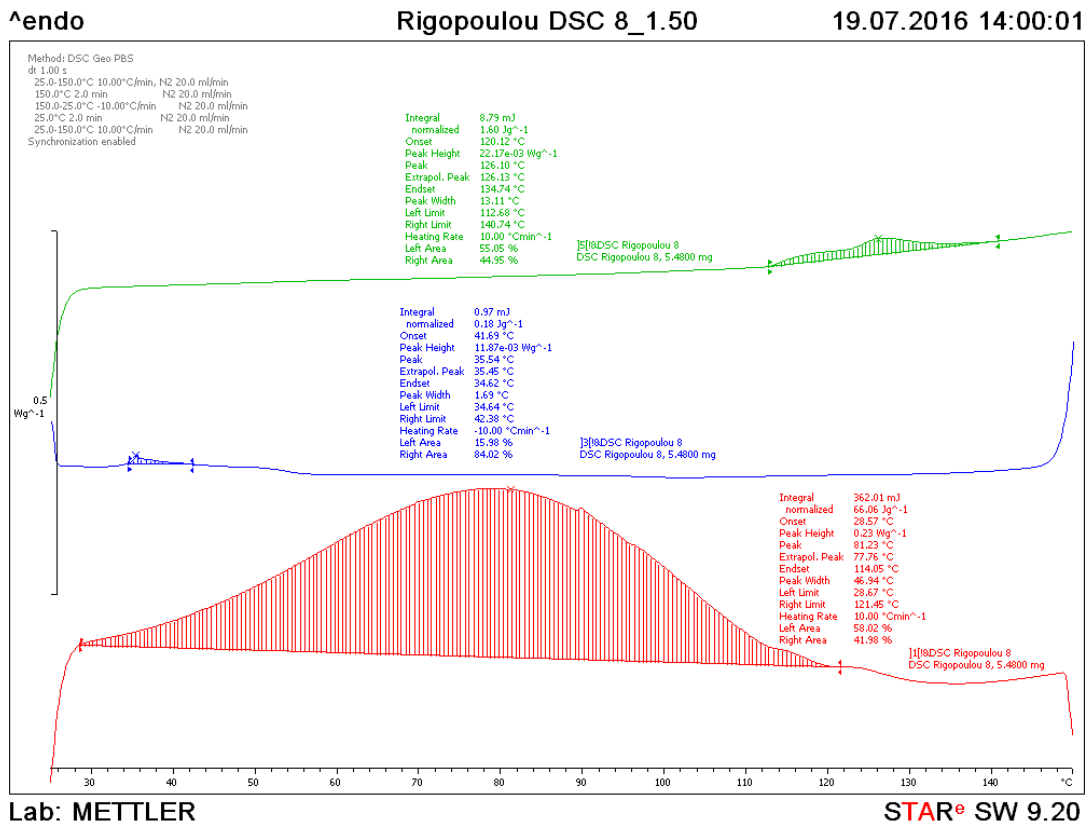
Σχήμα 66. Γράφημα TGA για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση *FoCut5a* και τολουόλιου στους 40 °C

ii. Ισοοκτάνιο - 50 °C



Σχήμα 67. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση FoCut5a και ισοοκτανίου στους 50 °C

iii. Χωρίς διαλύτη - 50 °C



Σχήμα 68. Γράφημα DSC για το προϊόν της αντίδρασης με χρήση FoCut5a, χωρίς διαλύτη στους 50 °C

Βιβλιογραφία

- [1] A. Pellis, E. Herrero Acero, V. Ferrario, D. Ribitsch, G. M. Guebitz, and L. Gardossi, “The Closure of the Cycle: Enzymatic Synthesis and Functionalization of Bio-Based Polyesters,” *Trends Biotechnol.*, vol. 34, no. 4, pp. 316–328, 2016.
- [2] S. N. Vouyiouka, E. Topakas, A. Katsini, C. D. Papaspyrides, and P. Christakopoulos, “A green route for the preparation of aliphatic polyesters via lipase-catalyzed prepolymerization and low-temperature postpolymerization,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 298, no. 6, pp. 679–689, 2013.
- [3] D. N. Bikiaris and D. S. Achilias, “Synthesis of poly(alkylene succinate) biodegradable polyesters, Part II: Mathematical modelling of the polycondensation reaction,” *Polymer (Guildf.)*, vol. 49, no. 17, pp. 3677–3685, 2008.
- [4] I. Manavitehrani, A. Fathi, H. Badr, S. Daly, A. N. Shirazi, and F. Dehghani, “Biomedical applications of biodegradable polyesters,” *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 1, 2016.
- [5] J. Xu and B. H. Guo, “Poly(butylene succinate) and its copolymers: Research, development and industrialization,” *Biotechnol. J.*, vol. 5, no. 11, pp. 1149–1163, 2010.
- [6] M. Kanelli *et al.*, “Production of biodegradable polyesters via enzymatic polymerization and solid state finishing,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 131, no. 19, pp. 2–9, 2014.
- [7] Y. Yang, Y. Yu, D. Wu, C. Liu, Z. Zhao, and Q. Li, “Lipase/esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters via polycondensation: A review,” *Process Biochem.*, vol. 47, no. 7, pp. 1027–1036, 2012.
- [8] V. Ferrario, A. Pellis, M. Cespugli, G. Guebitz, and L. Gardossi, “Nature Inspired Solutions for Polymers: Will Cutinase Enzymes Make Polyesters and Polyamides Greener?,” *Catalysts*, vol. 6, no. 12, p. 205, 2016.
- [9] W. Graessley, *Advances in polymer science*. 1974.
- [10] U. Edlund and A. C. Albertsson, “Polyesters based on diacid monomers,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 4, pp. 585–609, 2003.
- [11] S. J. Cooper and B. Vigon, “Life cycle engineering,” *Innov. der Produktentwicklung*, no. November, pp. 205–216, 2007.
- [12] J. Xu, “Microbial Succinic Acid, Its Polymer Poly(butylene succinate), and Applications,” in *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, vol. 14, China: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, pp. 121–132.
- [13] J. Li *et al.*, “A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 10, pp. 6147–6152, 2011.

- [14] M. S. Nikolic and J. Djonlagic, "Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene adipate)s," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 74, no. 2, pp. 263–270, 2001.
- [15] L. Tan, Y. Chen, W. Zhou, H. Nie, F. Li, and X. He, "Novel poly(butylene succinate-co-lactic acid) copolyesters: Synthesis, crystallization, and enzymatic degradation," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 9, pp. 1920–1927, 2010.
- [16] G. Z. Papageorgiou and D. N. Bikiaris, "Crystallization and melting behavior of three biodegradable poly(alkylene succinates). A comparative study," *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 26, pp. 12081–12092, 2005.
- [17] Z. Qiu, M. Komura, T. Ikehara, and T. Nishi, "DSC and TMDSC study of melting behaviour of poly(butylene succinate) and poly(ethylene succinate)," *Polymer (Guildf.)*, vol. 44, no. 26, pp. 7781–7785, 2003.
- [18] Y. Wang, M. Bhattacharya, and J. F. Mano, "Thermal analysis of the multiple melting behavior of poly(butylene succinate-co-adipate)," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 43, no. 21, pp. 3077–3082, 2005.
- [19] H. S. Kim, H. S. Yang, and H. J. Kim, "Biodegradability and mechanical properties of agro-flour-filled polybutylene succinate biocomposites," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 97, no. 4, pp. 1513–1521, 2005.
- [20] "Myriant," 2017. [Online]. Available: <http://www.myriant.com/applications/pbs.cfm>.
- [21] S. Zhou, X. Deng, X. Li, W. Jia, and L. Liu, "Synthesis and characterization of biodegradable low molecular weight aliphatic polyesters and their use in protein-delivery systems," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 91, no. 3, pp. 1848–1856, 2004.
- [22] E. Watson, A. M. Tatara, D. P. Kontoyiannis, and A. G. Mikos, "Inherently Antimicrobial Biodegradable Polymers in Tissue Engineering," *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 3, no. 7, pp. 1207–1220, 2017.
- [23] N. Jacquél *et al.*, "Synthesis and properties of poly(butylene succinate): Efficiency of different transesterification catalysts," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 49, no. 24, pp. 5301–5312, 2011.
- [24] S. Velmathi, R. Nagahata, J. I. Sugiyama, and K. Takeuchi, "A rapid eco-friendly synthesis of poly(butylene succinate) by a direct polyesterification under microwave irradiation," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 26, no. 14, pp. 1163–1167, 2005.
- [25] C. D. Papaspyrides and S. N. Vouyiouka, *Solid State Polymerization*. Wiley, 2009.
- [26] C. D. Papaspyrides, A. D. Porfyrus, S. Vouyiouka, R. Rulkens, E. Grolman, and G. Vanden Poel, "Solid state polymerization in a micro-reactor: The case of poly(tetramethylene terephthalamide)," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 133, no. 14, pp. 1–14, 2016.
- [27] S. Kobayashi, "Enzymatic Polymerization," *Polym. Sci. A Compr. Ref. 10 Vol.*

- Set*, vol. 5, pp. 217–237, 2012.
- [28] Y. Yang, Y. Yu, Y. Zhang, C. Liu, W. Shi, and Q. Li, “Lipase/esterase-catalyzed ring-opening polymerization: A green polyester synthesis technique,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 10, pp. 1900–1908, 2011.
- [29] R. A. Gross, M. Ganesh, and W. Lu, “Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations,” *Trends Biotechnol.*, vol. 28, no. 8, pp. 435–443, 2010.
- [30] S. Kobayashi, “Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polyesters,” *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 30, no. 4–5, pp. 237–266, 2009.
- [31] W. Liu, B. Chen, F. Wang, T. Tan, and L. Deng, “Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters and properties characterization,” *Process Biochem.*, vol. 46, no. 10, pp. 1993–2000, 2011.
- [32] G. Li, D. Yao, and M. Zong, “Lipase-catalyzed synthesis of biodegradable copolymer containing malic acid units in solvent-free system,” *Eur. Polym. J.*, vol. 44, no. 4, pp. 1123–1129, 2008.
- [33] A. Mahapatro, B. Kalra, A. Kumar, and R. A. Gross, “Lipase-catalyzed polycondensations: Effect of substrates and solvent on chain formation, dispersity, and end-group structure,” *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 3, pp. 544–551, 2003.
- [34] Y. Yang, W. Lu, X. Zhang, W. Xie, M. Cai, and R. A. Gross, “Two-step biocatalytic route to biobased functional polyesters from ω -carboxy fatty acids and diols,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 1, pp. 259–268, 2010.
- [35] A. K. Chaudhary, J. Lopez, E. J. Beckman, and A. J. Russell, “Biocatalytic solvent-free polymerization to produce high molecular weight polyesters,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 13, no. 3, pp. 318–325, 1997.
- [36] A. Mahapatro, A. Kumar, B. Kalra, and R. Gross, “Solvent-Free Adipic Acid/1, 8-Octanediol Condensation Polymerizations Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B,” *Macromolecules*, vol. 37, pp. 35–40, 2004.
- [37] D. Juais, A. F. Naves, C. Li, R. A. Gross, and L. H. Catalani, “Isosorbide polyesters from enzymatic catalysis,” *Macromolecules*, vol. 43, no. 24, pp. 10315–10319, 2010.
- [38] M. Sureshkumar and C. K. Lee, “Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 60, no. 1–2, pp. 1–12, 2009.
- [39] D. Yao, G. Li, and T. Kuila, “Lipase-Catalyzed Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyester Containing L-Malic Acid Unit in Solvent System,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 120, no. 7, pp. 1114–1120, 2011.
- [40] Y. Y. Linko, Z. L. Wang, and J. Seppälä, “Lipase-catalyzed linear aliphatic polyester synthesis in organic solvent,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 17, no. 6, pp. 506–511, 1995.
- [41] Y. Y. Linko, M. Lämsä, X. Wu, E. Uosukainen, J. Seppälä, and P. Linko,

- “Biodegradable products by lipase biocatalysis,” *J. Biotechnol.*, vol. 66, no. 1, pp. 41–50, 1998.
- [42] H. Uyama, K. Inada, and S. Kabayashi, “Lipase-Catalyzed Synthesis of Aliphatic Polyesters by Polycondensation of Dicarboxylic Acids and Glycols in Solvent-Free System,” *Polym. J.*, vol. 32, no. 5, pp. 440–443, 2000.
- [43] “Sigma-Aldrich,” 2017. [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/537322?lang=en®ion=GR>.
- [44] E. Nikolaivits, G. Makris, and E. Topakas, “Immobilization of a Cutinase from *Fusarium oxysporum* and Application in Pineapple Flavor Synthesis,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 65, no. 17, pp. 3505–3511, 2017.
- [45] Y. Jiang and K. Loos, “Enzymatic synthesis of biobased polyesters and polyamides,” *Polymers (Basel)*, vol. 8, no. 7, 2016.
- [46] M. Dimarogona, E. Nikolaivits, M. Kanelli, P. Christakopoulos, M. Sandgren, and E. Topakas, “Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 11, pp. 2308–2317, 2015.
- [47] N. A. D. L, “Novozymes Lipase Products,” no. 3, pp. 3–10.
- [48] E. Stavila, R. Z. Arsyi, D. M. Petrovic, and K. Loos, “*Fusarium solani* pisi cutinase-catalyzed synthesis of polyamides,” *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 4, pp. 834–842, 2013.
- [49] Π. Α. Ταραντίλη, *Σημειώσεις του μαθήματος “ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ.”* Εσωτερικές εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2011.
- [50] “PubChem.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#>.
- [51] D. A. Skoog, S. Universi, and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. .
- [52] Α. Παππά, *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: χρωματογραφικές, θερμικές, ηλεκτρομετρικές, φασματομετρία μάζας.* Εσωτερικές εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2004.
- [53] B. Wunderlich, *Thermal analysis of polymers*, vol. 5, no. 1. 1973.
- [54] Α. Μοροπούλου, *Χαρακτηρισμός, Έλεγχος ποιότητας, Διάγνωση φθοράς και συντήρηση δομικών υλικών, Μεθοδολογία ενόργανων και μη καταστρεπτικών τεχνικών.* Αθήνα: Εκδόσεις Ε.Μ.Π., 2010.
- [55] M. Murry, *Οργανική Χημεία, Τόμος Ι.* Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005.
- [56] Μ. Όξεκιουν-Πετροπούλου, *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης-Οπτικές Μέθοδοι.* Εκδόσεις Ε.Μ.Π., 1987.
- [57] C. D. Papaspyrides *et al.*, “Feasibility of Solid-State Postpolymerization on Fossil- and Bio-Based Poly(butylene succinate) Including Polymer Upcycling

- Routes,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 55, no. 20, pp. 5832–5842, 2016.
- [58] I. N. Georgousopoulou, S. Vouyiouka, P. Dole, and C. D. Papaspyrides, “Thermo-mechanical degradation and stabilization of poly(butylene succinate),” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 128, pp. 182–192, 2016.
- [59] J. U. Izunobi and C. L. Higginbotham, “Polymer molecular weight analysis by ¹H NMR spectroscopy,” *J. Chem. Educ.*, vol. 88, no. 8, pp. 1098–1104, 2011.
- [60] L. Ragupathy, U. Ziener, R. Dyllick-Brenzinger, B. Von Vacano, and K. Landfester, “Enzyme-catalyzed polymerizations at higher temperatures: Synthetic methods to produce polyamides and new poly(amide-co-ester)s,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, vol. 76, pp. 94–105, 2012.
- [61] Ε. Τ. Πολυμερών, *Επιλογή εργαστηριακών ασκήσεων κατεύθυνσης πολυμερών (Θεωρία - Πείραμα - Κατ’ οίκον Εργασία)*. Αθήνα: Εσωτερικές εκδόσεις Ε.Μ.Π, 2014.
- [62] R. J. Young and P. A. Lovell, “Introduction to polymers.” 1991.
- [63] T. H. E. United and S. Of, “By Authority Of,” vol. 552, no. 3, 2001.
- [64] F. W. Billmeyer, “Methods for estimating intrinsic viscosity,” *J. Polym. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 83–86, 1949.
- [65] F. Solomon, O. and Z. Ciuta, I., “Détermination de la viscosité intrinsèque de solutions de polymères par une simple détermination de la viscosité.” *J. Appl. Polym. Sci.*, pp. 683–686, 1962.
- [66] G. Bogdanic, “Group contribution methods for estimating the properties of polymer systems,” *Hem. Ind.*, vol. 3, pp. 287–305, 2006.
- [67] Χ. Παπουτσάνη, “Αξιολόγηση ενζυμικού πολυμερισμού για σύνθεση πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) σε σύστημα θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (TGA),” 2015.