



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, Αθήνα 157 80

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ενζυμικός πολυμερισμός για την παραγωγή πολυεστέρων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με τη χρήση καινοτόμων ενζύμων

Ιωάννης Γ. Σπανός



ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ

Σταματίνα Ν. Βουγιούκα

Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ

ΑΘΗΝΑ 2024

Στα πλαίσια του προπτυχιακού προγράμματος σπουδών μου, κλήθηκα να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία πάνω σε ένα πολύ καινοτόμο ερευνητικό πεδίο, το οποίο έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον τόσο της ακαδημαϊκής κοινότητας όσο και της βιομηχανίας. Η μελέτη αυτή, που ξεκίνησε τον Νοέμβριο του 2022 με θέμα «Ενζυμικός πολυμερισμός για την παραγωγή πολυεστέρων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με τη χρήση καινοτόμων ενζύμων», πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών και στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Επιβλέπουσα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η Αναπλ. Καθηγήτρια ΕΜΠ, κα Σταματίνα Ν. Βουγιούκα, την οποία ευχαριστώ θερμά, αφενός για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, κι αφετέρου για όλη την καθοδήγηση και τις συμβουλές που μου παρείχε αλλά και για το αίσθημα συμπερίληψης που δημιουργούσε, κάνοντάς με να νιώθω πραγματικό μέλος της ερευνητικής της ομάδας από την πρώτη στιγμή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπλ. Καθηγητή ΕΜΠ, κ. Ευάγγελο Τόπακα, Διευθυντή του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας και συνεπιβλέποντα της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αλλά και τον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Μακρυνιώτη για όλη τη συνεργασία και την καθοδήγηση κατά την εκπόνηση της πειραματικής διαδικασίας που χρειάστηκε να πραγματοποιηθεί όσον αφορά την προετοιμασία των βιοκαταλυτών.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ όμως το οφείλω στη Δρ. Χριστίνα Γκουντέλα που από την πρώτη στιγμή υπήρξε μέντοράς μου σε αυτό το επιστημονικό ταξίδι, καθώς με την υπομονή και την καθοδήγησή της, κατάφερα να φέρω εις πέρας όλο αυτό το έργο το οποίο θα ήταν σίγουρα πολύ διαφορετικό δίχως τη δική της συμβολή.

Επίσης, ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών για το άψογο κλίμα που φρόντιζαν να επικρατεί καθημερινά καθώς και για τις συμβουλές που παρείχαν στις κατ' ιδίαν συναντήσεις της ομάδας.

Κλείνοντας, δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου, την οικογένεια και τους φίλους μου, οι οποίοι ήταν και είναι πάντα δίπλα μου, στηρίζοντάς με σε όλο αυτό το ταξίδι των σπουδών μου.

Ιωάννης Σπανός

Αθήνα, Φεβρουάριος 2024

Περιεχόμενα

Πρόλογος / Ευχαριστίες.....	i
Περιεχόμενα.....	iii
Κατάλογος Πινάκων	vii
Κατάλογος Διαγραμμάτων	x
Κατάλογος Εικόνων	xii
Συνομογραφίες.....	xvi
Περίληψη	xxi
Abstract	xxiii
Κεφάλαιο 1: «Πράσινα» πολυμερή: Προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες & βιοαποικοδομήσιμα	1
1.1. Εισαγωγικά στοιχεία	1
1.2. Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) - PBS	7
1.2.1. Θερμικές ιδιότητες	9
1.2.2. Μηχανικές ιδιότητες και ιδιότητες φράγματος	10
1.2.3. Εφαρμογές του PBS.....	11
1.2.4. Εμπορικά διαθέσιμα PBS.....	13
1.2.5. Χημική σύνθεση PBS	14
1.3. Βιβλιογραφία.....	16
Κεφάλαιο 2: Ενζυμικός πολυμερισμός	20
2.1. Εισαγωγικά στοιχεία	20
2.2. Κατηγορίες ενζύμων (βιοκαταλυτών) που χρησιμοποιούνται στον ενζυμικό πολυμερισμό.....	21
2.2.1. Λιπάσες.....	22
2.2.2. Κουτινάσες.....	23
2.3. Ακίνητοποίηση ενζύμων	30

2.4. Βιβλιογραφία.....	34
Κεφάλαιο 3: Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	39
3.1. Ενζυμικός πολυμερισμός για τη σύνθεση του PBS.....	39
3.2. Σκοπός της εργασίας.....	41
3.3. Βιβλιογραφία.....	42
Κεφάλαιο 4: Πειραματικό μέρος	45
4.1. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια.....	45
4.1.1. Ξενιστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης των κουτινασών.....	46
4.1.2. Υλικά.....	47
4.1.3. Όργανα και συσκευές	51
4.1.4. Πειραματική διαδικασία	52
4.2. Χαρακτηρισμός βιοκαταλύτη	75
4.2.1. Υλικά.....	75
4.2.2. Μέτρηση ενεργότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου.....	76
4.2.3. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης	79
4.2.4. Μελέτη της θερμοσταθερότητας του βιοκαταλύτη	81
4.3. Ενζυμικός προπολυμερισμός	83
4.3.1. Υλικά.....	84
4.3.2. Όργανα και συσκευές	84
4.3.3. Πειραματική διαδικασία	85
4.4. Μεταπολυμερισμός μάζας.....	88
4.4.1. Υλικά.....	88
4.4.2. Όργανα και συσκευές	89
4.4.3. Πειραματική διαδικασία	89
4.5. Χαρακτηρισμός πρώτων υλών και προϊόντων	89
4.5.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR).....	89
4.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR).....	92

4.5.3.	Χρωματογραφία Διαπέρασης μέσω Πηκτής (GPC).....	96
4.5.4.	Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)	101
4.5.5.	Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)	105
4.6.	Βιβλιογραφία.....	107
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα ετερόλογης έκφρασης HiC & LCC ^{ICCG} – χαρακτηρισμός βιοκαταλύτη LCC ^{ICCG}		
5.1.	Αποτελέσματα ετερόλογης έκφρασης των πρωτεϊνών	111
5.1.1.	Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων κυττάρων στις υγρές καλλιέργειες	111
5.1.2.	Καθαρισμός και απομόνωση των ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας (IMAC)	112
5.1.3.	Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες	114
5.1.4.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενζύμων	115
5.1.5.	Ακίνητοποίηση ενζύμων	116
5.2.	Ενεργότητα ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου.	118
5.2.1.	Ενεργότητα ελεύθερου ενζύμου	118
5.2.2.	Ενεργότητα ακινητοποιημένου ενζύμου	119
5.3.	Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου – T _{opt}	121
5.4.	Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου	123
5.5.	Βιβλιογραφία.....	125
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC ^{ICCG} & HiC		
6.1.	Εισαγωγικά στοιχεία	127
6.2.	Χαρακτηρισμός προϊόντων μέσω κατάλυσης με LCC ^{ICCG}	128
6.2.1.	Μορφολογία προϊόντων και αποδόσεις διεργασίας	128
6.2.2.	Ταυτοποίηση της δομής μέσω φασματοσκοπίας	130
6.2.3.	Σύγκριση αποτελεσμάτων FT-IR και ¹ H-NMR	135

6.2.4.	Προσδιορισμός του μοριακού βάρους των προϊόντων.....	138
6.2.5.	Σύγκριση αποτελεσμάτων GPC και ¹ H-NMR	143
6.2.6.	Θερμικές ιδιότητες των προϊόντων	145
6.2.7.	Επανάληψη πειράματος ενζυμικού προπολυμερισμού	153
6.3.	Χαρακτηρισμός προϊόντων μέσω κατάλυσης με HiC	156
6.4.	Βιβλιογραφία.....	161
Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα πειραμάτων μεταπολυμερισμού μάζας: Διερεύνηση της θερμοκρασίας.....		
7.1.	Εισαγωγικά στοιχεία	164
7.2.	Διερεύνηση της θερμοκρασίας μεταπολυμερισμού	164
7.2.1.	Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC	165
7.2.2.	Υπολογισμός ακραίων ομάδων OH μέσω FT-IR.....	167
7.2.3.	Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων μέσω DSC.....	169
7.2.4.	Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων μέσω TGA.....	171
7.3.	Βιβλιογραφία.....	172
Κεφάλαιο 8: Συμπεράσματα – Μελλοντική έρευνα		
8.1.	Συμπεράσματα από την παρούσα διπλωματική εργασία.....	174
8.2.	Προτάσεις και ιδέες για μελλοντική έρευνα	176
Παράρτημα πινάκων		177

Πίνακας 1.1 Σύγκριση ιδιοτήτων εμπορικά διαθέσιμων PBS [27],[31],[32].	14
Πίνακας 3.1 Βιβλιογραφικά δεδομένα ενζυμικού πολυμερισμού του PBS.	40
Πίνακας 4.1 Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.	47
Πίνακας 4.2 Σύσταση και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.	48
Πίνακας 4.3 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης των ενζύμων σε στήλες βαρύτητας TALON® με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου.	48
Πίνακας 4.4 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου αλλά και στον αποχρωματισμό της πηκτής.	49
Πίνακας 4.5 Συστάσεις των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου.	50
Πίνακας 4.6 Χαρακτηριστικά φορέων ακινητοποίησης.	50
Πίνακας 4.7 Συστατικά μέσου (Mastermix) με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις ενεργότητας καθώς και οι χαρακτηρισμοί των στερεών βιοκαταλυτών.	76
Πίνακας 4.8 Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού.	84
Πίνακας 4.9 Συνθήκες αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού για κάθε βιοκαταλύτη.	85
Πίνακας 4.10 Ποσότητες βιοκαταλυτών, πρωτεϊνών και τελικές συγκεντρώσεις ως προς τα μονομερή για κάθε πείραμα ενζυμικού προπολυμερισμού.	86
Πίνακας 4.11 Ποσότητες προπολυμερούς από το πείραμα LCC_70 που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα μεταπολυμερισμού μάζας.	89
Πίνακας 5.1 Τιμές απορρόφησης στα 600 nm δειγμάτων από τις υγρές καλλιέργειες ύστερα από επώαση 3 h στους 37°C των ανασυνδυασμένων κυττάρων με το πλασμίδιο για την LCC ^{ICCG} και την HiC αντίστοιχα.	111
Πίνακας 5.2 Τιμές απορρόφησης στα 280 nm δειγμάτων από τα κλάσματα που προέκυψαν προσθέτοντας ποσότητα από το διάλυμα ιμιδαζολίου σε Talon 1x συγκέντρωσης 100 mM κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου LCC ^{ICCG} .	113
Πίνακας 5.3 Τιμές απορρόφησης στα 280 nm δειγμάτων από τα κλάσματα που προέκυψαν προσθέτοντας ποσότητα από το διάλυμα ιμιδαζολίου σε Talon 1x	

συγκέντρωσης 100 mM κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου HiC.	113
Πίνακας 5.4 Ποσότητες των ενζύμων μέσα από τις ενζυμικές συγκεντρώσεις, όπως αυτές προέκυψαν από τη μετατροπή του A_{280} μέσω του νόμου Beer-Lambert..	116
Πίνακας 5.5 Αποδόσεις ακινητοποίησης για κάθε κλάσμα βιοκαταλύτη.....	116
Πίνακας 5.6 Loadings βιοκαταλυτών που προέκυψαν μετά την ακινητοποίησή τους σε φορείς.	117
Πίνακας 5.7 Απορροφήσεις στα 410 nm των αντιδράσεων του ελεύθερου ενζύμου με το υπόστρωμα $pNPL$ για τη μέτρηση της ενεργότητας.	118
Πίνακας 5.8 Απορροφήσεις στα 410 nm των αντιδράσεων του ακινητοποιημένου ενζύμου με το υπόστρωμα $pNPL$ για τη μέτρηση της ενεργότητας του στερεού βιοκαταλύτη.....	119
Πίνακας 6.1 Τιμές αποδόσεων διεργασίες για τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με το ένζυμο LCC^{ICCG}	129
Πίνακας 6.2 Βιβλιογραφικά δεδομένα για τις χαρακτηριστικές κορυφές του PBS σε ένα φάσμα FT-IR [7].	130
Πίνακας 6.3 Ολοκληρώσεις κορυφών στα φάσματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435.....	135
Πίνακας 6.4 Τιμές εντάσεων χαρακτηριστικών κορυφών του PBS στα 1720 cm^{-1} για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις και το rsd	138
Πίνακας 6.5 Μέσες τιμές MB για τα προϊόντα από την κατάλυση της LCC^{ICCG} για κάθε κορυφή με τυπικές αποκλίσεις και rsd	140
Πίνακας 6.6 Λόγοι εντάσεων της 1 ^{ης} και της 2 ^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3 ^{ης}	142
Πίνακας 6.7 Μέσου-αριθμού μοριακό βάρος \overline{M}_n για κάθε προϊόν από τα πειράματα της LCC^{ICCG} και του πειράματος N435_40.	143
Πίνακας 6.8 Βαθμός πολυμερισμού \overline{x}_n των πειραμάτων της LCC^{ICCG} καθώς και του πειράματος N435_40.....	144
Πίνακας 6.9 Τιμές T_d μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων των πειραμάτων της LCC^{ICCG} και του πειράματος N435_40.....	152
Πίνακας 6.10 Αποδόσεις διεργασίας πειραμάτων καταλυόμενων από HiC καθώς και των πειραμάτων LCC_{70} και N435_40 για σύγκριση.	157

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας Π1 Ποσοστά ακραίων ομάδων OH των προϊόντων του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} και N435.....	177
Πίνακας Π2 Τιμές εντάσεων χαρακτηριστικών κορυφών του PBS στα 3400 cm ⁻¹ για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} και N435, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις και το rsd.....	177
Πίνακας Π3 Θερμικές ιδιότητες προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} μέσω ανάλυσης DSC.....	178
Πίνακας Π4 Τιμές $T_{d,5\%}$ των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG}	178
Πίνακας Π5 Τιμές $T_{d,5\%}$ μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων μάζας των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με HiC.....	178
Πίνακας Π6 Μέσες τιμές MB για τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας για κάθε κορυφή με τυπικές αποκλίσεις και rsd.....	179
Πίνακας Π7 Λόγοι εντάσεων της 1 ^{ης} και της 2 ^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3 ^{ης} των πειραμάτων μεταπολυμερισμού όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας.....	180
Πίνακας Π8 Τιμές εντάσεων κορυφών στα 3400 cm ⁻¹ των μεταπολυμερισμένων προϊόντων ύστερα από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας.....	180
Πίνακας Π9 Θερμικές ιδιότητες μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μέσω ανάλυσης DSC.....	181
Πίνακας Π10 Τιμές T_d , $T_{d,5\%}$ μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων μάζας των μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μεταπολυμερισμού μαζί με του προϊόντος από το πείραμα αναφοράς LCC_70.	181

Διάγραμμα 4.1 Η εξάρτηση της ενεργότητας από τη θερμοκρασία και τον χρόνο όπως περιγράφεται α) μέσω του κλασικού μοντέλου και β) μέσω του μοντέλου ισορροπίας [9].	80
Διάγραμμα 5.1 Κινητική αντίδρασης του βιοκαταλύτη LCC ^{ICCG} με το υπόστρωμα pNPL στους 35°C.	120
Διάγραμμα 5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC ^{ICCG} .	121
Διάγραμμα 5.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου LCC ^{ICCG} [4].	122
Διάγραμμα 5.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC ^{ICCG} .	124
Διάγραμμα 5.5 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ελεύθερου ενζύμου LCC ^{ICCG} [4].	124
Διάγραμμα 6.1 Φάσματα FT-IR των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} .	131
Διάγραμμα 6.2 Φάσματα μονομερών, πειραμάτων αναφοράς (Blank_60 και N435_40) και πειράματος LCC_70.	131
Διάγραμμα 6.3 Φάσματα ¹ H-NMR των προϊόντων από τα πειράματα της LCC ^{ICCG} , των μονομερών και των πειραμάτων αναφοράς.	133
Διάγραμμα 6.4 Γραφική αναπαράσταση των υπολογισμών από το FT-IR και το ¹ H-NMR για τις ομάδες OH.	137
Διάγραμμα 6.5 α) Σύγκριση χρωματογραφημάτων των προϊόντων της LCC ^{ICCG} με τα φάσματα των μονομερών και του πειράματος Blank_60, β) Σύγκριση χρωματογραφήματος του πειράματος LCC_70 με το χρωματογράφημα του πειράματος N435_40.	139
Διάγραμμα 6.6 Μοριακά βάρη (\overline{M}_n και \overline{M}_w) και συντελεστές πολυδιασποράς (Đ) για την πρώτη κορυφή των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού.	141
Διάγραμμα 6.7 Καμπύλες DSC (1η θέρμανση, ψύξη και 2η θέρμανση) α) προϊόντων LCC ^{ICCG} , β) Blank_60, γ) N435_40, δ) μονομερών.	146
Διάγραμμα 6.8 α) Σύγκριση \overline{M}_n , T_c και x_c για τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} και N435 β) Σύγκριση λόγων των εντάσεων της 1 ^{ης} κορυφής προς την ένταση της 3 ^{ης} με T_c και x_c για τα προϊόντα της LCC ^{ICCG} .	147
Διάγραμμα 6.9 Σύγκριση \overline{M}_n και T_m για τα προϊόντα της LCC ^{ICCG} και N435.	148

Διάγραμμα 6.10 Καμπύλες TGA προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC ^{ICCG} , πειραμάτων αναφοράς και μονομερών.	150
Διάγραμμα 6.11 Σύγκριση χρωματογραφημάτων των προϊόντων LCC_70 και LCC_70_360.	151
Διάγραμμα 6.12 α) Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και \overline{M}_n των πειραμάτων της LCC ^{ICCG} και του N435 β) Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και λόγων εντάσεων της 1 ^{ης} κορυφής προς την 3 ^η	152
Διάγραμμα 6.13 Φάσματα FT-IR των πειραμάτων LCC_60 και LCC_60_επαναλ.	154
Διάγραμμα 6.14 Χρωματογραφήματα πειραμάτων LCC_60 και LCC_60_επαναλ.	154
Διάγραμμα 6.15 Καμπύλες TGA για το πείραμα LCC_60 και το πείραμα LCC_60_επαναλ.	155
Διάγραμμα 6.16 Σύγκριση φασμάτων των προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού με HiC με τα φάσματα των πειραμάτων αναφοράς και του πειράματος LCC_70.	157
Διάγραμμα 6.17 Σύγκριση α) χρωματογραφημάτων των προϊόντων της HiC, των μονομερών, του Blank_60 και του LCC_70, και β) των πειραμάτων HiC_40 και N435_40.	158
Διάγραμμα 6.18 Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και \overline{M}_n των πειραμάτων της HiC καθώς και των πειραμάτων LCC_70 και N435_40.	159
Διάγραμμα 6.19 Καμπύλες TGA προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με HiC συγκριτικά με τις καμπύλες του πειράματος LCC_70 καθώς και των πειραμάτων αναφοράς.	160
Διάγραμμα 7.1 α) Χρωματογραφήματα προϊόντων μεταπολυμερισμού από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας καθώς και του προϊόντος από το πείραμα LCC_70 β) Εστίαση στις πρώτες κορυφές των χρωματογραφημάτων.	166
Διάγραμμα 7.2 Λόγοι εντάσεων της 1 ^{ης} και της 2 ^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3 ^{ης} για τα πειράματα μεταπολυμερισμού όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας μαζί με το προϊόν αναφοράς LCC_70.	167
Διάγραμμα 7.3 Μεταβολή του \overline{M}_n καθώς και των εντάσεων των ακραίων ομάδων OH συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα πειράματα μεταπολυμερισμού μάζας όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας.	168
Διάγραμμα 7.4 Καμπύλες DSC των μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μαζί με του πειράματος LCC_70 (1 ^η θέρμανση, ψύξη, 2 ^η θέρμανση).	169
Διάγραμμα 7.5 Μεταβολή των T_m , T_c αλλά και του \overline{M}_n = συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα.	170
Διάγραμμα 7.6 Καμπύλες TGA προϊόντων μεταπολυμερισμού για τα πειράματα διερεύνησης της θερμοκρασίας.	172

Εικόνα 1.1 Δεδομένα ετήσιας παραγωγής πλαστικών παγκοσμίως από το 1950 έως το 2021 [2].	1
Εικόνα 1.2. α) Μοντέλο γραμμικής οικονομίας όπου γίνεται εξόρυξη πρώτων υλών, παραγωγή των προϊόντων και στο τέλος απόρριψή τους με χρήση μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, β) Μοντέλο κυκλικής οικονομίας όπου τα προϊόντα παράγονται, καταναλώνονται και στο τέλος ανακυκλώνονται και επαναχρησιμοποιούνται [6].	3
Εικόνα 1.3 Κατάταξη των πολυμερών ανάλογα την προέλευσή τους και τη βιοαποικοδομησιμότητά τους [5].	5
Εικόνα 1.4 Παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών μέχρι το 2027 [16].	7
Εικόνα 1.5 Δομή του PBS [18].	8
Εικόνα 1.6 Σύνθεση PBS από ανανεώσιμες και μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες [21].	9
Εικόνα 1.7 Ιδιότητες φράγματος αερίων O ₂ και CO ₂ για διάφορα πολυμερή [19].	11
Εικόνα 1.8 Διάφορες εφαρμογές του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) [26].	12
Εικόνα 1.9 Λογότυπο Bionolle™ της εταιρίας Showa Denko K.K.	13
Εικόνα 1.10 Αντίδραση εστεροποίησης του ηλεκτρικού οξέος (διοξύ) με την 1,4-βουτανοδιόλη (διόλη) για τη σύνθεση του PBS.	15
Εικόνα 1.11 Δομή καταλύτη Ti(BuO) ₄ [34].	15
Εικόνα 2.1 Μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς όπου το κλειδί αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα και η κλειδαριά το ένζυμο [9].	22
Εικόνα 2.2 Δομή της λιπάσης B από τον μικροοργανισμό <i>Candida antarctica</i> (PDB ID: 1TCA) [14].	23
Εικόνα 2.3 Δομή του ενζύμου HiC (PDB ID: 4OYY) [20].	24
Εικόνα 2.4 Αντιδράσεις ομοπολυμερισμού διαφόρων ω-HA, καταλυόμενες από AO-HiC και N435 [22].	26
Εικόνα 2.5 Αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης προς τον σχηματισμό πολυεστέρων καταλυόμενες από AO-HiC και N435 α) αντίδραση σεβακικού οξέος με διόλες διαφορετικών μηκών αλυσίδας, β) αντίδραση 1,8-οκτανοδιόλης με διοξέα διαφορετικών μηκών αλυσίδας [22].	27
Εικόνα 2.6 Δομή του μεταλλαγμένου ενζύμου LCC ^{ICCG} (PDB ID: 7VVE) [27].	28
Εικόνα 2.7 α) Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της LCC ^{ICCG} , β) Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου LCC ^{ICCG} [28].	29

Εικόνα 2.8 Ακίνητοποίηση ενζύμου πάνω σε φορέα μέσω φυσικής προσρόφησης [33].	31
Εικόνα 2.9 Ακίνητοποίηση ενζύμου πάνω σε φορέα μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης [33].	32
Εικόνα 2.10 Σχηματική αναπαράσταση της ουράς ιστιδινών η οποία αποτελείται από 6 ιστιδίνες [34].	33
Εικόνα 2.11 Σχηματική αναπαράσταση του δεσμού μεταξύ της His-tag και του ιόντος Ni^{2+} όπου φαίνονται τα διαδοχικά στάδια δημιουργίας αυτού του δεσμού [34].	34
Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση του σκοπού της διπλωματικής εργασίας όπου πραγματοποιείται σύνθεση «πράσινου» πολυεστέρα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με χρήση καινοτόμων ενζύμων.	41
Εικόνα 4.1 Αυτόκαυστο αποστείρωσης όπου αποστειρώνεται το θρεπτικό υλικό και τα απαραίτητα σκεύη για την πειραματική διαδικασία του γενετικού ανασυνδυασμού.	53
Εικόνα 4.2 Τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB, αντιβιοτικό καναμυκίνη και αποικίες μετασχηματισμένων <i>E. coli</i> με το πλασμίδιο α) για το ένζυμο LCC ^{ICCG} και β) για το ένζυμο HiC.	55
Εικόνα 4.3 Προκαλλιέργειες μετά το τέλος της επώασης όπου παρατηρείται θολερότητα που οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των ανασυνδυασμένων κυττάρων.	57
Εικόνα 4.4 Φιάλες με το θρεπτικό υλικό οι οποίες προορίζονται για υγρές καλλιέργειες.	58
Εικόνα 4.5 Υγρές καλλιέργειες αφότου ολοκληρώθηκε η έκφραση των ενζύμων.	60
Εικόνα 4.6 Φιάλες φυγοκέντρησης με το περιεχόμενο των υγρών καλλιεργειών τοποθετημένες μέσα σε δοχείο με πάγο προς προστασία των εκφρασμένων ενζύμων.	60
Εικόνα 4.7 Κύτταρα που έχουν καθιζάνει μετά το πέρας της φυγοκέντρησης.	61
Εικόνα 4.8 Στήλες χρωματογραφίας συγγένειας οι οποίες περιέχουν ιόντα Co^{2+}	63
Εικόνα 4.9 Κελί ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα και τον μάρτυρα φορτωμένα στο gel.	67
Εικόνα 4.10 Gel με τα δείγματα από τη χρωματογραφία του ενζύμου LCC ^{ICCG} μετά την προσθήκη του staining solution.	68
Εικόνα 4.11 Δοχείο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαπίδυση. Στο δοχείο περιέχεται η μεμβράνη με τα κλάσματα HiC 100A και HiC 100B που προέκυψαν από τη χρωματογραφία συγγένειας καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM.	71
Εικόνα 4.12 Σχηματική αναπαράσταση διάσπασης του εστερικού δεσμού του pNPL από το ένζυμο, γεγονός που οδηγεί σε κιτρινισμό του μέσου αντίδρασης.	77

Εικόνα 4.13 Μοντέλο ισορροπίας για την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου, όπου $E_{ενεργ.}$ είναι η ενεργή μορφή του ενζύμου, $E_{απενεργ.}$ είναι η απενεργοποιημένη του μορφή και X είναι η μετουσιωμένη του μορφή [9].	79
Εικόνα 4.14 Μη αντιστρεπτή αντίδραση στην οποία η πρωτεΐνη από τη φυσική της κατάσταση N φτάνει στην πλήρως ξεδιπλωμένη της μορφή U [10].	81
Εικόνα 4.15 Αντίδραση σύνθεσης PBS από BDO και DES.	83
Εικόνα 4.16 Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor R-20, Buchi.	86
Εικόνα 4.17 Σύστημα διήθησης υπό κενό για την ανάκτηση του βιοκαταλύτη.	87
Εικόνα 4.18 Σχηματική αναπαράσταση διαγράμματος ροής της πειραματικής διαδικασίας του ενζυμικού πολυμερισμού.	88
Εικόνα 4.19 Οι τέσσερις περιοχές του φάσματος υπερύθρου: απλοί δεσμοί ατόμων με υδρογόνο, τριπλοί δεσμοί, διπλοί δεσμοί και περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος [17].	91
Εικόνα 4.20 Όργανο Platinum-ATR ALFA II Bruker.	92
Εικόνα 4.21 Περιοχές του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ [17].	93
Εικόνα 4.22 Ενδεικτικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το PBS.	95
Εικόνα 4.23 Διάχυση μορίων εντός της στατικής φάσης με βάση τον υδροδυναμικό όγκο τους [23].	97
Εικόνα 4.24 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαχωρισμού μέσω της GPC [22].	98
Εικόνα 4.25 Σχηματικό διάγραμμα εξοπλισμού της GPC [22].	100
Εικόνα 4.26 Όργανο Agilent 1260 Infinity II.	101
Εικόνα 4.27 Εφαρμογές της μεθόδου DSC [25].	101
Εικόνα 4.28 Σχηματική αναπαράσταση τυπικού θερμιδομέτρου διαφορικής σάρωσης [27].	102
Εικόνα 4.29 Όργανο DSC 1 Star ^e System Mettler Toledo.	103
Εικόνα 4.30 α) Πάτος του καψιδίου (pan) από αλουμίνιο, β) κάλυμμα του pan, γ) σφραγισμένο pan με οπή στο κέντρο του καλύμματος για να επιτυγχάνεται ο απαραίτητος εξαερισμός.	104
Εικόνα 4.31. Σχηματική αναπαράσταση του θερμοζυγού [30].	106
Εικόνα 4.32 Κεραμικό pan TGA.	106
Εικόνα 4.33 Όργανο TGA/DSC 1 Star ^e System Mettler Toledo.	107
Εικόνα 5.1 Gel ηλεκτροφόρησης για το ένζυμο LCC ^{ICCG} όπου φαίνονται χρωματισμένες οι ζώνες του ενζύμου στα κλάσματα LCC ^{ICCG} 100A και LCC ^{ICCG} 100B.	114
Εικόνα 5.2 Gel ηλεκτροφόρησης για το ένζυμο HiC όπου φαίνονται χρωματισμένες οι ζώνες του ενζύμου στα κλάσματα HiC 100A και HiC 100B.	115

Εικόνα 5.3 Τελική μορφή βιοκαταλυτών μέσα σε falcons μετά και το τέλος της λυοφιλίωσης.....	117
Εικόνα 6.1 Μορφολογία προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού α) Blank_60, β) LCC_50, γ) LCC_60, δ) LCC_70, ε) N435_40.....	128
Εικόνα 6.2 Μορφολογία προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού α) LCC_60, β) LCC_60_επαναλ.....	153
Εικόνα 6.3 Μορφολογία προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού με HiC α) Blank_60 β) HiC_40, γ) HiC_50, δ) HiC_60, ε) LCC_70 στ) N435_40.	156
Εικόνα 7.1 Προϊόντα ύστερα από αναβάθμιση του PBA μέσω μεταπολυμερισμού παρουσία αέρα στους 140, 160 και 180°C, όπου φαίνεται η αλλαγή στο χρώμα των προϊόντων λόγω θερμικής αποικοδόμησης [2].....	165

Συντομογραφίες

Asp	Aspartate	Ασπαρτικό οξύ
ASTM	American Society for Testing and Materials	Αμερικανική Εταιρεία Δοκιμών και Υλικών
BDO	1,4-butanediol	1,4-βουτανοδιόλη
bioPBS	Bio-based poly(butylene succinate)	Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) προερχόμενος από ανανεώσιμες πρώτες ύλες
bioPCs	Bio-based polycarbonates	Πολυανθρακικά προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες
bioPE	Bio-based polyethylene	Πολυαιθυλένιο προερχόμενο από ανανεώσιμες πρώτες ύλες
bioPP	Bio-based polypropylene	Πολυπροπυλένιο προερχόμενο από ανανεώσιμες πρώτες ύλες
bioPUs	Bio-based polyurethanes	Πολυουρεθάνες προερχόμενες από ανανεώσιμες πρώτες ύλες
CALB N435	<i>Candida antarctica</i> Lipase B Novozym 435	<i>Candida antarctica</i> Β-λιπάση της Novozym 435
CPG	Controlled porosity glass	Γυαλί ελεγχόμενου πορώδους
DES	Diethyl succinate	Ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας
DESs	Deep Eutectic solvents	Βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DSC	Differential scanning calorimetry	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
FT-IR	Fourier-Transform Infrared Spectroscopy	Φασματοσκοπία Υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
GFC	Gel Filtration Chromatography	Χρωματογραφία διήθησης μέσω πηκτής

GPC	Gel Permeation Chromatography	Χρωματογραφία διαπέρασης μέσω πηκτής
HiC	<i>Humicola insolens</i> cutinase	Κουτινάση από τον μικροοργανισμό <i>Humicola insolens</i>
His	Histidine	Ιστιδίνη
His-tag	Histidine-tag	Ετικέτα συγγένειας – ουρά πολυ-ιστιδινών
hybCPG	Hybrid controlled porosity glass	Υβριδικό γυαλί ελεγχόμενου πορώδους
ILs	Ionic Liquids	Ιοντικά υγρά
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography	Χρωματογραφία συγγένειας
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	Ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο
lacO	Lactose operator	Χειριστής οπερονίου της λακτόζης
LB	Luria Bertani media	Θρεπτικό υλικό Luria Bertani
LCC^{ICCG}	ICCG mutation of Leaf-branch compost cutinase	Μετάλλαξη ICCG της κουτινάσης προερχόμενης από κομπόστ φύλλων και κλαδιών
\overline{M}_n	Number-average molecular weight	Μέσου-αριθμού μοριακό βάρος
\overline{M}_w	Weight-average molecular weight	Μέσου-βάρους μοριακό βάρος
OD	Optical density	Οπτική πυκνότητα
PBA	Poly(butylene adipate)	Πολυ(αδιπικός βουτυλεστέρας)
PBAT	Poly(butylene adipate-terephthalate)	Πολυ(αδιπικός-τερεφθαλικός βουτυλεστέρας)
PBF	Poly(butylene furanoate)	Πολυ(φουρανοδικός βουτυλεστέρας)
PBS	Poly(butylene succinate)	Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας)

PCL	Poly(ϵ -caprolactone)	Πολυκαπρολακτόνη
PE 4.4	Polyester 4.4	Πολυεστέρας 4.4
PEF	Poly(ethylene furanoate)	Πολυ(φουρανοδικός αιθυλεστέρας)
PES	Poly(ethylene succinate)	Πολυ(ηλεκτρικός αιθυλεστέρας)
PET	Poly(ethylene terephthalate)	Πολυ(τερεφθαλικός αιθυλεστέρας)
PHAs	Poly(hydroxy alkanooates)	Πολυ(υδροξυ αλκανοεστέρες)
PLA	Poly(lactic acid)	Πολυ(γαλακτικό οξύ)
PMMA	Poly(methyl methacrylate)	Πολυ(μεθακρυλικό μεθύλιο)
pNPL	para-Nitrophenyl laurate	Εστέρας του παρα-νιτροφαίνυλο δωδεκανοϊκού οξέος
PS	Polystyrene	Πολυστυρένιο
PVA	Poly(vinyl alcohol)	Πολυ(βινυλική αλκοόλη)
PVBC	Poly(vinyl benzyl chloride)	Πολυ(βίνυλο βενζυλοχλωρίδιο)
PVC	Poly(vinyl chloride)	Πολυ(βίνυλο χλωρίδιο)
RID	Refractive Index Detector	Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
SA	Succinic acid	Ηλεκτρικό οξύ
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate	Λαουρυλοθειϊκό νάτριο
SEC	Size Exclusion Chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών
Ser	Serine	Σερίνη
SSP	Solid State Polymerization	Πολυμερισμός στερεάς κατάστασης
T_c	Crystallization temperature	Θερμοκρασία κρυστάλλωσης

T_d	Decomposition temperature	Θερμοκρασία αποικοδόμησης
$T_{d,5\%}$	Decomposition temperature at 5% weight loss	Θερμοκρασία αποικοδόμησης στο 5% απώλειας βάρους
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη
T_g	Glass transition temperature	Θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης
TG	Thermogravimetry	Θερμοβαρυμετρία
TGA	Thermogravimetric analysis	Θερμοβαρυμετρική ανάλυση
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i> lipase	Λιπάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό <i>Thermomyces lanuginosus</i>
T_m	Melting temperature	Θερμοκρασία τήξης
T_{m0}	Equilibrium melting temperature	Θερμοκρασία τήξης ισορροπίας
T_{m1}	Melting temperature at 1 st heating	Θερμοκρασία τήξης στην πρώτη θέρμανση
T_{m2}	Melting temperature at 2 nd heating	Θερμοκρασία τήξης στη δεύτερη θέρμανση
$T_{opt.}$	Optimum temperature	Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου
Trp	Tryptophan	Τρυπτοφάνη
Tyr	Tyrosine	Τυροσίνη
UV	Ultraviolet	Υπεριώδης
x_c	Crystallinity degree	Βαθμός κρυσταλλικότητας
\bar{x}_n	Number-average degree of polymerization	Μέσου-αριθμού βαθμός πολυμερισμού
ΔH_c	Crystallization enthalpy	Ενθαλπία κρυστάλλωσης
ΔH_f^0	Enthalpy of fusion per unit volume	Ενθαλπία τήξης ενός τέλει κρυστάλλου
ΔH_{m1}	Enthalpy of melting at 1 st heating	Ενθαλπία τήξης στην πρώτη θέρμανση

ΔH_{m2}	Enthalpy of melting at 2 nd heating	Ενθαλπία τήξης στη δεύτερη θέρμανση
σ_e	Lamellar surface free energy	Ελεύθερη ενέργεια ελασματικής επιφάνειας
ω-HAs	ω -Hydroxyalkanoic acids	ω -Υδροξυαλκανοϊκά οξέα

Η υπέρμετρη χρήση των πλαστικών προϊόντων τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργήσει αρκετά προβλήματα σχετικά με τη μείωση των πόρων και τη δυσκολία στη διαχείριση των αποβλήτων που προκύπτουν μετά τη χρήση τους, στρέφοντας το ενδιαφέρον της ακαδημαϊκής κοινότητας προς τη μελέτη «πράσινων» πολυμερών όπως είναι ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene succinate) ή PBS). Ο πολυεστέρας αυτός, ο οποίος παρουσιάζει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τις πολυολεφίνες, μπορεί να προέλθει αλλά και να επιστρέψει στη φύση μετά το τέλος της ζωής του, καθώς πρόκειται για ένα βιοαποικοδομήσιμο υλικό με δυνατότητα προέλευσης από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Μάλιστα, το PBS δύναται να χαρακτηριστεί πραγματικά «πράσινο» καθώς έχει τη δυνατότητα σύνθεσης μέσω πλήρως φιλικών προς το περιβάλλον διαδικασιών, όπως είναι ο ενζυμικός πολυμερισμός αξιοποιώντας ως καταλύτες διάφορες λιπάσες, κατά κύριο λόγο εμπορικά διαθέσιμες. Έτσι, αποφεύγεται η χρήση χημικών καταλυτών και υψηλών θερμοκρασιών (έως και 240°C), συνθήκες που χρησιμοποιούνται κυρίως από τη βιομηχανία κατά τη χημική του σύνθεση. Το μόνο μειονέκτημα του ενζυμικού πολυμερισμού είναι η σύνθεση προϊόντων με χαμηλό μοριακό βάρος με αποτέλεσμα να απαιτείται πολλές φορές ο συνδυασμός με κάποια διεργασία μεταπολυμερισμού.

Με δεδομένο ότι οι περισσότερες προσπάθειες στη βιβλιογραφία αναφέρονται σε χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης B από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB – Novozym® 435) για τη σύνθεση του PBS, η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη χρήση μη εμπορικά διαθέσιμων ενζύμων σε διεργασίες ενζυμικού προπολυμερισμού για τη σύνθεση του PBS. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν και εξετάστηκαν ήταν η κουτινάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Humicola insolens* ή HiC και η τετραπλή μετάλλαξη ICCG της κουτινάσης προερχόμενη από κομπόστ φύλλων και κλαδιών ή LCC^{ICCG}, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως σε αντιδράσεις αποπολυμερισμού. Χρήση σε διεργασίες ενζυμικού πολυμερισμού συναντώνται στη βιβλιογραφία μόνο για την περίπτωση της HiC, μιας και η LCC^{ICCG} δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα για τη σύνθεση πολυμερών. Έτσι, σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η ετερόλογη έκφραση

των δύο αυτών κουτινασών, σε στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* και ακολούθως η ακινητοποίησή τους πάνω σε φορείς προερχόμενους από γυαλί ελεγχόμενου πορώδους (Controlled porosity glass ή CPG) μέσω συμπλοκοποίησης, επιτυγχάνοντας ποσοστό ακινητοποίησης ίσο με 77% και για τις δύο περιπτώσεις.

Στη συνέχεια, οι ακινητοποιημένες αυτές κουτινάσες, χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες σε διαδικασίες ενζυμικής σύνθεσης ολιγομερών του PBS, συμμετέχοντας σε «πράσινες» διεργασίες (απουσία διαλυτών) δύο σταδίων (το πρώτο σε ήπιες συνθήκες με σκοπό να ευνοηθεί η ενζυμική σύνθεση ενώ το δεύτερο σε εντονότερες με σκοπό να ευνοηθεί η χημική). Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής, διερευνήθηκε η θερμοκρασία του πρώτου σταδίου (HiC: 40-60°C, LCC^{ICCG}: 50-70°C) με την LCC^{ICCG} να οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα καθώς προέκυψε προϊόν με μέσου-αριθμού μοριακό βάρος ίσο με 1400 g/mol, σημείο τήξης 56°C και βαθμό κρυσταλλικότητας 47%. Αντίθετα, στην περίπτωση της HiC, προέκυψαν προϊόντα σε υγρή μορφή με μικρό βαθμό πολυμερισμού.

Για αυτόν τον λόγο, η μελέτη εστιάστηκε στο προϊόν της LCC^{ICCG} το οποίο υποβλήθηκε ακολούθως σε διεργασίες μεταπολυμερισμού μάζας με σκοπό την αναβάθμιση των χαρακτηριστικών. Ως μέθοδος μεταπολυμερισμού επιλέχθηκε ο χαμηλής θερμοκρασίας μεταπολυμερισμός τήγματος, πραγματοποιώντας διερεύνηση της θερμοκρασίας του (90-130°C). Η βέλτιστη θερμοκρασία οδήγησε στην παραλαβή τελικού προϊόντος με μέσου-αριθμού μοριακό βάρος ίσο με 1700 g/mol, σημείο τήξης 59°C και κρυσταλλικότητα 45%.

Έτσι λοιπόν, στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε η ενζυμική σύνθεση ενός πραγματικά «πράσινου» πολυεστέρα χρησιμοποιώντας καινοτόμα ένζυμα, ο οποίος ήταν επιδεκτικός σε μεταπολυμερισμό, χωρίς θερμική αποικοδόμηση και υπολείμματα χημικών καταλυτών.

Λέξεις-κλειδιά

«Πράσινα» πολυμερή, Ανανεώσιμες πρώτες ύλες, Βιοαποικοδομησιμότητα, Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας), Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών, HiC, LCC^{ICCG}, Ακινητοποίηση ενζύμων, Ενζυμικός πολυμερισμός, Μεταπολυμερισμός μάζας

The excessive use of plastic products in recent years has created several problems regarding the reduction of resources and the difficulty in managing the waste generated after their use, turning the interest of the academic community towards the study of "green" polymers such as poly(butylene succinate) (PBS). This polyester, which has many characteristics in common with polyolefins, can be both derived and returned to nature at the end of its life, as it is a biodegradable material that can be derived from renewable raw materials. In fact, PBS can be described as truly "green" as it can be synthesized through fully environmentally friendly processes, such as enzymatic polymerization using as catalysts various lipases, mainly commercially available. This way, conditions which are mainly used by industry such chemical catalysts and high temperatures (up to 240°C) are avoided. The only disadvantage of enzymatic polymerization is the synthesis of products with low molecular weight, leading to the use of post-polymerization processes.

Given that most efforts in the literature refer to the use of immobilized lipase B from the microorganism *Candida antarctica* (CALB – Novozym® 435) for the synthesis of PBS, this diploma thesis aims to use non-commercially available enzymes in enzyme prepolymerization processes for the synthesis of PBS. The enzymes that were selected and tested, were *Humicola insolens* cutinase or HiC and ICCG-mutation of Leaf-branch compost cutinase or LCC^{ICCG} which have been mainly used in depolymerization reactions. Searching the literature, only attempts, in which HiC was used, were found since LCC^{ICCG} has not been used for polymer synthesis so far. Thus, heterologous expression of these two cutinases was firstly performed in bacteria *Escherichia coli* and subsequently their immobilization on Controlled Porosity Glass (CPG) carriers by complexation, achieving an immobilization rate of 77% for both cases.

Subsequently, these immobilized cutinases were used as biocatalysts in enzyme synthesis processes of PBS oligomers, participating in two-step "green" processes (in the absence of solvents) (the first stage was performed under mild conditions to favor enzyme synthesis and the second one under more intense conditions to

favor chemical synthesis). In the context of this diploma thesis, the temperature of the first stage (HiC: 40-60°C, LCC^{ICCG}: 50-70°C) was investigated with LCC^{ICCG} leading to better results as it gave a product with number-average molecular weight of 1400 g/mol, melting point of 56°C and crystallinity degree of 47%. In contrast, in the case of HiC, products in liquid form with a low degree of polymerization were obtained.

For this reason, the study was focused on the LCC^{ICCG} product which was then submitted to bulk post-polymerization processes to upgrade its characteristics. Low temperature melt post-polymerization was chosen as the post-polymerization method, by investigating its temperature (90-130°C). The optimum temperature led to a final product with number-average molecular weight of 1700 g/mol, melting point of 59°C and crystallinity of 45%.

Thus, in this diploma thesis, the enzymatic synthesis of a truly “green” polyester using novel enzymes, which was amenable to post-polymerization, without thermal degradation and chemical catalyst residues, was carried out.

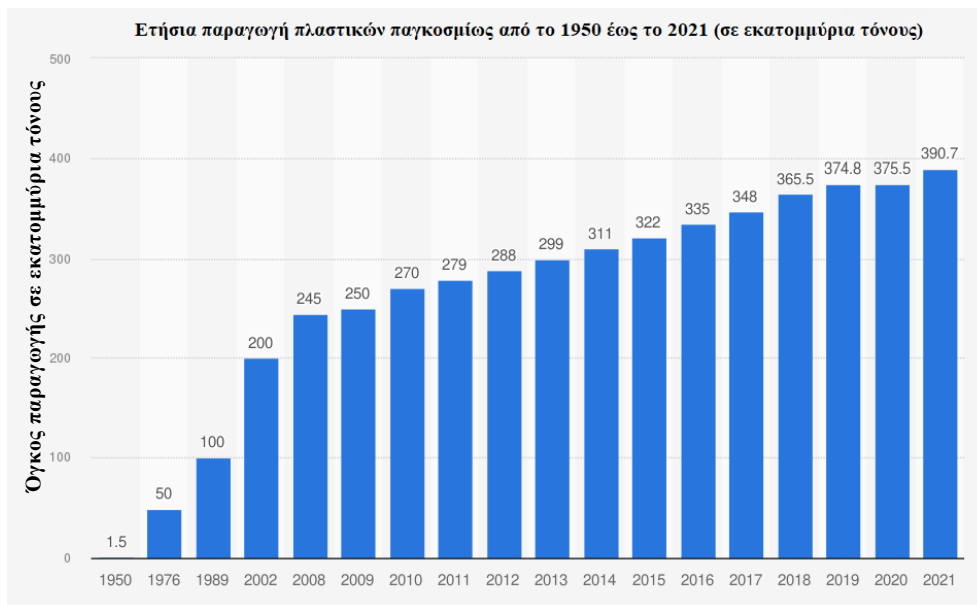
Keywords

“Green” polymers, Renewable raw materials, Biodegradability, Poly(butylene succinate), Heterologous expression of proteins, HiC, LCC^{ICCG}, Enzyme immobilization, Enzymatic polymerization, Bulk post-polymerization

Κεφάλαιο 1: «Πράσινα» πολυμερή: Προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες & βιοαποικοδομήσιμα

1.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η συνεχής εξέλιξη της τεχνολογίας η οποία οδηγεί καθημερινά σε βομβαρδισμό από νέες πληροφορίες, έχει δημιουργήσει ολοένα και περισσότερες νέες ανάγκες στις ζωές των ανθρώπων, πολλές φορές ακόμα και πλασματικές. Για να μπορέσουν να καλυφθούν αυτές οι ανάγκες, χρειάζεται η παραγωγή αγαθών. Κατά κύριο λόγο, το κενό έρχονται να καλύψουν τα πλαστικά καθώς πρόκειται για υλικά με μεγάλο εύρος εφαρμογών εξαιτίας των πολλών και χρήσιμων ιδιοτήτων τους. Πρόκειται για πολύ ευέλικτα υλικά που μπορούν να αντέξουν σε αντίξοες συνθήκες όπως είναι η υψηλή θερμοκρασία, η έκθεση στο φως και στα χημικά [1].



Εικόνα 1.1 Δεδομένα ετήσιας παραγωγής πλαστικών παγκοσμίως από το 1950 έως το 2021 [2].

Προσθέτοντας σε αυτά τα χαρακτηριστικά και το χαμηλό κόστος παραγωγής, θα έλεγε κανείς ότι τα πλαστικά πλέον κυριαρχούν στη βιομηχανία,

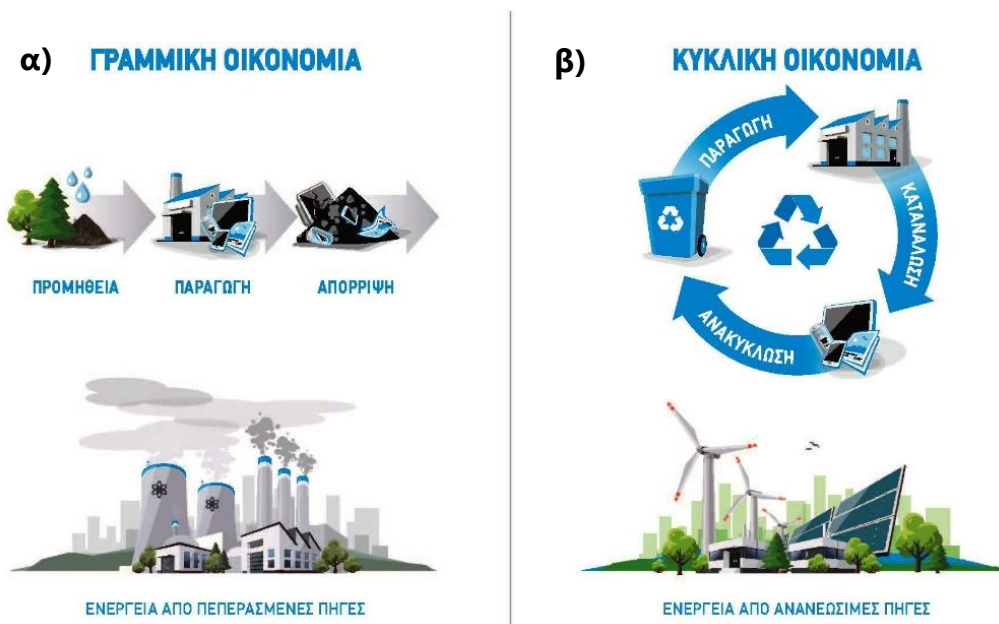
αντικαθιστώντας άλλα υλικά όπως τα μέταλλα, το ξύλο και το γυαλί. Αυτό αποδεικνύεται και από τα δεδομένα στην εικόνα 1.1 όπου φαίνεται ότι η παραγωγή αυτών των υλικών σε παγκόσμιο επίπεδο συνεχώς αυξάνεται, φτάνοντας το 2021 τους 390,7 εκατομμύρια τόνους παγκοσμίως [2]. Οι λόγοι για τους οποίους έχουν γίνει τόσο δημοφιλή ποικίλουν. Αρκεί να σημειωθεί ότι μπορούν να μορφοποιηθούν πολύ εύκολα, προσφέροντας καλαίσθητα προϊόντα σε οποιοδήποτε σχήμα και μέγεθος, συνδυάζοντας το χαμηλό βάρος. Ταυτόχρονα, οι χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις κατά τις διεργασίες παραγωγής και επεξεργασίας τους είναι αυτές που τα τοποθετούν ίσως σε τόσο υψηλή θέση στη βιομηχανία των υλικών [3].

Ωστόσο, η τόσο μεγάλη παραγωγή των πλαστικών επιφέρει πολλά προβλήματα στο περιβάλλον, αφενός λόγω της χρήσης ορυκτών πόρων οι οποίοι ολοένα και λιγοστεύουν, και αφετέρου εξαιτίας της μη εφαρμογής ενός καθολικού μέτρου το οποίο να ορίζει τον τρόπο ή/και τους τρόπους διαχείρισης των αποβλήτων που δημιουργούνται μετά τη χρήση των υλικών αυτών. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι εκπομπές CO₂ που προκύπτουν τόσο από τη χρήση ορυκτών πόρων στις διεργασίες παραγωγής όσο και από τους τρόπους διαχείρισης των πλαστικών αποβλήτων αγγίζουν τους 400 εκατομμύρια τόνους κάθε χρόνο [4].

Η τεράστια αυτή εκπομπή CO₂ καθώς και άλλων αερίων του θερμοκηπίου έχει στρέψει το ενδιαφέρον εδώ και πολλά χρόνια προς την ανακάλυψη νέων πολυμερικών υλικών τα οποία θα καταργήσουν το γραμμικό μοντέλο οικονομίας (προμήθεια πόρων-παραγωγή προϊόντων-απόρριψη) (εικόνα 1.2) που ακολουθείται από τη βιομηχανία και θα αξιοποιήσουν ανανεώσιμες πρώτες ύλες όπως είναι η βιομάζα οδηγώντας σε προϊόντα φιλικά προς το περιβάλλον [5],[6].

Έτσι λοιπόν, κρίνεται αναγκαίο να γίνει η εισαγωγή δύο νέων όρων που θα χαρακτηρίζουν τα υλικά και πιο συγκεκριμένα τα πολυμερή. Ο πρώτος είναι ο όρος πολυμερή προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες (bio-based), ο οποίος αναφέρεται σε προϊόντα και υλικά που είναι μερικώς ή πλήρως προερχόμενα από τη βιομάζα [7]. Σύμφωνα με τους Jiang *et al.* [8], η λέξη μερικώς χρησιμοποιείται καθώς αρκεί τουλάχιστον ένα μέρος του πολυμερούς να παράγεται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες ώστε συνολικά το πολυμερές να θεωρείται προερχόμενο από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Αυτή η κατηγορία των υλικών συμπεριλαμβάνει

διάφορες υποκατηγορίες ανάλογα τον τρόπο με τον οποίο παράγονται. Έτσι λοιπόν σε αυτά τα υλικά συμπεριλαμβάνονται: α) φυσικά πολυμερή, δηλαδή αυτά που προέρχονται απευθείας από τη βιομάζα όπως είναι η κυτταρίνη, β) πολυμερή που παράγονται από μικροοργανισμούς όπως οι πολυ(υδροξυ αλκανοεστέρες) (poly(hydroxy alkanooates) ή PHAs) και γ) συνθετικά πολυμερή τα οποία παράγονται είτε στο εργαστήριο είτε στη βιομηχανία από μονομερή που είναι προερχόμενα ανανεώσιμους πόρους (π.χ. PLA, PBS, PBF) [8],[9]. Κυρίως τα πολυμερή της τρίτης κατηγορίας δύνανται να έχουν ιδιότητες παρόμοιες με αυτές των αντίστοιχων υλικών που παράγονται πετροχημικά με τη διαφορά ότι τα πρώτα μειώνουν το αποτύπωμα άνθρακα στο περιβάλλον [10].



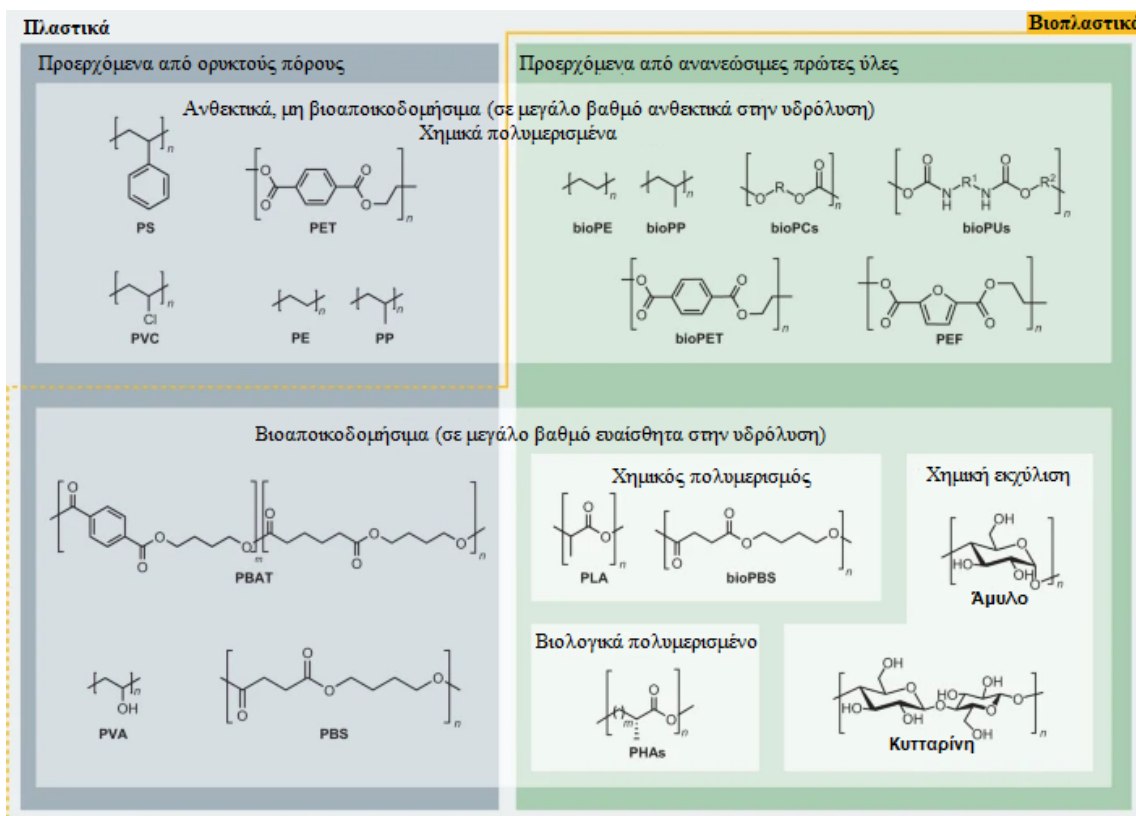
Εικόνα 1.2. α) Μοντέλο γραμμικής οικονομίας όπου γίνεται εξόρυξη πρώτων υλών, παραγωγή των προϊόντων και στο τέλος απόρριψή τους με χρήση μη ανανεώσιμων πηγών ενέργειας, β) Μοντέλο κυκλικής οικονομίας όπου τα προϊόντα παράγονται, καταναλώνονται και στο τέλος ανακυκλώνονται και επαναχρησιμοποιούνται [6].

Ο δεύτερος όρος είναι αυτός των βιοαποικοδομήσιμων ή βιοδιασπώμενων (biodegradable) ο οποίος περιλαμβάνει τα πολυμερή τα οποία είναι σχεδιασμένα με τέτοιο τρόπο ώστε να αποικοδομούνται κατά την απόρριψή τους, εξαιτίας της δράσης διαφόρων μικροοργανισμών [11]. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η βιοαποικοδόμηση, είναι απαραίτητη η παρουσία δεσμών μεταξύ κάποιου

καρβονυλίου της μακροαλυσίδας με άτομα O, N ή S. Αυτοί οι δεσμοί υδρολύονται και έτσι τα μακρομόρια αυτά αποικοδομούνται στο περιβάλλον [12]. Τα τελικά προϊόντα αυτής της αποικοδόμησης είναι συνήθως CO₂, H₂O ή/και CH₄ [10]. Η βιοαποικοδομησιμότητα ως αποτέλεσμα της δράσης των μικροοργανισμών μετριέται μέσα από τυποποιημένες δοκιμές οι οποίες λαμβάνουν υπόψη τον χρόνο αλλά και τις συνθήκες διάθεσης (ASTM πρότυπο D6813) [9],[13]. Μάλιστα, πολλά βιοαποικοδομήσιμα υλικά μπορούν να είναι ταυτόχρονα και κομποστοποιήσιμα με ειδική αναφορά στη βιοαποικοδόμησή τους εντός ενός συστήματος κομποστοποίησης. Σε αυτή την περίπτωση, η αποικοδόμηση πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε το προϊόν αυτό να διασπάται στα προϊόντα που προαναφέρθηκαν με ρυθμό ίσο με αυτόν που διασπώνται γνωστά κομποστοποιήσιμα υλικά (π.χ. κυτταρίνη) οδηγώντας σε τελικά προϊόντα τα οποία να έχουν συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, χαμηλή οικοτοξικότητα και απουσία οπτικά διακριτών υπολειμμάτων πλαστικού [13].

Οι παραπάνω κατηγορίες πολυμερών (προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και βιοδιασπώμενα) είναι ανεξάρτητες, καθώς τα κριτήρια που κατατάσσουν τα πολυμερή σε αυτές δεν ταυτίζονται. Αυτό σημαίνει ότι ένα προερχόμενο από ανανεώσιμες πρώτες ύλες πολυμερές δεν είναι απαραίτητα βιοδιασπώμενο και αντίστροφα. Υπάρχουν βέβαια και πολυμερή τα οποία ανήκουν και στις δύο αυτές οικογένειες. Για τον λόγο αυτό, διακρίνονται οι εξής κατηγορίες, οι οποίες φαίνονται και στην εικόνα 1.3:

- ❖ Πολυμερή προερχόμενα από ορυκτούς πόρους τα οποία δεν μπορούν να βιοαποικοδομηθούν (π.χ. PET, PVC, PS).
- ❖ Πλήρως ή μερικώς προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες πολυμερή τα οποία δεν είναι βιοαποικοδομήσιμα (π.χ. bioPP, bioPE, PEF).
- ❖ Βιοαποικοδομήσιμα πολυμερή προερχόμενα από ορυκτούς πόρους (π.χ. PBAT).
- ❖ Πολυμερή που προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και είναι ταυτόχρονα βιοαποικοδομήσιμα (π.χ. PLA, PHAs, bio-PBS) [5],[7].



Εικόνα 1.3 Κατάταξη των πολυμερών ανάλογα την προέλευσή τους και τη βιοαποικοδομησιμότητά τους [5].

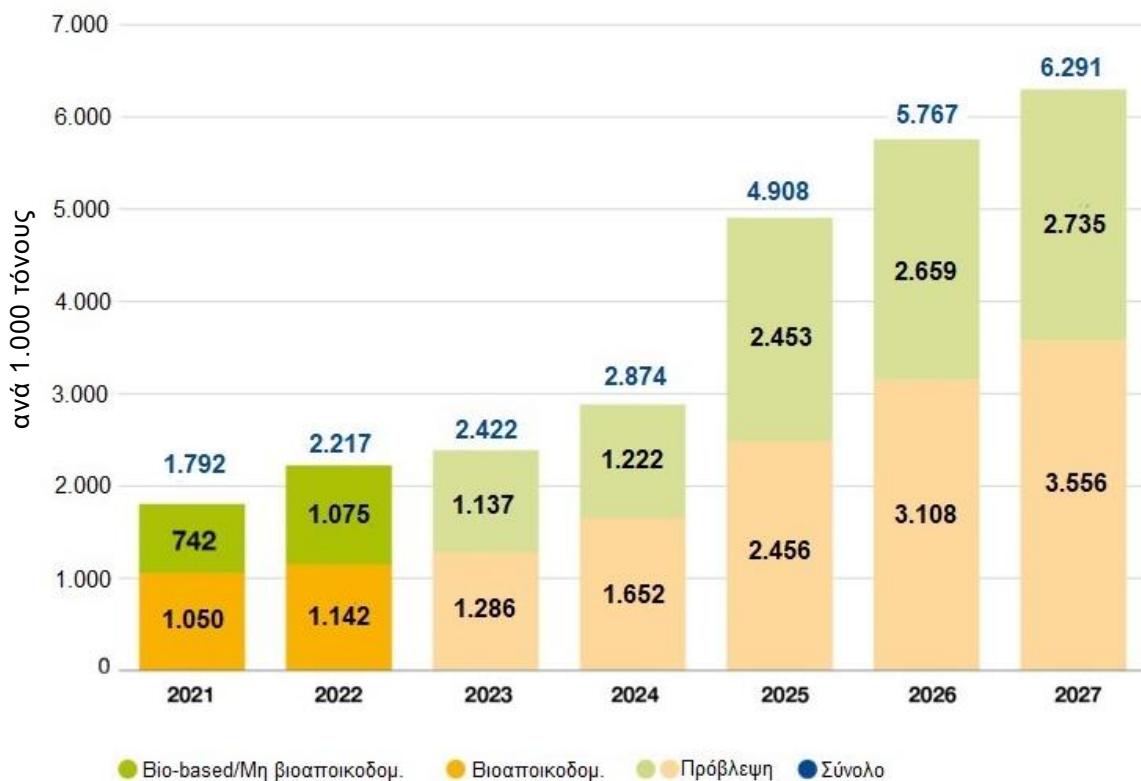
Με αφορμή λοιπόν τους δύο παραπάνω νέους όρους, αρκετά συχνά παρατηρείται και η χρήση του όρου «πράσινα» πολυμερή. Σύμφωνα όμως με τους Jiang *et al.* [8], η βιολογική προέλευση και η ικανότητα για βιοαποικοδόμηση δεν αρκούν για να μπορέσει ένα πολυμερές να χαρακτηριστεί ως «πράσινο». Αντιθέτως, χρειάζεται να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις για να είναι κανείς σίγουρος ότι το τελικό προϊόν είναι πραγματικά «πράσινο»:

- ❖ Να χρησιμοποιούνται «πράσινες» πρώτες ύλες, καταλύτες και διαλύτες (προερχόμενα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες).
- ❖ Να παράγεται μέσω διεργασιών οι οποίες να είναι φιλικές προς το περιβάλλον.
- ❖ Να είναι βιώσιμο προϊόν αφήνοντας σχεδόν μηδενικό αποτύπωμα C, δηλαδή υλικά που είναι βιοαποικοδομήσιμα ή που μπορούν να ανακυκλωθούν με αποτέλεσμα να μην επιβαρύνουν το περιβάλλον [8],[9].

Αυτές οι προϋποθέσεις βρίσκονται σε συμφωνία με τις αρχές της Πράσινης Χημείας, καθώς η χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών στις διεργασίες σύνθεσης πολυμερών αλλά και η παραγωγή και μετέπειτα χρήση βιοαποικοδομήσιμων υλικών συμβάλλουν στη διατήρηση της αειφορίας στον πλανήτη και βοηθούν στο να επιτευχθεί πράσινη χημεία πολυμερών. Αποτελούν δηλαδή χαρακτηριστικά τα οποία βοηθούν στη μείωση των προβλημάτων βιωσιμότητας που προκύπτουν καθημερινά [14]. Στο ίδιο κλίμα βρίσκεται και η αξιοποίηση νέων διαλυτών όπως είναι τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids, ή ILs), οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents ή DESs) και τα υπερκρίσιμα ρευστά (Supercritical fluids) όπως το υπερκρίσιμο CO₂ καθώς η χρήση διαλυτών σε διεργασίες παραγωγής πολυμερών αποτελεί μία από τις πιο κοινές και χρήσιμες μεθόδους [15]. Ωστόσο, η μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων μπορεί να επιτευχθεί και με τη χρήση «πράσινων» καταλυτών όπως είναι τα ένζυμα οδηγώντας παράλληλα σε λιγότερο ενεργοβόρες διαδικασίες, όπως περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο. Αξίζει μόνο να σημειωθεί πως η χρήση θερμοκρασιών και πιέσεων κοντά σε αυτές του περιβάλλοντος, είναι πάντα προτιμότερες λόγω της εξοικονόμησης ενέργειας αλλά και του μικρότερου κόστους λειτουργίας των διεργασιών μιας και τα ένζυμα απαιτούν ηπιότερες συνθήκες [14],[15]. Εν τούτοις, στην περίπτωση των πολυμερών, είναι αρκετά σπάνιο να πραγματοποιούνται διεργασίες παραγωγής σε ατμοσφαιρικές συνθήκες καθώς τα αντιδρώντα συστήματα που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα κυρίως στη βιομηχανία χρειάζονται τις περισσότερες φορές αρκετή ενέργεια για να μπορέσουν να οδηγήσουν στα τελικά πολυμερικά υλικά.

Δεδομένης λοιπόν της κρίσης των ορυκτών καυσίμων, της σταθερής κατανάλωσής τους και των πεπερασμένων αποθεμάτων τους, η παραγωγή βιοπλαστικών από τις βιομηχανίες αυξάνεται διαρκώς αξιοποιώντας πολλές φορές αστικά και γεωργικά απόβλητα, καθώς και απορρίμματα τροφών με αποτέλεσμα να εναρμονίζονται με τα μέτρα που ορίζει η Ευρωπαϊκή Ένωση αλλά και άλλοι θεσμοί παγκοσμίως [4],[7]. Η τάση αυτή προς τα βιοπλαστικά αποτυπώνεται και στην εικόνα 1.4 όπου φαίνεται πόσο αυξάνεται η παραγωγή τους, αποδεικνύοντας τη μεγάλη ανάγκη για αντικατάσταση των συμβατικών πλαστικών που χρησιμοποιούνται.

Παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών



Εικόνα 1.4 Παγκόσμια παραγωγική ικανότητα βιοπλαστικών μέχρι το 2027 [16].

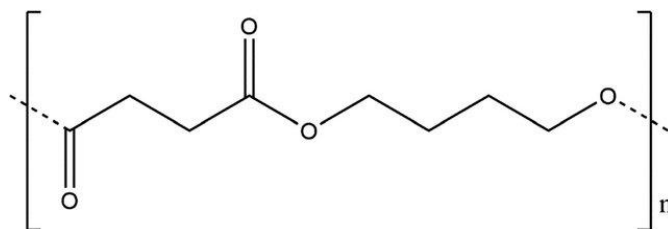
Σε αυτό το σημείο, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι τα δεδομένα για το 2022 έδειξαν πως το μέγεθος της παγκόσμιας αγοράς βιοπλαστικών ανερχόταν σε 7,56 δισεκατομμύρια δολάρια (περίπου 6,8 δισεκατομμύρια ευρώ) ενώ για το 2030 αναμένεται να φτάσει τα 31,66 δισεκατομμύρια δολάρια (περίπου 28,69 δισεκατομμύρια ευρώ) [17].

Ένα πολυμερές το οποίο πληροί πολλές από τις προϋποθέσεις που περιγράφηκαν προηγουμένως είναι και ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) του οποίου τα χαρακτηριστικά και οι ιδιότητες παρουσιάζονται στην επόμενη ενότητα.

1.2. Πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) - PBS

Ο πολυ(ηλεκτρικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene succinate) ή PBS), είναι ένα πολυμερές που δύναται να συνδυάσει τη βιολογική προέλευση με τη

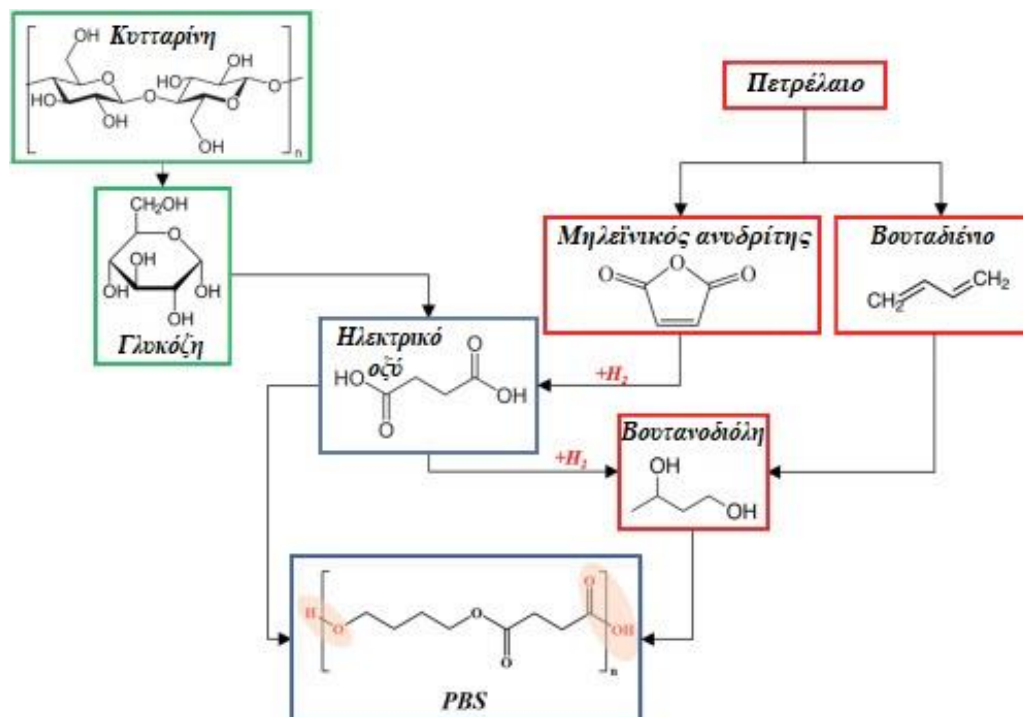
βιοαποικοδομησιμότητα καθώς είναι δυνατόν να προέλθει τόσο από πρώτες ύλες προερχόμενες από ορυκτούς πόρους όσο και από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με αποτέλεσμα να μπορεί να συγκαταλέγεται στα bio-based υλικά (εικόνα 1.6). Γνωστός και ως πολυ(ηλεκτρικός τετραμεθυλεστέρας), το πολυμερές αυτό, που παράγεται μέσω της αντίδρασης του ηλεκτρικού οξέος (succinic acid ή SA) με την 1,4-βουτανοδιόλη (1,4-butanediol ή BDO), ανήκει στην κατηγορία των αλειφατικών πολυεστέρων. Η επαναλαμβανόμενη δομική μονάδα έχει χημικό τύπο $C_8H_{12}O_4$ [18],[19],[20]. Στην εικόνα 1.5 μπορεί να διακρίνει κανείς τη δομή του PBS και να διαπιστώσει την παρουσία δεσμών μεταξύ καρβονυλίων και ατόμων N, γεγονός που του προσδίδει τον βιοδιασπώμενο χαρακτήρα.



Εικόνα 1.5 Δομή του PBS [18].

Όσον αφορά το ηλεκτρικό οξύ, είναι δυνατό να παραχθεί είτε μέσω χημικών διαδικασιών οι οποίες βασίζονται σε πρώτες ύλες προερχόμενες από το πετρέλαιο, είτε μέσω πιο βιώσιμων διεργασιών όπως είναι η βακτηριακή ζύμωση. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται συνήθως ως πρώτη ύλη ο μηλεϊνικός ανυδρίτης ενώ στη δεύτερη γίνεται ζύμωση της κυτταρίνης ή άλλων προϊόντων της από βακτήρια όπως είναι διάφορα ανασυνδυασμένα κύτταρα *Escherichia coli*. Αντίστοιχα, και για την BDO, υπάρχουν παραδείγματα παραγωγής της είτε από μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες είτε από ενώσεις προερχόμενες από τη βιομάζα. Η ακετοξυλίωση του βουταδιενίου αλλά και η αντίδραση της φορμαλδεΐδης με το ακετυλένιο είναι κάποια από τα παραδείγματα χημικής σύνθεσης της BDO στη βιομηχανία [21]. Η σύνθεση της BDO μέσω ανανεώσιμων πρώτων υλών περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους με κυρίαρχες α) την καταλυτική υδρογόνωση του SA το οποίο έχει προκύψει μέσα από ζύμωση ανανεώσιμων πρώτων υλών και β) την απευθείας ζύμωση της γλυκόζης σε βακτήρια όπως το *Escherichia coli*

όπου εν τέλει προϊόντα του κύκλου του κιτρικού οξέος μετατρέπονται με τη χρήση των κατάλληλων ενζύμων σε bio-based BDO [21],[22].



Εικόνα 1.6 Σύνθεση PBS από ανανεώσιμες και μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες [21].

Εκτός όμως του βιοδιασπώμενου χαρακτήρα και της δυνατότητας προέλευσης από ανανεώσιμες πρώτες, το PBS διαθέτει κι άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά. Πρόκειται για έναν πολυεστέρα ο οποίος διαθέτει μόνο κορεσμένους δεσμούς στην επαναλαμβανόμενη δομική του μονάδα, γεγονός που τον κατατάσσει στην κατηγορία των θερμοπλαστικών. Σε αυτά έρχονται να προστεθούν το γεγονός ότι είναι ένα ημικρυσταλλικό λευκό πολυμερές με πυκνότητα ίση με 1,25 g/cm³, χαρακτηριστικά που μαζί με τις ιδιαίτερα χρήσιμες ιδιότητές του το καθιστούν ιδανικό υποψήφιο για πολλές εφαρμογές [23].

1.2.1. Θερμικές ιδιότητες

Το PBS, γνωστό και ως PE 4.4 (Polyester 4.4) παρουσιάζει σημείο τήξης (T_m) στους 115°C και θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (T_g) που κυμαίνεται από τους -

45 έως τους -10°C [7],[23],[24]. Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά σε συνδυασμό με την υψηλή θερμική του σταθερότητα (μέχρι τους 220°C) το καθιστούν κατάλληλο για παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα [24],[25]. Συγκεκριμένα, οι θερμικές αυτές ιδιότητες του προσφέρουν πολύ καλή δυνατότητα επεξεργασίας σε κλωστοϋφαντουργικά νήματα, καλούπια έγχυσης και φιλμ καθώς μπορεί να λιώνει πιο γρήγορα αλλά και να αναμειγνύεται με άλλα υλικά [23],[26],[27].

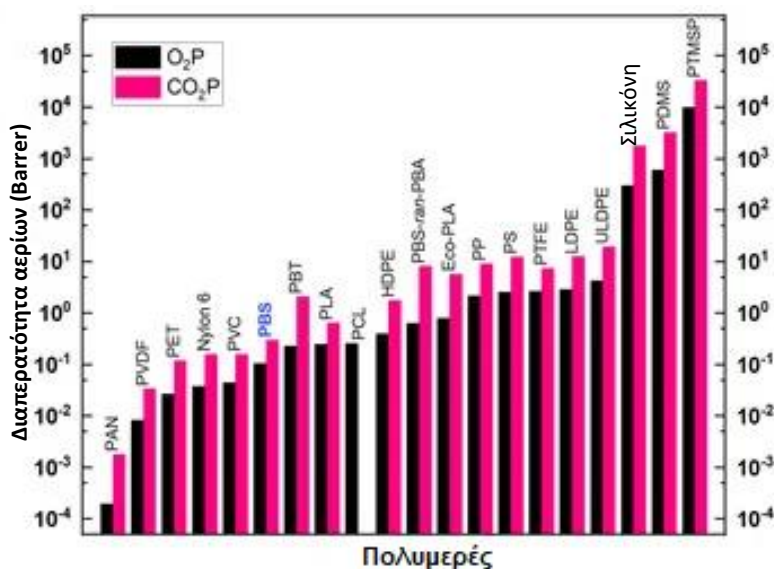
1.2.2. Μηχανικές ιδιότητες και ιδιότητες φράγματος

Εστιάζοντας στις μηχανικές ιδιότητες του PBS, υπογραμμίζεται ότι πρόκειται για ένα αρκετά όλκιμο πολυμερές, χαρακτηριστικό που το καθιστά εύκολα επεξεργάσιμο χαρίζοντάς του αντοχή σε εφελκυσμό ίση με 30-35 MPa [7],[26]. Μαζί με τον βαθμό κρυσταλλικότητας που διαθέτει αυτό το πολυμερές, ο οποίος κυμαίνεται από 35-45%, τοποθετείται σε υψηλή θέση στη βιομηχανία για χρήση σε διάφορες εφαρμογές. Ο βαθμός κρυσταλλικότητας με τη σειρά του επηρεάζει και το μέτρο ελαστικότητας το οποίο κι αυτό κυμαίνεται από 300-500 MPa. Από αυτό προκύπτει πως οι μηχανικές ιδιότητες είναι συνάρτηση τόσο του βαθμού κρυσταλλικότητας όσο και του μοριακού βάρους. Μεγαλύτερο μοριακό βάρος οδηγεί και σε καλύτερες μηχανικές ιδιότητες του τελικού προϊόντος. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μοριακό βάρος μπορεί να απαιτεί την προσθήκη μονομερών με αρωματικούς δακτυλίους οδηγώντας έτσι στην παραγωγή συμπολυμερών του PBS [23].

Για πιο συγκεκριμένες εφαρμογές όπως είναι η συσκευασία, σημαντικό ρόλο παίζει η μελέτη των ιδιοτήτων φράγματος. Όπως για κάθε υλικό που χρησιμοποιείται ως υλικό συσκευασίας, έτσι και για το PBS είναι σημαντικό να γνωρίζει κανείς το κατά πόσο διαπερατό είναι αυτό το υλικό από τα ρευστά είτε πρόκειται για αέρια είτε για υγρά, καθώς η διάχυση μορίων τόσο από το εξωτερικό περιβάλλον προς το εσωτερικό όσο και το ανάποδο επηρεάζει άμεσα τη διατήρηση ενός τρόφιμου ή ενός ποτού [28]. Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στη μεταφορά O_2 και CO_2 μέσω του υλικού καθώς η αλλαγή στα επίπεδα συγκέντρωσης αυτών των αερίων εντός της συσκευασίας επιφέρουν σημαντικά αποτελέσματα στον χρόνο ζωής των τροφίμων. Παράμετροι όπως το πάχος και το εμβαδόν του υλικού που χρησιμοποιείται για κάθε περίπτωση μπορεί να οδηγήσουν σε επιτάχυνση

της ενζυμικής αποικοδόμησης του τροφίμου όταν τα επίπεδα O_2 στον χώρο εντός της συσκευασίας είναι υψηλά και αντίστοιχα σε φθορά των ιστών όταν αυτά είναι πιο χαμηλά από τα επιθυμητά. Επιπλέον, ο χρόνος ζωής των τροφίμων μπορεί να επηρεαστεί σημαντικά και από την ανάπτυξη μικροοργανισμών εντός της συσκευασίας καθώς υπεύθυνο για τις αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι το CO_2 [19],[28].

Όπως φαίνεται από τα σχετικά βιβλιογραφικά δεδομένα (εικόνα 1.7), το PBS τοποθετείται ψηλά στη λίστα των πιθανών υλικών για χρήση ως υλικό συσκευασίας καθώς διαθέτει αρκετά καλές ιδιότητες φράγματος έναντι άλλων βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών, όπως για παράδειγμα το PLA, δίνοντας έτσι την ευκαιρία να εξεταστεί μια εναλλακτική λύση που θα μπορέσει να αντικαταστήσει τα ήδη υπάρχοντα πλαστικά [19].



Εικόνα 1.7 Ιδιότητες φράγματος αερίων O_2 και CO_2 για διάφορα πολυμερή [19].

1.2.3. Εφαρμογές του PBS

Λόγω όλων αυτών των ιδιοτήτων που προαναφέρθηκαν, το PBS διαθέτει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών, δίνοντας τη δυνατότητα αντικατάστασης συμβατικών πλαστικών όπως οι πολυολεφίνες, με τις οποίες διαθέτει παρόμοιες ιδιότητες [24]. Πιο συγκεκριμένα, μια κατηγορία που προαναφέρθηκε και στην οποία

βρίσκει εφαρμογή αυτός ο πολυεστέρας είναι τα υλικά συσκευασίας. Οι υποσχόμενες ιδιότητες φράγματος που παρουσιάζει μαζί με τη βιοαποικοδομησιμότητα και την ολκιμότητα, που τον κάνει να είναι εύκολα επεξεργάσιμος, τον καθιστούν έναν από τους πιο σημαντικούς αντικαταστάτες των παραδοσιακά χρησιμοποιούμενων πλαστικών σε εφαρμογές που σχετίζονται με τρόφιμα και ποτά [19].

Επιπλέον, πολλά είναι τα παραδείγματα των βιοϊατρικών εφαρμογών αυτού του πολυμερούς σε τομείς όπως η ορθοπεδική και η φαρμακευτική. Συγκεκριμένα, στον τομέα της ορθοπεδικής, το PBS έχει χρησιμοποιηθεί ως ικρίωμα σε περιπτώσεις όπου απαιτείται μηχανική οστικού ιστού για την επισκευή οστών. Ενδιαφέρουσες όμως προσπάθειες έχουν επιτευχθεί και σε περιπτώσεις όπου απαιτούνται συστήματα απελευθέρωσης φαρμάκων με το PBS να αποτελεί μήτρα εγκλεισμού της δραστικής ουσίας [26],[29].



Εικόνα 1.8 Διάφορες εφαρμογές του πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα) [26].

Άλλες εφαρμογές του PBS περιλαμβάνουν γεωργικά εξαρτήματα όπως μεμβράνες εδαφοκάλυψης, ηλεκτρονικά είδη εκμεταλλεόμενα τις θερμικές του ιδιότητες, κάψουλες καφέ καθώς και προϊόντα μιας χρήσης όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.8 [19],[26].

1.2.4. Εμπορικά διαθέσιμα PBS



Εκτός από την ακαδημαϊκή κοινότητα, το PBS έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον και της βιομηχανίας. Το PBS είναι πλέον και εμπορικά διαθέσιμο, σε διάφορες ποιότητες και διαφορετικές ονομασίες, με κυριότερη την ονομασία Bionolle™ [20]. Πιο συγκεκριμένα, το Bionolle™ είναι μια βιοαποικοδομήσιμη ρητίνη PBS που χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές όπως μπουκάλια, σακούλες σκουπιδιών, γάντια, δίχτυα, γλάστρες φυτών κ.α. [27]. Η ιαπωνική εταιρία Showa Denko K.K. ξεκίνησε τη μαζική παραγωγή αυτού του προϊόντος το 1993, λανσάροντας στο εμπόριο ένα πολυμερικό υλικό του οποίου τα διάφορα χαρακτηριστικά φαίνονται παρακάτω (πίνακας 1.1), όπως προκύπτουν από το φυλλάδιο δεδομένων ασφαλείας του [27],[30]. Το συγκεκριμένο προϊόν έχει την ικανότητα να βιοαποικοδομείται πλήρως όταν βρίσκεται στο κατάλληλο περιβάλλον όπως είναι το γλυκό και το θαλασσινό νερό καθώς και σε συνθήκες κομποστοποίησης [27].



Εικόνα 1.9 Λογότυπο Bionolle™ της εταιρίας Showa Denko K.K.

Αντίστοιχες προσπάθειες για την παραγωγή πλαστικών προϊόντων από PBS έχουν γίνει και από άλλες εταιρίες. Μια από αυτές προέρχεται από την εταιρία PTT MCC Biochem η οποία το 2017 δημιούργησε ένα νέο βιοαποικοδομήσιμο προϊόν προερχόμενο από bio-based ηλεκτρικό οξύ και προερχόμενη από ορυκτούς πόρους BDO. Το όνομα αυτού του προϊόντος είναι BioPBS™ και εισήχθη στην αγορά το 2017 ως απόγονος του GSPIa™, της εταιρείας Mitsubishi Chemical Corporation (MCC) το οποίο ήταν εμπορικά διαθέσιμο PBS εξ ολοκλήρου φτιαγμένο από πρώτες ύλες με βάση το πετρέλαιο [25]. Το νέο προϊόν είναι ικανό να βιοαποικοδομείται σε συνθήκες περιβάλλοντος με αποτέλεσμα να είναι πλήρως φιλικό προς το περιβάλλον καθώς ξεκινά και καταλήγει στη φύση. Στον πίνακα 1.1, γίνεται σύγκριση των ιδιοτήτων των δύο εμπορικά διαθέσιμων PBS.

Πίνακας 1.1 Σύγκριση ιδιοτήτων εμπορικά διαθέσιμων PBS [27],[31],[32].

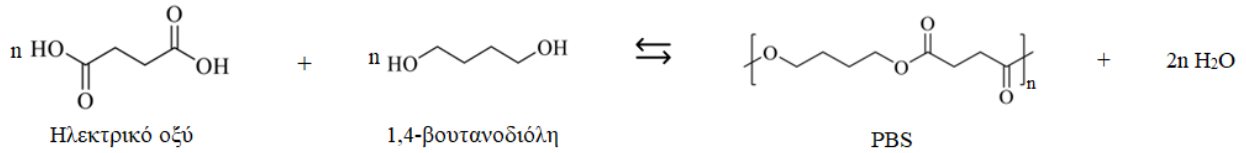
Ιδιότητες			
	#1000	FZ71 (PM/PB)	FD92 (PM/PB)
Προερχόμενο από ανανεώσιμες πρώτες ύλες	Όχι	Ναι	Ναι
Βιοαποικοδομήσιμο	Ναι	Ναι	Ναι
Πυκνότητα (g/cm ³)	1,26	1,26	1,24
T _m (°C)	114	115	84
T _g (°C)	-32	-22	-40
Αντοχή σε εφελκυσμό (MPa)	62	30	24
Επιμήκυνση πριν τη θραύση (%)	660	170	380

Από τα δεδομένα του πίνακα 1.1, είναι προφανές ότι οι ιδιότητες των διαφόρων εμπορικών PBS ενδέχεται να έχουν διακυμάνσεις καθώς το κάθε ένα προορίζεται για διαφορετικές εφαρμογές με διαφορετικές απαιτήσεις.

1.2.5. Χημική σύνθεση PBS

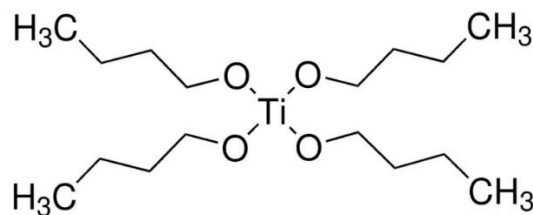
Το PBS, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι ένας πολυεστέρας που προκύπτει από την αντίδραση του ηλεκτρικού οξέος (SA) και της 1,4-βουτανοδιόλης (BDO) όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.10. Η αντίδραση αυτών των δύο μονομερών γίνεται μέσω σταδιακού πολυμερισμού καθώς πρόκειται για την αντίδραση ενός διοξέος με μία διόλη οδηγώντας σε γραμμικά μόρια. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, όλα τα μονομερή συμμετέχουν από την αρχή της αντίδρασης

δημιουργώντας διμερή και τριμερή τα οποία προοδευτικά μετατρέπονται σε ολιγομερή [3].



Εικόνα 1.10 Αντίδραση εστεροποίησης του ηλεκτρικού οξέος (διοξύ) με την 1,4-βουτανοδιόλη (διόλη) για τη σύνθεση του PBS.

Στη βιομηχανία, η αντίδραση σύνθεσης του PBS γίνεται κυρίως με χημικό τρόπο και χωρίζεται σε δύο διαδοχικά στάδια. Το πρώτο στάδιο λαμβάνει χώρα εντός αντιδραστήρα του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται περίπου στους 150-200°C σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα μονομερή που βρίσκονται εντός του αντιδραστήρα και αναδεύονται, λόγω της ύπαρξης μηχανικού αναδευτήρα, συμμετέχουν σε αντίδραση εστεροποίησης όπου σχηματίζονται ολιγομερή του PBS. Όταν πλέον το σύστημα φθάνει σε ισορροπία, για να αυξηθεί περαιτέρω το μοριακό βάρος του προϊόντος η θερμοκρασία του αντιδραστήρα αυξάνεται φθάνοντας τους 200-240°C, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις εφαρμόζεται και κενό (περίπου 0-1 bar) [23],[33]. Παράλληλα, οι βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής του PBS απαιτούν τη χρήση οργανομεταλλικών καταλυτών με σκοπό να επιταχυνθούν οι αντιδράσεις. Ανάμεσα στα διάφορα είδη καταλυτών που έχουν χρησιμοποιηθεί, υπάρχουν καταλύτες με βάση το τιτάνιο (Ti), το ζιρκόνιο (Zr), το γερμάνιο (Ge) και τον κασσίτερο (Sn) [33].



Εικόνα 1.11 Δομή καταλύτη Ti(BuO)₄ [34].

Ωστόσο, οι καταλύτες τιτανίου όπως είναι το βουτοξείδιο του τιτανίου ($Ti(BuO)_4$) (εικόνα 1.11) φαίνεται πως επιτυγχάνουν καλύτερη κατάλυση στο συγκεκριμένο σύστημα αντιδρώντων [33].

Συμπερασματικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί το PBS αποτελεί ένα βιοαποικοδομήσιμο πολυμερές το οποίο μπορεί να είναι και bio-based, αν τα μονομερή που χρησιμοποιούνται προέρχονται από ανανεώσιμες πρώτες ύλες. Ωστόσο, με βάση τα κριτήρια που πρέπει να πληροί ένα πολυμερές για να είναι «πράσινο» (ενότητα 1.1), γεννάται η αμφιβολία αν τελικά το PBS μπορεί πράγματι να χαρακτηριστεί «πράσινο» όταν παράγεται χημικά μέσω των διεργασιών που αναλύθηκαν παραπάνω.

1.3. Βιβλιογραφία

- [1] A.L. Andrady, M.A. Neal, Applications and societal benefits of plastics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 364 (2009) 1977–1984. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304>.
- [2] Statista Research Department, Global plastic production 1950-2021, (2023). Πρόσβαση: 14/12/2023
- [3] Σ. Βουγιούκα, ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ, ΕΜΠ, ΑΘΗΝΑ, 2021.
- [4] S. RameshKumar, P. Shaiju, K.E. O'Connor, R.B. P, Bio-based and biodegradable polymers - State-of-the-art, challenges and emerging trends, *Curr Opin Green Sustain Chem*. 21 (2020) 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.12.005>.
- [5] J.G. Rosenboom, R. Langer, G. Traverso, Bioplastics for a circular economy, *Nat Rev Mater*. 7 (2022) 117–137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>.
- [6] ΕΘΝΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΤΕΚΜΗΡΙΩΣΗΣ & ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ, Κυκλική Οικονομία: Ένα νέο οικονομικό μοντέλο βιώσιμης ανάπτυξης, Τεύχος 115. (2019). Πρόσβαση: 14/12/2023

- [7] A. Pellis, M. Malinconico, A. Guarneri, L. Gardossi, Renewable polymers and plastics: Performance beyond the green, *N Biotechnol.* 60 (2021) 146–158. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.10.003>.
- [8] Y. Jiang, K. Loos, Enzymatic synthesis of biobased polyesters and polyamides, *Polymers (Basel)*. 8 (2016). <https://doi.org/10.3390/polym8070243>.
- [9] C.I. Gkountela, S.N. Vouyiouka, Enzymatic Polymerization as a Green Approach to Synthesizing Bio-Based Polyesters, *Macromol.* 2 (2022) 30–57. <https://doi.org/10.3390/macromol2010003>.
- [10] H. Karan, C. Funk, M. Grabert, M. Oey, B. Hankamer, Green Bioplastics as Part of a Circular Bioeconomy, *Trends Plant Sci.* 24 (2019) 237–249. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.11.010>.
- [11] R.A. Gross, B. Kalra, Biodegradable Polymers for the Environment, *Science* (1979). 297 (2002) 803–807. <https://doi.org/10.1126/science.297.5582.803>.
- [12] Δ. Αχιλιάς, Γ. Παπαγεωργίου, ΧΗΜΕΙΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ , Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις , 2023.
- [13] J.H. Song, R.J. Murphy, R. Narayan, G.B.H. Davies, Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 364 (2009) 2127–2139. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0289>.
- [14] P.T. Anastas, J.C. Warner, ΠΡΑΣΙΝΗ ΧΗΜΕΙΑ, Θεωρία και πράξη, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ , 2007.
- [15] M.A. Dubé, S. Salehpour, Applying the Principles of Green Chemistry to Polymer Production Technology, *Macromol React Eng.* 8 (2014) 7–28. <https://doi.org/10.1002/mren.201300103>.
- [16] European Bioplastics, Bioplastics market development update 2023, (2023). Πρόσβαση: 14/12/2023
- [17] Fortune Business Insights, Bioplastics Market Size, Share & COVID-19 Impact Analysis, By Type (Biodegradable and Non-Biodegradable), By Application (Rigid Packaging, Flexible Packaging, Textiles, Automotive &

Transportation, Agriculture & Horticulture, Consumer Goods, and Others), and Regional Forecast, 2023-2030, (2023). Πρόσβαση 31/12/2023

- [18] J. Xu, P.H. Manepalli, L. Zhu, S. Narayan-Sarathy, S. Alavi, Morphological, barrier and mechanical properties of films from poly (butylene succinate) reinforced with nanocrystalline cellulose and chitin whiskers using melt extrusion, *Journal of Polymer Research*. (2019). <https://doi.org/10.1007/s10965-019-1783-8/Published>.
- [19] M.I. Peñas, R.A. Pérez-Camargo, R. Hernández, A.J. Müller, A Review on Current Strategies for the Modulation of Thermomechanical, Barrier, and Biodegradation Properties of Poly (Butylene Succinate) (PBS) and Its Random Copolymers, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14051025>.
- [20] A.F. Sousa, A.J.D. Silvestre, Plastics from renewable sources as green and sustainable alternatives, *Curr Opin Green Sustain Chem*. 33 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100557>.
- [21] M. Barletta, C. Aversa, M. Ayyoob, A. Gisario, K. Hamad, M. Mehrpouya, H. Vahabi, Polybutylene succinate - PBS Materials, processing, and industrial applications., *Prog Polym Sci*. 132 (2022).
- [22] Y. Zhu, J. Yang, F. Mei, X. Li, C. Zhao, Bio-based 1,4-butanediol and tetrahydrofuran synthesis: perspective, *Green Chemistry*. 24 (2022) 6450–6466. <https://doi.org/10.1039/d2gc02271k>.
- [23] L. Aliotta, M. Seggiani, A. Lazzeri, V. Gigante, P. Cinelli, A Brief Review of Poly (Butylene Succinate) (PBS) and Its Main Copolymers: Synthesis, Blends, Composites, Biodegradability, and Applications, *Polymers (Basel)*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/polym14040844>.
- [24] A. Douka, S. Vouyiouka, L.M. Papaspyridi, C.D. Papaspyrides, A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides, *Prog Polym Sci*. 79 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001>.

- [25] S. Kato, T. Ueda, T. Aoshima, N. Kosaka, S. Nitta, BioPBS™ (Polybutylene Succinate), in: 2023. https://doi.org/10.1007/12_2023_159.
- [26] S.A. Rafiqah, A. Khalina, A.S. Harmaen, I.A. Tawakkal, K. Zaman, M. Asim, M.N. Nurrazi, C.H. Lee, A review on properties and application of bio-based poly(Butylene succinate), *Polymers (Basel)*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/polym13091436>.
- [27] Showa Denko K.K., Bionolle data sheet, (2013). Πρόσβαση: 17/12/2023
- [28] V. Siracusa, N. Lotti, A. Munari, M. Dalla Rosa, Poly(butylene succinate) and poly(butylene succinate-co-adipate) for food packaging applications: Gas barrier properties after stressed treatments, *Polym Degrad Stab*. 119 (2015) 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2015.04.026>.
- [29] M. Gigli, M. Fabbri, N. Lotti, R. Gamberini, B. Rimini, A. Munari, Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review in memory of our beloved colleague and friend Dr. Lara Finelli., *Eur Polym J*. 75 (2016) 431–460. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.01.016>.
- [30] B. Rieger, A. Künkel, G.W. Coates, R. Reichardt, E. Dinjus, T.A. Zevaco, eds., *Synthetic Biodegradable Polymers*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27154-0>.
- [31] Μ. Μαθιουδάκη, Αξιοποίηση ενζυμικά παραγόμενων πολυμερών σε συστήματα εγκλεισμού δραστικών ουσιών, ΕΜΠ, 2022.
- [32] PTT MCC BIOCHEM COMPANY LIMITED, BioPBS brochure, (n.d.). Πρόσβαση: 17/12/2023
- [33] O. Platnieks, S. Gaidukovs, V.K. Thakur, A. Barkane, S. Beluns, Bio-based polybutylene succinate-Recent progress, challenges and, *European Polymer Journal*. 161 (2021).
- [34] Sigma-Aldrich, Titanium(IV) butoxide, (n.d.). Πρόσβαση: 20/12/2023

2.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η αντικατάσταση των συμβατικών διεργασιών παραγωγής πολυμερών όπως το παράδειγμα της χημικής σύνθεσης του PBS, κρίνεται πλέον απαραίτητη καθώς εντείνουν προβλήματα που αντιμετωπίζει ο πλανήτης και οδηγούν πολλές φορές στη δημιουργία πλαστικών προϊόντων τα οποία αφήνουν ένα τεράστιο αποτύπωμα άνθρακα στο περιβάλλον. Αξίζει μόνο να σημειωθεί ότι ένα πλαστικό μπουκάλι φτιαγμένο από πολυ(τερεφθαλικό αιθυλεστέρα) (PET) προερχόμενο μάλιστα από μη ανανεώσιμες πρώτες ύλες, απαιτεί περίπου 4 εκατομμύρια Joules σε ενέργεια [1]. Για αυτόν τον λόγο, κρίνεται αναγκαίο να αναπτυχθούν νέες, φιλικότερες προς το περιβάλλον διεργασίες που δεν θα επιβαρύνουν το περιβάλλον και παράλληλα θα οδηγούν σε πραγματικά «πράσινα» προϊόντα. Μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση είναι η βιοκατάλυση, δηλαδή η χρήση ενζύμων ως καταλύτες στις διάφορες διεργασίες. Αυτά τα βιομόρια μέχρι και πριν κάποια χρόνια χρησιμοποιούνταν μόνο σε υδατικά συστήματα, δημιουργώντας αμφιβολίες σχετικά με το αν θα μπορούν να είναι εξίσου αποδοτικά και σε οργανικά μιας και πολλά από τα αντιδρώντα μείγματα δεν έχουν την ικανότητα να διαλύονται στο νερό. Παρόλα αυτά, η χρήση τους σε μη συμβατικά συστήματα, δηλαδή απουσία νερού, γύρω στη δεκαετία του '80 είχε σημαντικά αποτελέσματα, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για νέες ιδέες στη σύνθεση μορίων [2].

Κατ' αυτό τον τρόπο, εισήχθη και ο όρος ενζυμικός πολυμερισμός, ο οποίος αναφέρεται στη διεργασία κατά την οποία πραγματοποιείται χημική σύνθεση πολυμερών *in vitro* μέσω μη βιοσυνθετικών μονοπατιών, αποφεύγοντας τη χρήση τοξικών καταλυτών αλλά χρησιμοποιώντας αντ' αυτού ως καταλύτη ένα ακινητοποιημένο ένζυμο [3]. Οι λόγοι για τους οποίους χρησιμοποιείται ο ενζυμικός πολυμερισμός είναι αρκετοί και ικανοί για να προσελκύσουν το ενδιαφέρον της ακαδημαϊκής κοινότητας αλλά και της βιομηχανίας. Συγκεκριμένα, μέσω του ενζυμικού πολυμερισμού επιτυγχάνεται η διεξαγωγή των διεργασιών σε ήπιες συνθήκες καθώς η παρουσία του ενζύμου απαιτεί χαμηλότερες θερμοκρασίες για την αποφυγή φαινομένων μετουσίωσης. Επίσης, αποφεύγεται η παραγωγή

ανεπιθύμητων παραπροϊόντων καθώς τα ένζυμα διαθέτουν υψηλή χημειο-, ε-ναντιο και τοποεκλεκτικότητα. Προκύπτουν έτσι προϊόντα υψηλής καθαρότητας από τα οποία δεν είναι απαραίτητο να γίνει η απομάκρυνση υπολειμμάτων του καταλύτη καθώς τα ένζυμα είναι πλήρως φιλικά και προς τον άνθρωπο αλλά και προς το περιβάλλον. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται ταυτόχρονα η χρήση χημικών καταλυτών οι οποίοι είναι συχνά επικίνδυνοι και τοξικοί [4],[5].

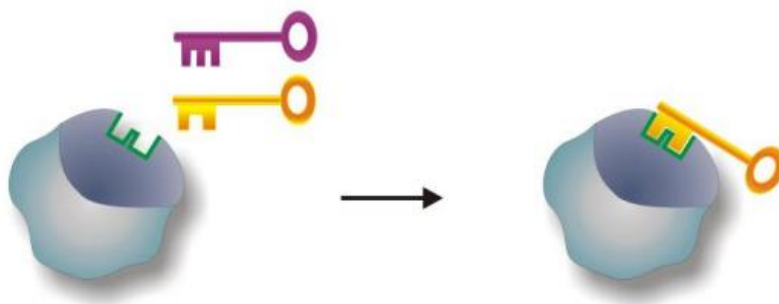
Όλα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τις αρχές της Πράσινης Χημείας αλλά και τις αρχές της Πράσινης Μηχανικής. Είναι πολύ σημαντικό τα υλικά που χρησιμοποιούνται να είναι εγγενώς ασφαλή, γεγονός που εξασφαλίζεται από τη χρήση των ενζύμων ως βιοκαταλύτες καθώς μειώνεται η επικινδυνότητα πλήρως [6],[7]. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο κίνδυνος είναι ίσος με το γινόμενο της επικινδυνότητας και της έκθεσης, φθάνοντας την επικινδυνότητα στο μηδέν, δίνεται το περιθώριο στην έκθεση να φτάσει στο άπειρο. Με λίγα λόγια, δεν υπάρχει κανένας περιορισμός στη χρήση των ενζύμων όσον αφορά τον κίνδυνο που μπορούν να προκαλέσουν. Επιπλέον, οι ήπιες συνθήκες λειτουργίας βοηθούν στην αύξηση της αποδοτικότητας καθώς μειώνεται η απαιτούμενη ενέργεια που χρειάζεται να καταναλωθεί αλλά εξοικονομείται και χώρος αφού δεν χρειάζονται πρόσθετα τμήματα οδηγώντας έτσι και σε μείωση του κόστους εξοπλισμού [7].

Παρόλο που τα ένζυμα είναι πολύ ισχυροί βιοκαταλύτες, δεν είναι όλα κατάλληλα για ενζυμικό πολυμερισμό. Στην επόμενη ενότητα λοιπόν, γίνεται μια πρώτη γνωριμία των ενζύμων και ειδικότερα αυτών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη σύνθεση πολυμερών.

2.2. Κατηγορίες ενζύμων (βιοκαταλυτών) που χρησιμοποιούνται στον ενζυμικό πολυμερισμό

Τα ένζυμα είναι μακρομόρια πρωτεϊνικής φύσεως κατά κύριο λόγο, των οποίων η λειτουργία είναι να δρουν καταλυτικά σε αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μέσα σε κύτταρα ζωντανών οργανισμών. Μια καταλυόμενη από ένζυμο αντίδραση έχει χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης από ό,τι αν γινόταν απουσία του ενζύμου με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται γρηγορότερα. Στη φύση

συναντώνται πάρα πολλά ένζυμα με το καθένα να δρα σε διαφορετικό υπόστρωμα. Το υπόστρωμα προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου προς σχηματισμό προϊόντων. Ο συνηθέστερος μηχανισμός με τον οποίο αλληλεπιδρά το ένζυμο με το υπόστρωμα είναι το μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς, όπως φαίνεται στην εικόνα 2.1, αποδεικνύοντας έτσι την εξειδίκευση που διαθέτουν τα ένζυμα στα διάφορα υποστρώματα [8].



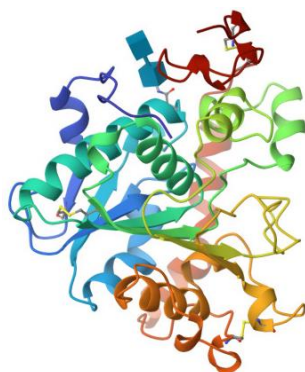
Εικόνα 2.1 Μοντέλο κλειδιού-κλειδαριάς όπου το κλειδί αντιπροσωπεύει το υπόστρωμα και η κλειδαριά το ένζυμο [9].

Όσον αφορά τον ενζυμικό πολυμερισμό, μια από τις πιο σημαντικές οικογένειες ενζύμων που συμμετέχουν σε τέτοιες αντιδράσεις είναι αυτή των υδρολασών. Τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν την ικανότητα να διασπούν δεσμούς παρουσία νερού. Ωστόσο, όταν βρίσκονται σε ένα μη συμβατικό σύστημα απουσία νερού, πραγματοποιούν την αντίδραση σύνθεσης, όπου σχηματίζονται οι δεσμοί μεταξύ των μονομερών οδηγώντας στη δημιουργία πολυμερών [10],[11].

2.2.1. Λιπάσες

Εμβαθύνοντας στην οικογένεια των υδρολασών, συναντώνται οι λιπάσες. Αυτή η κατηγορία υδρολασών, παρουσία νερού, καταλύει συνήθως τις αντιδράσεις υδρόλυσης των τριγλυκεριδίων προς λιπαρά οξέα και γλυκερόλη [11]. Εν ολίγοις, καταλύουν αντιδράσεις στις οποίες σπάνε εστερικοί δεσμοί των μορίων προς τον σχηματισμό των αρχικών ενώσεων. Απουσία νερού όμως, έχουν την ικανότητα να συνθέτουν δεσμούς και για αυτό χρησιμοποιούνται πολύ στον σχηματισμό πολυεστέρων [12]. Μάλιστα, οι περισσότερες προσπάθειες ενζυμικού πολυμερισμού που έχουν γίνει, περιλαμβάνουν μια ακινητοποιημένη λιπάση B

(εικόνα 2.2) προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB), γνωστή εμπορικά με την επωνυμία Novozym® 435 [5]. Το εμπορικό αυτό προϊόν στην ουσία αποτελεί έναν βιοκαταλύτη που έχει προκύψει από την ακινητοποίηση της CALB πάνω σε μια μακροπορώδη, ακρυλική, πολυμερική ρητίνη που αποτελεί τον φορέα ακινητοποίησης [13].



Εικόνα 2.2 Δομή της λιπάσης Β από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (PDB ID: 1TCA) [14].

Πιο συγκεκριμένα, η ακινητοποίηση γίνεται μέσω διεπιφανειακής ενεργοποίησης πάνω σε μια μήτρα σφαιρικού σχήματος με υψηλό πορώδες προερχόμενη από πολυ(μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (PMMA) διασυνδεδεμένο με διβινυλοβενζόλιο γνωστή με την εμπορική ονομασία Lewatit VP OC 1600. Ο βιοκαταλύτης αυτός έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλά συστήματα φέροντας πολύ σημαντικά αποτελέσματα τόσο στο κομμάτι της σύνθεσης πολυμερών όσο και στο κομμάτι της υποβάθμισης των πολυμερών, ως ένας τρόπος διαχείρισης των πλαστικών μετά το τέλος χρήσης τους. Ενδεικτικά αναφέρεται ένα παράδειγμα όπου το N435 χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση πολυεστέρων προερχόμενων από μια λακτόνη επιτυγχάνοντας προϊόντα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 50.000 g/mol [15].

2.2.2. Κουτινάσες

Εκτός από τις λιπάσες, στην οικογένεια των υδρολασών ανήκουν κι άλλες κατηγορίες ενζύμων όπως οι κουτινάσες. Προερχόμενα κυρίως από μύκητες, τα ένζυμα που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία έχουν ως στόχο στη φύση να

υδρολύουν κάποια υποστρώματα και κυρίως την κουτίνη που συναντάται ως κύριο συστατικό της επιδερμίδας των φυτών και αποτελείται από υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα με 16-18 άτομα άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, η υδρόλυση των πολυεστέρων, όπως είναι και η κουτίνη προς μικρότερα μόρια από τις κουτινάσες, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον καθώς μπορούν να αποτελέσουν πιθανούς αντικαταστάτες άλλων ενζύμων όπως είναι οι λιπάσες [16],[17]. Τα συγκεκριμένα ένζυμα έχουν την ικανότητα να λειτουργούν σε μη υδατικά συστήματα παίρνοντας μέρος σε αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης κατ' αντιστοιχία με τις λιπάσες. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο κοινό χαρακτηριστικό που διαθέτουν καθώς τόσο οι λιπάσες όσο και οι κουτινάσες μπορούν να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς σε λιπαρά υποστρώματα λόγω της υδροφοβικότητας της επιφάνειάς τους [18].

Ανάμεσα στις κουτινάσες που φαίνεται να έχουν μεγάλο ενδιαφέρον τόσο ως προς τη σύνθεση όσο και ως προς την υποβάθμιση πολυμερών, ξεχωρίζουν δύο. Η πρώτη προέρχεται από τον μικροοργανισμό *Humicola insolens*, ο οποίος είναι ένας αερόβιος, θερμόφιλος μύκητας που συναντάται κατά κύριο λόγο στο έδαφος ή στα κομπόστ μανιταριών [19].



Εικόνα 2.3 Δομή του ενζύμου HiC (PDB ID: 4OYY) [20].

Εστιάζοντας στις διεργασίες σύνθεσης πολυμερικών υλικών, η κουτινάση που προέρχεται από αυτόν τον μύκητα (*Humicola insolens* cutinase ή HiC) (εικόνα 2.3) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 2007 από τους Hunsen *et al.* [21] σε πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού και συγκεκριμένα για τον σχηματισμό

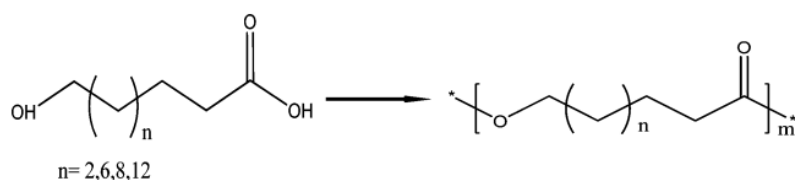
πολυεστέρων μέσω πολυσυμπύκνωσης. Όντας ακινητοποιημένη πάνω στον ίδιο φορέα που έχει ο εμπορικά διαθέσιμος βιοκαταλύτης N435, η κουτινάση αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε πολυμερισμούς μάζας όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μονομερή. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν δύο διερευνήσεις όπου στη μία χρησιμοποιήθηκε ένα διοξύ, το αδιπικό, με το μήκος της αλυσίδας της διόλης να αλλάζει (C4, C6 και C8) ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιλέχθηκε μια συγκεκριμένη διόλη (η 1,4-κυκλοεξανοδιμεθανόλη) με το μήκος του διοξέος να μεταβάλλεται από C4 έως C10. Ο χρόνος αντίδρασης των πειραμάτων ήταν 48 h, η αντίδραση πραγματοποιήθηκε υπό κενό (10 mmHg) και η συγκέντρωση του καταλύτη ήταν 1% w/w. Επιπλέον κάθε συνδυασμός διοξέος με διόλη πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος θερμοκρασιών (50-90°C) για να μελετηθεί ταυτόχρονα και η επίδραση της θερμοκρασίας στην αύξηση του μοριακού βάρους των τελικών προϊόντων [21].

Αυτό που τελικά βρέθηκε ήταν πως τα υψηλότερα μοριακά βάρη επιτεύχθηκαν στους 70°C, ενώ ταυτόχρονα φάνηκε πως όσο αυξανόταν η αλυσίδα ενός από τα δύο μονομερή, τόσο αυξανόταν και το μοριακό βάρος. Μάλιστα, η μεγαλύτερη τιμή μοριακών βαρών σημειώθηκε στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκαν ως μονομερή η 1,4-κυκλοεξανοδιμεθανόλη και το σεβακικό οξύ, δηλαδή τα μεγαλύτερα σε αριθμό ατόμων άνθρακα μονομερή, οδηγώντας σε πολυεστέρα με MB ίσο με 19.000 Da [21].

Με βάση αυτά τα δεδομένα, συνεχίστηκε η μελέτη σε αντιδράσεις πολυμερισμού με άνοιγμα δακτυλίου με ή χωρίς διαλύτη. Σε αυτή την περίπτωση οι αντιδράσεις διήρκησαν 24 h σε ατμοσφαιρική πίεση στους 70°C, με τον βιοκαταλύτη να βρίσκεται σε συγκέντρωση ίση με 0,1% w/w. Το αποτέλεσμα αυτής της μελέτης ήταν η παραγωγή ενός πολυμερούς με MB ίσο με 44.600 Da όταν στο σύστημα υπήρχε ως διαλύτης το τολουόλιο [21].

Σε συνέχεια αυτών των αποτελεσμάτων, η ίδια ερευνητική ομάδα χρησιμοποίησε αργότερα την ίδια κουτινάση, ακινητοποιημένη ωστόσο σε διαφορετικό φορέα [22]. Συγκεκριμένα αντί για τα σφαιρίδια Lewatit VP OC 1600, χρησιμοποιήθηκε μια ρητίνη προερχόμενη από σφαιρίδια τα οποία αποτελούνταν από εποξειδικά ενεργοποιημένο μακροπορώδη PMMA, γνωστά με την εμπορική ονομασία Amberzyme™ oxirane resin (AO-HiC) [22],[23].

Η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε 3 σειρές πειραμάτων με τον συγκεκριμένο βιοκαταλύτη, στους 70°C λόγω της βέλτιστης δράσης του ενζύμου σε αυτή τη θερμοκρασία. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα και με τον βιοκαταλύτη N435 στην ίδια θερμοκρασία έτσι ώστε να γίνει η σύγκριση της επίδρασης του κάθε βιοκαταλύτη. Η πρώτη σειρά πειραμάτων περιλάμβανε αντιδράσεις ομοπολυμερισμού μεταξύ ω -υδροξυαλκανοϊκών οξέων (ω -Hydroxyalkanoic acids ή ω -HAs) (εικόνα 2.4) παρουσία διαλύτη διφαινυλεθέρα, όπου οι βιοκαταλύτες βρίσκονταν σε συγκέντρωση 1% w/w σε σχέση με τα μονομερή. Μετά τις 2 h, εφαρμοζόταν κενό (10 mmHg) και το σύστημα παρέμενε στον αντιδραστήρα για 8 h [22].

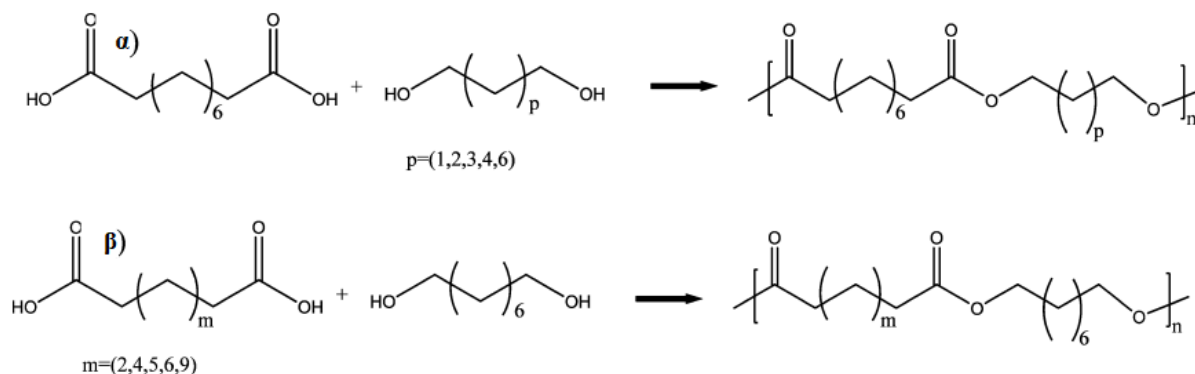


Εικόνα 2.4 Αντιδράσεις ομοπολυμερισμού διαφόρων ω -HA, καταλυόμενες από AO-HiC και N435 [22].

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέγιστο MB παρατηρήθηκε στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως μονομερές το C16- ω HA καθώς μετά από 8 h κατάλυσης με AO-HiC και N435, παρήχθησαν πολυμερή με μέσου-αριθμού μοριακό βάρος \overline{M}_n ίσο με 40.400 g/mol και 25.500 g/mol αντίστοιχα [22].

Οι επόμενες σειρές πειραμάτων περιλάμβαναν αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης μεταξύ διαφόρων διοξέων με διόλες με διάφορα μήκη αλυσίδων όπου στη μία περίπτωση παρέμενε σταθερό το διοξύ (χρησιμοποιήθηκε το σεβακικό οξύ) και άλλαζε η διόλη ενώ στη δεύτερη παρέμενε σταθερή η διόλη (χρησιμοποιήθηκε η 1,8-οκτανοδιόλη) και άλλαζε το μήκος της αλυσίδας του διοξέος (εικόνα 2.4). Οι συνθήκες των πειραμάτων παρέμειναν σχεδόν ίδιες με αυτές των πειραμάτων ομοπολυμερισμού με τη διαφορά ότι σε αυτή τη διερεύνηση εφαρμόστηκε μετά από 2 h κενό ίσο με 20 mmHg. Το καλύτερο αποτέλεσμα βρέθηκε στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκαν ως μονομερή το βρασυλικό οξύ (C₁₃H₂₄O₄) και

η 1,8-οκτανοδιόλη καθώς προέκυψαν πολυμερή από την κατάλυση με AO-HiC και N435 με \overline{M}_n ίσο με 11.000 g/mol και 9.600 g/mol αντίστοιχα [22].



Εικόνα 2.5 Αντιδράσεις πολυσυμπύκνωσης προς τον σχηματισμό πολυεστέρων καταλυόμενες από AO-HiC και N435 α) αντίδραση σεβακικού οξέος με διόλες διαφορετικών μηκών αλυσίδας, β) αντίδραση 1,8-οκτανοδιόλης με διοξέα διαφορετικών μηκών αλυσίδας [22].

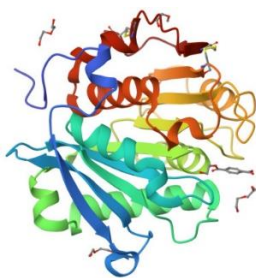
Συνοψίζοντας αυτές τις δύο μελέτες, διαπιστώνεται ότι η δραστηριότητα του ενζύμου HiC σε αντιδράσεις σύνθεσης πολυμερών αυξάνεται όταν αυξάνεται και το μήκος της αλυσίδας των μονομερών οδηγώντας σε πολυμερή με υψηλά MB.

Το δεύτερο ένζυμο από την οικογένεια των κουτινασών το οποίο φαίνεται να έχει μεγάλο ενδιαφέρον βιοτεχνολογικά ονομάζεται Leaf-branch compost cutinase (LCC) και απομονώθηκε για πρώτη φορά από κομπόστ φύλλων και κλαδιών. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας που είχε το κομπόστ από το οποίο απομονώθηκε, προκύπτει το συμπέρασμα ότι μάλλον πρόκειται για μια θερμόφιλη βακτηριδιακή κουτινάση και όχι μυκητιακή, όπως η πλειοψηφία αυτών των ενζύμων, λόγω της ομοιότητας στην αλληλουχία των αμινοξέων με άλλες αντίστοιχες κουτινάσες προερχόμενες από βακτήρια [24]. Το χαρακτηριστικό αυτό ήταν που προσέελκυσε το ενδιαφέρον της ακαδημαϊκής κοινότητας στο κομμάτι της ενζυμικής αποικοδόμησης των πλαστικών ως ένας νέος τρόπος διαχείρισης των υλικών αυτών μετά το τέλος της ζωής τους.

Σχεδόν όλες οι έρευνες που έχουν γίνει για αυτό το ένζυμο περιλαμβάνουν τη μελέτη της δράσης του σε διεργασίες αποικοδόμησης του πολυ(τερεφθαλικού

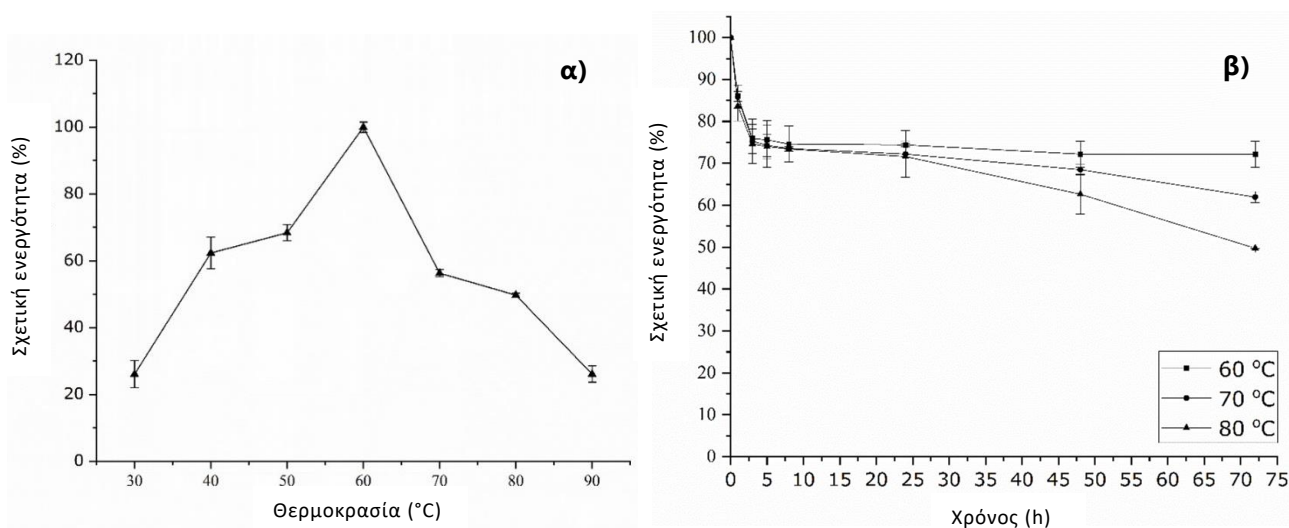
αιθυλεστέρα) (PET), τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο πολυεστέρα για την παραγωγή πλαστικών μπουκαλιών. Μια από τις πρώτες προσπάθειες που έγιναν για ενζυμική αποικοδόμηση του PET μέσω του ενζύμου LCC πραγματοποιήθηκε το 2012 από τους Sulaiman *et al.* [25]. Αρχικά, η ομάδα αυτή μελέτησε την ενεργότητα του ενζύμου πάνω σε διαφορετικά εστερικά υποστρώματα διερευνώντας ταυτόχρονα τη θερμοκρασία και το pH. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας έδειξαν ότι η LCC παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα σε υποστρώματα τα οποία έχουν μικρή αλυσίδα, δηλαδή περίπου 4 άτομα άνθρακα, στους 50°C και σε pH=8. Με αυτά τα δεδομένα, η ομάδα προχώρησε τη μελέτη της υδρόλυσης του PET, καταφέροντας να αποικοδομήσει κομμάτια πλαστικής σακούλας κατασκευασμένη από αυτόν τον πολυεστέρα. Τα κομμάτια αυτά είχαν μάζα περίπου 20-25 mg και μετά από επώαση 24 h στους 50°C σε pH=8, η LCC μπόρεσε να μειώσει τη μάζα τους κατά περίπου 1,5mg αποδεικνύοντας την υδρολυτική της ικανότητα απέναντι σε συνθετικά πολυμερή. Μάλιστα, μετά από ανάλυση των προϊόντων της αποικοδόμησης του PET μέσω χρωματογραφικής τεχνικής, φάνηκε πως η LCC μπορεί να αποικοδομήσει πλήρως τον πολυεστέρα αυτόν οδηγώντας στα αρχικά μονομερή του [25].

Το 2020 οι Tournier *et al.* [26] μελέτησαν τη διεργασία αποικοδόμησης του PET σε υψηλότερη θερμοκρασία. Πηγαίνοντας στους 65°C, πιο κοντά δηλαδή στο T_g του PET φάνηκε ότι η LCC έχανε τη σταθερότητά της με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται ένα μικρό ποσοστό αποικοδόμησης. Έτσι λοιπόν, ξεκίνησαν να μελετούν κάποιες μεταλλάξεις του ενζύμου αυτού προσπαθώντας να βελτιώσουν τη θερμοκρασιακή του σταθερότητα καταλήγοντας στη μετάλλαξη LCC^{ICCG} η οποία στους 72°C κατάφερε να φτάσει σε ποσοστό αποικοδόμησης ίσο με 90% μετά από 9,3 h (συγκέντρωση ενζύμου 3 mg ανά γραμμάριο PET) [26].



Εικόνα 2.6 Δομή του μεταλλαγμένου ενζύμου LCC^{ICCG} (PDB ID: 7VVE) [27].

Τα αποτελέσματα αυτά έδωσαν την αφορμή για ακόμα περισσότερη έρευνα σχετικά με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη της LCC. Μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Makryniotis *et al.* [28], έδειξε ότι η LCC^{ICCG} είναι ένα ένζυμο με σημαντικά χαρακτηριστικά. Για την ακρίβεια, πρόκειται για μια κουτινάση με μέγιστη καταλυτική δράση στους 60°C (εικόνα 2.7) ικανή να αποικοδομεί πολυμερικά υλικά ακόμα και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες [28].



Εικόνα 2.7 α) Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα της LCC^{ICCG}, β) Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου LCC^{ICCG} [28].

Επιπροσθέτως, έχει την ικανότητα να παραμένει θερμικά σταθερή, δηλαδή να χάνει λιγότερο από το 20% της ενεργότητάς της, ακόμα και μετά από παραμονή 3 ημερών στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της όπως φαίνεται στην εικόνα 2.7 [28].

Παρόλο που η χρήση της LCC στο κομμάτι της υποβάθμισης των πολυμερών έχει μελετηθεί σε σημαντικό βαθμό, ακόμα δεν συναντάται στη βιβλιογραφία καμία προσπάθεια χρήσης της σε πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού αντίστοιχα με εκείνα του N435 και της HiC.

2.3. Ακίνητοποίηση ενζύμων

Σε όλες τις περιπτώσεις ενζυμικού πολυμερισμού που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 2.2 χρησιμοποιήθηκε ένζυμο ακίνητοποιημένο πάνω σε κάποιον φορέα. Για τον λόγο αυτό είναι σημαντικό να δοθεί έμφαση στην ακίνητοποίηση των ενζύμων. Σύμφωνα με τους Almeida *et al.* [29], η ακίνητοποίηση είναι η διαδικασία κατά την οποία το ένζυμο περιορίζεται μερικώς ή πλήρως σε μια συγκεκριμένη περιοχή, δημιουργώντας έναν στερεό βιοκαταλύτη, αδιάλυτο στο νερό. Με την ακίνητοποίηση λοιπόν επιτυγχάνεται:

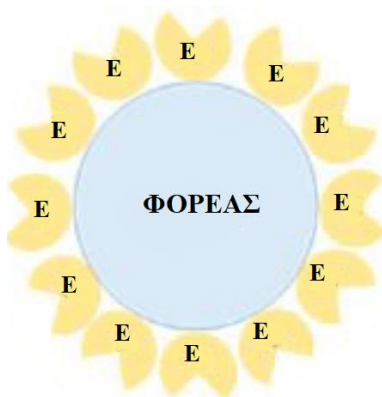
- ❖ Αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου ως προς τη θερμοκρασία και το pH.
- ❖ Μείωση του κόστους καθώς το ένζυμο μπορεί να ανακτηθεί στο τέλος της αντίδρασης και να επαναχρησιμοποιηθεί.
- ❖ Παραλαβή προϊόντων απαλλαγμένα από ένζυμο λόγω διαφορετικών φάσεων οδηγώντας σε προϊόντα υψηλής καθαρότητας.
- ❖ Εύκολος έλεγχος της αντίδρασης, καθώς μπορεί να διακοπεί οποιαδήποτε στιγμή αφαιρώντας τον βιοκαταλύτη [29],[30].

Από την άλλη πλευρά, στα μειονεκτήματα της ακίνητοποίησης συμπεριλαμβάνεται το γεγονός ότι ορισμένα ένζυμα μπορεί να γίνουν πιο ασταθή ή να απενεργοποιηθούν εντελώς χάνοντας την καταλυτική τους δράση. Παράλληλα, το υψηλό κόστος που απαιτείται για τις διαδικασίες παραγωγής, απομόνωσης και ανάκτησης των ενζύμων, έχει οδηγήσει σε περιορισμένη χρήση των βιοκαταλυτών στη βιομηχανία.

Η ακίνητοποίηση λοιπόν όπως προαναφέρθηκε γίνεται πάντα με τη χρήση κάποιου φορέα έτσι ώστε να μπορέσει να προκύψει ο τελικός βιοκαταλύτης σε στερεή μορφή. Τα είδη των φορέων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία της ακίνητοποίησης είναι πολλά. Ενδεικτικά αναφέρονται φορείς όπως ανόργανα υλικά, κεραμικά υλικά, σίλικά, μαγνητικά υλικά, ορυκτά, νανοσωματίδια, αλλά και οργανικοί φορείς οι οποίοι περιλαμβάνουν διάφορα μακρομόρια φυσικά ή συνθετικά. Τέτοια μακρομόρια μπορεί να είναι το κολλαγόνο, η κυτταρίνη, το άμυλο, η αγαρόζη αλλά και διάφορα πλαστικά [31].

Αφού επιλεγθεί ο κατάλληλος φορέας για την ακίνητοποίηση, σειρά έχει η επιλογή του μηχανισμού μέσω του οποίου θα προκύψει το τελικό ακίνητοποιημένο

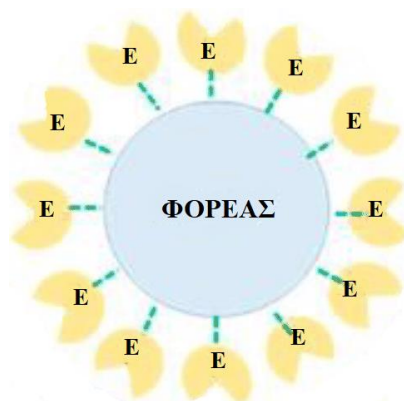
ένζυμο. Ένας από τους πιο βασικούς μηχανισμούς ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι αυτός της φυσικής προσρόφησης. Όπως και στην περίπτωση του N435, το ένζυμο προσροφάται στην εξωτερική επιφάνεια του φορέα (εικόνα 2.8) μέσω δεσμών όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου και οι δυνάμεις Van der Waals [32].



Εικόνα 2.8 Ακινητοποίηση ενζύμου πάνω σε φορέα μέσω φυσικής προσρόφησης [33].

Σαν μέθοδος η φυσική προσρόφηση έχει κάποια θετικά χαρακτηριστικά αλλά και κάποια αρνητικά. Στα θετικά συγκαταλέγεται το γεγονός πως πρόκειται για την πιο απλή μέθοδο ακινητοποίησης και ταυτόχρονα την πιο οικονομική καθώς δεν χρειάζεται χρήση κάποιου αντιδραστηρίου. Ωστόσο, το γεγονός ότι η σύνδεση του ενζύμου με τον φορέα γίνεται μέσω δυνάμεων Van der Waals οδηγεί πολλές φορές σε εκρόφηση του ενζύμου λόγω ασθενούς σύνδεσης και εν ολίγοις σε ασταθή βιοκαταλύτη [32],[33].

Μια άλλη πολύ συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι αυτή της ομοιοπολικής πρόσδεσης του ενζύμου πάνω στον εκάστοτε φορέα όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 2.9. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό, πραγματοποιείται η δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ του φορέα και κάποιων χημικών ομάδων που φέρουν οι διάφορες πλευρικές ομάδες των ενζύμων, όπως είναι οι καρβοξυλομάδες, οι αμινομάδες, οι φαινολικοί δακτύλιοι και τα ιμιδαζολικά άζωτα [31].



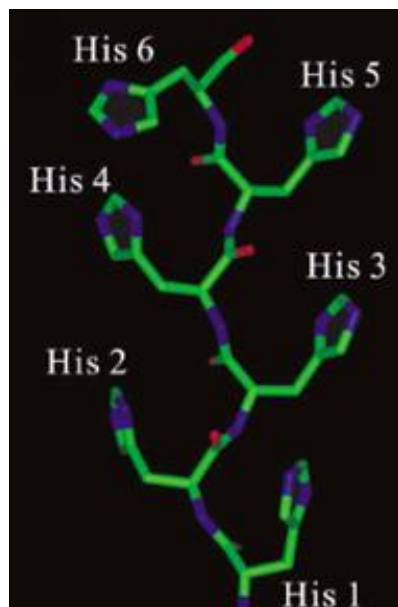
Εικόνα 2.9 Ακίνητοποίηση ενζύμου πάνω σε φορέα μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης [33].

Στα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου συγκαταλέγεται η ισχυρή πρόσδεση πάνω στον φορέα εξαιτίας της δημιουργίας των ομοιοπολικών δεσμών αποφεύγοντας έτσι την πιθανή εκρόφηση του ενζύμου. Επιπλέον, παρέχεται μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα στον βιοκαταλύτη από αυτή που έχει το ελεύθερο ένζυμο. Παρ' όλα αυτά, η δημιουργία αυτών των δεσμών πολλές φορές οδηγεί σε περιορισμένη κίνηση του ενζύμου ή ακόμα χειρότερα σε διαμορφώσεις στις οποίες το ενεργό κέντρο δεν είναι ελεύθερο να αλληλεπιδράσει με το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να μειώνεται η ενεργότητα του ενζύμου [33].

Μια άλλη, πιο εξειδικευμένη μέθοδος ακίνητοποίησης είναι η δημιουργία δεσμών μεταξύ των ιμιδαζολίων που περιέχονται στις πλευρικές ομάδες του αμινοξέος ιστοιδίνης (His) με μέταλλα που βρίσκονται στην επιφάνεια κάποιου φορέα προς τον σχηματισμό συμπλόκων. Πιο αναλυτικά, είναι πολύ συχνό φαινόμενο το να πραγματοποιείται έκφραση κάποιων ενζύμων τα οποία έχουν σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε στο γονίδιο έκφρασης να υπάρχει και η πληροφορία η οποία να οδηγεί στον σχηματισμό μιας ουράς πολύ-ιστιδινών στο τέλος της αμινοξικής αλληλουχίας (His-tag). Το μήκος αυτής της ουράς μπορεί να ποικίλει από 2 έως 6 αμινοξέα ιστοιδίνης, με τη συνηθέστερη να είναι η His-tag6 (εικόνα 2.10) [34].

Αυτή η ουρά λοιπόν έχει την ικανότητα σχηματισμού δεσμών με μέταλλα προς τον σχηματισμό συμπλόκων οδηγώντας έτσι στην ακίνητοποίηση του ενζύμου πάνω στον φορέα. Ο δεσμός αυτός, δημιουργείται από την αντίδραση του ηλεκτρονιόφιλου μεταλλικού ιόντος που βρίσκεται στην επιφάνεια του φορέα και

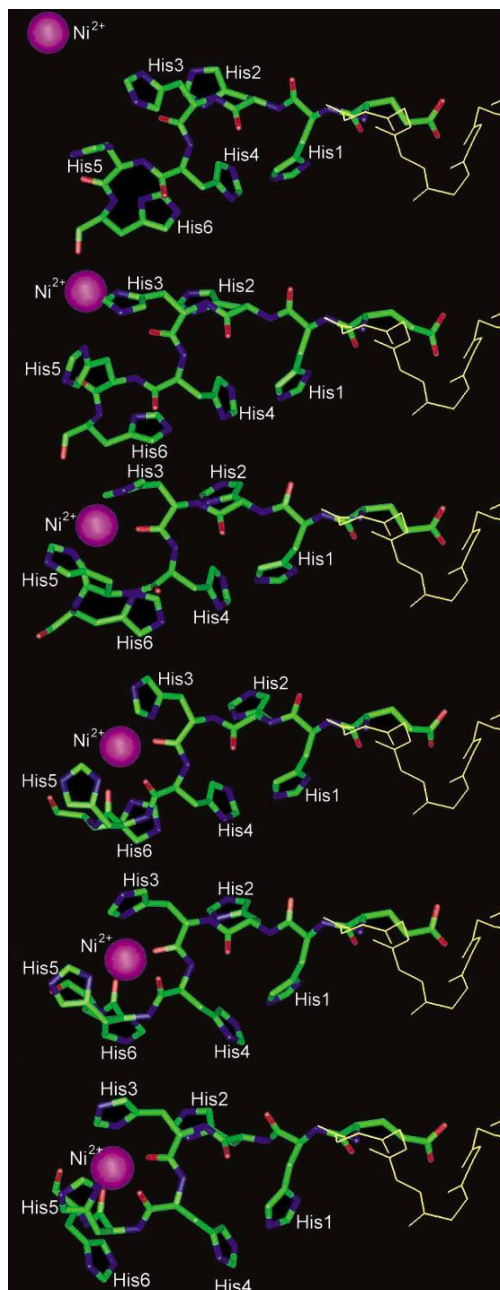
αποτελεί τον δέκτη ηλεκτρονίων, με το πυρηνόφιλο άζωτο του ιμιδαζολίου της ιστιδίνης που αποτελεί τον δότη ηλεκτρονίων.



Εικόνα 2.10 Σχηματική αναπαράσταση της ουράς ιστιδινών η οποία αποτελείται από 6 ιστιδίνες [34].

Τα ιόντα μετάλλων που συνήθως χρησιμοποιούνται, ανήκουν στα στοιχεία μετάπτωσης όπως είναι ο Cu^{2+} , ο Zn^{2+} , το Ni^{2+} , το Co^{2+} και ο Fe^{3+} . Στην εικόνα 2.11 παρουσιάζεται το αποτέλεσμα από μια μελέτη προσομοίωσης της σύνδεσης της His-tag με ιόν Ni^{2+} οδηγώντας στον σχηματισμό συμπλόκου [34].

Εκτός από αυτές όμως τις μεθόδους, υπάρχουν ακόμα δύο οι οποίες είναι η διασταυρούμενη πρόσδεση και ο εγκλωβισμός σε μήτρα. Στην πρώτη περίπτωση, δημιουργούνται ομοιοπολικοί δεσμοί μεταξύ διαφορετικών ομάδων των ενζύμων χρησιμοποιώντας κάποια πολυδραστικά αντιδραστήρια τα οποία όμως μπορεί να οδηγήσουν σε μετουσίωση του ενζύμου. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται ακινητοποίηση του ενζύμου παγιδεύοντάς το σε μια υδατοδιαλυτή πολυμερική μήτρα, προστατεύοντάς το έτσι από το εξωτερικό περιβάλλον. Ωστόσο, υπάρχει πιθανότητα να διαχυθούν ένζυμα μικρού MB από το εσωτερικό της μήτρας μέσω των πόρων της [33].



Εικόνα 2.11 Σχηματική αναπαράσταση του δεσμού μεταξύ της His-tag και του ιόντος Ni^{2+} όπου φαίνονται τα διαδοχικά στάδια δημιουργίας αυτού του δεσμού [34].

2.4. Βιβλιογραφία

- [1] LAViT, Million Plastic Bottles Per Minute – Scary Plastic Statistics, (2019).
Πρόσβαση: 01/01/2024
- [2] V. Stepankova, J. Damborsky, R. Chaloupkova, Industrial biocatalysis, 2014.

- [3] S. Kobayashi, A. Makino, Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry, *Chem Rev* 109 (2009) 5288–5353. <https://doi.org/10.1021/cr900165z>.
- [4] A. Douka, S. Vouyiouka, L.M. Papaspyridi, C.D. Papaspyrides, A review on enzymatic polymerization to produce polycondensation polymers: The case of aliphatic polyesters, polyamides and polyesteramides, *Prog Polym Sci* 79 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.10.001>.
- [5] V. Hevilla, A. Sonseca, C. Echeverría, A. Muñoz-Bonilla, M. Fernández-García, Enzymatic Synthesis of Polyesters and Their Bioapplications: Recent Advances and Perspectives, *Macromol Biosci* 21 (2021). <https://doi.org/10.1002/mabi.202100156>.
- [6] Α. Ζουμπούλης, Ε. Πελέκα, Κ. Τριανταφυλλίδης, Πράσινη Χημεία και Τεχνολογία στη Βιώσιμη Ανάπτυξη, ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ, 2015.
- [7] P.T. Anastas, J.B. Zimmerman, Chapter 2 The twelve principles of green engineering as a foundation for sustainability, in: *Sustainability Science and Engineering*, 2006: pp. 11–32. [https://doi.org/10.1016/S1871-2711\(06\)80009-7](https://doi.org/10.1016/S1871-2711(06)80009-7).
- [8] Μ. Shuler, F. Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ε.Μ.Π., ΑΘΗΝΑ, 2005.
- [9] Z. Prokop, A. Gora, J. Brezovsky, R. Chaloupkova, Engineering of protein tunnels: Keyhole-lock-key model for catalysis by the enzymes with active sites, 2012. <https://www.researchgate.net/publication/294848183>.
- [10] R.A. Gross, M. Ganesh, W. Lu, Enzyme-catalysis breathes new life into polyester condensation polymerizations, *Trends Biotechnol* 28 (2010) 435–443. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.05.004>.
- [11] Βιομηχανική Βιοτεχνολογία, 8ο εξάμηνο Σπουδών, Εργαστηριακές Ασκήσεις, ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2019.

- [12] R.A. Gross, B. Kalra, A. Kumar, Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis, *Appl Microbiol Biotechnol* 55 (2001) 655–660. <https://doi.org/10.1007/s002530100617>.
- [13] Z. Cabrera, G. Fernandez-Lorente, R. Fernandez-Lafuente, J.M. Palomo, J.M. Guisan, Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification, *Process Biochemistry* 44 (2009) 226–231. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.10.005>.
- [14] RCSB PDB, 1TCA: THE SEQUENCE, CRYSTAL STRUCTURE DETERMINATION AND REFINEMENT OF TWO CRYSTAL FORMS OF LIPASE B FROM CANDIDA ANTARCTICA, (n.d.). Πρόσβαση: 23/12/2023
- [15] C. Ortiz, M.L. Ferreira, O. Barbosa, J.C.S. Dos Santos, R.C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L.E. Briand, R. Fernandez-Lafuente, Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst?, *Catal Sci Technol* 9 (2019) 2380–2420. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>.
- [16] S. Chen, L. Su, J. Chen, J. Wu, Cutinase: Characteristics, preparation, and application, *Biotechnol Adv* 31 (2013) 1754–1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005>.
- [17] C.T. de Oliveira, M.A. de Assis, M.A. Mazutti, G.A.G. Pereira, D. de Oliveira, Production of recombinant cutinases and their potential applications in polymer hydrolysis: The current status, *Process Biochemistry* 134 (2023) 30–46. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.10.020>.
- [18] V. Ferrario, A. Pellis, M. Cespuigli, G.M. Guebitz, L. Gardossi, Nature inspired solutions for polymers: Will cutinase enzymes make polyesters and polyamides greener?, *Catalysts* 6 (2016). <https://doi.org/10.3390/catal6120205>.
- [19] L.P. Meleiro, A.L.R.L. Zimbardi, F.H.M. Souza, D.C. Masui, T.M. Silva, J.A. Jorge, R.P.M. Furriel, A novel β -glucosidase from *Humicola insolens* with high potential for untreated waste paper conversion to sugars, *Appl Biochem Biotechnol* 173 (2014) 391–408. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0847-9>.
- [20] RCSB PDB, 4OYY: *Humicola insolens* cutinase, (n.d.). Πρόσβαση: 23/12/2023

- [21] M. Hunsen, A. Azim, H. Mang, S.R. Wallner, A. Ronkvist, X. Wenchun, R.A. Gross, A cutinase with polyester synthesis activity, *Macromolecules* 40 (2007) 148–150. <https://doi.org/10.1021/ma062095g>.
- [22] D. Feder, R.A. Gross, Exploring chain length selectivity in HIC-catalyzed polycondensation reactions, *Biomacromolecules* 11 (2010) 690–697. <https://doi.org/10.1021/bm901272r>.
- [23] B. Chen, J. Hu, E.M. Miller, W. Xie, M. Cai, R.A. Gross, Candida antarctica Lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis, *Biomacromolecules* 9 (2008) 463–471. <https://doi.org/10.1021/bm700949x>.
- [24] S. Sulaiman, D.J. You, E. Kanaya, Y. Koga, S. Kanaya, Crystal structure and thermodynamic and kinetic stability of metagenome-derived LC-cutinase, *Biochemistry* 53 (2014) 1858–1869. <https://doi.org/10.1021/bi401561p>.
- [25] S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J.J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach, *Appl Environ Microbiol* 78 (2012) 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>.
- [26] V. Tournier, C.M. Topham, A. Gilles, B. David, C. Folgoas, E. Moya-Leclair, E. Kamionka, M.L. Desrousseaux, H. Texier, S. Gavalda, M. Cot, E. Guémard, M. Dalibey, J. Nomme, G. Cioci, S. Barbe, M. Chateau, I. André, S. Duquesne, A. Marty, An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles, *Nature* 580 (2020) 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- [27] RSCB PDB, 7VVE: Complex structure of a leaf-branch compost cutinase variant in complex with mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid, (n.d.). Πρόσβαση: 23/12/2023
- [28] K. Makryniotis, E. Nikolaivits, C. Gkountela, S. Vouyiouka, E. Topakas, Discovery of a polyesterase from *Deinococcus maricopensis* and comparison to the benchmark LCCICCG suggests high potential for semi-crystalline

- post-consumer PET degradation, *J Hazard Mater* 455 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131574>.
- [29] F.L.C. Almeida, A.S. Prata, M.B.S. Forte, Enzyme immobilization: what have we learned in the past five years?, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 16 (2022) 587–608. <https://doi.org/10.1002/bbb.2313>.
- [30] Ι. Κλώνης, *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, 4th ed., ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, 2020.
- [31] S. M., P. O., P. N., P. N., B. A. M., P. R., The Enzyme Immobilization: Carriers and Immobilization methods, *JOURNAL OF ENGINEERING & PROCESSING MANAGEMENT* 11 (2020). <https://doi.org/10.7251/jepm1902089s>.
- [32] P. Saunders, J. Brask, Improved Immobilization Supports for Candida Antarctica Lipase B, in: *Biocatalysis in Polymer Chemistry*, Wiley, 2010: pp. 65–82. <https://doi.org/10.1002/9783527632534.ch3>.
- [33] X. Lyu, R. Gonzalez, A. Horton, T. Li, Immobilization of enzymes by polymeric materials, *Catalysts* 11 (2021). <https://doi.org/10.3390/catal11101211>.
- [34] H.L. Liu, Y. Ho, C.M. Hsu, Molecular simulations to determine the chelating mechanisms of various metal ions to the his-tag motif: A preliminary study, *J Biomol Struct Dyn* 21 (2003) 31–41. <https://doi.org/10.1080/07391102.2003.10506903>.

3.1. Ενζυμικός πολυμερισμός για τη σύνθεση του PBS

Τα τελευταία χρόνια, συνεχώς γίνονται προσπάθειες ποσοτικοποίησης των επιπτώσεων που φέρουν οι διεργασίες που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο από τη βιομηχανία, αφήνοντας μεγάλο αποτύπωμα άνθρακα στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα, ποσοτικά δεδομένα που προέκυψαν από ανάλυση κύκλου ζωής του PBS που πραγματοποιήθηκε από τους Rajendran *et al.* [1], έδειξαν ότι οι εκπομπές των αερίων του θερμοκηπίου στην περίπτωση της σύνθεσης του PBS από ανανεώσιμες ύλες (υπολείμματα τροφών) έφταναν τα 5,19 kg CO₂-eq/kg PBS ενώ στην περίπτωση της σύνθεσης από ορυκτούς πόρους έφταναν μέχρι και τα 6,6 kg CO₂-eq/kg PBS όταν η παγκόσμια παραγωγή του PBS για το 2019 άγγιξε τους 86.500 τόνους [2].

Τέτοια στοιχεία στρέφουν όλο και περισσότερο την προσοχή στη βιοκατάλυση όσον αφορά διεργασίες παραγωγής πολυμερικών υλικών, όπως είναι και το PBS. Οι νέες αυτές μεθοδολογίες, περιλαμβάνουν χαμηλότερες θερμοκρασίες, μειώνοντας έτσι την ενέργεια που χρειάζεται να καταναλωθεί, γεγονός που μεταφράζεται σε μείωση του κόστους αλλά και σε μείωση της χρήσης των πόρων. Οι περισσότερες προσπάθειες που έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά την ενζυμική σύνθεση του PBS περιλαμβάνουν τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου ενζύμου N435 (πίνακας 3.1), πολλές φορές μάλιστα παρουσία διαλυτών [3]. Ορισμένα από αυτά τα παραδείγματα όμως είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή πολυεστέρων με μικρότερα MB από εκείνα που προέκυπταν από διεργασίες χημικής σύνθεσης, οδηγώντας έτσι στη μελέτη και χρήση διαφορετικών ενζύμων για τη σύνθεση του PBS. Για να αντιμετωπιστεί ωστόσο το πρόβλημα του χαμηλού MB πολλές φορές πραγματοποιήθηκε εφαρμογή πρόσθετων σταδίων επεξεργασίας. Με άλλα λόγια, προπολυμερή ενζυμικού πολυμερισμού έχουν χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες μεταπολυμερισμού με σκοπό αφενός την αύξηση του MB και αφετέρου τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους, πετυχαίνοντας σημαντικά αποτελέσματα [4]. Παραδείγματα διεργασιών μεταπολυμερισμού που έχουν χρησιμοποιηθεί, αποτελούν ο πολυμερισμός στερεάς κατάστασης (Solid State Polymerization ή

SSP) και ο μεταπολυμερισμός μάζας [5]. Δύο μεθοδολογίες οι οποίες διατηρούν τον «πράσινο» χαρακτήρα που έχουν και τα προηγούμενα στάδια, δίνοντας κίνητρα να στηριχθούν κι άλλες μελέτες πάνω σε αυτές ως εκμαγείο για τη χρήση νέων συστημάτων που δεν έχουν ακόμη χρησιμοποιηθεί.

Στον πίνακα 3.1 φαίνονται συγκεντρωμένες οι προσπάθειες των τελευταίων ετών όσον αφορά τη σύνθεσή του μέσω βιοκαταλυτικών διεργασιών.

Πίνακας 3.1 Βιβλιογραφικά δεδομένα ενζυμικού πολυμερισμού του PBS.

Αναφορά	Ένζυμο	Διαλύτης	Θερμοκρασία (°C)	\overline{M}_w (g/mol)	\overline{M}_n (g/mol)
[6]	N435	-	85	1094	851
[3]	N435	Ισοοκτάνιο	50	2000	-
[7]	<i>R. miehei</i> lipase	Διφαινυλαιθέρας	37	2140	-
[8]	N435	-	60	2550	1700
[9]	N435	Διφαινυλαιθέρας	80	-	840-2550
[4]	N435	Διφαινυλαιθέρας	75	-	3910
[10]	N435	Διφαινυλαιθέρας	80	11.500	4463-6017
[11]	iCALB με διάφορους φορείς ακινητοποίησης	Τολουόλιο,	95	-	900-4600
[12]	N435	Διφαινυλαιθέρας	60-90	-	2000-7000
[13]	N435	-	130	23.600	11.700
[12]	N435	-	80-95	38.000	27.340
[14]	N435	Τολουόλιο	95	73.000	-
[15]	N435	Τολουόλιο	100-120	130.000	81.250

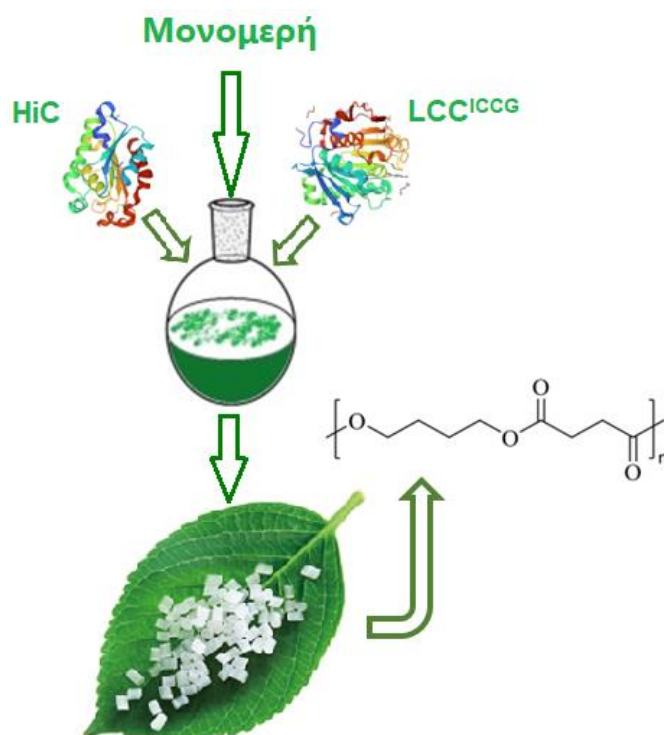
Με βάση λοιπόν τα δεδομένα του πίνακα 3.1 ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η εύρεση κι άλλων νέων ενζύμων τα οποία θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε

πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού με σκοπό τη σύνθεση «πράσινων» πολυμερών όπως είναι το PBS.

3.2. Σκοπός της εργασίας

Έχοντας πάντα ως στόχο κατά τη διάρκεια της μελέτης τη σύνθεση «πράσινων» πολυεστέρων προερχόμενων από ανανεώσιμες πρώτες ύλες και βιοαποικοδομήσιμων, η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιείται με σκοπό να ελεγχθεί η χρήση καινοτόμων βιοκαταλυτών σε διεργασίες ενζυμικού πολυμερισμού «πράσινων» πολυμερών.

Πιο συγκεκριμένα, στόχος είναι να πραγματοποιηθεί ετερόλογη έκφραση των κουτιναςών HiC και LCC^{ICCG} οι οποίες έπειτα θα χρησιμοποιηθούν όντας ακινητοποιημένες πάνω σε κατάλληλους φορείς, σε αντιδράσεις σύνθεσης πολυεστέρων όπου το πολυμερές που θα λειτουργήσει ως μοντέλο είναι το PBS.



Εικόνα 3.1 Σχηματική αναπαράσταση του σκοπού της διπλωματικής εργασίας όπου πραγματοποιείται σύνθεση «πράσινου» πολυεστέρα από ανανεώσιμες πρώτες ύλες με χρήση καινοτόμων ενζύμων.

Παρά το γεγονός ότι η HiC έχει ήδη δοκιμαστεί σε πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού όπως αναφέρεται και στην ενότητα 2.2.2, μοιάζει αρκετά υποσχόμενη η προσπάθεια χρήσης αυτών των ενζύμων στην παραγωγή του PBS, πόσο μάλλον για την περίπτωση της LCC^{ICG} η οποία θα χρησιμοποιηθεί για πρώτη φορά σε τέτοιο σύστημα, έχοντας ως παρακαταθήκη τα πολύ σημαντικά αποτελέσματα στον τομέα της αποικοδόμησης των πολυεστέρων.

Ολοκληρώνοντας λοιπόν την παρούσα εργασία, θα έχει αποδειχτεί αν αυτά τα δύο ένζυμα που έχουν την ικανότητα να διασπούν εστερικούς δεσμούς όταν βρίσκονται σε κατάλληλο περιβάλλον, δίνοντας νέες λύσεις στη διαχείριση των πλαστικών αποβλήτων, μπορούν να λειτουργήσουν σε διαδικασίες σύνθεσης πολυεστέρων, κλείνοντας έτσι τον κύκλο της βιωσιμότητας.

3.3. Βιβλιογραφία

- [1] N. Rajendran, J. Han, Techno-economic analysis and life cycle assessment of poly (butylene succinate) production using food waste, *Waste Management* 156 (2023) 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.11.037>.
- [2] S.M. Ioannidou, D. Ladakis, E. Moutousidi, E. Dheskali, I.K. Kookos, I. Câmara-Salim, M.T. Moreira, A. Koutinas, Techno-economic risk assessment, life cycle analysis and life cycle costing for poly(butylene succinate) and poly(lactic acid) production using renewable resources, *Science of The Total Environment* 806 (2022) 150594. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150594>.
- [3] C. Gkountela, M. Rigopoulou, E.M. Barampouti, S. Vouyiouka, Enzymatic pre-polymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate), *Eur Polym J* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>.
- [4] M. Kanelli, A. Douka, S. Vouyiouka, C.D. Papaspyrides, E. Topakas, L.M. Pappaspyridi, P. Christakopoulos, Production of biodegradable polyesters via enzymatic polymerization and solid state finishing, *J Appl Polym Sci* 131 (2014). <https://doi.org/10.1002/app.40820>.

- [5] C.I. Gkountela, D. Markoulakis, M. Mathioudaki, I. Pitterou, A. Detsi, S.N. Vouyiouka, Scalable enzymatic polymerization and low-temperature post-polymerization of poly(butylene succinate): Process parameters and application, *Eur Polym J* 198 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112423>.
- [6] A. Pellis, J.W. Comerford, A.J. Maneffa, M.H. Sipponen, J.H. Clark, T.J. Farmer, Elucidating enzymatic polymerisations: Chain-length selectivity of *Candida antarctica* lipase B towards various aliphatic diols and dicarboxylic acid diesters, *Eur Polym J* 106 (2018) 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.07.009>.
- [7] Y.-Y. Linko, M. Lämsä, X. Wu, E. Uosukainen, J. Seppälä, P. Linko, Biodegradable products by lipase biocatalysis, *J Biotechnol* 66 (1998) 41–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(98\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(98)00155-2).
- [8] H. Uyama, K. Inada, S. Kobayashit, *Lipase-Catalyzed Synthesis of Aliphatic Polyesters by Polycondensation of Dicarboxylic Acids and Glycols in Solvent-Free System*, 2000.
- [9] Z.W. Uniwersytet Technologiczny Szczecinie, SYNTEZA ENZYMATYCZNA POLI(BURSZTYNIANU BUTYLENU) (PBS) KATALIZOWANA LIPAZĄ B ZE SZCZEPU *CANDIDA ANTARCTICA*: NOWY, OBIECUJĄCY MATERIAŁ DLA ZASTOSOWAŃ BIOMEDYCZNYCH MIROSŁAWA EL FRAY*, BOGUSŁAWA GRADZIK, n.d.
- [10] Y. Jiang, A. Woortman, G. van Ekenstein, K. Loos, Enzyme-Catalyzed Synthesis of Unsaturated Aliphatic Polyesters Based on Green Monomers from Renewable Resources, *Biomolecules* 3 (2013) 461–480. <https://doi.org/10.3390/biom3030461>.
- [11] B. Sena, J.L. Aceña, J.L. Novella Robisco, B. Monje Martínez, L. Martí Montaner, M.I. Fernández-Bachiller, Effectiveness of different immobilized *Candida antarctica* lipase b (iCaLB) in the production of biobased oligoester derivatives from poly(butylene succinate) (PBS) and poly(butylene adipate) (PBA), *Eur Polym J* 201 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112575>.

- [12] H. Azim, A. Dekhterman, Z. Jiang, R.A. Gross, Candida antarctica Lipase B-Catalyzed Synthesis of Poly(butylene succinate): Shorter Chain Building Blocks Also Work, *Biomacromolecules* 7 (2006) 3093–3097. <https://doi.org/10.1021/bm060574h>.
- [13] D. Pospiech, R. Choińska, D. Flugrat, K. Sahre, D. Jehnichen, A. Korwitz, P. Friedel, A. Werner, B. Voit, Enzymatic Synthesis of Poly(alkylene succinate)s: Influence of Reaction Conditions, *Processes* 9 (2021) 411. <https://doi.org/10.3390/pr9030411>.
- [14] L. Ren, Y. Wang, J. Ge, D. Lu, Z. Liu, Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) and its Copolymers, *Macromol Chem Phys* 216 (2015) 636–640. <https://doi.org/10.1002/macp.201400550>.
- [15] S. Sugihara, K. Toshima, S. Matsumura, New Strategy for Enzymatic Synthesis of High-Molecular-Weight Poly(butylene succinate) via Cyclic Oligomers, *Macromol Rapid Commun* 27 (2006) 203–207. <https://doi.org/10.1002/marc.200500723>.

4.1. Ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε βακτήρια

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η χρήση δύο καινοτόμων, μη εμπορικά διαθέσιμων βιοκαταλυτών στον ενζυμικό πολυμερισμό. Τα ένζυμα που μελετήθηκαν είναι δύο κουτινάσες και συγκεκριμένα, η θερμοάντοχη τετραπλή μετάλλαξη (F243I/D238C/S283C/Y127G) του ενζύμου LCC (LCC^{LCCG}), το γονίδιο του οποίου προέκυψε έπειτα από μεταγενομική ανάλυση σε δείγμα από κομπόστ φύλλων και κλαδιών (leaf-branch compost) [1],[2], και η μυκητιακή κουτινάση από τον μικροοργανισμό *Humicola insolens* (HiC) [3],[4]. Τα ελεύθερα ένζυμα εκφράστηκαν ετερόλογα σε βακτηριακό σύστημα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Η επιλογή του συστήματος έκφρασης αποτελεί παράμετρο υψίστης σημασίας καθώς ως ξενιστής δεν επιλέγεται κατά κανόνα ο μικροοργανισμός προέλευσης, δηλαδή αυτός που εκφράζει φυσιολογικά τις εν λόγω πρωτεΐνες, αφού συχνά δεν είναι γνωστές οι συνθήκες οι οποίες είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του, ενώ ο γενικότερος πειραματικός χειρισμός μπορεί να φανεί δυσχερής. Για να επιλυθούν τα παραπάνω προβλήματα, ο ξενιστής στον οποίο έλαβε χώρα η έκφραση των επιθυμητών ενζύμων επιλέχθηκε να είναι το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*) μιας και αποτελεί τον πιο διαδεδομένο ξενιστή για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών για τον οποίον μάλιστα, έχουν μελετηθεί αρκετά οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης αλλά και έκφρασης πρωτεϊνών [5]. Μιας και το βακτήριο *E. coli*, όπως προαναφέρθηκε, δεν διαθέτει εκ φύσεως τα απαραίτητα γονίδια για την έκφραση των μελετώμενων ενζύμων, χρειάζεται με κάποιον τρόπο να αποκτήσει αυτήν την πληροφορία. Αυτό μπορεί να γίνει μέσω του γενετικού ανασυνδυασμού, ο οποίος είναι μια διαδικασία κατά την οποία γενετικά στοιχεία από δύο διαφορετικά γονιδιώματα έρχονται σε επαφή σε μια μονάδα οδηγώντας έτσι σε νέους γενότυπους. Πιο συγκεκριμένα, ενσωματώνεται το μετασχηματιζόμενο τμήμα (DNA δότη) στο κύτταρο δέκτη, το DNA δότη γίνεται μονόκλωνο και στη συνέχεια ο ένας κλώνος ολοκληρώνεται ενώ ο άλλος διασπάται και αποβάλλεται. Ο φορέας αυτής της πληροφορίας ονομάζεται πλασμίδιο το οποίο είναι ένα

μικρού μεγέθους κυκλικό μόριο DNA με δυνατότητα αντιγραφής στο κύτταρο-δέκτη [6].

4.1.1. Ξενιστής και φορέας ετερόλογης έκφρασης των κουτινασών

Τα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* που επιλέχθηκαν ως ξενιστές για την ετερόλογη έκφραση της LCC^{ICCG} αλλά και της HiC ήταν τα B21-Gold (DE3). Πρόκειται για επιδεκτικά σε μετασχηματισμό στελέχη του βακτηρίου τα οποία διαθέτουν το ίδιο χρωμοσωμικό DNA με τα απλά κύτταρα *E. coli* με τη διαφορά ότι τα πρώτα έχουν δεχτεί κάποιες τροποποιήσεις με σκοπό η έκφραση των ξένων πρωτεϊνών να λαμβάνει χώρα σε υψηλά επίπεδα. Ο έλεγχος της ετερόλογης έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης βασίζεται στον τρόπο λειτουργίας του οπερονίου της λακτόζης (*lac operon*), δηλαδή γίνεται στην ουσία επαγωγή της έκφρασης με χρήση επαγόμενου υποκινητή σε φορέα έκφρασης για τον έλεγχο της μεταγραφής. Ο πιο κοινός φορέας έκφρασης είναι ο pET. Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένα ο pET-26b(+). Πρόκειται για δίκλωνο κυκλικό μόριο DNA (5360 βάσεων) το οποίο φέρει γονίδιο αντίστασης στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Ο υποκινητής στον φορέα αυτόν αναγνωρίζεται από την T7 RNA πολυμεράση και όχι από την RNA πολυμεράση του *E. coli*. Ωστόσο, το γονίδιο που κωδικοποιεί την T7 RNA πολυμεράση βρίσκεται στο γονιδίωμα του *E. coli* και ρυθμίζεται από τον χειριστή *lacO* όπως επίσης και ο υποκινητής του φορέα έκφρασης. Όταν λοιπόν απουσιάζει από το μέσο της καλλιέργειας η λακτόζη, είναι ενεργοποιημένος ο *lac* καταστολέας ο οποίος συνδέεται με την περιοχή που αντιστοιχεί στον *lacO* και εμποδίζει την RNA πολυμεράση να ξεκινήσει τη μεταγραφή. Μόλις όμως βρεθεί στο υγρό της καλλιέργειας λακτόζη ή κάποιο ανάλογό της, ο *lac* καταστολέας απενεργοποιείται, κι έτσι η RNA πολυμεράση ξεκινάει τη μεταγραφή από όπου προκύπτει και η T7 RNA πολυμεράση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, προτιμάται η χρήση ανάλογου της λακτόζης όπως είναι το ισοπροπυλ-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο (IPTG) καθώς είναι ένα μόριο το οποίο δεν μεταβολίζεται από το κύτταρο. Η T7 RNA πολυμεράση με τη σειρά της είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφή των γονιδίων που υπάρχουν στον φορέα έκφρασης, άρα και των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των επιθυμητών ενζύμων, καθώς ο υποκινητής του φορέα αναγνωρίζεται από αυτή. Με

αυτό τον τρόπο «διπλοκλειδώνεται» η έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών καθώς δημιουργούνται δύο επίπεδα ελέγχου. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι διότι χρειάζεται η παραγωγή των επιθυμητών πρωτεϊνών να γίνεται σε μεγάλες ποσότητες. Αν δεν υπήρχαν αυτά τα δύο επίπεδα ελέγχου και η έκφραση των ενζύμων λάμβανε χώρα κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων τότε η ανάπτυξη θα ήταν αργή και φτωχή.

4.1.2. Υλικά

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας της ετερόλογης έκφρασης των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα χημικά αντιδραστήρια τα οποία είχαν καθαρότητα αναλυτικού βαθμού και προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) και AppliChem (Γερμανία).

Το θρεπτικό υλικό στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών ήταν το Luria-Bertani (LB), του οποίου η σύσταση φαίνεται παρακάτω (πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1 Σύσταση θρεπτικού μέσου LB.

Συστατικό	Σύσταση (%w/v σε απιονισμένο νερό)
Εκχύλισμα ζύμης	0,5
NaCl	1,0
Τρυπτόνη	1,0
Άγαρ	1,5

Κατά τη δημιουργία των στερεών καλλιέργειών αλλά και κατά την επώαση των κυττάρων στις προκαλλιέργειες και στις υγρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε καναμυκίνη ως αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ θρεπτικού (συγκέντρωση stock: 100 mg/mL) καθώς και IPTG (σκόνη IPTG-99% καθαρότητα, υπερκάθαρο νερό) ως επαγωγέας της έκφρασης σε συγκέντρωση 0,2 mM (συγκέντρωση stock: 1 M).

Για την απομόνωση των ενζύμων αλλά και για τη μελέτη της δράσης τους χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα ρυθμιστικά διαλύματα (buffers), τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2 Σύσταση και pH των ρυθμιστικών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση	pH
Talon 10x	Tris-base, NaCl, πυκνό HCl	0,5 M, 3 M, στάγδην προσθήκη για ρύθμιση του pH	8,0
Talon 1x	Talon 10x, απιονισμένο νερό	Αραίωση 10 φορές σε ποσότητα του διαλύματος Talon 10x	8,0
Tris-HCl	Tris-base, πυκνό HCl	20 mM, στάγδην προσθήκη για ρύθμιση του pH	8,0
Citrate-Phosphate (C-P)	Κιτρικό οξύ, NaH ₂ PO ₄	0,1 M, 0,1 M	6,0
Sodium-Phosphate (S-P)	Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄	0,1 M, 0,1 M	7,5

Η διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με χρήση στήλης βαρύτητας TALON[®] με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη διαδικασία, είναι συγκεντρωμένα στον πίνακα 4.3.

Πίνακας 4.3 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία καθαρισμού και απομόνωσης των ενζύμων σε στήλες βαρύτητας TALON[®] με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου.

Διάλυμα	Συστατικά	Συγκέντρωση
Απιονισμένο νερό	-	-

Talon 1x-ιμιδαζόλιο	Talon 10x, απιονισμένο νερό, σκόνη ιμιδαζολίου ($\geq 99,5\%$ καθαρότητα)	Αραίωση 10 φορές σε ποσότητα του διαλύματος Talon 10x, 0,005-0,1 M ιμιδαζολίου
Αιθανόλη	Καθαρή αιθανόλη (99,8%, απιονισμένο νερό)	Αναλογία καθαρή αιθανόλη : απιονισμένο νερό = 20:80

Κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου όπου οι πρωτεΐνες βρίσκονταν σε αποδιατακτική μορφή αλλά και κατά τον χρωματισμό της πηκτής χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα διαλύματα όπως παρουσιάζονται στους πίνακες παρακάτω (πίνακας 4.4 και πίνακας 4.5 αντίστοιχα)

Πίνακας 4.4 Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου αλλά και στον αποχρωματισμό της πηκτής.

Διάλυμα	Συνταγή	pH
Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ή ηλεκτροδίων (SDS Running buffer 10x)	30,3 g/L Tris-base, 144 g/L γλυκίνη, 10 g/L δωδεκυλοθειϊκού νατρίου (SDS)	8,3
Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (SDS Loading buffer)	1 g SDS, 5 mL 0,25 M Tris-base (pH=6,8), 2,5 mL 50% γλυκερόλη, 2,5 mL 2-μερκαπτοαιθανόλη, 4 mL 0,1% μπλε της βρωμοθυμόλης	-
Υδατικό διάλυμα χρώσης (Staining solution)	0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250/ AppliChem (H.Π.A.), 10% v/v παγετώδες οξικό οξύ, 40% v/v μεθανόλη, 50% v/v απιονισμένο νερό	-
Υδατικό διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining solution)	70% v/v απιονισμένο νερό, 20% v/v μεθανόλη, 10% v/v οξικό οξύ	-

Πίνακας 4.5 Συστάσεις των πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμίδιου.

Πήκτωμα	Συστατικά	Σύσταση (1 πηκτώματος)
Επιστοιβάσης 4% (stacking gel)	Απιονισμένο νερό, 0,25 M Tris/SDS	
	0,2% (pH=6,8), 40% δις-ακρυλαμίδιο, TEMED, 10% Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	1,5 mL, 1,9 mL, 0,38 mL, 7,5 μL, 25 μL
Διαχωρισμού 12,5% (resolving gel)	Απιονισμένο νερό, 0,75 M Tris/SDS	
	0,2% (pH=8,8), 40% δις-ακρυλαμίδιο, TEMED, 10% Υπερθειικό αμμώνιο (APS)	1,7 mL, 4,7 mL, 2,94 mL, 15 μL, 50 μL

Κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης, χρησιμοποιήθηκαν φορείς οι οποίοι προμηθεύτηκαν από την εταιρία EnginZyme (Σουηδία). Πρόκειται για φορείς οι οποίοι βασίζονται σε σφαιρίδια από γυαλί ελεγχόμενου πορώδους (Controlled porosity glass, CPG) φέροντας πολλές φορές κάποια επικάλυψη (hybrid CPG, hybCPG™) με σκοπό να μεταβάλλεται η υδροφιλία τους ανάλογα την εφαρμογή στην οποία αξιοποιούνται. Στην επιφάνεια των φορέων υπάρχουν συνδεδεμένα ιόντα Fe^{3+} τα οποία δημιουργούν σύμπλοκα με συγκεκριμένες ομάδες των αμινοξέων (ουρά πολυ-ιστιδίνης). Τα χαρακτηριστικά αυτών των υλικών συνοψίζονται στον πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6 Χαρακτηριστικά φορέων ακινητοποίησης.

Ονομασία	Επιφάνεια	Μέγεθος σφαιριδίων (μm)	Διάμετρος πόρων (Å)
EziG 2 (Coral)	Υδρόφοβη - hybCPG με επικάλυψη από πολυ(βίνυλο βενζυλοχλωρίδιο)	75-125	300±50
EziG 3 (Amber)	Ημι-υδρόφιλη - hybCPG με αναμειγμένο συμπολυμερές		300±50

4.1.3. Όργανα και συσκευές

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας για την ετερόλογη έκφραση των κουτινασών έγινε χρήση του βασικού εξοπλισμού του εργαστηρίου όπως είναι:

- ❖ Ποτήρια ζέσεως
- ❖ Κωνικές φιάλες
- ❖ Ογκομετρικοί κύλινδροι
- ❖ Γυάλινα μπουκάλια αποστείρωσης
- ❖ Σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου Falcon (15 και 50 mL)
- ❖ Πλαστικά σωληνάρια Eppendorf (1,5 και 2,0 mL)
- ❖ Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου
- ❖ Πιπέτες Pasteur
- ❖ Πολυπιπέτα
- ❖ Ρύγχη (tips) αυτόματων πιπετών
- ❖ Σπαθίδες μεταφοράς στερεών αντιδραστηρίων
- ❖ Χωνιά
- ❖ Αποστειρωμένα τρυβλία Petri

Εκτός όλων αυτών, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα χρήση και εξειδικευμένου εργαστηριακού εξοπλισμού όπως:

- ❖ Αναλυτικός ζυγός ABS120-4, Kern & Sohn GmbH (Γερμανία)
- ❖ Ανακινήτριας δοκιμαστικών σωλήνων Vortex Mixer LVM-202, LabTech
- ❖ Ανακινούμενοι επωαστικοί θάλαμοι ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- ❖ Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- ❖ Αποστειρωμένο χώρο εργασίας UNIFLOW UV1200
- ❖ Θερμαινόμενοι και ανακινούμενοι επωαστήρες Eppendorf Thermomixer Comfort (1,5 & 2,0 mL), Eppendorf (Γερμανία)
- ❖ Θερμαινόμενες πλάκες με δυνατότητα μαγνητικής ανάδευσης
- ❖ Μετρητή pH (pH-meter 537), WTW (Γερμανία)
- ❖ Μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- ❖ Μεμβράνη διαπίδυσης Molecular Porous Membrane Tubing, Spectra Por Membranes

- ❖ Στήλες φυγοκέντρησης Amicon Ultra-0,5 mL, Centrifugal filters, Ultracell-10K
- ❖ Στήλη βαρύτητας TALON[®], Bio-Rad με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech (Η.Π.Α.)
- ❖ Συσκευή απιονισμένου νερού
- ❖ Συσκευή υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Merck Milipore (Η.Π.Α.)
- ❖ Συσκευή φωτομέτρησης microplate SpectraMax[®] ABS Plus, Molecular Devices
- ❖ Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer, BOECO (Γερμανία)
- ❖ Συσκευή ηλεκτροφόρησης διαχωρισμού πρωτεϊνών Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad (Η.Π.Α.)
- ❖ Υπερκατάψυξη FORMA SCIENTIFIC FULL SIZE -86C BIO FREEZER, THERMO FISCHER SCIENTIFIC (Η.Π.Α.)
- ❖ Φούρνος επώασης τρυβλίων WT binder 7200, TOTTLINGEN (Γερμανία)
- ❖ Φυγόκεντρο Beckman Model TJ-6 Centrifuge, Beckman Coulter (Η.Π.Α.)
- ❖ Ψυχόμενη φυγόκεντρος Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL (Κίνα)
- ❖ Ψυχόμενη φυγόκεντρος Sigma 3K30 Centrifuge, B. Braun Biotech (Γερμανία)
- ❖ Ψυχόμενη φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN (Γερμανία)
- ❖ Συσκευή υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400, Sonics and Materials (Η.Π.Α.)
- ❖ Στήλες-φίλτρα φυγοκέντρησης Amicon[®] Ultra – 0,5 mL Centrifugal Filters Ultracel[®] - 10 K Regenerated Cellulose, Merck Millipore Ltd (Γερμανία)
- ❖ Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)

4.1.4. Πειραματική Διαδικασία

Προετοιμασία στερεού θρεπτικού μέσου σε τρυβλία Petri

Της διαδικασίας του γενετικού ανασυνδυασμού προηγείται η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού ανάπτυξης των ανασυνδυασμένων κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό που θα παρασκευαστεί είναι το Luria-Bertani (LB) του οποίου η συνταγή φαίνεται παραπάνω (πίνακας 4.1). Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το απιονισμένο νερό και η ρύθμιση του θρεπτικού μέσου στο επιθυμητό pH (7,4) πραγματοποιήθηκε μέσω προσθήκης διαλύματος NaOH 10M, ενώ ποσότητα, ίση με

0,5 mL, απομονώθηκε σε πλαστικό σωληνάριο (errendorf) προς χρήση σε επόμενο βήμα της διαδικασίας του ανασυνδυασμού.



Εικόνα 4.1 Αυτόκαυστο αποστείρωσης όπου αποστειρώνεται το θρεπτικό υλικό και τα απαραίτητα σκεύη για την πειραματική διαδικασία του γενετικού ανασυνδυασμού.

Στη συνέχεια προστέθηκε στο θρεπτικό μέσο άγαρ σε περιεκτικότητα 1,5% w/v, ως πηκτικός παράγοντας για τη δημιουργία στερεού μέσου ανάπτυξης σε τρυβλία Petri. Ακολούθως, το θρεπτικό υλικό και τα απαραίτητα σκεύη αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (εικόνα 4.1), προς αποφυγή επιμόλυνσης των στερεών καλλιιεργειών. Η αποστείρωση έλαβε χώρα στους 121°C για 20 min.

Γενετικός ανασυνδυασμός μέσω μετασχηματισμού

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Είναι γνωστό ότι οι φυσικοί μηχανισμοί μεταφοράς γονιδίων με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί ο γενετικός ανασυνδυασμός ποικίλλουν. Στην παρούσα πειραματική μελέτη, επιλέχθηκε ως μηχανισμός, ο μετασχηματισμός (transformation) κατά τον οποίο πραγματοποιείται παραλαβή ελεύθερου DNA

από ένα κύτταρο. Ωστόσο, η πρόσληψη ελεύθερου DNA δεν μπορεί να γίνει από όλα τα γένη των βακτηρίων και για αυτό τον λόγο πολλές φορές προηγείται μια διαδικασία που θέτει τα κύτταρα επιδεκτικά στο να λάβουν τη νέα πληροφορία, συνήθως μέσω προκατεργασίας με κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (buffer) μαζί με θερμοκρασιακούς χειρισμούς.

Πειραματική δραστηριότητα

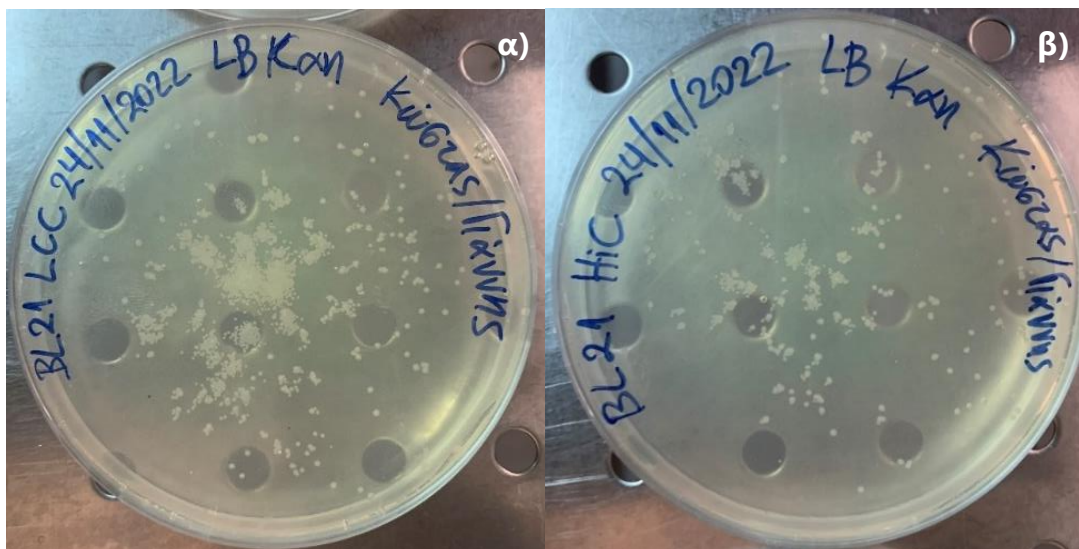
Η διαδικασία του μετασχηματισμού ξεκίνησε με την προσθήκη των πλασμιδίων που φέρουν τα επιθυμητά γονίδια στα κύτταρα-δέκτη. Η αποθήκευση των επιδεκτικών κυττάρων *E. coli* πραγματοποιείται στους -70°C , στην υπερκατάψυξη FORMA SCIENTIFIC FULL SIZE -86C BIO FREEZER, THERMO FISCHER SCIENTIFIC σε erpendorfs σε όγκο 50 μL . Επιλέχθηκαν δύο erpendorfs που περιείχαν τα επιδεκτικά στελέχη *E. coli* BL21 Gold (DE3) και τοποθετήθηκαν σε ένα δοχείο με πάγο. Αντίστοιχα, από την κατάψυξη, επιλέχθηκαν δύο erpendorfs τα οποία περιείχαν τα πλασμίδια που φέρουν τα γονίδια έκφρασης των ενζύμων LCC^{ICCG} και HiC αντίστοιχα και τοποθετήθηκαν κι αυτά στο δοχείο με τον πάγο. Από τα erpendorfs με τα πλασμίδια, ελήφθησαν 0,8 μL και προστέθηκαν στα erpendorfs που περιείχαν τα επιδεκτικά κύτταρα και όλα μαζί παρέμειναν στο δοχείο με τον πάγο για 30 min. Κατά την παραμονή τους στον πάγο, τα αρνητικά φορτισμένα πλασμίδια προσέγγισαν τη θετικά φορτισμένη επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης των επιδεκτικών κυττάρων.

Η μέθοδος του μετασχηματισμού που επιλέχθηκε ήταν αυτή του Heat-shock. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο αναφέρει πως το erpendorf που περιέχει τα κύτταρα και τα πλασμίδια τοποθετείται σε ένα thermomixer (Θερμαινόμενος και ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort) για 80 s στους 42°C χωρίς κάποια ανάδευση. Με αυτόν τον τρόπο, τα κύτταρα υπόκεινται σε ένα θερμικό «σοκ» με αποτέλεσμα οι κυτταρικές τους μεμβράνες να γίνονται περισσότερο διάτρητες και να χαλαρώνουν καθιστώντας πιο εύκολη την είσοδο των πλασμιδίων. Μόλις ολοκληρώθηκε το χρονικό διάστημα των 80 s, το σύστημα τοποθετήθηκε αμέσως σε δοχείο με πάγο και προστέθηκαν 200 μL από το θρεπτικό μέσο LB που είχε πρωτίστως απομονωθεί και αποστειρωθεί ξεχωριστά.

Στη συνέχεια, οδηγήθηκε ξανά σε thermomixer προς επώαση για 60 min στους 37°C υπό ανάδευση στα 500 rpm.

Όσο διήρκεσε το χρονικό διάστημα των 60 min, στρώθηκαν τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό. Εφόσον, η διαδικασία του Heat-shock δεν έχει απόδοση 100% κρίνεται απαραίτητη η επιλογή των ανασυνδυασμένων κυττάρων μέσω κάποιου αντιβιοτικού-επιλογής. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία του αντιβιοτικού είναι ικανή να εξουδετερώσει τα κύτταρα που δεν μετασχηματίστηκαν καθώς το πλασμίδιο εκτός του γονιδίου έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης, φέρει και το γονίδιο ανθεκτικότητας απέναντι στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Έτσι λοιπόν, προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα καναμυκίνης ώστε η τελική συγκέντρωση μέσα στο θρεπτικό υλικό να είναι ίση με $50 \frac{\mu\text{g καναμυκίνης}}{\text{mL θρεπτικού}}$.

Τα αντιβιοτικά ως γνωστόν είναι θερμικά ασταθή, πράγμα που σημαίνει πως έπρεπε να μειωθεί η θερμοκρασία του θρεπτικού που είχε αποστειρωθεί, τόσο ώστε η καναμυκίνη να μην καταστραφεί αλλά και ταυτόχρονα να μην προλάβει το θρεπτικό υλικό να πήξει λόγω της παρουσίας του πηκτικού παράγοντα. Μια ιδανική θερμοκρασία λοιπόν ήταν αυτή των 50°C.



Εικόνα 4.2 Τρυβλίο με θρεπτικό υλικό LB, αντιβιοτικό καναμυκίνη και αποικίες μετασχηματισμένων *E. coli* με το πλασμίδιο α) για το ένζυμο LCC^{ICCG} και β) για το ένζυμο HiC.

Με το πέρας της επώασης των 60 min, στην οποία είχαν υποβληθεί τα προς μετασχηματισμό βακτήρια, κι έχοντας προσθέσει το θρεπτικό υλικό στα τρυβλία, έγινε η προσθήκη του περιεχομένου των erpendorfs στα τρυβλία με στερεό πλέον θρεπτικό υλικό το οποίο περιείχε και το αντιβιοτικό. Στη συνέχεια, τα τρυβλία παρέμειναν στους 37°C (Φούρνος επώασης τρυβλίων WT binder 7200, TOTTLINGEN) για 17 h (overnight) και την επόμενη μέρα, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη αποικιών των ανασυνδυασμένων κυττάρων, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.2.

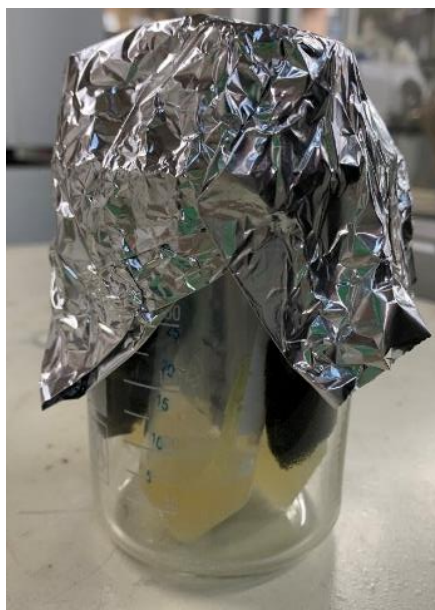
Η διαδικασία του γενετικού ανασυνδυασμού πραγματοποιήθηκε σε ειδικά αποστειρωμένο χώρο εργασίας (απαγωγός-αποστειρωμένος χώρος εργασίας UNIFLOW UV1200), παρουσία φλόγας. Ο χειρισμός του αντιβιοτικού γινόταν σε κατάλληλη απόσταση από τη φλόγα έτσι ώστε να αποφευχθεί η απενεργοποίησή του.

Δημιουργία προκαλλιιεργειών

Αφού αναπτύχθηκαν οι αποικίες των ανασυνδυασμένων κυττάρων, ξεκίνησε η διαδικασία δημιουργίας των προκαλλιιεργειών. Οι προκαλλιιεργείες αποτέλεσαν εμβόλιο για τις κύριες υγρές καλλιιεργείες στις οποίες πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια η περαιτέρω ανάπτυξη των κυττάρων και η ετερόλογη έκφραση των επιθυμητών ενζύμων. Χρησιμοποιήθηκε ξανά ως θρεπτικό υλικό το LB με την ίδια σύσταση όπως στην περίπτωση των τρυβλίων με τη διαφορά ότι στην περίπτωση των εμβολίων δεν προστέθηκε ο πηκτικός παράγοντας. Ο αριθμός των προκαλλιιεργειών που δημιουργήθηκαν ήταν ίσος με αυτόν των υγρών καλλιιεργειών που προέκυψαν στη συνέχεια.

Ο όγκος κάθε προκαλλιιεργείας ήταν ίσος με 5 mL, 1% του όγκου των υγρών καλλιιεργειών (500 mL). Έτσι λοιπόν, παρασκευάστηκε θρεπτικό υλικό LB και ακολούθως έγινε η προσαρμογή του pH στο 7,4. Στη συνέχεια, ακολούθησε αποστείρωση αυτού καθώς και όλων των υπολοίπων απαραίτητων εξαρτημάτων-σκευών που χρειάστηκαν, όπως τα tips για τις πιπέτες μεταβλητού όγκου καθώς και τα δοχεία (falcons-steriline) στα οποία δημιουργήθηκαν οι προκαλλιιεργείες. Η θερμοκρασία της αποστείρωσης ορίστηκε όπως και προηγουμένως ίση με 121°C και η διάρκειά της ίση με 20 min. Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της

αποστείρωσης, το θρεπτικό υλικό τοποθετήθηκε στους 4°C με σκοπό να μειωθεί η θερμοκρασία του. Ο λόγος που συνέβη αυτό ήταν γιατί ακολούθησε εκ νέου προσθήκη αντιβιοτικού καναμυκίνης, τελικής συγκέντρωσης $50 \frac{\mu\text{g καναμυκίνης}}{\text{mL θρεπτικού}}$, ώστε να εξουδετερωθούν κύτταρα που δεν μπόρεσαν να παραλάβουν το πλασμίδιο αφενός γιατί μπορεί να αναπτύχθηκαν πάνω σε νεκρά κύτταρα και αφετέρου διότι μπορεί κατά τον διπλασιασμό κάθε κυττάρου να δημιουργήθηκαν σφάλματα που να οδήγησαν σε νέα κύτταρα χωρίς το επιθυμητό πλασμίδιο.



Εικόνα 4.3 Προκαλλιέργειες μετά το τέλος της επώασης όπου παρατηρείται θολερότητα που οφείλεται στον πολλαπλασιασμό των ανασυνδυασμένων κυττάρων.

Κάθε προκαλλιέργεια των 5 mL εμβολιάστηκε με μια αποικία από τα τρυβλία των ανασυνδυασμένων κυττάρων, και τα steriline οδηγήθηκαν σε επωαστήρα (Ανακινούμενος επωαστικός θάλαμος ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd) overnight, στους 37°C υπό ανάδευση (180 rpm). Μετά το πέρας της επώασης παρατηρήθηκε θολερότητα στο θρεπτικό υλικό, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.3, ένδειξη της ανάπτυξης των ανασυνδυασμένων κυττάρων εντός της προκαλλιέργειας.

Δημιουργία υγρών καλλιέργειών

Οι προκαλλιέργειες αποτέλεσαν, όπως προαναφέρθηκε, εμβόλια για τις υγρές καλλιέργειες όπου εκεί έγινε η ελεγχόμενη ανάπτυξη των κυττάρων και στη συνέχεια η ετερόλογη έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών. Ο όγκος κάθε καλλιέργειας που δημιουργήθηκε ήταν 500 mL, επομένως επιλέχθηκαν σκεύη στα οποία ο όγκος της καλλιέργειας κάλυπτε μόνο το ¼ του συνολικού όγκου του σκεύους καθώς είναι απαραίτητος ο επαρκής αερισμός εντός της καλλιέργειας.



Εικόνα 4.4 Φιάλες με το θρεπτικό υλικό οι οποίες προορίζονται για υγρές καλλιέργειες.

Για τις υγρές καλλιέργειες λοιπόν παρασκευάστηκε εκ νέου θρεπτικό υλικό LB (προσαρμογή του pH στο 7,4) το οποίο μοιράστηκε στις κωνικές φιάλες όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.4 και αποστειρώθηκε στους 121°C για 20 min μαζί με όλα τα υπόλοιπα αντικείμενα που χρειάστηκαν για την παρασκευή των υγρών καλλιέργειών. Το στόμιο των κωνικών με το θρεπτικό υλικό καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο.

Με το τέλος αυτού του βήματος, οτιδήποτε είχε αποστειρωθεί, τοποθετήθηκε για λίγο σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο με θερμοκρασία 4°C ώστε να μειωθεί η θερμοκρασία του και αφού έφτασε σε ένα επιθυμητό επίπεδο έγινε η προσθήκη αντιβιοτικού ώστε να αποφευχθεί η παρουσία μη ανασυνδυασμένων κυττάρων τα οποία δεν φέρουν αντίσταση σε αντιβιοτικά. Στα 500 mL θρεπτικού υλικού

προστέθηκαν 250 μL καναμυκίνης προς τελική συγκέντρωση $50 \frac{\mu\text{g καναμυκίνης}}{\text{mL θρεπτικού}}$. Στη συνέχεια, έγινε η προσθήκη του περιεχομένου των προκαλλιεργειών στις υγρές καλλιέργειες αφότου πρώτα οι φιάλες είχαν τοποθετηθεί σε επωαστήρα (Ανακινούμενος επωαστικός θάλαμος ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd) στους 37°C ώστε το θρεπτικό υλικό να βρίσκεται κοντά στην επιθυμητή θερμοκρασία πριν γίνει ο εμβολιασμός. Η επώασή τους έγινε στους 37°C υπό ανάδευση στα 180 rpm περίπου για 3 h, μέχρις ότου δηλαδή η ανάπτυξη των βακτηρίων φτάσει στα $\frac{3}{4}$ της εκθετικής τους φάσης. Τόσο στην περίπτωση των προκαλλιεργειών όσο και στην περίπτωση των υγρών καλλιεργειών η χρήση της έντονης ανάδευσης αλλά και των κατάλληλων σκευών βοήθησαν στο να παρέχεται ο απαραίτητος αερισμός στα συστήματα καθώς και τα θρεπτικά συστατικά που απαιτούνται για την ομαλή ανάπτυξη των κυττάρων. Σε περίπτωση που δεν υπήρχε η ανάδευση, τα κύτταρα θα καθίζαναν και θα λάμβανε χώρα αναερόβια ανάπτυξη με αργούς ρυθμούς.

Όταν η ανάπτυξη των βακτηρίων έφτασε στα $\frac{3}{4}$ της εκθετικής φάσης, γεγονός που ισοδυναμεί με οπτική πυκνότητα ίση με 0,6-0,8 έγινε φωτομέτρηση στα 600 nm (Φωτόμετρο S-22 UV/Vis. Spectrophotometer, BOECO) (OD_{600}) έχοντας κάνει δειγματοληψία από κάθε καλλιέργεια και αφαιρώντας το σήμα ενός τυφλού δείγματος (blank).

Στη συνέχεια, και εφόσον τα κύτταρα είχαν πλέον πολλαπλασιαστεί στον επιθυμητό βαθμό, ακολούθησε η επαγωγή της έκφρασης των επιθυμητών γονιδίων. Η διαδικασία αυτή έλαβε χώρα μέσω της προσθήκης IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,2 mM. Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες παρέμειναν στον επωαστήρα overnight, στους 16°C υπό ανάδευση στα 180 rpm.

Όλη η προαναφερθείσα πειραματική διαδικασία έλαβε χώρα στον ειδικά διαμορφωμένο χώρο παρουσία φλόγας, κατ' αντιστοιχία με τις προηγούμενες περιπτώσεις κάνοντας προσεκτικούς χειρισμούς των αντιβιοτικών.

Παραλαβή των εσωκυτταρικά παραγόμενων κουτινασών

Την επόμενη μέρα, εφόσον η ετερόλογη έκφραση είχε ολοκληρωθεί (εικόνα 4.5) και γνωρίζοντας ότι η έκφραση των πρωτεϊνών στα βακτήρια είναι

εσωκυτταρική, δημιουργήθηκε η ανάγκη διαχωρισμού των κυττάρων από το υγρό της καλλιέργειας, μέσω φυγοκέντρησης.



Εικόνα 4.5 Υγρές καλλιέργειες αφότου ολοκληρώθηκε η έκφραση των ενζύμων.

Το περιεχόμενο των καλλιεργειών συλλέχθηκε σε ειδικά δοχεία της ψυχόμενης φυγοκέντρου (Ψυχόμενη φυγόκεντρος ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN), που απεικονίζονται στην εικόνα 4.6, των οποίων η μάζα ισοσταθμίστηκε και οδηγήθηκαν στη ψυχόμενη φυγόκεντρο. Η φυγοκέντρωση διήρκεσε 35 min στους 4°C και η ταχύτητά της ορίστηκε στα 4500 rpm.



Εικόνα 4.6 Φιάλες φυγοκέντρησης με το περιεχόμενο των υγρών καλλιεργειών τοποθετημένες μέσα σε δοχείο με πάγο προς προστασία των εκφρασμένων ενζύμων.

Το αποτέλεσμα της φυγοκέντρωσης ήταν ο διαχωρισμός της βιομάζας, η οποία παρέμεινε στον πυθμένα του δοχείου, από το θρεπτικό υλικό το οποίο απομακρύνθηκε (εικόνα 4.7). Τα κύτταρα που παρέμειναν επαναιωρήθηκαν μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x ώστε να μπορέσει να γίνει η λύση των κυτταρικών μεμβρανών για την παραλαβή των ενζύμων. Έτσι λοιπόν, τα κύτταρα κάθε καλλιέργειας όγκου 500 mL επαναιωρήθηκαν σε 25 mL Talon 1x.



Εικόνα 4.7 Κύτταρα που έχουν καθιζάνει μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης.

Τα επαναιωρημένα κύτταρα οδηγήθηκαν σε συσκευή υπερήχων (Συσκευή υπερήχων Vibra-Cell Processor VC 400, Sonics and Materials) ώστε να πραγματοποιηθεί διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών και να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες που εκφράστηκαν στο εσωτερικό τους. Η χρήση των υπερήχων αποτελεί γενικά μια ήπια μέθοδο για τη διάρρηξη των μεμβρανών. Η συσκευή υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε, δημιούργησε υπερηχητικά κύματα τα οποία μετατράπηκαν σε μηχανικές ταλαντώσεις οι οποίες με τη σειρά τους οδήγησαν στη δημιουργία φυσαλίδων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σπηλαίωση αποτέλεσμα του οποίου είναι η ενέργεια που απελευθερώνεται από τη διάσπαση των φυσαλίδων να οδηγεί στη λύση των κυτταρικών μεμβρανών.

Κάθε falcon που περιείχε το εναιώρημα των κυττάρων οδηγήθηκε στη συσκευή υπερήχων όπου εφαρμόστηκαν 4 κύκλοι του 1 min. Η ποσότητα κάθε falcon

τοποθετήθηκε σε ένα ποτήρι ζέσεως το οποίο βρισκόταν μέσα σε πάγο και οι υπέρηχοι παρέμεναν 8 s ενεργοί με διαλλείματα των 5 s σε όλη τη διάρκεια του 1 min. Ο λόγος που το σύστημα περιβαλλόταν από πάγο, η εφαρμογή 4 διαδοχικών κύκλων αλλά και τα διαλλείματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ήταν γιατί κατά τη λύση των κυττάρων απελευθερώνονταν ενέργεια η οποία ενδεχομένως να αύξανε τη θερμοκρασία των πρωτεϊνών οδηγώντας σε μετουσίωσή τους. Η χρήση του πάγου λοιπόν και των διαλλειμάτων βοήθησε στο να παραμένει το σύστημα σε μια χαμηλή θερμοκρασία σε όλη τη διάρκεια του φαινομένου.

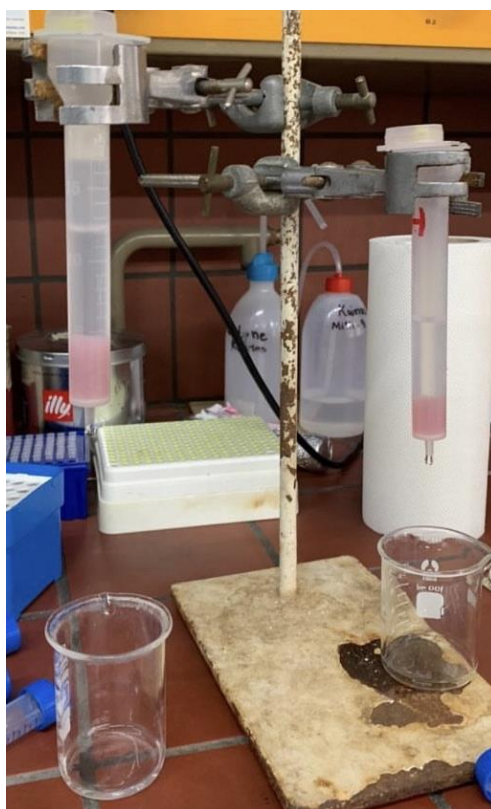
Τα θραύσματα των κυττάρων που προέκυψαν από τη χρήση των υπερήχων χρειάστηκε να απομακρυνθούν. Αυτό συνέβη μέσα από δύο κύκλους φυγόκεντρησης (Ψυχόμενη φυγόκεντρος Centrifuge 4239R, ALC INTERNATIONAL). Η θερμοκρασία κάθε κύκλου ήταν 4°C και η ταχύτητα ορίστηκε σε 20000 RCF. Ο πρώτος κύκλος διήρκησε 30 min ενώ ο δεύτερος 20. Το αποτέλεσμα από κάθε κύκλο ήταν η καθίζηση των θραυσμάτων και η παραλαβή του υπερκείμενου υγρού το οποίο εμπεριείχε τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος που εκφράστηκαν ετερόλογα, διάφορες άλλες πρωτεΐνες που εκφράζονται εκ φύσεως από τα βακτήρια, το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την επαναιώρηση σε κάθε περίπτωση καθώς και υπολείμματα θρεπτικού υλικού στα οποία οφειλόταν και ο κιτρινισμός που παρατηρήθηκε. Το σύστημα για κάθε ένζυμο οδηγήθηκε απευθείας σε δοχείο με πάγο ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των ενζύμων.

Καθαρισμός και απομόνωση των κουτινασών

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Η παρουσία των υπόλοιπων πρωτεϊνών ήταν ανεπιθύμητη και για αυτόν τον λόγο χρειάστηκε να γίνει απομόνωση των ενζύμων LCC^{ICCG} και HiC μέσω χρωματογραφικής μεθόδου. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χρωματογραφία συγγένειας (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC) εκμεταλλεζόμενοι το γεγονός ότι ο επιλεγμένος φορέας (pET-26 b(+)) εμπεριέχει μια αλληλουχία στο τέλος του γονιδίου έκφρασης, ώστε κατά τη μετάφρασή του να παράγεται το επιθυμητό ένζυμο με μια τερματική αμινοξική ακολουθία έξι μορίων ιστιδίνης (ουρά πολυ-ιστιδίνης/His-tag). Η στήλη (Στήλη βαρύτητας TALON[®], Bio-Rad με ρητίνη Talon ακινητοποιημένων ιόντων κοβαλτίου, Clontech)

περιέχει μια ρητίνη πάνω στην οποία υπάρχουν κάποια ιόντα μετάλλων και συγκεκριμένα ιόντα Co^{2+} τα οποία αλληλοεπιδρούν με την ουρά των ιστοιδινών (His-tag) δημιουργώντας σύμπλοκα. Στην ουσία αυτό που συμβαίνει είναι η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του ηλεκτρονιόφιλου τμήματος που είναι τα ιόντα Co^{2+} με το πυρηνόφιλο που είναι τα ιμιδαζολικά άζωτα που βρίσκονται στην πλευρική ομάδα των ιστοιδινών.



Εικόνα 4.8 Στήλες χρωματογραφίας συγγένειας οι οποίες περιέχουν ιόντα Co^{2+} .

Πειραματική δραστηριότητα

Χρησιμοποιήθηκαν στήλες με ρητίνη όγκου 5 mL ($\text{CV}=5\text{mL}$), σαν αυτές στην εικόνα 4.8, και προτού ξεκινήσει η διαδικασία της χρωματογραφίας, χρειάστηκε να γίνει καθαρισμός τους με απιονισμένο νερό όγκου ίσου με 45 mL ($9 \times \text{CV}$) αφού πρώτα απομακρύνθηκε το διάλυμα αποθήκευσης, δηλαδή αιθανόλη 20%. Στη συνέχεια ακολούθησε εξισορρόπηση των στηλών χρησιμοποιώντας διάλυμα Talon 1x, όγκου 45 mL ($9 \times \text{CV}$). Μέσω της εξισορρόπησης δεν επηρεάζονται οι

αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και ρητίνης από τις ιοντικές αλληλεπιδράσεις των αλάτων του ρυθμιστικού διαλύματος με τα ιόντα Co^{2+} .

Αφού οι στήλες ήταν πλέον εξισορροπημένες, μπορούσε να γίνει το πέρασμα των διαλυμάτων που προέκυψαν μετά από τους δύο κύκλους φυγοκέντρωσης. Αυτό που επιτεύχθηκε σε αυτό το βήμα ήταν η πρόσδεση των επιθυμητών ενζύμων στις στήλες. Οτιδήποτε άλλο, δεν συγκρατήθηκε από τις στήλες, συλλέχθηκε σε falcon και οδηγήθηκε σε δοχείο με πάγο. Τα κλάσματα που προέκυψαν από αυτό το βήμα ονομάστηκαν Flowthroughs και ο λόγος για τον οποίο έγινε η συλλογή τους ήταν γιατί πάντα υπάρχει πιθανότητα οι στήλες να μην λειτουργούν σωστά, δηλαδή να μην γίνεται η δημιουργία συμπλόκων με το ένζυμο ενδιαφέροντος κι έτσι να μην επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Κατά το πέρασμα αυτών των κλασμάτων από τις στήλες, μπορεί κάποια συστατικά να μην πρόλαβαν να εξέλθουν από αυτές ακόμα κι αν δεν δημιουργούν σύμπλοκα. Η ρητίνη είναι πορώδης και ενδεχομένως πρωτεΐνες των βακτηρίων να εισχώρησαν στους πόρους αυτούς και να μην κατάφεραν να παρασυρθούν από τη ροή του πρωτεϊνικού διαλύματος. Για τον σκοπό αυτό προστέθηκαν σε κάθε στήλη 10 mL ($2 \times CV$) Talon 1x και τα κλάσματα που προέκυψαν ονομάστηκαν Washes.

Το επόμενο βήμα ήταν η απομάκρυνση των πιθανώς λανθασμένα συγκρατημένων πρωτεϊνών που εκφράζουν τα βακτήρια εκ φύσεως εξαιτίας της παρουσίας αμινοξέων ιστιδίνης στην αλληλουχία τους τα οποία κατάφεραν να αλληλοεπιδράσουν με τα ιόντα Co^{2+} . Για να καταστραφεί ο δεσμός μεταξύ των ιόντων Co^{2+} και των λανθασμένα συγκρατημένων πρωτεϊνών χρειάστηκε ένα αντιδραστήριο το οποίο θα μπορούσε να ανταγωνιστεί αυτή τη σύνδεση και μάλιστα να την υπερνικήσει με αποτέλεσμα αυτές οι πρωτεΐνες να μπορέσουν να εκλουστούν από τις στήλες. Για τον σκοπό αυτό λοιπόν χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ιμιδαζολίου 5mM σε διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα Talon 1x, προκειμένου να μην επηρεαστεί η εξισορρόπηση των στηλών. Συγκεκριμένα προστέθηκαν 7 mL από το διάλυμα αυτό και ύστερα ακολούθησε προσθήκη 7mL από διάλυμα ιμιδαζολίου 10 mM με αποτέλεσμα να αποδεσμευτούν και να παρασυρθούν όσα συστατικά δεν πρόλαβαν από τη ροή των προηγούμενων κλασμάτων. Με αυτά τα δύο κλάσματα ήπιων συγκεντρώσεων ιμιδαζολίου θεωρητικά μπόρεσαν να απομακρυνθούν από τις στήλες όλα τα ανεπιθύμητα πρωτεϊνικά μόρια κι έτσι στη

συνέχεια προστέθηκαν 4 mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM. Για αυτή την τάξη μεγέθους συγκεντρώσεων, το ιμιδαζόλιο δρα ανταγωνιστικά με τα επιθυμητά πρωτεϊνικά μόρια, όσον αφορά τη δέσμευσή τους με τα ιόντα κοβαλτίου. Σε αυτό το στάδιο αναμένεται η αρχική αποδέσμευση των πρωτεϊνών-στόχων. Αυτά τα κλάσματα ονομάστηκαν 100A_x (όπου x=1,2,3... ανάλογα τον αριθμό των στηλών που χρησιμοποιήθηκαν). Έτσι λοιπόν, προσθέτοντας ακόμα 6mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM μπόρεσαν να παρασυρθούν περαιτέρω τα ένζυμα ενδιαφέροντος που είχαν αποδεσμευτεί από τη ρητίνη εξαιτίας των προηγούμενων κλασμάτων. Τα κλάσματα αυτά ονομάστηκαν 100B_x (όπου x=1,2,3... ανάλογα τον αριθμό των στηλών που χρησιμοποιήθηκαν) κι από τη ροή αυτών των κλασμάτων ενδεχομένως να απομακρύνθηκαν όσα πρωτεϊνικά μόρια δεν μπόρεσαν από τη ροή των κλασμάτων 100A. Αφού έγινε η συλλογή των κλασμάτων 100B έγινε προσθήκη για μια τελευταία φορά 6mL διαλύματος ιμιδαζολίου 100mM ώστε να παραληφθεί η οποιαδήποτε ποσότητα είχε παραμείνει εντός των στηλών. Το όνομα αυτών των τελευταίων κλασμάτων ήταν 100Γ_x (όπου x=1,2,3... ανάλογα τον αριθμό των στηλών που χρησιμοποιήθηκαν).

Όπως φάνηκε και από τα προηγούμενα, κάθε βήμα όπου γινόταν προσθήκη ιμιδαζολίου αποτελούσε «ξέπλυμα» των στηλών και βοηθούσε ταυτόχρονα να αποδεσμευτούν συστατικά που δεν μπόρεσαν κατά τη ροή του προηγούμενου.

Όλα τα κλάσματα συλλέχθηκαν σε falcons και τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο ώστε η θερμοκρασία τους να παραμένει χαμηλή για αποφυγή μετουσίωσης των ενζύμων. Στη συνέχεια, ακολούθησε φωτομέτρηση των δειγμάτων 100A, 100B και 100Γ που προέκυψαν από κάθε στήλη σε πηγάδια UV-πλάκας 96 θέσεων και ρυθμίστηκε η απορρόφηση στα 280 nm (υπεριώδης ακτινοβολία UV), στο φυτόμετρο SpectraMax ABS Plus με λογισμικό SoftMax Pro 7 (Molecular Devices - HELLAMCO). Η μέτρηση στο συγκεκριμένο μήκος κύματος επιλέχθηκε καθώς είναι γνωστό πως στα 280 nm απορροφούν αρωματικοί δακτύλιοι που βρίσκονται σε πλευρικές ομάδες αμινοξέων όπως η τυροσίνη (Tyr) και η τρυπτοφάνη (Trp). Η ποσότητα κάθε δείγματος στη πλάκα ήταν ίση με 250μL. Εκτός από τα δείγματα των κλασμάτων της χρωματογραφίας, μετρήθηκαν και δείγματα από το διάλυμα ιμιδαζολίου 100 mM (Blank) ώστε να γίνει η αφαίρεση της απορρόφησης του από τα δείγματα 100A, 100B και 100Γ.

Οι στήλες ξεπλύθηκαν μετά το τέλος της διαδικασίας με απιονισμένο νερό (9×CV) και στο τέλος προστέθηκε το διάλυμα αποθήκευσης το οποίο περιείχε αιθανόλη 20% και αποθηκεύτηκαν στους 4°C όπως ορίζει ο κατασκευαστής.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

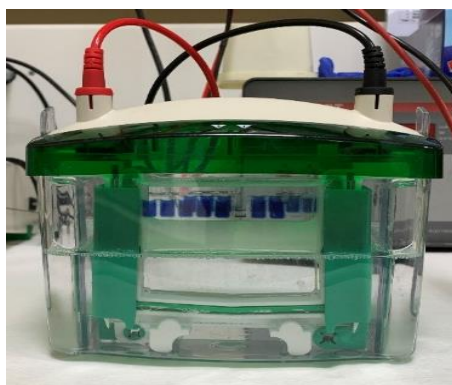
Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για να αποδειχθεί η παρουσία των εν λόγω ενζύμων ήταν αυτή της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση περιλαμβάνει διεργασίες κατά τις οποίες φορτισμένα μόρια κινούνται με την επιβολή ηλεκτρικού πεδίου. Για την ταυτοποίηση της απομονωμένης πρωτεΐνης, ή τον διαχωρισμό πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό διάλυμα, αξιοποιείται η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή (gel) πολυακρυλαμιδίου. Η αρχή της μεθόδου έγκειται στη λειτουργία της πηκτής ως μοριακό κόσκινο, από το οποίο διέρχονται αποδιεταγμένα και φορτισμένα μόρια πρωτεΐνης με συγκεκριμένη ταχύτητα ανάλογα το μοριακό τους βάρος, με την επιβολή τάσης.

Αρχικά, χρειάστηκε να γίνει μια προκατεργασία στα δείγματα με στόχο τόσο την αρνητική επιφόρτισή τους καθώς και την καταστροφή της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών, μιας και το gel που χρησιμοποιήθηκε ήταν ένα πολυμερές με διάφορους πόρους. Για να γίνουν τα παραπάνω, χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα (loading buffer) (πίνακας 4.4) το οποίο περιείχε τα εξής:

- ❖ 2-μερκαπτοαιθανόλη, η οποία βοήθησε στην αναδιάταξη των πρωτεϊνών μέσω διάσπασης δισουλφιδικών δεσμών. Κάνοντας γραμμικά τα μόρια των πρωτεϊνών, έγινε πιο εύκολη η διόδός τους από τους πόρους.
- ❖ Γλυκερόλη, η οποία βοήθησε στην αύξηση της πυκνότητας των πρωτεϊνικών δειγμάτων.
- ❖ Λαουρυλοθειϊκό νάτριο (Sodium dodecyl sulfate, SDS), το οποίο βοήθησε στην αρνητική φόρτιση των πρωτεϊνών.
- ❖ Χρωστική, η οποία περιείχε βρομοαιθανόλη και Tris-base.

Πρώτα από όλα, από κάθε δείγμα ελήφθησαν 40 μL εκτός από τα δείγματα HiC/LCC^{ICCG} 100A, HiC/LCC^{ICCG} 100B και HiC/LCC^{ICCG} 100Γ από τα οποία ελήφθησαν 20 μL και προστέθηκαν 20 μL νερό και 10 μL από το loading buffer. Στη συνέχεια τα δείγματα οδηγήθηκαν για βρασμό σε υδατόλουτρο όπου

παρέμειναν για 5 min. Ο βρασμός βοήθησε στο να γίνει πιο εύκολα η αναδιάταξη των πρωτεϊνών. Πριν ξεκινήσει η ηλεκτροφόρηση προετοιμάστηκε η πηκτή πολυακρυλαμιδίου η οποία αποτελείται από δύο μέρη, την πηκτή διαχωρισμού (resolving gel) και την πηκτή επιστοίβασης (stacking gel). Έτσι, παρασκευάστηκε το resolving gel και έγινε απόχυσή του ανάμεσα στις δύο πλάκες καλύπτοντας τα $\frac{3}{4}$ του όγκου. Πάνω από το gel προστέθηκε νερό έως την επιφάνεια της διάταξης για να γίνει εξομάλυνση και να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες. Μετά από 20min, αφού είχε ήδη πήξει το gel, έγινε απόχυση του νερού και παρασκευάστηκε το stacking gel. Αυτό με τη σειρά του προστέθηκε πάνω από το resolving gel και ύστερα τοποθετήθηκαν κάποια ειδικά εξαρτήματα («χτενάκια» 10 θέσεων) έτσι ώστε να δημιουργηθούν οι θέσεις για να γίνει η φόρτωση των δειγμάτων. Με τα gel να είναι έτοιμα, το σύστημα υάλων που είχε δημιουργηθεί, τοποθετήθηκε εντός του ειδικού κελιού (Συσκευή ηλεκτροφόρησης διαχωρισμού πρωτεϊνών Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad) (εικόνα 4.9) και συμπληρώθηκε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) μέχρι το αναγραφόμενο ύψος για τη διέλευση του ρεύματος.

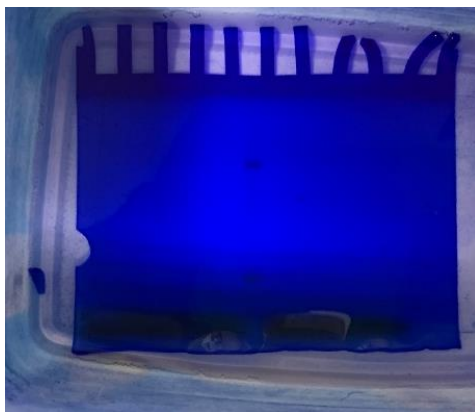


Εικόνα 4.9 Κελί ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα και τον μάρτυρα φορτωμένα στο gel.

Μόλις λοιπόν ήταν έτοιμο το σύστημα, ξεκίνησε η φόρτωση των δειγμάτων, με τη σειρά που προέκυψαν και τα κλάσματα από τη χρωματογραφία. Εκτός από τα δείγματα από τα διάφορα κλάσματα, σε μία θέση φορτώθηκε κι ένας μάρτυρας (ladder). Στην εικόνα 4.9 φαίνονται τα δείγματα όπως φορτώθηκαν στις θέσεις που είχαν δημιουργηθεί από τα χτενάκια πάνω στο gel. Η ποσότητα του ladder που φορτώθηκε ήταν ίση με 3,5 μL και ο λόγος για τον οποίο

χρησιμοποιήθηκε ήταν διότι βοήθησε στο τέλος της διαδικασίας να γίνει η ταυτοποίηση του μοριακού βάρους του επιθυμητού ενζύμου.

Έχοντας κάνει αυτά, πραγματοποιήθηκε έναρξη της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης. Συνδέοντας την άνοδο, που βρισκόταν στο εξωτερικό τμήμα των 2 gel, καθώς και την κάθοδο, που βρισκόταν στον χώρο μεταξύ των 2 gel, με το τροφοδοτικό, ξεκίνησε η παροχή του ρεύματος. Στην αρχή, και μέχρι τα δείγματα με τον μάρτυρα «να κατέβουν» από τις θέσεις φόρτωσης, το σύστημα τροφοδοτούνταν με 50 V. Μετά από 30 min, όσο δηλαδή διήρκεσε αυτό το βήμα, αυξήθηκαν τα volts από 50 σε 100 για περίπου 120 min μέχρις ότου που τα δείγματα έφτασαν στο τέλος των gel. Ύστερα από αυτό, σειρά είχε η οπτικοποίηση του ενζύμου πάνω στο gel. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ένα διάλυμα χρωματισμού (staining solution) (πίνακας 4.4), το οποίο αφότου προστέθηκε, το σύστημα παρέμεινε υπό ήπια ανάδευση για 60 min, οδηγώντας σε απορρόφηση αυτού του διαλύματος από τα gel. Το διάλυμα αυτό, τα μετέτρεψε από σχεδόν άχρωμα σε μπλε (εικόνα 4.10).



Εικόνα 4.10 Gel με τα δείγματα από τη χρωματογραφία του ενζύμου LCC^{ICCG} μετά την προσθήκη του staining solution.

Για να μπορέσουν όμως να εμφανιστούν οι περιοχές στις οποίες αντιστοιχούν τα ένζυμα, χρειάστηκε να γίνει ο αποχρωματισμός των gel. Έτσι λοιπόν, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αποχρωματισμού (destaining solution) (πίνακας 4.4) το οποίο περιείχε τις ίδιες ενώσεις με το staining χωρίς όμως να περιέχεται σε αυτό η χρωστική. Η προσθήκη του destaining solution οδήγησε στην αλληλεπίδραση

του διαλύτη αυτού του διαλύματος με τη χρωστική που είχε απορροφηθεί από το gel με αποτέλεσμα η δεύτερη να αρχίσει να διαχέεται προς το διαλύτη κι έτσι να επιτυγχάνεται ο αποχρωματισμός τους. Οι περιοχές ωστόσο των ενζύμων δεν αποχρωματίστηκαν καθώς η χρωστική δημιουργεί ομοιοπολικούς δεσμούς με τις πρωτεΐνες. Τα gel παρέμειναν overnight (≈ 17 h) στο destaining solution και την επόμενη μέρα παρατηρήθηκε πλήρης αποχρωματισμός τους εκτός από τα σημεία ενδιαφέροντος.

Συμπύκνωση παραγόμενης κουτινάσης

Μιας και στην παρούσα διπλωματική δίνεται περισσότερη έμφαση στο ένζυμο LCC^{ICCG}, εξ αρχής δημιουργήθηκαν περισσότερες καλλιέργειες για αυτό το ένζυμο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, ο όγκος του διαλύματος που προέκυψε για αυτό το ένζυμο να είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο της HiC. Για να μπορεί να είναι πιο διαχειρίσιμος ο τελικός όγκος του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση με χρήση μεμβρανών Ultracel® 10 kDa Ultrafiltration Discs (Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore). Ενώνοντας τα κατάλληλα επιλεγμένα κλάσματα της χρωματογραφίας προέκυψε το τελικό πρωτεϊνικό διάλυμα με συνολικό όγκο 50 mL. Κατά τη διαδικασία της συμπύκνωσης χρησιμοποιήθηκε μια μεμβράνη συγκεκριμένου πορώδους (10 kDa) (cut-off) η τιμή του οποίου είναι μικρότερη από το MB του ενζύμου (30 kDa). Επιβάλλοντας υψηλή πίεση στο σύστημα, ενώσεις με MB μικρότερο του συγκεκριμένου cut-off μπορούν και διαπερνούν τη μεμβράνη αλλά όχι το επιθυμητό ένζυμο με αποτέλεσμα τη συμπύκνωσή του. Παράλληλα, η χρήση μαγνητικής ανάδευσης σε όλη τη διάρκεια του φαινομένου βοήθησε στην αποφυγή φαινομένων μετουσίωσης του ενζύμου στην επιφάνεια της μεμβράνης λόγω διατμητικών τάσεων καθώς εξασφαλιζόταν ομοιόμορφη συγκέντρωση. Η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται υπερδιήθηση και οδηγεί σε πιο συμπυκνωμένα διαλύματα του επιθυμητού ενζύμου με μικρότερους όγκους οι οποίοι είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμοι. Μόλις ολοκληρώθηκε η διαδικασία της συμπύκνωσης, ο τελικός όγκος στον οποίο ήταν διαλυμένο πλέον το ένζυμο ήταν ίσος με 27,5 mL. Παρατηρήθηκε πως το διάλυμα δεν ήταν απολύτως διαυγές και αυτό ενδεχομένως να οφειλόταν σε μόρια πρωτεΐνης που είχαν καθιζάνει λόγω κορεσμού του διαλύματος. Για αυτόν τον λόγο ακολούθησε φυγοκέντρηση (Ψυχόμενη φυγόκεντρος

ROTANTA 460R, Hettich ZENTRIFUGEN) για 5 min στους 4°C και όταν ολοκληρώθηκε το υπερκείμενο οδηγήθηκε σε νέο falcon και κατευθείαν σε δοχείο με πάγο.

Εξισορρόπηση μέσω διαπίδυσης

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Έχοντας συμπυκνώσει το διάλυμα της LCC^{ICCG} που είχε προκύψει μετά τη χρωματογραφία, μπορούσε πλέον να ξεκινήσει η διαδικασία της διαπίδυσης (dialysis) και για τα δύο ένζυμα. Κατά τη διαδικασία αυτή, πραγματοποιείται αλλαγή των ρυθμιστικών διαλυμάτων στα οποία είναι διαλυτά τα ένζυμα με νέα τα οποία δεν περιέχουν ιμιδαζόλιο καθώς τα ένζυμα επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για βιοτεχνολογικούς σκοπούς στη συνέχεια, οπότε η παρουσία του ιμιδαζολίου είναι ανεπιθύμητη. Επίσης, η αλλαγή του διαλύματος βοηθά και κατά τη μακροχρόνια αποθήκευση των ενζύμων καθώς μπορούν και παραμένουν σταθερά όταν είναι διαλυτά. Επομένως αυτό που επιτυγχάνεται με τη διαπίδυση είναι στην ουσία μια εξισορρόπηση καθώς πραγματοποιείται η ανταλλαγή ιόντων μέσω ημιπερατής μεμβράνης κυτταρίνης.

Πειραματική δραστηριότητα

Για την επιτυχή εξισορρόπηση του διαλύματος σε 17 h απαιτείται ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι τουλάχιστον 100 φορές μεγαλύτερος από τον όγκο του πρωτεϊνικού κλάσματος. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για το ένζυμο LCC^{ICCG} ήταν το Talon 0,5x με pH=7,5, ενώ για το ένζυμο HiC χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM με pH=8,0. Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε (Μεμβράνη διαπίδυσης Molecular Porous Membrane Tubing, Spectra Por Membranes) είχε cut-off τα 14 kDa με αποτέλεσμα οτιδήποτε είχε μοριακό βάρος μεγαλύτερο από αυτή την τιμή να μην μπορούσε να τη διαπεράσει. Οι μεμβράνες υποβλήθηκαν πρώτα σε μια προκατεργασία. Συγκεκριμένα, ξεπλύθηκαν 3 φορές με υπερκάθαρο νερό ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα αποθήκευσής τους και οποιαδήποτε άλλη ακαθαρσία. Ύστερα, χρειάστηκε να τοποθετηθούν για 30 min σε βραστό υπερκάθαρο νερό με σκοπό να ενυδατωθούν. Όταν ήταν πλέον έτοιμες για χρήση, προστέθηκε σε κάθε μια το

αντίστοιχο τελικό κλάσμα, αφού πρώτα είχε σφραγιστεί η μια πλευρά τους με μανταλάκι μιας και είναι ανοιχτές και από τις δύο πλευρές. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε ο αέρας από τον κενό χώρο πιέζοντας ελαφρά και ακολούθως σφραγίστηκαν και από την άλλη πλευρά. Η κάθε μεμβράνη τοποθετήθηκε μέσα στο αντίστοιχο δοχείο (εικόνα 4.11) με το σωστό ρυθμιστικό διάλυμα και το κάθε σύστημα αφέθηκε στους 4°C όπου παρέμειναν μέχρι την επόμενη μέρα με σκοπό να γίνει η ανταλλαγή των ιόντων μέσω της διαδικασίας της ώσμωσης.

Ώσμωση, ονομάζεται το φαινόμενο της διέλευσης μορίων διαλύτη, μέσω ημιπερατής μεμβράνης, από τον διαλύτη στο διάλυμα ή από το διάλυμα μικρότερης συγκέντρωσης (αραιότερο) προς το διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης σε διαλυμένη ουσία (πυκνότερο).



Εικόνα 4.11 Δοχείο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η διαπίδυση. Στο δοχείο περιέχεται η μεμβράνη με τα κλάσματα HiC 100A και HiC 100B που προέκυψαν από τη χρωματογραφία συγγένειας καθώς και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 20 mM.

Προσδιορισμός συγκέντρωσης ενζύμων

Την επόμενη μέρα, αφότου είχε ολοκληρωθεί η μέθοδος της διαπίδυσης, ακολούθησε φυγοκέντρηση του πρωτεϊνικού κλάσματος, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν πρωτεϊνικά μόρια που μπορεί να είχαν καθιζάνει. Από το υπερκείμενο, χρησιμοποιήθηκε ένα μικρό δείγμα για φωτομέτρηση ώστε να γίνει ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του ενζύμου. Η φωτομέτρηση έγινε στα 280 nm, όπως

προαναφέρθηκε, και για να μετατραπεί η τιμή της απορρόφησης σε συγκέντρωση, χρησιμοποιήθηκε ο νόμος Beer-Lambert (εξίσωση 4.1).

Εξίσωση 4.1 Σχέση Beer-Lambert, μέσω της οποίας γίνεται μετατροπή της απορρόφησης στα 280 nm σε συγκέντρωση.

$$A_{280} = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

όπου,

A_{280} : η τιμή της απορρόφησης στα 280 nm.

ε : ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας $\left[\frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}\right]$.

b : το μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας στην κυψελίδα, ίσο με 0,67 cm.

C : η συγκέντρωση του ενζύμου [M].

Όσον αφορά τον συντελεστή γραμμομοριακής απορροφητικότητας, η τιμή του εξαρτάται από την αμινοξική αλληλουχία. Για το ένζυμο LCC^{ICCG}, η τιμή του ε είναι ίση με $37150 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}$, ενώ για το ένζυμο HiC είναι ίση με $13200 \frac{1}{\text{M}\cdot\text{cm}}$. Οι τιμές αυτές προέκυψαν με τη χρήση του υπολογιστικού εργαλείου ProtParam [7].

Ακίνητοποίηση των ενζύμων

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Οι ποσότητες των τελικώς εκφραζόμενων ενζύμων όντας διαλυμένες όπως προαναφέρθηκε μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα, βρίσκονταν σε ελεύθερη μορφή. Για να μπορέσουν να αξιοποιηθούν στη συνέχεια στα πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού, χρειάστηκε να γίνει ακίνητοποίησή τους πάνω σε κάποιους φορείς. Μέσω της διαδικασίας της ακίνητοποίησης, η κίνηση των μορίων ενός ενζύμου στο χώρο παρεμποδίζεται σε μέγιστο ή απόλυτο βαθμό με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας αδιάλυτης στο νερό ενζυμικής φάσης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν φορείς φτιαγμένοι από γυαλί ελεγχόμενου πορώδους (Controlled porosity glass, CPG) φέροντας επικάλυψη από διάφορα, πολυμερικά κυρίως υλικά (hybrid CPG, hybCPG) ώστε να μπορούν να ανταποκριθούν σε πληθώρα εφαρμογών ανάλογα την υδροφιλία του ενζύμου. Τα σφαιρικά αυτά σωματίδια

των φορέα φέρουν στην επιφάνειά τους ιόντα Fe(III) με αποτέλεσμα να μπορούν να δημιουργούν σύμπλοκα με συγκεκριμένα τμήματα πρωτεϊνών όπως είναι οι ουρές πολυ-ιστιδινών κατ' αντιστοιχία με τη χρωματογραφία συγγένειας. Έτσι επιτυγχάνεται ταυτόχρονος καθαρισμός και ακινητοποίηση των ενζύμων και μάλιστα χωρίς να υπάρχει παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου του ενζύμου όπως πιθανόν θα συνέβαινε αν η ακινητοποίηση γινόταν μέσω προσρόφησης, καθώς το ένζυμο παραμένει στην επιφάνεια του φορέα χωρίς να τροποποιείται η δομή του. Ωστόσο, η απόδοση μιας τέτοιας μεθόδου ακινητοποίησης δεν είναι απόλυτη (100%) και για αυτό τον λόγο χρειάστηκε να μελετηθούν κάποιες παράμετροι.

Πειραματική δραστηριότητα

Το πρώτο που ελέγχθηκε ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση κάθε ενζύμου καθώς θα μπορούσε να επηρεάζει τη σύνδεση ενζύμου-Fe³⁺. Η εταιρεία (EnginZyme), η οποία προμηθεύει τους συγκεκριμένους φορείς προτείνει συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα για την ακινητοποίηση, όμως μέσα από πειράματα φάνηκε ότι τελικά ήταν καλύτερα τα ρυθμιστικά διαλύματα στα οποία ήταν ήδη αποθηκευμένα το ένζυμο (Talon 0,5x με pH=7,5 για το ένζυμο LCC^{ICCG}, Tris-HCl 20 mM με pH=8,0 για το ένζυμο HiC) μιας και όταν άλλαζε το ρυθμιστικό διάλυμα, έχαναν τη σταθερότητά τους. Ένας δεύτερος παράγοντας που μελετήθηκε ήταν ο χρόνος της διαδικασίας της ακινητοποίησης από όπου φάνηκε ότι οι 3 h ήταν ο ιδανικός χρόνος για να επιτευχθεί η μέγιστη απόδοση. Μετά το πέρας δηλαδή των 3 h, η απόδοση της ακινητοποίησης παρέμενε σταθερή. Εκτός αυτών, σημαντικός είναι και ο λόγος της ποσότητας του ενζύμου προς την ποσότητα του φορέα καθώς αν η ποσότητα του δεύτερου δεν επαρκεί για να ακινητοποιήσει όλη την ποσότητα, τότε η διαδικασία θα έχει χαμηλή απόδοση. Ύστερα από μια σειρά πειραμάτων δοκιμάζοντας διαφορετικούς λόγους (0,2-1,5), το αποτέλεσμα ήταν πως η καλύτερη απόδοση επιτεύχθηκε όταν ο λόγος αυτός ήταν ίσος με 0,2. Ο τελευταίος παράγοντας που μελετήθηκε, και ίσως ο πιο σημαντικός, ήταν το είδος του φορέα. Όπως προαναφέρθηκε, οι φορείς που χρησιμοποιήθηκαν αποτελούνταν από γυαλί ελεγχόμενου πορώδους. Όσον αφορά το ένζυμο LCC^{ICCG}, ο φορέας που

χρησιμοποιήθηκε ήταν υβριδικός καθώς έφερε επικάλυψη στην επιφάνειά του επηρεάζοντας την υδροφιλία του. Το κάθε ένζυμο έχει διαφορετική επιφανειακή φόρτιση, άρα και διαφορετική υδροφιλία. Κάνοντας διάφορα πειράματα προέκυψε πως η μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης για το ένζυμο LCC^{ICCG} επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ο φορέας EziG 3 (Amber) ο οποίος είναι ημι-υδρόφιλος, φτιαγμένος από hybCPG με αναμεμειγμένο συμπολυμερές. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του ενζύμου HiC, έγινε χρήση του φορέα EziG 2 (Coral). Συγκεκριμένα, πρόκειται για έναν επίσης υβριδικό, υδρόφοβο φορέα, φτιαγμένο από hybCPG με επικάλυψη από πολύ(βίνυλο βενζυλοχλωρίδιο) (PVBC).

Η ακινητοποίηση έλαβε χώρα σε επωαστήρα του οποίου η ανάδευση είχε ρυθμιστεί στα 100 rpm και η θερμοκρασία στους 4°C έτσι ώστε το ένζυμο να παραμένει σταθερό. Μετά το πέρας των 3 h, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των συστημάτων ώστε να καθιζάνουν οι φορείς. Από το υπερκείμενο έγινε δειγματοληψία και ακολούθησε φωτομέτρηση στα 280 nm για να βρεθούν οι αποδόσεις ακινητοποίησης μέσα από την εξίσωση 4.2.

Εξίσωση 4.2 Απόδοση ακινητοποίησης μέσω απορρόφησης στα 280nm.

$$\text{απόδοση ακινητοποίησης} = \frac{A_{280_{\text{πριν}}} - A_{280_{\text{μετά}}}}{A_{280_{\text{πριν}}}} \cdot 100\%$$

Εκτός από την απόδοση ακινητοποίησης, υπολογίζονται και οι φορτώσεις (loading) των ενζύμων στους φορείς χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.3.

Εξίσωση 4.3 Υπολογισμός φόρτωσης (loading) ενζύμων στους βιοκαταλύτες.

$$\text{loading} = \frac{\text{Μάζα ακινητοποιημένης πρωτεΐνης}}{\text{Συνολική μάζα βιοκαταλύτη}} \cdot 100\%$$

Λυοφιλίωση (Freeze drying)

Το τελευταίο βήμα ήταν το να αποκτήσουν οι βιοκαταλύτες την τελική τους μορφή, δηλαδή ξηρή σκόνη, ώστε να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν στα

πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού. Αρχικά έγινε ξανά φυγοκέντρηση για 5 min στους 4°C, οι φορείς με τα ακινητοποιημένα ένζυμα καθίζαναν και στη συνέχεια απομακρύνθηκε όλο το υπερκείμενο, που εμπεριείχε ποσότητα ελεύθερου ενζύμου (LCC^{LCCG} και HiC αντίστοιχα). Έπειτα, προστέθηκαν 10-12 mL από το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης κάθε ενζύμου. Έγινε ανάδευση ώστε να επαναιωρηθούν οι βιοκαταλύτες στα ρυθμιστικά διαλύματα και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση για 5 min. Το υπερκείμενο από κάθε περίπτωση απομακρύνθηκε και ακολούθησε η ίδια διαδικασία για άλλες δύο φορές με σκοπό να «ξεπλυθούν» οι βιοκαταλύτες. Μετά από αυτές τις δύο επαναλήψεις, απομακρύνθηκε όσο το δυνατόν περισσότερη ποσότητα από τα υπερκείμενα ρυθμιστικά διαλύματα, και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα falcons στην κατάψυξη ώστε το περιεχόμενό τους να παγώσει. Η διαδικασία ξήρανσης που επιλέχθηκε ήταν αυτή της λυοφιλίωσης ή αλλιώς κρυοξήρανσης (freeze drying) κατά την οποία πραγματοποιήθηκε εξάχνωση του πάγου με τη χρήση κενού. Για αυτό τον λόγο τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη, ώστε η μικρή ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος που είχε παραμείνει να ψυχθεί σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια να απομακρυνθεί μέσω εξάχνωσης εφαρμόζοντας κενό.

4.2. Χαρακτηρισμός βιοκαταλύτη

4.2.1. Υλικά

Όσον αφορά τα πειράματα για τη μέτρηση της ενεργότητας τόσο του ελεύθερου όσο και του ακινητοποιημένου ενζύμου (LCC^{LCCG}), καθώς επίσης και τα πειράματα χαρακτηρισμού του βιοκαταλύτη, πραγματοποιήθηκαν όλα χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον εστέρα του παρα-νιτροφαίνυλο δωδεκανοϊκού οξέος (para nitrophenyl laurate ή pNPL). Το υπόστρωμα αυτό είναι διαλυμένο σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide ή DMSO), δημιουργώντας stock pNPL σε DMSO με συγκέντρωση 20 mM. Η συνταγή του τελικού διαλύματος με το οποίο αντέδρασε το ένζυμο σε όλες τις μορφές του (ελεύθερο ή ακινητοποιημένο), φαίνεται στον πίνακα 4.7.

Πίνακας 4.7 Συστατικά μέσου (Mastermix) με το οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις ενεργότητας καθώς και οι χαρακτηρισμοί των στερεών βιοκαταλυτών.

Συστατικά	Συγκέντρωση	pH
Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών – φωσφορικών	100 mM	6
Stock pNPL σε DMSO	1-1,1 mM	-
Αραβικό κόμμι (gum Arabic)	0,25% w/v	-
Triton x 100	1% v/v	-

4.2.2. Μέτρηση ενεργότητας ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου

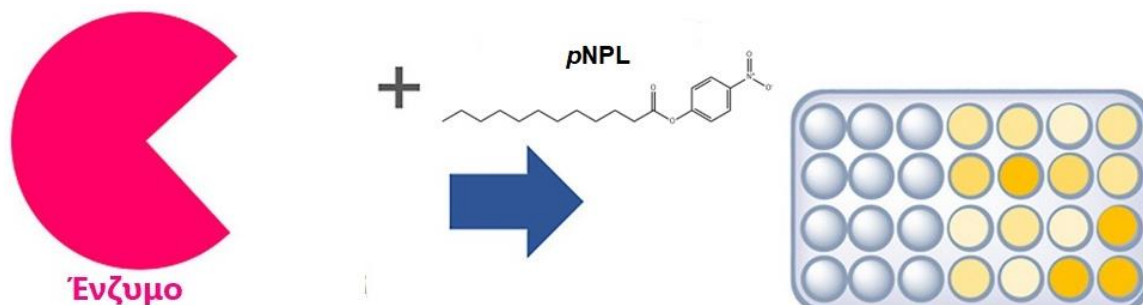
Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό για ένα ένζυμο, είτε αυτό είναι ελεύθερο (διαλυμένο σε κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα) είτε ακινητοποιημένο, είναι η ενεργότητά του. Είναι το μέγεθος που χαρακτηρίζει πόσο δραστικό είναι ένα ένζυμο απέναντι σε κάποιο υπόστρωμα. Η ενεργότητα συνήθως μετριέται σε μονάδες Units/mg_{ενζύμου}, όπου 1 Unit είναι ίσο με τα μmoles υποστρώματος που καταναλώνονται ανά λεπτό. Επομένως, η μονάδα μέτρησης μετατρέπεται σε μmoles_{ποστρωμ.}/(mg_{ενζύμου}·min).

Η μέτρηση της ενεργότητας, γίνεται συνήθως με βάση κάποια πρωτόκολλα (assays ενεργότητας) όπου χρησιμοποιείται κάποιο υπόστρωμα, τέτοιο ώστε να μπορεί να αλληλοεπιδρά με το ένζυμο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η LCC^{ICCG} είναι μια κουτινάση η οποία μπορεί να διασπά εστερικούς δεσμούς. Για αυτόν τον λόγο, για τη μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου αυτού, χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα το pNPL, ένας εστέρας με 12 άτομα C, όπου στην άκρη της αλυσίδας του υπάρχει ένα μόριο pNP συνδεδεμένο με εστερικό δεσμό. Όταν ο εστερικός αυτός δεσμός υδρολύεται, απελευθερώνεται ένα μόριο δωδεκανοϊκού οξέος και ένα μόριο 4-νιτροφαινόλης (pNP), η ιοντισμένη μορφή του οποίου προσδίδει μία κίτρινη χρώση στο μέσο της αντίδρασης όπως ακριβώς φαίνεται και στην εικόνα 4.12.

Μετριέται η απορρόφηση αυτού του κιτρινισμού, στα 410 nm, και στη συνέχεια μετατρέπεται σε ενεργότητα με τους κατάλληλους υπολογισμούς. Όσο μεγαλύτερη η απορρόφηση, τόσο πιο έντονος είναι ο κιτρινισμός, δηλαδή τόσα

περισσότερα μόρια *p*NP έχουν απελευθερωθεί, οδηγώντας έτσι σε όλο και μεγαλύτερη τιμή ενεργότητας.



Εικόνα 4.12 Σχηματική αναπαράσταση διάσπασης του εστερικού δεσμού του *p*NPL από το ένζυμο, γεγονός που οδηγεί σε κιτρινισμό του μέσου αντίδρασης.

Πειραματική δραστηριότητα για τη μέτρηση ενεργότητας του ελεύθερου ενζύμου
Αρχικά ποσότητα του υποστρώματος διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), δημιουργώντας stock *p*NPL σε DMSO με συγκέντρωση 20 mM. Ποσότητα από αυτό το stock διαλύθηκε σε κατάλληλο διαλύτη ο οποίος ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών και φωσφορικών ιόντων (Citrate-Phosphate, C-P) με pH=6 και συγκέντρωση 100 mM. Επειδή όμως το συγκεκριμένο υπόστρωμα είναι αρκετά δυσδιάλυτο σε υδατικά διαλύματα, προστέθηκαν ακόμα κάποιες ουσίες οι οποίες λειτούργησαν ως τασιενεργά ώστε να βοηθήσουν στην ευκολότερη διάλυση του *p*NPL. Συγκεκριμένα προστέθηκε αραβικό κόμμι (gum Arabic) το οποίο είναι ένας γαλακτωματοποιητής, σε συγκέντρωση 0,25% w/v καθώς επίσης και Triton x 100 που είναι μια επιφανειοδραστική ουσία, σε συγκέντρωση 1% v/v. Όλο αυτό το σύστημα μαζί ονομάστηκε Mastermix και αποτέλεσε το μέσο στο οποίο πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος.

Οι αντιδράσεις στην περίπτωση όπου το ένζυμο ήταν ελεύθερο έλαβαν χώρα σε VIS-πλάκα 96 θέσεων, και πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις με το ένζυμο, χάριν επαναληψιμότητας, καθώς και δύο αντιδράσεις χωρίς αυτό, αλλά με προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος αποθήκευσης (Talon 0,5x με pH=7,5) (Blank) έτσι ώστε να αφαιρεθεί η απορρόφηση που μπορεί να οφείλεται σε τυχόν

αυτοϋδρόλυση του υποστρώματος. Η κάθε αντίδραση είχε όγκο 250 μL , από τα οποία τα 20 μL ήταν ο όγκος του ενζύμου (ρυθμιστικό διάλυμα αποθήκευσης στην περίπτωση των Blank) και τα 230 μL ήταν ο όγκος του mastermix.

Σε κάθε αντίδραση η συγκέντρωση του $p\text{NPL}$ έπρεπε να είναι ίση με 1 mM. Αν φτιαχνόταν mastermix με συγκέντρωση $p\text{NPL}$ ίση με 1 mM, τότε προσθέτοντας έπειτα τα 20 μL ενζύμου, η συγκέντρωση του υποστρώματος θα μειωνόταν. Για αυτόν τον λόγο υπολογίστηκε η συγκέντρωση του $p\text{NPL}$ στο mastermix στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου μέσω του νόμου αραιώσης.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \Rightarrow C_1 = \frac{1 \text{ mM} \cdot 250 \mu\text{L}}{230 \mu\text{L}} \Rightarrow C_1 \approx 1,1 \text{ mM}$$

Έχοντας ετοιμάσει επομένως το mastermix με συγκέντρωση υποστρώματος 1,1 mM, τοποθετήθηκαν 230 μL σε 5 θέσεις και στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μL ενζύμου στις 3 θέσεις και 20 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα της διαπίδυσης στις άλλες δύο που αποτελούσαν δείγματα Blank. Η αντίδραση διήρκησε 10 min εντός του φωτόμετρου στους 35°C, μετρώντας την απορρόφηση του κιτρινισμού στα 410 nm (Συσκευή φωτομέτρησης microplate SpectraMax® ABS Plus, Molecular Devices).

Πειραματική δραστηριότητα για τη μέτρηση ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση του ακινητοποιημένου ενζύμου με τη διαφορά ότι οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε thermomixer στους 35°C, διαβεβαιώνοντας τη σωστή ανάδευση του στερεού βιοκαταλύτη με το υδατοδιαλυτό υπόστρωμα, ίδιο με την περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου. Η συγκέντρωση του υποστρώματος στο mastermix ήταν 1 mM καθώς δεν υπήρχε κάποιο πρόβλημα αραιώσης από την παρουσία του στερεού βιοκαταλύτη. Ο αριθμός των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν ήταν τρεις και ο όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν ίσος με 1 mL. Εκτός των 3 αντιδράσεων του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν ακόμα 2 αντιδράσεις (Blank) όπου αντί για τον βιοκαταλύτη χρησιμοποιήθηκε σκέτος ο φορέας που είχε χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση του ενζύμου. Η ποσότητα του βιοκαταλύτη (και αντίστοιχα του φορέα για τα πειράματα Blank) που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίση με 0,5 mg ($\pm 0,05$).

Οι αντιδράσεις διήρκησαν 9 min, και μόλις ολοκληρώθηκαν έγινε αμέσως ταχεία φυγοκέντρηση (spindown) (Μικροφυγόκεντρο πάγκου Eppendorf 3200) ώστε να καθιζάνει ο στερεός βιοκαταλύτης και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο πάγο (4°C). Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση δειγμάτων από το υπερκείμενο στα 410 nm.

4.2.3. Προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

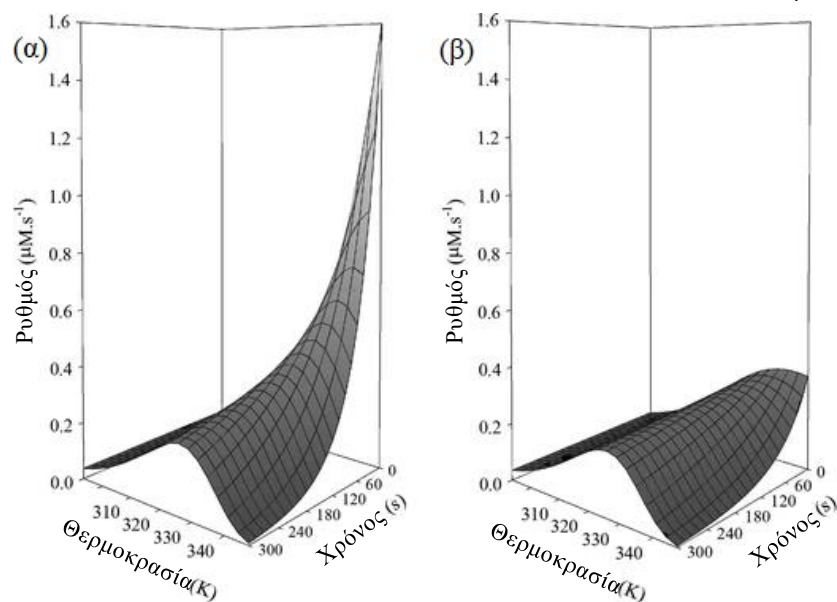
Ως γνωστόν οι πρωτεΐνες είναι μόρια πολύ ευαίσθητα σε αλλαγές της θερμοκρασίας καθώς όταν εκτίθενται σε ακραίες συνθήκες τότε χάνουν την ενεργότητά τους λόγω απενεργοποίησης. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως μετουσίωση και οδηγεί σε καθίζηση των ενζύμων καθώς πλέον δεν έχουν τη δυνατότητα να διαλύονται σε διαλύτες στους οποίους νωρίτερα μπορούσαν [8].

Αναζητώντας στη βιβλιογραφία περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στη δράση των ενζύμων, φαίνεται πως για πολλά χρόνια γινόταν χρήση του κλασικού μοντέλου (the Classical Model) σύμφωνα με το οποίο η ενεργότητα του ενζύμου αυξάνεται μέχρι ενός σημείου ($T_{opt.}$) και στη συνέχεια μειώνεται καθώς η περαιτέρω αύξησή της οδηγεί σε μετουσίωση του ενζύμου. Παρ' όλα αυτά, το μοντέλο αυτό εκλείπει της συσχέτισης με τον χρόνο [6].

Για αυτό τον λόγο έγινε εισαγωγή μιας νέας θεωρίας, με την ονομασία μοντέλο ισορροπίας (the Equilibrium model), σύμφωνα με το οποίο το ενεργό ένζυμο βρίσκεται σε ισορροπία με μια ανενεργή μορφή του ενζύμου η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται στη μετουσιωμένη μορφή μη αντιστρεπτά, όπως φαίνεται και από τη χημική εξίσωση στην εικόνα 4.13 [9].



Εικόνα 4.13 Μοντέλο ισορροπίας για την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου, όπου $E_{ενεργ.}$ είναι η ενεργή μορφή του ενζύμου, $E_{απενεργ.}$ είναι η απενεργοποιημένη του μορφή και X είναι η μετουσιωμένη του μορφή [9].



Διάγραμμα 4.1 Η εξάρτηση της ενεργότητας από τη θερμοκρασία και τον χρόνο όπως περιγράφεται α) μέσω του κλασικού μοντέλου και β) μέσω του μοντέλου ισορροπίας [9].

Στο διάγραμμα 4.1 φαίνονται συγκεντρωτικά τα διαγράμματα που περιγράφουν την επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου με βάση το κλασικό μοντέλο αλλά και το μοντέλο ισορροπίας. Το συγκεκριμένο διάγραμμα φανερώνει πως η ενεργότητα είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας αλλά και του χρόνου καθώς η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης (T_{opt}) του ενζύμου ολοένα και μειώνεται καθώς αυξάνεται ο χρόνος της αντίδρασης.

Πειραματική δραστηριότητα

Προσπάθεια για εύρεση της T_{opt} πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC^{ICCG} . Η μελέτη που έγινε αφορούσε τη δράση του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες όσον αφορά τη διάσπαση εστερικών δεσμών σε μόρια $p\text{NPL}$. Για αυτόν λοιπόν τον σκοπό, έλαβαν χώρα αντιδράσεις του βιοκαταλύτη χρησιμοποιώντας mastermix με την ίδια συνταγή που χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση της μέτρησης της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε διάφορες θερμοκρασίες σε thermomixer (50, 60, 70 και 80°C) όπου 0,5 mg βιοκαταλύτη ($\pm 0,05$) αντέδρασε με 1 mL mastermix για 9 min. Όταν ολοκληρώθηκε ο απαιτούμενος

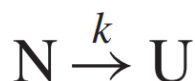
χρόνος, έγινε spindown των αντιδράσεων ώστε να καθιζάνει ο βιοκαταλύτης, μεταφέρθηκαν στο πάγο (4°C) και δείγμα από το υπερκείμενο φωτομετρήθηκε στα 410 nm ώστε να προσδιοριστεί η απορρόφηση λόγω του κιτρινισμού. Σε κάθε θερμοκρασία πραγματοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις με τον βιοκαταλύτη και άλλες δύο αντιδράσεις αναφοράς (Blank) στις οποίες χρησιμοποιήθηκε σκέτος ο φορέας της ακινητοποίησης.

4.2.4. Μελέτη της θερμοσταθερότητας του βιοκαταλύτη

Σύντομο θεωρητικό υπόβαθρο

Εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό με την ενεργότητα, είναι και η σταθερότητα ενός ενζύμου στις αλλαγές της θερμοκρασίας. Ως γνωστόν τα ένζυμα είναι μακρομόρια πρωτεϊνικής φύσεως, τα οποία όπως και κάθε πρωτεΐνη διαθέτουν μια τριτοταγή δομή στον χώρο η οποία είναι αποτέλεσμα διαφόρων αλληλεπιδράσεων τόσο μεταξύ των διαφόρων ομάδων των αμινοξέων όσο και μεταξύ των ομάδων των ενζύμων με τα μόρια του διαλύτη. Η δημιουργία της τριτοταγούς δομής είναι απαραίτητη προϋπόθεση για να μπορούν να παραμένουν σταθερά και ενεργά τα ένζυμα. Αυτή η αναδίπλωση που πραγματοποιείται, η οποία μοιάζει με τη δημιουργία μικκυλίων υδρόφοβων ενώσεων σε νερό, προκύπτει από διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων των αμινοξέων όπως είναι δυνάμεις Van der Waals, δεσμού υδρογόνου αλλά και δισουλφιδικοί δεσμοί, οδηγώντας σε μια διάταξη όπου οι υδρόφοβες πλευρικές ομάδες των αμινοξέων κλείνονται στο εσωτερικό της δομής, αφήνοντας στο εξωτερικό τις υδρόφιλες να αλληλοεπιδρούν με τα μόρια του διαλύτη [10].

Σύμφωνα με τον Feller [10], η σταθερότητα ορίζεται ως η ενέργεια της αντίδρασης κατά την οποία η πρωτεΐνη από τη φυσική αναδιπλωμένη κατάσταση της φτάνει στην πλήρως ξεδιπλωμένη της μορφή, όπως περιγράφεται από τη χημική εξίσωση στην εικόνα 4.14.



Εικόνα 4.14 Μη αντιστρεπτή αντίδραση στην οποία η πρωτεΐνη από τη φυσική της κατάσταση N φτάνει στην πλήρως ξεδιπλωμένη της μορφή U [10].

Πειραματική δραστηριότητα

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, το ακινητοποιημένο ένζυμο LCC^{ICCG} υποβλήθηκε σε πειράματα για να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητά του. Εξετάστηκε η σταθερότητα σε 3 διαφορετικές θερμοκρασίες (60,70 και 80°C), όπου ποσότητα βιοκαταλύτη ίση με 0,5 mg ($\pm 0,05$) παρέμεινε για επώαση σε αυτές τις θερμοκρασίες για διάφορες χρονικές στιγμές (από 3 έως 72 h) και στη συνέχεια υπολογίστηκε η εναπομένουσα ενεργότητα του βιοκαταλύτη σε εστερικό υπόστρωμα όπως είναι το pNPL. Οι ποσότητες του βιοκαταλύτη είχαν τοποθετηθεί σε erpendorfs μαζί με 1 mL ενός ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων 100 mM με pH=7,5 στο οποίο το ένζυμο εμφανίζει τη βέλτιστη δράση. Η επώαση έλαβε χώρα σε thermomixer όπου τα erpendorfs παρέμειναν υπό ανάδευση στα 700 rpm. Κάθε ζευγάρι θερμοκρασίας και χρονικού διαστήματος αποτελούσε μια τιμή για την οποία όμως χρησιμοποιήθηκαν 3 αντιδράσεις για να φανεί αν το αποτέλεσμα είναι έγκυρο και επαναλήψιμο.

Όταν ολοκληρωνόταν το χρονικό διάστημα της επώασης, κάθε τριάδα αντιδράσεων υποβαλλόταν σε ταχεία φυγοκέντρηση (spindown) ώστε να καθιζάνει ο βιοκαταλύτης και να απομακρυνθούν 900 μ L από το υπερκείμενο, τα οποία παρέμειναν στην άκρη. Έτσι σε κάθε erpendorf υπήρχε ο στερεός βιοκαταλύτης καθώς και 100 μ L από το υπερκείμενο buffer έτοιμα να οδηγηθούν για αντίδραση με το υπόστρωμα. Ο όγκος κάθε αντίδρασης ήταν ίσος με 1 mL όπως και στην περίπτωση της μελέτης του $T_{opt.}$, οπότε σε κάθε erpendorf προστέθηκαν 900 μ L mastermix, το οποίο παρασκευάστηκε ακολουθώντας την ίδια συνταγή με τις προηγούμενες περιπτώσεις.

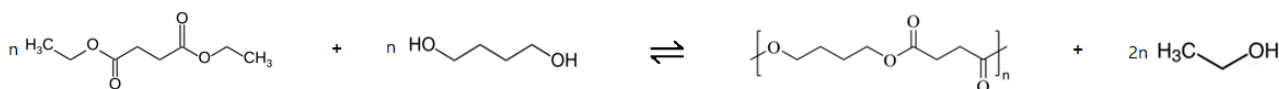
Ωστόσο, το μόνο πρόβλημα που υπήρχε πριν ξεκινήσουν οι αντιδράσεις ήταν το ενδεχόμενο εκρόφησης (leaking) του ενζύμου από τον φορέα το οποίο θα οδηγούσε σε μεταβλητά μειωμένη ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου και λανθασμένο αποτέλεσμα. Για τον σκοπό αυτό, 250 μ L από το υπερκείμενο που είχε παραμείνει στην άκρη φωτομετρήθηκαν στα 280 nm όπου φάνηκε πως πράγματι είχε πραγματοποιηθεί εκρόφηση μιας ποσότητας του ενζύμου. Έτσι λοιπόν για κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκαν 2 μετρήσεις. Στην πρώτη περιλαμβάνονταν η ποσότητα του στερεού καταλύτη, τα 100 μ L υπερκείμενου όπου υπήρχε όπως φάνηκε και μια ποσότητα ελεύθερου ενζύμου καθώς και 900 μ L mastermix (αντίδραση βιοκαταλύτη). Στη δεύτερη περιλαμβάνονταν ακριβώς τα

ίδια χωρίς όμως την ποσότητα του στερεού βιοκαταλύτη (αντίδραση υπερκείμενου).

Οι αντιδράσεις στη συνέχεια γίνονταν σε thermomixer στους 35°C για 10 min, ακολουθούσε ταχεία φυγοκέντρηση (spindown) και τέλος φωτομέτρηση δείγματος του υπερκείμενου στα 410 nm για να μετρηθεί η απορρόφηση του κιτρινισμού από την απελευθέρωση του pNP. Η τελική απορρόφηση, που οφειλόταν στη δράση του βιοκαταλύτη αποκλειστικά, προέκυπτε έπειτα από την αφαίρεση των δύο αποτελεσμάτων.

4.3. Ενζυμικός προπολυμερισμός

Έχοντας ολοκληρώσει την ετερόλογη έκφραση των πρωτεϊνών που θα χρησιμοποιηθούν, παραλαμβάνονται τα ακινητοποιημένα ένζυμα με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού για τη σύνθεση του PBS που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πολυμερών της Σχολής Χημικών Μηχανικών ΕΜΠ. Στην αντίδραση σύνθεσης του PBS συμμετέχουν δύο μονομερή, το SA και η BDO, δίνοντας ως παραπροϊόν το νερό σύμφωνα με τη χημική εξίσωση που φαίνεται στην εικόνα 1.10.



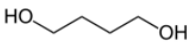
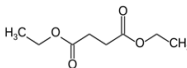
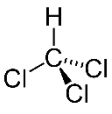
Εικόνα 4.15 Αντίδραση σύνθεσης PBS από BDO και DES.

Χρησιμοποιώντας όμως ως βιοκαταλύτες τις δύο αυτές κουτινάσες (HiC και LCC^{ICCG}), η παρουσία του νερού είναι ανεπιθύμητη καθώς σε υδατικά συστήματα οι κουτινάσες υδρολύουν εστερικούς δεσμούς. Για την αποφυγή αυτού του προβλήματος χρησιμοποιείται αντί του SA, ο ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (diethyl succinate ή DES) σύμφωνα με τη χημική αντίδραση που φαίνεται στην εικόνα 4.15 οδηγώντας στην παραγωγή αιθανόλης ως παραπροϊόν της αντίδρασης.

4.3.1. Υλικά

Όλα τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού είναι συγκεντρωμένα στον πίνακα 4.8.

Πίνακας 4.8 Χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού.

Αντιδραστήριο	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος	Προμηθευτής	Καθαρότητα (%)
1,4-βουτανδιόλη (BDO)	C ₄ H ₁₀ O ₂		Alfa Aesar	99
Ηλεκτρικός διαιθυλεστέρας (DES)	C ₈ H ₁₄ O ₄		Alfa Aesar	98
Χλωροφόρμιο	CHCl ₃		Sigma Aldrich	HPLC Grade ≥99,8%

Οι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα ένζυμα LCC^{ICCG} και HiC σε ακινητοποιημένη μορφή, η οποία προέκυψε όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 4.1.4.

4.3.2. Όργανα και συσκευές

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ενζυμικού προπολυμερισμού χρησιμοποιήθηκαν τα εξής:

- ❖ Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotavapor R-20, Buechi, Ελβετία) (εικόνα 4.16)
- ❖ Υδραργυρικό θερμόμετρο εμβαπτισμένο στο λουτρό του περιστροφικού εξατμιστήρα για περισσότερη ακρίβεια στη μέτρηση της θερμοκρασίας
- ❖ Σφαιρική φιάλη των 10 mL
- ❖ Σύστημα διήθησης υπό κενό

4.3.3. Πειραματική διαδικασία

Για κάθε έναν βιοκαταλύτη πραγματοποιήθηκε μια σειρά από αντιδράσεις δύο σταδίων με στόχο τη διερεύνηση της θερμοκρασίας του πρώτου σταδίου.

Πίνακας 4.9 Συνθήκες αντιδράσεων ενζυμικού πολυμερισμού για κάθε βιοκαταλύτη.

Ένζυμο	1° Στάδιο			2° Στάδιο		
	Χρόνος (h)	T (°C)	P (mbar)	Χρόνος (h)	T (°C)	P (mbar)
HiC	24	40	1000	2	70	200
	24	50	1000	2	70	200
	24	60	1000	2	70	200
LCC ^{ICCG}	24	50	1000	2	80	200
	24	60	1000	2	80	200
	24	70	1000	2	80	200

Οι συνθήκες των αντιδράσεων φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 4.9. Πριν ξεκινήσουν οι αντιδράσεις, ζυγίστηκαν οι απαραίτητες ποσότητες BDO (6 mmol=540,7 mg) και DES (6 mmol=1,0452 g) για την παραγωγή 1 g PBS. Το μείγμα μεταφέρθηκε στον περιστροφικό εξατμιστήρα όπου αναδεύθηκε για 30 min στη θερμοκρασία του πρώτου σταδίου κάθε πειράματος με σκοπό την ομογενοποίηση των μονομερών καθώς δεν είναι μεταξύ τους αναμίξιμα. Η συγκέντρωση του βιοκαταλύτη που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε με βάση πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού που είχαν πραγματοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτη το εμπορικό ένζυμο Novozym® 435 [11]. Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε ο βιοκαταλύτης σε συγκέντρωση ίση με 10% w/w ως προς τη μάζα των μονομερών. Θεωρώντας το loading του N435 ίσο με 10% [12], προκύπτει πως η συγκέντρωση της καθαρής πρωτεΐνης στα πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού ήταν ίση περίπου με 0,9% w/w ως προς τη μάζα των μονομερών.

Με βάση λοιπόν αυτά, και γνωρίζοντας ότι σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν περίπου 1586 mg μονομερών, έγινε προσπάθεια προσθήκης τόσης ποσότητας βιοκαταλύτη ώστε να επιτευχθεί η ίδια συγκέντρωση πρωτεΐνης. Χρησιμοποιώντας ~1586 mg μονομερών σε κάθε πείραμα, η προσπάθεια προσθήκης ~100 mg βιοκαταλύτη οδήγησε σε συγκέντρωση πρωτεΐνης ίση με 0,8% w/w ως προς τη μάζα των μονομερών και για τα δύο ένζυμα. Οι ακριβείς ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα φαίνονται στον πίνακα 4.10.

Πίνακας 4.10 Ποσότητες βιοκαταλυτών, πρωτεϊνών και τελικές συγκεντρώσεις ως προς τα μονομερή για κάθε πείραμα ενζυμικού προπολυμερισμού.

Πείραμα	Ποσότητα βιοκαταλύτη (mg)	Ποσότητα πρωτεΐνης (mg)	Τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης ως προς τα μονομερή (%w/w)
HiC_40	98,1	12,95	0,8
HiC_50	113,7	15,01	0,9
HiC_60	76,3	10,07	0,6
LCC_50	103,1	13,73	0,9
LCC_60	99,7	13,28	0,8
LCC_70	98,9	13,17	0,8



Εικόνα 4.16 Περιστροφικός εξατμιστήρας Rotavapor R-20, Buechi.

Μετά το πέρας των 30 min, έγινε η προσθήκη του βιοκαταλύτη σε κάθε περίπτωση. Οι ήπιες συνθήκες του πρώτου σταδίου (40-60°C για την HiC, 50-70°C για την LCC^{ICCG}, 1000 mbar) επιλέχθηκαν με σκοπό να αποφευχθούν οι απώλειες των μονομερών και να διερευνηθεί η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των ενζύμων. Με το πέρας των 24 h, η θερμοκρασία ανέβηκε στους 70°C για την HiC και στους 80°C για την LCC χρησιμοποιώντας κενό με σκοπό τη συνεχή απομάκρυνση του παραπροϊόντος οδηγώντας την ισορροπία συνεχώς προς τα δεξιά σύμφωνα με την αρχή Le Chatelier.

Το κάθε πείραμα ολοκληρώθηκε ύστερα από 2 h από τη στιγμή που εφαρμόστηκε το κενό και προστέθηκαν στη σφαιρική φιάλη 10-12 mg CHCl_3 έτσι ώστε να διαλυθεί το προϊόν. Το σύστημα παρέμεινε υπό ήπια ανάδευση για περίπου 24 h κι έπειτα ακολούθησε η διήθησή του υπό κενό για την ανάκτηση του βιοκαταλύτη (εικόνα 4.17). Ο βιοκαταλύτης παρέμεινε στο φίλτρο της διήθησης ενώ το διήθημα μεταφέρθηκε σε γυάλινο τρυβλίο και τοποθετήθηκε στον απαγωγό με σκοπό την εξάτμιση του CHCl_3 ώστε να προκύψει το τελικό προϊόν. Η παραπάνω πειραματική διαδικασία παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.18.



Εικόνα 4.17 Σύστημα διήθησης υπό κενό για την ανάκτηση του βιοκαταλύτη.

Όταν πλέον είχε γίνει η ξήρανση του προϊόντος ακολούθησε η μέτρηση της απόδοσης της διεργασίας ενζυμικού προπολυμερισμού (εξίσωση 4.4).

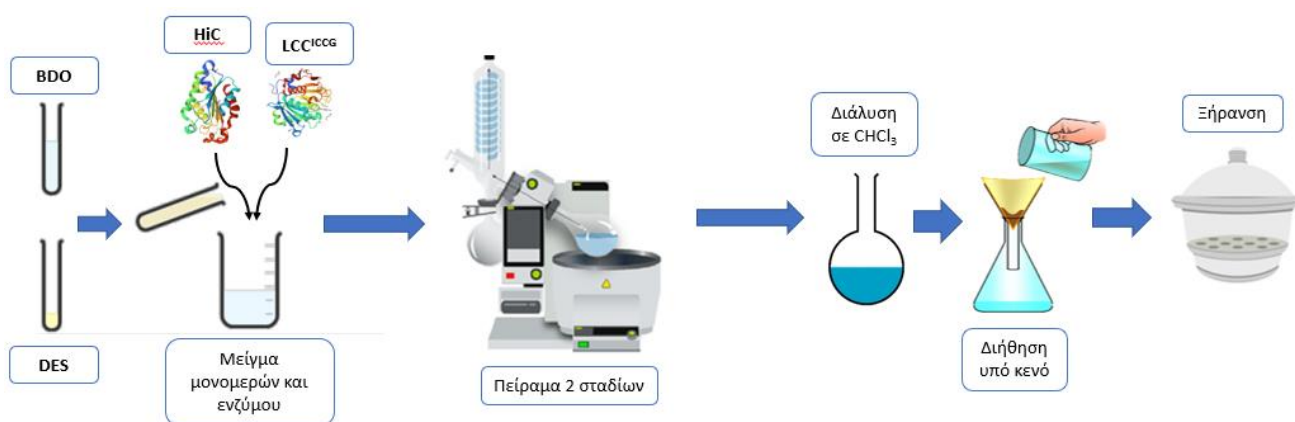
Εξίσωση 4.4 Απόδοση διεργασίας ενζυμικού προπολυμερισμού.

$$\text{Απόδοση διεργασίας \%} = \frac{m_{\text{πειραματικό}}}{m_{\text{θεωρητικό}}} \cdot 100\%$$

όπου

$m_{\text{πειραματικό}}$: η μάζα του τελικού προϊόντος όπως προέκυψε από τον ενζυμικό προπολυμερισμό

$m_{\text{θεωρητικό}}$: η μάζα που θα προέκυπτε αν είχαν χρησιμοποιηθεί οι στοιχειομετρικές ποσότητες των μονομερών.



Εικόνα 4.18 Σχηματική αναπαράσταση διαγράμματος ροής της πειραματικής διαδικασίας του ενζυμικού πολυμερισμού.

4.4. Μεταπολυμερισμός μάζας

4.4.1. Υλικά

Για τα πειράματα μεταπολυμερισμού μάζας, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα από το προϊόν του πειράματος LCC_70.

4.4.2. Όργανα και συσκευές

- ❖ Όργανο TGA/DSC 1 Star^e System Mettler Toledo.
- ❖ Καψίδια αλουμινίου (pans) όγκου 100 μL (βλ. ενότητα 4.5.4)

4.4.3. Πειραματική διαδικασία

Μέσω των πειραμάτων μεταπολυμερισμού μάζας στο TGA (βλ. ενότητα 4.5.5) πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης μεταπολυμερισμού. Πρώτο βήμα για τα πειράματα αυτά αποτέλεσε η δημιουργία των δειγμάτων που οδηγήθηκαν στο TGA για μεταπολυμερισμό. Ποσότητα από το προϊόν του προπολυμερούς LCC_70 τοποθετήθηκε στα pans αλουμινίου, τόση ώστε να γεμίσει το pan χωρίς όμως να γίνει υπερχείλιση. Συγκεκριμένα οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα φαίνονται στον πίνακα 4.11.

Πίνακας 4.11 Ποσότητες προπολυμερούς από το πείραμα LCC_70 που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα πειράματα μεταπολυμερισμού μάζας.

Πείραμα	Ποσότητα (mg)
M_4_90*	93,67
M_4_100	67,40
M_4_110	73,79
M_4_120	74,59
M_4_130	65,15

*M_x_y, όπου M=melt, x=ο χρόνος παραμονής στο TGA και y=η θερμοκρασία στην οποία έλαβε χώρα το πείραμα μεταπολυμερισμού.

4.5. Χαρακτηρισμός πρώτων υλών και προϊόντων

4.5.1. Φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR)

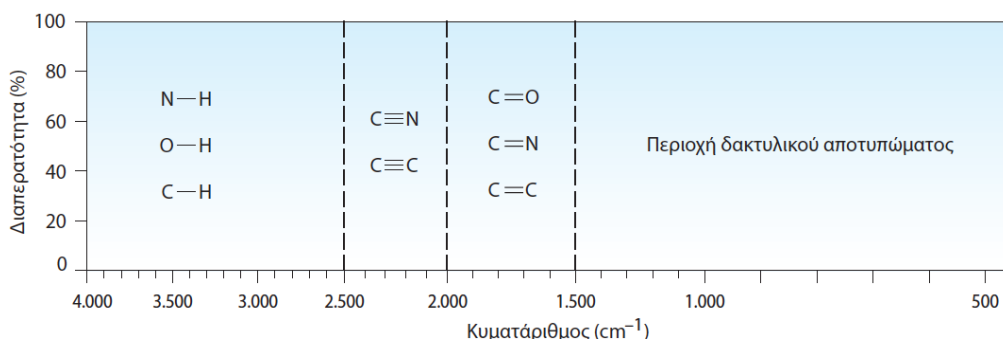
Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται ανάμεσα στην περιοχή του ορατού και σε αυτή των μικροκυμάτων με τους

κυματαριθμούς (κυματαριθμός = $1/\lambda$, όπου λ : μήκος κύματος σε cm) που αντιστοιχούν στην υπέρυθρη ακτινοβολία να κυμαίνονται από 12800 έως 10 cm^{-1} . Το μεγαλύτερο όμως ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή από 4000 έως 400 cm^{-1} . Αυτή η περιοχή μάλιστα χωρίζεται σε δύο επιμέρους αποτελούμενη από την περιοχή των χαρακτηριστικών ομάδων από 4000 έως 1400 cm^{-1} και από την περιοχή από 1400 έως 400 cm^{-1} η οποία χαρακτηρίζεται ως το «δακτυλικό αποτύπωμα» της εκάστοτε ένωσης [13]. Η φασματοσκοπία υπέρυθρου χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην επιστήμη πολυμερών καθώς πρόκειται για μια οπτική μέθοδο η οποία δεν καταστρέφει το δείγμα [14]. Τα αποτελέσματα που παρέχει είναι ποιοτικής κυρίως φύσεως αφού μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή της ένωσης της οποίας τα μόρια διεγείρονται σε υψηλότερες στάθμες δόνησης που είναι κβαντισμένες [13],[15]. Για να μπορέσουν ωστόσο να απορροφήσουν τα διάφορα μόρια υπέρυθρη ακτινοβολία, απαραίτητη προϋπόθεση είναι να διαθέτουν διπολική ροπή. Κατά τη διέγερσή τους, ανάλογα τη γραμμικότητα που παρουσιάζουν τα μόρια έχουν κάποιους βαθμούς ελευθερίας όσον αφορά την κίνησή τους στον χώρο οι οποίοι περιγράφουν τις δονήσεις στις οποίες υπόκεινται. Για ένα μη γραμμικό μόριο αποτελούμενο από N άτομα, οι δονητικοί βαθμοί ελευθερίας είναι $3N-6$ ενώ για ένα γραμμικό μόριο είναι $3N-5$. Οι δονήσεις αυτές κατατάσσονται κυρίως σε δύο κατηγορίες [16].

- ❖ Δονήσεις τάσης (stretching vibrations): είναι το αποτέλεσμα της συνεχούς παλλόμενης κίνησης δύο συνδεδεμένων μεταξύ τους ατόμων, μεταβάλλοντας τη μεταξύ τους απόσταση κατά μήκος του άξονα του δεσμού.
- ❖ Δονήσεις κάμψης (bending vibrations): χαρακτηρίζονται από μια συνεχή μεταβολή της γωνίας μεταξύ των δύο δεσμών και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:
 - Δονήσεις ψαλιδιού ή παραμόρφωσης (scissoring or deformation vibrations) οι οποίες παράγονται όταν δύο άτομα που είναι συνδεδεμένα με ένα κεντρικό άτομο κινούνται εμπρός πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) και προς τη μεταξύ τους διεύθυνση.
 - Δονήσεις αιώρησης (rocking vibrations) οι οποίες συμβαίνουν όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εμπρός και πίσω εντός του επιπέδου ισορροπίας (in-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.

- Δονήσεις σείσης (wagging vibrations) οι οποίες παράγονται όταν μία μη γραμμική δομική μονάδα τριών ατόμων δονείται εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane) που σχηματίζεται από τα άτομα και τους δύο δεσμούς.
- Δονήσεις συστροφής (twisting vibrations) οι οποίες λαμβάνουν χώρα όταν μία δομική μονάδα τριών ατόμων συστρέφεται γύρω από τον δεσμό σύνδεσης με το υπόλοιπο τμήμα του μορίου εκτός του επιπέδου ισορροπίας (out-of-plane) [16].

Κατά την αποδιέγερσή τους, εκπέμπουν την ενέργεια που έχουν απορροφήσει η οποία μετρείται από το όργανο σε σχέση με τη συχνότητα. Έτσι λοιπόν μια ένωση με πολλά άτομα μπορεί να οδηγήσει σε πολύπλοκα φάσματα καθώς θα διαθέτει πολλούς δονητικούς βαθμούς ελευθερίας. Ωστόσο η ερμηνεία ενός φάσματος IR μπορεί να απλουστευτεί λαμβάνοντας υπόψιν πως τα διάφορα είδη των δεσμών απορροφούν σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος όπως φαίνεται άλλωστε και στην εικόνα 4.19.



Εικόνα 4.19 Οι τέσσερις περιοχές του φάσματος υπέρυθρου: απλοί δεσμοί ατόμων με υδρογόνο, τριπλοί δεσμοί, διπλοί δεσμοί και περιοχή του δακτυλικού αποτυπώματος [17].

Πειραματική διάταξη FT-IR

Αφού ολοκληρώθηκαν τα πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού, δείγματα από τα προϊόντα οδηγήθηκαν για ανάλυση στο Platinum-ATR ALFA II Bruker (εικόνα 4.20). Μικρή ποσότητα από κάθε προϊόν τοποθετήθηκε πάνω στον κρύσταλλο του οργάνου όπου γίνεται σάρωση από 400-4000 cm⁻¹ μέσω της οποίας εντοπίστηκαν οι χαρακτηριστικές κορυφές του PBS.



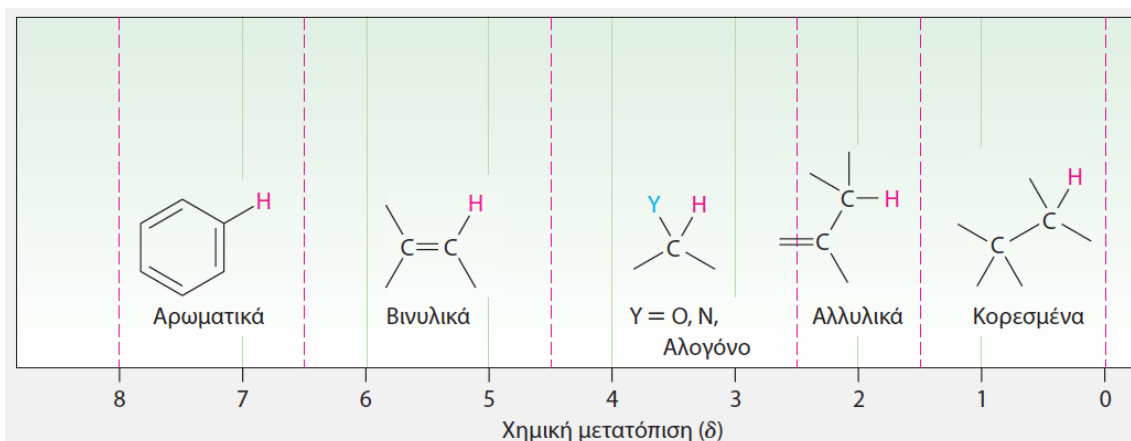
Εικόνα 4.20 Όργανο Platinum-ATR ALFA II Bruker.

4.5.2. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μια πολύ χρήσιμη και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης όσον αφορά οργανικές ενώσεις. Η τεχνική αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς μπορεί να δώσει πολλές πληροφορίες για τη δομή των μορίων σκιαγραφώντας τη σύνδεση των υδρογόνων με τους άνθρακες της κάθε ένωσης [17]. Κατά την ανάλυση μέσω της μεθόδου NMR, το δείγμα τοποθετείται εντός ομογενούς μαγνητικού πεδίου στο οποίο οι πυρήνες αποκτούν συγκεκριμένο προσανατολισμό, είτε παράλληλο είτε αντιπαράλληλο με αυτόν της έντασης του πεδίου. Εντός αυτού του πεδίου, οι πυρήνες απορροφούν ακτινοβολία μεταβαίνοντας από χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη σε υψηλότερη μέχρις ότου τελειώσει η ακτινοβολία όπου επιστρέφουν στην αρχική τους κατάσταση εκπέμποντας την ακτινοβολία που είχαν απορροφήσει η οποία καταγράφεται και προκύπτει έπειτα το φάσμα NMR [18].

Μόνο πυρήνες με περιττό αριθμό πρωτονίων μπορούν να αξιοποιηθούν σε μια ανάλυση NMR όπως οι πυρήνες ^1H και ^{13}C [17]. Ένα φάσμα NMR μπορεί να περιέχει πολλές κορυφές, ανάλογα την κάθε ένωση, οι οποίες οφείλονται στους διάφορους πυρήνες που συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες [18]. Ωστόσο θα σκεφτόταν κανείς ότι από τη στιγμή που σε κάθε ανάλυση μπορεί να εξεταστεί ένα μόνο είδος πυρήνα, θα ήταν λογικό να εμφανίζεται μόνο μια κορυφή. Στην πραγματικότητα, κάθε πυρήνας περιβάλλεται από έναν αριθμό

ηλεκτρονίων, διαφορετικό σε κάθε περίπτωση, τα οποία με τη σειρά τους δημιουργούν και αυτά δικά τους μαγνητικά πεδία μικρότερης έντασης δρώντας αντίθετα από το εξωτερικό πεδίο. Αυτό συνεπάγεται πως ο κάθε πυρήνας εντέλει αντιλαμβάνεται διαφορετικό πεδίο, μικρότερο από το εξωτερικό το οποίο δικαιολογεί και το γεγονός ότι για παράδειγμα σε ένα φάσμα $^1\text{H-NMR}$ δεν εμφανίζεται μια μόνο κορυφή. Κάθε πυρήνας ^1H που αντιστοιχεί ουσιαστικά σε ένα πρωτόνιο αντιλαμβάνεται διαφορετικό μαγνητικό πεδίο καθώς το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται είναι διαφορετικό ανάλογα με το πόσο προστατευμένος ή όχι είναι [17]. Μιας και η ισχύς του πεδίου αυξάνεται από τα αριστερά προς τα δεξιά σε ένα γράφημα NMR προκύπτει ότι οι περισσότερο προστατευμένοι πυρήνες απαιτούν μεγαλύτερο πεδίο και εμφανίζονται δεξιότερα από τους πυρήνες που είναι πιο εκτεθειμένοι. Με άλλα λόγια, έχουν διαφορετική χημική μετατόπιση δηλαδή διαφορετική θέση στο γράφημα.



Εικόνα 4.21 Περιοχές του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ [17].

Στην εικόνα 4.21 φαίνεται ότι πρωτόνια που είναι κοντά σε κορεσμένα άτομα άνθρακα βρίσκονται στην πλευρά υψηλού πεδίου ενώ πρωτόνια που είναι πιο αποπροστατευμένα όπως για παράδειγμα αυτά που ενώνονται με άνθρακες που συμμετέχουν σε διπλούς δεσμούς βρίσκονται στην πλευρά χαμηλού πεδίου.

Εκτός από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά, ένα φάσμα NMR μπορεί να δώσει και ποσοτικές πληροφορίες για μια ένωση. Πιο συγκεκριμένα, υπολογίζοντας κανείς το εμβαδόν μιας κορυφής, κάνοντας δηλαδή την ολοκλήρωσή της, βρίσκει τον

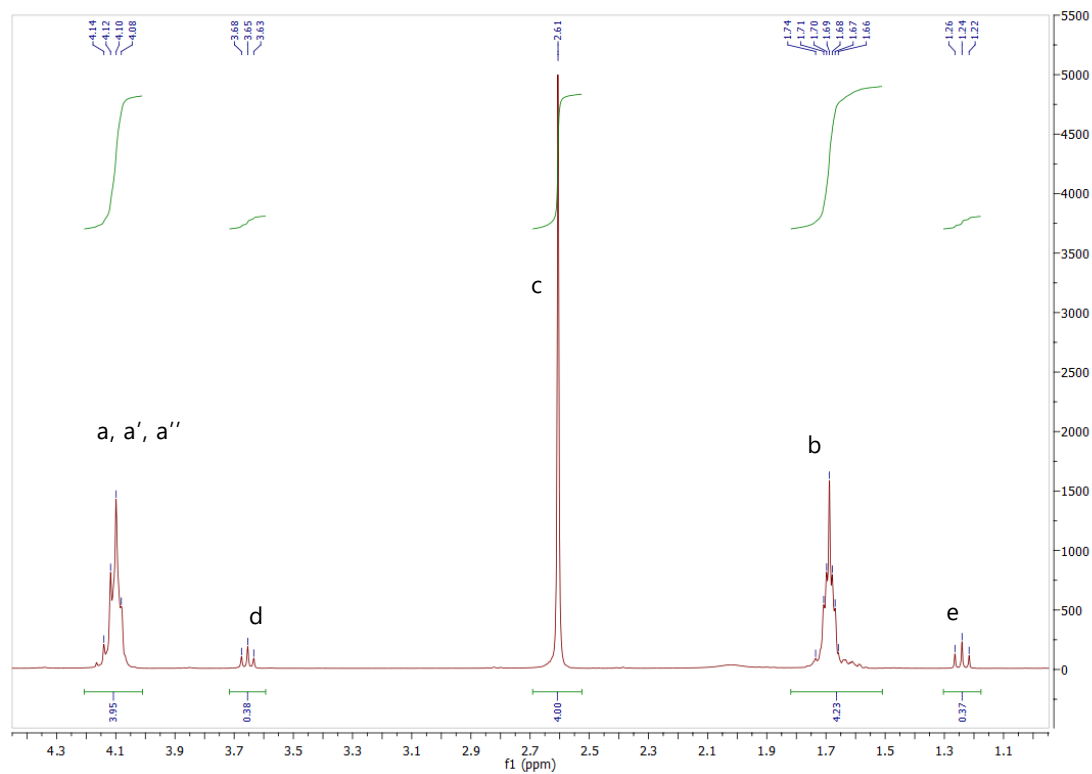
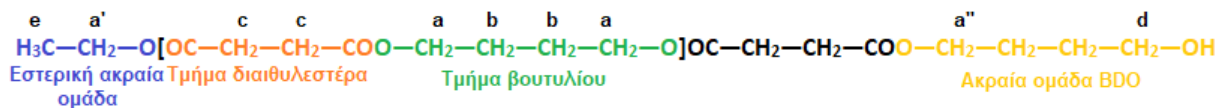
αριθμό των πρωτονίων στα οποία οφείλεται η κορυφή. Ο αριθμός των πρωτονίων αυτών είναι ανάλογος με την τιμή του εμβαδού που υπολογίζεται [19]. Ακόμα, ένα άλλο χαρακτηριστικό που αξιοποιείται από ένα φάσμα NMR είναι η πολλαπλότητα μιας κορυφής. Πολλές κορυφές μπορεί να χωρίζονται σε δύο ή παραπάνω κορυφές λόγω του φαινομένου spin-spin που προκαλείται από πρωτόνια γειτονικά και χημικά ισοδύναμα [15]. Αν ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων είναι n , τότε η πολλαπλότητα της κορυφής θα είναι ίση με $n+1$ [19].

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι πληροφορίες που λαμβάνει κανείς από ένα φάσμα NMR είναι οι ακόλουθες:

- ❖ Ο αριθμός των σημάτων, δηλαδή τα διαφορετικά είδη πρωτονίων στο μόριο.
- ❖ Η θέση (χημική μετατόπιση) των σημάτων, δηλαδή πόσο θωρακισμένα είναι τα πρωτόνια.
- ❖ Η ένταση (ολοκλήρωση) των σημάτων, η οποία είναι ανάλογη του αριθμού των πρωτονίων στα οποία οφείλεται το κάθε σήμα.
- ❖ Η σχάση σήματος (πολλαπλότητα), δηλαδή τον αριθμό των γειτονικών πρωτονίων.

Τα δεδομένα αυτά και κυρίως η ολοκλήρωση των σημάτων μπορεί να αξιοποιηθεί ακόμα περισσότερο στην περίπτωση των πολυμερών για τον υπολογισμό του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους \overline{M}_n . Στην εικόνα 4.22 φαίνεται η δομή του PBS καθώς και οι ομάδες των χημικά ισοδύναμων πρωτονίων.

Ανάλογα το περιβάλλον κάθε ομάδας, η κορυφή η οποία οφείλεται στην κάθε μία θα εμφανίζεται στο φάσμα του NMR είτε πιο δεξιά είτε πιο αριστερά. Για παράδειγμα, οι ομάδες a, a' και a'' αντιστοιχούν στην αριστερότερη κορυφή του φάσματος του PBS όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.22 καθώς είναι οι πιο αποπροστατευμένες ομάδες σε αντίθεση με τα πρωτόνια της ομάδας e τα οποία εμφανίζονται στο δεξί κομμάτι του φάσματος μιας και είναι πιο θωρακισμένα και απαιτούν υψηλότερο μαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 4.22 Ενδεικτικό φάσμα $^1\text{H-NMR}$ για το PBS.

Εκτός από τη θέση κάθε κορυφής, το φάσμα όπως απεικονίζεται στην εικόνα 4.22, δίνει κάποιες επιπλέον πληροφορίες όπως είναι οι εντάσεις των κορυφών. Οι τιμές από αυτές τις ολοκληρώσεις είναι που αξιοποιούνται για τον υπολογισμό του μέσου-αριθμού μοριακού βάρους \overline{M}_n χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.5.

Εξίσωση 4.5 Υπολογισμός μέσου-αριθμού μοριακού βάρους για το PBS συναρτήσει των εντάσεων απορρόφησης από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ [19].

$$\overline{M}_n = \frac{\left(I_a - I_d - \frac{2}{3}I_e\right) M_a + \frac{I_c}{4} M_c + \frac{I_d}{2} M_d + \frac{I_e}{3} M_e}{0,5 \left(\frac{I_d}{2} + \frac{I_e}{3}\right)}$$

όπου,

- M_i : μοριακό βάρος της ομάδας i που ανήκει το εκάστοτε υδρογόνο ($M_a=88,1$ g/mol, $M_c =84,07$ g/mol, $M_d=89,11$ g/mol και $M_e=45,06$ g/mol).
- I_i : η ένταση της απορρόφησης (ολοκλήρωμα) που αντιστοιχεί στην ομάδα i του πρωτονίου.
- i : a, a', a'', b, c, d και e.

Μέσω του φάσματος $^1\text{H-NMR}$ μπορεί επίσης να υπολογιστεί και το ποσοστό των ακραίων εστερικών ομάδων όπως φαίνεται από την εξίσωση 4.6.

Εξίσωση 4.6 Υπολογισμός ακραίων εστερικών ομάδων του PBS συναρτήσει των εντάσεων απορρόφησης από το φάσμα $^1\text{H-NMR}$ [19].

$$\text{Ποσοστό ακραίων εστερικών ομάδων (\%)} = \frac{\frac{I_e}{3}}{\frac{I_d}{2} + \frac{I_e}{3}} \cdot 100\%$$

Τέλος, γίνεται υπολογισμός και του μέσου-αριθμού βαθμού πολυμερισμού σύμφωνα με την εξίσωση 4.7.

Εξίσωση 4.7 Μέσου-αριθμού βαθμός πολυμερισμού.

$$\bar{x}_n = 2 \frac{\overline{M}_n}{M_0}$$

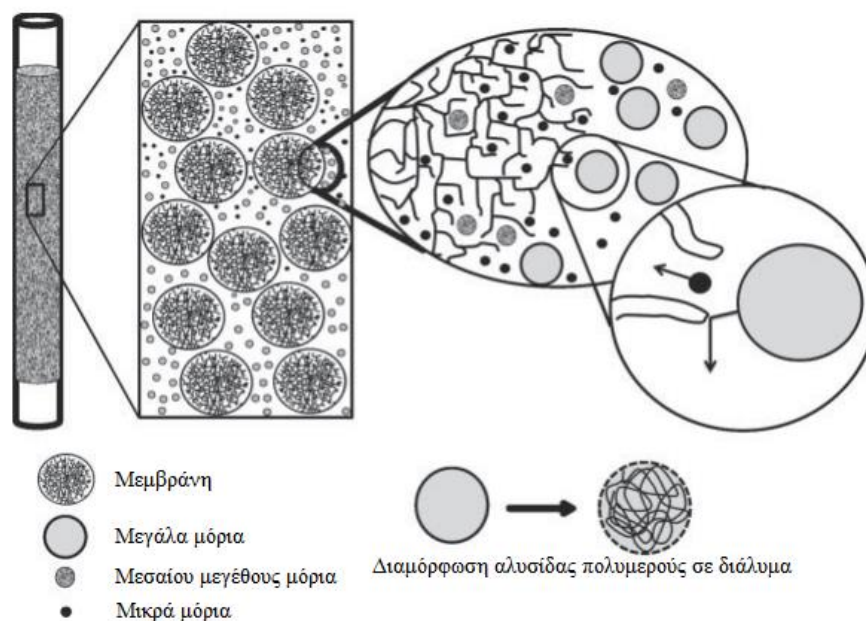
όπου M_0 : το μοριακό βάρος της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας του PBS ίσο με 172 g/mol.

4.5.3. Χρωματογραφία Διαπέρασης μέσω Πηκτής (GPC)

Για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους των προϊόντων από τα πειράματα του ενζυμικού πολυμερισμού αλλά και τα πειράματα μεταπολυμερισμού χρησιμοποιήθηκε ως τεχνική η Χρωματογραφία Διαπέρασης Πηκτής (Gel Permeation Chromatography, GPC ή Gel Filtration Chromatography, GFC) [21]. Πρόκειται για ένα είδος υγρής χρωματογραφίας μέσω της οποίας μπορεί να γίνει διαχωρισμός

μακρομορίων εκμεταλλεζόμενη το διαφορετικό μέγεθος των διαφόρων μορίων του δείγματος. Έτσι λοιπόν, φυσικά μακρομόρια, ή ακόμα και συνθετικά όπως είναι τα πολυμερή, μπορούν να διαχωριστούν με βάση τον διαφορετικό υδροδυναμικό όγκο τους, δηλαδή τον όγκο που καταλαμβάνουν τα μακρομόρια όταν είναι διαλυτά, και για αυτό τον λόγο η GPC είναι γνωστή και ως Χρωματογραφία Αποκλεισμού μεγεθών (Size Exclusion Chromatography, SEC) [21],[22].

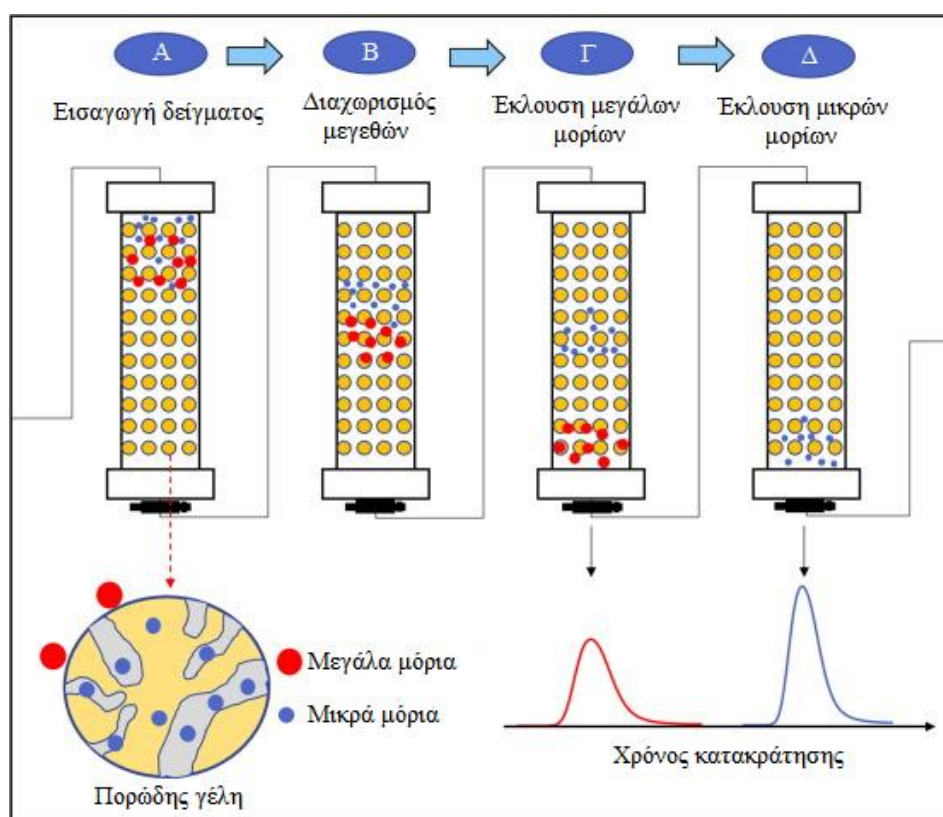
Κατά τη διαδικασία της GPC, δείγματα από τα προϊόντα διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη και η κάθε μακροαλυσίδα θεωρείται πως αποτελεί μια «σφαίρα» συγκεκριμένου όγκου, όπως απεικονίζεται στην εικόνα 4.23, ο οποίος ποικίλει ανάλογα το μοριακό βάρος. Οι σφαίρες αυτές παρασύρονται από την κινητή φάση, που είναι ίδια με τον διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάλυση των δειγμάτων, και ρέουν μέσα από κατάλληλες στήλες που αποτελούν τη στατική φάση.



Εικόνα 4.23 Διάχυση μορίων εντός της στατικής φάσης με βάση τον υδροδυναμικό όγκο τους [23].

Κατά τη ροή τους μέσα από αυτές τις στήλες, τα διάφορα σφαιρίδια προσπαθούν να ταξιδέψουν μέσα από τους πόρους που διαθέτουν τα πληρωτικά υλικά τα οποία μπορεί να είναι είτε σωματίδια πολυστυρενίου είτε γέλη πυριτίας.

Μόρια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος άρα και μεγαλύτερο υδροδυναμικό όγκο δεν μπορούν να εισέλθουν μέσα από τους πόρους του πληρωτικού υλικού και καταλήγουν να εκλούνται νωρίτερα από μακρομόρια μικρότερου μεγέθους τα οποία διαχέονται μέσα από τους πόρους, ταξιδεύοντας περισσότερο εντός της στήλης με αποτέλεσμα να εκλούνται αργότερα όπως απεικονίζεται και στην εικόνα 4.24 [22]. Με αυτόν τον τρόπο οι διαφορετικές οικογένειες μοριακών βαρών που περιέχονται στα δείγματα καταφέρνουν να διαχωριστούν αλλά και να ανιχνευτούν από κατάλληλο ανιχνευτή.



Εικόνα 4.24 Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας διαχωρισμού μέσω της GPC [22].

Ο ανιχνευτής αυτός μπορεί να ποικίλει ανάλογα την εκάστοτε ανάλυση. Ωστόσο ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος είναι αυτός που μετρά τον δείκτη διάθλασης (Refractive index detector, RID) του εκλούμενου μακρομορίου καταγράφοντας το σήμα για δεδομένη χρονική στιγμή [24]. Για να μπορέσει όμως στη συνέχεια να γίνει ο υπολογισμός του MB, θα πρέπει να έχει προηγηθεί βαθμονόμηση στο σύστημα χρησιμοποιώντας πρότυπα δείγματα πολυμερούς. Είναι πολύ σύνηθες

να χρησιμοποιούνται πρότυπα πολυστυρενίου με αποτέλεσμα να γίνεται η συσχέτιση των διαφόρων MB με τους αντίστοιχους χρόνους έκλυσης. Ωστόσο, για να αποφευχθούν σφάλματα και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη μέθοδος για τη μέτρηση MB και άλλων πολυμερών, γίνεται μια διόρθωση ως προς το εγγενές ιξώδες. Αυτή η διόρθωση είναι γνωστή ως παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιοδήποτε πολυμερές ανεξάρτητα από την αλληλεπίδραση που μπορεί να έχει με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται μιας και διορθώνοντας με το ιξώδες αυτό που λαμβάνεται υπόψη είναι ο χρόνος στον οποίο εκρέει από τη στήλη ένας συγκεκριμένος υδροδυναμικός όγκος και όχι απλά μια συγκεκριμένη τιμή MB. Στην εξίσωση 4.8, φαίνεται πως συνδέεται ο υδροδυναμικός όγκος, που είναι το γινόμενο του εγγενούς ιξώδους με το μοριακό με βάρος, με τον χρόνο έκλυσης [15],[23],[24].

Εξίσωση 4.8 Παγκόσμια καμπύλη βαθμονόμησης με βάση δεδομένα από πρότυπα πολυστυρενίου.

$$\log([\eta]_{PS} \cdot MW_{PS}) = \alpha \cdot t + \beta$$

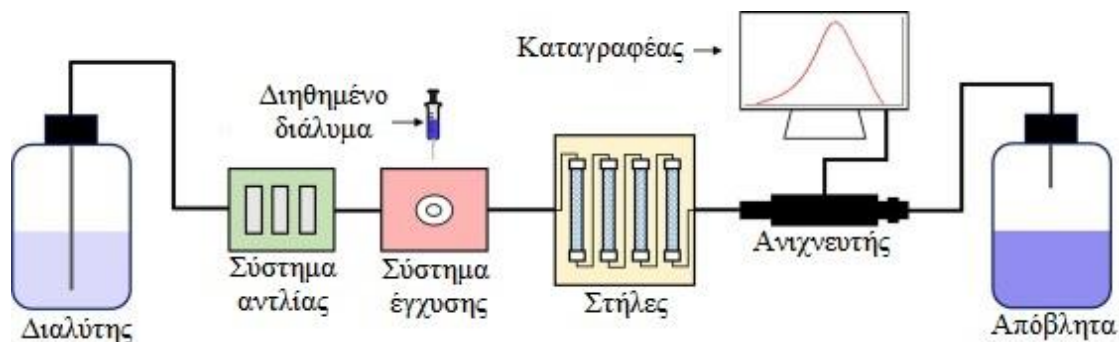
όπου,

- $[\eta]_{PS}$: το εγγενές ιξώδες του πολυστυρενίου.
- MW_{PS} : το μοριακό βάρος του πολυστυρενίου.
- t : ο χρόνος έκλυσης.
- α, β : σταθερές

Ο εξοπλισμός ο οποίος απαιτείται για μια ανάλυση GPC και παρουσιάζεται σχηματικά στην εικόνα 4.25, περιλαμβάνει τα εξής:

- Δοχείο διαλύτη.
- Απαερωτή (degasser) για την απομάκρυνση των φυσαλίδων από τον διαλύτη.
- Αντλία (σύστημα παραλαβής του διαλύτη), μέσω της οποίας γίνεται άντληση του διαλύτη οδηγώντας προς το σύστημα έγχυσης.
- Μετρητή πίεσης για τη μέτρηση της πίεσης στο σύστημα.
- Σύστημα έγχυσης (injector) μέσω του οποίου εισάγεται το δείγμα στη στήλη.

- Στήλες χρωματογραφίας με πληρωτικό υλικό.
- Ανιχνευτή που μπορεί και ανιχνεύει τα μόρια που εκρέουν από τις στήλες.
- Καταγραφέα που παραλαμβάνει το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή και το καταγράφει στο αντίστοιχο γράφημα.
- Δοχείο συλλογής αποβλήτων όπου συλλέγονται τα απόβλητα μετά το τέλος της κάθε ανάλυσης.



Εικόνα 4.25 Σχηματικό διάγραμμα εξοπλισμού της GPC [22].

Πειραματική διαδικασία

Προτού ξεκινήσει η ανάλυση απαιτείται η προετοιμασία των δειγμάτων. Από κάθε προϊόν δημιουργήθηκαν δύο δείγματα ζυγίζοντας περίπου 10 mg για το κάθε δείγμα. Οι ποσότητες αυτές διαλύθηκαν σε 5 mL χλωροφορμίου έτσι ώστε να προκύψουν διαλύματα με συγκέντρωση 2 mg/mL. Για να μπορέσουν να οδηγηθούν προς ανάλυση χρειάστηκε να φιλτραριστούν μικρές ποσότητες από κάθε διάλυμα σε ειδικά vials μέσω φίλτρου Syringe Filters Nylon 25mm 0,22μm. Μόλις ήταν έτοιμα τα δείγματα, οδηγήθηκαν προς ανάλυση στο όργανο Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies) (εικόνα 4.26). Το όργανο αυτό είναι εξοπλισμένο με μια στήλη προστασίας PLgel 5 μm και δύο στήλες PLgel MIXED-D 5 μm (300x7,5mm). Η κινητή φάση αποτελείται από χλωροφόρμιο το οποίο ρέει με ρυθμό ροής 1 mL/min μέσα από τη στατική φάση μαζί με τα δείγματα βοηθώντας στον διαχωρισμό των διαφόρων οικογενειών MB οι οποίες ανιχνεύονται από ανιχνευτή δείκτη διάθλασης Agilent 1260 Infinity II (G7162A). Το σήμα από τον ανιχνευτή καταγράφεται από τον καταγραφέα και στη συνέχεια γίνεται υπολογισμός των MB με βάση τη βαθμονόμηση που έχει προηγηθεί με πρότυπα πολυστυρενίου MB από 162 έως 500.000 g/mol (EasiVial PS-M 2 mL).



Εικόνα 4.26 Όργανο Agilent 1260 Infinity II.

4.5.4. Διαφορική Θερμιδομετρία Σάρωσης (DSC)

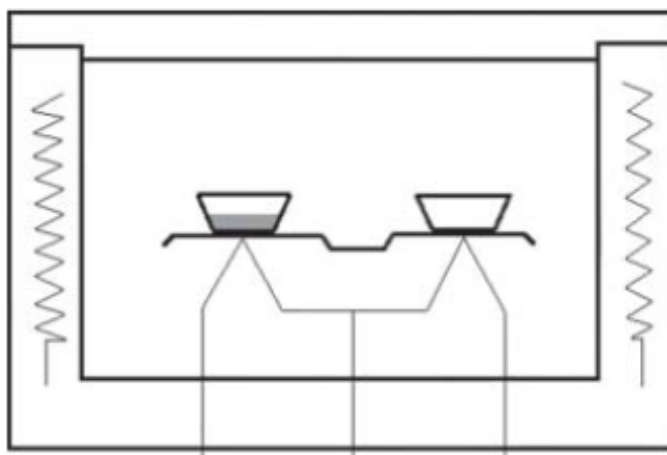
Μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους για τη μελέτη και ανάλυση των θερμικών ιδιοτήτων των πολυμερών είναι η Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Εξαιτίας των πολλών πεδίων στα οποία βρίσκουν εφαρμογή τα πολυμερή, είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζει κανείς τη συμπεριφορά αυτών των υλικών στις μεταβολές της θερμοκρασίας.



Εικόνα 4.27 Εφαρμογές της μεθόδου DSC [25].

Πιο συγκεκριμένα ο χαρακτηρισμός ενός πολυμερικού υλικού όσον αφορά τις θερμικές του ιδιότητες περιλαμβάνει (εικόνα 4.27) τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας υαλώδους μετάπτωσης T_g , του σημείου τήξης T_m αλλά και της θερμοκρασίας κρυστάλλωσης, δεδομένα που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ποιοτική κατάταξη των υλικών καθώς και για τον προσδιορισμό της καθαρότητάς τους αλλά όχι για την ταυτοποίησή τους.

Κατά την ανάλυση μέσω DSC, καταγράφεται η διαφορά της ροής θερμότητας ανάμεσα στο δείγμα που αναλύεται κι ένα υλικό αναφοράς όσο το σύστημα θερμαίνεται ή ψύχεται γραμμικά [26]. Η θέρμανση ή η ψύξη αντίστοιχα πραγματοποιούνται εντός του οργάνου όπου το περιβάλλον παραμένει αδρανές λόγω της ροής αζώτου [15]. Όσο μεταβάλλεται η θερμοκρασία τόσο στο δείγμα όσο και στο υλικό αναφοράς, το οποίο στην ουσία είναι ένα άδειο καψίδιο αλουμινίου (pan) (εικόνα 4.28) ίδιο με αυτό που περιέχει το δείγμα, ο ρυθμός μεταβολής της θερμότητας πρέπει να παραμένει ίδιος και για τα δύο pans, οπότε στην περίπτωση του pan που περιέχει το δείγμα χρειάζεται περισσότερη ενέργεια κάτι που καταγράφεται και στο γράφημα του DSC με τις αντίστοιχες κορυφές. Όταν η θερμοκρασία αυξάνεται, το δείγμα εκλύει θερμότητα καθώς λαμβάνει χώρα εξώθερμη διεργασία όπως είναι η τήξη και σημειώνεται ως θετική κορυφή.



Εικόνα 4.28 Σχηματική αναπαράσταση τυπικού θερμιδομέτρου διαφορικής σάρωσης [27].

Αντίστοιχα όταν αρχίζει η ψύξη, λαμβάνει χώρα ενδόθερμη διεργασία όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια και για αυτό σημειώνεται ως αρνητική κορυφή στο γράφημα. Σε κάθε περίπτωση αυτή η ενέργεια μπορεί να προσδιοριστεί καθώς είναι ίση με το εμβαδόν που περικλείεται από κάθε κορυφή το οποίο έχει αναχθεί ως προς τη μάζα του δείγματος που αναλύεται.

Πειραματική διαδικασία

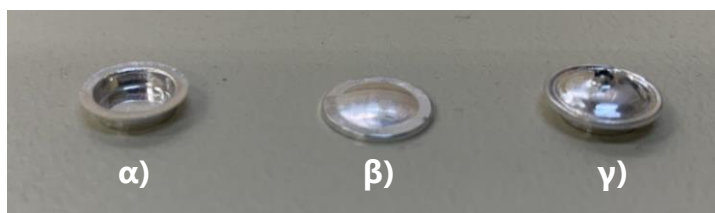
Το πρώτο βήμα ήταν η προετοιμασία των δειγμάτων που θα οδηγούνταν προς ανάλυση στο όργανο DSC 1 Star^e System της Mettler Toledo (εικόνα 4.29). Ποσότητα από τα δείγματα τοποθετήθηκε μέσα στα pans του αλουμινίου, τόση ώστε να καλύπτεται ο πάτος του pan μιας και τα προϊόντα του ενζυμικού πολυμερισμού βρίσκονται σε μορφή gel. Καταγράφηκε η ακριβής μάζα της ποσότητας που είχε τοποθετηθεί στον δειγματοφορέα και στη συνέχεια το pan σφραγίστηκε αεροστεγώς μέσω ειδικής πρέσας, με μεταλλικό κάλυμμα στο οποίο πρώτα είχε δημιουργηθεί οπή με διάμετρο ίση με τη μύτη μιας βελόνας για την εξασφάλιση αερισμού (εικόνα 4.30).



Εικόνα 4.29 Όργανο DSC 1 Star^e System Mettler Toledo.

Μόλις τα δείγματα ήταν έτοιμα, τοποθετήθηκαν ένα ένα στο όργανο για ανά-
λυση, όπου είχε ήδη οριστεί αδρανής ατμόσφαιρα με ροή αζώτου ίση με 20
mL/min για να ξεκινήσει ο ακόλουθος θερμικός κύκλος.

- 1^η θέρμανση: 25°C → 150°C
- Παραμονή για 2 min στους 150°C
- Ψύξη: 150°C → -50°C
- Παραμονή για 2 min στους -50°C
- 2^η θέρμανση: -50°C → 150°C



**Εικόνα 4.30 α) Πάτος του καψιδίου (pan) από αλουμίνιο, β) κάλυμμα του pan, γ) σφρα-
γισμένο pan με οπή στο κέντρο του καλύμματος για να επιτυγχάνεται ο απαραίτητος
εξαερισμός.**

Ο ρυθμός αύξησης και αντίστοιχα μείωσης της θερμοκρασίας ήταν ίσος με
10°C/min. Η ψύξη έγινε με χρήση υγρού αζώτου. Μέσω της ψύξης υπολογίστηκε
και ο βαθμός κρυσταλλικότητας (εξίσωση 4.9).

Εξίσωση 4.9 Βαθμός κρυσταλλικότητας.

$$x_c = \frac{\Delta H_c}{\Delta H_0} \cdot 100\%$$

όπου ΔH_c είναι η ενθαλπία κρυστάλλωσης και ΔH_0 είναι η ενθαλπία τήξης του
100% κρυσταλλικού PBS ίση με 110,5 J/g.

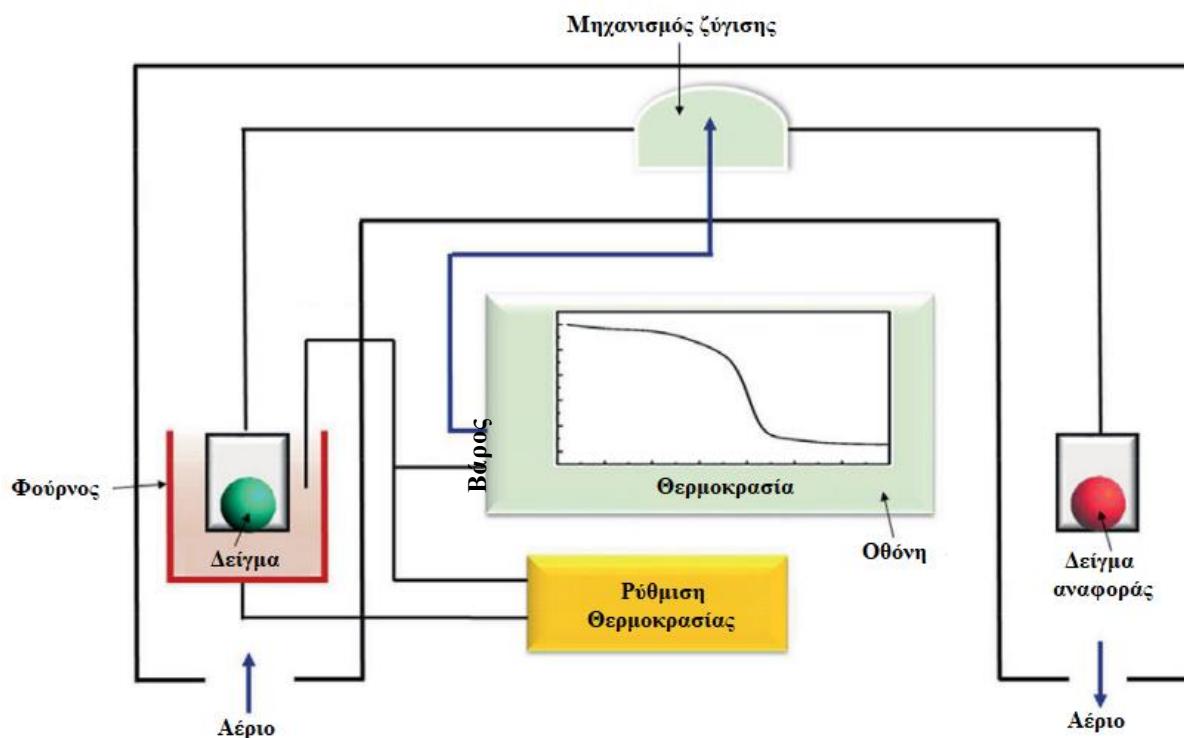
4.5.5. Θερμοβαρυμετρική Ανάλυση (TGA)

Στην οικογένεια των χαρακτηρισμών των θερμικών ιδιοτήτων έρχεται να προστεθεί ακόμα μία μέθοδος που είναι αυτή της Θερμοβαρυμετρικής ανάλυσης (Thermogravimetric Analysis, TGA). Πρόκειται για μία πολύ σημαντική τεχνική όσον αφορά τον χαρακτηρισμό υλικών όπως είναι τα πολυμερή καθώς βοηθά στη μελέτη της θερμικής διάσπασης και της θερμικής σταθερότητας μιας και αυτό που πραγματοποιείται είναι η συνεχής μέτρηση της μάζας του δείγματος που αναλύεται όσο αυτό θερμαίνεται σε ελεγχόμενο περιβάλλον [28]. Το περιβάλλον στο οποίο λαμβάνει χώρα η ανάλυση κατά την οποία γίνεται συνεχής καταγραφή της μάζας, της θερμοκρασίας και του χρόνου, μπορεί να είναι είτε αδρανές, λόγω της ροής αζώτου ή κάποιου αδρανούς αερίου, είτε οξειδωτικό λόγω της ροής αέρα, είτε αναγωγικό [28],[29].

Με βάση τα παραπάνω, είναι πολύ σύνηθες το όργανο να αποκαλείται και θερμοζυγός (Thermobalance) καθώς η καρδιά του είναι ένας αναλυτικός ζυγός μέσα σε έναν φούρνο [28]. Εκτός του ζυγού και του φούρνου όμως, το όργανο επίσης διαθέτει φιάλη παροχής αερίου, 2 ροόμετρα, ένα για το προστατευτικό αέριο κι ένα για το αέριο του φούρνου, καθώς και μια αντλία για το ψυκτικό υγρό [15].

Μια ανάλυση μέσω TGA μπορεί να οδηγήσει τόσο σε ποιοτικά όσο και σε ποσοτικά συμπεράσματα για το δείγμα που αναλύεται. Στα ποιοτικά συμπεριλαμβάνονται η θερμοκρασία στην οποία γίνεται μια αντίδραση (για δυναμική καταπόνηση), ο χρόνος που διαρκεί (για ισοθερμοκρασιακή καταπόνηση) αλλά και η κινητική των αντιδράσεων διάσπασης. Από την άλλη, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι καταγράφεται συνεχώς η μάζα του δείγματος, μπορούν να γίνουν και ποσοτικοί υπολογισμοί [28]. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 4.31, οι μετρήσεις της μάζας αλλά και της θερμοκρασίας καταγράφονται συνεχώς από κατάλληλο λογισμικό σε Η/Υ όπου παραλαμβάνεται στο τέλος το γράφημα της απώλειας μάζας συναρτήσει της θερμοκρασίας (καμπύλη TG) [15]. Σε αυτή την καμπύλη φαίνεται η συνεχής μείωση της μάζας η οποία στις πιο χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή μέχρι τους 100°C, μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη υγρασίας, σε υπολείμματα μονομερών ή στην ύπαρξη ολιγομερών. Όσο η θερμοκρασία αυξάνεται, παρατηρείται περαιτέρω μείωση της μάζας καθώς παράγονται πτητικά προϊόντα λόγω σχάσης αλυσίδας οδηγώντας στην αποδόμηση του υλικού

[29]. Η θερμοκρασία αποικοδόμησης T_d μπορεί να φανεί και από την καμπύλη της πρώτης παραγώγου που διαθέτει το λογισμικό στην οποία αντιστοιχεί και η μέγιστη απώλεια μάζας.



Εικόνα 4.31. Σχηματική αναπαράσταση του θερμοζυγού [30].

Πειραματική διαδικασία

Η διαδικασία της ανάλυσης μέσω TGA ξεκίνησε με την προετοιμασία των δειγμάτων από τα οποία ζυγίστηκε μια ικανοποιητική ποσότητα μέσα ειδικά κεραμικά rap τα οποία παρέμειναν ανοιχτά (εικόνα 4.32).



Εικόνα 4.32 Κεραμικό rap TGA.

Στη συνέχεια, τα δείγματα οδηγήθηκαν στο όργανο TGA/DSC 1 Star^e System της Mettler Toledo (εικόνα 4.33) όπου ξεκίνησε η θέρμανσή τους από τους 30°C μέχρι τους 600°C με βήμα 10°C/min. Η παροχή του φέροντος αερίου, που στη συγκεκριμένη περίπτωση ήταν άζωτο, ήταν ίση με 20 mL/min. Στο τέλος της κάθε ανάλυσης, το λογισμικό παρέχει το γράφημα του ποσοστού της αρχικής μάζας που παραμένει στο δείγμα συναρτήσει της θερμοκρασίας από όπου φαίνονται όλα τα ενδεχόμενα στάδια στα οποία υπάρχει απώλεια μάζας.



Εικόνα 4.33 Όργανο TGA/DSC 1 Star^e System Mettler Toledo.

4.6. Βιβλιογραφία

- [1] S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J.J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach, *Appl Environ Microbiol* 78 (2012) 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>.
- [2] V. Tournier, C.M. Topham, A. Gilles, B. David, C. Folgoas, E. Moya-Leclair, E. Kamionka, M.L. Desrousseaux, H. Texier, S. Gavalda, M. Cot, E. Guémard, M.

- Dalibey, J. Nomme, G. Cioci, S. Barbe, M. Chateau, I. André, S. Duquesne, A. Marty, An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles, *Nature* 580 (2020) 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- [3] Å.M. Ronkvist, W. Xie, W. Lu, R.A. Gross, Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate), *Macromolecules* 42 (2009) 5128–5138. <https://doi.org/10.1021/ma9005318>.
- [4] M. Hunsen, A. Azim, H. Mang, S.R. Wallner, A. Ronkvist, X. Wenchun, R.A. Gross, A cutinase with polyester synthesis activity, *Macromolecules* 40 (2007) 148–150. <https://doi.org/10.1021/ma062095g>.
- [5] J. Kim, S.I. Kim, E. Hong, Y. Ryu, Strategies for increasing heterologous expression of a thermostable esterase from *Archaeoglobus fulgidus* in *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif* 127 (2016) 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.07.012>.
- [6] M.L. Shuler, F. Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Ε.Μ.Π., ΑΘΗΝΑ, 2005.
- [7] Expasy, ProtParam tool, (n.d.). Πρόσβαση: 03/01/2024
- [8] H. Wu, Studies on denaturation of proteins xiii. a theory of denaturation, *Adv Protein Chem* 46 (1995) 6–26. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60330-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60330-7).
- [9] R.M. Daniel, M.J. Danson, R. Eienthal, C.K. Lee, M.E. Peterson, The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications, *Extremophiles* 12 (2008) 51–59. <https://doi.org/10.1007/s00792-007-0089-7>.
- [10] G. Feller, Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures, *Journal of Physics Condensed Matter* 22 (2010). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/32/323101>.
- [11] C.I. Gkountela, D. Markoulakis, M. Mathioudaki, I. Pitterou, A. Detsi, S.N. Vouyiouka, Scalable enzymatic polymerization and low-temperature post-polymerization of poly(butylene succinate): Process parameters and

- application, *Eur Polym J* 198 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eur-polymj.2023.112423>.
- [12] A. Mahapatro, B. Kalra, A. Kumar, R.A. Gross, Lipase-Catalyzed Polycondensations: Effect of Substrates and Solvent on Chain Formation, Dispersity, and End-Group Structure, *Biomacromolecules* 4 (2003) 544–551. <https://doi.org/10.1021/bm0257208>.
- [13] Συλλογική Έκδοση Εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης, Εργαστηριακές Ασκήσεις, 3rd ed., Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, 2009.
- [14] Sigma-Aldrich, What is FTIR Spectroscopy?, (n.d.). Πρόσβαση: 01/12/2023
- [15] Μ. Μαθιουδάκη, Αξιοποίηση ενζυμικά παραγόμενων πολυμερών σε συστήματα εγκλεισμού δραστικών ουσιών, ΕΜΠ, 2022.
- [16] Μ. Κουή, Ν. Αβδελίδης, Π. Θεοδωρακέας, Ε. Χειλάκου, Φασματοσκοπία Υπερύθρου Μετασχηματισμού Fourier με Αποσβένουσα Ολική Ανάκλαση, in: Μη Καταστρεπτικές Και Φασματοσκοπικές Μέθοδοι Εξέτασης Των Υλικών, Κάλλιπος, Ανοιχτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2015.
- [17] J. McMurry, Οργανική Χημεία , 9th ed., ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ, 2020.
- [18] Α.Π. Κουνέλη, Αρχές Λειτουργίας και Εφαρμογές Φασματογράφου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού, ΕΜΠ, 2019.
- [19] D.G. Watson, Φαρμακευτική ανάλυση, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα , 2015.
- [20] T. Debuissy, E. Pollet, L. Avérous, Enzymatic Synthesis of a Bio-Based Copolyester from Poly(butylene succinate) and Poly((R)-3-hydroxybutyrate): Study of Reaction Parameters on the Transesterification Rate, *Biomacromolecules* 17 (2016) 4054–4063. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01494>.
- [21] G. Gellerstedt, Gel Permeation Chromatography, in: *Methods in Lignin Chemistry*, 1992: pp. 487–497. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_34.

- [22] J. Ma, G. Sun, D. Sun, F. Yu, M. Hu, T. Lu, Application of gel permeation chromatography technology in asphalt materials: A review, *Constr Build Mater* 278 (2021) 122386. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.122386>.
- [23] M.G. Neira-Velázquez, M.T. Rodríguez-Hernández, E. Hernández-Hernández, A.R.Y. Ruiz-Martínez, Polymer Molecular Weight Measurement, in: *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization, and Processing*, Wiley, 2013: pp. 355–366. <https://doi.org/10.1002/9781118480793.ch17>.
- [24] A. Boborodea, S. O’Donohue, Universal calibration of gel permeation chromatography using evaporative light scattering detector coupled with viscometer, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* 25 (2020) 167–175. <https://doi.org/10.1080/1023666X.2020.1770403>.
- [25] J. Drzeżdżon, D. Jacewicz, A. Sielicka, L. Chmurzyński, Characterization of polymers based on differential scanning calorimetry based techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 110 (2019) 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.037>.
- [26] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα, 2010.
- [27] A.J. Müller, R.M. Michell, *Differential Scanning Calorimetry of Polymers*, in: *Polymer Morphology*, Wiley, 2016: pp. 72–99. <https://doi.org/10.1002/9781118892756.ch5>.
- [28] Α. Παππά, *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές Μέθοδοι, Φασματομετρία Μάζας*, Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, 2004.
- [29] J.D. Menczel, R.B. Prime, eds., *Thermal Analysis of Polymers*, Wiley, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470423837>.
- [30] H.M. Ng, N.M. Saidi, F.S. Omar, K. Ramesh, S. Ramesh, S. Bashir, Thermogravimetric Analysis of Polymers, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, Wiley, 2018: pp. 1–29. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst667>.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα ετερόλογης έκφρασης HiC & LCC^{ICCG} – χαρακτηρισμός βιοκαταλύτη LCC^{ICCG}

5.1. Αποτελέσματα ετερόλογης έκφρασης των πρωτεϊνών

5.1.1. Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων κυττάρων στις υγρές καλλιέργειες

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στην παρούσα διπλωματική εργασία δόθηκε περισσότερη έμφαση στη μελέτη του ενζύμου LCC^{ICCG} μιας και πρόκειται για μια κουτινάση η οποία δεν έχει αξιοποιηθεί ακόμα σε διεργασίες σύνθεσης πολυεστέρων, όπως το PBS, σε αντίθεση με την HiC (βλ. ενότητα 2.2.2).

Πίνακας 5.1 Τιμές απορρόφησης στα 600 nm δειγμάτων από τις υγρές καλλιέργειες ύστερα από επώαση 3 h στους 37°C των ανασυνδυασμένων κυττάρων με το πλασμίδιο για την LCC^{ICCG} και την HiC αντίστοιχα.

LCC ^{ICCG}		HiC	
Αριθμός φιάλης	Απορρόφηση στα 600 nm	Αριθμός φιάλης	Απορρόφηση στα 600 nm
1	0,375	1	0,500
2	0,531	2	0,415
3	0,485	3	0,528
4	0,653	-	-
5	0,460	-	-
6	0,594	-	-
7	0,594	-	-
8	0,584	-	-
9	0,586	-	-
10	0,586	-	-

Για αυτόν λοιπόν τον λόγο, έγινε προσπάθεια για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας LCC^{ICCG} από ό,τι HiC, δημιουργώντας 10 υγρές καλλιέργειες για την πρώτη και 3 για τη δεύτερη. Οι καλλιέργειες αυτές, όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.1.4, παρέμειναν για επώαση εντός των επωαστήρων για περίπου 3 h με σκοπό η οπτική πυκνότητα λόγω της ανάπτυξης των κυττάρων να φτάσει σε ένα επιθυμητό επίπεδο (0,6-0,8). Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος, οι τιμές της οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) που προέκυψαν από φωτομέτρηση δειγμάτων των καλλιεργειών στα 600 nm παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1.

Τα δεδομένα αυτά (πίνακας 5.1) έδειξαν πως η ανάπτυξη των κυττάρων δεν ήταν ίδια σε κάθε καλλιέργεια μετά από 3 h. Αυτό το γεγονός μπορεί να οφείλεται ενδεχομένως στη θέση των καλλιεργειών εντός του επωαστικού θαλάμου. Καλλιέργειες οι οποίες βρίσκονταν πιο κοντά στην έξοδο του αέρα (εξισορρόπηση της θερμοκρασίας στο επιθυμητό επίπεδο (37°C)) είχαν γρηγορότερη ανάπτυξη από τις καλλιέργειες οι οποίες βρίσκονταν σε πιο απομακρυσμένη θέση.

5.1.2. Καθαρισμός και απομόνωση των ενζύμων μέσω χρωματογραφίας συγγένειας (IMAC)

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση των επιθυμητών ενζύμων από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που εκφράζονται εκ φύσεως από τα βακτήρια *E. coli* πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία συγγένειας σε στήλες Talon® (βλ. ενότητα 4.1.4). Για τον καθαρισμό της LCC^{ICCG} χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές στήλες λόγω και της μεγαλύτερης ποσότητας που είχε παραχθεί, ενώ για τον καθαρισμό της HiC χρησιμοποιήθηκε μία στήλη. Δείγματα από τα κλάσματα στα οποία έγινε προσθήκη διαλύματος ιμιδαζολίου σε Talon 1x συγκέντρωσης 100 mM φωτομετρήθηκαν στα 280 nm με σκοπό να αποδειχτεί η παρουσία ενζύμων σε αυτά τα κλάσματα, κάτι που ταυτόχρονα θα αποδείκνυε και τη σωστή λειτουργία των στηλών που χρησιμοποιήθηκαν. Τα αποτελέσματα από τη φωτομέτρηση στα 280 nm παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στους ακόλουθους πίνακες (πίνακας 5.2 και πίνακας 5.3).

Πίνακας 5.2 Τιμές απορρόφησης στα 280 nm δειγμάτων από τα κλάσματα που προέκυψαν προσθέτοντας ποσότητα από το διάλυμα ιμιδαζολίου σε Talon 1x συγκέντρωσης 100 mM κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου LCC^{ICCG}.

Στήλη 1		Στήλη 2		Στήλη 3		Στήλη 4	
Δείγματα	A ₂₈₀	Δείγματα	A ₂₈₀	Δείγματα	A ₂₈₀	Δείγματα	A ₂₈₀
100A	0,987	100A	0,929	100A	0,478	100A	0,984
100B	3,048	100B	3,051	100B	3,049	100B	3,082
100Γ	0,425	100Γ	0,381	100Γ	0,471	100Γ	0,342
ιμιδαζόλιο 100mM	0,164	ιμιδαζόλιο 100mM	0,164	ιμιδαζόλιο 100mM	0,164	ιμιδαζόλιο 100mM	0,164

Πίνακας 5.3 Τιμές απορρόφησης στα 280 nm δειγμάτων από τα κλάσματα που προέκυψαν προσθέτοντας ποσότητα από το διάλυμα ιμιδαζολίου σε Talon 1x συγκέντρωσης 100 mM κατά τον χρωματογραφικό καθαρισμό του ενζύμου HiC.

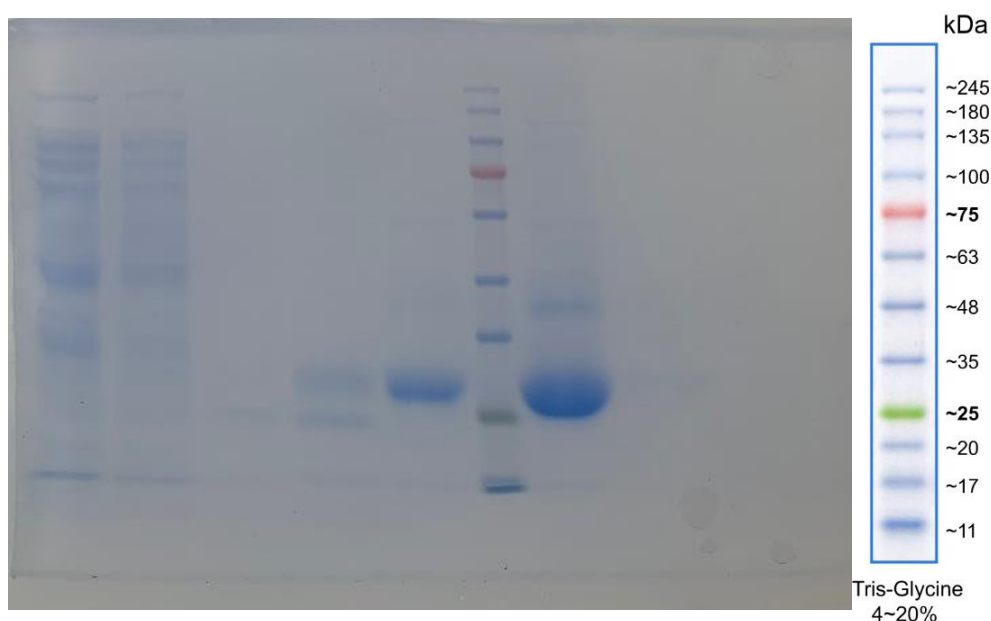
Δείγματα	A ₂₈₀
100A	2,050
100B	1,768
100Γ	0,72
ιμιδαζόλιο 100mM	0,217

Οι τιμές που προέκυψαν, έδειξαν πως οι μεγαλύτερες απορροφήσεις παρατηρήθηκαν κατά κύριο λόγο στα κλάσματα 100B και 100A, αποδεικνύοντας ταυτόχρονα τη σωστή λειτουργία της διαδικασίας του καθαρισμού μέσω των συγκεκριμένων στηλών.

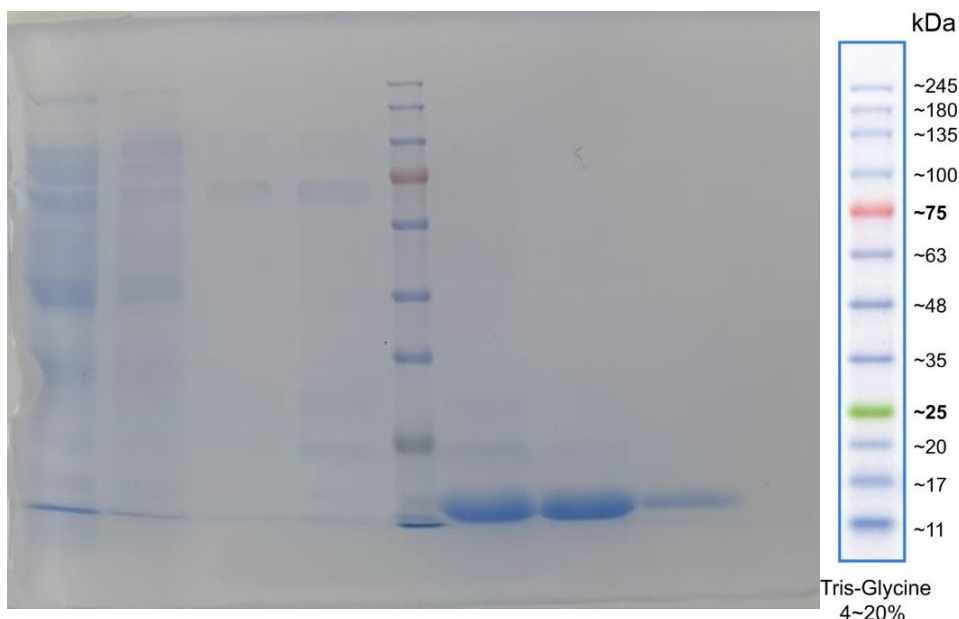
Μία ακόμη παρατήρηση που έγινε ωστόσο, αφορά τις τιμές οι οποίες ήταν μεγαλύτερες της μονάδας. Οι τιμές αυτές δεν έχουν φυσική σημασία και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για υπολογισμό συγκέντρωσης των ενζύμων καθώς βρίσκονται εκτός της γραμμικής περιοχής στην οποία μπορεί να πραγματοποιεί υπολογισμούς το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τη φωτομέτρηση. Μέσω αυτής της μέτρησης δεν μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των ενζύμων καθώς αποτελούν μια απλή ένδειξη και όχι απόδειξη της παρουσίας των ενζύμων στα κλάσματα αυτά.

5.1.3. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Για να γίνει ταυτοποίηση των επιθυμητών ενζύμων, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε δείγματα από τα κλάσματα της χρωματογραφίας συγγένειας. Γνωρίζοντας ότι το ένζυμο LCC^{ICCG} έχει μοριακό βάρος ίσο με 28.834,36 g/mol και αντίστοιχα το ένζυμο HiC ίσο με 20.383,00 g/mol, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση αυτών των δύο ενζύμων καθώς για τη μεν LCC^{ICCG} η ζώνη που εμφανίστηκε ήταν σχεδόν στο ίδιο ύψος με τη ζώνη των 30 kDa του μάρτυρα, ενώ για τη δε HiC ήταν σχεδόν στο ίδιο ύψος με τη ζώνη των 20 kDa. Τα αποτελέσματα της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης ύστερα από τα στάδια χρωματισμού και αποχρωματισμού παρουσιάζονται στην εικόνα 5.1 και στην εικόνα 5.2 όπου διακρίνεται η παρουσία των ενζύμων στο κλάσμα 100A και ακόμα περισσότερο στο κλάσμα 100B. Η παρουσία των ενζύμων στα κλάσματα αυτά ήταν αναμενόμενη μιας και τόσο το κλάσμα 100A όσο και το κλάσμα 100B προέκυψαν ύστερα από χρήση διαλύματος ιμιδαζολίου 100 mM σε Talon 1x. Το ιμιδαζόλιο σε αυτήν τη συγκέντρωση, μπόρεσε να υπερνικήσει τον δεσμό μεταξύ των ιόντων της στήλης και των πολυ-ιστιδινών στο τέλος της αμινοξικής αλληλουχίας των ενζύμων.



Εικόνα 5.1 Gel ηλεκτροφόρησης για το ένζυμο LCC^{ICCG} όπου φαίνονται χρωματισμένες οι ζώνες του ενζύμου στα κλάσματα LCC^{ICCG} 100A και LCC^{ICCG} 100B.



Εικόνα 5.2 Gel ηλεκτροφόρησης για το ένζυμο HiC όπου φαίνονται χρωματισμένες οι ζώνες του ενζύμου στα κλάσματα HiC 100A και HiC 100B.

5.1.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ενζύμων

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας της διαπίδυσης, ακολούθησε ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των ενζύμων τα οποία ήταν σε ελεύθερη μορφή, διαλυμένα στα ρυθμιστικά διαλύματα (Talon 0,5x με pH=7,5 για την LCC^{ICCG}, Tris-HCl 20 mM με pH=8,0 για την HiC). Μικρά δείγματα (250 μ L) από τα τελικά κλάσματα που προέκυψαν, φωτομετρήθηκαν στα 280 nm και η απορρόφηση μετατράπηκε σε συγκέντρωση μέσω του νόμου Beer-Lambert όπως περιγράφεται στην εξίσωση 4.1. Ο τύπος αυτός δίνει τη συγκέντρωση σε μονάδες [M], ενώ πολλαπλασιάζοντας με το MB της κάθε πρωτεΐνης ($MB_{LCC^{ICCG}} = 28.834,36 \frac{g}{mol}$, $MB_{HiC} = 20.383,00 \frac{g}{mol}$), προκύπτει η τελική ενζυμική συγκέντρωση σε μονάδες $\left[\frac{mg}{mL} \right]$.

Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε σε δείγματα των διαλυμάτων των ενζύμων αλλά και των ρυθμιστικών διαλυμάτων που είχαν αραιωθεί 5 φορές έτσι ώστε να αφαιρεθούν στη συνέχεια οι απορροφήσεις που οφείλονται σε αυτά. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη φωτομέτρηση αλλά και από τη μετατροπή της απορρόφησης σε ενζυμική συγκέντρωση φαίνονται στον πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4 Ποσότητες των ενζύμων μέσα από τις ενζυμικές συγκεντρώσεις, όπως αυτές προέκυψαν από τη μετατροπή του A₂₈₀ μέσω του νόμου Beer-Lambert.

Δείγματα	A ₂₈₀	Συγκέντρωση (mg/mL)	Όγκος κλάσματος (mL)	Μάζα ενζύμου (mg)
LCC ^{ICCG}	3,205	3,71	27,5	102,00
Talon 0,5x	0,058	-	-	-
HiC	1,555	3,58	8,5	30,43
Tris-HCl 20mM	0,051	-	-	-

5.1.5. Ακίνητοποίηση ενζύμων

Για την ακίνητοποίηση των ενζύμων στους φορείς πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται στην ενότητα 4.1.4. Για την περίπτωση της LCC^{ICCG}, το συνολικό κλάσμα χωρίστηκε ισομερώς σε δύο μικρότερα επιμέρους για να είναι πιο εύκολος ο χειρισμός τους. Οι αποδόσεις ακίνητοποίησης υπολογίστηκαν μέσα από την εξίσωση 4.2 και παρουσιάζονται στον πίνακα 5.5.

Πίνακας 5.5 Αποδόσεις ακίνητοποίησης για κάθε κλάσμα βιοκαταλύτη.

Όνομα βιοκαταλύτη	Ποσότητα φορέα (mg)	Απόδοση ακίνητοποίησης (%)
HiC-Coral	150	77,0
LCC ^{ICCG} -Amber_1	255	75,7
LCC ^{ICCG} -Amber_2	255	77,9

Μετά το τέλος της ακίνητοποίησης, οι βιοκαταλύτες απέκτησαν την τελική τους μορφή, δηλαδή άνυδρη σκόνη (εικόνα 5.3) μέσω της διαδικασίας της λυοφιλίωσης, έτοιμοι να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα σύνθεσης πολυεστέρων. Σημαντικό χαρακτηριστικό για τους βιοκαταλύτες είναι η φόρτωσή τους (loading) πάνω στους φορείς της ακίνητοποίησης. Το loading ορίζεται ως το πηλίκο της μάζας της ακίνητοποιημένης πρωτεΐνης προς τη συνολική μάζα του βιοκαταλύτη (ακίνητοποιημένη πρωτεΐνη + φορέας ακίνητοποίησης), όπως φαίνεται και

από την εξίσωση 4.3. Είναι σημαντικό χαρακτηριστικό καθώς βοηθά στο να είναι γνωστή η ποσότητα της καθαρής πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται σε κάθε διεργασία.



Εικόνα 5.3 Τελική μορφή βιοκαταλυτών μέσα σε falcons μετά και το τέλος της λυοφιλίωσης.

Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζονται τα loadings των βιοκαταλυτών όπως υπολογίστηκαν από την εξίσωση 4.3.

Πίνακας 5.6 Loadings βιοκαταλυτών που προέκυψαν μετά την ακινητοποίησή τους σε φορείς.

Όνομα βιοκαταλύτη	Loading (%)
HiC-Coral	13,20
LCC ^{LCCG} -Amber_1	13,15
LCC ^{LCCG} -Amber_2	13,49

Τα δύο ξεχωριστά κλάσματα της LCC^{LCCG} ενώθηκαν σε ένα τελικό κλάσμα το οποίο είχε loading ίσο με **13,32%**.

Έχοντας όλα αυτά τα δεδομένα, ξεκίνησε μια μελέτη πάνω στον βιοχημικό χαρακτηρισμό που προέκυψε από την ακινητοποίηση του ενζύμου LCC^{LCCG}. Όσον

αφορά την HiC, είναι ένα ήδη μελετημένο ένζυμο, οπότε τα πειράματα βασίστηκαν πάνω σε υπάρχουσες έρευνες [1],[2].

5.2. Ενεργότητα ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου.

5.2.1. Ενεργότητα ελεύθερου ενζύμου

Στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου οι αντιδράσεις υδρόλυσης του υποστρώματος *p*NPL πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 4.2.2 εντός του φωτόμετρου SpectraMax ABS Plus με λογισμικό SoftMax Pro 7 (Molecular Devices-HELLAMCO). Μετά τα 10 min, οι απορροφήσεις που προέκυψαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.7.

Πίνακας 5.7 Απορροφήσεις στα 410 nm των αντιδράσεων του ελεύθερου ενζύμου με το υπόστρωμα *p*NPL για τη μέτρηση της ενεργότητας.

Πείραμα	A ₄₁₀
Blank_1	0,076
Blank_2	0,094
LCC_1	0,482
LCC_2	0,467
LCC_3	0,467

Σημαντικό βήμα πριν ξεκινήσει η μετατροπή της απορρόφησης σε ενεργότητα, ήταν να γίνει έλεγχος της εγκυρότητας των τιμών που προέκυψαν. Ήταν απαραίτητο δηλαδή να αποδειχτεί η γραμμικότητα στην κινητική της αντίδρασης του ελεύθερου ενζύμου με το υπόστρωμα *p*NPL (1 mM) στους 35°C για 10 min. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όπου οι αντιδράσεις έγιναν εντός του φωτόμετρου, ο έλεγχος έγινε απευθείας από το λογισμικό παρακολουθώντας σε πραγματικό χρόνο πως εξελίσσεται το φαινόμενο.

Κάνοντας λοιπόν την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τις αντιδράσεις αυτές, προέκυψε ενεργότητα ίση με **2,043±0,046 units/mg** (rsd=2,24%).

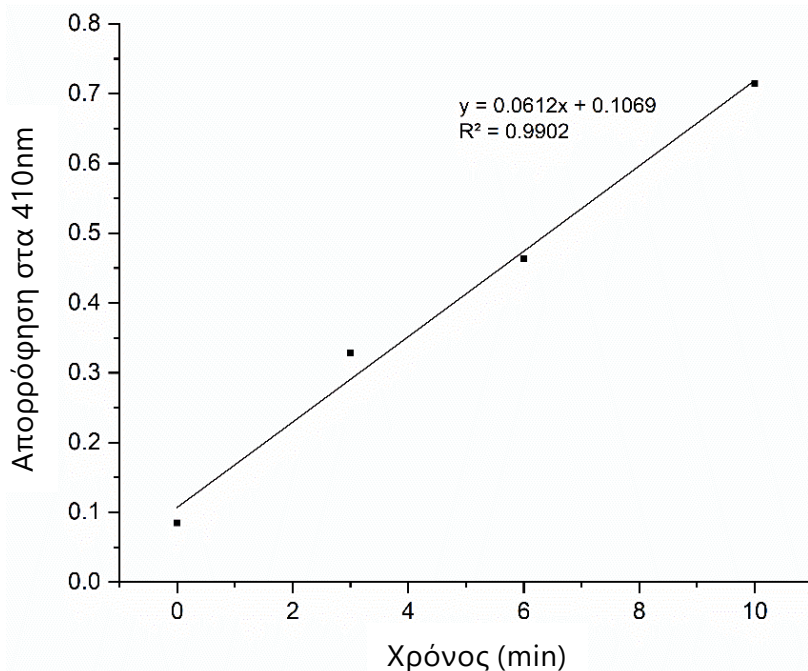
5.2.2. Ενεργότητα ακινητοποιημένου ενζύμου

Όσον αφορά τη μέτρηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC^{ICCG}, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε thermomixer όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.2.2 και οι απορροφήσεις που προέκυψαν ύστερα από φωτομέτρηση του υπερκείμενου κάθε αντίδρασης στα 410 nm παρουσιάζονται συγκριτικά στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 5.8).

Πίνακας 5.8 Απορροφήσεις στα 410 nm των αντιδράσεων του ακινητοποιημένου ενζύμου με το υπόστρωμα pNPL για τη μέτρηση της ενεργότητας του στερεού βιοκαταλύτη.

Πείραμα	Απορρόφηση στα 410 nm
Blank_1	0,088
Blank_2	0,080
LCC_1	1,018
LCC_2	0,914
LCC_3	0,808

Αντίστοιχα με την περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου, και σε αυτή τη περίπτωση για να φανεί αν είναι έγκυρες οι τιμές που προέκυψαν, χρειάστηκε να αποδειχτεί η γραμμικότητα στην κινητική της αντίδρασης του βιοκαταλύτη με το υπόστρωμα. Έτσι λοιπόν, δημιουργήθηκε η καμπύλη αναφοράς για το συγκεκριμένο σύστημα έτσι ώστε να αποδειχτεί η γραμμικότητα αυτή, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 5.1.



Διάγραμμα 5.1 Κινητική αντίδρασης του βιοκαταλύτη LCC^{ICCG} με το υπόστρωμα pNPL στους 35°C.

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, και γνωρίζοντας ότι η κινητική της αντίδρασης του βιοκαταλύτη με το υπόστρωμα εξελίσσεται γραμμικά, οι απορροφήσεις που προέκυψαν μετατράπηκαν σε τιμές συγκέντρωσης μέσω της εξίσωσης $C = \alpha \cdot A_{410}$, όπου το α είναι ένας συντελεστής ο οποίος αντικατοπτρίζει την κλίση της καμπύλης αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων pNP συναρτήσει διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων μεταβλητών αλάτων και pH, της μορφής $y = \alpha x$. Στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος Citrate-Phosphate με pH=6, η τιμή του α είναι ίση με 0,4667.

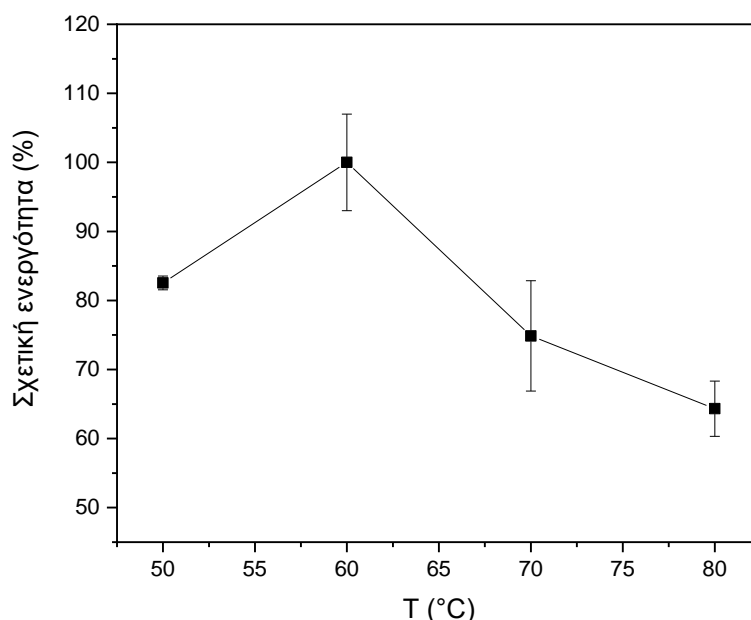
Οι απορροφήσεις αυτές μετατράπηκαν σε συγκεντρώσεις και έπειτα σε τιμές ενεργότητας όπως και στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου. Το αποτέλεσμα από αυτές τις μετρήσεις οδήγησε σε τιμή ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου ίση με **0,693 ± 0,080 units/mg** (rsd=12%).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις ενεργότητας του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου ενζύμου, φαίνεται πως πραγματοποιήθηκε μείωση της ενεργότητας όταν το ένζυμο ακινητοποιήθηκε στον φορέα, γεγονός που συμφωνεί με δεδομένα της βιβλιογραφίας. Συγκεκριμένα, μέσα από αναζήτηση

στη βιβλιογραφία προκύπτει το συμπέρασμα πως είναι πολύ σύνηθες η ενεργότητα ενός ενζύμου να μειώνεται μετά την ακινητοποίησή του λόγω αλλαγής στη δομή του. Αυτή η αλλαγή συνήθως προκαλείται από τη σύνδεση στον φορέα επηρεάζοντας τελικά κι άλλες ιδιότητες του ενζύμου [3].

5.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου – T_{opt} .

Ολοκληρώνοντας την πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα, οι απορροφήσεις που προέκυψαν από τη φωτομέτρηση στα 410 nm αξιοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η ποσοστιαία σχετική ενεργότητα αφού πρώτα είχε γίνει αναγωγή των απορροφήσεων ως προς τη μάζα του στερεού βιοκαταλύτη (φορέα ακινητοποίησης για τα Blank πειράματα). Η σχετική ενεργότητα για την κάθε θερμοκρασία προσδιορίστηκε σε σύγκριση με την ενεργότητα στη θερμοκρασία στην οποία εμφανίστηκε η βέλτιστη δράση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.2.

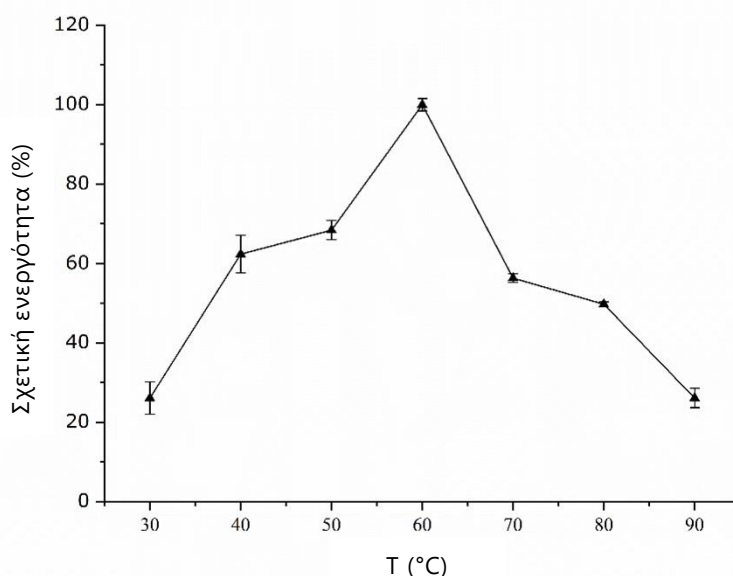


Διάγραμμα 5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC^{ICCG}.

Η καμπύλη η οποία προέκυψε στο διάγραμμα 5.2 παρουσιάζει ένα μέγιστο όσον αφορά τη σχετική ενεργότητα σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, ακριβώς όπως αναφέρει και το μοντέλο ισορροπίας βάσει του οποίου περιγράφεται η εξάρτηση της ενεργότητας από τη θερμοκρασία (διάγραμμα 4.1).

Η μελέτη για το $T_{opt.}$ του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC^{ICCG} έδειξε πως ο βιοκαταλύτης είχε μέγιστη δράση απέναντι σε εστερικά υποστρώματα σε θερμοκρασία ίση με 60°C όταν η αντίδραση διαρκούσε 9 min. Μάλιστα, η σχετική ενεργότητα αυξανόταν μέχρι τους 60°C ξεκινώντας από ένα ποσοστό ίσο με ~83%, ενώ στη συνέχεια η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση του ποσοστού αυτού από 100% σε ~75% φτάνοντας τελικά στους 80°C σε ένα ποσοστό ίσο με 64%.

Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της μελέτης για την εύρεση του $T_{opt.}$ του ελεύθερου ενζύμου (διάγραμμα 5.3), η οποία πραγματοποιήθηκε από τους Makryniotis *et al.* [4].



Διάγραμμα 5.3 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου LCC^{ICCG} [4].

Συγκρίνοντας το διάγραμμα 5.2 και το διάγραμμα 5.3, διαπιστώνεται πως η ακινητοποίηση δεν επηρέασε το $T_{opt.}$ καθώς και στις 2 περιπτώσεις η βέλτιστη

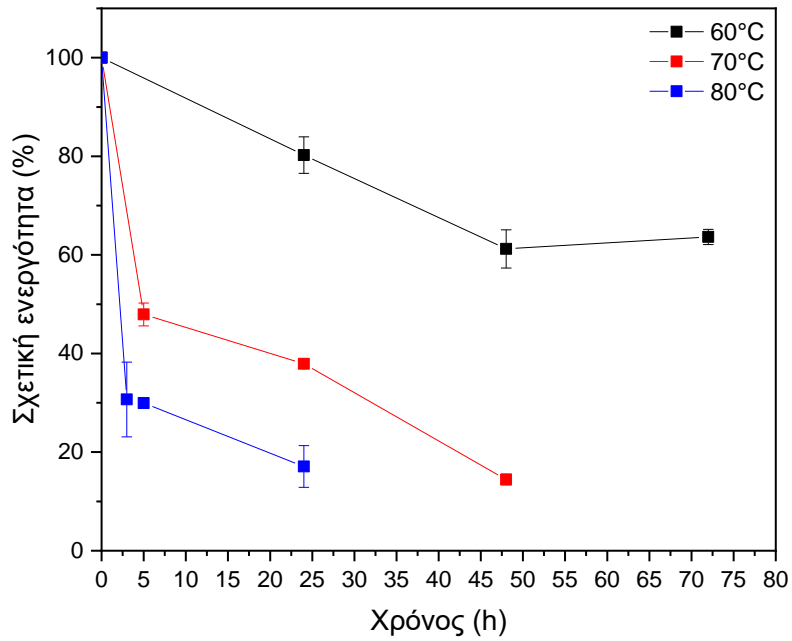
δράση εμφανίστηκε στους 60°C. Ωστόσο, η διαφορά που παρατηρήθηκε αφορά τη σχετική ενεργότητα στις άλλες θερμοκρασίες γύρω από τους 60°C, όπου φάνηκε πως μετά την ακινητοποίηση, η σχετική ενεργότητα στους 50°C αλλά και στους 70°C ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με τις τιμές του ελεύθερου ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, στους 50°C το ελεύθερο ένζυμο είχε ποσοστό σχετικής ενεργότητας ίσο περίπου με 65%, το οποίο μετά την ακινητοποίηση έφτασε στο 83%. Αντίστοιχα, στην περίπτωση όπου η θερμοκρασία ήταν ίση με 70°C, το ποσοστό της σχετικής ενεργότητας πριν την ακινητοποίηση ήταν μικρότερο από 60% ενώ μετά την ακινητοποίηση έφτασε σχεδόν το 75%. Έτσι λοιπόν, το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι ενδεχομένως η ακινητοποίηση να βοήθησε στο να γίνει πιο δραστικό το ένζυμο στις θερμοκρασίες γύρω της βέλτιστης σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του.

5.4. Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ενζύμου

Αντίστοιχα με τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, έτσι και σε αυτή την περίπτωση έγινε αναγωγή των απορροφήσεων στα 410 nm ως προς τη μάζα του βιοκαταλύτη που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα και αξιοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της ποσοστιαίας σχετικής ενεργότητας.

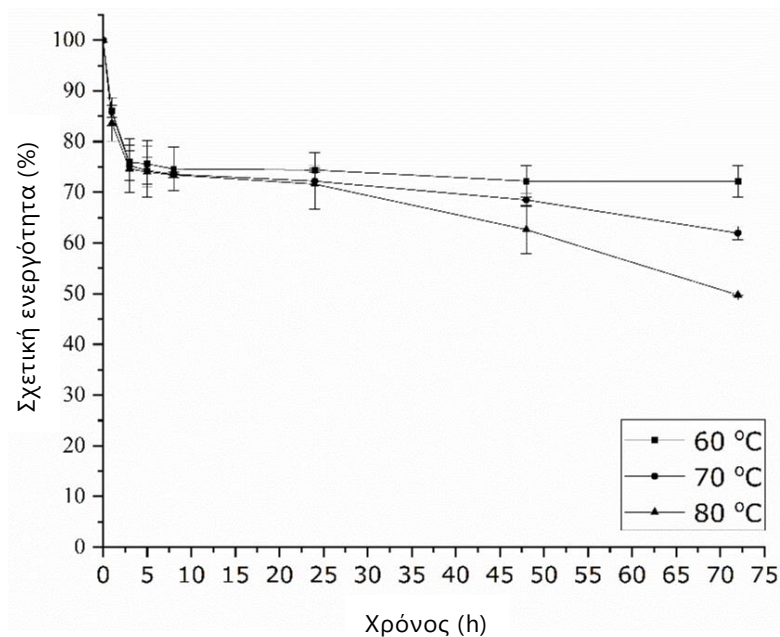
Θεωρώντας πως ο βιοκαταλύτης που δεν είχε υποστεί επώαση, είχε το 100% της ενεργότητας, προκύπτει πως όλες οι τιμές είχαν ως σημείο αναφοράς αυτήν την τιμή όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα 5.4.

Το διάγραμμα 5.4 δείχνει πως ο βιοκαταλύτης έχασε λιγότερο από το 20% της ενεργότητάς του μέχρι τις πρώτες 24 h επώασης στους 60°C, παραμένοντας σχεδόν σταθερός. Μάλιστα, φαίνεται πως μετά από κάποια στιγμή έπαψε να χάνει άλλη ενεργότητα φτάνοντας περίπου σε ένα 60% της αρχικής τιμής. Αντίθετα στις υπόλοιπες θερμοκρασίες φαίνεται πως η ενεργότητα μειώθηκε πολύ γρηγορότερα καθιστώντας τον βιοκαταλύτη πλήρως ασταθή στους 70 και στους 80°C, από τις πρώτες κιόλας ώρες.



Διάγραμμα 5.4 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου LCC^{ICCG}.

Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της έρευνας που πραγματοποιήθηκε από τους Makryniotis *et al.* [4] σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ελεύθερου ενζύμου (διάγραμμα 5.5).



Διάγραμμα 5.5 Επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του ελεύθερου ενζύμου LCC^{ICCG} [4].

Οι δύο αυτές μελέτες δείχνουν πως η ακινητοποίηση οδήγησε σε γρηγορότερη μείωση της ενεργότητας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60°C κάνοντας τον βιοκαταλύτη θερμικά ασταθέστερο σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Συγκεκριμένα από το διάγραμμα 5.4, φαίνεται πως στην περίπτωση των 60°C, το ένζυμο κατάφερε να διατηρήσει πάνω από το 80% της αρχικής του ενεργότητας μέχρι τις πρώτες 24 h φτάνοντας σε μια σταθερή τιμή (~60%) σε βάθος χρόνου, σε αντίθεση με την περίπτωση όπου βρισκόταν ελεύθερο όπου η ενεργότητά του είχε φτάσει γύρω στο 75% στο ίδιο χρονικό διάστημα (διάγραμμα 5.5). Όσον αφορά τις υπόλοιπες θερμοκρασίες στις οποίες έγινε μελέτη, η σχετική ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου σε βάθος χρόνου συνέχισε να μειώνεται παραμένοντας σε ποσοστά μεγαλύτερα του 50%. Κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στον στερεό βιοκαταλύτη, καθώς η σχετική του ενεργότητα τόσο στους 70 όσο και στους 80°C έφτασε να είναι μικρότερη από 20% εντός του πρώτου 24ωρου.

Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και μέσα από αναζήτηση στη βιβλιογραφία και μάλιστα σε μελέτη πάνω σε λιπάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Thermomyces lanuginosus* (TLL), η οποία όταν βρισκόταν σε ακινητοποιημένη μορφή πάνω σε σφαιρίδια οκτυλοαγαρόζης είχε χαμηλότερη θερμική σταθερότητα από ό,τι όντας ελεύθερη καθώς η φόρτωσή της στον φορέα ήταν αρκετά μεγάλη. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα 5.2.2, η ακινητοποίηση πολλές φορές μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη δομή μιας πρωτεΐνης επηρεάζοντας αρνητικά τις ιδιότητές της. Έτσι λοιπόν, η μειωμένη θερμική σταθερότητα στην ακινητοποιημένη μορφή μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης μεταξύ μορίων ενζύμου των οποίων η δομή έχει μερικώς μεταβληθεί εξαιτίας της σύνδεσης με τον φορέα οδηγώντας σε μερικώς ξεδιπλωμένες δομές [5].

5.5. Βιβλιογραφία

- [1] Y. Sun, J. Wu, L. Su, Expression of *Humicola insolens* Cutinase in *Escherichia coli* and its Optimization of Fermentation, *Food and Machinery* 34 (2018) 4–28. <https://doi.org/10.13652/j.issn.1003-5788.2018.04.001>.
- [2] L. Su, R. Hong, D. Kong, J. Wu, Enhanced activity towards polyacrylates and poly(vinyl acetate) by site-directed mutagenesis of *Humicola insolens*

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα ετερόλογης έκφρασης HiC & LCC^{ICCG} – χαρακτηρισμός βιοκαταλύτη LCC^{ICCG}
cutinase, *Int J Biol Macromol* 162 (2020) 1752–1759.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.261>.

- [3] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem Soc Rev* 42 (2013) 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>.
- [4] K. Makryniotis, E. Nikolaivits, C. Gkountela, S. Vouyiouka, E. Topakas, Discovery of a polyesterase from *Deinococcus maricopenis* and comparison to the benchmark LCC^{ICCG} suggests high potential for semi-crystalline post-consumer PET degradation, *J Hazard Mater* 455 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131574>.
- [5] H. Zaak, E.H. Siar, J.F. Kornecki, L. Fernandez-Lopez, S.G. Pedrero, J.J. Virgen-Ortíz, R. Fernandez-Lafuente, Effect of immobilization rate and enzyme crowding on enzyme stability under different conditions. The case of lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads, *Process Biochemistry* 56 (2017) 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.02.024>.

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC

6.1. Εισαγωγικά στοιχεία

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη της δράσης δύο κουτινασών σε πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού δύο σταδίων για την παραγωγή πολυ(ηλεκτρικού βουτυλεστέρα). Η μελέτη αυτών των δύο ενζύμων σε αντιδράσεις σύνθεσης PBS παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον με βάση δεδομένα που έχουν προκύψει στη βιβλιογραφία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην ενότητα 2.2.2, προσπάθειες κατάλυσης πειραμάτων ενζυμικού πολυμερισμού με HiC οδήγησαν σε σύνθεση πολυεστέρων από διάφορες πρώτες ύλες, από όπου φάνηκε η προτίμηση του ενζύμου σε υποστρώματα με μεγάλες αλυσίδες (πάνω από 4 άτομα C). Ένα παράδειγμα ήταν η σύνθεση ομοπολυμερούς χρησιμοποιώντας ως μονομερές το C16-ωHA όπου η κατάλυση της HiC με τεχνική διαλύματος ύστερα από 8 ώρες στους 70°C με κενό 10 mmHg οδήγησε σε προϊόν με \overline{M}_n ίσο με 40.400 g/mol [1],[2]. Από την άλλη μεριά, οι έρευνες σχετικά με την LCC^{ICCG}, περιλαμβάνουν κυρίως προσπάθειες υδρόλυσης πολυεστέρων, οδηγώντας σε ένα πρώτο συμπέρασμα πως το ένζυμο αυτό αλληλοεπιδρά καλύτερα με υποστρώματα που έχουν πιο μικρές αλυσίδες (μονομερή με 4 άτομα C το πολύ) [3]. Έτσι, σε δεύτερο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις αποπολυμερισμού και μάλιστα δοκιμές υδρόλυσης του PET, καταφέροντας ποσοστό αποικοδόμησης ίσο με 90% ύστερα από 9,5 h περίπου, με τη θερμοκρασία να είναι ίση με 72°C [4].

Παραμένοντας στο ίδιο κλίμα με αυτές τις προσπάθειες της βιβλιογραφίας, και θέλοντας να τονιστεί ο «πράσινος» χαρακτήρας των διεργασιών, στην παρούσα διπλωματική επιλέχθηκε ως μέθοδος πολυμερισμού η τεχνική μάζας. Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έγινε διερεύνηση της θερμοκρασίας του πρώτου σταδίου (50-70°C για την LCC^{ICCG} και 40-60°C για την HiC), με βάση τη μελέτη που προηγήθηκε (κεφάλαιο 5), σε ατμοσφαιρική πίεση για 24 h ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του κάθε ενζύμου. Οι συνθήκες του δεύτερου σταδίου (80°C για την LCC^{ICCG} και 70°C για την HiC, 20 mbar, 2 h)

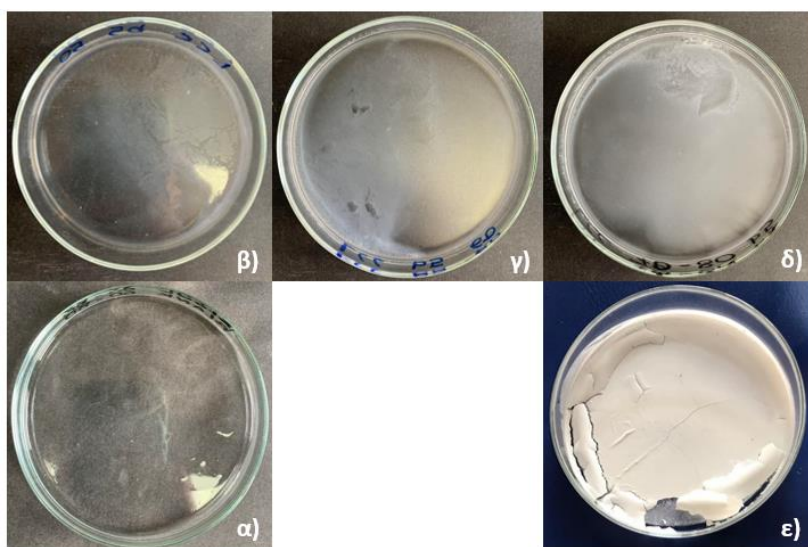
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC
επιλέχθηκαν με τρόπο τέτοιο ώστε να μπορέσει να εξελιχθεί η αντίδραση περαιτέρω και ήταν ίδιες για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του ενζύμου LCC^{ICCG} και του ενζύμου HiC αντίστοιχα.

Όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζονται συγκριτικά με τα αποτελέσματα από τη σύνθεση του PBS η οποία έχει πραγματοποιηθεί στα πλαίσια προηγούμενης εργασίας του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πολυμερών χρησιμοποιώντας ως βιοκαταλύτη την εμπορικά διαθέσιμη ακινητοποιημένη λιπάση N435 (1^ο στάδιο: 24 h, 40°C, 1000 mbar – 2^ο στάδιο: 2 h, 90°C, 20 mbar) [5]. Εκτός από τα πειράματα όπου πραγματοποιείται βιοκατάλυση, πραγματοποιήθηκε πείραμα αναφοράς, χωρίς τη χρήση ενζύμου (Blank_60). Οι συνθήκες του συγκεκριμένου πειράματος είναι οι ίδιες με τις συνθήκες του πειράματος LCC_60 (πίνακας 4.9).

6.2. Χαρακτηρισμός προϊόντων μέσω κατάλυσης με LCC^{ICCG}

6.2.1. Μορφολογία προϊόντων και αποδόσεις διεργασίας

Η μορφολογία των προϊόντων που προέκυψαν από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} φαίνονται στην εικόνα 6.1.



Εικόνα 6.1 Μορφολογία προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού α) Blank_60, β) LCC_50, γ) LCC_60, δ) LCC_70, ε) N435_40.

Το προϊόν του πειράματος αναφοράς παραλήφθηκε σε υγρή μορφή, όπως ακριβώς είναι και τα μονομερή τα οποία χρησιμοποιούνται, υποδηλώνοντας πως χωρίς τον βιοκαταλύτη δεν πραγματοποιήθηκε σύνθεση PBS. Στη συνέχεια, εξετάζοντας μακροσκοπικά τη μορφολογία των προϊόντων που προέκυψαν από τα πειράματα με LCC^{LCCG}, φάνηκε πως και τα 3 βρίσκονταν σε μορφή γέλης (gel) έχοντας ένα πολύ ελαφρύ λευκό χρώμα. Παρατηρήθηκε επίσης ότι με αύξηση της θερμοκρασίας, το gel αυτό γινόταν όλο και πιο ξηρό (LCC_70) πλησιάζοντας τη μορφολογία του πειράματος N435_40 το οποίο βρισκόταν σε στερεή μορφή.

Το μοριακό βάρος (MB) των ολιγομερών μπορεί να συσχετιστεί με τη διαφορετική τους μορφολογία. Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση του MB οδηγεί σε στερεά προϊόντα ενώ όσο πιο μικρός είναι ο βαθμός πολυμερισμού, η κατάσταση των υλικών προσομοιάζει την υγρή [6].

Οι αποδόσεις που προέκυψαν μετά τα πειράματα του ενζυμικού προπολυμερισμού παρουσιάζονται στον πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1 Τιμές αποδόσεων διεργασίες για τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με το ένζυμο LCC^{LCCG}.

Πείραμα	Απόδοση διεργασίας (%)
LCC_50	112
LCC_60	103
LCC_70	99
N435_40	81

Τα δεδομένα του πίνακα 6.1 υποδηλώνουν ότι στα πειράματα LCC_50 και LCC_60 πιθανώς υπήρχαν υπολείμματα μονομερών τα οποία δεν αντέδρασαν και παρέμειναν στο τελικό προϊόν κάτι που συμφωνεί και με τη μορφολογία των προϊόντων αυτών. Ωστόσο, φαίνεται πως όσο αυξανόταν η θερμοκρασία του πρώτου σταδίου, προέκυπταν όλο και πιο ξηρά προϊόντα, απαλλαγμένα από

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC υπολείμματα μονομερών προσεγγίζοντας όλο και περισσότερο τη μορφολογία του PBS που προέκυψε από την κατάλυση του N435.

6.2.2. Ταυτοποίηση της δομής μέσω φασματοσκοπίας

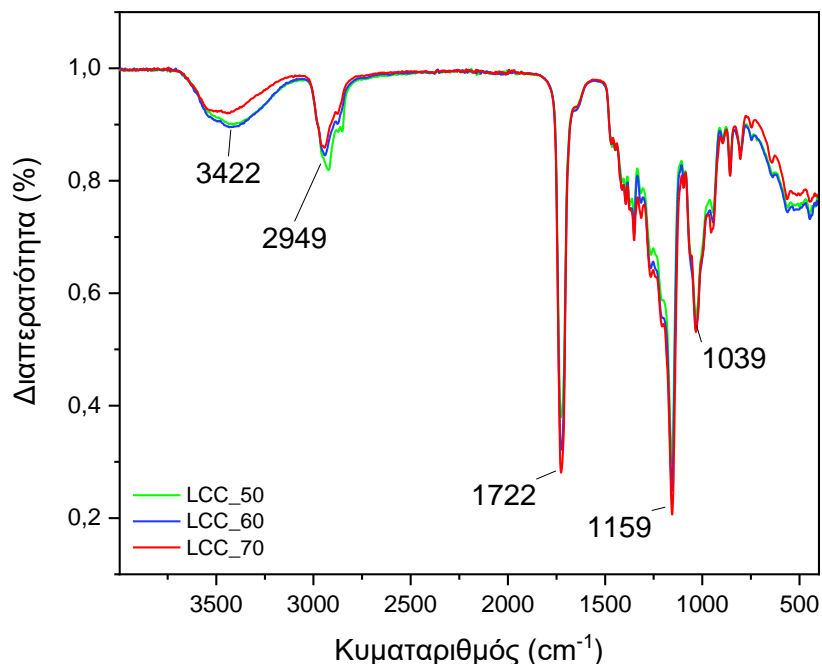
Φασματοσκοπία υπερύθρου FT-IR

Πριν την ανάλυση των δειγμάτων από τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού, αναζητήθηκαν βιβλιογραφικά οι χαρακτηριστικές κορυφές του PBS (πίνακας 6.2).

Πίνακας 6.2 Βιβλιογραφικά δεδομένα για τις χαρακτηριστικές κορυφές του PBS σε ένα φάσμα FT-IR [7].

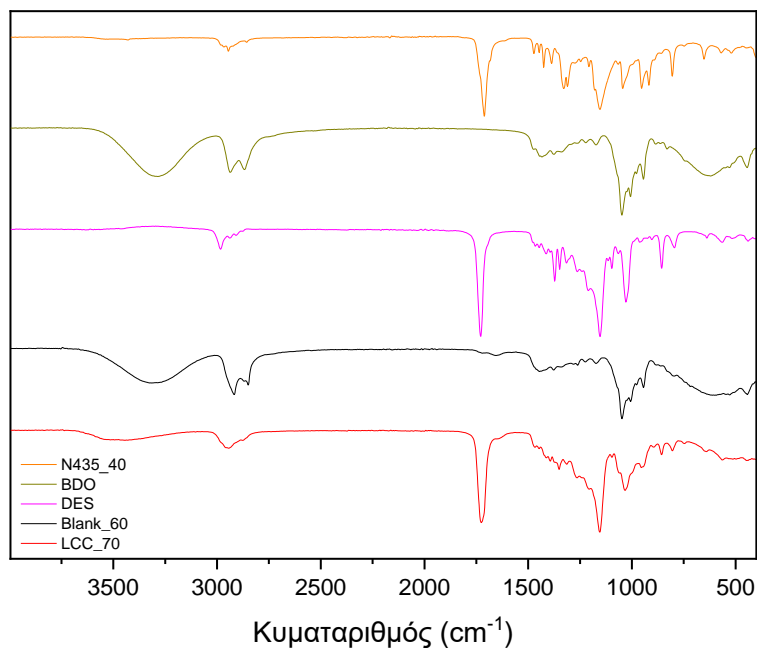
Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Είδος κορυφής
~3430	Τάση του δεσμού O-H
2945	Ασύμμετρη τάση του δεσμού C-H
~1720	Δονήσεις τάσης του δεσμού C=O
1159	Δονήσεις τάσης του εστερικού δεσμού C-O-C
1044	Δονήσεις τάσης του δεσμού O-C-C

Με βάση λοιπόν τα δεδομένα του πίνακα 6.2, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση της δομής του PBS σε όλα τα προϊόντα καθώς περιέχονταν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές του πολυεστέρα στα φάσματα των προϊόντων όπως αυτές προέκυψαν από βιβλιογραφικά δεδομένα [7]. Συγκεκριμένα, φάνηκε πως τα φάσματα αυτά ταυτίζονταν σχεδόν απόλυτα μεταξύ τους (διάγραμμα 6.1) και για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα από τα 3 με σκοπό να γίνει σύγκριση με τα φάσματα των πειραμάτων αναφοράς (Blank_60 και N435_40), όπως φαίνεται στο διάγραμμα 6.2.



Διάγραμμα 6.1 Φάσματα FT-IR των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG}.

Συγκρίνοντας το διάγραμμα 6.1 και το διάγραμμα 6.2, φάνηκε πως υπήρχαν κάποιες διαφορές αλλά και κάποιες ομοιότητες μεταξύ των φασμάτων.



Διάγραμμα 6.2 Φάσματα μονομερών, πειραμάτων αναφοράς (Blank_60 και N435_40) και πειράματος LCC_70.

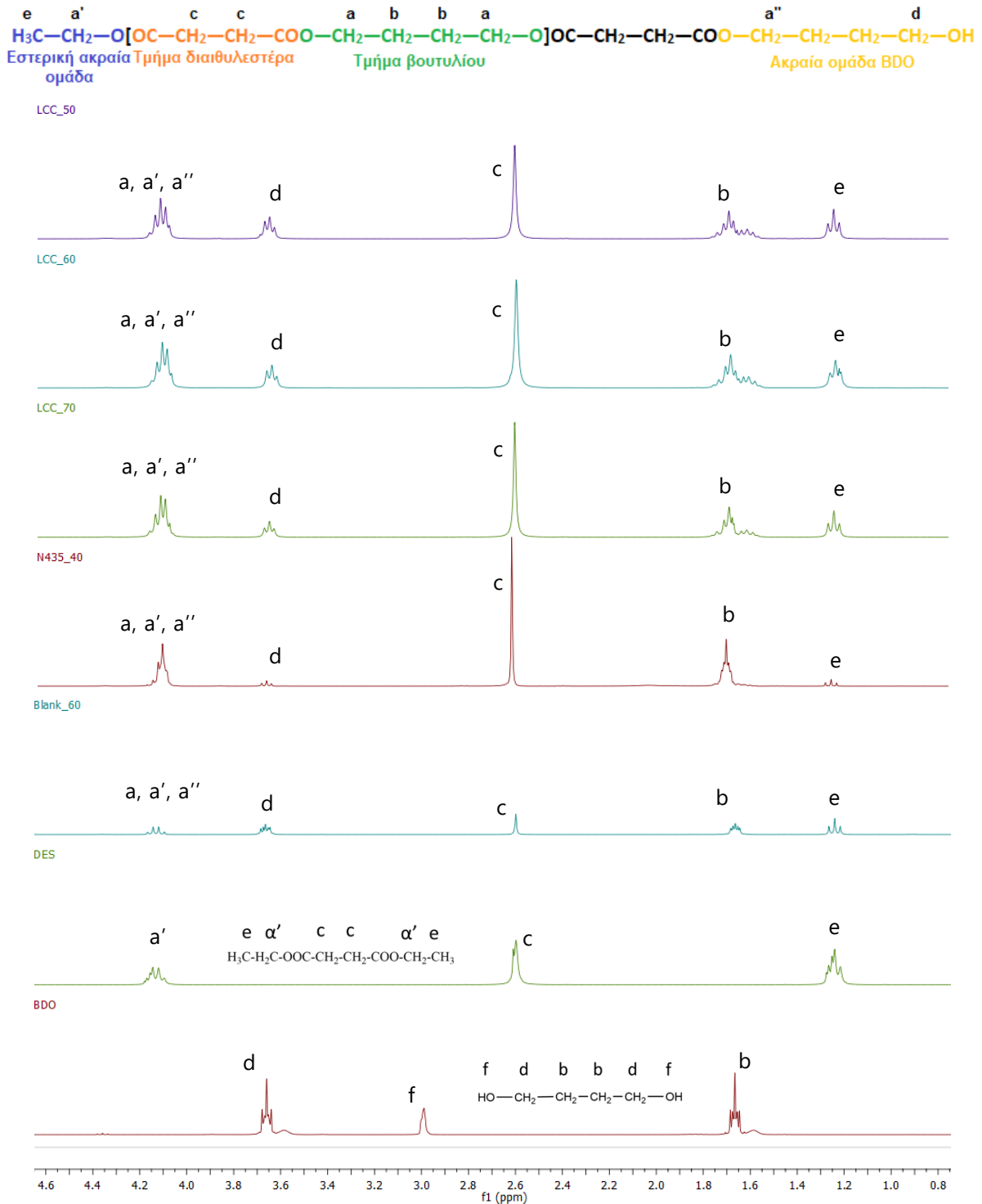
Αρχικά, συγκρίνοντας το φάσμα του προϊόντος από το πείραμα N435_40 με το αντίστοιχο φάσμα από το προϊόν του πειράματος LCC_70, φάνηκε πως τα φάσματα αφορούσαν το ίδιο πολυμερές καθώς υπήρχαν και στις δύο περιπτώσεις όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που παρουσιάζονται παραπάνω (πίνακας 6.2), οδηγώντας για πρώτη φορά στο συμπέρασμα ότι η χρήση του ενζύμου LCC^{ICCG} είχε ως αποτέλεσμα πράγματι τη σύνθεση του PBS.

Αντίθετα, όσον αφορά το φάσμα που αντιστοιχεί στο πείραμα Blank_60, φάνηκε πως είχε περισσότερες ομοιότητες με τα φάσματα των μονομερών παρά με το φάσμα του πειράματος LCC_70. Ωστόσο, το γεγονός ότι το φάσμα του πειράματος Blank_60 δεν ταυτιζόταν απόλυτα με αυτά των μονομερών, πιθανώς να σημαίνει πως ακόμα και χωρίς τον καταλύτη ενδεχομένως να πραγματοποιήθηκε η αντίδραση της μετεστεροποίησης αλλά να προέκυψε προϊόν με πολύ μικρό βαθμό πολυμερισμού, γεγονός που είναι δυνατόν να συμβεί όπως αποδείχτηκε και μέσα από αναζήτηση σε δεδομένα της βιβλιογραφίας [8]. Πιο αναλυτικά, οι Sena *et al.* [8], προσπαθώντας να συνθέσουν PBS μέσω ενζυμικού πολυμερισμού με χρήση ακινητοποιημένης CALB, πραγματοποίησαν πειράματα αναφοράς (Blank) δύο σταδίων (1^ο στάδιο: 150°C, 24 h, ατμόσφαιρα N₂, 2^ο στάδιο: 95°C, 24 h, ατμόσφαιρα N₂ ή κενό, τεχνική μάζας ή τεχνική διαλύματος) οδηγώντας σε σύνθεση προϊόντος με μέσου-αριθμού μοριακό βάρος $\overline{M}_n=500$ g/mol όταν στα αντίστοιχα πειράματα με χρήση βιοκατάλυσης προέκυψαν προϊόντα με $\overline{M}_n=4600$ g/mol.

Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού

Στο διάγραμμα 6.3 απεικονίζονται τα φάσματα NMR των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού στα οποία πραγματοποιήθηκε κατάλυση της LCC^{ICCG}. Τα φάσματα αυτά συγκρίνονται με τα φάσματα των πειραμάτων αναφοράς (N435_40 και Blank_60) αλλά και με τα αντίστοιχα των μονομερών.

Λαμβάνοντας υπόψη τις ομάδες των χημικά ισοδύναμων πρωτονίων όπως αυτές φαίνονται στο διάγραμμα 6.3 καθώς και τα βιβλιογραφικά δεδομένα, προκύπτει για το PBS πως:



Διάγραμμα 6.3 Φάσματα ¹H-NMR των προϊόντων από τα πειράματα της LCC^{ICCG}, των μονομερών και των πειραμάτων αναφοράς.

- ❖ Τα υδρογόνα τα οποία βρίσκονται στη θέση c (-CO-CH₂-CH₂-CO-, τμήμα διαιθυλεστέρα) είναι εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και αντιστοιχούν σε κορυφή στα 2,62 ppm.

- ❖ Τα υδρογόνα που βρίσκονται στη θέση a ($-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, τμήμα βουτυλίου) βρίσκονται εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και αντιστοιχούν σε κορυφή στα 4,12 ppm. Τα υδρογόνα a' και a'' βρίσκονται εκτός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας, όμως είναι χημικά ισοδύναμα με αυτά της ομάδας a, οπότε υπάρχει αλληλοεπικάλυψη στα 4,12 ppm
- ❖ Τα υδρογόνα της θέσης b ($-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, τμήμα βουτυλίου) βρίσκονται κι αυτά εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και αντιστοιχούν σε κορυφή στα 1,71 ppm.
- ❖ Τα υδρογόνα που ανήκουν στη θέση e ($CH_3-CH_2-O-CO-$, εστερική ακραία ομάδα) βρίσκονται εκτός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και αντιστοιχούν σε κορυφή στα 1,25 ppm.
- ❖ Τα υδρογόνα της θέσης d ($HO-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, ακραία ομάδα της BDO) βρίσκονται κι αυτά εκτός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και αντιστοιχούν σε κορυφή που εμφανίζεται στα 3,67 ppm [9].

Μέσα από τα δεδομένα από το διάγραμμα 6.3, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση της δομικής μονάδας του PBS στα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού καθώς εμφανίστηκαν όλες οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στο πολυμερές αυτό, όπως αυτές προκύπτουν από τη βιβλιογραφία [9]. Οι κορυφές αυτές που φάνηκε να ταιριάζουν με τις αντίστοιχες του φάσματος που αντιστοιχεί στο πείραμα N435_40, εμφανίστηκαν και στο φάσμα του Blank_60, με πολύ μικρότερη όμως ένταση.

Μια σημαντική διαφορά που διαπιστώθηκε και στα φάσματα από το διάγραμμα 6.3, ήταν η απουσία της κορυφής που αντιστοιχεί στην υδροξυλομάδα της BDO (~3 ppm – κορυφή f [10]) από τα φάσματα των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού τόσο με LCC^{ICCG} όσο και με N435. Παρόλο που είναι πιθανόν να σχηματίστηκαν αλυσίδες oligομερών έχοντας ακραίες ομάδες OH, το γεγονός ότι δεν ανιχνεύτηκαν στα φάσματα των προϊόντων ενδεχομένως να οφείλεται στη δημιουργία ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών των ομάδων και των εστερικών δεσμών [11]. Αυτά τα δεδομένα, έδειξαν πως δεν υπήρχαν υπολείμματα BDO στα προϊόντα, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα πως οι αυξημένες αποδόσεις που βρέθηκαν, πιθανόν να οφείλονταν σε υπολείμματα του DES.

Πίνακας 6.3 Ολοκληρώσεις κορυφών στα φάσματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435.

Πείραμα	Ολοκληρώσεις κορυφών				
	a, a', a''	b	c	d	e
LCC_50	3,82	4,70	4,00	1,98	1,93
LCC_60	3,88	4,74	4,00	1,77	1,68
LCC_70	3,88	4,23	4,00	1,12	1,48
N435_40	3,99	4,22	4,00	0,35	0,34

Συνεχίζοντας την ανάλυση των αποτελεσμάτων από τα φάσματα ¹H-NMR, φάνηκε πως από τις ολοκληρώσεις των κορυφών (πίνακας 6.3) στα 4,12 ppm και 1,71 ppm, εκεί που αντιστοιχούν δηλαδή οι ομάδες a,a',a'' και b αντίστοιχα, οι τιμές που προέκυψαν για αυτές τις κορυφές ήταν κοντά στο 4 το οποίο ταιριάζει με τον αριθμό των υδρογόνων της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας που αντιστοιχούν στις ομάδες τύπου a και b.

6.2.3. Σύγκριση αποτελεσμάτων FT-IR και ¹H-NMR

Χρησιμοποιώντας την εξίσωση 4.6 έγινε υπολογισμός του ποσοστού των ακραίων εστερικών ομάδων και υδροξυλομάδων στα προϊόντα των πειραμάτων της LCC^{ICCG}. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή αυτής της εξίσωσης φαίνονται στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π1).

Τα δεδομένα αυτού του πίνακα δείχνουν πως από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} αλλά και με N435, προέκυψαν προϊόντα πλούσια σε ακραίες ομάδες OH κάτι που συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα σύνθεσης ολιγομερών του PBS μέσω ενζυμικού πολυμερισμού. Συγκεκριμένα, περιπτώσεις ενζυμικά καταλυόμενων διεργασιών σύνθεσης PBS από λιπάσες (όπως και το N435) έχουν δείξει πως ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση των μονομερών με το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από δύο στάδια. Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιείται αντίδραση μεταξύ του εστέρα

(συνήθως DES) και της υδροξυλομάδας της σερίνης του ενεργού κέντρου προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου ακυλοενζύμου. Σε δεύτερο στάδιο, λαμβάνει χώρα η αντίδραση αυτού του ενδιάμεσου με την πυρηνόφιλη BDO σχηματίζοντας το τελικό προϊόν το οποίο αποδεσμεύεται από το ενεργό κέντρο και το ένζυμο αναγεννάται [6]. Έτσι λοιπόν, οι διεργασίες στις οποίες πραγματοποιείται ενζυμική σύνθεση του PBS από BDO και DES με βάση τον παραπάνω μηχανισμό, οδηγούν συνήθως σε ολιγομερή πλούσια σε ακραίες υδροξυλομάδες καθώς το χαμηλό εσωτερικό μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του DES, δυσχεραίνει την προσβασιμότητα αυτού του μονομερούς στο ενεργό κέντρο. Αντίθετα, η παρουσία περισσότερων ατόμων C στην αλυσίδα της BDO, καθιστά αυτό το μονομερές περισσότερο υδρόφοβο, διευκολύνοντας έτσι τη διάχυσή του στο υδρόφοβο ενεργό κέντρο του ενζύμου [5].

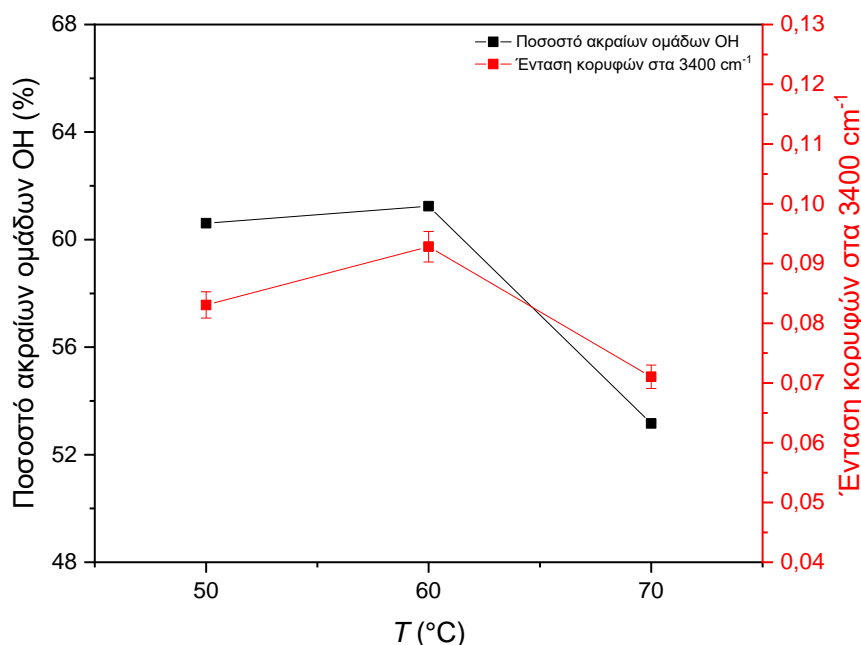
Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, ενδεχομένως ο ίδιος μηχανισμός να ακολουθείται και στην περίπτωση των κουτινάσων μιας και η καταλυτική τους τριάδα αποτελείται από τα αμινοξέα σερίνη, ιστιδίνη και ασπαρτικό οξύ (Ser-His-Asp) από τα οποία η σερίνη είναι και η πιο εκτεθειμένη και για αυτό να προέκυψαν προϊόντα πλούσια σε ακραίες ομάδες OH [12].

Αντίστοιχη προσπάθεια υπολογισμού της μεταβολής των ακραίων ομάδων OH έγινε και μέσω των φασμάτων από το FT-IR. Πραγματοποιώντας 5 μετρήσεις από κάθε προϊόν, υπολογίστηκαν οι εντάσεις των κορυφών που αντιστοιχούν στον δεσμό -OH, ο οποίος στη συγκεκριμένη περίπτωση αντιστοιχεί μόνο σε ακραίες ομάδες είτε πολυμερικών αλυσίδων είτε μονομερών. Οι εντάσεις των κορυφών αυτών φαίνονται στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π2).

Τα δεδομένα από τους πίνακες Π1 και Π2 παρουσιάζονται συγκριτικά στο διάγραμμα 6.4 με σκοπό να φανεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων.

Έχοντας λοιπόν αυτό ως δεδομένο, τόσο η ανάλυση μέσω ¹H-NMR όσο και αυτή μέσω του FT-IR έδειξαν πως με αύξηση της θερμοκρασίας, τα άκρα OH αρχικά παρέμειναν σχεδόν σταθερά ενώ στη συνέχεια μειώθηκαν. Με βάση όσα προαναφέρθηκαν σχετικά με την παρουσία περισσότερων άκρων OH στις αλυσίδες των ολιγομερών λόγω της καλύτερης αλληλεπίδρασης του ενεργού κέντρου του N435 με την BDO, είναι λογικό να δημιουργούνται αλυσίδες ολιγομερών έχοντας

κυρίως άκρα OH σε χαμηλές θερμοκρασίες όπου ο ρυθμός πολυμερισμού είναι πιο αργός καθώς η σταθερά ταχύτητας σε αντιδράσεις σταδιακού πολυμερισμού ακολουθεί κινητική Arrhenius [5],[13].



Διάγραμμα 6.4 Γραφική αναπαράσταση των υπολογισμών από το FT-IR και το ¹H-NMR για τις ομάδες OH.

Γνωρίζοντας ήδη ότι στην περίπτωση του ενεργού κέντρου της LCC^{ICCG} υπάρχει το αμινοξύ σερίνη το οποίο είναι και πιο εκτεθειμένο, είναι πιθανό λοιπόν η συμπεριφορά αυτή να ταιριάζει με τη συμπεριφορά που παρουσιάζει και το N435 σε περιπτώσεις ενζυμικής σύνθεσης ολιγομερών του PBS [3].

Όσον αφορά τη μείωση που παρατηρήθηκε από τη μεσαία στην υψηλότερη θερμοκρασία, η οποία απεικονίζεται καλύτερα από τα δεδομένα του ¹H-NMR, ενδεχομένως να οφείλεται στην αύξηση του ρυθμού αντίδρασης (κινητική Arrhenius). Στους 70°C, η σταθερά της αντίδρασης είναι μεγαλύτερη ευνοώντας την αντίδραση περισσότερων μικρών αλυσίδων ολιγομερών προς τον σχηματισμό μεγαλύτερων. Το γεγονός αυτό φαίνεται να ταιριάζει και με τη μορφολογία των προϊόντων που εξετάστηκε μακροσκοπικά, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε όλο και περισσότερο στερεά προϊόντα, υποδηλώνοντας έτσι τη δημιουργία προϊόντων με μεγαλύτερο μοριακό βάρος.

Πίνακας 6.4 Τιμές εντάσεων χαρακτηριστικών κορυφών του PBS στα 1720 cm⁻¹ για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις και το rsd.

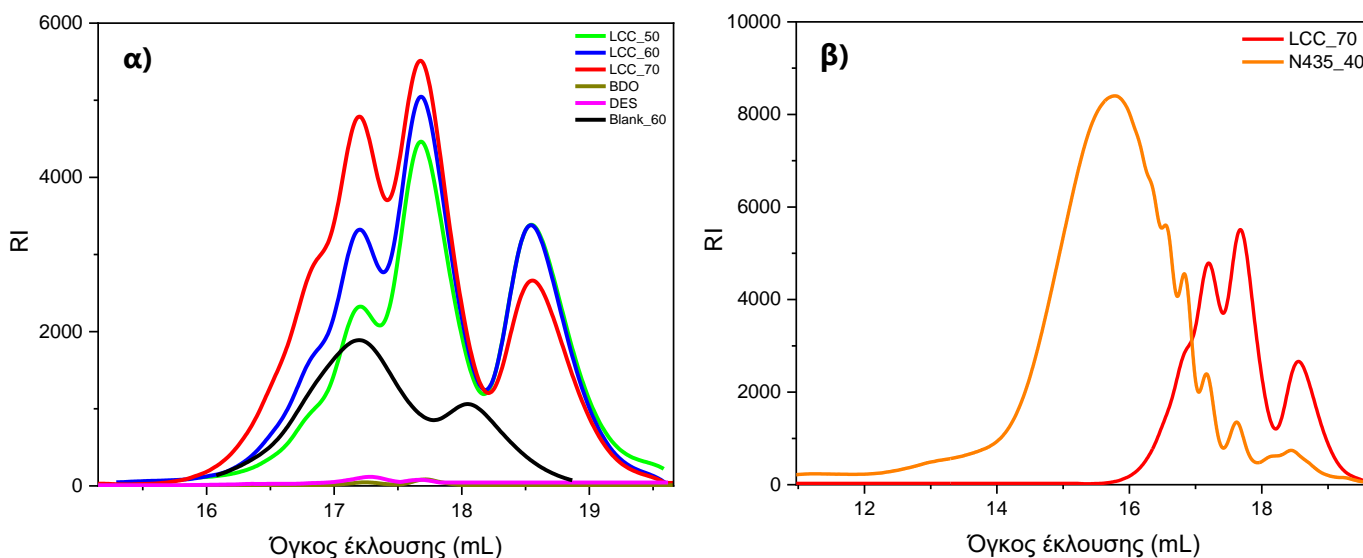
Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Πείραμα	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	RSD (%)
1720	LCC_50	0,562	0,019	3
	LCC_60	0,667	0,007	1
	LCC_70	0,708	0,004	1
	N435_40	0,613	-	-

Η ίδια προσπάθεια έγινε και για την περίπτωση της έντασης των κορυφών που αντιστοιχούν στους εστερικούς δεσμούς. Από τα δεδομένα του πίνακα 6.4, φαίνεται πως η αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε αύξηση της έντασης αυτής της κορυφής μέσω της ανάλυσης του FT-IR. Μιας και η ένταση των κορυφών στα 1720 cm⁻¹ είναι αποτέλεσμα συνεισφοράς τόσο των ακραίων εστερικών ομάδων όσο και των εστερικών δεσμών εντός της επαναλαμβανόμενης δομικής μονάδας και δεδομένου ότι τα προϊόντα είναι πλούσια σε ακραίες ομάδες OH, προκύπτει πως αυτή η αύξηση οφείλεται σε εστερικούς δεσμούς εντός της δομικής μονάδας των ολιγομερών. Μια τέτοια υπόθεση οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, τόσο αυξάνονται και οι εστερικοί δεσμοί εντός των επαναλαμβανόμενων δομικών μονάδων, γεγονός που οδηγεί επίσης σε αύξηση του MB.

6.2.4. Προσδιορισμός του μοριακού βάρους των προϊόντων

Το MB αποτελεί ίσως το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό για ένα πολυμερές καθώς είναι ένα μέγεθος το οποίο μπορεί να επηρεάσει άμεσα τις ιδιότητες των πολυμερικών υλικών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα MB των προϊόντων του ενζυμικού προπολυμερισμού προσδιορίστηκαν μέσω δύο μεθόδων: α) μέσω GPC (βλ. ενότητα 4.5.3) και β) μέσω ¹H-NMR σύμφωνα με την εξίσωση 4.5.

Προσδιορισμός του μοριακού βάρους μέσω GPC



Διάγραμμα 6.5 α) Σύγκριση χρωματογραφήματων των προϊόντων της LCC^{ICCG} με τα φάσματα των μονομερών και του πειράματος Blank_60, **β)** Σύγκριση χρωματογραφήματος του πειράματος LCC_70 με το χρωματογράφημα του πειράματος N435_40.

Στο διάγραμμα 6.5 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα χρωματογραφήματα των προϊόντων μαζί με αυτά των μονομερών και των πειραμάτων αναφοράς. Από το χρωματογράφημα του πειράματος Blank_60 παρατηρήθηκε πως ακόμα και απουσία ενζύμου υπήρχε δυνατότητα σύνθεσης προϊόντος, του οποίου ο βαθμός πολυμερισμού ήταν αρκετά χαμηλός ($\bar{x}_n=7$). Κάνοντας μια αναζήτηση στη βιβλιογραφία, υπάρχουν αντίστοιχες περιπτώσεις πειραμάτων Blank, όπως αυτή που προαναφέρθηκε στην ενότητα 6.2.2 από τους Sena *et al.* [8], στις οποίες φαίνεται πως έλαβαν χώρα αντιδράσεις μετεστεροποίησης μεταξύ των μονομερών απουσία καταλύτη, όμως το αποτέλεσμα οδήγησε σε προϊόντα πολύ μικρού MB.

Μια ακόμα παρατήρηση που έγινε εξετάζοντας το διάγραμμα 6.5 αφορά την ίδια τη μορφολογία των γραφημάτων που αντιστοιχούν στα προϊόντα. Συγκεκριμένα φάνηκε πως προέκυψαν χρωματογραφήματα με διαχωρισμένες κορυφές, υποδηλώνοντας την παρουσία διαφορετικών οικογενειών MB. Αναζητώντας στη βιβλιογραφία για αντίστοιχες συμπεριφορές, φαίνεται πως στην περίπτωση oligομερών υπάρχει η δυνατότητα για γραφήματα με πλήρως διαχωρισμένες κορυφές όπου η κάθε κορυφή να αντιστοιχεί σε διαφορετικό πληθυσμό

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC μοριακού βάρους. Πιο αναλυτικά, έχει παρατηρηθεί πως σε προσπάθεια ανάλυσης ολιγομερών PS, οι διάφοροι πληθυσμοί με \bar{x}_n έως 14 κατάφερναν και διαχωρίζονταν με αποτέλεσμα να εκλούνται ξεχωριστά, οδηγώντας σε ξεχωριστές κορυφές στο γράφημα [14].

Όσον αφορά την εικόνα του χρωματογραφήματος που προέκυψε από το προϊόν της κατάλυσης με N435, φάνηκε πως σε αυτή την περίπτωση προέκυψε μία καμπύλη με μία κορυφή μετατοπισμένη προς τα αριστερά, υποδηλώνοντας μεγαλύτερο MB, η οποία προς το τέλος της άρχισε να διαχωρίζεται σε μικρότερες κορυφές χωρίς όμως να γίνεται πλήρης διαχωρισμός των κορυφών όπως συνέβη στην περίπτωση των πειραμάτων όπου πραγματοποιήθηκε κατάλυση με LCC^{ICCG}.

Πίνακας 6.5 Μέσες τιμές MB για τα προϊόντα από την κατάλυση της LCC^{ICCG} για κάθε κορυφή με τυπικές αποκλίσεις και *rsd*.

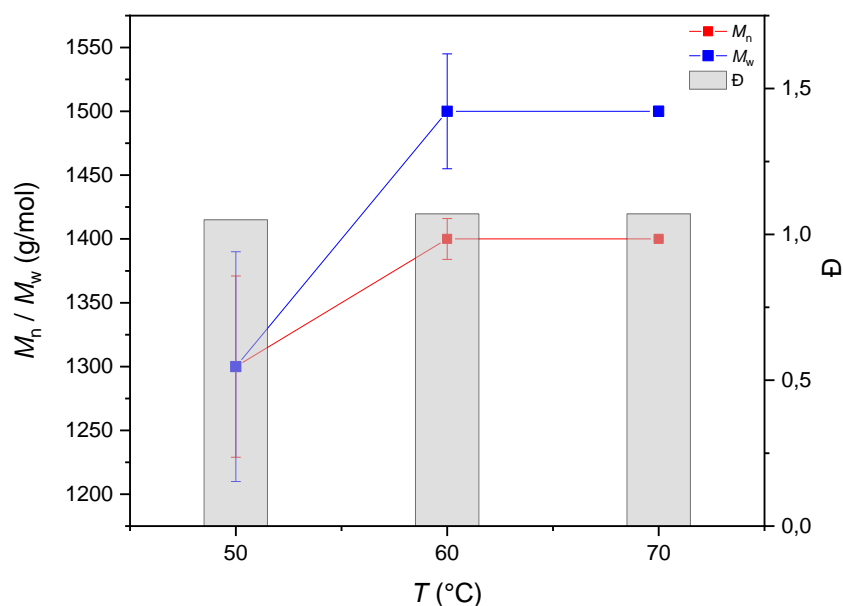
Πείραμα	1 ^η κορυφή							D
	\bar{M}_n (g/mol)	Τυπ. Αποκλ. \bar{M}_n (g/mol)	RSD (%)	\bar{M}_w (g/mol)	Τυπ. Αποκλ. \bar{M}_w (g/mol)	RSD (%)		
LCC_50	1300	70	5,53	1300	90	6,66	1,05	
LCC_60	1400	20	1,18	1500	50	3,02	1,07	
LCC_70	1400	1	0,05	1500	4	0,29	1,07	
2 ^η κορυφή								
LCC_50	700	28	3,85	800	29	3,85	1,02	
LCC_60	800	3	0,37	800	2	0,27	1,03	
LCC_70	700	2	0,28	800	2	0,28	1,03	
3 ^η κορυφή								
LCC_50	300	8	2,43	400	10	3,08	1,05	
LCC_60	400	1	0,20	400	1	0,19	1,04	
LCC_70	400	4	0,98	400	3	0,75	1,04	

Έτσι λοιπόν αυτές οι κορυφές ολοκληρώθηκαν ξεχωριστά υπολογίζοντας το MB κάθε πληθυσμού μεμονωμένα όπως φαίνεται παραπάνω (πίνακας 6.5).

Από τα δεδομένα του πίνακα 6.5, φαίνεται πως κατά κύριο λόγο η πρώτη κορυφή είναι αυτή που διαφοροποιεί το κάθε προϊόν μιας και τα MB των άλλων δύο παραμένουν σχεδόν ίδια.

Επίσης, οι μικρές τιμές του συντελεστή πολυδιασποράς ($\mathcal{D} = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$) (συνηθέστερες τιμές \mathcal{D} : 2-50) δικαιολογούνται από το γεγονός ότι πρόκειται για πλήρως διαχωρισμένες κορυφές ολιγομερών δείχνοντας την ομοιογένεια κάθε πληθυσμού [13]. Για αυτό τον λόγο, κατασκευάζεται το διάγραμμα 6.6 στο οποίο παρουσιάζεται η μεταβολή του MB (\overline{M}_n και \overline{M}_w) που αντιστοιχεί στις πρώτες κορυφές σε σχέση με τη θερμοκρασία.

Βλέποντας πλέον πως αποτυπώνεται η σχέση του μοριακού βάρους με την αύξηση της θερμοκρασίας, είναι πια σαφές ότι όσο η θερμοκρασία αυξάνεται, το MB αυξάνεται ελαφρώς φτάνοντας σε ένα πλατό. Η σχέση αυτή του MB με τη θερμοκρασία συμφωνεί αρχικά με τη μορφολογία των προϊόντων μακροσκοπικά καθώς όσο αυξανόταν η θερμοκρασία, προέκυπτε όλο και πιο ξηρό υλικό, δείγμα του μεγαλύτερου MB [6].



Διάγραμμα 6.6 Μοριακά βάρη (\overline{M}_n και \overline{M}_w) και συντελεστές πολυδιασποράς (\mathcal{D}) για την πρώτη κορυφή των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού.

Η μέγιστη τιμή MB είναι ίση με $\overline{M}_n = 1400$ g/mol ($\overline{M}_w = 1500$ g/mol, $\overline{D} = 1,07$) για τα πειράματα LCC_60 και LCC_70, όταν αντίστοιχα για το πείραμα N435_40 προέκυψε MB προπολυμερούς ίσο με $\overline{M}_n = 2500$ g/mol ($\overline{M}_w = 6700$ g/mol, $\overline{D} = 2,73$).

Παρά το γεγονός ότι τα MB των πειραμάτων LCC_60 και LCC_70 είναι ίσα, η μορφολογία του δεύτερου είναι πιο ξηρή, προσομοιάζοντας περισσότερο ένα στερεό υλικό. Αναλύοντας λοιπόν ακόμα περισσότερο τα δεδομένα του πίνακα 6.5, έγινε προσπάθεια συσχέτισης των κορυφών εντός του ίδιου δείγματος ώστε να φανεί ποιος πληθυσμός επικρατεί σε κάθε προϊόν και να βρεθεί μια εξήγηση όσον αφορά τη διαφορετική υφή των προϊόντων. Έτσι, βρέθηκαν τα ύψη των κορυφών από τα χρωματογραφήματα, ορίστηκε η τρίτη κορυφή ως αυτή βάσει της οποίας θα γινόταν η κανονικοποίηση των κορυφών και υπολογίστηκαν έπειτα οι λόγοι του ύψους κάθε κορυφής ως προς το ύψος της τρίτης. Τα αποτελέσματα αυτών των υπολογισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6.

Πίνακας 6.6 Λόγοι εντάσεων της 1^{ης} και της 2^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3^{ης}.

Πείραμα	1 ^η κορυφή/ 3 ^η κορυφή	2 ^η κορυφή/ 3 ^η κορυφή
LCC_50	0,69	1,34
LCC_60	0,98	1,50
LCC_70	1,86	2,14

Θεωρώντας τον λόγο 3^η κορυφή/ 3^η κορυφή ίσο με τη μονάδα, συνεπάγεται από τα δεδομένα του πίνακα 6.6 ότι όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, επικρατούσαν όλο και περισσότερο οι δύο πρώτες κορυφές έναντι της τρίτης, δηλαδή οι πληθυσμοί με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος. Αυτό λοιπόν μπορεί να δικαιολογήσει το γεγονός σύμφωνα με το οποίο όσο αυξανόταν η θερμοκρασία παραλαμβάνονταν όλο και πιο ξηρά υλικά.

Ωστόσο, το «καλύτερο» προϊόν δεν προέκυψε στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου, όπως αυτή μετρήθηκε για τον βιοκαταλύτη (ενότητα 5.3). Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη διαφορετική φύση του συστήματος πολυμερισμού από αυτό του βιοχημικού χαρακτηρισμού (οργανικό σύστημα με μονομερή ως

υποστρώματα έναντι υδατικού συστήματος με εστέρα ως υπόστρωμα) είτε στην επίδραση του χρόνου όπως αναφέρει το μοντέλο ισορροπίας το οποίο περιγράφει την εξάρτηση της ενεργότητας από τη θερμοκρασία και τον χρόνο (βλ. ενότητα 4.2.3). Σε χρόνο 0, η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης ενδεχομένως να είναι υψηλότερη (πιο κοντά στους 70°C) κι έτσι να ευνοείται ο σχηματισμός περισσότερων ολιγομερών σε σχέση με την περίπτωση των 60°C στα πρώτα λεπτά. Ωστόσο, πέρα από το ενζυμικό κομμάτι, το τελικό αποτέλεσμα ενδεχομένως να οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, και στον μεγαλύτερο ρυθμό αντίδρασης στους 70°C οδηγώντας στον σχηματισμό περισσότερων αλυσίδων μεγαλύτερου MB.

Προσδιορισμός του μοριακού βάρους μέσω ¹H-NMR

Ο υπολογισμός του \overline{M}_n μέσω ¹H-NMR έγινε με βάση την εξίσωση 4.5. Οι τιμές του \overline{M}_n που προέκυψαν, φαίνονται στον πίνακα 6.7.

Πίνακας 6.7 Μέσου-αριθμού μοριακό βάρος \overline{M}_n για κάθε προϊόν από τα πειράματα της LCC^{ICCG} και του πειράματος N435_40.

Πείραμα	\overline{M}_n (g/mol)
LCC_50	300
LCC_60	300
LCC_70	400
N435_40	1200

Εξετάζοντας τις τιμές που προέκυψαν, διαπιστώνεται ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας, αυξήθηκε ελαφρώς η τιμή του \overline{M}_n το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα της GPC για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού.

6.2.5. Σύγκριση αποτελεσμάτων GPC και ¹H-NMR

Για να μπορέσει να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν όσον αφορά τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μέσω των δύο αυτών μεθόδων,

λήφθηκαν υπόψη τα δεδομένα από τους παραπάνω πίνακες (πίνακας 6.5 και πίνακας 6.7) όπου παρουσιάζονται οι τιμές του \overline{M}_n και πως αυτές μεταβάλλονται με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Το πρώτο που διαπιστώθηκε ήταν η διαφορά των τιμών που προσδιορίστηκαν μέσω των δύο μεθόδων, με τις τιμές από το ¹H-NMR να είναι μικρότερες ακόμα και στην περίπτωση του πειράματος N435_40. Συγκεκριμένα, όλες οι τιμές που υπολογίστηκαν μέσω ¹H-NMR για τα πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε κατάλυση με την LCC^{ICCG}, είναι μικρότερες από τις αντίστοιχες της GPC κατά 71-79%, όταν αντίστοιχα στην περίπτωση του πειράματος N435_40, η τιμή του ¹H-NMR είναι κατά 52% μικρότερη από την τιμή της GPC.

Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί κι άλλες φορές στη βιβλιογραφία, ακόμα και σε περιπτώσεις όπου πραγματοποιείται ενζυμική σύνθεση PBS. Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί διαφορά μεταξύ των τιμών που προκύπτουν από τις δύο αυτές μεθόδους έως και 92% [5].

Ωστόσο, παρά τις διαφορές στις τιμές του \overline{M}_n , και οι δύο μέθοδοι ακολουθούν μια αυξητική τάση όσο η θερμοκρασία αυξάνεται, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τη μακροσκοπική μορφολογία των προϊόντων. Τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι μεγαλύτερο \overline{M}_n έχει το πείραμα LCC_70.

Πίνακας 6.8 Βαθμός πολυμερισμού \overline{x}_n των πειραμάτων της LCC^{ICCG} καθώς και του πειράματος N435_40.

Πείραμα	\overline{x}_n – ¹ H-NMR	\overline{x}_n – GPC
LCC_50	3	15
LCC_60	3	16
LCC_70	4	16
N435_40	15	29

Υπολογίστηκε επίσης και ο βαθμός πολυμερισμού μέσα από τα αποτελέσματα του ¹H-NMR όπου φαίνεται πως το προϊόν του πειράματος LCC_70 είναι ένα δεκαεξαμερές σε αντίθεση με τα άλλα δύο τα οποία έχουν ίσο ή μικρότερο \bar{x}_n (πίνακας 6.8).

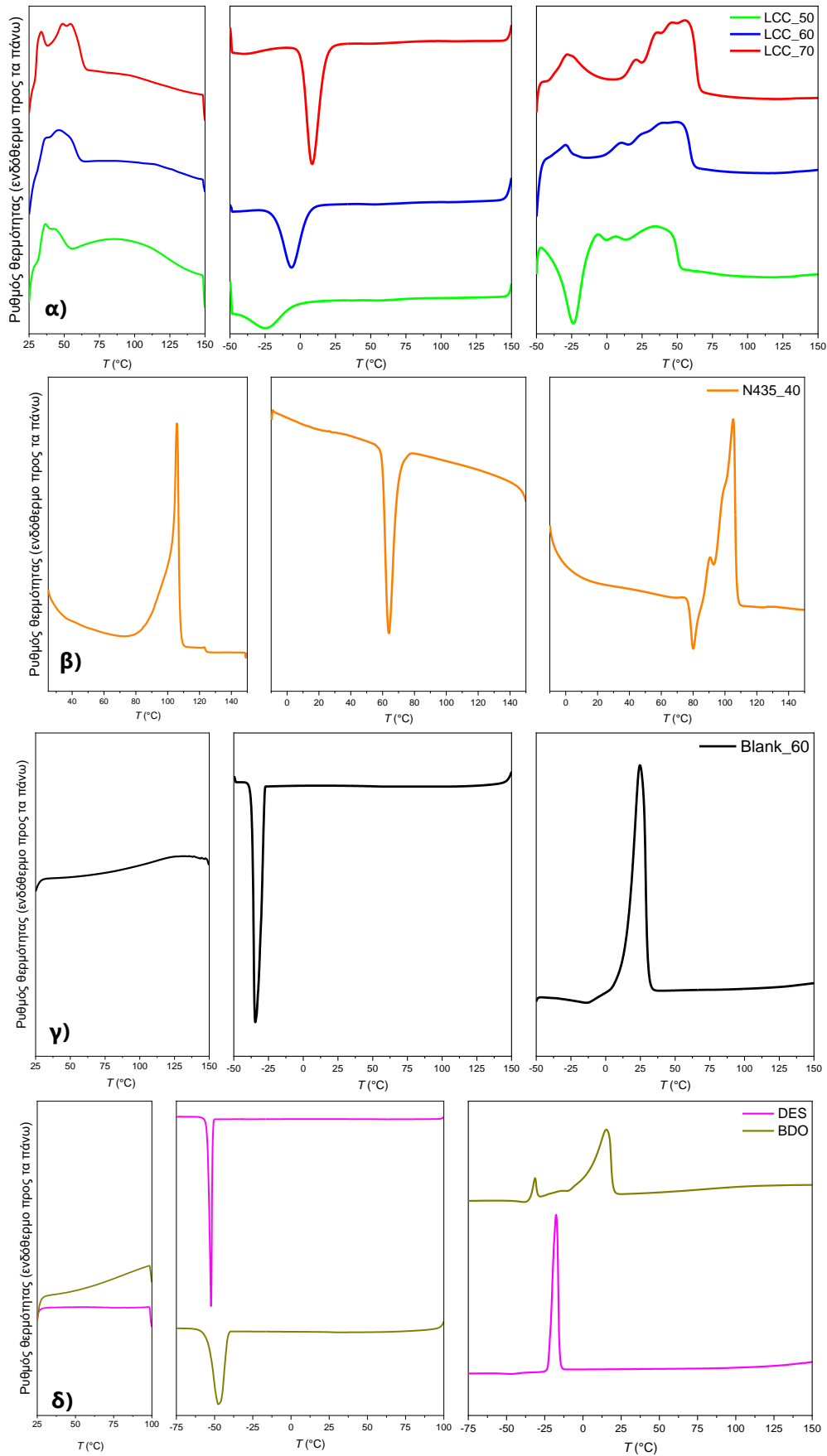
6.2.6. Θερμικές ιδιότητες των προϊόντων

Αποτελέσματα DSC

Ξεκινώντας από τις καμπύλες της 1^{ης} θέρμανσης όπου διαγράφεται η θερμική ιστορία του υλικού (διάγραμμα 6.7), φάνηκε ότι στα πειράματα της LCC^{ICCG} υπάρχουν ευρείες κορυφές σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (από 37-49°C – όσο αυξάνεται η θερμοκρασία των πειραμάτων, αυξάνεται και το T_{m1}) οι οποίες όμως προσεγγίζουν τιμές ολιγομερών PBS που συναντώνται στη βιβλιογραφία [6]. Αντίθετα, στο πείραμα που πραγματοποιήθηκε από την κατάλυση του N435, παρατηρήθηκε μια οξεία κορυφή στους 106°C (T_{m1}). Αυτές οι διαφορές αποδίδονται στο μικρότερο MB αυτών των προϊόντων. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερο το MB, η εικόνα της καμπύλης της 1^{ης} θέρμανσης προσεγγίζει περισσότερο την εικόνα των αντίστοιχων καμπυλών των μονομερών καθώς επίσης και του Blank_60, στα οποία δεν εμφανίζεται καμία τήξη προϊόντος.

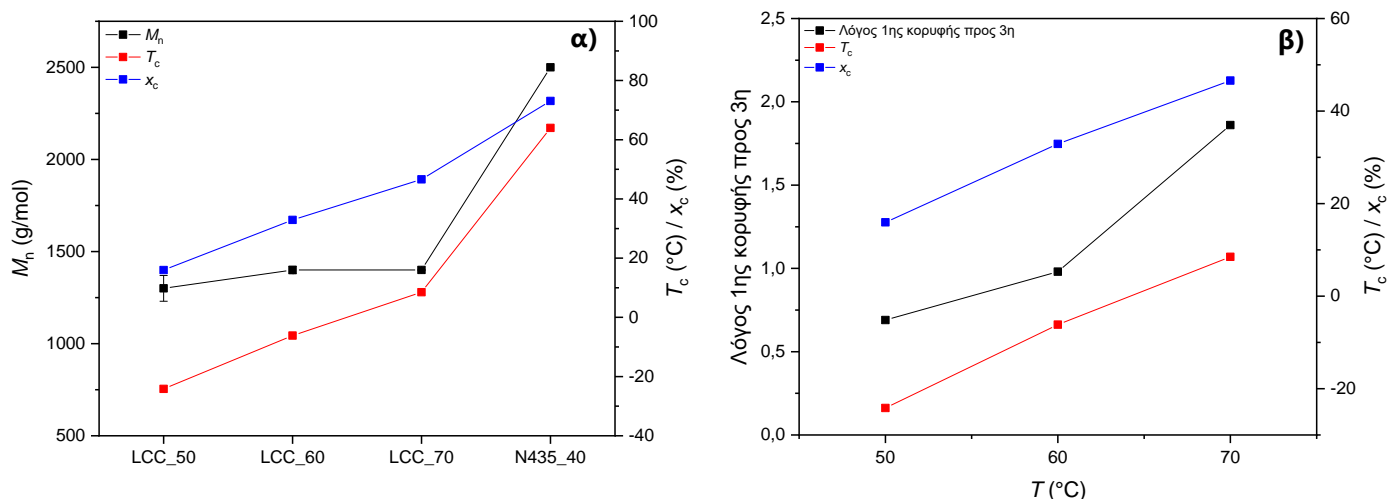
Προχωρώντας στις καμπύλες ψύξης, στα πειράματα LCC_50, LCC_60 και LCC_70 εμφανίστηκαν κορυφές κρυστάλλωσης (T_c) στους -24°C, στους -6°C και στους 8,5°C αντίστοιχα, ενώ στο πείραμα N435_40 εμφανίστηκε μια κορυφή κρυστάλλωσης στους 64°C. Παρατηρείται πως η αύξηση της θερμοκρασίας του 1^{ου} σταδίου των πειραμάτων της LCC^{ICCG}, οδηγεί σε σχηματισμό προϊόντων με γρηγορότερους ρυθμούς κρυστάλλωσης.

Αυτό το φαινόμενο προκύπτει για δύο λόγους. Αφενός, γιατί οι αλυσίδες ολιγομερών με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού μπορούν να αναδιπλωθούν καλύτερα σε σχέση με τις αντίστοιχες των ολιγομερών μικρότερου βαθμού πολυμερισμού, και αφετέρου λόγω της μείωσης των ακραίων ομάδων στα μεγαλύτερου MB ολιγομερή. Η παρουσία πολλών άκρων εντός του δείγματος παρεμποδίζει τη διεργασία της κρυστάλλωσης, γεγονός που μπορεί να εξαιρεθεί όσο το MB αυξάνεται [5],[15].



Διάγραμμα 6.7 Καμπύλες DSC (1η θέρμανση, ψύξη και 2η θέρμανση) α) προϊόντων LCC^{ICCG}, β) Blank_60, γ) N435_40, δ) μονομερών

Η ίδια τάση αποτυπώνεται και στον βαθμό κρυσταλλικότητας (διάγραμμα 6.8) ο οποίος υπολογίζεται κατά την ψύξη και αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η επικράτηση των πληθυσμών με μεγαλύτερο MB καθώς αυξάνεται η ενθαλπία κρυστάλλωσης ΔH_c γεγονός που δείχνει τη μεγαλύτερη τάση αυτών των προϊόντων για κρυστάλλωση [6].



Διάγραμμα 6.8 α) Σύγκριση \overline{M}_n , T_c και x_c για τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435 β) Σύγκριση λόγων των εντάσεων της 1^{ης} κορυφής προς την ένταση της 3^{ης} με T_c και x_c για τα προϊόντα της LCC^{ICCG}.

Τέλος, παρατηρώντας τις καμπύλες της 2^{ης} θέρμανσης, στην περίπτωση του πειράματος N435_40 φαίνεται να πραγματοποιείται ψυχρή κρυστάλλωση (cold crystallization) στους 80°C η οποία οφείλεται σε ένα μέρος του δείγματος που πιθανώς δεν πρόλαβε να κρυσταλλώσει κατά την ψύξη. Στα πειράματα της LCC^{ICCG} όπου δεν παρατηρείται ψυχρή κρυστάλλωση καταγράφονται πολλαπλές κορυφές τήξης ευρύτερες σε σχέση με του πειράματος N435_40. Τέτοια συμπεριφορά είναι αρκετά συχνή στη βιβλιογραφία όσον αφορά ανάλυση PBS μέσω DSC. Μάλιστα κάθε κορυφή αποδίδεται και σε διαφορετική ομάδα κρυστάλλων η οποία λιώνει. Οι δύο πρώτες κορυφές αφορούν την τήξη του πραγματικού κρυστάλλου και συγκεκριμένα, η πρώτη κορυφή συνήθως είναι αποτέλεσμα «κακής ποιότητας» κρυστάλλων που υπήρχαν στην αρχική κατανομή και λιώνουν πρώτοι. Η μεσαία κορυφή αντιστοιχεί σε κρυστάλλους «καλύτερης ποιότητας» της αρχικής κατανομής ενώ η τρίτη, που βρίσκεται στο μεγαλύτερο T_m ,

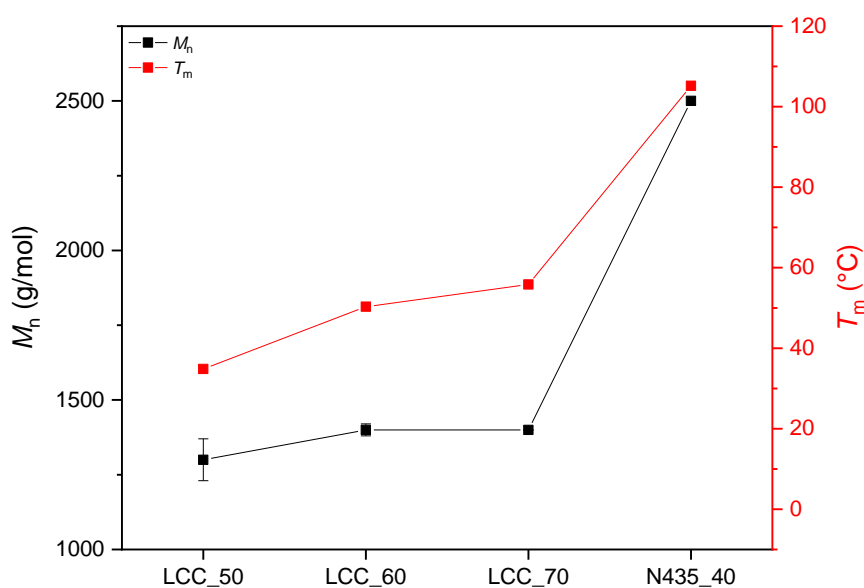
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC αντιστοιχεί στην τήξη μερικών λιωμένων κρυστάλλων που προέκυψαν κατά την ανακρυστάλλωση [16].

Οι τιμές των T_{m2} για τα πειράματα LCC_50, LCC_60, LCC_70 και N435_40 είναι ίσες με 35°C, 50°C, 56°C και 105°C αντίστοιχα. Η ίδια τάση παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση όπου με αύξηση του MB υπάρχει αύξηση στο σημείο τήξης καθώς λόγω της αυξημένης κρυσταλλικότητας, χρειάζεται περισσότερη ενέργεια έτσι ώστε να σπάσουν οι δεσμοί μεταξύ των κρυστάλλων και το υλικό να γίνει τήγμα. Η σχέση αυτή μεταξύ MB και T_m περιγράφεται μέσω της εξίσωσης Gibbs-Thomson (εξίσωση 6.1) [17].

Εξίσωση 6.1 Εξίσωση Gibbs-Thomson για τον υπολογισμό του σημείου τήξεως [17].

$$T_m = T_m^0 \left(1 - \frac{2\sigma_e}{l\Delta H_f^0} \right)$$

όπου T_m^0 το σημείο τήξης ισορροπίας, σ_e η ελεύθερη ενέργεια ελασματικής επιφάνειας, l το ελασματοειδές πάχος και ΔH_f^0 η ενθαλπία τήξης ενός τέλει κρυστάλλου. Για τα ολιγομερή, το l είναι ίσο με το μήκος της αλυσίδας με αποτέλεσμα όσο αυξάνεται το MB, να αυξάνεται και το μήκος της αλυσίδας άρα και το σημείο τήξης ακριβώς όπως συμβαίνει και σε αυτή την περίπτωση [6].



Διάγραμμα 6.9 Σύγκριση \overline{M}_n και T_m για τα προϊόντα της LCC^{ICCG} και N435.

Οι τιμές που προκύπτουν από τη δεύτερη θέρμανση κάθε δείγματος παρουσιάζονται συγκριτικά στο διάγραμμα 6.9.

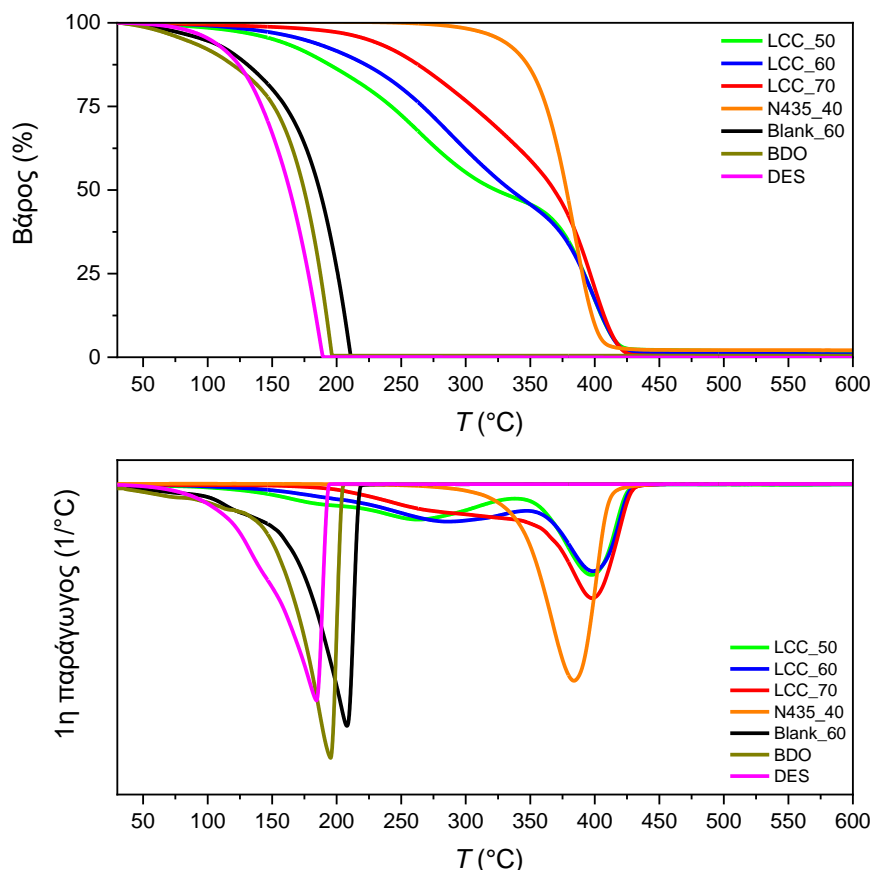
Αυτές οι διαφορές που φαίνονται και στο διάγραμμα 6.9 είναι λογικές αν σκεφτεί κανείς τη μεγάλη διαφορά και στο \overline{M}_n που προέκυψε μεταξύ των πειραμάτων. Όλα τα δεδομένα για τα προϊόντα από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} είναι συγκεντρωμένα στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π3).

Μια ακόμα παρατήρηση που γίνεται εξετάζοντας τις καμπύλες που φαίνονται στο διάγραμμα 6.7 είναι η παρουσία κάποιων επιπλέον κορυφών στα πειράματα LCC_60 και LCC_70 σε χαμηλές θερμοκρασίες κατά τη δεύτερη θέρμανση. Συγκεκριμένα πρόκειται για ενδόθερμες κορυφές στους -29°C και στους -28°C για τα πειράματα LCC_60 και LCC_70 αντίστοιχα. Αυτές ενδεχομένως να αντιστοιχούν σε κορυφές που εμφανίζονται κατά την ανάλυση των μονομερών (ενδεχομένως υπολείμματα DES), είτε σε ακαθαρσίες. Επίσης όσον αφορά το προϊόν LCC_50, παρατηρείται μια κορυφή κρυστάλλωσης στη δεύτερη θέρμανση η οποία ενδεχομένως να αντιστοιχεί στην κρυστάλλωση της ψύξης που δεν πρόλαβε να ολοκληρωθεί.

Αποτελέσματα TGA

Στο διάγραμμα 6.10 παρουσιάζονται συγκριτικά οι καμπύλες TGA για τα πειράματα ενζυμικού πολυμερισμού της LCC^{ICCG}, των πειραμάτων αναφοράς αλλά και των μονομερών. Οι καμπύλες που παρουσιάζονται επιβεβαιώνουν για ακόμη μια φορά πως η παρουσία του ενζύμου οδήγησε σε παραγωγή προϊόντος καθώς υπάρχει πολύ μεγάλη διαφορά συγκριτικά με τις καμπύλες που αντιστοιχούν στο πείραμα Blank_60 οι οποίες είναι σχεδόν παρόμοιες με αυτές των μονομερών. Ωστόσο, όσον αφορά τις καμπύλες των προϊόντων από τα πειράματα της LCC^{ICCG}, είναι φανερό ότι πραγματοποιούνται δύο στάδια αποικοδόμησης σε σχέση με το προϊόν της κατάλυσης με N435. Κάνοντας μια αναζήτηση στη βιβλιογραφία σχετικά με την αποικοδόμηση του PBS, φάνηκε ότι αυτή πραγματοποιείται κοντά στους 400°C σε ένα στάδιο, ακριβώς όπως συμβαίνει και με το προϊόν του πειράματος N435_40 [18]. Ωστόσο, σε περιπτώσεις προϊόντων χαμηλού MB, η αποικοδόμηση του PBS, μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δύο στάδια, αποδεικνύοντας πόσο σημαντική παράμετρος είναι το MB [6]. Έχοντας ήδη

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC
 αποδειξει πόσο χαμηλά είναι τα MB των προϊόντων της LCC^{ICCG}, η συμπεριφορά που παρουσιάζουν συνάδει σε μεγάλο βαθμό με τα ευρήματα της βιβλιογραφίας.



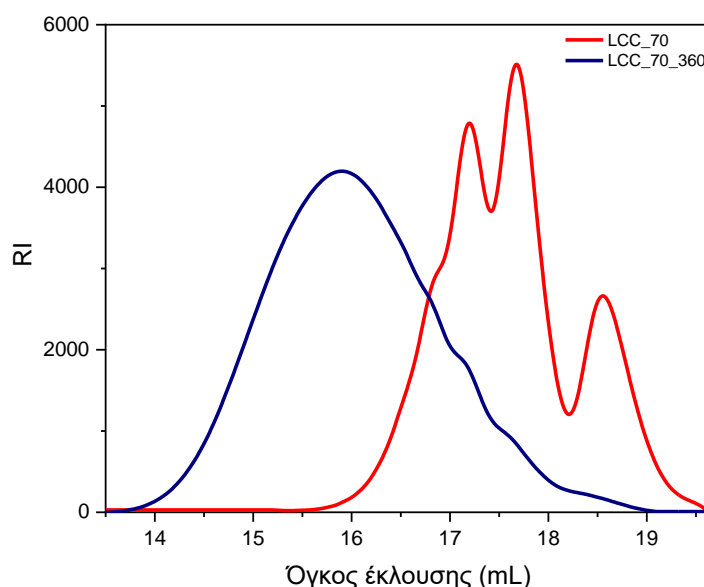
Διάγραμμα 6.10 Καμπύλες TGA προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG}, πειραμάτων αναφοράς και μονομερών.

Πέρα από τον χαμηλό βαθμό πολυμερισμού των προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού, το γεγονός ότι εμφανίστηκαν δύο στάδια αποικοδόμησης στην ανάλυση μέσω TGA, ενδεχομένως να οφειλόταν σε μεταπολυμερισμό μάζας που μπορεί να έλαβε χώρα εντός του οργάνου. Όπως έχει αποδειχτεί και στις προηγούμενες ενότητες, τα δείγματα των πειραμάτων της LCC^{ICCG} είναι ολιγομερή χαμηλού MB, γεγονός που οδηγεί σε υψηλές συγκεντρώσεις ακραίων δραστικών ομάδων, και μάλιστα κυρίως ακραίων υδροξυλομάδων.

Για να διαπιστωθεί αν το πρώτο στάδιο που εμφανίστηκε στα γραφήματα από την ανάλυση μέσω TGA αφορά μεταπολυμερισμό ή όχι, πραγματοποιήθηκε μια μελέτη περίπτωσης (case study) κατά την οποία δείγμα από το προϊόν LCC_70

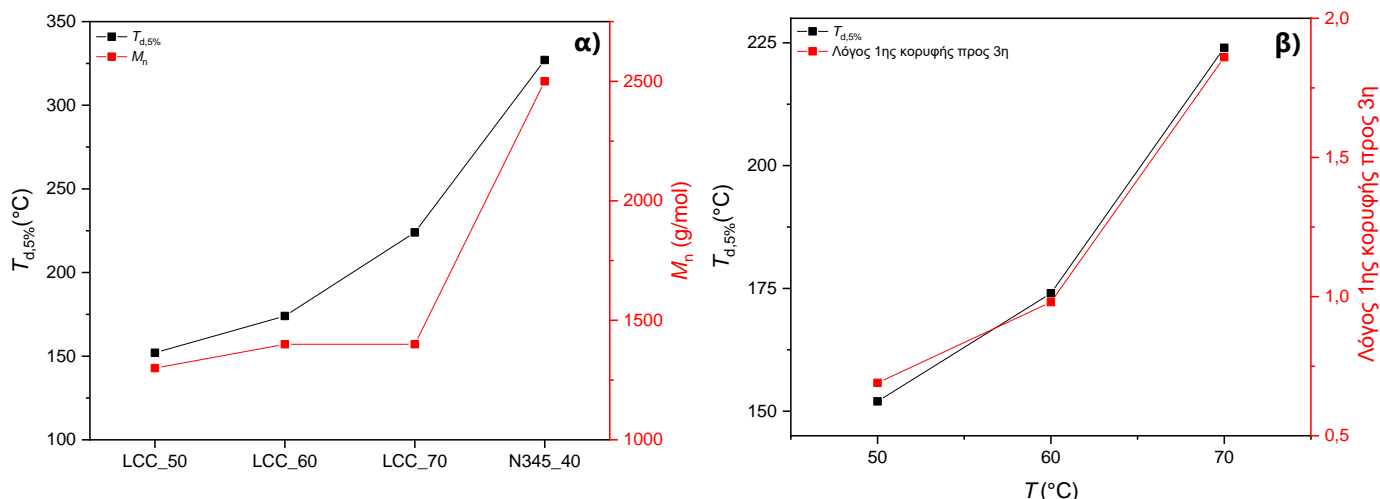
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC τοποθετήθηκε στο TGA σε μια δυναμική ανάλυση μέχρι τους 360°C (LCC_70_360). Το υλικό που παρέμεινε εντός του καψιδίου (pan) αναλύθηκε μέσω GPC και το νέο χρωματογράφημα που προέκυψε παρουσιάζεται στο διάγραμμα 6.11.

Η εικόνα του νέου γραφήματος (διάγραμμα 6.11) έδειξε πως το υλικό που είχε απομείνει εντός του pan, είχε μεταπολυμεριστεί αφού προέκυψε μια νέα ενιαία καμπύλη, μετατοπισμένη προς τα αριστερά, γεγονός που δηλώνει αύξηση του MB καθώς μόρια με μεγαλύτερο \overline{M}_n εκλύονται γρηγορότερα. Τα ποσοτικά δεδομένα από αυτή τη μελέτη έδειξαν πως πραγματοποιήθηκε αύξηση του MB μετά την παραμονή στο TGA φτάνοντας σε τιμή $\overline{M}_n = 2200 \pm 20$ g/mol ($\overline{M}_w = 3600 \pm 20$ g/mol, $D = 1,63$) σημειώνοντας αύξηση $\Delta\overline{M}_n = 57\%$ ($\Delta\overline{M}_w = 140\%$).



Διάγραμμα 6.11 Σύγκριση χρωματογραφημάτων των προϊόντων LCC_70 και LCC_70_360.

Αναλύοντας κι άλλο τα δεδομένα από την ανάλυση του TGA, εξετάστηκε ταυτόχρονα και η θερμοκρασία στην οποία τα προϊόντα χάνουν το 5% της συνολικής τους μάζας ($T_{d,5\%}$), ένας δείκτης ο οποίος δείχνει κατά πόσο είναι θερμικώς σταθερά τα υλικά. Στο διάγραμμα 6.12 φαίνεται η μεταβολή του $T_{d,5\%}$ (Πίνακας Π4) σε σχέση με το \overline{M}_n αλλά και με τον λόγο έντασης της 1^{ης} κορυφής προς την ένταση της 3^{ης} για όλα τα προϊόντα των πειραμάτων της LCC^{ICCG} καθώς και του πειράματος από την κατάλυση του N435.



Διάγραμμα 6.12 α) Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και \overline{M}_n των πειραμάτων της LCC^{ICCG} και του N435 β) Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και λόγων εντάσεων της 1^{ης} κορυφής προς την 3^η.

Τα δεδομένα από το διάγραμμα 6.12 δείχνουν πως όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, άρα και οι πληθυσμοί στα προϊόντα της LCC^{ICCG} με το μεγαλύτερο MB, αυξάνεται και το $T_{d,5\%}$. Η συγκεκριμένη τιμή έχει φανεί και από δεδομένα της βιβλιογραφίας πως δείχνει να έχει μια εξάρτηση από το MB. Με άλλα λόγια, όσο αυξάνεται η τιμή του MB, αυξάνεται συνήθως και η τιμή του $T_{d,5\%}$ οδηγώντας σε πιο σταθερά προϊόντα. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει και στη συγκεκριμένη περίπτωση όπου το πείραμα LCC_70 έχει το υψηλότερο $T_{d,5\%}$ συγκριτικά με τα υπόλοιπα πειράματα της LCC^{ICCG} μιας και έχει το μεγαλύτερο MB.

Πίνακας 6.9 Τιμές T_d μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων των πειραμάτων της LCC^{ICCG} και του πειράματος N435_40.

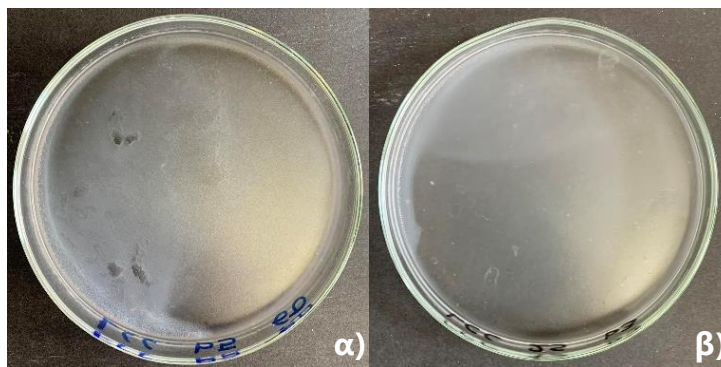
Πείραμα	T_d (°C)	Υπόλειμμα μάζας (%)
LCC_50	398	1,17
LCC_60	399	0,88
LCC_70	398	0,30
N435_40	383	2,10

Ωστόσο, συγκρίνοντας το προϊόν του πειράματος N435_40, είναι σαφές ότι πρόκειται για ένα πολύ πιο σταθερό πολυμερές κάτι που μοιάζει λογικό τόσο από τη μακροσκοπική του μορφολογία του όσο και από την τιμή του MB [5],[19].

Στον παραπάνω πίνακα (πίνακας 6.9) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα T_d αλλά και τα υπολείμματα κάθε πειράματος ενζυμικού προπολυμερισμού όπως προέκυψαν από την ανάλυση του TGA.

6.2.7. Επανάληψη πειράματος ενζυμικού προπολυμερισμού

Αφού ολοκληρώθηκαν όλες οι αναλύσεις των προϊόντων έγινε επανάληψη του πειράματος LCC_60 έτσι ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα του συστήματος (βιοκαταλύτης και πολυμερισμός). Το επαναληπτικό πείραμα πραγματοποιήθηκε με καινούργια παρτίδα βιοκαταλύτη. Αυτός ο βιοκαταλύτης είχε $loading=9,76\%$ και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ως προς τα μονομερή ήταν ίση με $\sim 0,7\%$ έναντι $0,8\%$ του αρχικού πειράματος. Στην εικόνα 6.2 παρουσιάζονται συγκριτικά οι μορφολογίες των δύο αυτών προϊόντων.

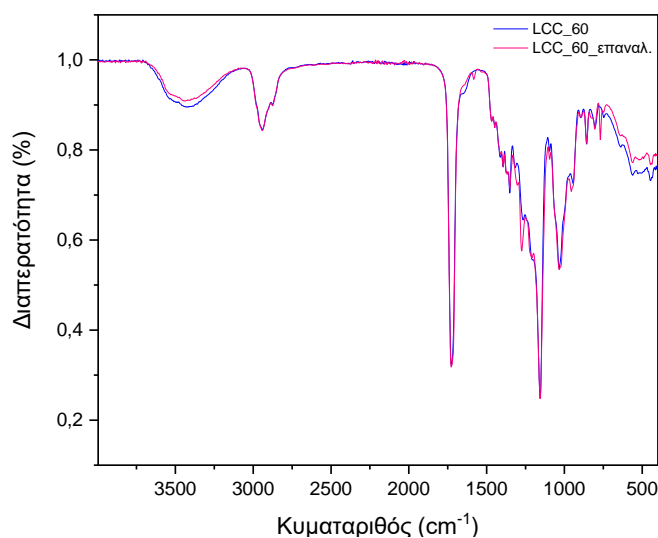


Εικόνα 6.2 Μορφολογία προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού α) LCC_60, β) LCC_60_επαναλ.

Από την εικόνα 6.2 φαίνεται πως τα προϊόντα που παρήχθησαν εφαρμόζοντας τις ίδιες συνθήκες πειράματος αλλά διαφορετική παρτίδα (batch) βιοκαταλύτη, έχουν πανομοιότυπη μορφολογία, τύπου gel.

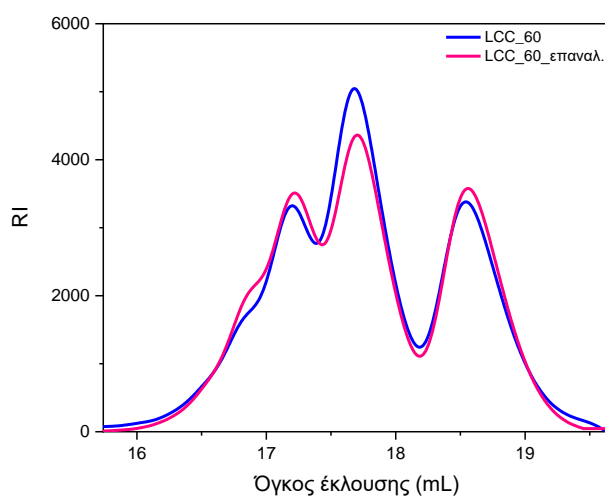
Στη συνέχεια παρατίθεται το φάσμα FT-IR του πειράματος LCC_60 και του επαναληπτικού. Από το διάγραμμα 6.13 φαίνεται πως υπάρχει πλήρης ταύτιση στα

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC
 φάσματα των δύο προϊόντων, αποδεικνύοντας για πρώτη φορά πως η διαδικασία σύνθεσης του PBS σε αυτές τις συνθήκες είναι επαναλήψιμη ακόμα και με διαφορετικό batch βιοκαταλύτη.



Διάγραμμα 6.13 Φάσματα FT-IR των πειραμάτων LCC_60 και LCC_60_επαναλ.

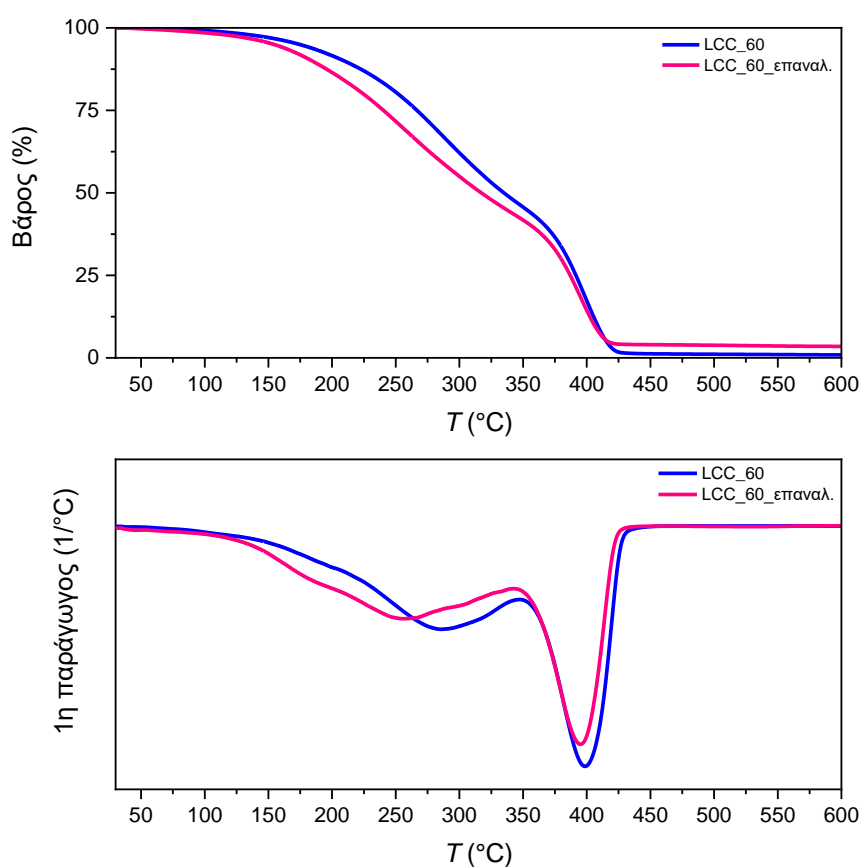
Ο προσδιορισμός του \overline{M}_n του επαναληπτικού που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε μέσω GPC, οδηγώντας σε χρωματογράφημα το οποίο είχε παρόμοια εικόνα με αυτή του χρωματογραφήματος του πειράματος LCC_60, παρουσιάζοντας δηλαδή 3 διαχωρισμένες κορυφές, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 6.14.



Διάγραμμα 6.14 Χρωματογραφήματα πειραμάτων LCC_60 και LCC_60_επαναλ.

Αναλύοντας τα δεδομένα από την GPC, τα MB του επαναληπτικού ήταν ίσα με $\overline{M}_n = 1300 \pm 30$ g/mol και $\overline{M}_w = 1400 \pm 30$ g/mol ενώ του αρχικού $\overline{M}_n = 1400 \pm 20$ g/mol και $\overline{M}_w = 1500 \pm 50$ g/mol. Η απόκλιση που παρατηρείται είναι αρκετά μικρή και ενδεχομένως να οφείλεται στη μικρότερη ποσότητα πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε στο επαναληπτικό πείραμα.

Στη συνέχεια γίνεται σύγκριση των δύο προϊόντων όσον αφορά τις θερμικές τους ιδιότητες.



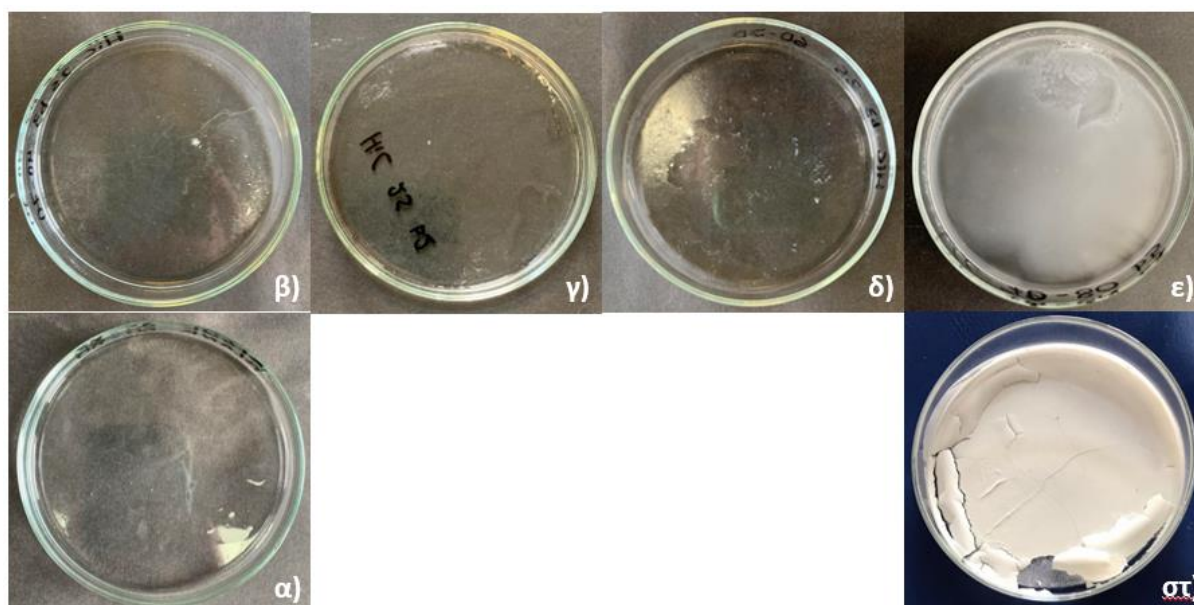
Διάγραμμα 6.15 Καμπύλες TGA για το πείραμα LCC_60 και το πείραμα LCC_60_επαναλ.

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε μέσω του TGA (διάγραμμα 6.15), έδειξε πως η αποικοδόμηση πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια (μεταπολυμερισμός στο 1^ο στάδιο, όπως αποδείχτηκε προηγουμένως), όπως και στο αρχικό πείραμα, με τις τιμές του T_d και του $T_{d,5\%}$ να μην παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές (LCC_60: $T_{d,5\%} = 174^\circ\text{C}$, $T_d = 399^\circ\text{C}$, LCC_60_επαναλ.: $T_{d,5\%} = 154^\circ\text{C}$, $T_d = 395^\circ\text{C}$). Η διαφορά αυτή στο $T_{d,5\%}$ ενδεχομένως να οφείλεται στο ελαφρώς μικρότερο MB του

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC επαναληπτικού προϊόντος, κάνοντάς το λιγότερο θερμικά σταθερό σε αντίθεση με το προϊόν από το πείραμα LCC_60.

6.3. Χαρακτηρισμός προϊόντων μέσω κατάλυσης με HiC

Η μορφολογία των προϊόντων αυτού του ενζύμου παρουσιάζεται στην εικόνα 6.3 όπου γίνεται σύγκριση με τη μορφολογία των πειραμάτων αναφοράς μακροσκοπικά.



Εικόνα 6.3 Μορφολογία προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού με HiC α) Blank_60 β) HiC_40, γ) HiC_50, δ) HiC_60, ε) LCC_70 στ) N435_40.

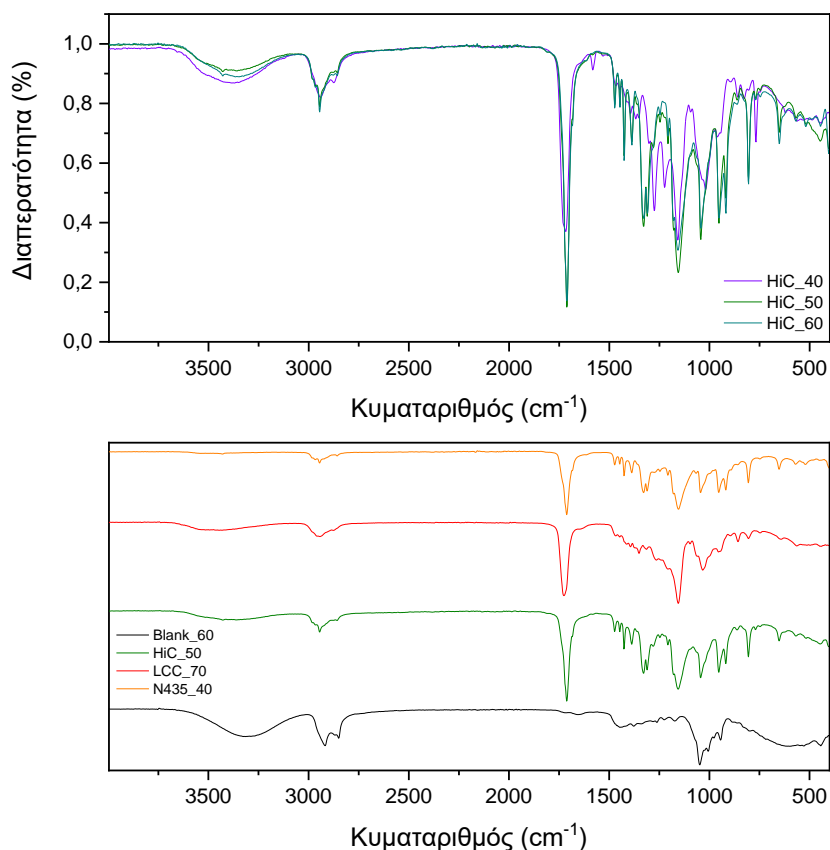
Η μορφολογία των πειραμάτων όπου πραγματοποιήθηκε κατάλυση με το ακινητοποιημένο ένζυμο HiC διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από αυτή του πειράματος LCC_70.

Στην πρώτη περίπτωση, τα προϊόντα που προέκυψαν ήταν όλα σε υγρή μορφή (σαν το πείραμα Blank_60), σε αντίθεση με το πείραμα LCC_70 όπου ήταν σε μορφή gel, υποδηλώνοντας χαμηλότερο βαθμό πολυμερισμού.

Πίνακας 6.10 Αποδόσεις διεργασίας πειραμάτων καταλυόμενων από HiC καθώς και των πειραμάτων LCC_70 και N435_40 για σύγκριση.

Πείραμα	Απόδοση διεργασίας (%)
HiC_40	65
HiC_50	82
HiC_60	55
LCC_70	99
N435_40	81

Οι μαζικές αποδόσεις των προϊόντων (πίνακας 6.10) ήταν σημαντικά μικρότερες από αυτή του πειράματος LCC_70, προσεγγίζοντας την αντίστοιχη «απόδοση» του πειράματος Blank_60, του οποίου ήταν ίση με 60,8%.



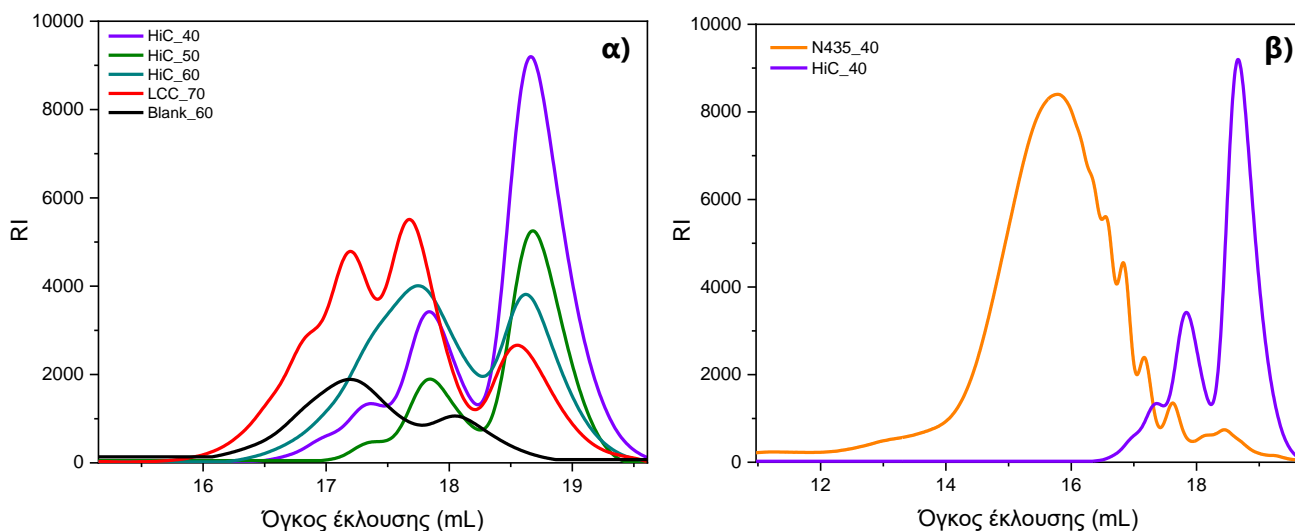
Διάγραμμα 6.16 Σύγκριση φασμάτων των προϊόντων ενζυμικού πολυμερισμού με HiC με τα φάσματα των πειραμάτων αναφοράς και του πειράματος LCC_70.

Μάλιστα, η «απόδοση» του συγκεκριμένου πειράματος, καθώς περνούσαν οι μέρες, φάνηκε πως ολοένα και μειωνόταν λόγω συνεχούς εξάτμισης των μονομερών που δεν αντέδρασαν ή λόγω εξάχνωσης των πολύ χαμηλού MB ολιγομερών που σχηματίστηκαν.

Τα φάσματα FT-IR των προϊόντων που προέκυψαν παρουσιάζονται στο διάγραμμα 6.16 και συγκρίνονται με το φάσμα του πειράματος LCC_70 και τα φάσματα των πειραμάτων αναφοράς.

Παρά την ομοιότητα των φασμάτων ως προς τις χαρακτηριστικές κορυφές του PBS, φάνηκε πως η ένταση της κορυφής στα 3400 cm^{-1} ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση των πειραμάτων της HiC από ό,τι στο πείραμα LCC_70 (συγκεκριμένα HiC_40: 0,105, HiC_50: 0,075, HiC_60: 0,090 έναντι LCC_70: 0,071), υποδηλώνοντας την παρουσία περισσότερων άκρων OH και άρα χαμηλότερα MB, σε συμφωνία με την υγρή κατάσταση στην οποία βρίσκονταν τα προϊόντα.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του MB, η ανάλυση μέσω GPC οδήγησε σε χρωματογραφήματα παρόμοια με αυτά του προϊόντος LCC_70. Πιο συγκεκριμένα, προέκυψαν χρωματογραφήματα με διαχωρισμένες κορυφές όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 6.17.



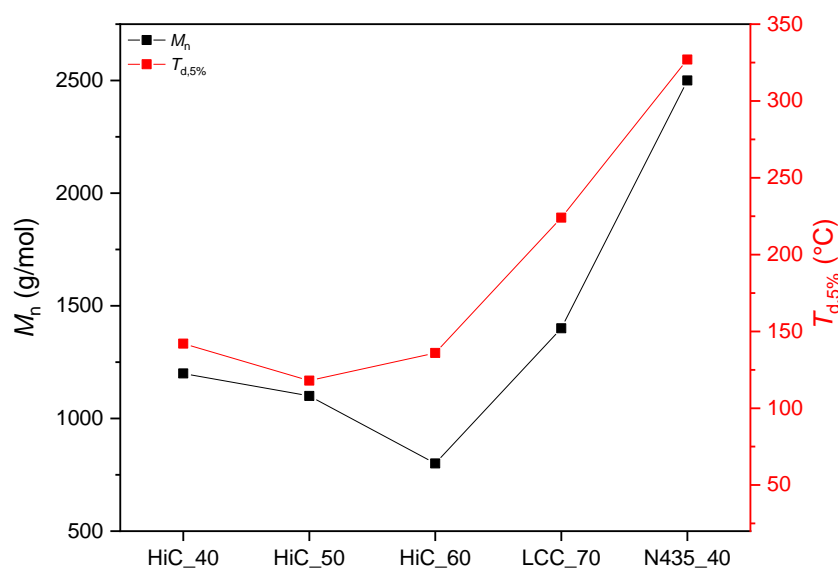
Διάγραμμα 6.17 Σύγκριση α) χρωματογραφημάτων των προϊόντων της HiC, των μονομερών, του Blank_60 και του LCC_70, και β) των πειραμάτων HiC_40 και N435_40.

Ωστόσο, στα χρωματογραφήματα των πειραμάτων της HiC, (κυρίως στα προϊόντα HiC_40 και HiC_50), φαίνεται να επικρατούν κορυφές που αντιστοιχούν σε πληθυσμούς με το χαμηλότερο MB, το οποίο ταιριάζει με τη μορφολογία των προϊόντων αυτών.

Συγκεκριμένα, οι λόγοι των εντάσεων των δύο πρώτων κορυφών ως προς την ένταση της τρίτης κορυφής βρέθηκαν ίσοι με 0,151 και 0,382 αντίστοιχα για το πείραμα HiC_40, ενώ για το πείραμα HiC_50 είναι ίσοι με 0,106 και 0,377 αντίστοιχα. Έτσι επιβεβαιώθηκε και ποσοτικά η επικράτηση των πληθυσμών χαμηλού μοριακού βάρους.

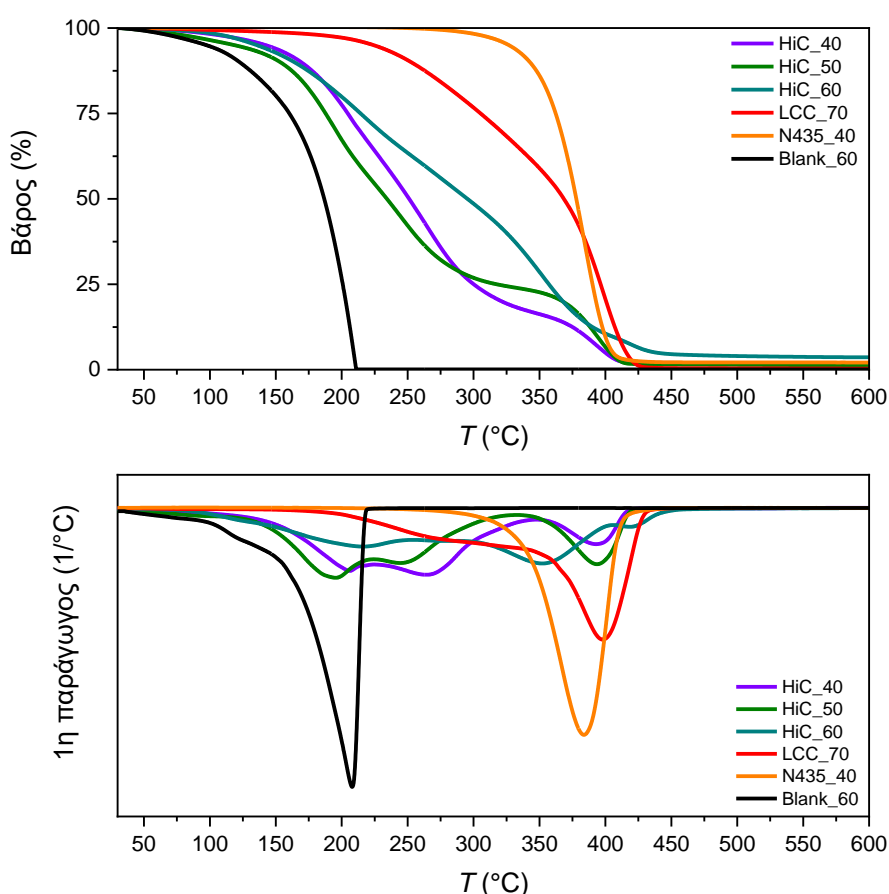
Εξετάζοντας ποσοτικά τα αποτελέσματα της GPC, προέκυψε για το προϊόν HiC_40 $\overline{M}_n = 1200 \pm 10$ g/mol ($\overline{M}_w = 1200 \pm 10$ g/mol, $\overline{D} = 1,03$), για το HiC_50 $\overline{M}_n = 1100 \pm 30$ g/mol ($\overline{M}_w = 1200 \pm 40$ g/mol, $\overline{D} = 1,02$) και για το HiC_60 $\overline{M}_n = 800 \pm 40$ g/mol ($\overline{M}_w = 900 \pm 40$ g/mol, $\overline{D} = 1,10$). Όλες οι τιμές ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες του πειράματος LCC_70 ($\overline{M}_n = 1400 \pm 20$ g/mol, $\overline{M}_w = 1500 \pm 50$ g/mol, $\overline{D} = 1,07$).

Όσον αφορά την ανάλυση μέσω TGA που πραγματοποιήθηκε για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού με HiC, τα $T_{d,5\%}$ (Πίνακας Π5) των προϊόντων παρουσιάζονται συγκριτικά με τα αντίστοιχα του πειράματος LCC_70 αλλά και του N435_40 στο διάγραμμα 6.18.



Διάγραμμα 6.18 Σύγκριση $T_{d,5\%}$ και \overline{M}_n των πειραμάτων της HiC καθώς και των πειραμάτων LCC_70 και N435_40.

Τα δεδομένα από το διάγραμμα 6.18 δείχνουν πως προέκυψαν πολύ ασταθή προϊόντα με πολύ χαμηλότερα $T_{d,5\%}$ από τα πειράματα της LCC^{ICCG} καθώς και από το προϊόν του πειράματος αναφοράς. Η τάση που παρατηρήθηκε και σε αυτή την περίπτωση ήταν η ίδια με αυτή των πειραμάτων της LCC^{ICCG} καθώς όσο αυξανόταν το \overline{M}_n , τόσο αυξανόταν και το $T_{d,5\%}$. Από τις καμπύλες που φαίνονται στο διάγραμμα 6.19, φάνηκε πιο ξεκάθαρα το γεγονός ότι επρόκειτο για πολύ ασταθή προϊόντα καθώς η αποικοδόμηση έλαβε χώρα σε παραπάνω από δύο στάδια σε αντίθεση με το πείραμα LCC_70.



Διάγραμμα 6.19 Καμπύλες TGA προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με HiC συγκριτικά με τις καμπύλες του πειράματος LCC_70 καθώς και των πειραμάτων αναφοράς.

Η αστάθεια αυτή ήταν αναμενόμενη μιας και η αναζήτηση στη βιβλιογραφία έδειξε πως η συμπεριφορά αυτή ταιριάζει με την αποικοδόμηση πολύ χαμηλού MB oligομερών PBS. Πιο αναλυτικά, όσο πιο μικρός είναι ο βαθμός

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα ενζυμικού προπολυμερισμού του PBS με χρήση καινοτόμων ενζύμων – LCC^{ICCG} & HiC πολυμερισμού του προϊόντος, τόσο περισσότερα είναι τα στάδια αποικοδόμησης που λαμβάνουν χώρα [6].

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από την κατάλυση της LCC^{ICCG} όσο και από την κατάλυση της HiC, φαίνεται πως, καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η χρήση του ενζύμου LCC^{ICCG}, καθώς η HiC οδήγησε σε υγρά προϊόντα, με υποδεέστερες ιδιότητες. Από τα πειράματα της LCC^{ICCG}, τα καλύτερα αποτελέσματα προέκυψαν από το πείραμα LCC_70 καθώς το προϊόν αυτό είχε το μεγαλύτερο MB αλλά και καλύτερες θερμικές ιδιότητες απέναντι στα άλλα, προσεγγίζοντας αυτές του προϊόντος που προέκυψε από το πείραμα N435_40.

Για τους παραπάνω λόγους, το προϊόν του πειράματος LCC_70 επιλέχθηκε να οδηγηθεί σε πειράματα μεταπολυμερισμού μιας και είχε αποδειχτεί η επιδεκτικότητά του σε μεταπολυμερισμό με σκοπό να γίνει προσπάθεια βελτίωσης των ιδιοτήτων του.

6.4. Βιβλιογραφία

- [1] D. Feder, R.A. Gross, Exploring chain length selectivity in HIC-catalyzed polycondensation reactions, *Biomacromolecules* 11 (2010) 690–697. <https://doi.org/10.1021/bm901272r>.
- [2] M. Hunsen, A. Azim, H. Mang, S.R. Wallner, A. Ronkvist, X. Wenchun, R.A. Gross, A cutinase with polyester synthesis activity, *Macromolecules* 40 (2007) 148–150. <https://doi.org/10.1021/ma062095g>.
- [3] S. Sulaiman, S. Yamato, E. Kanaya, J.J. Kim, Y. Koga, K. Takano, S. Kanaya, Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach, *Appl Environ Microbiol* 78 (2012) 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>.
- [4] V. Tournier, C.M. Topham, A. Gilles, B. David, C. Folgoas, E. Moya-Leclair, E. Kamionka, M.L. Desrousseaux, H. Texier, S. Gavalda, M. Cot, E. Guémard, M. Dalibey, J. Nomme, G. Cioci, S. Barbe, M. Chateau, I. André, S. Duquesne, A.

- Marty, An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles, *Nature* 580 (2020) 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>.
- [5] C.I. Gkountela, D. Markoulakis, M. Mathioudaki, I. Pitterou, A. Detsi, S.N. Vouyiouka, Scalable enzymatic polymerization and low-temperature post-polymerization of poly(butylene succinate): Process parameters and application, *Eur Polym J* 198 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112423>.
- [6] C. Gkountela, M. Rigopoulou, E.M. Barampouti, S. Vouyiouka, Enzymatic pre-polymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate), *Eur Polym J* 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>.
- [7] G. Masioné, D. Čiužas, E. Krugly, I. Stasiulaitenė, L. Pečiulytė, M. Tichonovas, D. Martuzevičius, Formation and characterisation of biobased poly(butylene succinate) electrospun nanofibre scaffolds, *Mater Today Commun* 37 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107212>.
- [8] B. Sena, J.L. Aceña, J.L. Novella Robisco, B. Monje Martínez, L. Martí Montaner, M.I. Fernández-Bachiller, Effectiveness of different immobilized *Candida antarctica* lipase b (iCaLB) in the production of biobased oligoester derivatives from poly(butylene succinate) (PBS) and poly(butylene adipate) (PBA), *Eur Polym J* 201 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112575>.
- [9] T. Debuissy, E. Pollet, L. Avérous, Enzymatic Synthesis of a Bio-Based Copolyester from Poly(butylene succinate) and Poly((R)-3-hydroxybutyrate): Study of Reaction Parameters on the Transesterification Rate, *Biomacromolecules* 17 (2016) 4054–4063. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01494>.
- [10] X. Chen, X. Liu, J. Lei, L. Xu, Z. Zhao, F. Kausar, X. Xie, X. Zhu, Y. Zhang, W.Z. Yuan, Synthesis, clustering-triggered emission, explosive detection and cell imaging of nonaromatic polyurethanes, *Mol Syst Des Eng* 3 (2018) 364–375. <https://doi.org/10.1039/C7ME00118E>.

- [11] A.M. Bhayo, R. Abdul-Karim, S.G. Musharraf, M.I. Malik, Synthesis and characterization of 4-arm star-shaped amphiphilic block copolymers consisting of poly(ethylene oxide) and poly(ϵ -caprolactone), *RSC Adv* 8 (2018) 28569–28580. <https://doi.org/10.1039/C8RA05000G>.
- [12] S. Chen, L. Su, J. Chen, J. Wu, Cutinase: Characteristics, preparation, and application, *Biotechnol Adv* 31 (2013) 1754–1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005>.
- [13] Σ. Βουγιούκα, ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ, ΕΜΠ, ΑΘΗΝΑ, 2021.
- [14] S. Mori, Calculations of average molecular weights of oligomers in high-performance gel permeation chromatography, *J Chromatogr A* 156 (1978) 111–120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)83131-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)83131-3).
- [15] T.X. Jin, M. Zhou, S.D. Hu, F. Chen, Q. Fu, Y. Fu, Effect of molecular weight on the properties of poly(butylene succinate), *Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)* 32 (2014) 953–960. <https://doi.org/10.1007/s10118-014-1463-4>.
- [16] D.K. Song, Y.K. Sung, Synthesis and characterization of biodegradable poly(1,4-butanediol succinate), *J Appl Polym Sci* 56 (1995) 1381–1395. <https://doi.org/10.1002/app.1995.070561102>.
- [17] J. Kim, G.W. Roberts, D.J. Kiserow, Effect of prepolymer molecular weight on solid state polymerization of poly(bisphenol a carbonate) with nitrogen as a sweep fluid, *J Polym Sci A Polym Chem* 46 (2008) 4959–4969. <https://doi.org/10.1002/pola.22819>.
- [18] M. Barletta, C. Aversa, M. Ayyoob, A. Gisario, K. Hamad, M. Mehrpouya, H. Vahabi, Polybutylene succinate - PBS Materials, processing, and industrial applications., *Prog Polym Sci* 132 (2022).
- [19] Μ. Μαθιουδάκη, Αξιοποίηση ενζυμικά παραγόμενων πολυμερών σε συστήματα εγκλεισμού δραστικών ουσιών, ΕΜΠ, 2022.

Κεφάλαιο 7: Αποτελέσματα πειραμάτων μεταπολυμερισμού μάζας: Διερεύνηση της θερμοκρασίας

7.1. Εισαγωγικά στοιχεία

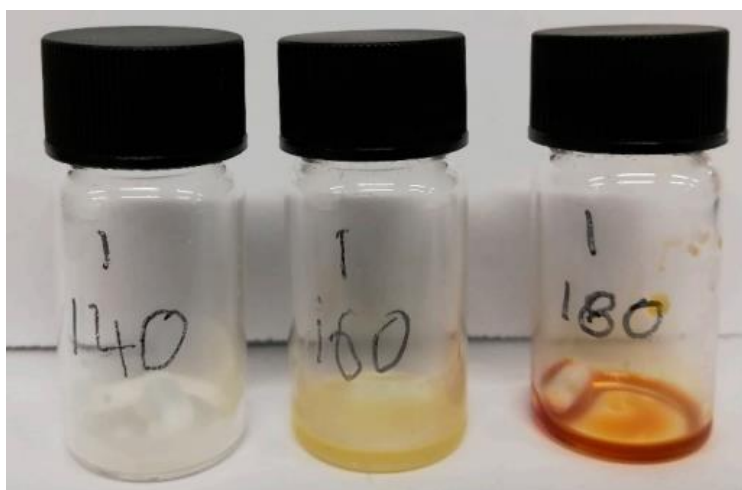
Έχοντας ολοκληρώσει τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού, ξεκίνησε η προσπάθεια βελτίωσης των ιδιοτήτων του προϊόντος από το πείραμα LCC_70 μέσω μεταπολυμερισμού τήγματος στο TGA.

Έχοντας σιγουρέψει πλέον πως το προϊόν του πειράματος LCC_70 είναι επιδεκτικό σε διεργασίες μεταπολυμερισμού, ξεκίνησαν πειράματα διερεύνησης της θερμοκρασίας. Το κριτήριο με το οποίο έγινε η αξιολόγηση των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, ήταν η επίδραση στο μοριακό βάρος των μεταπολυμερισμένων προϊόντων, καθώς και οι μεταβολές στα θερμικά χαρακτηριστικά.

7.2. Διερεύνηση της θερμοκρασίας μεταπολυμερισμού

Όσον αφορά την επιλογή των θερμοκρασιών στις οποίες έλαβαν χώρα τα πειράματα μεταπολυμερισμού (90-130°C), αυτές προέκυψαν έχοντας λάβει υπόψη προηγούμενες έρευνες του εργαστηρίου στις οποίες ο ενζυμικός προπολυμερισμός για τη σύνθεση του PBS συνδυάστηκε με μεταπολυμερισμό μάζας (θερμοκρασία μεταπολυμερισμού ίση με 110°C) [1]. Μετά το τέλος των μεταπολυμερισμών, η μορφολογία των προϊόντων ήταν παρόμοια με αυτή του αρχικού υλικού, δηλαδή ξηρό, σχεδόν λευκό gel, το οποίο όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, γινόταν όλο και πιο σκληρό. Η εικόνα αυτή των προϊόντων υπέδειξε πως το υλικό δεν αποικοδομήθηκε θερμικά, αφενός λόγω των σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών στις οποίες έλαβαν χώρα τα πειράματα και αφετέρου λόγω της ροής του αζώτου εντός του οργάνου γεγονός που βοήθησε στην αποφυγή αντιδράσεων οξείδωσης. Περιπτώσεις της βιβλιογραφίας έχουν δείξει πως σε προσπάθειες αναβάθμισης των ιδιοτήτων ενζυμικά παραγόμενων πολυμερών, όπως ο πολυ(αδιπικός βουτυλεστέρας) (poly(butylene adipate) ή PBA), μέσω μεταπολυμερισμού, οι οποίες έλαβαν χώρα παρουσία αέρα και σε υψηλότερες

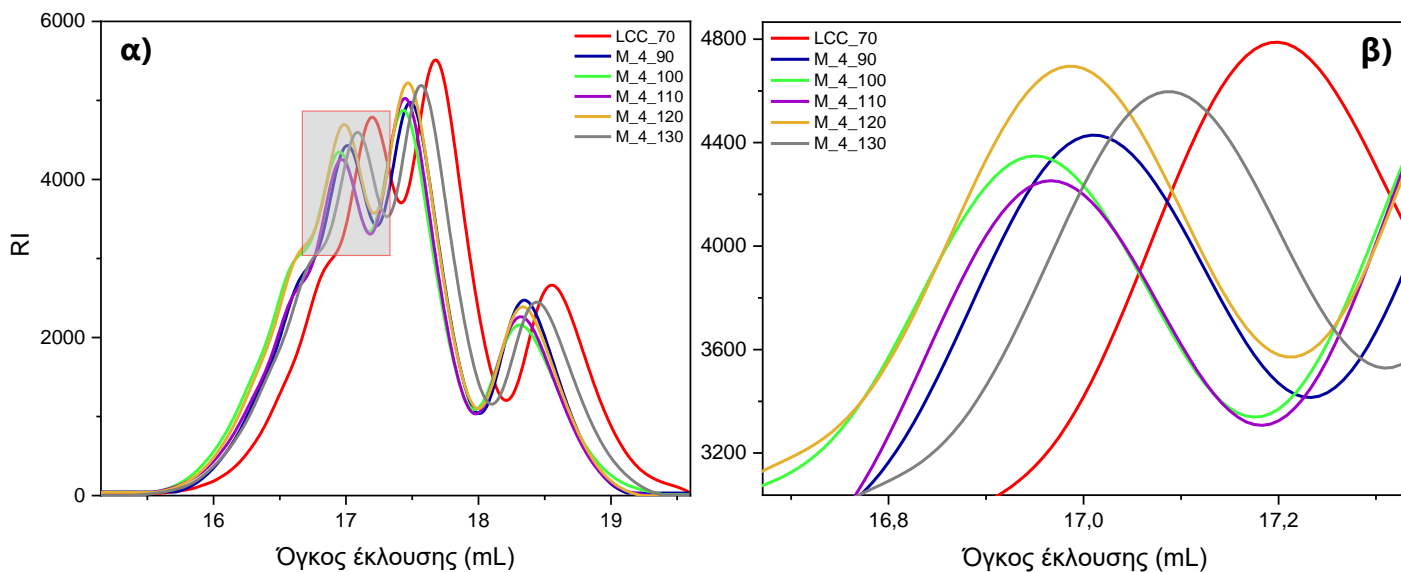
θερμοκρασίες (140-180°C), παρατηρήθηκε αλλαγή στην υφή αλλά και στο χρώμα (εικόνα 7.1) των μεταπολυμερισμένων προϊόντων (από λευκό σε κίτρινο), φαινόμενα τα οποία αποδόθηκαν σε ενδεχόμενη θερμική αποικοδόμηση, μιας και το μοριακό βάρος των προϊόντων δεν αυξανόταν περαιτέρω [2].



Εικόνα 7.1 Προϊόντα ύστερα από αναβάθμιση του PBA μέσω μεταπολυμερισμού παρουσία αέρα στους 140, 160 και 180°C, όπου φαίνεται η αλλαγή στο χρώμα των προϊόντων λόγω θερμικής αποικοδόμησης [2].

7.2.1. Προσδιορισμός μοριακού βάρους μέσω GPC

Τα προϊόντα από τα πειράματα μεταπολυμερισμού στα οποία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας, χαρακτηρίστηκαν μέσω GPC και τα νέα χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7.1. Εξετάζοντας τις καμπύλες που προέκυψαν, φάνηκε πως τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα παρουσίασαν αυξημένα MB σε σχέση με το αρχικό προϊόν μιας και όλες οι καμπύλες εμφανίστηκαν μετατοπισμένες προς τα αριστερά, δηλαδή σε μικρότερους όγκους έκλυσης. Ωστόσο, οι καμπύλες και σε αυτήν την περίπτωση εμφάνισαν τρεις διαδοχικές κορυφές, διαχωρισμένες μεταξύ τους, εκπροσωπώντας διαφορετικούς πληθυσμούς MB, ακριβώς όπως και στο προϊόν του πειράματος LCC_70. Ολοκληρώνοντας αυτές τις κορυφές προέκυψαν οι τιμές MB των μεταπολυμερισμένων προϊόντων, οι οποίες πράγματι παρουσίασαν μια μικρή αύξηση σε σχέση με το αρχικό υλικό.

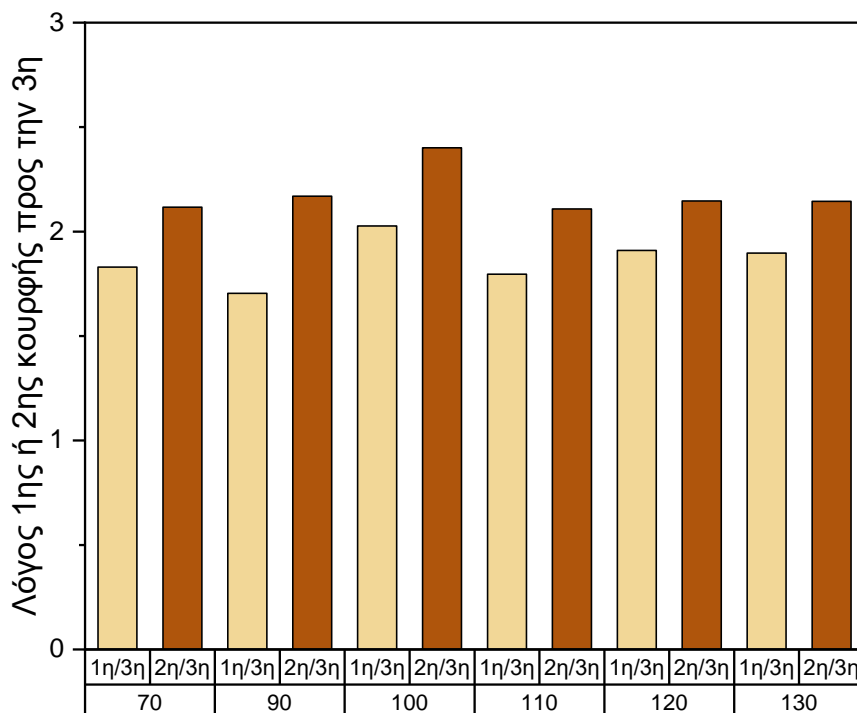


Διάγραμμα 7.1 α) Χρωματογραφήματα προϊόντων μεταπολυμερισμού από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας καθώς και του προϊόντος από το πείραμα LCC_70 β) Εστίαση στις πρώτες κορυφές των χρωματογραφημάτων.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και από τα δεδομένα στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π6), το MB των μεταπολυμερισμένων προϊόντων αυξήθηκε λίγο σε όλες τις περιπτώσεις σε σχέση με το αρχικό υλικό, με τη μέγιστη τιμή να σημειώνεται όταν η θερμοκρασία του μεταπολυμερισμού ήταν ίση με 100°C (M_4_100). Η τιμή αυτή βρέθηκε ίση με $\overline{M}_n = 1700 \pm 2$ g/mol ($\overline{M}_w = 1800 \pm 1$ g/mol, $\overline{D} = 1,07$) σημειώνοντας μικρή αύξηση ίση με $\Delta \overline{M}_n = 21\%$ ($\Delta \overline{M}_w = 20\%$).

Επίσης, τα δεδομένα του πίνακα Π6 δείχνουν πως η τάση που ακολουθήθηκε για τις τιμές των MB ήταν αρχικά αυξητική, φτάνοντας τη μέγιστη τιμή στους 100°C όπως προαναφέρθηκε, ενώ με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας των πειραμάτων μεταπολυμερισμού, τα MB μειώνονταν ελαφρώς. Αυτή η μείωση που παρατηρήθηκε στις υψηλότερες θερμοκρασίες, ενδεχομένως να οφείλεται σε αποικοδόμηση του υλικού.

Η ίδια τάση παρατηρήθηκε κι ύστερα από υπολογισμό του λόγου της έντασης της 1^{ης} κορυφής προς την ένταση της 3^{ης} κορυφής καθώς επίσης και του λόγου της έντασης της 2^{ης} κορυφής προς την 3^η. Σε όλες τις περιπτώσεις φάνηκε πως επικρατούσαν οι δύο πρώτες κορυφές, δηλαδή οι πληθυσμοί με τα μεγαλύτερα MB, και μάλιστα, όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, τόσο αυξάνονταν και οι τιμές αυτών των λόγων φτάνοντας σε ένα μέγιστο στην περίπτωση των 100°C.



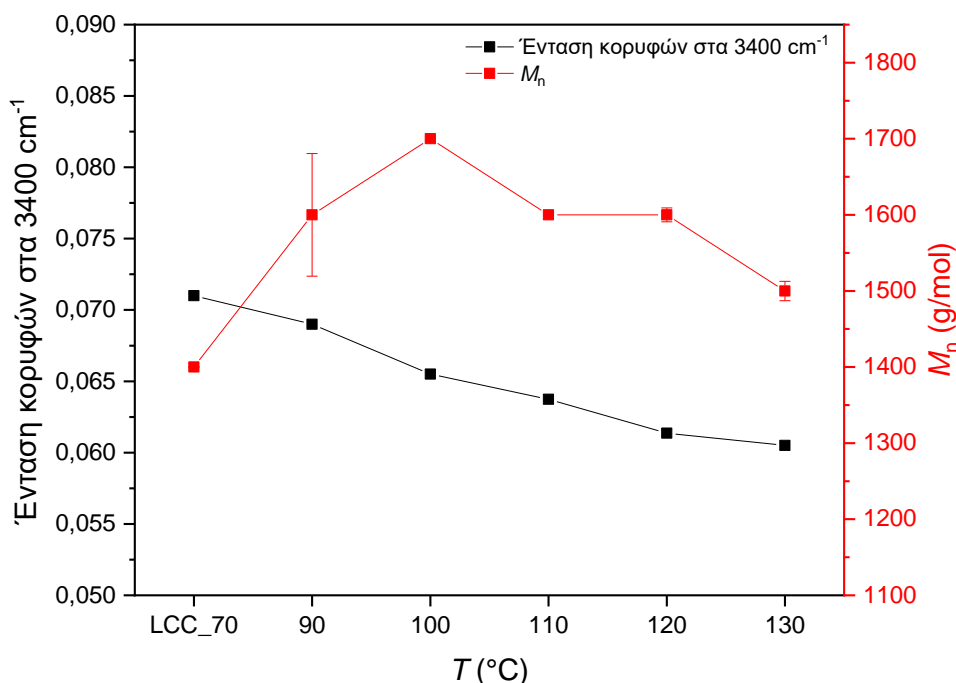
Διάγραμμα 7.2 Λόγοι εντάσεων της 1^{ης} και της 2^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3^{ης} για τα πειράματα μεταπολυμερισμού όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας μαζί με το προϊόν αναφοράς LCC_70.

Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε μείωση αυτών των λόγων όπως φαίνεται και από τα δεδομένα από το διάγραμμα 7.2, τα οποία συνάδουν και με τις τιμές \overline{M}_n και \overline{M}_w οδηγώντας στο συμπέρασμα πως η θερμοκρασία των 100°C φάνηκε να βελτιώνει ως έναν βαθμό το προϊόν του ενζυμικού προπολυμερισμού. Στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π7) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές των λόγων των εντάσεων των κορυφών για τα προϊόντα μεταπολυμερισμού όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας.

7.2.2. Υπολογισμός ακραίων ομάδων OH μέσω FT-IR

Μέσα από την ανάλυση FT-IR των μεταπολυμερισμένων δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια υπολογισμού της έντασης των κορυφών στα 3400 cm^{-1} που αντιστοιχούν σε ομάδες OH. Τα αποτελέσματα αυτών των υπολογισμών παρουσιάζονται συγκριτικά με τα αποτελέσματα της GPC στο διάγραμμα 7.3.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και σε αυτό το διάγραμμα, όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, οι ομάδες OH μειώνονταν.



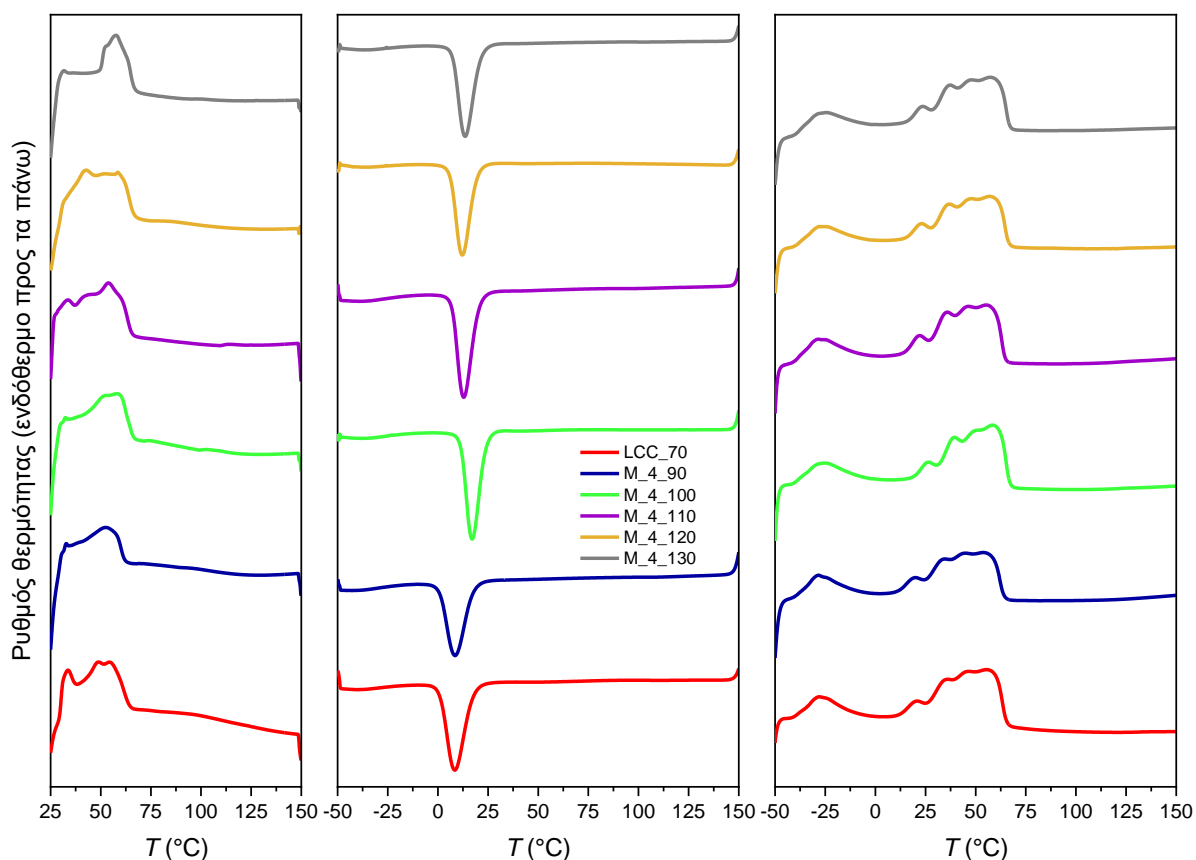
Διάγραμμα 7.3 Μεταβολή του \overline{M}_n καθώς και των εντάσεων των ακραίων ομάδων OH συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα πειράματα μεταπολυμερισμού μάζας όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας.

Η μείωση αυτή συμφωνεί αρχικά με την αύξηση του \overline{M}_n , καθώς όσο μεγαλύτερο MB, τόσο λιγότερες ακραίες ομάδες υπάρχουν στα προϊόντα. Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε όμως σε περαιτέρω μείωση των ακραίων υδροξυλομάδων, φαινόμενο που ενδεχομένως να οφειλόταν σε απώλεια ολιγομερών στις μεγαλύτερες θερμοκρασίες, γεγονός που δεν ευνόησε και την αύξηση του MB.

Οι τιμές των εντάσεων των κορυφών στα 3400 cm⁻¹ παρουσιάζονται συγκριτικά στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π8).

7.2.3. Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων μέσω DSC

Οι καμπύλες που προέκυψαν από την ανάλυση των μεταπολυμερισμένων προϊόντων μέσω DSC παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7.4. Ξεκινώντας από την 1^η θέρμανση, παρατηρήθηκαν ευρείες ενδόθερμες τήξης με κορυφές που κυμαίνονταν από 52-59°C σε αντίθεση με την περίπτωση του προϊόντος από το πείραμα αναφοράς (LCC_70) το οποίο είχε $T_{m1}=49^\circ\text{C}$.

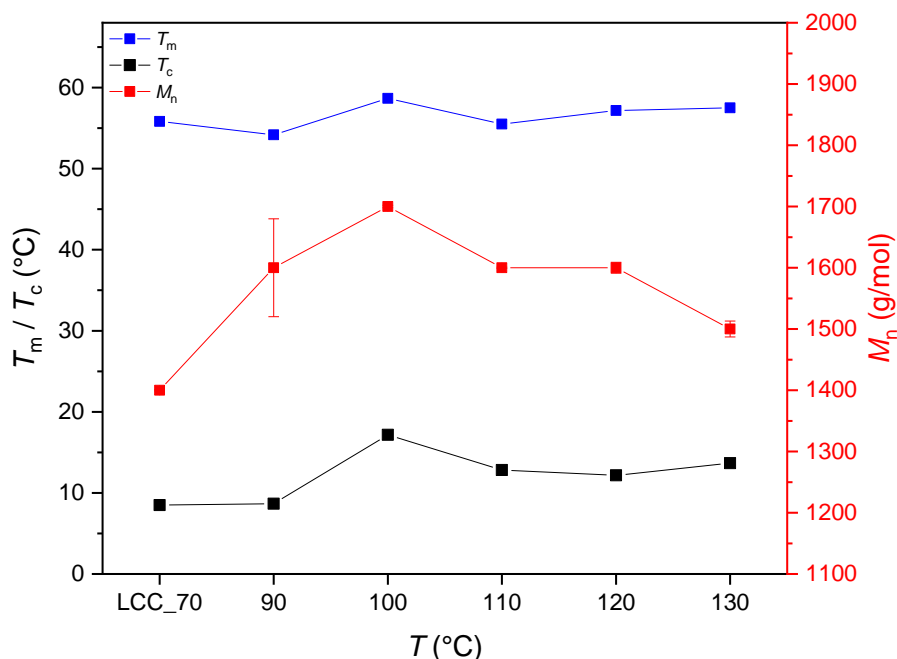


Διάγραμμα 7.4 Καμπύλες DSC των μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μαζί με του πειράματος LCC_70 (1^η θέρμανση, ψύξη, 2^η θέρμανση).

Η αύξηση αυτή είναι αποτέλεσμα της αύξησης του MB στα προϊόντα του μεταπολυμερισμού και ταιριάζουν με τιμές που συναντώνται στη βιβλιογραφία για PBS χαμηλού MB [3].

Προχωρώντας στις καμπύλες ψύξης, τα δεδομένα έδειξαν πως η αύξηση της θερμοκρασίας των πειραμάτων μεταπολυμερισμού οδήγησε σε αύξηση του T_c

και μετά ξανά σε μείωση, με τη μέγιστη τιμή να είναι ίση με $17,2^{\circ}\text{C}$ για το προϊόν του πειράματος M_4_100 . Τα δεδομένα αυτά, που παρουσιάζονται στο διάγραμμα 7.5, ταιριάζουν με τη μεταβολή του M_B συναρτήσει της θερμοκρασίας καθώς όσο το M_B αυξανόταν, αυξανόταν και το T_c με αποτέλεσμα η κρυστάλλωση να πραγματοποιείται γρηγορότερα. Εκτός αυτού όμως, το γεγονός ότι στην περίπτωση των 100°C παρατηρήθηκε μεγαλύτερο T_c αποδίδεται στο ότι οι αλυσίδες ολιγομερών με μεγαλύτερο βαθμό πολυμερισμού μπορούν να αναδιπλωθούν καλύτερα σε σχέση με τις αντίστοιχες των ολιγομερών μικρότερου βαθμού πολυμερισμού [3].



Διάγραμμα 7.5 Μεταβολή των T_m , T_c αλλά και του \overline{M}_n συναρτήσει της θερμοκρασίας για τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα.

Ολοκληρώνοντας με τη 2^η θέρμανση των προϊόντων μεταπολυμερισμού όπου διερευνήθηκε η θερμοκρασία των πειραμάτων, καταγράφηκαν ευρείες πολλαπλές κορυφές τήξης, όπως αυτές του αρχικού προϊόντος.

Η αύξηση της θερμοκρασίας, όπως φαίνεται και από το διάγραμμα 7.5 οδήγησε αρχικά σε αύξηση και στη συνέχεια σε μείωση του σημείου τήξεως, φτάνοντας

σε μέγιστη τιμή $T_m=58,7^{\circ}\text{C}$ όταν η θερμοκρασία του πειράματος μεταπολυμερισμού ήταν ίση με 100°C σε σύγκριση με το αρχικό προϊόν που είχε $T_m=55,8^{\circ}\text{C}$.

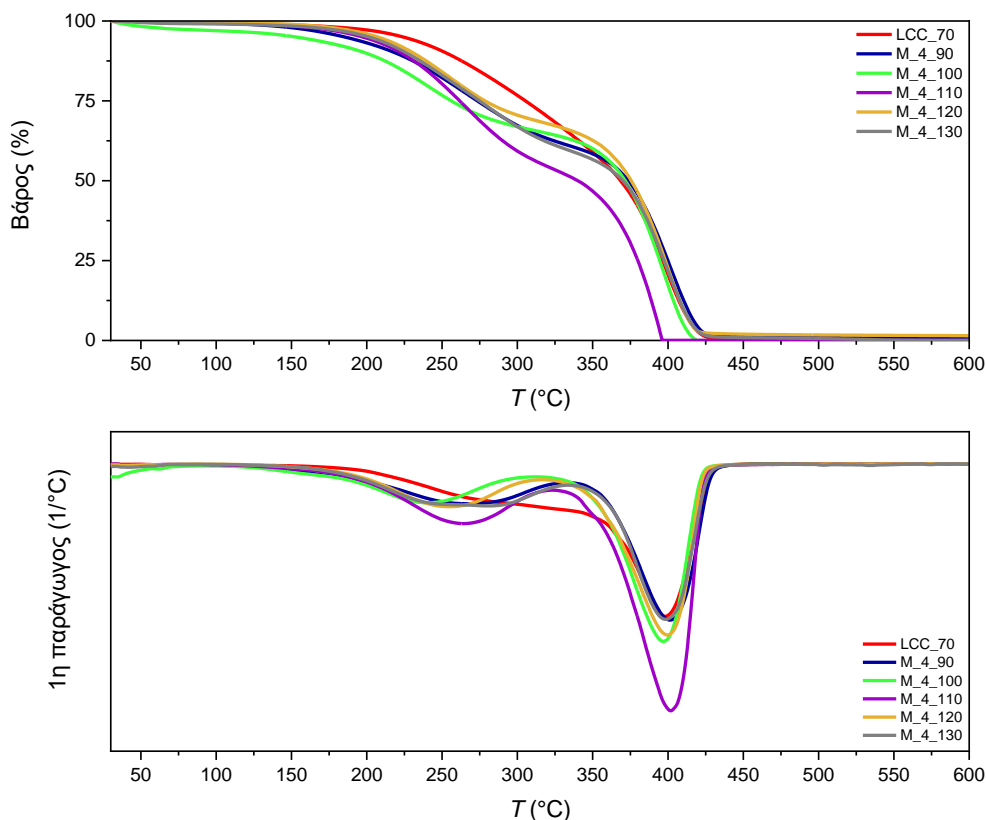
Η τάση που παρατηρήθηκε, συνάδει με τη μεταβολή του \overline{M}_n , καθώς στα προϊόντα στα οποία επικρατούν οι πληθυσμοί με το μεγαλύτερο MB, πραγματοποιείται καλύτερη αναδίπλωση των μακροαλυσίδων.

Στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π9) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά όλες οι πληροφορίες που προέκυψαν από την ανάλυση μέσω του DSC για τα προϊόντα αυτής της διερεύνησης της θερμοκρασίας.

7.2.4. Χαρακτηρισμός θερμικών ιδιοτήτων μέσω TGA

Η ανάλυση μέσω TGA έδειξε πως τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα παρουσίασαν πάνω από ένα στάδια αποικοδόμησης (διάγραμμα 7.6), προσομοιάζοντας τόσο τη συμπεριφορά των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού όσο και περιπτώσεις της βιβλιογραφίας οι οποίες αναφέρονται σε πολλαπλά στάδια αποικοδόμησης ολιγομερών ενζυμικά παραγόμενου PBS καθώς και άλλων πολυμερών [3]. Πιο συγκεκριμένα, αναζητώντας στη βιβλιογραφία για αντίστοιχες συμπεριφορές, βρέθηκαν περιπτώσεις του πολυ(ηλεκτρικού αιθυλεστέρα) (poly(ethylene succinate) ή PES), ο οποίος μπορούσε να αποικοδομηθεί σε ένα στάδιο όταν το \overline{M}_n ήταν μεγαλύτερο από 3600 g/mol ενώ όταν το \overline{M}_n βρισκόταν στο εύρος από $2300\text{-}3000\text{ g/mol}$ τότε η αποικοδόμηση λάμβανε χώρα σε τρία στάδια [4]. Επίσης, παρόμοια έρευνα έδειξε πως και στην περίπτωση της πολυκαπρολακτόνης (poly(ϵ -caprolactone) ή PCL), η αποικοδόμηση λάμβανε χώρα σε τρία στάδια όταν το \overline{M}_n ήταν χαμηλότερο (10.000 g/mol) ενώ όταν το \overline{M}_n ήταν υψηλότερο (80.000 g/mol) τότε παρατηρούνταν μόνο δύο στάδια [5].

Μία άλλη ενδεχόμενη ερμηνεία, είναι η πρώτη, ευρεία κορυφή ($240\text{-}285^{\circ}\text{C}$) να οφείλεται σε περαιτέρω μεταπολυμερισμό των ολιγομερών, ο οποίος όμως έλαβε χώρα σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες συγκριτικά με αυτές που διερευνήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Παρόλο που οι συνθήκες αυτές ενδεχομένως να οδηγούσαν σε μεγαλύτερα MB, θα έθεταν σε αμφισβήτηση τον «πράσινο» χαρακτήρα της διεργασίας κάνοντάς τη μη βιώσιμη.



Διάγραμμα 7.6 Καμπύλες TGA προϊόντων μεταπολυμερισμού για τα πειράματα διερεύνησης της θερμοκρασίας.

Στο παράρτημα πινάκων (Πίνακας Π10) παρουσιάζονται τα $T_{d,5\%}$, τα T_d καθώς και τα υπολείμματα μάζας των προϊόντων μεταπολυμερισμού όπως προέκυψαν από την ανάλυση μέσω TGA.

7.3. Βιβλιογραφία

- [1] C.I. Gkountela, D. Markoulakis, M. Mathioudaki, I. Pitterou, A. Detsi, S.N. Vouyiouka, Scalable enzymatic polymerization and low-temperature post-polymerization of poly(butylene succinate): Process parameters and application, Eur Polym J 198 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112423>.
- [2] J.W. Comerford, F.P. Byrne, S. Weinberger, T.J. Farmer, G.M. Guebitz, L. Gardossi, A. Pellis, Thermal Upgrade of Enzymatically Synthesized Aliphatic and

Aromatic Oligoesters, Materials 13 (2020) 368.

<https://doi.org/10.3390/ma13020368>.

- [3] C. Gkountela, M. Rigopoulou, E.M. Barampouti, S. Vouyiouka, Enzymatic pre-polymerization combined with bulk post-polymerization towards the production of bio-based polyesters: The case of poly(butylene succinate), Eur Polym J 143 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110197>.
- [4] K. Chrissafis, K.M. Paraskevopoulos, D.N. Bikiaris, Effect of molecular weight on thermal degradation mechanism of the biodegradable polyester poly(ethylene succinate), Thermochim Acta 440 (2006) 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2005.11.002>.
- [5] M. Unger, C. Vogel, H.W. Siesler, Molecular Weight Dependence of the Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone): A Thermogravimetric Differential Thermal Fourier Transform Infrared Spectroscopy Study, Appl Spectrosc 64 (2010) 805–809. <https://doi.org/10.1366/000370210791666309>.

8.1. Συμπεράσματα από την παρούσα διπλωματική εργασία

Ολοκληρώνοντας την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων τόσο από το κομμάτι της παραγωγής των στερεών βιοκαταλυτών όσο και από το κομμάτι της σύνθεσης προπολυμερών PBS αλλά και της διαδικασίας μεταπολυμερισμού αυτών των προϊόντων, προέκυψαν τα ακόλουθα σημαντικά συμπεράσματα.

Ξεκινώντας με τη διαδικασία της ετερόλογης έκφρασης των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς η παραγωγή των δύο επιθυμητών κουτινασών (κουτινάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Humicola insolens* ή HiC και τετραπλή μετάλλαξη ICCG της κουτινάσης προερχόμενη από κομπόστ φύλλων και κλαδιών ή LCC^{ICCG}) σε στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli*, οι οποίες στη συνέχεια ακινητοποιήθηκαν σε φορείς αποτελούμενους από γυαλί ελεγχόμενου πορώδους (Controlled porosity glass ή CPG), οδηγώντας στην παραλαβή στερεών βιοκαταλυτών υπό μορφή ξηρής σκόνης. Η ακινητοποίηση των ενζύμων στέφτηκε με επιτυχία και στις δύο περιπτώσεις, οδηγώντας σε ποσοστό ακινητοποίησης ίσο με 77% τόσο για την HiC όσο και για την LCC^{ICCG}. Η μελέτη χαρακτηρισμού του βιοκαταλύτη που προέκυψε από την ακινητοποίηση του ενζύμου LCC^{ICCG}, αρχικά έδειξε πως προέκυψε βιοκαταλύτης με ενεργότητα ίση με **0,693±0,080 units/mg** (rsd=12%), μειωμένη σε σχέση με αυτή του ελεύθερου ενζύμου, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου λόγω της σύνδεσης με τον φορέα. Επίσης, η μελέτη της θερμοσταθερότητας έδειξε πως η ακινητοποίηση οδήγησε σε λιγότερο θερμικά σταθερό καταλύτη καθώς όσο η θερμοκρασία αυξανόταν, τόσο γρηγορότερα μειωνόταν η ενεργότητά του συγκριτικά με την ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου, φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου η φόρτωση του ενζύμου στον φορέα είναι υψηλή. Ωστόσο, η ακινητοποίηση δεν άλλαξε τη θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο παρουσιάζει τη βέλτιστη δράση καθώς τόσο πριν όσο και μετά την ακινητοποίηση, το ένζυμο παρουσίασε βέλτιστη δράση στους **60°C**, σημειώνοντας μάλιστα αύξηση στη σχετική ενεργότητα στις θερμοκρασίες γύρω από τους 60°C μετά την ακινητοποίηση.

Συνεχίζοντας με τις διεργασίες σύνθεσης του PBS μέσω ενζυμικού προπολυμερισμού χρησιμοποιώντας αυτές τις δύο κουτινάσες, φάνηκε πως η χρήση αυτών των ενζύμων είχε ως αποτέλεσμα τη σύνθεση ολιγομερών του PBS, με την LCC^{ICCG} να οδηγεί στην παραγωγή PBS σε μορφή gel, σε αντίθεση με την περίπτωση της HiC όπου τα προϊόντα παρέμειναν σε υγρή μορφή. Η παρούσα διπλωματική εργασία μάλιστα, αποτελεί την πρώτη ερευνητική προσπάθεια χρήσης του ενζύμου LCC^{ICCG} σε διεργασίες ενζυμικού πολυμερισμού αφού η αναζήτηση στη βιβλιογραφία έδειξε πως όλες οι βιοτεχνολογικές εφαρμογές του αφορούν διεργασίες αποπολυμερισμού κυρίως του πολυ(τερεφθαλικού αιθυλεστέρα) (poly(ethylene terephthalate ή PET) (βλ. ενότητα 2.2.2). Πραγματοποιώντας λοιπόν αντιδράσεις δύο σταδίων και για τα δύο ένζυμα, και ταυτόχρονα διερευνώντας τη θερμοκρασία του πρώτου σταδίου (1^ο στάδιο: HiC: 40-60°C, LCC^{ICCG}: 50-70°C, 24 h, 1000 mbar, 2^ο στάδιο: HiC: 70°C, LCC^{ICCG}: 80°C, 2 h, 200 mbar) το προϊόν με τα βέλτιστα χαρακτηριστικά προέκυψε στην περίπτωση χρήσης του ενζύμου LCC^{ICCG} όταν το πρώτο στάδιο της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε στους **70°C** παρουσιάζοντας $\overline{M}_n = 1400 \pm 1 \text{ g/mol}$, $x_c = 47\%$, $T_m = 55,8^\circ\text{C}$, και $T_d = 398^\circ\text{C}$.

Το ίδιο προϊόν τέθηκε σε δοκιμή μεταπολυμερισμού μάζας εντός του οργάνου Θερμοβαρυστρικής ανάλυσης (Thermogravimetric analysis ή TGA), και διερευνήθηκε η θερμοκρασία των πειραμάτων σε ισοθερμοκρασιακά πειράματα των 4 h. Έχοντας λοιπόν δοκιμάσει ένα εύρος θερμοκρασιών από 90-130°C, αποδείχτηκε πως το προϊόν με τις ελαφρώς βελτιωμένες συνθήκες προέκυψε ύστερα από παραμονή 4 h στους **100°C** καθώς παρουσίασε $\overline{M}_n = 1700 \pm 2 \text{ g/mol}$ ($\Delta\overline{M}_n = 21\%$), $x_c = 45\%$, $T_m = 58,7^\circ\text{C}$ και $T_d = 397^\circ\text{C}$. Η περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδήγησε σε υποβάθμιση αυτών των χαρακτηριστικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το προϊόν από τον ενζυμικό προπολυμερισμό είναι ιδιαίτερα επιδεκτικό σε διεργασίες μεταπολυμερισμού ανοίγοντας το δρόμο για περισσότερη διερεύνηση.

Συνοψίζοντας λοιπόν, μέσω της παρούσας διπλωματικής εργασίας κατέστη σαφές πως οι καινοτόμοι βιοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν σε διεργασίες ενζυμικού πολυμερισμού του PBS, μπορούν να κλείσουν τον κύκλο βιωσιμότητας, καθώς όχι μόνο μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαδικασίες αποπολυμερισμού

των πλαστικών αλλά μπορούν ταυτόχρονα να καταλύσουν και διεργασίες σύνθεσης αυτών των υλικών.

8.2. Προτάσεις και ιδέες για μελλοντική έρευνα

Όσον αφορά την παραγωγή των στερεών βιοκαταλυτών και τη χρήση τους σε διεργασίες ενζυμικού πολυμερισμού, υπάρχουν περιθώρια περαιτέρω μελλοντικής έρευνας σε αρκετά επίπεδα όπως:

- ❖ Προσπάθεια ακινητοποίησης αυτών των κουτινασών είτε μέσω διαφορετικής μεθόδου ακινητοποίησης είτε χρησιμοποιώντας διαφορετικούς φορείς με σκοπό να διαπιστωθεί αν μπορούν να προκύψουν βιοκαταλύτες με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, όπως μεγαλύτερη ενεργότητα αλλά και καλύτερη θερμική σταθερότητα.
- ❖ Χρήση των καινοτόμων αυτών βιοκαταλυτών σε αντιδράσεις σύνθεσης κι άλλων «πράσινων» πολυμερών, όπως είναι το PLA.

Στη συνέχεια, εστιάζοντας στο κομμάτι του ενζυμικού προπολυμερισμού και του μεταπολυμερισμού μάζας, οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα περιλαμβάνουν:

- ❖ Διερεύνηση των συνθηκών (θερμοκρασία, πίεση, χρόνος αντίδρασης) του δεύτερου σταδίου για τα πειράματα και των δύο ενζύμων.
- ❖ Μελέτη με στόχο την κλιμάκωση της διεργασίας του ενζυμικού προπολυμερισμού.
- ❖ Διερεύνηση του χρόνου αντίδρασης των πειραμάτων μεταπολυμερισμού μάζας εντός του TGA.
- ❖ Διερεύνηση μεταπολυμερισμού μάζας υπό κενό.
- ❖ Μελέτη με στόχο την κλιμάκωση της διεργασίας του μεταπολυμερισμού.

Παράρτημα πινάκων

Πίνακας Π1 Ποσοστά ακραίων ομάδων OH των προϊόντων του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435.

Πείραμα	Ποσοστό ακραίων ομάδων OH (%)
LCC_50	61
LCC_60	61
LCC_70	53
N435_40	61

Πίνακας Π2 Τιμές εντάσεων χαρακτηριστικών κορυφών του PBS στα 3400 cm⁻¹ για τα προϊόντα του ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} και N435, μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις και το rsd.

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Πείραμα	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση	RSD (%)
3400	LCC_50	0,083	0,002	3
	LCC_60	0,093	0,003	3
	LCC_70	0,071	0,002	3
	N435_40	0,021	-	-

Πίνακας Π3 Θερμικές ιδιότητες προϊόντων ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG} μέσω ανάλυσης DSC.

Πείραμα	1 ^η θέρμανση		Ψύξη			2 ^η θέρμανση	
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	x_c (%)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)
LCC_50	36,5	11,5	-24,2	17,6	16	34,8	28,5
LCC_60	46,0	19,5	-6,2	36,4	33	50,3	35,7
LCC_70	49,0	33,5	8,5	51,5	47	55,8	47,3

Πίνακας Π4 Τιμές $T_{d,5\%}$ των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με LCC^{ICCG}.

Πείραμα	$T_{d,5\%}$ (°C)
LCC_50	152
LCC_60	174
LCC_70	224

Πίνακας Π5 Τιμές $T_{d,5\%}$ μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων μάζας των προϊόντων από τα πειράματα ενζυμικού προπολυμερισμού με HiC.

Πείραμα	$T_{d,5\%}$ (°C)	Υπόλειμμα μάζας (%)
HiC_40	142	1,61
HiC_50	118	1,23
HiC_60	136	3,62

Πίνακας Π6 Μέσες τιμές MB για τα μεταπολυμερισμένα προϊόντα από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας για κάθε κορυφή με τυπικές αποκλίσεις και rsd.

1 ^η κορυφή							
Πείραμα	\overline{M}_n (g/mol)	Τυπ. Αποκλ. \overline{M}_n (g/mol)	RSD (%)	\overline{M}_w (g/mol)	Τυπ. Αποκλ. \overline{M}_w (g/mol)	RSD (%)	Đ
M_4_90	1600	80	4,92	1900	300	15,69	1,15
M_4_100	1700	2	0,13	1800	1	0,04	1,07
M_4_110	1600	1	0,09	1800	5	0,28	1,07
M_4_120	1600	9	0,57	1700	6	0,33	1,07
M_4_130	1500	13	0,85	1600	14	0,88	1,07
2 ^η κορυφή							
M_4_90	900	20	2,29	900	19	2,15	1,02
M_4_100	900	3	0,31	900	2	0,23	1,02
M_4_110	900	1	0,16	900	1	0,15	1,02
M_4_120	900	7	0,80	900	8	0,86	1,02
M_4_130	800	8	0,95	800	8	0,93	1,02
3 ^η κορυφή							
M_4_90	400	19	4,48	400	16	3,51	1,04
M_4_100	400	4	0,98	500	3	0,62	1,05
M_4_110	400	10	2,26	500	7	1,55	1,04
M_4_120	400	6	1,29	500	5	1,09	1,04
M_4_130	400	4	1,07	400	5	1,20	1,04

Πίνακας Π7 Λόγοι εντάσεων της 1^{ης} και της 2^{ης} κορυφής ως προς την ένταση της 3^{ης} των πειραμάτων μεταπολυμερισμού όπου πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της θερμοκρασίας.

Πείραμα	1 ^η κορυφή/ 3 ^η κορυφή	2 ^η κορυφή/ 3 ^η κορυφή
M_4_90	1,70	2,17
M_4_100	2,03	2,40
M_4_110	1,80	2,11
M_4_120	1,91	2,15
M_4_130	1,90	2,14

Πίνακας Π8 Τιμές εντάσεων κορυφών στα 3400 cm⁻¹ των μεταπολυμερισμένων προϊόντων ύστερα από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας.

Κυματαριθμός (cm ⁻¹)	Πείραμα	Ένταση κορυφής
3400	M_4_90	0,069
	M_4_100	0,066
	M_4_110	0,064
	M_4_120	0,061
	M_4_130	0,061

Πίνακας Π9 Θερμικές ιδιότητες μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μέσω ανάλυσης DSC.

Πείραμα	1 ^η θέρμανση		Ψύξη			2 ^η θέρμανση	
	T_{m1} (°C)	ΔH_{m1} (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)	x_c (%)	T_{m2} (°C)	ΔH_{m2} (J/g)
M_4_90	52,3	22,7	8,7	44,0	40	54,2	39,4
M_4_100	52,3	44,4	17,2	49,4	45	58,7	45,0
M_4_110	53,8	44,7	12,8	51,5	47	55,5	46,9
M_4_120	58,5	38,9	12,2	45,0	41	57,2	41,4
M_4_130	57,7	37,0	13,7	46,9	42	57,5	43,2

Πίνακας Π10 Τιμές T_d , $T_{d,5\%}$ μαζί με τις τιμές των υπολειμμάτων μάζας των μεταπολυμερισμένων προϊόντων από τη διερεύνηση της θερμοκρασίας μεταπολυμερισμού μαζί με του προϊόντος από το πείραμα αναφοράς LCC_70.

Πείραμα	$T_{d,5\%}$ (°C)	T_d (°C)	Υπόλειμμα μάζας (%)
LCC_70	224	398	0,30
M_4_90	185	402	0,53
M_4_100	153	397	0,02
M_4_110	197	402	0,03
M_4_120	207	400	1,51
M_4_130	201	399	0,00