



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΡΒΟΞΥ-ΜΕΘΥΛΟ
ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΜΕ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΙΟΥΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Περίληψη.....	3
B. Θεωρητικό Μέρος.....	4
1. Η κυτταρίνη και τα παράγωγά της.....	4
2. Εστέρες κυτταρίνης και οι εφαρμογές τους.....	14
3. Ένζυμα και μηχανισμοί.....	19
Γ. Πειραματικό Μέρος.....	33
1. Υλικά.....	33
2. Όργανα.....	35
3. Μέθοδοι.....	36
Δ. Αποτελέσματα.....	44
Ε. Συμπεράσματα.....	60
ΣΤ. Βιβλιογραφία.....	62

Α.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κυτταρίνη είναι συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των φυτικών ιστών και είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση , εύκολα διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες και διατίθεται σε χαμηλό κόστος. Παρόλα αυτά όμως, λόγω της χημικής της δομής και της στερεοχημικής της διαμόρφωσης, η οποία έχει μεγάλου μήκους αλυσίδες ισχυρά συνδεδεμένες μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, είναι δύσκολο να επεξεργαστεί ενζυμικά . Για το λόγο αυτό στη συγκεκριμένη εργασία, ως κυτταρινούχο υπόστρωμα της ενζυμικής εστεροποίησης χρησιμοποιήθηκε ένα διαλυτό παράγωγό της, η καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose).

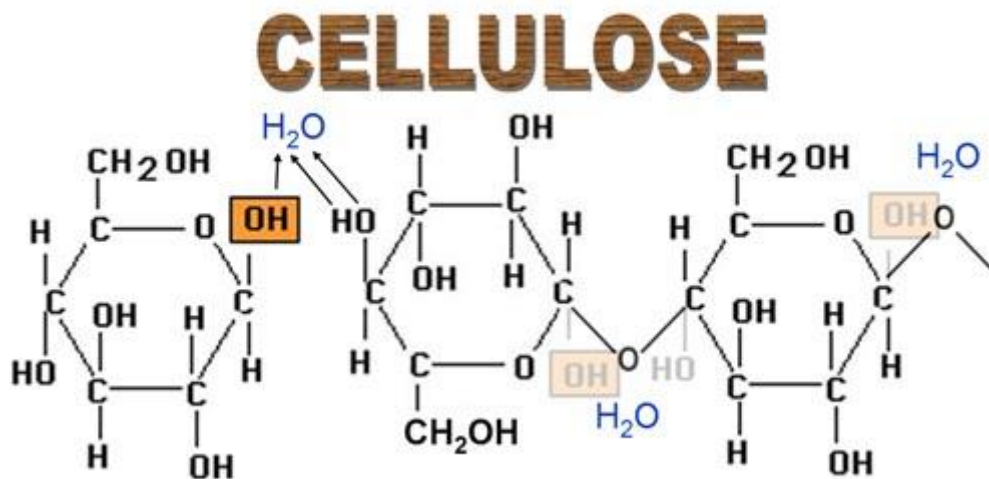
Για να επιτύχουμε την εστεροποίηση των κυτταρινικών υποστρωμάτων, χρησιμοποιήσαμε ως μέσο βιοκατάλυσης υδατικά συστήματα στα οποία μπορεί να διαλυθεί ικανή ποσότητα καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης. Σε ένα τέτοιο σύστημα η υδρόληση συναγωνίζεται την εστεροποίηση και έτσι η τελευταία μπορεί να πραγματοποιηθεί μόνο με κινητικό έλεγχο της αντίδρασης. Αυτό ήταν εφικτό με βιοκατάλυση απο τη λιπάση *A.niger* η οποία μπόρεσε και εστεροποίησε επιτυχώς την καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη με βινυλεστέρες ιπαρών οξέων.

Στόχος είναι η παραγωγή εστέρων κυτταρίνης οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς.

Β.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Η κυτταρίνη και τα παράγωγα της

Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης. Είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ και αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης, συνδεδεμένες μεταξύ τους με β (1-4) γλυκοζιτικούς δεσμούς, παρόμοιους με αυτούς της κελλοβιόζης. Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των μορίων της κυτταρίνης ποικίλει από μερικές εκατοντάδες έως και κάποιες χιλιάδες [2],[3].



Σχήμα 1: Η δομή της κυτταρίνης

Η κυτταρίνη είναι το δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των πράσινων φυτών και πολλών μορφών αλγών. Περίπου το 33% της φυτικής βιομάζας είναι κυτταρίνη. Σε καθαρή κατάσταση βρίσκεται στις ίνες του βαμβακιού 90% [4], ενώ στο ξύλο των κωνοφόρων και φυλλοβόλων δένδρων βρίσκεται σε συγκεντρώσεις 40-60% από τα οποία παρασκευάζεται βιομηχανικά. Πολλά είδη βακτηρίων επίσης την εκκρίνουν για να σχηματίσουν βιοφιλμ. Η κυτταρίνη είναι η πιο κοινή οργανική ένωση στη γη. Μερικά ζώα, ειδικά τα μηρυκαστικά και οι τερμίτες, μπορούν να αφομοιώσουν την κυτταρίνη με τη βοήθεια των συμβιωτικών μικροοργανισμών που ζουν στα έντερά τους. Δεν είναι θρεπτική ουσία για τον

άνθρωπο, καθώς ο οργανισμός δεν διαθέτει τα κατάλληλα ένζυμα για την πέψη της.

Ιστορία

Η κυτταρίνη ανακαλύφθηκε το 1838 από το Γάλλο χημικό Anselme Payen, την οποία απομόνωσε από φυτά [2],[5]. Χρησιμοποιήθηκε για να παραγάγει το πρώτο επιτυχημένο θερμοπλαστικό πολυμερές υλικό, τον κελουλοΐτη, από την κατασκευαστική επιχείρηση Hyatt το 1870. Ο Hermann Staudinger προσδιόρισε τη δομή της κυτταρίνης το 1920. Η χημική σύνθεση του μορίου της κυτταρίνης έγινε για πρώτη φορά το 1992 από τους Kobayashi και Shoda [6].

Εμπορικά Προϊόντα

Η κυτταρίνη είναι το βασικό συστατικό του χαρτιού, του χαρτονιού και των υφασμάτων που φτιάχνονται από βαμβάκι, λινό και άλλες φυτικές ίνες. Χρησιμοποιείται επίσης για να φτιάξει υδρόφιλα και ιδιαιτέρως απορροφητικά σφουγγάρια.

Η κυτταρίνη μπορεί να μετατραπεί στο σελοφάν, το οποίο είναι μια λεπτή διαφανή μεμβράνη, και στο τεχνητό μετάξι, η οποία είναι μια σημαντική ίνα που έχει χρησιμοποιηθεί στα υφάσματα από την αρχή του 20ού αιώνα. Το σελοφάν και το τεχνητό μετάξι είναι γνωστά ως "αναγεννημένες ίνες κυτταρίνης" (regenerated cellulose fibers), έχουν ίδια χημική δομή με την κυτταρίνη και γίνονται συνήθως από βισκόζη (viscose), ένα ιξώδες διάλυμα που προέρχεται από την κυτταρίνη.

Η κυτταρίνη είναι η πρώτη ύλη για την κατασκευή της νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose), ενός νιτρικού άλατος που χρησιμοποιήθηκε ως βασικό υλικό για τον κελουλοΐτη ο οποίος με τη σειρά του χρησιμοποιήθηκε ως φωτογραφικό φιλμ και φιλμ για ταινίες μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '30.

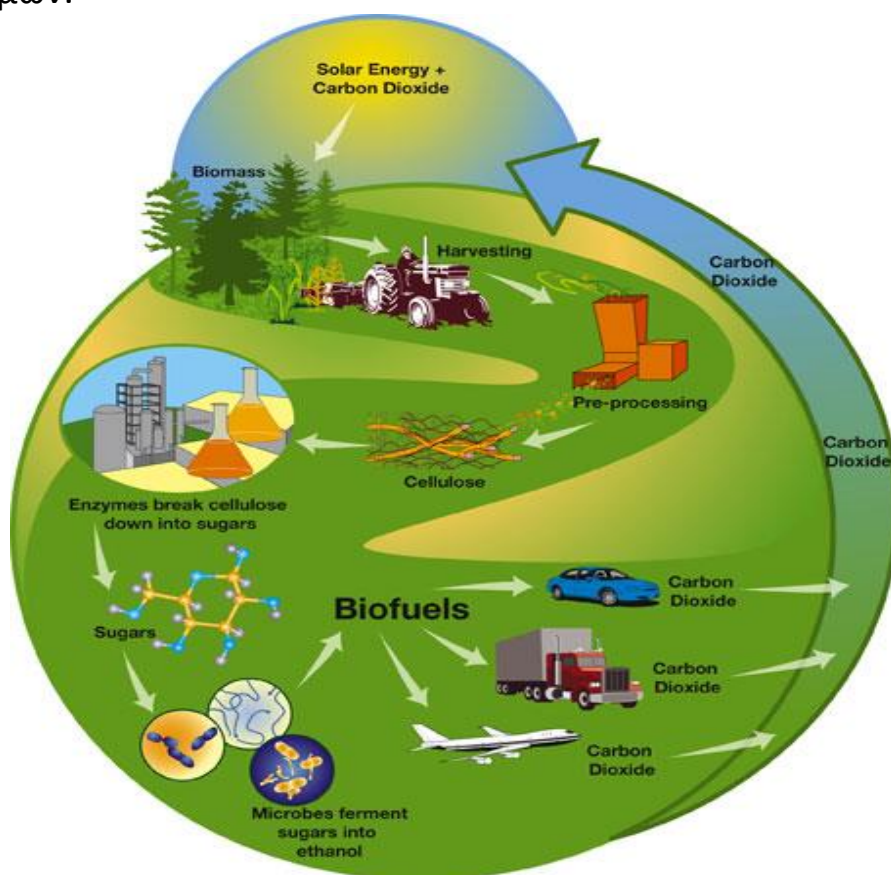
Χρησιμοποιείται για να κάνει υδατοδιαλυτές συγκολλητικές ουσίες όπως η μεθυλική και η καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη που

χρησιμοποιούνται στη συρραφή ταπετσариών. Η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη και η κονιοποιημένη κυτταρίνη χρησιμοποιούνται ως ανενεργά πληρωτικά υλικά φαρμακευτικές ταμπλέτες και ως σταθεροποιητές στα επεξεργασμένα τρόφιμα [7].

Εργαστηριακά χρησιμοποιείται ως στατική φάση για τη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Οι ίνες κυτταρίνης χρησιμοποιούνται επίσης στην υγρή διήθηση, μερικές φορές σε συνδυασμό με γη διατόμων ή με άλλα μέσα διήθησης, για να δημιουργήσουν ένα φίλτρο -κλίνη από αδρανές υλικό.

Επίσης η κυτταρίνη που προέρχεται από ανακυκλωμένο χαρτί αποτελεί ένα φιλικό προς το περιβάλλον μονωτικό υλικό. Ακόμα, αν συνδυαστεί με το βορικό οξύ, λειτουργεί ως επιβραδυντικό πυρκαγιάς.

Τέλος, η μετατροπή της κυτταρίνης σε βιοκαύσιμα όπως η κυτταρινική αιθανόλη είναι υπό έρευνα ως εναλλακτική πηγή καυσίμων.



Σχήμα 2: Ο ρόλος της κυτταρίνης στη φύση

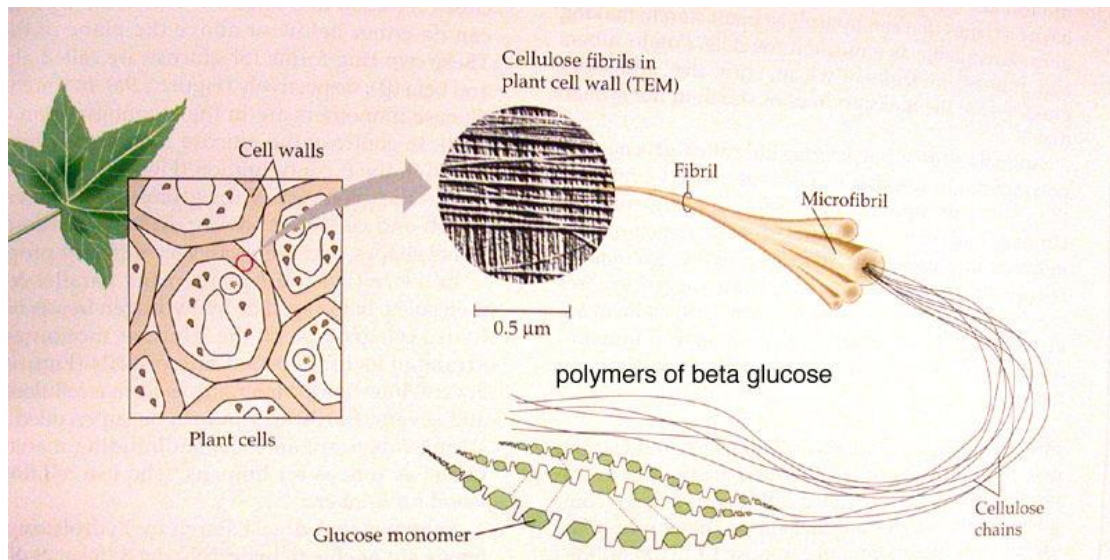
Δομή και Ιδιότητες

Η κυτταρίνη είναι άγευστη , άοσμη, υδρόφιλη και αδιάλυτη στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Είναι χειρόμορφη και βιοαποικοδομήσιμη ένωση και αν επεξεργαστεί με πυκνά διαλύματα οξέων σε υψηλή θερμοκρασία μπορεί να διασπαστεί στα μονομερή της (ομάδες γλυκόζης)

Η κυτταρίνη αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται με $\beta(1-4)$ -γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αυτός ο τύπος γλυκοζιτικού δεσμού είναι που διαφοροποιεί την κυτταρίνη από άλλους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και το γλυκογόνο οι οποίοι έχουν $\alpha(1-4)$ -γλυκοζιτικούς δεσμούς.

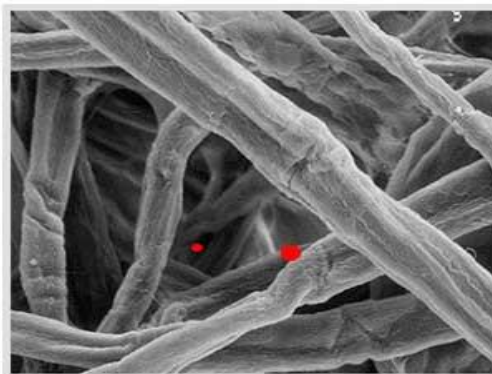
Το μόριο της κυτταρίνης διαθέτει μια εκτεταμένη και μάλλον δύσκαμπτη διαμόρφωση που μοιάζει με ράβδο, η οποία σταθεροποιείται από την ισημερινή διαμόρφωση των υπολειμμάτων γλυκόζης (glucose residues). Οι πολλαπλές ομάδες υδροξυλίου στα υπολείμματα γλυκόζης από μια αλυσίδα διαμορφώνουν τους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια οξυγόνου στην ίδια ή σε μια γειτονική αλυσίδα, κρατώντας τις αλυσίδες σταθερά μαζί δίπλα-δίπλα διαμορφώνοντας μικροϊνίδια με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό. Αυτή η δύναμη είναι σημαντική στα κυτταρικά τοιχώματα, όπου τα μικροϊνίδια παγιδεύονται σε μια μήτρα υδατανθράκων (ημικυτταρίνη, λιγνίνη), παρέχοντας ακαμψία στα κύτταρα των φυτών.

Η κυτταρίνη σε αντίθεση με το άμυλο δεν έχει καμία διακλάδωση. Επίσης είναι ακόμη πιο κρυσταλλική σε σχέση με το άμυλο. Το άμυλο αν και μετατρέπεται από κρυσταλλικό σε άμορφο όταν θερμαίνεται στους 60-70 °C σε υδατικό περιβάλλον ,η κυτταρίνη απαιτεί θερμοκρασία 320 °C και πίεση 25 MPa για να γίνει άμορφη στο ίδιο μέσο.



Σχήμα 3: Απεικόνιση κυτταρίνης σε φύλλο

Διάφορες δομές της κυτταρίνης είναι γνωστές, ανάλογα με τη θέση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις αλυσίδες έχουμε διάφορες γνωστές δομές της κυτταρίνης. Η φυσική κυτταρίνη είναι η κυτταρίνη I, με δομές τις I_{α} και I_{β} . Η κυτταρίνη που παράγεται από βακτήρια και άλγη περιέχει κυρίως τον τύπο I_{α} ενώ η κυτταρίνη των ανώτερων φυτών αποτελείται κυρίως από I_{β} . Η κυτταρίνη στις αναγεννημένες ίνες κυτταρίνης είναι η κυτταρίνη II. Η μετατροπή της κυτταρίνης I στην κυτταρίνη II δεν είναι αντιστρεπτή, υποστηρίζοντας ότι η κυτταρίνη I είναι μετασταθής και η κυτταρίνη II είναι σταθερή. Τέλος με διάφορες χημικές επεξεργασίες έχουμε την κυτταρίνη III και την κυτταρίνη IV [10].



Σχήμα 4: Κυτταρίνη από τη ματιά ενός μικροσκοπίου

Πολλές ιδιότητες της κυτταρίνης εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας της ή το βαθμό πολυμερισμού της, δηλ. τον αριθμό των μονάδων γλυκόζης που συνιστούν ένα πολυμερές μόριο. Η κυτταρίνη από πολτό ξύλου έχει χαρακτηριστικά μήκη αλυσίδων μεταξύ 300 και 1700 μονάδων. Το βαμβάκι και άλλες ίνες φυτών όπως οι βακτηριακές κυτταρίνες έχουν μήκη αλυσίδων τα οποία κυμαίνονται από 800 ως 10.000 μονάδες. Τα μόρια με πολύ μικρό μήκος αλυσίδας τα οποία προέρχονται από την αποικοδόμηση της κυτταρίνης είναι γνωστά σαν κυτταρινοδεξτρίνες. Σε αντίθεση με την μακριάς αλυσίδας κυτταρίνη, οι κυτταρινοδεξτρίνες είναι διαλυτές στο νερό και σε κάποιους οργανικούς διαλύτες.

Η κυτταρίνη που προέρχεται από τα φυτά είναι συνήθως αναμεμιγμένη με ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη και άλλες ουσίες, ενώ η μικροβιακή κυτταρίνη είναι αρκετά πιο καθαρή, έχει πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό και αποτελείται από μακριές αλυσίδες.

Η κυτταρίνη είναι διαλυτή στο αιθυλενοδιαμίδιο του χαλκού (cupriethylenediamine), στο αιθυλενοδιαμίδιο του καδμίου (cadmiumethylenediamine), στο N-methylmorpholine N-oxide και στο lithium chloride/ dimethylformamide. Τα παραπάνω μέσα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εμπορικών παραγώγων κυτταρίνης.

Αποικοδόμηση

Κυτταρινόλυση είναι η διαδικασία αποικοδόμησης της κυτταρίνης σε μικρότερους πολυσακχαρίτες που λέγονται κυτταρινοδεξτρίνες ή εντελώς σε μονάδες γλυκόζης. Επειδή τα μόρια της κυτταρίνης συνδέονται ισχυρά το ένα με το άλλο, η κυτταρινόλυση είναι σχετικά δύσκολο να συγκριθεί με την αποικοδόμηση κάποιου άλλου πολυσακχαρίτη [15].

Τα θηλαστικά δεν έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομήσουν άμεσα την κυτταρίνη. Μερικά μηρυκαστικά όπως οι αγελάδες και τα πρόβατα περιέχουν ορισμένα συμβιωτικά αναερόβια βακτήρια (όπως τα cellulomonas) στη χλωρίδα του εντερικού τους

τοιχώματος, και αυτά τα βακτήρια παράγουν ένζυμα για να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη. Ομοίως, οι κατώτεροι τερμίτες περιέχουν πρωτόζωα που παράγουν τέτοια ένζυμα. Οι ανώτεροι τερμίτες χρησιμοποιούν βακτήρια για την ίδια δουλειά. Οι μύκητες, που στη φύση είναι αρμόδιοι για την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών, είναι επίσης ικανοί να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς στην κυτταρίνη είναι οι γλυκοζιτικές υδρολάσες (glycoside hydrolases) συμπεριλαμβανομένων των ενδο- και εξω- κυτταρινασών. Αυτά τα είδη των ενζύμων παράγονται και εκκρίνονται συνήθως συνδυαστικά, σαν μία ομάδα ενζύμων. Πολλές φορές τα εκκρίματα αυτά περιέχουν και κάποια δευτερεύοντα μόρια που βοηθούν τα ένζυμα να προσδεθούν στο μόριο της κυτταρίνης.

Η εμπορική χρήση της κυτταρίνης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ευκολία του μετασχηματισμού της σε παράγωγα κυτταρίνης και αυτό οφείλεται στις ομάδες των υδροξυλίων.

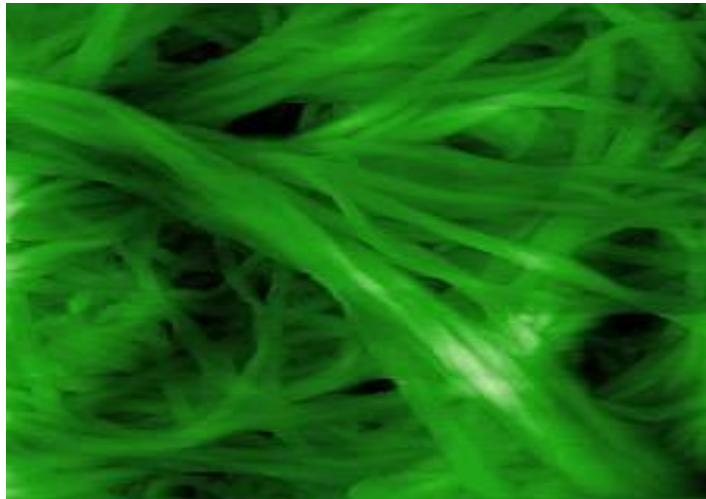
Παράγωγα

Οι ομάδες υδροξυλίου της κυτταρίνης μπορούν μερικώς ή πλήρως να αντιδράσουν με διάφορα αντιδραστήρια και να υποκατασταθούν από τις ανάλογες χημικές μονάδες. Τα νέα αυτά μόρια έχουν συνήθως καινούριες ιδιότητες. Οι εστέρες και οι αιθέρες κυτταρίνης είναι τα εμπορικά σημαντικότερα τέτοια υλικά.

Μεταξύ των εστέρων κυτταρίνης είναι η καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose)(CMC).

Άλλα παράγωγα είναι:

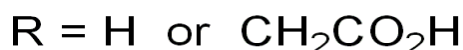
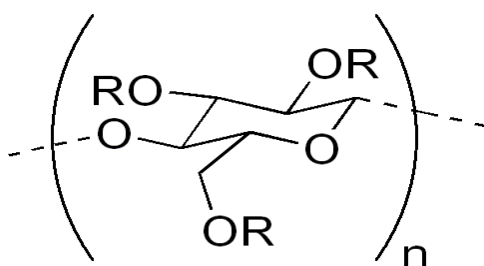
1. Η αιθυλοκυτταρίνη (Ethyl cellulose), ένα υδατοδιαλυτό εμπορικό θερμοπλαστικό που χρησιμοποιείται σε ρούχα, μελάνια, συνδετικά υλικά και δισκία φαρμάκων ελεγχόμενης αποικοδόμησης
2. Η μεθυλοκυτταρίνη (Methylcellulose)
3. Η υδροξυπροπυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl cellulose)
4. Η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose)
5. Η υδροξυπροπυλο μεθυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl methyl cellulose) που χρησιμοποιείται ως τροποποιητής ιξώδους, παράγοντας πήκτοποίησης, αφριστικός και συνδετικός παράγοντας.
6. Η υδροξυαιθυλο μεθυλο κυτταρίνη (Hydroxyethyl methyl cellulose), που χρησιμοποιείται στην παραγωγή λεπτών ταινιών κυτταρίνη.



Σχήμα5:Κυτταρίνη

Carboxymethyl Cellulose (CMC)

Η CMC είναι όπως αναφέρθηκε ένα παράγωγο της κυτταρίνης με καρβοξυμεθυλομάδες (-CH₂-COOH) προσδεδεμένες σε ορισμένες υδροξυλομάδες των μονομερών της, τα οποία αποτελούν το «σκελετό» της ένωσης (σχήμα 6).



Σχήμα 6: Μονομερές της CMC

Το βασικότερο χαρακτηριστικό της ένωσης, το οποίο ενδιαφέρει αυτή την εργασία, είναι η διαλυτότητά της στο νερό, σε αντίθεση με την καθαρή κυτταρίνη.

Η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη είναι ένα παράγωγο της κυτταρίνης που σχηματίζεται από την αντίδραση της με αλκάλια και χλωροοξικό οξύ. Διαφορετικές προεπεξεργασίες της CMC μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα διαφορετικούς μέσους βαθμούς υποκατάστασης οι οποίοι κυμαίνονται από 0.6 - 0.95. Τα μόρια της CMC έχουν μικρότερο μέσο μέγεθος σε σχέση με τα μόρια της φυσικής κυτταρίνης έχοντας περιοχές υψηλού και χαμηλού βαθμού υποκατάστασης.

Τα περισσότερα μόρια CMC διαλύονται γρήγορα σε κρύο νερό και χρησιμοποιούνται κυρίως για τον έλεγχο του ιξώδους χωρίς πηκτικά (CMC, σε τυπικές συγκεντρώσεις, ακόμα και στην παρουσία ιόντων ασβεστίου).

Η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη (CMC) δεν έχει καμία επιβλαβή επιπτώση στην ανθρώπινη υγεία και χρησιμοποιείται ως άκρως αποτελεσματική πρόσθετη ύλη για τη βελτίωση των προϊόντων και την επεξεργασία ιδιοτήτων σε διάφορα πεδία εφαρμογής, όπως στα τρόφιμα, καλλυντικά ή φαρμακευτικά προϊόντα και στα προϊόντα βιομηχανίας χάρτου και κλωστοϋφαντουργίας.

Η CMC χρησιμοποιείται στην επιστήμη τροφίμων ως ένα τροποποιητή ιξώδους, ως πυκνωτικό μέσο και ως σταθεροποιητή γαλακτωμάτων σε διάφορα προϊόντα όπως στα παγωτά. Ως πρόσθετο τρόφιμο έχει αριθμό E E466. Επίσης είναι ένα συστατικό πολλών προϊόντων όπως οδοντόκρεμες, καθαρτικά, χάπια για δίαιτα, απορρυπαντικά και διάφορα χαρτικά προϊόντα. Χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο επειδή έχει υψηλό ιξώδες, είναι μη τοξικό, και είναι μη αλλεργιογόνο. Η CMC χρησιμοποιείται ως λιπαντικό σε μη πτητικές οφθαλμικές σταγόνες (τεχνητά δάκρυα).

Χρησιμοποιείται επίσης στην πετρελαϊκή βιομηχανία ως συστατικό λάσπης γεώτρησης, όπου δρα ως τροποποιητής ιξώδους και το νερό παράγοντας διατήρησης. Πολύ-ανιονικών κυτταρίνη ή PAC προέρχεται από CMC και χρησιμοποιείται επίσης στην πράξη κοιτασμάτων πετρελαίου. Τέλος γίνεται χρήση CMC σε παγοθήκες για το σχηματισμό ευτηκτικού μείγματος με αποτέλεσμα χαμηλότερο σημείο ψύξης και επομένως περισσότερη ψύξη ισχύος από πάγο.

Η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη (CMC) είναι παράγωγο κυτταρίνης με καρβοξυμεθυλικές ομάδες να υποκαθιστούν ομάδες υδροξυλίων. Η ενζυμική εστεροποίηση της εγγενούς κυτταρίνης σε υδατικό διάλυμα ή σε διάλυμα με οργανικό διαλύτη έγινε με ελάχιστη επιτυχία. Οι λιπάσες έχουν μεγάλο ενδιαφέρον ως βιομηχανικοί βιοκαταλύτες επειδή είναι εμπορικά διαθέσιμες, έτοιμες να αναλάβουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων και μπορούν να καταλύσουν έναν αριθμό αντιδράσεων συμπεριλαμβάνοντας την υδρόλυση εστέρων και τη αντίστροφη διαδικασία, δηλαδή την σύνθεση εστέρα. Η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη (CMC), είναι υδατοδιαλυτή αλλά αδιάλυτη σε διάλυμα οργανικού διαλύτη.



Σχήμα7: καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη σε στερεή μορφή

2.Εστέρες κυτταρίνης και οι εφαρμογές τους

Όπως είδαμε η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές που απαντάται στη φύση πιο συχνά από οποιοδήποτε άλλο. Η απομόνωση και ο καθαρισμός της από τη βιομηχανία παραγωγής χαρτιού εμφανίζεται ως μία από τις μεγαλύτερες βιομηχανίες παγκοσμίως. Όμως μέχρι τώρα η κυτταρίνη δύσκολα χρησιμοποιείται ως χημική πρώτη ύλη, λόγω του μεγάλου αριθμού δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν μεταξύ των μορίων γλυκόζης με αποτέλεσμα να γίνεται δύσκολο το λιώσιμο ή η διάλυσή της [18]. Από την άλλη η διάσπαση των δεσμών υδρογόνου με θέρμανση απαιτεί θερμοκρασίες που ξεπερνούν τη θερμοκρασία αποικοδόμησης της [19].

Αυτή η δυσκολία χρήσης της κυτταρίνης σε χημικές διεργασίες μπορεί να αποφευχθεί με χημική μετατροπή της κατά τη διάρκεια ετερογενών διεργασιών προς την παραγωγή εστέρων και αιθέρων της κυτταρίνης. Και οι δύο αυτές κατηγορίες παραγώγων της κυτταρίνης παρουσιάζουν ιδιαίτερο εμπορικό ενδιαφέρον.

Ειδικότερα οι εστέρες της κυτταρίνης με λιπαρά οξέα θεωρούνται ως μια ενδιαφέρουσα κατηγορία θερμοπλαστικών. Οι λόγοι που τους κατατάσσουν σε αυτή τη θέση είναι ότι οι εστέρες αυτοί είναι δυνατόν να βιοαποικοδομηθούν και να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ινών, μεμβρανών, πλαστικών όπως επίσης βρίσκουν εφαρμογές και στην ιατρική ως επικαλυπτές φαρμάκων.

Με αντιδράσεις ετερογενών φάσεων (2 φάσεων) μπορούν να παραχθούν όλοι οι εμπορικοί εστέρες της κυτταρίνης. Η κυτταρίνη παραμένει αδιάλυτη, σε αιώρηση, με αποτέλεσμα να αντιδρά σταδιακά ξεκινώντας από τις άμορφες περιοχές και συνεχίζοντας στις πιο κρυσταλλικές. Οι διεργασίες αυτές όμως περιορίζονται στο σχηματισμό εστέρων με μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα, (τεσσάρων ανθράκων ή λιγότερα). Αντίθετα όταν η αλυσίδα του λιπαρού αποτελείται από έξι ή περισσότερους άνθρακες οι εστέρες της κυτταρίνης εμφανίζουν θερμοπλαστικές ιδιότητες. Με τη χρήση χλωριδίων οξέων και πυριδίνης είναι δυνατόν να παραχθούν τέτοιοι εστέρες με ετερογενή συστήματα αντιδράσεων.

Η τροποποίηση της κυτταρίνης σε συστήματα μιας φάσεως απαιτεί τη χρήση ενός διαλύτη στον οποίο τα υδροξύλια θα παραμένουν εύκολα προσπελάσιμα. Έτσι πρόσφατα χρησιμοποιήθηκαν συστήματα όπου διάλυμα κυτταρίνης σε N, N-διμεθυλο-ακεταμίδιο/χλωριούχου λιθίου μεταφέρεται σε πυριδίνη που περιέχει χλωρίδια λιπαρών οξέων και σε ατμόσφαιρα αζώτου είναι δυνατό να παραχθούν εστέρες της κυτταρίνης με μακριάς αλυσίδας λιπαρά οξέα, C₁₂ έως C₂₀.

Είναι φανερό ότι μια ενζυμική διεργασία παραγωγής εστέρων της κυτταρίνης θα εμφάνιζε ιδιαίτερα πλεονεκτήματα έναντι των μεθόδων κλασσικής χημείας, αφού τα προϊόντα θα προέρχονται από συστήματα με μη τοξικούς καταλύτες, τουλάχιστον. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η δυνατότητα ενζυμικής εστεροποίησης παραγωγού κυτταρίνης. Επίσης μελετήθηκαν παράγοντες, όπως η ταχύτητα ανάδευσης του συστήματος η θερμοκρασία ανάδευσης, ο λόγος των υποστρωμάτων, και η συγκέντρωση του ενζυμικού παρασκευάσματος στο σύστημα.

Εφαρμογές εστέρων κυτταρίνης

Οι εστέρες κυτταρίνης είναι σημαντικά εμπορικά πολυμερή για σχεδόν έναν αιώνα. Παρά τη μακρά ιστορία τους, γίνεται ουσιώδης έρευνα γύρω από νέους εστέρες κυτταρίνης, καινούργιους τρόπους για να αυξηθεί η απόδοσή τους, και δημιουργικούς τρόπους για να τους χρησιμοποιήσουμε σε εμπορικές εφαρμογές. Η κοινωνία συνεχώς αυξάνει τις προσδοκίες της ότι τα πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούμε θα βασίζονται σε ανανεώσιμες πηγές, θα είναι βιοδιασπώμενα και ανακυκλώσιμα [20],[21]. Σίγουρα οι επιδράσεις που έχουν στην υγεία τα πολυμερή υλικά έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, με την ενδοκρινή διάσπαση να αποτελεί μια σημαντική κοινωνική ανησυχία [22]. Η πιο προσεκτική έρευνα των πολυμερών υλικών του εμπορίου έχει αυξήσει σημαντικά το ενδιαφέρον στα μη τοξικά και ανανεώσιμο-βασισμένα υλικά όπως τους εστέρες κυτταρίνης. Ευτυχώς η εστεροποίηση της κυτταρίνης έχει πρόσβαση σ'ένα εύρος ιδιοτήτων το οποίο καθιστά τους εστέρες κυτταρίνης υλικά με μεγάλο εύρος εφαρμογών.

Στη συνέχεια θα αναφερθούν εκείνες οι περιοχές εφαρμογών των εστέρων κυτταρίνης στις οποίες υπάρχει πρόσφατη δραστηριότητα, τα τελευταία 20 χρόνια.

Σύγχρονες εφαρμογές επιστρωμάτων

Για την προστασία ή διακόσμηση σε βιομηχανικές και αρχιτεκτονικές εφαρμογές χρησιμοποιούνται υλικά όπως μέταλλο, πλαστικό, ξύλο, ρουχισμός, χαρτί και δέρμα. Τα παλαιότερα είδη επιστρωμάτων εφαρμόστηκαν σε υποστρώματα χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Οι οργανικοί και ανόργανοι εστέρες κυτταρίνης έχουν παίξει για καιρό σημαντικό ρόλο σε εφαρμογές επιστρωμάτων. Οι εστέρες κυτταρίνης που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές επιστρωμάτων περιλαμβάνουν την οξική κυτταρίνη (cellulose acetate), την οξική προπιονική κυτταρίνη (cellulose acetate propionate), την οξική βουτυρική κυτταρίνη (cellulose acetate butyrate), και η νιτροκυτταρίνη (nitrocellulose). Στο

συγκεκριμένο κομμάτι θα εστιάσουμε στους οργανικούς εστέρες κυτταρίνης [20].

Οι εστέρες κυτταρίνης έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο ως επικαλυπτικές ουσίες για πάνω από 50 χρόνια. Όταν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετες ουσίες, ρητίνες ή φιλμ, οι εστέρες κυτταρίνης παρέχουν ένα αριθμό πλεονεκτημάτων συμπεριλαμβάνοντας βελτιωμένη ροή και αξιοσημείωτη αντοχή [23],[24]. Διαφορετικές εφαρμογές επιστρωμάτων απαιτούν διαφορετικές ιδιότητες. Δομικά, φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά μπορούν να ελεγχθούν με χειρισμό της δομής των πολυμερών συμπεριλαμβάνοντας το βαθμό υποκατάστασης, την περιεκτικότητα σε υδροξύλιο και το μήκος της αλυσίδας. Η οξική βουτυρική κυτταρίνη είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο στη βιομηχανία επιστρωμάτων. Στην οξική βουτυρική κυτταρίνη αυξάνεται η περιεκτικότητα σε βουτυλο ομάδες, η ελαστικότητα, η διαλυτότητα, η ανεκτικότητα σε υδρογονάνθρακα και η συμβατότητα, ενώ η χημική αντίσταση και η σκληρότητα μειώνονται. Καθώς το μοριακό βάρος του εστέρα αυξάνεται, η συμβατότητα και η διαλυτότητα μειώνονται, η ανθεκτικότητα και το σημείο τήξης αυξάνονται, και η σκληρότητα και η πυκνότητα μένουν ανεπηρέαστες. Επίσης η συμβατότητα, η διαλυτότητα, και το μέγιστο μη πτητικό περιεχόμενο μειώνονται καθώς το μοριακό βάρος του εστέρα αυξάνεται. Η αντίσταση σε υγρασία και η σκληρότητα, μειώνονται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε υδροξύλιο. Επιπλέον η ανοχή των διαλυμάτων οξικής βουτυρικής κυτταρίνης σε προστιθέμενο νερό ή αιθανόλη, η σκληρότητα και η δραστηριότητα με ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια αυξάνονται με την περιεκτικότητα σε υδροξύλιο [24].

Από τα μέσα της δεκαετίας του '60 οι διεθνείς κανονισμοί ανάγκασαν τη βιομηχανία επιστρωμάτων να αναπτύξει νέα τεχνολογία για να μειώσει το ποσοστό των πτητικών οργανικών ενώσεων που ελευθερώθηκαν κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των επιστρωμάτων [20].

Η οξική βουτυρική κυτταρίνη παρέχει αρκετά οφέλη στις βιομηχανίες μεταλλικών επιστρωμάτων και συγκεκριμένα στη βιομηχανία αυτοκινήτων. Η μεταλλική εμφάνιση αρκετών

αυτοκινήτων επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας επιστρώματα τα οποία περιέχουν προσανατολισμένες μεταλλικές νιφάδες.

Ελεγχόμενη αποδέσμευση φαρμάκων

Η ταχεία ανάπτυξη της υποβοηθούμενης και ελεγχόμενης τεχνολογίας αποδέσμευσης φαρμάκων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δεκαετιών έχει οδηγηθεί από το στόχο να υπάρξει ασφάλεια αλλά και να αποσπάσουμε αποτελεσματικά το μέγιστο όφελος από τις δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές εφαρμογές.

Οι εστέρες κυτταρίνης έχουν δεχτεί περισσότερη προσοχή από τη βιομηχανία φαρμάκων, και σ' αυτό το τμήμα θα έπρεπε να εστιάσουμε στη χρήση εστέρων κυτταρίνης για να βοηθήσουμε ή να ελέγξουμε την απελευθέρωση ενεργών φαρμάκων, αλλά θα έπρεπε να κατανοηθεί ότι οι αγροτικές εφαρμογές ή οι εφαρμογές ελέγχου παρασίτων μπορούν επίσης να ωφεληθούν από τις ίδιες αρχές.

Αρκετές αποτελεσματικές φαρμακευτικές ενέργειες είναι εμπορικά διαθέσιμες για τη θεραπεία των περισσότερων ανθρώπινων ασθενειών.

3. Ένζυμα και μηχανισμοί

Βασικές αρχές ενζυμολογίας

Τα ένζυμα αποτελούν μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών και είναι βασικά συστατικά των ζωντανών κυττάρων. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα είναι δύο :

1. Είναι βιοκαταλύτες , δηλαδή είναι τα βιομόρια τα οποία καταλύουν τις διάφορες βιολογικές αντιδράσεις
2. Παρουσιάζουν εξειδικευμένη καταλυτική δράση

Οι συγκεκριμένοι βιοκαταλύτες επιταχύνουν τις αντίστοιχες χημικές δράσεις 10^8 - 10^{20} φορές, χωρίς να λαμβάνουν μέρος στη στοιχειομετρία της αντίδρασης. Έχουν μεγάλη καταλυτική δύναμη η οποία ξεπερνά αυτή των συμβατικών χημικών καταλυτών.

Οι πρωτεΐνες (άρα και τα ένζυμα) αποτελούν βιοπολυμερή των οποίων τα μονομερή είναι τα αμινοξέα. Ένα αμινοξύ περιέχει δυο χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες, τη βασική αμινομάδα ($-NH_2$) και την όξινη καρβοξυλομάδα ($-COOH$). Τα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι είκοσι (20). Και τα είκοσι είναι α-αμινοξέα, δηλαδή η αμινομάδα είναι υποκαταστάτης του α-άνθρακα ως προς το καρβονύλιο. Ένα τέτοιο αμινοξύ έχει την ακόλουθη δομή.

Προφανώς το μοναδικό τμήμα που δεν παραμένει σταθερό αλλά μεταβάλλεται από το ένα αμινοξύ στο άλλο, είναι η πλευρική αλυσίδα. Αν εξαιρέσουμε τη περίπτωση όπου η πλευρική αλυσίδα είναι το υδρογόνο (γλυκίνη), τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα παρουσιάζουν οπτική ενεργότητα, απαντούν δηλαδή με δύο εναντιομερείς μορφές. Όμως στις βιολογικές δράσεις συμμετέχει μόνο ο ένας αντίποδας, ο L.

Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες έχουν πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και σε ορισμένες περιπτώσεις και τεταρτοταγή δομή. Για να διατηρούν την καταλυτική τους δράση θα πρέπει να έχουν την ανάλογη τριτοταγή δομή τους (με την προϋπόθεση ότι φυσικά

διατηρούν και τις κατώτερης τάξης δομές). Θα πρέπει δηλαδή να έχουν την κατάλληλη τριδιάστατη διαμόρφωση στο χώρο. Αυτή η υπεύθυνη για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης δομή, οφείλεται στους ακόλουθους παράγοντες:

- Στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των ουδέτερων R groups. Λόγω αυτών των απώσεων, τα R groups πάνε προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης μακριά από το νερό.
- Στις υδρόφιλες φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες (π.χ. $-CH_2OH$) που προσανατολίζονται προς το εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης, προς το νερό.
- Στις ομάδες NH_3^+ και COO^- που μπορεί να βρίσκονται στο εσωτερικό ή εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης και σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμό άλατος.

Η βιολογική δράση μίας πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τη δευτεροταγή, την τριτοταγή και τη τεταρτοταγή δομή της. Οι δομές αυτές, όπως είδαμε, οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς άλατος, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κ.α.. Έκθεση της πρωτεΐνης σε υψηλές θερμοκρασίες ($> 50\text{ }^\circ\text{C}$), σε ευρείες μεταβολές του pH, σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (π.χ. αλκοόλη), σε μηχανική επεξεργασία και σε άλλους παρεμφερείς παράγοντες, προκαλεί αλλοίωση στις αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τις ανώτερες βαθμίδες δομής των πρωτεϊνών.

Έτσι αυτές χάνουν τη δραστηριότητά τους. Το φαινόμενο αυτό καλείται μετουσίωση (denaturation) [25].

Σε μία αντίδραση η οποία καταλύεται από ένα ένζυμο, τα αντιδρώντα αναφέρονται ως υπόστρωμα (substrate). Το ένζυμο λοιπόν, συνδέεται με το υπόστρωμα και δημιουργείται το ενεργοποιημένο σύμπλοκο (enzyme-substrate complex). Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα μία σειρά χημικών μεταβολών στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο και τελικά προκύπτει το προϊόν και απελευθερώνεται το ένζυμο ανέπαφο [26].



Όπου E: ένζυμο
S: υπόστρωμα
ES: ενεργοποιημένο σύμπλοκο
P: προϊόν

Σημείωση: Τα ένζυμα, ως καταλύτες, δεν εμφανίζονται στα προϊόντα της αντίδρασης που καταλύουν, αλλά αναγεννώνται και συνεχίζουν τη καταλυτική τους δράση με τα επόμενα υποστρώματα.

Δεδομένου του μεγαλύτερου μεγέθους του ενζύμου (MB= 12000-40000) από το αντίστοιχο υπόστρωμα, το τελευταίο προσδένεται σε μία συγκεκριμένη θέση του ενζύμου η οποία καλείται ' ενεργός θέση ' (active site). Οι ομάδες της ενεργού θέσεως με τις οποίες συνδέεται το υπόστρωμα για να σχηματιστεί το ενεργοποιημένο σύμπλοκο, λέγονται 'προσδένουσες ομάδες' (binding groups).

Επίσης, στην ενεργό θέση του ενζύμου υπάρχουν και κάποιες ομάδες οι οποίες λαμβάνουν συμμετοχή στη σχάση και το σχηματισμό χημικών δεσμών, μετά τη πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτές οι ομάδες καλούνται 'καταλυτικές' (catalytic groups) [25].

Το σημείο κλειδί στην εξήγηση της καταλυτικής δράσης των ενζύμων είναι το εξής. Καθώς το υπόστρωμα συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι καταλυτικές ομάδες επιφέρουν τέτοια χημική μεταβολή στο υπόστρωμα, ώστε η μετατροπή του σε προϊόν να διεξάγεται μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού από αυτόν που θα ακολουθούσαν απουσία του βιοκαταλύτη. Ο νέος αυτός μηχανισμός συνδυάζεται με την ελάττωση των ενεργειακών απαιτήσεων του συστήματος. Δηλαδή μειώνεται η ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτό οφείλεται είτε στην ανακατανομή της εσωτερικής ενέργειας (internal energy) των αντιδρώντων μορίων, είτε στην διάσπαση ή ιοντοποίηση μορίων, ιόντων και ριζών, από

την επίδραση των καταλυτικών ομάδων του ενζύμου (catalytic groups). Έτσι, στις ενζυμικές αντιδράσεις τα προϊόντα δημιουργούνται μετά από έναν αριθμό επιμέρους αντιδράσεων που όλες τους έχουν μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης από την αρχική. Όπως και να έχει, η αντίδραση ακολουθεί πλέον ένα νέο μηχανισμό. Διεξάγεται δηλαδή μέσω ενός καινούριου δρόμου αντίδρασης.

Τέλος θα αναφέρουμε λίγα λόγια για τη κατηγοριοποίηση των ενζύμων. Η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (IUBMB) έχει αναγνωρίσει σχεδόν 4000 ένζυμα και τα έχει κατηγοριοποιήσει αναλόγως [27]. Τα ένζυμα, ανάλογα με το είδος των αντιδράσεων που καταλύουν, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- 1) οξειδοαναγωγάσες ή οξειδοοδουκτάσες (καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής)
- 2) τρανσφεράσες (καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς μιας ομάδας από ένα υπόστρωμα σ'ένα άλλο)
- 3) υδρολάσες (καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης)
- 4) λυάσες (καταλύουν αντιδράσεις αποβολής ενός μικρού μορίου από κάποιο υπόστρωμα)
- 5) ισομεράσες (καταλύουν αντιδράσεις ισομερείωσης)
- 6) λιγάσες ή συνθετάσες (καταλύουν αντιδράσεις σύνδεσης μορίων)

Κάθε μία από αυτές τις έξι κατηγορίες υποδιαιρείται σε επιμέρους ομάδες και αυτές με τη σειρά τους σε άλλες υποομάδες.

Δομικά χαρακτηριστικά και μηχανισμός δράσης των λιπασών

Τα ένζυμα ανήκουν σε μια σημαντική κατηγορία βιομορίων που καταλύουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών οι οποίες είναι σημαντικότερες για τη ζωή. Τα ένζυμα μπορούν να καταλύουν τη σύνθεση, την αποικοδόμηση ή την τροποποίηση υποστρωμάτων. Παρόλο που τα ένζυμα μπορούν να έχουν ένα ευρύ φάσμα πιθανών υποστρωμάτων συνήθως εξειδικεύονται σε ένα συγκεκριμένο τύπο μορίων. Αυτή η εξειδίκευση είναι και το σημαντικότερο χαρακτηριστικό των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι λιπάσες ανήκουν στην κατηγορία των υδρολυτικών ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση τριγλυκεριδίων.

Δομή των λιπασών

Λόγω της ικανότητας των λιπασών να αποικοδομούν αδιάλυτα υποστρώματα θα μπορούσε να αναμένεται ότι η μοριακή τους διάταξη θα εμφάνιζε κάποιες ιδιαιτερότητες. Όμως η πρωτοταγής δομή των λιπασών δεν παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με τη φυσικοχημική κατάσταση των υποστρωμάτων τους. Στην πραγματικότητα, η συνολική αλληλουχία των λιπασών παρουσιάζει μικρή ομολογία. Ένα από τα γνωστά κοινά χαρακτηριστικά είναι η αλληλουχία GxSxG (Gly/Ala-X-Ser-X-Gly-).

Παρόλη τη μικρή ομολογία της αλληλουχίας των διαφόρων λιπασών, μπορούμε να κατατάξουμε τις λιπάσες σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με την αλληλουχία τους. Η οικογένεια των λιπασών από θηλαστικά (mammalian lipase gene family) αποτελείται από τρεις τύπους λιπασών, τις λιποπρωτεϊνικές λιπάσες (LPL), τις ηπατικές λιπάσες (HL) και τις παγκρεατικές (PL). Οι μικροβιακές λιπάσες ομαδοποιούνται σε τέσσερις οικογένειες: της *Candida cylindracea*, του *Pseudomonas*, του *Staphylococcus* και του *Mucor* [28].

Η δομή των λιπασών αποτελείται από παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που συνδέονται με α-έλικες. Αυτή η διαμόρφωση

συναντάται επίσης και στην εστεράση (acetylcholine), στην καρβοξυπεπτιδάση II, στην υδρολάση της δι-ενολακτόνης και στη δι-εχαλογενάση και είναι γνωστή με το όνομα διαμόρφωση α/β-υδρολάσης. Σε όλα αυτά τα ένζυμα ο καταλυτικός μηχανισμός είναι συγκρίσιμος με αυτόν της σερίνης-πρωτεάσης, η οποία αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα και μια οξυανική οπή. Η καταλυτική τριάδα της σερίνης-πρωτεάσης αποτελείται από μια πυρηνόφιλη σερίνη, μια ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό οξύ, ενώ η οξυανική τρύπα συνήθως συνίσταται από δύο αμίδια.

Η δομική και μηχανιστική διατήρηση της διαμόρφωσης α/β-υδρολάσης είναι αυστηρή, δεδομένου ότι η αλληλουχία αυτών των πρωτεϊνών ποικίλει. Επίσης η ταυτότητα, αλλά όχι η λειτουργία, των δύο αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας μπορεί να αλλάξει και να παραμείνει μόνο η ιστιδίνη. Όμως η εμφάνιση των μελών της καταλυτικής τριάδας στην αλληλουχία διατηρείται όπως: N-τελικό → πυρηνόφιλο → οξύ → ιστιδίνη. Το πυρηνόφιλο μπορεί να είναι μια σερίνη ή μια κυστεΐνη, ή ένα ασπαρτικό οξύ, ενώ το οξύ συνήθως είναι το ασπαρτικό και σπανιότερα το γλουταμινικό. Επίσης η διαμόρφωση του βρόχου, που περιλαμβάνει τα καταλυτικά αμινοξέα, διατηρείται σταθερή [29].

Το πεπτιδικό κάλυμμα και η ενεργοποίηση διεπιφάνειας

Πεπτιδικό κάλυμμα (lid), ονομάζεται η διαμόρφωση κατά την οποία το καταλυτικό κέντρο των λιπασών δεν εκτίθεται στο διαλύτη αλλά βρίσκεται κρυμμένο κάτω από ένα ευκίνητο επιφανειακό βρόγχο. Αποτελείται από 6 έως 30 αμινοξέα τα οποία σχηματίζουν τουλάχιστον μια α-έλικα. Έχει προταθεί ότι το δέσιμο μιας λιπάσης με μια υδρόφοβη διεπιφάνεια πραγματοποιείται με τη μετακίνηση του πεπτιδικού καλύμματος και την εμφάνιση του ενεργού κέντρου με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου [30]. Αυτό όμως δεν είναι απόλυτο.

Αναφορικά με το αν ανοίγει ή όχι το πεπτιδικό κάλυμμα υπάρχουν δύο κατηγορίες λιπασών: αυτές με το προσχηματισμένο ενεργό κέντρο και αυτές που το ενεργό κέντρο σχηματίζεται κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης του ενζύμου (όπως η RML). Σε αυτή την

περίπτωση η ενεργοποίηση της λιπάσης δεν πραγματοποιείται μόνο με την μετακίνηση του καλύμματος αλλά και της σερίνης 82, η οποία δεν είναι μέρος της καταλυτικής τριάδας ή του καλύμματος.

Μόνο όταν η RML βρίσκεται στη ενεργοποιημένη (ανοικτή) διαμόρφωση το υδροξύλιο και η κύρια νιτρική αλυσίδα της σερίνης 82 βρίσκονται στη σωστή θέση για να αντιδράσουν με την οξυανική τρύπα και να συνεχιστεί η κατάλυση. Ανάλογες αλλαγές στη διαμόρφωση παρουσιάζονται και στην παγκρεατική λιπάση. Σε αυτή 9 αμινοξέα δημιουργούν ένα βρόγχο και δημιουργούν την οξυανική τρύπα.

Εκτός από την επαφή του ενζύμου με τη διεπιφάνεια νερού-λιπαρού και άλλοι παράγοντες είναι δυνατό να συμμετέχουν στη σταθεροποίηση της ανοικτής διαμόρφωσης των λιπασών. Έτσι η ανοικτή διαμόρφωση της παγκρεατικής λιπάσης σταθεροποιείται με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης – συν-λιπάση (co-lipase) – η οποία αντιδρά με το C-τελικό κομμάτι της λιπάσης και το πεπτιδικό κάλυμμα [31]. Επίσης στη λιπάση από *Rhizomucor miehei* σχηματίζεται μια ιοντική ‘γέφυρα’ μεταξύ του ασπαρτικού οξέος του καλύμματος και μιας αργινίνης, η οποία φαίνεται να σταθεροποιεί την ανοικτή διαμόρφωση [32].

Το πεπτιδικό κάλυμμα στη διαμόρφωση ορισμένων λιπασών δεν είναι κλειστό απουσία υποστρώματος ή παρεμποδιστή [33]. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ένα μοντέλο το οποίο θεωρεί ότι η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ της ανοικτής και της κλειστής διαμόρφωσης είναι σημαντικά μικρή με αποτέλεσμα να διατηρείται ένα ποσοστό της λιπάσης στην ανοικτή διαμόρφωση σε υδατικά διαλύματα [34]. Επίσης έχει προταθεί ότι η ανοικτή και η κλειστή διαμόρφωση των περισσότερων λιπασών βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία [35]. Όταν μια λιπάση, η οποία βρίσκεται στην ανοικτή διαμόρφωση, δένεται στη διεπιφάνεια, η διαμόρφωση της σταθεροποιείται και το ένζυμο είναι ενεργοποιημένο. Έτσι, ίσως θα ήταν πιο σωστό να μιλάμε για διεπιφανειακή σταθεροποίηση παρά για διεπιφανειακή ενεργοποίηση.

Το χρονικό διάστημα που η λιπάση διατηρείται στην ανοικτή διαμόρφωση, απουσία κατάλληλου υποστρώματος, ποικίλει ανάλογα με τη λιπάση και εξαρτάται από το μέγεθος της αλυσίδας του πεπτιδικού καλύμματος.

Αυτό το μοντέλο της σταθεροποίησης του καλύμματος, σε αντίθεση με το άνοιγμα του παρουσία διεπιφάνειας, ίσως εξηγεί και την απουσία διεπιφανειακής ενεργοποίησης που παρουσιάζουν ορισμένες λιπάσες οι οποίες έχουν πεπτιδικό κάλυμμα [36]. Έτσι η εκτεθειμένη υδρόφοβη περιοχή των λιπασών μπορεί να λειτουργεί και ως πυρήνας συσσωμάτωσης των λιπιδίων, ταυτόχρονα με το δέσιμο που προσφέρει στο ένζυμο με τη λιπαρή επιφάνεια. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλίζεται μια σχετικά μεγάλη υδρόφοβη περιοχή για την παραμονή διαφόρων μονομερών των λιπιδίων και το ένζυμο βρίσκεται για αρκετό χρόνο στην ανοικτή διαμόρφωση. Έτσι μια λιπάση μπορεί να δημιουργήσει τη δική της διεπιφάνεια σε περιπτώσεις που η συγκέντρωση του λιπιδίου είναι μικρότερη από το όριο διαλυτότητας.

Ο καταλυτικός μηχανισμός των λιπασών

Ο καταλυτικός μηχανισμός που έχει προταθεί για τις λιπάσες και τις εστεράσες επικεντρώνεται στη σερίνη του καταλυτικού κέντρου.

Το πρώτο στάδιο, αυτό της ακετυλίωσης, ξεκινά με την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο και οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου Michaelis-Menten. Η σερίνη του ενεργού κέντρου είναι τοποθετημένη κατάλληλα για τη ηλεκτρονιόφιλη προσβολή στον άνθρακα του καρβονυλίου του εστέρα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της πρώτης τετραεδρικής ενδιάμεσης κατάστασης. Η ιστιδίνη του ενεργού κέντρου βοηθά την ηλεκτρονιόφιλη προσβολή ενεργώντας ως δέκτης του πρωτονίου από τη σερίνη. Το τρίτο αμινοξύ του ενεργού κέντρου, το ασπαρτικό (ή γλουταμινικό) οξύ, σταθεροποιεί τη θετικά φορτισμένη ιστιδίνη με δεσμούς υδρογόνου. Το αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο του καρβονυλίου σταθεροποιείται από την οξυανική τρύπα, η οποία συνήθως

αποτελείται από άτομα αζώτου δύο ή τριών κύριων αλυσίδων. Στη συνέχεια το ενδιάμεσο σύμπλεγμα σπάει σχηματίζεται το ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο με την απομάκρυνση της αλκοόλης, η οποία δρα ως δέκτης πρωτονίου από την ιστιδίνη. Κατά το δεύτερο στάδιο το ακυλο-ένζυμο υδρολύεται από ένα μόριο νερού. Σε αυτό το στάδιο η ίδια καταλυτική τριάδα (σερίνη, ιστιδίνη και ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ) παίρνει μέρος με την ίδια δράση αλλά με αντίστροφη σειρά. Το ηλεκτρονιόφιλο οξυγόνο της σερίνης σχηματίζει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο με το τριγλυκερίδιο και ο εστερικός δεσμός του τελευταίου υδρολύεται και ένα τριγλυκερίδιο ελευθερώνεται. Τότε η ακυλιωμένη σερίνη αντιδρά με ένα μόριο νερού, το ακυλιωμένο ένζυμο διαχωρίζεται και το λιπαρό οξύ αποσπάται. Το στάδιο αυτό της καταλυτικής διαδικασίας, όπου το προϊόν ελευθερώνεται από το ενεργό κέντρο, είναι ιδιαίτερης σημασίας, αφού αν το λιπαρό οξύ είναι ισχυρά δεμένο με το ενεργό κέντρο θα παρεμποδίσει τη δράση του ενζύμου.

Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα

Τα τελευταία χρόνια η εμπλοκή της βιοκατάλυσης στην οργανική σύνθεση είναι αρκετά έντονη και ειδικά σε συνάρτηση με τις κλασικές συμβατικές χημικές μεθόδους. Τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή χημο-, τοπο- και εναντιοεκλεκτικότητα, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς καταλύτες για τη φαρμακευτική βιομηχανία όπου υπάρχει ανάγκη για τη παρασκευή καθαρών χειρόμορφων ενώσεων. Τα προϊόντα που παράγονται ενζυμικά, θεωρούνται φυσικά.

Ακόμα, οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως κάτω από ήπιες συνθήκες, όπως θερμοκρασίες περίπου στους 30°C, και pH ουδέτερο ή σχεδόν ουδέτερο.

Επίσης οι βιοκαταλυτικές εφαρμογές είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Είναι λιγότερο επικίνδυνες λόγω αποφυγής της χρήσης τοξικών ουσιών ή επιβλαβών μετάλλων, δεν ρυπαίνουν το περιβάλλον και είναι ενεργειακά συμφέρουσες συγκρινόμενες με τις παραδοσιακές χημικές τεχνικές.

Όλοι αυτοί οι λόγοι συνηγορούν υπέρ της χρήσης της ενζυμικής κατάλυσης που εδραιώνεται στον τομέα της οργανικής σύνθεσης, όπου και μας ενδιαφέρει. Μάλιστα στην περίπτωση αυτή συνήθως ενδείκνυται η χρήση των λεγόμενων μη συμβατικών μέσων (non-conventional media).

Το φυσικό περιβάλλον των ενζύμων είναι τα ζωντανά κύτταρα. Μικροβιακά, φυτικά και ζωικά. Ο λόγος που καθιστά τα ένζυμα ικανά να λειτουργούν σε υδατικά μέσα είναι γιατί στο εσωτερικό των κυττάρων η ουσία που υπάρχει σε σχετική αφθονία ή αλλιώς το περιβάλλον είναι το νερό (κυτταρόπλασμα). Δεν μας εκπλήσσει το γεγονός ότι σε βιολογικό-βιοτεχνολογικό επίπεδο χρησιμοποιούνται ένζυμα *in vitro* για να καταλύσουν αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε υδατικό περιβάλλον. Όμως τη τελευταία εικοσαετία -και ειδικά τα τελευταία χρόνια- διάφορα ένζυμα έχουν φανεί να λειτουργούν και σε συστήματα μη υδατικά, τα λεγόμενα μη συμβατικά συστήματα. Σε αυτά τα συστήματα η περιεκτικότητά τους σε νερό είναι μειωμένη σε σχέση με τα "συμβατικά" [42].

Τα μέσα τα οποία καλούνται μη συμβατικά είναι εκείνα τα οποία κυρίως περιέχουν οργανικά συστατικά (διαλύτες, υποστρώματα, προϊόντα...), υπερκρίσιμα ρευστά, ιοντικά υγρά ή και κάποιο αέριο μέσο αντίδρασης [43],[44].

Τα μη συμβατικά μέσα χρησιμοποιούνται για αρκετούς λόγους. Τα περισσότερα ένζυμα μπορούν να καταλύσουν μία αντίδραση και προς τις δυο κατευθύνσεις. Είναι καταλύτες και ως τέτοιοι δεν ελέγχουν προς ποια πλευρά θα γίνει μια αντίδραση. Αυτό ελέγχεται από τις συνθήκες του αντιδρώντος συστήματος και από τη θέση της χημικής ισορροπίας. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ένζυμα στα μη συμβατικά περιβάλλοντα που εξετάζουμε είναι οι υδρολάσες. Στο νερό καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης, αλλά παρουσία οργανικού διαλύτη για παράδειγμα, η χημική ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της σύνθεσης [44]. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι οι συνθήκες είναι εκείνες που μετατόπιζουν την ισορροπία της αντίδρασης και

‘επιβάλλουν’ τη σύνθεση. Το ένζυμο απλά ‘υπακούει’ και εφόσον μπορεί, καταλύει αντιδράσεις σύνθεσης.

Ακόμα υπάρχουν και κάποιοι άλλοι λόγοι για τους οποίους γίνεται ελκιστική η χρήση των ενζύμων εκτός νερού πέρα από το ότι δίνουν νέες αντιδράσεις (σύνθεση αντί υδρόλυση). Τα περισσότερα αντιδρώντα των αντιδράσεων οργανικής σύνθεσης που ενδιαφέρουν τους χημικούς μηχανικούς στις διάφορες παραγωγικές διαδικασίες, είναι αδιάλυτα στο νερό. Το νερό ευνοεί συχνά και κάποιες παράπλευρες αντιδράσεις οι οποίες είναι ανεπιθύμητες. Εξαιτίας του υψηλού σημείου ζέσεως του νερού (100 °C σε 1 atm) η ανάκτηση των προϊόντων είναι δύσκολη, με υψηλό κόστος και πιθανόν καταστροφική για τα προϊόντα αν αυτά είναι ευπαθή [42].

Το βασικό ερώτημα στην ενζυμική κατάλυση σε οργανικά μέσα είναι το γιατί τα ένζυμα παραμένουν ενεργά. Αρχικά αυτή η θέση φαίνεται άτοπη καθώς οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις στις οποίες στηρίζεται η τριτοταγής δομή των ενζύμων, απουσιάζουν. Όμως αυτό τελικά δεν έχει σαν αποτέλεσμα τη μετουσίωση τους. Πράγματι το οργανικό περιβάλλον έχει τη τάση να τους προκαλεί μετουσίωση με το ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των ενζύμων, αλλά για να γίνει αυτό θα πρέπει το ένζυμο να παρουσιάζει και υψηλή ευκαμψία (flexibility). Αυτή η ευκαμψία υφίσταται παρουσία μεγάλης ποσότητας νερού, το οποίο δρα ως μοριακός λιπαντής. Έτσι σε οργανικούς διαλύτες τα μόρια των ενζύμων είναι πολύ άκαμπτα [42]. Μάλιστα όσο περισσότερο μη πολικός είναι ο διαλύτης τόσο πιο δραστικά είναι τα ένζυμα. Αντίθετα αν ο διαλύτης είναι αρκετά πολικός, τότε τα ένζυμα καθίστανται πρακτικά ανενεργά. Αυτό συμβαίνει γιατί το πολικό μόριο του διαλύτη μπορεί να δεσμεύσει μόρια νερού, προσδεδεμένα επιλεκτικά σε ειδικές θέσεις του ενζύμου και να το απογυμνώσει από αυτά [45]. Τα προσδεδεμένα αυτά μόρια νερού ή αλλιώς το “bound water” όπως αναφέρεται είναι μόρια νερού ισχυρά συνδεδεμένα με συγκεκριμένες θέσεις επάνω στην επιφάνεια του ενζύμου. Αυτή η μικροποσότητα νερού είναι καθοριστική για τη μορφή και τη δραστικότητα του ενζύμου. Το ένζυμο λοιπόν, αρκεί

να είναι συνδεδεμένο με την απαιτούμενη μικροποσότητα νερού και να έχει την απαραίτητη ακαμψία ώστε να παραμένει ενεργό στο φαινομενικά 'εχθρικό' περιβάλλον του οργανικού διαλύτη. Από τα μη συμβατικά συστήματα αυτά με τα οποία θα ασχοληθούμε είναι εκείνα που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες.

Οργανικοί διαλύτες

Τα μέσα βιοκατάλυσης που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες και που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι μίγματα νερού και υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη, διφασικά συστήματα αποτελούμενα από νερό και οργανικό διαλύτη μη αναμίξιμο με αυτό, αντίστροφα μικκύλια και μικρογαλακτώματα ή και σχεδόν άνυδροι οργανικοί διαλύτες [46].

Στα διφασικά μίγματα, το ένζυμο και τα υδρόφιλα συστατικά βρίσκονται στην υδατική φάση όπου και γίνεται η αντίδραση (πολλές φορές γίνεται στη διεπιφάνεια των φάσεων ή κοντά σε αυτή). Αναλόγως τα υδρόφοβα συστατικά κατανέμονται στην οργανική φάση.

Στα αντίστροφα μικκύλια το ένζυμο εγκλωβίζεται στο εσωτερικό τους όπου το περιβάλλον είναι υδατικό. Τα υδρόφοβα συστατικά βρίσκονται και πάλι στο οργανικό μέρος, γύρω από τα μικκύλια. Η αντίδραση γίνεται στην επιφάνεια των τελευταίων.

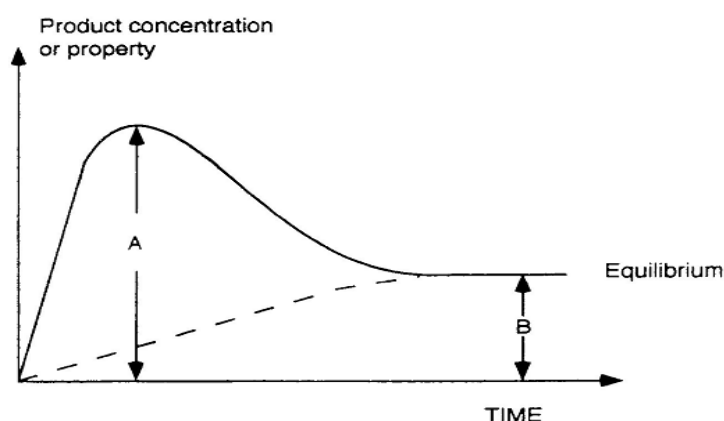
Στα συστήματα με τους άνυδρους οργανικούς διαλύτες, το λυοφιλιωμένο ένζυμο βρίσκεται ως εναιώρημα σε αυτούς και μόνο μικροποσότητες νερού (<5% v/v) είναι παρούσες, για να διατηρηθεί η δράση του βιοκαταλύτη [46].

Κλείνοντας είναι σκόπιμο να αναφέρουμε λίγα λόγια σχετικά με τη θερμοδυναμική και κινητική προσέγγιση μίας αντίδρασης σε τέτοια συστήματα. Καταρχήν, από τη στιγμή που έχουμε μία συγκεκριμένη αντίδραση, δηλαδή συγκεκριμένα αντιδρώντα και προϊόντα, η θερμοδυναμική θα καθορίσει το αν η αντίδραση αυτή είναι εφικτή ή όχι. Αυτό ποσοτικά ελέγχεται από τη τιμή της

μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG της αντίδρασης. Αν είναι αρνητική η δράση είναι αυθόρμητη και μπορεί να πραγματοποιηθεί [48]. Αν όμως είναι θετική τότε η αντίδραση δεν είναι αυθόρμητη και δεν μπορεί να γίνει, ούτε με τη παρουσία καταλύτη. Ο τελευταίος δύναται να επηρεάσει μόνο την κινητική της αντίδρασης εφόσον αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί. Στη συνέχεια και εφόσον η αντίδραση είναι πραγματοποιήσιμη, η φύση των αντιδρώντων και των προϊόντων, η θερμοκρασία, η πίεση, το pH αν υπάρχει νερό, η ύπαρξη άλλων ουσιών και γενικότερα οι συνθήκες που περιγράφουν το σύστημα, καθορίζουν και επηρεάζουν τη κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας της δράσης. Δηλαδή με αυτά τα δεδομένα μπορούμε να υπολογίσουμε το τι θα συμβεί όταν η αντίδραση έρθει σε ισορροπία. Κάτι που θεωρητικά γίνεται σε άπειρο χρόνο. Αυτή είναι η θερμοδυναμική θεώρηση και είναι χαρακτηριστικό το ότι δεν εμπλέκονται καθόλου τα ένζυμα.

Πράγματι αν στις προηγούμενες παραμέτρους προσθέσουμε και τον βιοκαταλύτη, τότε αντιμετωπίζουμε και τη κινητική πλευρά της αντίδρασης [44]. Ο (βιο)καταλύτης απλά επιταχύνει την εξέλιξη των πραγμάτων που θα συνέβαιναν ούτως ή άλλως.

Τα παραπάνω γίνονται περισσότερο αντιληπτά στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα 8: Η συγκέντρωση του προϊόντος μιας ενζυμικής δράσης, σε συνάρτηση με το χρόνο.

A: κινητικός έλεγχος της αντίδρασης

B: θερμοδυναμικός έλεγχος

Λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα

Ενώ σε υδατικό περιβάλλον η υδρόλυση των εστερικών δεσμών πραγματοποιείται με υψηλές αποδόσεις, σε μη υδατικά μέσα λαμβάνει χώρα η αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή η εστεροποίηση. Το έντονο ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τις λιπάσες επικεντρώνεται σε αυτή τη συνθετική τους ικανότητα σε συνδυασμό πάντοτε με το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που είναι δυνατό να αναγνωρίσουν ως υποστρώματα και την εκλεκτικότητα τους. Έτσι οι λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα είναι δυνατό να συνθέσουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που ενδιαφέρουν τη φαρμακοβιομηχανία και άλλες βιομηχανίες που παράγουν προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Οι αντιδράσεις που μπορούν να καταλυθούν από λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα παρουσιάζονται στο. Το πρώτο στάδιο, σε όλες αυτές τις αντιδράσεις, είναι ο σχηματισμός του ακυλο-ενζύμου ενδιάμεσου με τον ακυλο-δότη. Στις περιπτώσεις της υδρόλυσης και της μετεστεροποίησης (transesterification) ο δότης είναι ένας εστέρας και στην περίπτωση της εστεροποίησης ο δότης είναι ένα καρβοξυλικό οξύ.

Στο δεύτερο στάδιο το ενδιάμεσο αντιδρά με τον ακυλο-δέκτη, ο οποίος για την αντίδραση της υδρόλυσης είναι νερό και μία αλκοόλη για τις αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης. Είναι φανερό ότι η παρουσία του ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσου είναι απαραίτητο για την πορεία της αντίδρασης. Δηλαδή, κάθε ακυλο-δότης που ταιριάζει στο ενεργό κέντρο και μπορεί να σχηματίσει το ενδιάμεσο με τη λιπάση μπορεί να τροποποιηθεί από το ένζυμο. Οι λιπάσες είναι δυνατό να σχηματίσουν τέτοιου είδους ενδιάμεσα όχι μόνο με λιπαρά οξέα και εστέρες, αλλά και με θειοεστέρες και ενεργοποιημένες αμίνες. Μόλις το ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο σχηματιστεί μπορεί να αντιδράσει με κάθε ακυλο-δέκτη, όπως νερό, αλκοόλες, πρωτοταγείς αμίνες και αμμωνία με την προϋπόθεση βέβαια ότι ο δέκτης είναι ικανός να φτάσει την ακυλο-ομάδα.

Γ.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΥΛΙΚΑ

Ένζυμα:

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα εξής:

- *lipase Candida Cylindracea*, εταιρείας Fluka, ειδικής ενεργότητας 4.2 U/mg.
- *Lipase from Aspergillus niger*, εταιρείας Fluka, ειδικής ενεργότητας 3.5 U/mg.

Υποστρώματα:

- CMC Sodium chloride Natriunchlorid, εταιρείας Fluka με καθαρότητα >99.5%



Σχήμα 9: Παράγωγα κυτταρίνης που υπάρχουν στο εμπόριο

Λιπαρά:

- Vinyl-propionate με καθαρότητα 98% της εταιρείας Aldrich
- Vinyl-palmitate με καθαρότητα 95% της εταιρείας Aldrich
- Vinyl-laurate με καθαρότητα >99.0%(GC) της εταιρείας Fluka

Οργανικοί Διαλύτες:

- Μεθανόλη (CH₃OH), εταιρείας Fisher Scientific με καθαρότητα 100%
- Εξανόλη (C₆H₁₄O), εταιρείας Merck-Schuchardt με καθαρότητα >98%
- Αιθανόλη (C₂H₅OH), εταιρείας Applichem με καθαρότητα 70%

Λοιπά αντιδραστήρια:

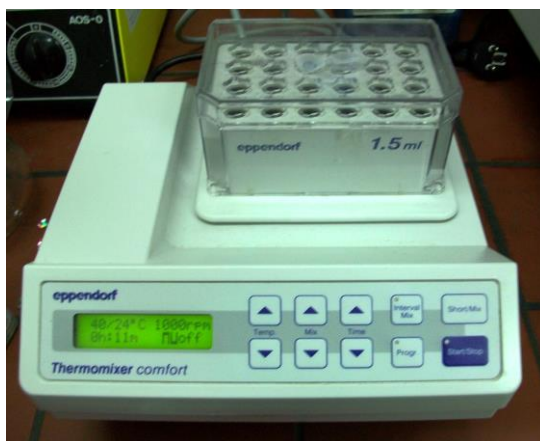
Για την Παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (citrate/phosphate) χρησιμοποιήθηκαν:

- απιονισμένο νερό
- citric acid 1-hydrate extra pure, εταιρείας Riedel-de Haen με καθαρότητα 99.5%
- sodium phosphate dibasic, εταιρείας Riedel-de Haen με καθαρότητα 98.5%

2.ΟΡΓΑΝΑ:

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

1. Επωαστήρας με ανάδευση (orbital incubator), ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-1000rpm)
2. Φασματόμετρο υπερύθρου (FT-IR)
3. Φούρνος ξήρανσης
4. Πρέσα για παστίλιες
5. pH-μετρο
6. Αναλυτικός ζυγός
7. Φυγόκεντρος



Σχήμα 10: thermomixer



Σχήμα 11: FT-IR

3.ΜΕΘΟΔΟΙ

Για όλες τις αντιδράσεις πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

- Για τη δημιουργία του Buffer κανουμε τα εξής: αρχικά ζυγίζουμε 1.05 gr citric acid και 1.42 gr sodium phosphate. Σε 2 ποτήρια ζέσεως τοποθετούμε ξεχωριστά τις ποσότητες που ζυγίσαμε και προσθέτουμε από 100 ml αντίστοιχα.
- Αναδεύουμε καλά μέχρι να ομογενοποιηθούν τα διαλύματα.
- Σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως προσθέτω αρκετή ποσότητα από το διάλυμα citrate και στάγδην προσθέτουμε διάλυμα phosphate και με την χρήση ενός pH-μετρου πετυχαίνουμε να έχει το διάλυμά τιμή pH ίση με 7.
- Ζυγίζουμε 0.6 gr CMC κυτταρίνη.
- Σε ποτήρι ζέσεως βάζουμε 20 ml από το Buffer.
- Σε συνεχή ανάδευση ρίχνουμε πολύ αργά τα 0.6 gr της κυτταρίνης μέσα στο ποτήρι με τα 20 ml του Buffer. Αυτό είναι το stock solution.

Πείραμα1

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα2

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.7 ml εξανόλη και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 0.7 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.7 ml εξανόλη και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 0.7 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.7 ml αιθανόλη και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 0.7 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα3

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα4

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα5

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα6

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα7

Στις παρακάτω αντιδράσεις αλλάζουμε την τιμή του pH στο Buffer:

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution στο οποίο το Buffer έχει pH με τιμή 5. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution στο οποίο το Buffer έχει pH με τιμή 6. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution στο οποίο το Buffer έχει pH με τιμή 7.5. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα8

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα9

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.1 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.2 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.4 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *lipase Candida Cylindracea* και 1 ml από το

stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.

- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα10

Στις παρακάτω αντιδράσεις η ποσότητα κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε είναι 0.3 gr CMC στο stock solution.

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα11

Στις παρακάτω αντιδράσεις η ποσότητα κυτταρίνης που χρησιμοποιήθηκε είναι 0.7 gr CMC στο stock solution.

- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Σε erpendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το erpendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα12

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 50°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Πείραμα13

- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-laurate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-propionate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Σε errendorf τοποθετούμε 0.3 ml vinyl-palmitate και 20 U από το ένζυμο *A.niger* και 1 ml από το stock solution. Στεγανοποιούμε το errendorf με ταινία parafilm.
- Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 30°C με ανάδευση στα 1000rpm.

Καθαρισμοί

- Το περιεχόμενο από τα errendorf το μεταφέρουμε σε falcon και προσθέτουμε 5 ml αιθανόλης. Σε περίπτωση που παραμένει οτιδήποτε στα errendorf ξεπλένουμε με αιθανόλη.
- Αναδεύουμε τα falcon σε μηχανήμα vortex.
- Τα τοποθετούμε σε φυγόκεντρο για 15 λεπτά σε maximum στροφές.

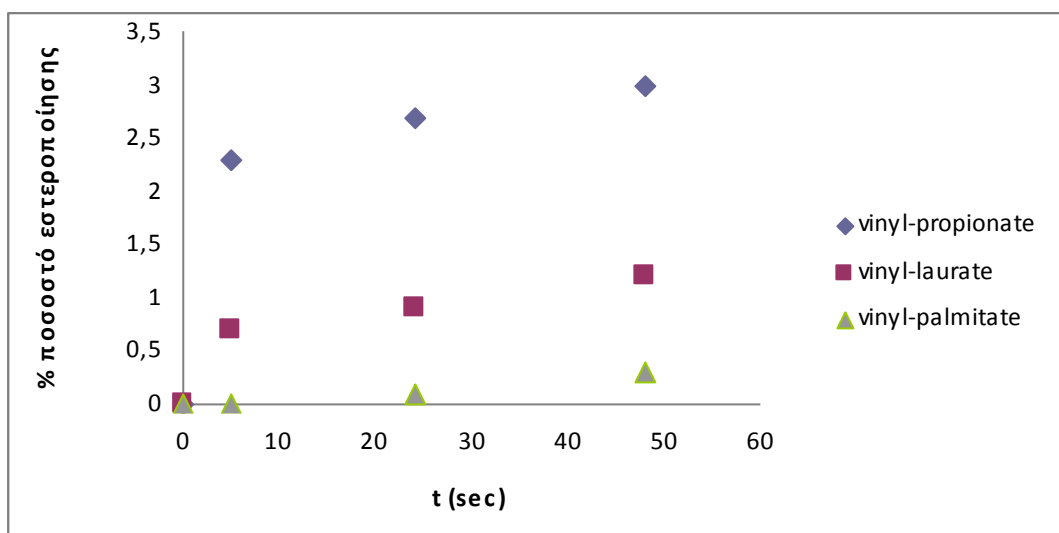
- Από το διαχωρισμό που έχει γίνει με απλή απόχυση απομακρύνουμε την υγρή φάση.
- Προσθέτουμε 2 ml μεθανόλης σε κάθε falcon.
- Αναδεύουμε τα falcon σε μηχανήμα vortex.
- Τα τοποθετούμε σε φυγόκεντρο για 10 λεπτά σε maximum στροφές.
- Από το διαχωρισμό που έχει γίνει με απλή απόχυση απομακρύνουμε την υγρή φάση.
- Επαναλαμβάνουμε την ίδια διαδικασία με τα 2 ml μεθανόλης για μια ακόμη φορά.
- Τοποθετούμε και αφήνουμε τα falcon μέσα σε φούρνο για ένα 24ωρο περίπου.

Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με FT-IR

- Αφού ολοκληρωθεί η ξήρανση, τα στερεά δείγματα αναμιγνύονται με KBr (10mg δείγματος + 100mg KBr).
- Γίνεται κονιορτοποίηση και μορφοποίηση σε παστίλιες με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας.
- Η κάθε παστίλια τοποθετείται στον ειδικό δειγματοφορέα του FT-IR (φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier).
- Τις νέες εστερομάδες που δημιουργούνται μπορούμε να τις παρατηρήσουμε από την οθόνη του υπολογιστή ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φασματόμετρο.

Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πείραμα1



Διάγραμμα1: Πορεία αντίδρασης CMC με vinyl-propionate, vinyl-laurate, vinyl-palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας1: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος1

Λιπαρό Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
Vinyl-propionate	3
Vinyl –laurate	1.2
Vinyl-palmitate	0.3

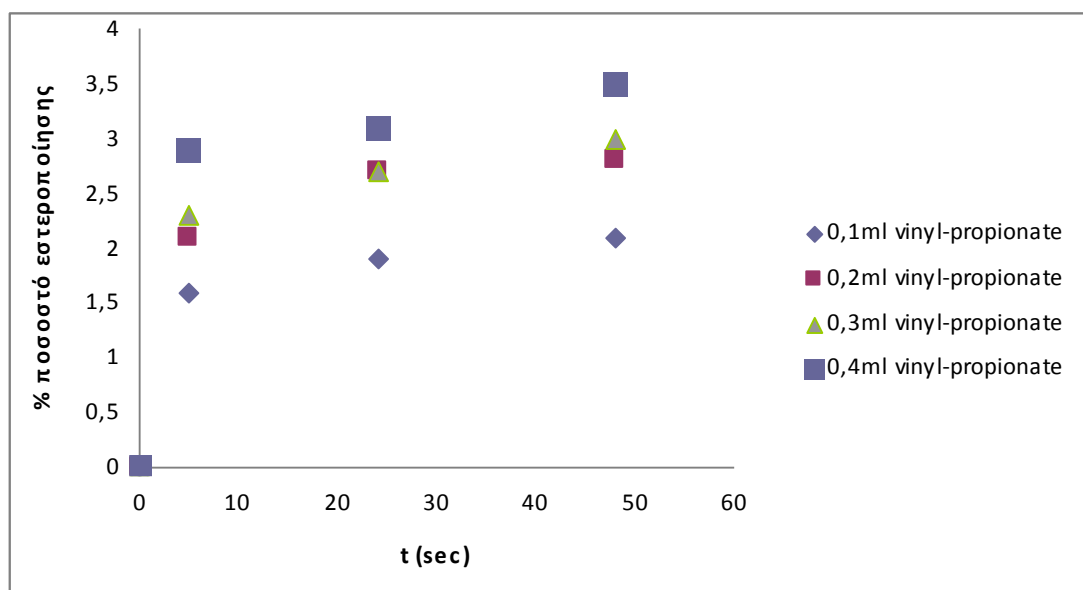
Πείραμα2

Στο πείραμα 2 οι αντίδρασεις CMC με 1-Hexanol, Ethanol absolute και με βιοκαταλύτη το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm δεν είχαν ως αποτέλεσμα καμία εστεροποίηση.

Πίνακας2: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος2

Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
1-Hexanol	–
Ethanol absolute	–

Πείραμα3

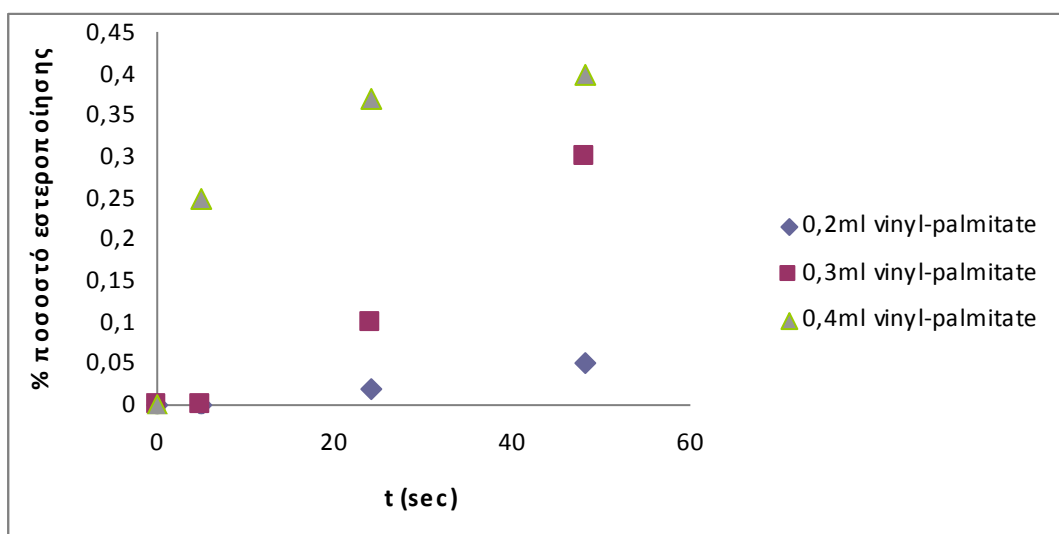


Διάγραμμα2: Πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-propionate, 0.2ml vinyl-propionate, 0.3ml vinyl-propionate, 0.4 vinyl-propionate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας3: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος3

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση(%εστεροποίηση)
0.1ml vinyl-propionate	2.1
0.2ml vinyl-propionate	2.8
0.3ml vinyl-propionate	3
0.4ml vinyl-propionate	3.5

Πείραμα4

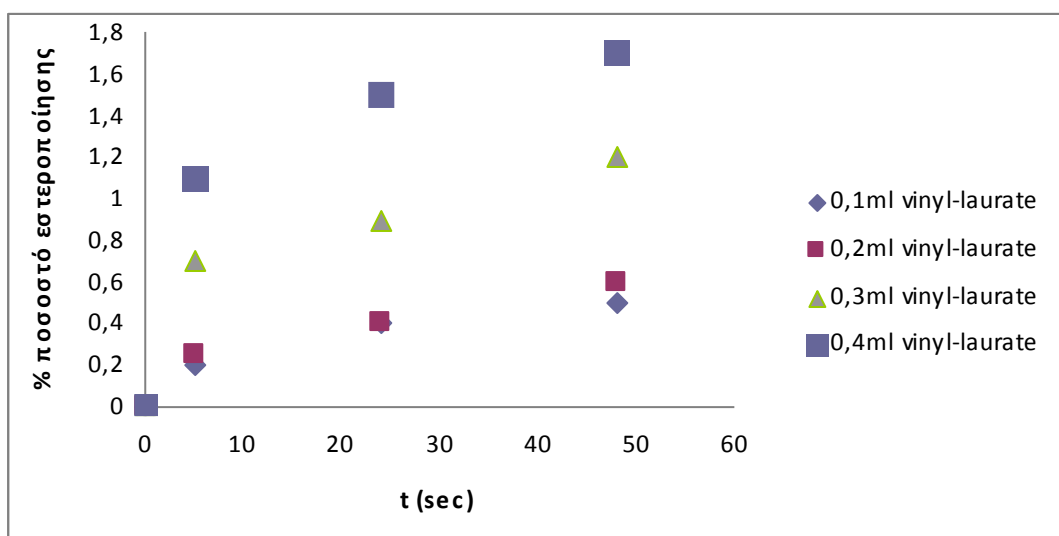


Διάγραμμα3: Πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-palmitate, 0.2ml vinyl- palmitate, 0.3ml vinyl- palmitate, 0.4 vinyl- palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας4: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος4

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
0.1ml vinyl- palmitate	–
0.2ml vinyl- palmitate	0.05
0.3ml vinyl- palmitate	0.3
0.4ml vinyl- palmitate	0.4

Πείραμα5

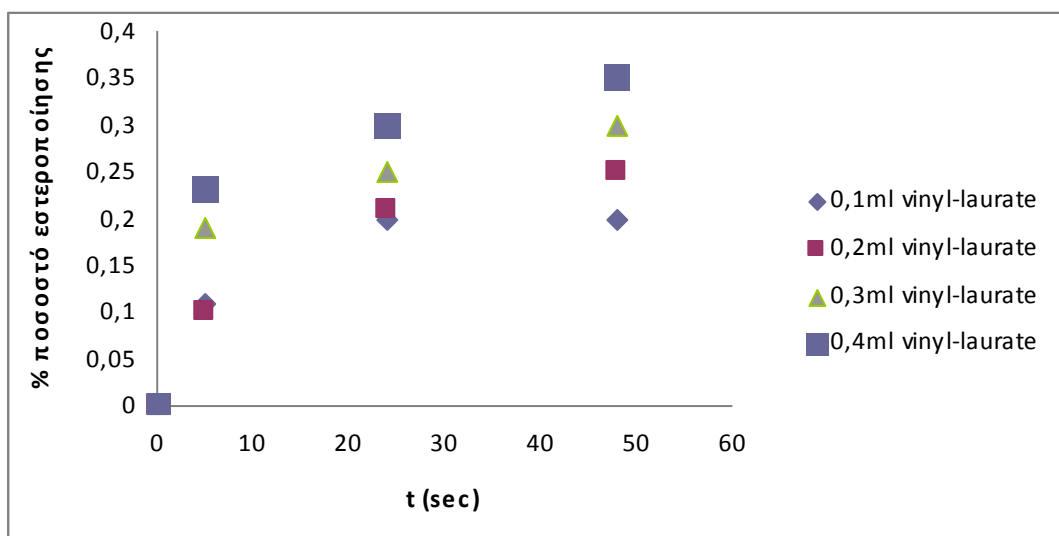


Διάγραμμα4: Πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-laurate, 0.2ml vinyl-laurate, 0.3ml vinyl-laurate, 0.4 vinyl-laurate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας5: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος5

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
0.1ml vinyl-laurate	0.5
0.2ml vinyl-laurate	0.6
0.3ml vinyl-laurate	1.2
0.4ml vinyl-laurate	1.7

Πείραμα6

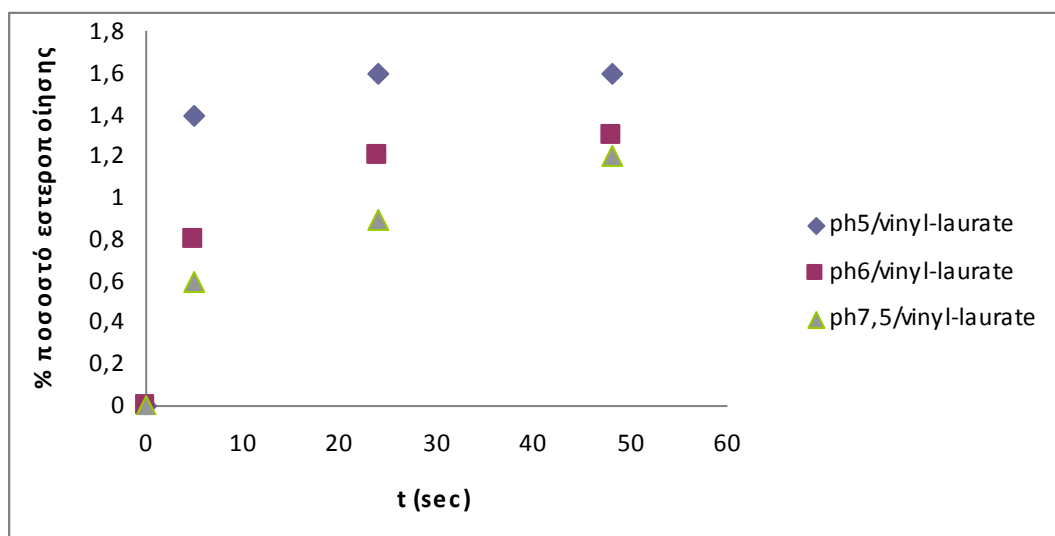


Διάγραμμα5: Πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-laurate, 0.2ml vinyl-laurate, 0.3ml vinyl-laurate, 0.4 vinyl-laurate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *lipase Candida Cylindracea*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας6: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος6

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
0.1ml vinyl-laurate	0.2
0.2ml vinyl-laurate	0.25
0.3ml vinyl-laurate	0.3
0.4ml vinyl-laurate	0.35

Πείραμα7

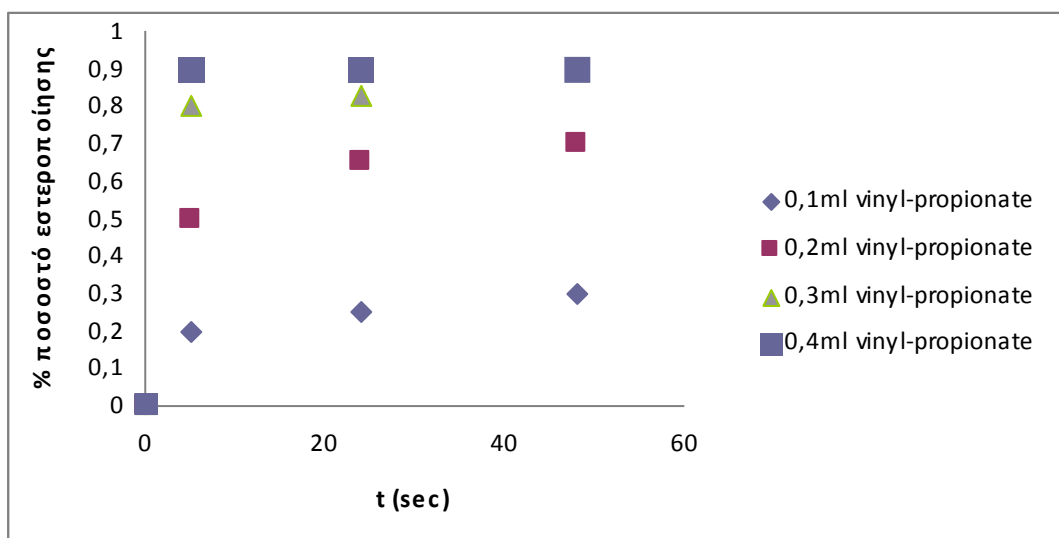


Διάγραμμα6: Πορεία αντίδρασης CMC με vinyl-laurate σε pH5, vinyl-laurate σε pH6, vinyl-laurate σε pH7.5. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας7: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος7

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
pH5 vinyl-laurate	1.6
pH6 vinyl-laurate	1.3
pH7.5 vinyl-laurate	1.2

Πείραμα8



Διάγραμμα7: Πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-propionate, 0.2ml vinyl-propionate, 0.3ml vinyl-propionate, 0.4 vinyl-propionate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *lipase Candida Cylindracea*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας8: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος8

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
0.1ml vinyl-propionate	0.3
0.2ml vinyl-propionate	0.7
0.3ml vinyl-propionate	0.9
0.4ml vinyl-propionate	0.9

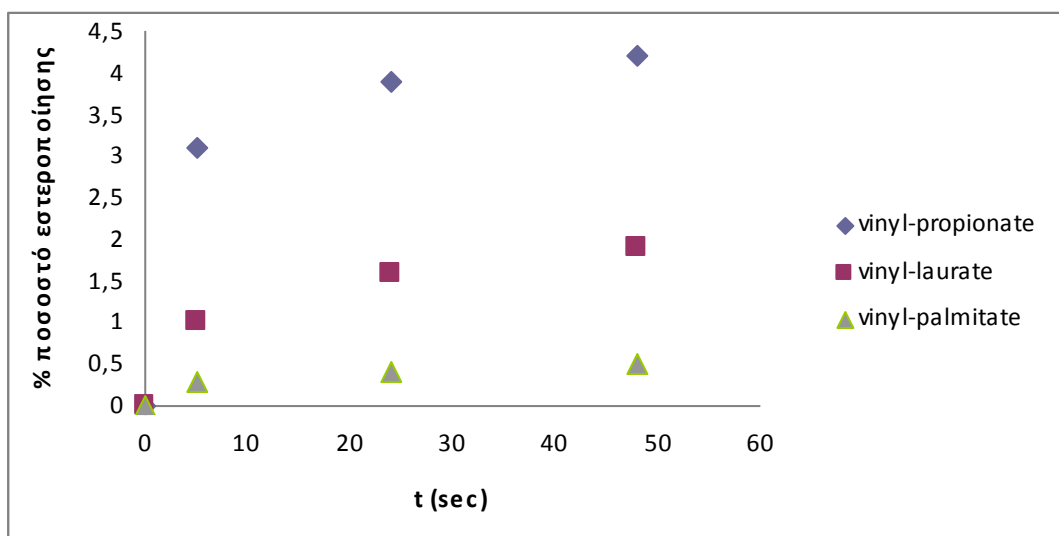
Πείραμα9

Στο πείραμα 9 η πορεία αντίδρασης CMC με 0.1ml vinyl-palmitate, 0.2ml vinyl-palmitate, 0.3ml vinyl-palmitate, 0.4 vinyl-palmitate και με βιοκαταλύτη το ένζυμο λιπάση *lipase Candida Cylindracea*, T=40°C, 1000rpm δεν έδωσε αποτελέσματα εστεροποίησης.

Πίνακας9: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος9

Ποσότητα λιπαρού υποστρώματος	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
0.1ml vinyl-palmitate	–
0.2ml vinyl-palmitate	–
0.3ml vinyl-palmitate	–
0.4ml vinyl-palmitate	–

Πείραμα10

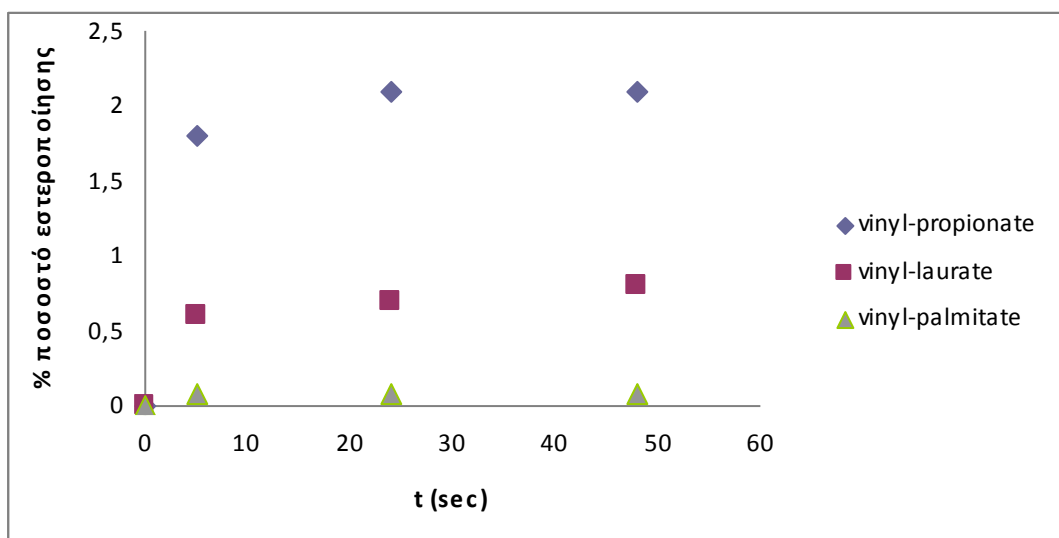


Διάγραμμα8: Πορεία αντίδρασης με 0.3gr CMC με vinyl-propionate, vinyl-laurate, vinyl- palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας10: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος10

Λιπαρό Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
Vinyl-propionate	4.2
Vinyl –laurate	1.9
Vinyl- palmitate	0.5

Πείραμα11

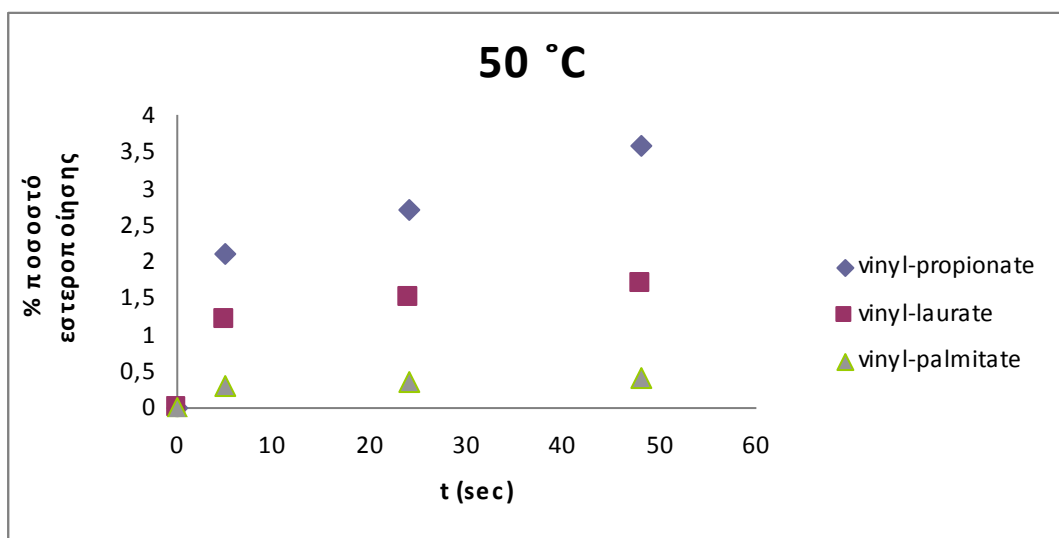


Διάγραμμα9: Πορεία αντίδρασης με 0.7gr CMC με vinyl-propionate, vinyl-laurate, vinyl- palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=40°C, 1000rpm.

Πίνακας11: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος11

Λιπαρό Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (%εστεροποίηση)
Vinyl-propionate	2.1
Vinyl –laurate	0.8
Vinyl- palmitate	0.08

Πείραμα12

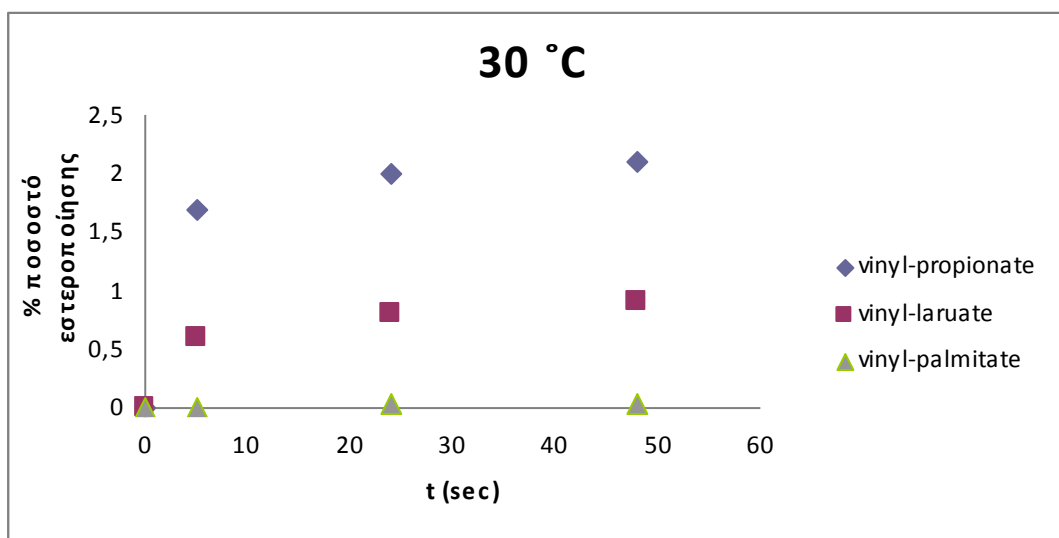


Διάγραμμα10: Πορεία αντίδρασης με CMC με vinyl-propionate, vinyl-laurate, vinyl- palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=50°C, 1000rpm.

Πίνακας12: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος12

Λιπαρό Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
Vinyl-propionate	3.6
Vinyl –laurate	1.7
Vinyl- palmitate	0.4

Πείραμα13

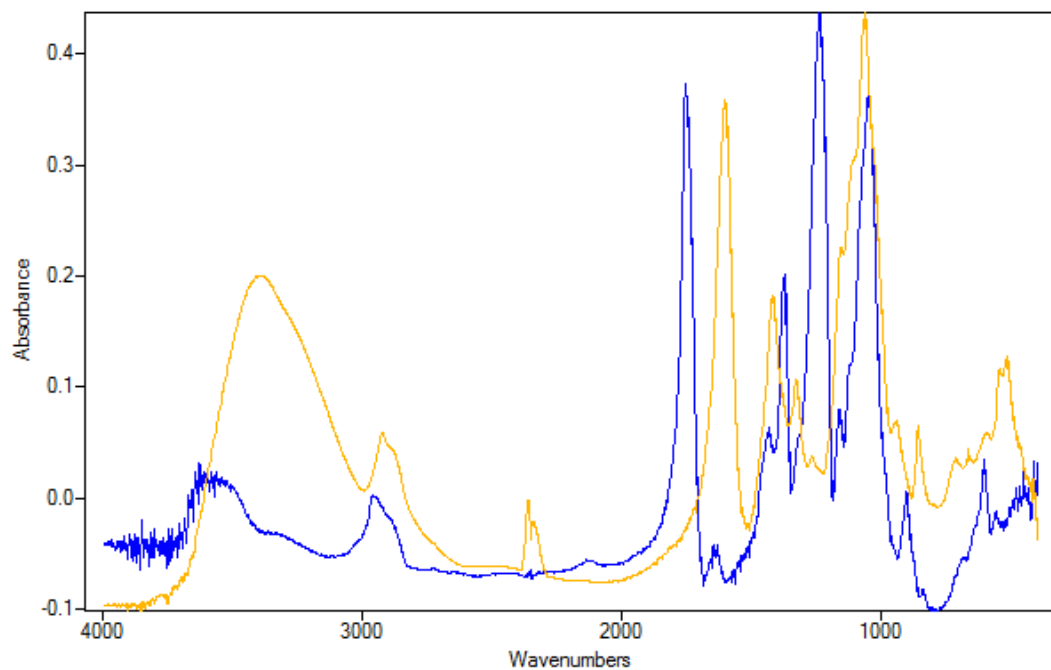


Διάγραμμα11: Πορεία αντίδρασης με CMC με vinyl-propionate, vinyl-laurate, vinyl- palmitate. Ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιείται το ένζυμο λιπάση *A.niger*, T=30°C, 1000rpm.

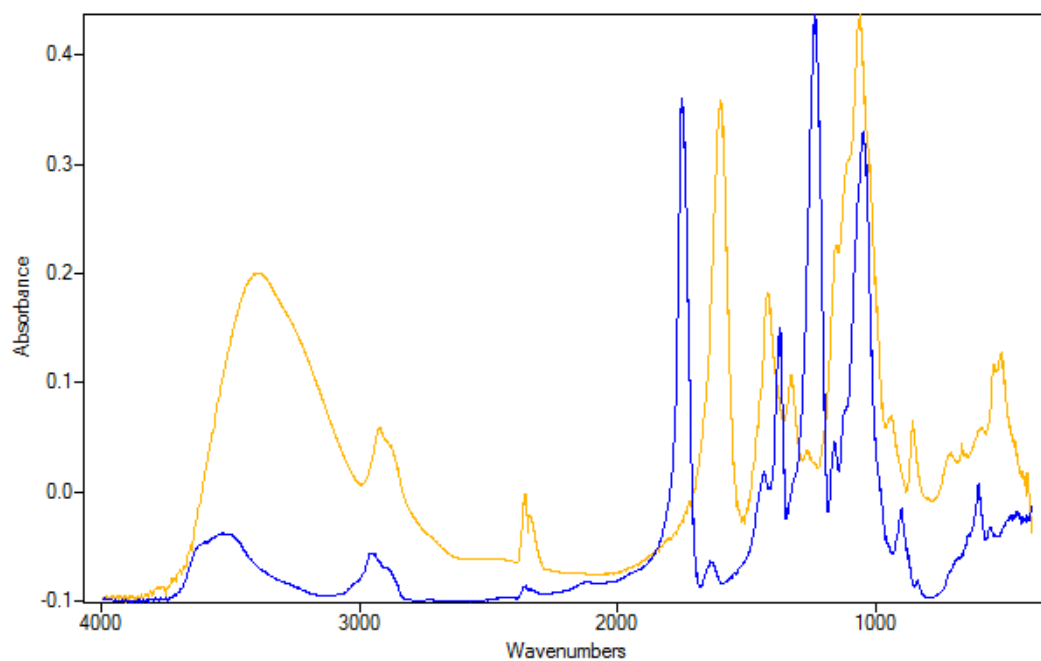
Πίνακας13: Τελική απόδοση αντιδράσεων πειράματος13

Λιπαρό Υπόστρωμα	Τελική απόδοση (% εστεροποίηση)
Vinyl-propionate	2.1
Vinyl – laurate	0.9
Vinyl- palmitate	0.03

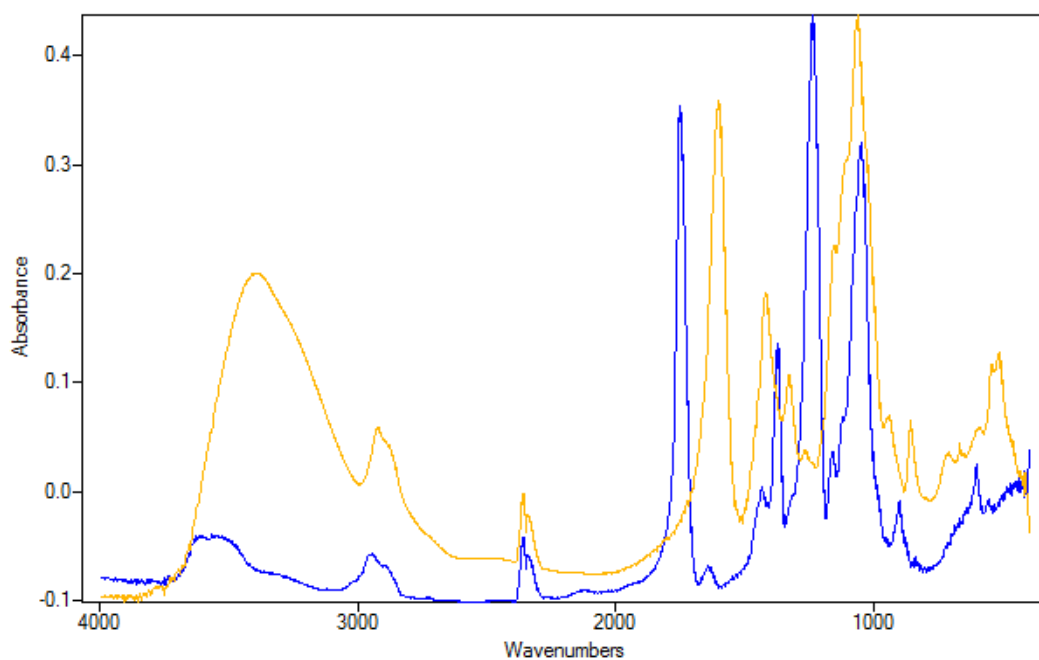
Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων έγινε με FT-IR. Η ταυτοποίηση του εκάστοτε σχηματιζόμενου εστέρα γίνεται με έλεγχο του αντίστοιχου φάσματος του FT-IR στη περιοχή κυματαριθμών από 1700cm^{-1} έως 1800cm^{-1} . Στη συνέχεια ακολουθούν τρία αντιπροσωπευτικά φάσματα στα οποία φαίνεται ο σχηματιζόμενος εστέρας επί της καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης.



Σχήμα 12: φάσμα FT-IR εστεροποιημένης καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης με vinyl-propionate. Ο εστέρας εμφανίζεται σε κυματαριθμό 1741cm^{-1} όπου η αντίστοιχη κορυφή φαίνεται ότι απουσιάζει από το φάσμα της καθαρής καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης.



Σχήμα 13: φάσμα FT-IR εστεροποιημένης καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης με vinyl-laurate. Ο εστέρας εμφανίζεται σε κυματαριθμό 1762cm^{-1} όπου η αντίστοιχη κορυφή φαίνεται ότι απουσιάζει από το φάσμα της καθαρής καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης.



Σχήμα 14: φάσμα FT-IR εστεροποιημένης καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης με vinyl-palmitate. Ο εστέρας εμφανίζεται σε κυματαριθμό 1788cm^{-1} όπου η αντίστοιχη κορυφή φαίνεται ότι απουσιάζει από το φάσμα της καθαρής καρβοξυμέθυλο κυτταρίνης.

Ε.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με όλα τα πειράματα που έγιναν, το ποσοστά εστεροποίησης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη διαφορετική ποσότητα του λιπαρού υποστρώματος, το pH, τη θερμοκρασία και το είδος του ενζύμου.

Παρατηρήσαμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό εστεροποίησης είναι του vinyl-propionate και ακολουθούν το vinyl-laurate και το vinyl-palmitate. Αυτό συμβαίνει διότι το vinyl-laurate και το vinyl-palmitate είναι πολύ μεγαλύτερα σε μέγεθος μόρια από ότι το vinyl-propionate, με αποτέλεσμα να εμαφανίζονται στερεοχημικές παρεμποδίσεις. Παράλληλα το vinyl-propionate έχει πολύ μεγαλύτερη διαλυτότητα στο μέσο αντίδρασης μας (H₂O) από ότι τα άλλα δύο υποστρώματα. Επίσης παρατηρήσαμε ότι ο αρχικός ρυθμός αντίδρασης του vinyl-propionate είναι μεγαλύτερος από εκείνους των vinyl-laurate και vinyl-palmitate.

Ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις των λιπαρών υποστρωμάτων (0.1-0.4ml) ξεχωριστά για τις αντιδράσεις είτε των vinyl-propionate είτε των vinyl-laurate είτε και για των vinyl-palmitate παρατηρήσαμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό εστεροποίησης επιτυγχάνεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (0.4ml) του υποστρώματος και ακολουθούν αναλογικά οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις. Η μόνη εξαίρεση που υπήρξε ήταν στις αντιδράσεις των vinyl-palmitate στις οποίες για τη μικρότερη συγκέντρωση (0.1ml) δεν παρατηρήθηκε εστεροποίηση. Άρα συμπεραίνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του λιπαρού οξέος στις αντιδράσεις μας τόσο αυξάνεται το ποσοστό εστεροποίησης.

Μέσα από τα πειράματα παρατηρήθηκε επίσης ότι η χρήση του ενζύμου *A.niger* σε σχέση με τη χρήση του ενζύμου *Lipase from Candida Cylindracea* σε αντίστοιχες αντιδράσεις με ίδια υποστρώματα και συνθήκες, έδωσε μεγαλύτερα ποσοστά εστεροποίησης. Αυτό συμβαίνει λόγω της εκλεκτικότητας των

ενζύμων καθώς και στη σταθερότητά τους στις συνθήκες του πειράματος.

Παρατηρήθηκε ακόμα ότι το ένζυμο *Lipase from Candida Cylindracea* δεν αντέδρασε με το υπόστρωμα vinyl-palmitate που οφείλεται στην εκλεκτικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου στο υπόστρωμα.

Επίσης διαπιστώθηκε πως με την αύξηση της CMC μέχρι ενός σημείου, αυξάνονται τα ποσοστά εστεροποίησης λόγω διαθεσιμότητας του υποστρώματος. Παρ' όλα αυτά με μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης της CMC παρατηρείται μείωση του ποσοστού εστεροποίησης. Αυτό συμβαίνει γιατί με τη σημαντική αύξηση του ιξώδους μειώνεται σημαντικά η διάχυση του υποστρώματος στο ένζυμο.

Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση των ποσοστών εστεροποίησης με την αύξηση της θερμοκρασίας το οποίο είναι αναμενόμενο. Σε θερμοκρασίες όπως των 30°C, 40°C, 50°C δεν παρουσιάζεται το φαινόμενο της μετουσίωσης.

Τέλος υπήρξαν αντιδράσεις στις οποίες προσπάθησαν να εκμεταλλευτούμε τον καρβοξυλικό χαρακτήρα της CMC και ως εκ τούτου προσθέσαμε αλκοόλη ως υπόστρωμα για να σχηματιστεί πιθανώς ο αντίστοιχος εστέρας. Αυτό όμως δεν επετεύχθη κάτι που πιθανώς οφείλεται στη μειωμένη δραστικότητα των καρβοξυμέθυλο ομάδων.

ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Y. Nishiyama, P. Langan, H. Chanzy (2002). "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction". *J. Am. Chem. Soc* 124 (31): 9074–9082. doi:10.1021/ja0257319.
2. Crawford, R. L. (1981). *Lignin biodegradation and transformation*. New York: John Wiley and Sons. ISBN 0-471-05743-6.
3. Updegraff DM (1969). "Semimicro determination of cellulose in biological materials". *Analytical Biochemistry* 32: 420–424. doi:10.1016/S0003-2697(69)80009-6.
4. Cellulose. (2008). In *Encyclopædia Britannica*. Retrieved January 11, 2008, from Encyclopædia Britannica Online.
5. Young, Raymond (1986). *Cellulose structure modification and hydrolysis*. New York: Wiley. ISBN 0471827614.
6. Klemm, Dieter; Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink, Andreas Bohn (2005). "Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material". *ChemInform* 36 (36). doi:10.1002/chin.200536238.
7. Weiner, Myra L.; Lois A. Kotkoskie (1999). *Excipient Toxicity and Safety*. pp. 210. ISBN 0824782100, 9780824782108.
8. Holt-Gimenez, Eric 2007. Biofuels: Myths of the Agrofuels Transition. *Backgrounder*. Institute for Food and Development Policy, Oakland, CA. 13:2
9. *Cooking cellulose in hot and compressed water* Shigeru Deguchi, Kaoru Tsujii and Koki Horikoshi *Chem. Commun.*, 2006, 3293 - 3295, doi:10.1039/b605812d
10. Structure and morphology of cellulose by Serge Pérez and William Mackie, CERMAV-CNRS, 2001. Chapter IV.
11. Stenius, Per (2000) "1" *Forest Products Chemistry* Papermaking Science and Technology 3 Finland: Fapet OYp. 35 ISBN 952-5216-03-9
12. Kimura, Laosinchai, Itoh, Cui, Linder, Brown, *Plant Cell*, 1999, 11, 2075-2085

13. Taylor, Howells, Huttly, Vickers, Turner, *PNAS*, 2003, 100, 1450-1455
14. Peng, Kawagoe, Hogan, Delmer, "Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants", *Science*, 2002, 295, 147-150. PMID 11778054
15. David G. Barkalow, Roy L. Whistler, "Cellulose", in AccessScience@McGraw-Hill, DOI 10.1036/1097-8542.118200. Retrieved 11 January 2008.
16. ^ http://www.interiordezine.com/index.cfm/Interior_Design_Finishes/Fibres__artificial_
17. ^{Λ a b c d e f} Peter John Turnbull Morris, "The American Synthetic Rubber Research Program", Pennsylvania Press, ISBN 0-8122-8207-8, Full Text Online, page 258
18. Kroschwitz J. I. 1990. *Encyl. Polym. Sci. & Eng.* John Wiley, New York.
19. Bandrup J., Immergut E.H. 1989. *Polymer handbook*, John Wiley, New York.
20. Kevin J. Edgar, Charles M. Buchanan, John S. Debenham, Paul A. Rundquist, Brian D. Seiler, Michael C. Shelton, Debra Tindall, "Advances in cellulose ester performance and application", *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1605-1688
21. Collins T. *Science* 2001;291:48-9
22. Kaiser J. *Science* 2000;290:695-7
23. Eastman Chemical Company Publication E-146M, August 1995
24. Eastman Chemical Company Publication E-101F, September 1995
25. Όλγα Μαρκοπούλου, 'Εισαγωγή στα Βιοχημικά Συστήματα', Αθήνα, 1990
26. Shuler M., Kargi F., 'Μηχανική Βιοδιεργασιών-βασικές έννοιες', πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2005
27. Krishna S.H., 'Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media', *Biotechnol Adv.* 20.239-67,2002
28. Schmid R. D., Verger R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem.Int. Ed.* 37: 1608-1633

29. Derewenda Z. S. 1994. Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.* 45: 1-52
30. Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G. Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Høj-Jensen B., Nørskov L., Thim L., and Menge U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol. *Nature.* 343: 767-770.
31. van Tibeurgh H., Egloff M. P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C. 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature.* 362: 814-820
32. Norin M. Haeflner F., Achour A. Norin T., Hult K. 1994. Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehi*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Sci.* 3: 1493-1503
33. Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M. 1993. Insight into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268: 12843-12847
34. Rubin B. 1994. Grease pit chemistry exposed. A clutch of recent lipase structures lift the lid on the mechanism of interfacial activation and the determinants of lipase substrate specificity. *Nature Struct. Biol.* 1: 568-572
35. Kempner E. S. 1993. Movable lobes and flexible loops in proteins. Structural Lobes that control biochemical activity. *FEBS Lett.* 326:4-10.
36. Debeer A.M.T.H. J. 1992. Mechanism of activation of lipolytic enzymes. PhD thesis Utrecht University, The Netherlands
37. Ollis D. L., Chean E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197-211
38. Kolattukudy P.E. 1984. Lipases. Elsevier, Amsterdam
39. Martinez C., de Geus P., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with catalytic serine accessible to solvent. *Nature.* 356: 615-618

40. Prompers J. J., Groenewegen A., Schaick R. C., Pepermans H. A. M., Hilbers C.W. 1997 ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of *Fusarium solani pisi* cutinase and preliminary features of the structure in solution. *Protein. Sci.* 6, 2375-2384
41. Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurgh H., Egloff M. P., Cudrey C., Verger R., Cambillau C. 1994. Cutinase, a lipolytic enzyme with a performed oxyanion hole. *Biochemistry.* 33: 83-89
42. Alexander M. Klivanov, 'Improving enzymes by using them in organic solvents', *Nature*, 409, 241-246, 2001
43. Tsitsimpikou C., Stamatis H., Sereti V., Daflos H. & Kolisis F.N., 'Acylation of Glucose Catalysed by Lipases in Supercritical Carbom Dioxide', *J.Chem.Technol.Biotechnol.*, 1998, 71, 309-314
44. Straathof A., Adlercreutz P., 'Applied Biocatalysis', second edition, harwood academic publishers, 2000
45. Jakubowski D., 'Enzyme catalysis in organic solvents', <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olcatorgsolv>
46. Carrea G., Riva S., 'Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents', *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 2226-2254
47. Dimitrios Tassios, 'Εφαρμοσμένη Θερμοδυναμική Χημικής Μηχανικής', Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2001
48. Φανή Ρουμπάνη-Καλατζοπούλου, 'Χημική Κινητική και Κατάλυση', εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 1998
49. De Zoete M. C., van Rantwijk F., Sheldon R. A. 1994. Lipase-catalysed transformations with unnatural acyl acceptors. *Cat. Today* 22: 563-590

