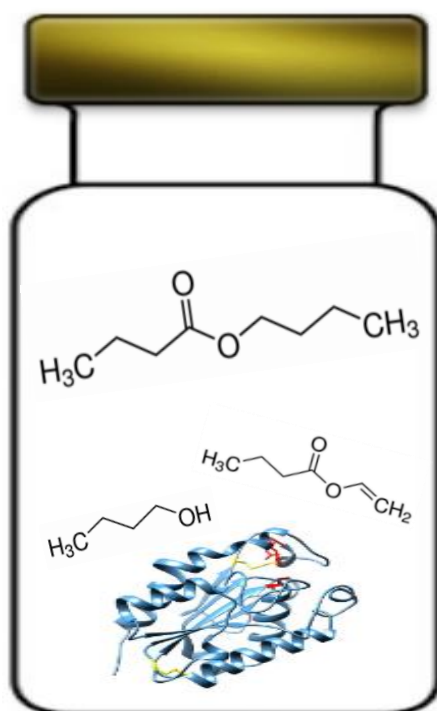




ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ακινητοποίηση μιας ανασυνδυασμένης
κουτινάσης του μύκητα *Fusarium oxysporum*
και χρήση της για τη σύνθεση αλειφατικών
εστέρων μικρής αλυσίδας



Μακρής Γεώργιος

Επιβλέπων: Τόπακας Ευάγγελος, Επ. Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2015

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Ε.Μ.Π. Ευάγγελου Τόπακα.

Με την ευκαιρία ολοκλήρωσης αυτής της εξάμηνης προσπάθειας, θα ήθελα να ευχαριστήσω εκ βαθέων τον υπεύθυνό μου, κύριο Τόπακα, για την εμπιστοσύνη και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε για την ανάθεση του εν λόγω θέματος και την συνεχή στήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια υλοποίησής του. Οι γνώσεις του και οι συμβουλές του μου παρείχαν όλα όσα θα ήθελα να γνωρίζω αλλά και ακόμα περισσότερα, καθότι προερχόμενος από διαφορετική εμβάθυνση της Σχολής Χημικών Μηχανικών με ενέπνευσε να ακολουθήσω τον τομέα της Βιοτεχνολογίας, για τον οποίο αρχικά δεν διέθετα ολοκληρωμένη αντίληψη.

Πολλά θερμά ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στον Υ.Δ. Ευστράτιο Νικολάιβιτς, ο οποίος ήταν πάντα πρόθυμος και διαθέσιμος να επιλύσει τυχόν απορίες και προβληματισμούς μου και να με εισάγει ουσιαστικά σε ένα νέο, για μένα, εργαστηριακό περιβάλλον. Οι εμπειρίες του και οι γνώσεις του αποτέλεσαν καταλυτικό παράγοντα για την πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και ευελπιστώ ότι η συνεργασία μας αλλά και η φιλία που αναπτύχθηκε μεταξύ μας θα διαρκέσει για καιρό.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω από τις ευχαριστίες μου και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας, για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές σε θέματα συμπεριφοράς σε ένα ερευνητικό εργαστήριο και το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Τέλος θα ήθελα από καρδιάς να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που με παρότρυνε και ενθάρρυνε στις όποιες δυσκολίες αντιμετώπισα αυτό το χρονικό διάστημα.

Γεώργιος Μακρής,

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2015

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ακινητοποίηση μιας κουτινάσης (*FoCut5a*) του μεσόφιλου μύκητα *Fusarium oxysporum* η οποία είχε εκφραστεί ετερόλογα σε ξενιστή *E. coli* με στόχο την εφαρμογή της σε μια αντίδραση σύνθεσης εστέρων μικρής αλυσίδας. Οι αλειφατικοί εστέρες μικρής αλυσίδας εμφανίζουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν πολύ σημαντικά αρωματικά συστατικά, που εκτιμώνται ιδιαίτερα για το φρουτώδες άρωμα που παρέχουν.

Αρχικά, η *FoCut5a* εκφράστηκε ετερόλογα στο βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* BL21 (D3), το οποίο είχε μετασχηματιστεί με τον πλασμιδιακό φορέα pET22b(+) που έφερε το αντίστοιχο γονίδιο. Η αναδίπλωση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε στον περιπ्लाσμικό χώρο των *E. coli* BL21 χρησιμοποιώντας τη σηματοδοτική αλληλουχία *relB*. Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η επαγωγή της πρωτεΐνης και το πρωτεϊνικό μίγμα (εσωκυττάριο υγρό) λήφθηκε ύστερα από διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους και είχε συγκέντρωση 9,4 mg/mL, ύστερα από υπερδιήθηση. Η ενεργότητα του ελευθερού ενζύμου βρέθηκε ίση με 785,5 U/mL.

Ως επόμενο βήμα ακολούθησε η ακινητοποίηση του παραχθέντος ενζύμου. Η μέθοδος ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η διασταυρούμενη σύνδεση για τη δημιουργία διασταυρωμένων συσσωματωμάτων ενζύμου (CLEAs®). Για το σκοπό αυτό διεξήχθησαν προκαταρκτικά πειράματα για την επιλογή των βέλτιστων παραμέτρων ακινητοποίησης. Ως διαλύτης καταβύθισης (precipitant) επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο που εμφάνιζε την καλύτερη συμπεριφορά και ως παράγοντας διασύνδεσης (cross-linker) χρησιμοποιήθηκε η γλουταραλδεΐδη με συγκέντρωση 10 mM. Η βέλτιστη συγκέντρωση του μίγματος ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε στην ακινητοποίηση ήταν 9,4 mg/mL. Επίσης, προσδιορίστηκε και συγκρίθηκε η ενεργότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων που προήλθαν από τα φυσικά βακτηριακά στελέχη *E. coli* με την ανασυνδυασμένη ενεργότητα των CLEAs κουτινάσης, με τη συνολική ενεργότητα να προέρχεται τελικά από την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

Το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφάνιζε αυξημένη θερμοσταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο, και μάλιστα κατά τον έλεγχο της θερμοκίνης σταθερότητας διαπιστώθηκε ότι τα CLEAs διατηρούσαν ακόμη περίπου το 24% της αρχικής ενεργότητας στους 40 °C μετά από 5 h.

Στην συνέχεια ακολούθησαν οι αντιδράσεις σύνθεσης του βουτυρικού βουτυλεστέρα με τη χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου, ύστερα από μελέτη μελέτη διαφόρων εστέρων με την 1-βουτανόλη και στην οποία το ένζυμο εμφάνιζε υψηλότερη απόδοση. Μελετήθηκαν, επίσης, διάφορες παράμετροι για την αύξηση της απόδοσης της μετεστεροποίησης.

Αρχικά, υπολογίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία για τη διεξαγωγή της αντίδρασης στους 50 °C και η αναλογία των αντιδρώντων στο μίγμα της αντίδρασης, η οποία, για το βινυλικό βουτυλεστέρα και την 1-βουτανόλη, ήταν 3:1. Εξετάστηκε επιπλέον η συγκέντρωση του αντιδρώντος εστέρα, με τη μεγαλύτερη απόδοση να επιτυγχάνεται

για την τιμή των 100 mM ενώ για υψηλότερες τιμές η απόδοση αφού μειώθηκε φάνηκε να σταθεροποιείται ανεξάρτητα από την αύξηση της συγκέντρωσης.

Οι τελικές μελέτες αφορούσαν τη ποσότητα του ενζύμου που οδηγούσε στην υψηλότερη μετατροπή και την πορεία της απόδοσης της αντίδρασης με το χρόνο. Στην πρώτη περίπτωση μέγιστη απόδοση (100%) λήφθηκε για ποσότητα ενζύμου 14,6 U, ενώ ακόμα και για τιμή 11 U η μετατροπή ξεπερνούσε το 99%, και επομένως προτιμήθηκε. Στην δεύτερη περίπτωση και αξιοποιώντας όλες τις βέλτιστες παραμέτρους, διεξήχθει η αντίδραση μετεστεροποίησης ώστε να βρεθεί και η πορεία της απόδοσης σε σχέση με το χρόνο. Δείγματα ελήφθησαν για συνολικό χρόνο μελέτης 7 h, από τα οποία προέκυψε η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης ίση με 12,5 mmol/L/h. Επίσης, μια μετατροπή της τάξης του 89% είχε επιτευχθεί μετά από την πάροδο 4 h, ενώ σε χρόνο 6 h η απόδοση άγγιξε το 100%.

Abstract

The purpose of the present diploma thesis was to immobilize a cutinase (*FoCut5a*) from the mesophilic fungus *Fusarium oxysporum* which had been heterologously expressed in an *E. coli* host, in order to be implemented in a short chain ester synthetic reaction. The short chain flavor esters exhibit large industrial interest as they are very important aroma components, highly appreciated for their fruity flavor.

Initially, *FoCut5a* was heterologously expressed in the bacterial strain *Escherichia coli* BL21 (D3), which had been transformed with the plasmid vector pET22b (+) carrying the corresponding gene. The folding of the enzyme was performed in the periplasmic space of *E. coli* BL21 utilizing the *pelB* signal sequence. After transformation, followed the induction of the protein. The crude protein solution (intracellular liquid) was obtained after the ruption of the bacterial cells by sonication. A concentration of 9,4 mg/mL was achieved after ultrafiltration. The activity of the free enzyme was equal to 785,5 U/mL.

The next step included the immobilization of the produced enzyme. The immobilization method used was cross-linking to create cross-linked enzyme aggregates (CLEAs®). For this purpose, preliminary experiments were carried out to select the best immobilization parameters. Acetonitrile was selected as a precipitant which exhibited the best behavior and glutaraldehyde was used as a cross-linker, at a concentration of 10 mM. The optimum concentration of the crude enzyme used in the immobilization technique was 9,4 mg/mL. Furthermore, the activity of the immobilized enzyme originating from wild type *E. coli* cells was determined and compared with the activity of the recombinant cutinase CLEAs with the total activity deriving from the recombinant protein.

The immobilized enzyme showed increased thermostability compared to the free enzyme and during the enzymatic assay, it was found that the CLEAs maintained approximately 24% of the initial activity at 40 °C after 5 h of incubation.

Subsequently, synthetic reactions of butyl butyrate followed, using vinyl butyrate and 1-butanol as reactants after studying various short chain esters because in that reaction the enzyme exhibited the highest efficiency. Various parameters were also examined for increasing the yield of transesterification reaction.

Initially, the optimum temperature for conducting the reaction was found to be 50 °C, and the ratio of the reactants, specifically for the vinyl butyrate and 1-butanol, was 3:1. Further studies concerned the concentration of vinyl butyrate, with the highest yield resulting for 100 mM. For higher concentration values, transesterification yields decreased at first and then appeared to stabilize, regardless of the concentration.

Final studies concerned the amount of enzyme used and the time course of the reaction. In the first case, maximum yield (nearly 100%) was obtained using an enzyme loading of 14,6 U per reaction, while for 11 U per reaction, conversion exceeded 99%. Therefore, the latter enzyme loading was preferred.

In the second case, the transesterification reaction was carried out utilizing all the optimum parameters during a period of time. Samples were taken for a total of 7 h. The initial reaction rate was equal to 12,5 mmol/L/h. Finally, a yield of 89% was achieved after 4 h, while after 6 h, the yield of the transesterification reaction reached close to 100%.

Περιεχόμενα

Περίληψη	i
Abstract	iii
Περιεχόμενα.....	1
Κεφάλαιο 1^ο Θεωρητικό Μέρος	1
1.1 Δομή και ρόλος της κουτίνης.....	1
1.2 Ορισμός & Χαρακτηριστικά Κουτινασης.....	2
1.3 Παραγωγή κουτινάσης	2
1.3.1 Καλλιέργεια κουτινοπαραγωγών μικροοργανισμών	2
1.3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση κουτινάσης.....	3
1.4 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κουτιναςών	4
1.5 Δομή Κουτιναςών	5
1.5.1 Διαφορές Κουτιναςών και Λιπασών	7
1.6 Ακινητοποίηση Ενζύμων	7
1.6.1 Μη ομοιοπολική προσρόφηση και εναπόθεση.....	8
1.6.2 Ακινητοποίηση μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων.....	9
1.6.3 Ομοιοπολική σύνδεση (tethering)	10
1.6.4 Διασταυρούμενη σύνδεση ενός ενζύμου (cross-linking)	11
1.6.5 Εγκλεισμός σε πολυμερική γέλη ή κάψουλα	12
1.7 Ακινητοποίηση Κουτινάσης.....	14
1.8 Η κουτινάση σε οργανικούς διαλύτες	16
1.9 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Κουτινάσες	17
1.9.1 Υδρόλυση	17
1.9.2 Εστεροποίηση	17
1.9.3 Μετεστεροποίηση.....	19
1.9.4 Πολυμερισμός.....	19
1.10 Εφαρμογές.....	20
1.10.1 Γαλακτοκομικά προϊόντα & Έλαια	20
1.10.2 Τρόφιμα	21
1.10.3 Βιομηχανία Υφασμάτων (Κλωστοϋφαντουργία).....	22
1.10.4 Γεωργία.....	23
1.10.5 Απορρυπαντικά.....	25
1.11 Αρωματικοί (Αλειφατικοί) Εστέρες.....	25

1.11.1 Γενικά στοιχεία και εφαρμογές	25
1.11.2 Είδη σύνθεσης εστέρων και σύγκρισή τους	26

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2^ο Υλικά & Μέθοδοι	31
2.1 Υλικά.....	31
2.1.1 Συσκευές – Όργανα	31
2.1.2 Μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην ετερόλογη έκφραση.....	31
2.2 Μέθοδοι Παραγωγής και Ανάλυσης Πρωτεϊνών	32
2.2.1 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells).....	32
2.2.2 Έκφραση και Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα <i>E. Coli</i> BL21 (DE3)	32
2.2.3 Λήψη του μίγματος των πρωτεϊνών (crude).....	33
2.2.4 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay).....	34
2.3 Ακινητοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking)	35
2.3.1 Μελέτη παραμέτρων για τη δημιουργία των CLEAs.....	35
2.3.2 Δημιουργία CLEAs κουτινάσης σε μεγάλη κλίμακα	36
2.4 Έλεγχος θερμικής σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου	37
2.5 Συνθέσεις Εστέρων	37
2.5.1 Μελέτη επίδρασης της ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλης.....	37
2.5.2 Μελέτη συνθηκών για βελτιστοποίηση της σύνθεσης του βουτυρικού βουτυλεστέρα	38
2.6 Αναλυτικές Μέθοδοι	39
Κεφάλαιο 3^ο Παραγωγή και ακινητοποίηση της κουτινάσης <i>FoCut5a</i>.....	43
3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένης της κουτινάσης <i>FoCut5a</i>	43
3.2 Ακινητοποίηση κουτινάσης.....	43
3.2.1 Βέλτιστη επιλογή διαλύτη καταβύθισης	43
3.2.2 Βέλτιστη συγκέντρωση παράγοντα διασύνδεσης.....	44
3.2.3 Βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου	45
3.3 Σύγκριση ενεργότητας μη ανασυνδυασμένων CLEAs και ελεύθερου ενζύμου με το ανασυνδυασμένο ακινητοποιημένο ένζυμο	45
3.4 Έλεγχος θερμικής σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου	46
Κεφάλαιο 4^ο Αντιδράσεις Μετεστεροποίησης	49
4.1 Συνθέσεις Βουτυλεστέρων	49
4.1.1 Επίδραση ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλης	49

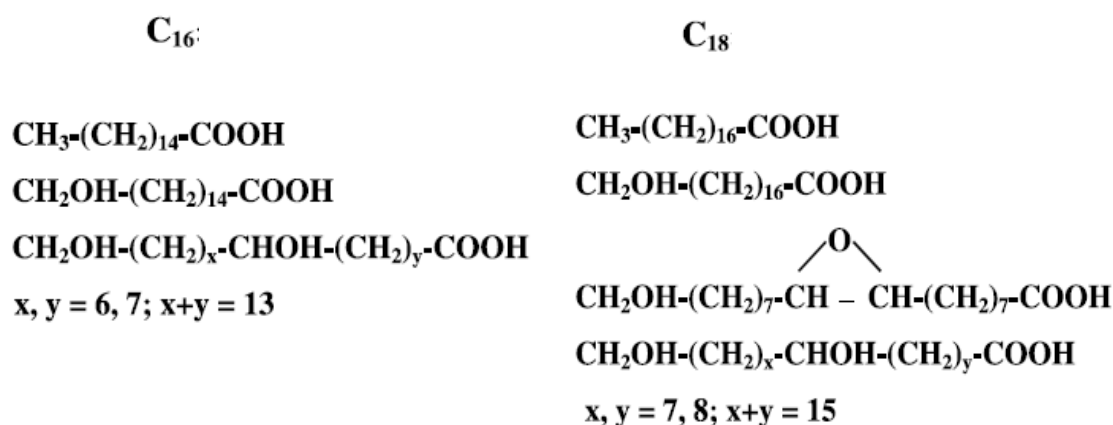
4.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της αντίδρασης.....	49
4.1.3 Επίδραση της αναλογίας των αντιδρώντων συστατικών.....	51
4.1.4 Μελέτη συγκεντρώσεων του βινυλικού βουτυλεστέρα	52
4.1.5 Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση.....	53
4.2 Πορεία της απόδοσης της αντίδρασης με το χρόνο	54
Κεφάλαιο 5^ο Σύνοψη και συζήτηση αποτελεσμάτων	59
5.1 Προτάσεις για το μέλλον.....	65
Βιβλιογραφία	67

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο Θεωρητικό Μέρος

1.1 Δομή και ρόλος της κουτίνης

Τα εναέρια μέρη των φυτών όπως τα φύλλα, τα άνθη, οι καρποί και τα μικρά στελέχη καλύπτονται από μια επιδερμίδα (Yeats & Rose, 2013). Το δομικό συστατικό της επιδερμίδας του φυτού είναι ένας βιοπολυεστέρας, η κουτίνη (Domínguez et al., 2011). Η κουτίνη αποτελείται από ένα σχετικά άκαμπτο πλέγμα εστεροποιημένων υδροξυ και υδροξύλ-εποξυ λιπαρών οξέων, ενσωματωμένο σε ένα στρώμα μη πολικών λιπιδίων που συλλογικά ονομάζονται κεριά. Τα λιπαρά οξέα της κουτίνης είναι συνήθως η-C₁₆ και η-C₁₈ (Purdy & Kolattukudy, 1975). Οι δεσμοί που κυριαρχούν στις κουτίνες είναι οι εστερικοί, αν και έχουν επίσης παρουσιαστεί υπεροξειδικές γέφυρες και αιθερικοί σύνδεσμοι. Η πραγματική σύνθεση της κουτίνης εξαρτάται από το εκάστοτε είδος. Ωστόσο, σε γενικές γραμμές, ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά φαίνεται να περιέχουν κατά κύριο λόγο τα οξέα C₁₆, ιδιαιτέρως το διυδροξυπαλμιτικό, ενώ στα πιο αργά αναπτυσσόμενα φυτά, υπάρχουν στοιχεία για ένα μίγμα από οξέα C₁₆ και C₁₈ (Kolattukudy, 1985).



Εικόνα 1: Δομή των πιο κοινών λιπαρών οξέων (C₁₆ και C₁₈) που δρουν σαν μονομερή του βιοπολυεστέρα κουτίνης του φυτού

Από άποψη φυσιολογίας, η κύρια λειτουργία που αποδίδεται στην επιδερμίδα αυτή είναι να ελαχιστοποιηθεί η απώλεια νερού (G. Kerstiens, 1996; M. Riederer, L. Schreiber, 2001). Ωστόσο, από μια γενικότερη σκοπιά, αυτός ο ρόλος της ρύθμισης της ποσότητας νερού του φυτού συνοδεύεται και από άλλες σημαντικές λειτουργίες: η επιδερμίδα περιορίζει την απώλεια ουσιών από τους εσωτερικούς ιστούς του φυτού και επίσης προστατεύει το φυτό από φυσικούς, χημικούς και βιολογικούς παράγοντες. Η κουτίνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία του φυτού από την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, και η ενζυμική υδρόλυσή της έχει αποδείχθηκε ότι είναι ένα από τα πρώτα στάδια μόλυνσης ενός φυτού. Μερικοί μικροοργανισμοί, συμπεριλαμβανομένων των φυτοπαθογόνων, έχει αποδειχθεί ότι επιβιώνουν χρησιμοποιώντας την κουτίνη ως μοναδική πηγή άνθρακα (Purdy & Kolattukudy,

1975) με την παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων που επάγονται με την παρουσία μονομερών κουτίνης (Purdy & Kolattukudy, 1975; Lin & Kolattukudy, 1980).

1.2 Ορισμός & Χαρακτηριστικά Κουτινάσης

Η κουτινάση (EC 3.1.1.74) είναι μια εστεράση που αποτελεί το μικρότερο μέλος της οικογένειας α/β υδρολασών, της ευρύτερης οικογένειας υδρολασών σερίνης (Longhi & Cambillau, 1999). Η κουτινάση έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί από διάφορες πηγές, κυρίως από μύκητες και βακτήρια (*Saccharomyces* και *Pseudomonas*) αλλά και γύρη (pollen) (Chen et al., 1987). Το μεγαλύτερο μέρος της έρευνας στο πεδίο της κουτινάσης έχει γίνει με τη χρήση του φυτοπαθογόνου μύκητα που προσβάλλει το μπιζέλι, *Fusarium solani. f. pisi* (Egmond & de Vlieg, 2000).

Η ευελιξία της κουτινάσης σε σχέση με μια ποικιλία πιθανών υποστρωμάτων και το μοναδικό χαρακτηριστικό της να είναι ενεργή, ανεξάρτητα από την παρουσία μιας διεπιφάνειας ελαίου - νερού, την καθιστά ενδιαφέρουσα ως βιοκαταλύτη σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές (Carvalho et al., 1999; Pio & Macedo, 2009). Η μη υδατική ενζυμολογία υπήρξε μία τέτοια περιοχή, όπου η κουτινάση, όπως και οι λιπάσες, έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αποτελεσματικός βιοκαταλύτης για οργανική σύνθεση (Vidinha et al., 2006). Η ευελιξία της κουτινάσης απεικονίζεται στην αποτελεσματικότητά της στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, την εστεροποίηση, και την δια- και ενδο- μετεστεροποίηση (Carvalho et al., 1999). Εξάλλου, οι κουτινάσες είναι ικανές να υδρολύουν μια μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων διαλυτών εστέρων μικρού μοριακού βάρους και σε ορισμένες περιπτώσεις υψηλού μοριακού βάρους αδιάλυτων συνθετικών πολυεστέρων. Αυτό το προφίλ ενεργιοτήτων δίνει μια σειρά από σημαντικές εφαρμογές σε βιομηχανίες που ποικίλουν από τον τομέα των απορρυπαντικών έως βιομηχανίες τροφίμων και χημικών ουσιών.

1.3 Παραγωγή κουτινάσης

1.3.1 Καλλιέργεια κουτινοπαραγωγών μικροοργανισμών

Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών που παράγουν την κουτινάση σε σημαντικές ποσότητες είναι συνηθέστερα υγρές (Fett et al., 1992) και σπανιότερα στερεές (Speranza et al., 2011). Η παραγωγή της κουτινάσης φαίνεται να ρυθμίζεται ιδιαίτερα από τις συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών (Li et al., 2009). Πιο συγκεκριμένα καταστέλλεται παρουσία γλυκόζης και επάγεται παρουσία κουτίνης, υδρολυμένης κουτίνης ή κύριων συστατικών της στο θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας (Sebastian et al., 1987).

Η παραγωγή κουτινάσων από τα φυσικά στελέχη τους εμφανίζει τα μειονεκτήματα της χαμηλής παραγωγικότητας και των μεγάλων περιόδων ζύμωσης. Συνεπώς, αν και τα συστήματα αυτά επιτρέπουν την παραγωγή επαρκών ποσοτήτων κουτινάσης που

μπορούν να καλύψουν τις ανάγκες της ερευνητικής δραστηριότητας, εντούτοις δεν παράγουν επαρκές υλικό για την κάλυψη των απαιτήσεων των βιομηχανικών εφαρμογών. Επομένως, ορισμένοι ερευνητές έχουν στραφεί στην ανασυνδυασμένη έκφραση ενζύμων σε ομόλογους και ετερόλογους ξενιστές, ελπίζοντας σε μικρότερους χρόνους ζύμωσης και σε αύξηση τόσο της κλίμακας όσο και της απόδοσης (Chen et al., 2013).

1.3.2 Κλωνοποίηση και ετερόλογη έκφραση κουτινάσης

Με την έλευση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA, πολλές κουτινάσες, λόγω και της σπουδαιότητάς τους, έχουν παραχθεί μέσω έκφρασης μεγάλης κλίμακας σε ετερόλογους ξενιστές.

Η κουτινάση του *Fusarium solani pisi* έχει μελετηθεί εντατικά και έχει εκφραστεί σε μια ποικιλία από ετερόλογους ξενιστές.

Όταν η κουτινάση αυτή εκφράστηκε στη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* SU50, η ενεργότητα στο μέσο καλλιέργειας ήταν 123 U/mL (van Gemeren et al., 1995). Με έλεγχο της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου και του pH, η ενεργότητα της κουτινάσης θα μπορούσε να φθάσει τα 170 U/mL (Calado et al., 2002). Εισάγοντας μια συναινετική αλληλουχία N-γλυκοζυλίωσης στην N-τερματική περιοχή της κουτινάσης του *F. solani pisi*, αύξησε 5 φορές την έκκριση κουτινάσης από την ζύμη *S. cerevisiae*, ενώ εισάγοντας μια θέση N-γλυκοζυλίωσης στην C-τερματική περιοχή αύξησε την έκκριση κουτινάσης 1,8 φορές (Sagt et al., 2000). Σε περαιτέρω προσπάθειες για να κατασκευαστεί μια διεργασία βιομηχανικής κλίμακας για την παραγωγή ανασυνδυασμένης κουτινάσης του *F. solani pisi* στην ζύμη *S. cerevisiae*, κατασκευάστηκε ένα στέλεχος έκφρασης στο οποίο η έκφραση επάχθηκε μέσω ενός υποκινητή γαλακτόζης. Υιοθετώντας μια τυπική στρατηγική ζύμωσης ημιδιαλείποντος έργου, λήφθηκε στο μέσο καλλιέργειας μια συγκέντρωση κουτινάσης ίση με 546 mg/L (Ferreira et al., 2003). Το τελικό σύστημα που κατασκευάστηκε από αυτούς τους ερευνητές ενσωμάτωσε την έκφραση και τον καθαρισμό του ενζύμου σε ένα σύστημα που μπορεί να είναι χρήσιμο σε βιομηχανική κλίμακα (Calado et al., 2004).

Η κουτινάση του *F. solani pisi* έχει επίσης εκφραστεί στην ζύμη *Pichia pastoris* (Kwon et al., 2009). Χωρίς καμία βελτιστοποίηση, η συγκέντρωση της κουτινάσης σε φιάλες έφθασε περίπου τα 340 mg/L, γεγονός που υποδηλώνει ότι ένα βελτιστοποιημένο σύστημα έκφρασης *Pichia pastoris* θα μπορούσε να είναι πολύ ελπιδοφόρο για την παραγωγή κουτινάσης του *F. solani pisi*.

Συστήματα μυκήτων έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για να εκφράσουν την κουτινάση του *F. solani pisi*. Χρησιμοποιώντας τον *Aspergillus awamori* ως ξενιστή, η κουτινάση εκκρίθηκε στο μέσο καλλιέργειας σε συγκέντρωση 50 mg/L (35 U/mL) (van Gemeren et al., 1995).

Οι κουτινάσες από τους μύκητες *A. oryzae*, *A. niger* και *M. fructicola* έχουν επίσης κλωνοποιηθεί και εκφραστεί σε *P. pastoris* χρησιμοποιώντας τον, επαγόμενο με μεθανόλη, AOX1 ως υποκινητή (Liu et al, 2009; Nyysola et al, 2013; Wang et al., 2002). Ένα γονίδιο κουτινάσης του *P. antarctica* κλωνοποιήθηκε υπό τον έλεγχο του

υποκινητή GAL1 και εκφράστηκε σε *S. cerevisiae* (Shinozaki et al., 2013b). Επιπλέον, ο *Trichoderma reesei* επελέγη ως ξενιστής για την έκφραση του γονιδίου κουτινάσης από τον *C. cinerea*, με την απόδοση της παραγωγής κουτινάσης σε εργαστηριακό ζυμωτήρα να είναι 1,4 g/L (Kontkanen et al., 2009).

Ακόμα περισσότερες είναι οι περιπτώσεις έκφρασης των ανασυνδυασμένων κουτινασών σε βακτηριακά στελέχη *Escherichia coli*, λόγω της ευκολίας γενετικού χειρισμού τους και των μικρότερων χρόνων καλλιέργειας. Συνηθέστερα για την έκφραση χρησιμοποιούνται τα στελέχη *E. coli* BL21 (DE3), μετασχηματισμένα με πλασμιδιακούς φορείς της οικογένειας pET (T7 promoter) και ως επαγωγός της έκφρασης χρησιμοποιείται η ένωση isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Οι συνθήκες καλλιέργειας από περίπτωση σε περίπτωση ποικίλουν. Για παράδειγμα, η θερμοκρασία παραγωγής μπορεί να είναι 20, 25 ή 37 °C, το θρεπτικό μέσο LB ή TB, η συχνότητα ανάδευσης 180-400 rpm, η συγκέντρωση του επαγωγέα 0,1-1 mM IPTG. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα, εκτός από την εσωκυτταρική έκφραση, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη να μεταφέρεται είτε στο περίπλασμα του κυττάρου, είτε ακόμα και εξωκυτταρικά, με τη χρήση ειδικών αλληλουχιών-σηματοδοτών, που συνεκφράζονται με αυτήν. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η συγκομιδή και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης-στόχου. Παράδειγμα εξωκυτταρικής έκφρασης είναι οι κουτινάσες από το βακτηριακό γένος *Thermobifida*, οι οποίες εκφράστηκαν στο στέλεχος *E. coli* BL21 (DE3) με βέλτιστη εξωκυτταρική ενεργότητα της κουτινάσης να είναι ίση με 2258,5 U/mL (5,1 g/L). Η τιμή αυτή αποτελεί την υψηλότερη παραγωγή μέχρι σήμερα και επιτεύχθηκε με την στρατηγική της συνδυαστικής χρήσης επαγωγέων IPTG/Λακτόζης (Chen et al., 2008).

1.4 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Κουτινασών

Οι ερευνητές περιγράφουν, σε ορισμένες κουτινάσες, την παρουσία μιας διαμόρφωσης που ανοίγει και κλείνει, που υποδεικνύει ότι το ένζυμο είναι κυρίως λιπάση παρά εστεράση (Melo et al., 2003b). Η κίνηση αυτή της ενεργής περιοχής (ενεργό κέντρο) μπορεί να είναι υπεύθυνη για την προσαρμογή του ενζύμου σε διαφορετικούς διαλύτες. Θεωρώντας την ομάδα των κουτινασών, η σταθερότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το συγκεκριμένο ένζυμο που εξετάζεται. Οι Petersen et al. (1998) παρατήρησαν ότι η τριτοταγής δομή της κουτινάσης του *Fusarium solani pisi* παραμένει αμετάβλητη σε ένα εύρος pH από 4,0 έως 9,0. Ωστόσο, το ένζυμο διατήρησε τη ενεργότητά του σε pH από 4,0 έως 5,0 και επίσης σε pH 8,5. Αυτή η συμπεριφορά πιθανόν σχετίζεται με την ιονισμένη κατάσταση της His-188, επειδή αυτό το υπόλειμμα πρέπει να αποπρωτονιωθεί ώστε να σταθεροποιηθεί η καταλυτική θέση. Επιπλέον βρέθηκε ότι η κουτινάση του *Fusarium solani f. pisi* έχει ισοηλεκτρικό σημείο 7,8 (Petersen et al., 1997; Egmond et al., 1996). Το pH σταθερότητας των μυκητιακών κουτινασών παραμένει στο βασικό και όξινο εύρος, ενώ η κουτινάση από γύρη εμφανίζει σταθερότητα σε ουδέτερο pH, με την βέλτιστη τιμή pH να είναι 6,8 (Kolattukudy, 1984). Όσον αφορά τη βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας τους, αυτή κυμαίνεται γύρω στους 40 °C, αν και ένζυμα προερχόμενα από θερμοφίλους μικροοργανισμούς

παρουσιάζουν το βέλτιστό τους στους 50-60 °C. Αρκετές στρατηγικές έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί προκειμένου να αυξηθεί η θερμική και λειτουργική σταθερότητα των κουτιναςών σε διαφορετικά μέσα αντίδρασης (Carvalho et al., 1999; Melo et al., 2003; Ternström et al., 2005). Η χρήση αντίστροφων μικκυλίων, κυρίως AOT, είναι η πιο διαδεδομένη στρατηγική στη βιβλιογραφία, λόγω των υψηλών αποδόσεων που λαμβάνονται. Τα αντίστροφα μικκύλια είναι συστήματα που αποτελούνται από αμφίφιλα μόρια με πολικές ομάδες προσανατολισμένες προς το εσωτερικό και μη πολικές ομάδες προσανατολισμένες προς το εξωτερικό του μορίου. Η δομή τους έχει χαρακτηριστικά που μοιάζουν με τις βιολογικές μεμβράνες. Αυτό το χαρακτηριστικό τα καθιστά ένα χρήσιμο εργαλείο για την μελέτη των βιολογικών αλληλεπιδράσεων των βιοδραστικών πεπτιδίων (Melo et al., 2003b). Η χρήση των αλκοολούχων μέσων, κυρίως η χρήση εξανόλης, αυξάνει την κατακράτηση της ενεργότητας της κουτινάσης στα αντίστροφα μικκύλια, μολονότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός (Sebastião et al., 1993). Αξίζει επίσης να σημειωθεί η χρήση της σημειακά κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης, η οποία περιλαμβάνει την ανάπτυξη και επιλογή μεταλλαγμένων ενζύμων με διαφοροποιημένες και βελτιωμένες την ενεργότητα, σταθερότητα και διαθεσιμότητα τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η σύγκριση των ιδιοτήτων της κουτινάσης που προέρχεται από τον μύκητα *Fusarium solani pisi* (wild-type) με την αντίστοιχη από μεταλλαγμένες παραλλαγές του (Brissos et al., 2008). Τα πλεονεκτήματα της σημειακά κατευθυνόμενης μεταλλαξογένεσης επεκτείνονται επίσης και στην υψηλή δυνατότητα επαναληψιμότητας, την σχετική ευκολία και την καλή σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας της μεθόδου. Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή χρήζει περαιτέρω μελέτης καθώς η έλλειψη διαθέσιμων δομικών και βιοχημικών δεδομένων περιορίζει τον αριθμό των πρωτεϊνών που μπορούν να τροποποιηθούν. Τέλος, όσον αφορά την σταθερότητα των κουτιναςών, οι Gonçaves et al. (1999) έδειξαν ότι η κουτινάση παραμένει σταθερή όταν ακινητοποιείται σε διοξείδιο του πυριτίου.

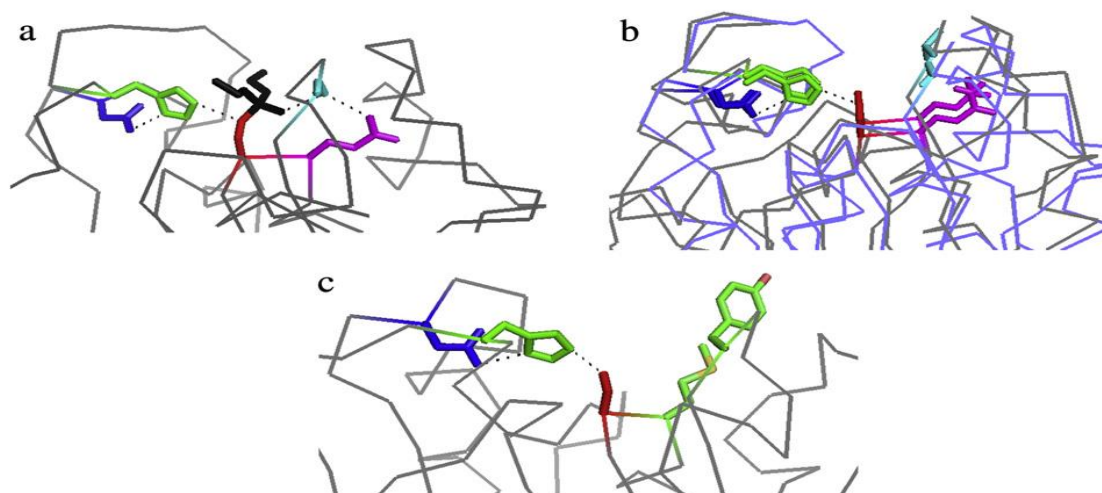
1.5 Δομή Κουτιναςών

Τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια των ακτίνων-X, έχει γίνει γνωστή η κρυσταλλική δομή αρκετών μικροβιακών λιπασών (*Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Candida Antartica B*, *Pseudomonas glumae*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus delemar*, *Humicola lanuginosa*, *Geotrichum candidum*, *Pseudomonas cepacia*, *Penicillium camembertii*, και *Pseudomonas mendaccino*), αλλά και λιπασών θηλαστικών (ανθρώπινη παγκρεατική) (Longhi et al., 1997a; Cygler και Schrag, 1997).

Όλες οι λιπάσες οι οποίες έχουν ερευνηθεί μέχρι στιγμής ποικίλλουν ευρέως στο μέγεθος και την αλληλουχία των αμινοξέων. Ωστόσο, ανήκουν στην κατηγορία των εστερασών σερίνης και στην υπεροικογένεια των α/β υδρολασών στην οποία η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται στην είσοδο μιας εξαιρετικά απότομης περιέλιξης μεταξύ ενός β-κλώνου και μίας α-έλικας. Χαρακτηρίζονται από την καταλυτική τριάδα Ser, His, Asp (Glu) και από μία θέση πρόσδεσης οξυανιόντος που σταθεροποιεί τη

μεταβατική κατάσταση μέσω δεσμών υδρογόνου με δύο κύριες αλυσίδες αμιδικών ομάδων (Nicolas et al., 1996).

Η τρισδιάστατη δομή της κουτινάσης του *Fusarium solani f. Pisi*, που έχει κλωνοποιηθεί και εκφραστεί σε κύτταρα *E. coli* έγινε γνωστή σε ανάλυση 1,6 Å (Martinez et al., 1992) η οποία πρόσφατα επεκτάθηκε σε 1,0 Å (Longhi et al., 1997b; Jelsch et al., 1998). Οι κουτινάσες έχουν μοριακό βάρος περίπου 22.000 daltons με εξαιρετικά διατηρημένες επιμηκύνσεις, οι οποίες περιλαμβάνουν τέσσερις αμετάβλητες κυστεΐνες, που σχηματίζουν δύο δισουλφιδικές γέφυρες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κουτινάση είναι επίσης μια α/β υδρολάση και έχει ένα κεντρικό β -φύλλο (επίπεδο) που αποτελείται από πέντε παράλληλους κλώνους και καλύπτεται από δύο και τρεις έλικες σε κάθε πλευρά του φύλλου. Η κουτινάση του *Fusarium solani f. Pisi* ανήκει επίσης στην κατηγορία των εστερασών σερίνης. Η αλυσίδα Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly που περιέχει τη δραστική Ser120, έχει ακόμα ισχυρότερη ομολογία με την αλληλουχία Gly- (Tyr ή His)-Ser-X-Gly που συνήθως είναι παρούσα στις λιπάσες. Η καταλυτική τριάδα Ser120, Asp175 και His188, είναι προσβάσιμη στο διαλύτη, βρίσκεται στο ένα άκρο του ελλεισοειδούς της πρωτεΐνης, και περιβάλλεται από το βρόχο 80-87 και από τον περισσότερο υδροφοβό βρόχο 180-188 (Jelsch et al., 1998). Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει γνωστές με την βοήθεια των ακτίνων-X περίπου 40 δομές της κουτινάσης αυτής και των μεταλλάξεών της. (Longhi et al., 1996; Longhi et al., 1997a; Nicolas et al., 1996; Martinez et al., 1992; Longhi et al., 1997b; Jelsch et al., 1998; Prange et al., 1998).



Εικόνα: Ενεργές θέσεις κουτινάσης. a) Κουτινάση του *Fusarium solani pisi* (γκρι γραμμή) με ένα μόριο φωσφορικού διαιθυλεστέρα (μαύρο) να δεσμεύεται στην καταλυτική Ser (κόκκινο). Οι πλευρικές αλυσίδες της καταλυτικής His (πράσινο) και Asp (μπλε), μαζί με την οπή ανιόντος Ser (κυανό) και Gln (ερυθρό ματζέντα) αποδίδονται ως ράβδοι. Οι υποθετικοί δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με μαύρες διακεκομμένες γραμμές. b) Επικάλυψη των ευθυγραμμισμένων δομών της κουτινάσης του *F. solani pisi* (μπλε κορδέλα) και του *Cryptococcus sp.* (γκρι κορδέλα). Οι πλευρικές αλυσίδες της καταλυτικής Ser (κόκκινο), His (πράσινο) και Asp (μπλε), καθώς και η οπή οξυανιόντος Ser ή Thr (κυανό) και Gln (κόκκινο ματζέντα) αποδίδονται ως ράβδοι. Οι υποθετικοί δεσμοί υδρογόνου παρουσιάζονται με μαύρες διακεκομμένες γραμμές. c) Ενεργή περιοχή της κουτινάσης του *Thermobifida alba*. Οι πλευρικές αλυσίδες της καταλυτικής Ser (κόκκινο), (πράσινο) His (πράσινο) και Asp (μπλε) αποδίδονται ως ράβδοι. Οι υποθετικοί δεσμοί υδρογόνου αποδίδονται ως διακεκομμένες μαύρες γραμμές. Όλες οι αποδόσεις των δομών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του PyMol.

1.5.1 Διαφορές Κουτινασών και Λιπασών

Οι κουτινάσες διαφέρουν από τις κλασσικές λιπάσες, καθώς δεν εμφανίζουν διεπιφανειακή ενεργοποίηση. Οι προαναφερθέντες βρόχοι 80-87 και 180-188, που φέρουν υδρόφοβα αμινοξέα (Leu81, Gly82, Ala85, Leu86, Pro87, Leu 182, Ileu183 και Val184), μπορούν να αποτελέσουν τη διεπιφανειακή θέση δέσμησης (Martinez et al., 1992). Παρά την ύπαρξη των δύο γεφυρών πλευρικής αλυσίδας των αμινοξέων Leu81 και Val184, Leu182 και Asn84, η καταλυτική σερίνη της κουτινάσης δεν είναι «θαμμένη» κάτω από την επιφάνεια των βρόχων, αλλά είναι προσβάσιμη σε διαλύτη και υπόστρωμα. Η απουσία ενός πτερυγίου, που καλύπτει το ενεργό κέντρο της σερίνης, όπως σε άλλες λιπάσες, πιθανώς εξηγεί γιατί η κουτινάση δεν ενεργοποιείται από την παρουσία των διεπαφών. Η σύνδεση της κουτινάσης σε διεπαφάνειες δεν φαίνεται να απαιτεί μια αναδιάταξη της κύριας αλυσίδας, όπως στην περίπτωση των λιπασών, αλλά μόνο τον αναπροσανατολισμό λίγων λιπόφιλων πλευρικών αλυσίδων, για παράδειγμα Leu81 και Leu182, που παίζουν το ρόλο ενός «μίνι» πτερυγίου. Ένα άλλο σημαντικό χαρακτηριστικό στη δομή της κουτινάσης είναι ότι η οπή του οξυανιόντος προσχηματίζεται στην κουτινάση αντί να προκαλείται από μέσω δέσμησης συνδέτη και φαίνεται να σταθεροποιείται με την πλευρική αλυσίδα της κουτινάσης Ser42 (Nicolas et al., 1996).

1.6 Ακίνητοποίηση Ενζύμων

Η ακίνητοποίηση ενός ενζύμου συνεπάγεται την αλληλεπίδραση δύο ειδών, του ενζύμου και του φορέα (Bornscheuer et al., 2006; Mateo et al. 2007; Sheldon 2007; Cao 2005). Οι επιφανειακές ιδιότητες και των δύο είναι επομένως σημαντικές. Στην περίπτωση του ενζύμου, οι πολικές ομάδες (π.χ. αμινομάδες σε λυσίνη και οξικές ομάδες σε γλουταμικό οξύ), οι μη πολικές περιοχές επιφάνειας ή οι ομάδες με σάκχαρο μπορούν να επηρεάσουν τις ιδιότητες της επιφάνειας. Ο φορέας πρέπει να παρασκευαστεί για να ταιριάζει με οποιαδήποτε από αυτές τις επιφανειακές ιδιότητες του ενζύμου. Μια βασική προϋπόθεση για κάθε φορέα είναι η ανάγκη μιας μεγάλης επιφάνειας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με υλικά μικρού μεγέθους σωματιδίων, αν και αυτό μπορεί να κάνει δυσκολότερο το διαχωρισμό, ή με εξαιρετικά πορώδη υλικά, με πόρους αρκετά μεγάλων διαστάσεων που δεν περιορίζουν τη διάχυση των υποστρωμάτων. Επιπλέον, το υλικό πρέπει να είναι χημικά και μηχανικά σταθερό. Εναλλακτικά, ο φορέας μπορεί να ενθυλακώσει το ένζυμο (Pierre, 2004; Avnir et al., 2006). Στην περίπτωση αυτή, οι πόροι του φορέα πρέπει να είναι επαρκούς μεγέθους για την εξασφάλιση της απρόσκοπτης διάχυσης των υποστρωμάτων διασφαλίζοντας ταυτόχρονα ότι το ένζυμο παραμένει εγκλωβισμένο στο εσωτερικό. Η αγκίστρωση του ενζύμου στον φορέα μπορεί να ενισχυθεί με ομοιοπολική σύνδεση. Δραστικές λειτουργικές ομάδες μπορούν επίσης να εισαχθούν στη μήτρα των πολυμερών υποστηρικτών, με επιλογή κατάλληλου οργανικού μονομερούς (Basso et al., 2003). Στην περίπτωση των πυριτικών, η επιφανειακή παραγωγοποίηση μπορεί να επιτευχθεί μέσω τροποποίησης της επιφάνειας των υδρόξυ ομάδων με κατάλληλα αντιδραστήρια. Στην πιο ακραία περίπτωση αγκίστρωσης, δεν χρησιμοποιείται φορέας και τα μόρια

του ενζύμου συνδέονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τους δικούς τους φορείς (Sheldon 2007).

Γενικά, δεν είναι διαθέσιμη μια μέθοδος που μπορεί να εφαρμοστεί για την ακινητοποίηση του κάθε ενζύμου. Τυπικά η προσέγγιση που ακολουθείται είναι εκείνη της δοκιμής και σφάλματος, μέχρις ότου αναπτυχθεί ένα ικανοποιητικό σύστημα. Με μια τέτοια προσέγγιση, ένα απλό σημείο για την ορθή ακινητοποίηση ενός ενζύμου, αν και δεν εκτιμάται πάντοτε, είναι ότι το ένζυμο πρέπει να είναι σταθερό καθ' όλη την διάρκεια της διαδικασίας ακινητοποίησης (Hanefeld et al., 2009).

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές ακινητοποίησης ανήκουν συνολικά σε πέντε κατηγορίες, καθεμία από τις οποίες εμφανίζει και τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

1. Μη ομοιοπολική προσρόφηση και εναπόθεση
2. Ακινητοποίηση μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων
3. Ομοιοπολική σύνδεση (tethering)
4. Διασταυρούμενη σύνδεση ενός ενζύμου (cross-linking)
5. Εγκλεισμός σε πολυμερική γέλη ή κάψουλα

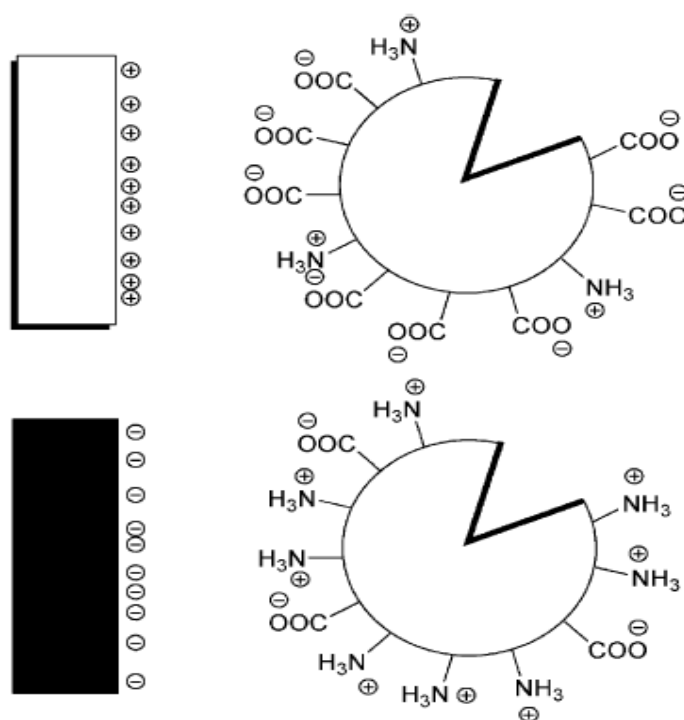
1.6.1 Μη ομοιοπολική προσρόφηση και εναπόθεση

Η προσρόφηση των ενζύμων πάνω σε φορείς μπορεί να προχωρήσει μέσω διαφορετικών τύπων αλληλεπιδράσεων. Ένζυμα με μεγάλη λιπόφιλη επιφάνεια θα αλληλεπιδράσουν καλά με ένα υδρόφοβο φορέα. Οι δυνάμεις van der Waals και οι αλλαγές στην εντροπία διασφαλίζουν την ακινητοποίηση του ενζύμου επί του φορέα. Υπολείμματα σακχάρων γλυκοζυλιωμένων ενζύμων μπορούν να εξασφαλίσουν απορρόφηση μέσω δεσμών υδρογόνου, καθώς μεγάλες υδρόφιλες επιφάνειες του ενζύμου θα αλληλεπιδράσουν με ένα υδρόφιλο φορέα. Το πλεονέκτημα της ακινητοποίησης μέσω επίδρασης της εντροπίας ή μέσω δεσμών υδρογόνου είναι ότι το ένζυμο δε χρειάζεται να προεπεξεργαστεί ή να τροποποιηθεί χημικά. Είναι ακόμη εφικτή η χρήση ακατέργαστων ποσοτήτων ενζύμου (crude) για αυτές τις ακινητοποιήσεις. Μεταβάλλοντας τις συνθήκες ακινητοποίησης επηρεάζονται σημαντικά τα αποτελέσματα και, επομένως, αυτό θα μπορούσε να επιφέρει μια άμεση μετατροπή των ιδιοτήτων του ενζύμου (Cao, 2005).

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της ακινητοποίησης μέσω προσρόφησης είναι ότι το ένζυμο έχει την τάση να εκλυθεί εύκολα από τον φορέα όταν χρησιμοποιείται σε υδατικά μέσα. Αυτή δεν συμβαίνει στην περίπτωση χρησιμοποίησης οργανικών διαλυτών λόγω της εγγενούς αδιαλυτότητας των ενζύμων σε τέτοια μέσα. Στην περίπτωση της εναπόθεσης, το υπόστρωμα απλώς προστίθεται σε ένα υδατικό διάλυμα του ενζύμου και έπειτα ο βιοκαταλύτης ανακτάται με καταβύθιση ή με εξάτμιση της υδατικής φάσης. Ως αποτέλεσμα, το ένζυμο εναποτίθεται στο στερεό υπόστρωμα και κανένας υδρόφοβος ή εντροπικός παράγοντας δεν εμπλέκονται στη διαδικασία ακινητοποίησης. Η πλειοψηφία των ενζύμων που ακινητοποιούνται επί κόνεως SiO₂ παρασκευάζονται σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία (Ferrer et al., 2002).

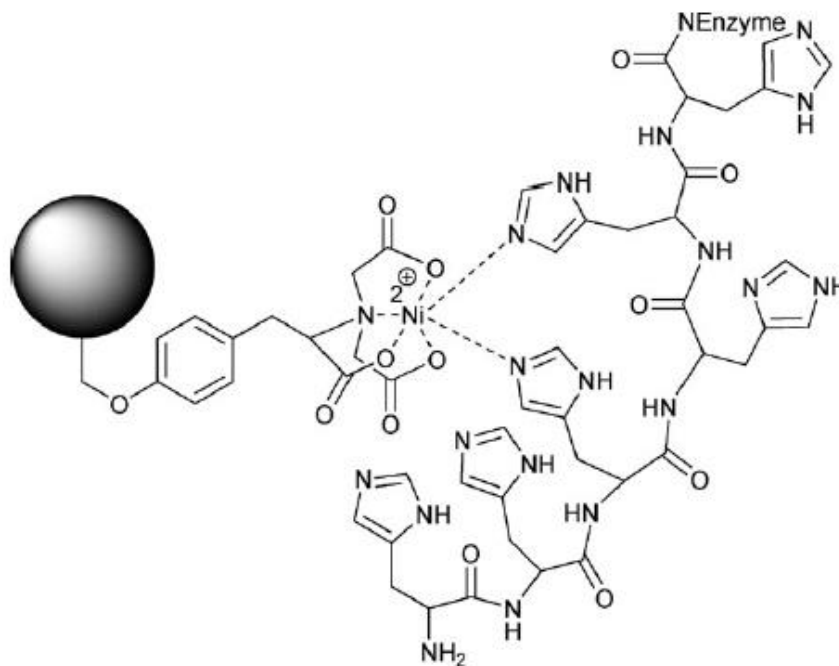
1.6.2 Ακίνητοποίηση μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων

Ανάλογα με το pH του διαλύματος και το ισοηλεκτρικό σημείο, η επιφάνεια του ενζύμου μπορεί να φέρει αλλαγές. Με τη χρήση ευρέως διαθέσιμων συστημάτων μοντελοποίησης, μπορούν εύκολα να υπολογιστούν και να παρουσιαστούν το επιφανειακό φορτίο και η κατανομή του φορτίου ενός ενζύμου (Basso et al., 2005). Ουσιαστικά κάθε εναλλάκτης ιόντων μπορεί να δράσει ως φορέας ακίνητοποίησης μέσω ιοντικών και ισχυρά πολικών αλληλεπιδράσεων. Ανάλογα με το κυρίαρχο φορτίο του ενζύμου (Εικ. 3), ο εναλλάκτης ιόντων πρέπει να είναι είτε αρνητικά (λ.χ. καρβοξυλικός) είτε θετικά φορτισμένος (λ.χ. πρωτονιομένες αμινομάδες).



Εικόνα: Διαφορετικοί τύποι εναλλακτών ιόντων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακίνητοποίηση ενζύμων, ανάλογα με το επιφανειακό φορτίο τους.

Οι δακτύλιοι ιμιδαζολίου από την ιστιδίνη μπορούν να δράσουν ως διασυνδέτες για μεταλλικά ιόντα. Ειδικότερα ιόντα Cu^{2+} , Co^{2+} ή Ni^{2+} έχουν χρησιμοποιηθεί για την συνένωση ενζύμων. Τα ένζυμα πρέπει να περιέχουν εύκολα προσβάσιμα υπολείμματα ιμιδαζολίου ή γενετικώς εισαγμένη αλληλουχία His (σε μικρή αλληλουχία με έξι ιστιδίνες, Εικ. 4).



Εικόνα: Ιόν Ni^{2+} προσδεμένο σε αλληλουχία His (His-Tag)

Η ιοντική ακινητοποίηση εξαρτάται έντονα από την τιμή του pH και τις συγκεντρώσεις αλάτων κατά τη διάρκεια της ακινητοποίησης, αλλά και κατά την εφαρμογή. Παρόμοια με την έκπλυση σε υδατικά μέσα που περιγράφεται για ένζυμα που ακινητοποιούνται μέσω δεσμών υδρογόνου, υψηλές συγκεντρώσεις άλατος μπορούν να οδηγήσουν σε ανταλλαγή ιόντων και έκπλυση των ενζύμων ακινητοποιημένων μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Τέλος επισημαίνεται πως το μέγεθος των πόρων των εναλλακτών ιόντων αποτελεί ουσιώδη παράμετρο που πρέπει να αποτελεί μέρος του σχεδιασμού της ακινητοποίησης.

1.6.3 Ομοιοπολική σύνδεση (tethering)

Η ομοιοπολική πρόσδεση ενός ενζύμου σε ένα φορέα έχει το πλεονέκτημα ότι το ένζυμο είναι καλά σταθεροποιημένο. Με αυτόν τον τρόπο ελαχιστοποιείται η έκπλυση του ενζύμου σε υδατικά μέσα και αποτρέπεται μια πρωτεϊνική μόλυνση του προϊόντος. Ως γενικός κανόνας, η ομοιοπολική ακινητοποίηση θα πρέπει να προτιμάται σε περιπτώσεις υδατικών διαλυμάτων και ύπαρξης παραγόντων μετουσίωσης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο σχηματισμός των πολλαπλών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ ενζύμου και φορέα μειώνει την ευκαμψία και τις θερμικές δονήσεις εμποδίζοντας έτσι το ξεδίπλωμα και τη μετουσίωση της πρωτεΐνης. Συνολικά, τα ομοιοπολικά ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε οποιοδήποτε μέσο, ενώ τα προσροφημένα ένζυμα θα πρέπει να εφαρμόζονται σε οργανικούς διαλύτες ή σε καθαρά υδρόφοβα αντιδραστήρια για την αποφυγή έκπλυσης.

Ένα σαφές μειονέκτημα της ομοιοπολικής πρόσδεσης είναι ότι το ένζυμο τροποποιείται χημικά. Μια κατεύθυνση σωστής τροποποίησης είναι δύσκολη αλλά

όχι αδύνατη. Όπως θα ήταν αναμενόμενο, η ακινητοποίηση δεν συμβαίνει με ενιαίο τρόπο για όλα τα μόρια του ενζύμου σε μία παρτίδα. Παρ' όλα αυτά, η προσκόλληση πολλαπλών ενζύμων μπορεί να επιτευχθεί συνδέοντας τα ερμητικά με τον φορέα. Κάτι τέτοιο δεν περιορίζεται μόνο στα μονομερή ένζυμα, αλλά περιλαμβάνει επίσης και τα πολλαπλομερή.

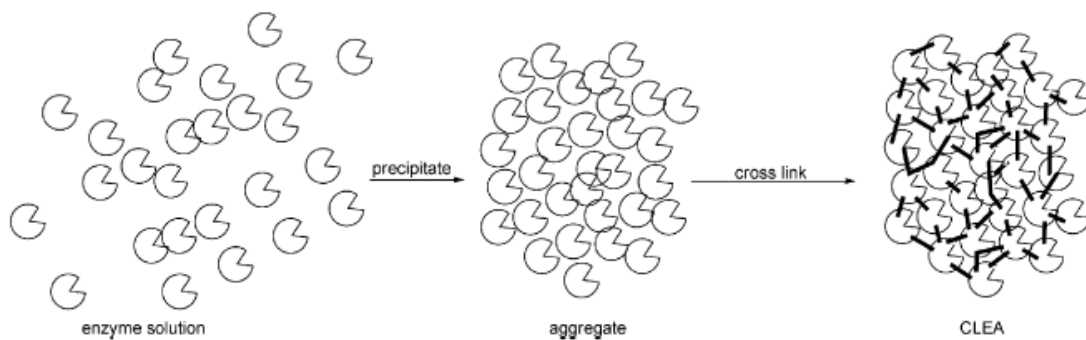
Συνηθέστερα, οι αμινομάδες του ενζύμου είναι εκείνες που χρησιμοποιούνται για την ομοιοπολική ακινητοποίηση. Ωστόσο, και άλλες λειτουργικές ομάδες της επιφάνειας του ενζύμου μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν, συμπεριλαμβανομένων των υπολείμματα σακχάρων (Basso et al., 2007). Η αμινομάδα ως πυρηνόφιλη μπορεί να «επιτεθεί» για παράδειγμα σε ένα εποξειδίο ή μία αλδεΐδη. Κατά το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου ομοιοπολικής ακινητοποίησης, πρέπει να εξεζητούνται προσεκτικά όλα τα συστατικά των εγγενών ενζυμικών παρασκευασμάτων. Τις περισσότερες φορές, τα εγγενή ένζυμα είναι εμπορικά διαθέσιμα σαν ακατέργαστα παρασκευάσματα που περιέχουν διάφορα πρόσθετα, όπως πολυόλες και σάκχαρα που συνήθως προστίθενται ως σταθεροποιητές. Η πραγματική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες μπορεί να είναι πολύ χαμηλή (< 5%) και θα πρέπει πάντα να λαμβάνεται υπόψη η παρεμβολή από άλλα δραστικά χημικά είδη.

Ο οξικός βινυλεστέρας χρησιμοποιείται συχνά ως ακυλοδότης στην ακυλίωση των αλκοολών καταλυόμενη από λιπάση σε ξηρούς οργανικούς διαλύτες. Το παραπροϊόν ακεταλδεΐδης απελευθερώνεται, το οποίο μπορεί να είναι επιβλαβές για το ένζυμο, δεδομένου ότι σχηματίζει μία βάση Schiff με τις επιφανειακές αμινομάδες.

1.6.4 Διασταυρούμενη σύνδεση ενός ενζύμου (cross-linking)

Μια ακραία περίπτωση ομοιοπολικής πρόσδεσης είναι η διασταυρούμενη σύνδεση των ενζύμων (cross-linking) χρησιμοποιώντας ένα παράγοντα σύνδεσης όπως είναι η γλουταραλδεΐδη. Αντί για την σταθεροποίηση του ενζύμου σε ένα φορέα, το ένζυμο δρα εδώ ως ο δικός του φορέας. Το πρώτο βήμα είναι η δημιουργία συσσωματωμάτων ή κρυστάλλων ενζύμων ή ενζύμων σε αποξηραμένη, με ψεκασμό, μορφή. Ωστόσο, ακόμη και ένζυμα τα οποία βρίσκονται σε διάλυμα μπορούν να διασταυρωθούν. Το διασταυρωμένο και κατά συνέπεια ακινητοποιημένο ένζυμο είναι ελεύθερο φορέα, δηλαδή λαμβάνεται σχεδόν καθαρό ένζυμο, εξαλείφοντας τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που συνδέονται με τους φορείς (Sheldon, 2007).

Τα Διασταυρωμένα Συσσωματώματα Ενζύμου (CLEA) παρασκευάζονται αρχικά με την συσσωμάτωση των ενζύμων. Η προσθήκη παραγόντων καταβύθισης όπως ακετόνη, θειικό αμμώνιο, αιθανόλη ή 1,2-διμεθοξυαιθάνιο ακολουθείται από ένα παράγοντα δημιουργίας σταυροδεσμών, συνήθως τη γλουταραλδεΐδη (Εικ. 5). Η διμίνη που λαμβάνεται με αυτόν τον τρόπο μπορεί, αλλά συνήθως δεν απομειώνεται.

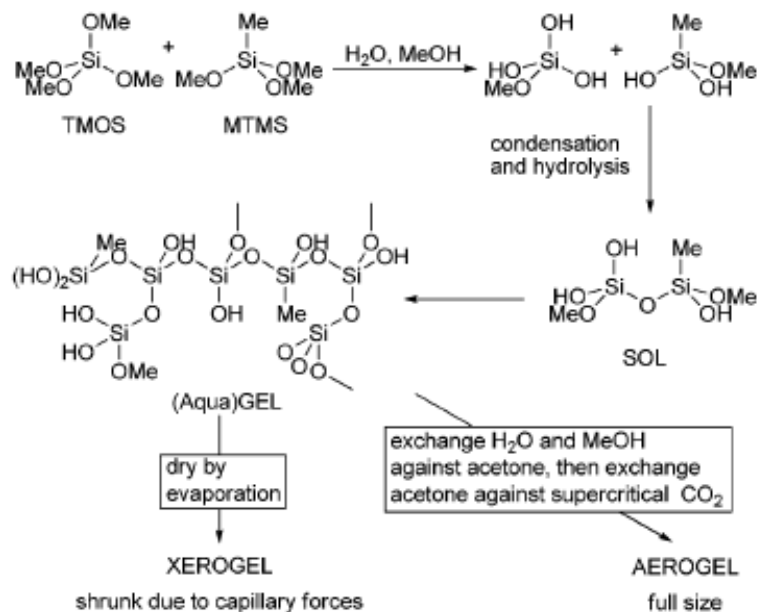


Εικόνα 5: Δημιουργία συσσωμάτων & σταυροδεσμών ενός ενζύμου για την παρασκευή CLEA

Συχνά περιλαμβάνονται και πρόσθετα στα CLEAs. Η λιπάση από την οικογένεια βακτηρίων *Burkholderia cepacia* (BCL), για παράδειγμα, ακινητοποιήθηκε με σταυροειδείς δεσμούς με την αλβουμίνη βόειου ορού ως αντιδραστήριο προστασίας παρουσία δεξτρίνης. Όταν το CLEA του BCL που περιέχει δεξτρίνη συγκρίθηκε με το εμπορικό παρασκεύασμα Amano PS, ήταν σημαντικά πιο δραστικό. Επίσης εμφάνιζε μεγαλύτερη δραστηριότητα από το ξηρό πήκτωμα (xerogel) του BCL. Επιπλέον, το CLEA του BCL παρουσίασε βελτιωμένη εναντιοεπιλεκτικότητα. Ωστόσο, ένας καταλύτης θα πρέπει να είναι σχεδόν αμετάβλητος πριν, κατά τη διάρκεια και κατά το πέρας της αντίδρασης και θα πρέπει να είναι ανακυκλώσιμος. Κατί τέτοιο δεν συμβαίνει στην περίπτωση του CLEA του BCL. Στην ακυλίωση μιας αλκοόλης με οξικό βινυλεστέρα σε ξηρό DIPE (δισοπροπυλαιθέρας), το CLEA έχασε ταχέως τη δραστηριότητά του (28% στον δεύτερο κύκλο). Αντίθετα το ξηρό πήκτωμα BCL ήταν πολύ πιο σταθερό και θα μπορούσε να ανακυκλωθεί πολλές φορές (Hara et al., 2008).

1.6.5 Εγκλεισμός σε πολυμερική γέλη ή κάψουλα

Ο καλύτερος τρόπος για να αποφευχθεί οποιαδήποτε αρνητική επίδραση στη δομή ενός ενζύμου είναι ο εγκλεισμός του. Πολλές μέθοδοι εγκλεισμού έχουν αναπτυχθεί, με τη μέθοδο sol-gel να είναι η πιο υποσχόμενη και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική (Pierre, 2004; Avnir et al., 2006). Τα Sol-gels είναι υλικά πυριτίου που είναι εξαιρετικά πορώδη και παρασκευάζονται εύκολα (Εικόνα 6). Το πήκτωμα sol-gel είναι μια χημικώς αδρανής ύαλος που μπορεί να διαμορφωθεί με οποιοδήποτε επιθυμητό τρόπο και σε οποιοδήποτε σχήμα. Μπορεί να σχεδιαστεί ώστε να είναι θερμικά και μηχανικά πολύ σταθερή, ωστόσο μια τυπική ύαλος είναι αρκετά εύθραυστη. Οι ύαλοι sol-gel έχουν χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην ακινητοποίηση των πρωτεϊνών και ειδικότερα στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Αν και οι ύαλοι sol-gel είναι πορώδεις, η διάχυση του υποστρώματος στο ένζυμο μπορεί να περιοριστεί επομένως απαιτείται να ληφθεί μέριμνα ώστε μια ανάλογη διάχυση να αποφευχθεί.



Εικόνα 6: Η σύνθεση των sol-gels

Η σύνθεση του πηκτώματος sol-gel είναι σχετικά αβλαβής για πολλά ένζυμα. Στο πρώτο στάδιο ένα τετρααλκοξυσιλάνιο (π.χ. tetramethoxysilane, TMOS) υδρολύεται μέσω καταλυτική οξείδωση. Η υδρόλυση ακολουθείται από συμπύκνωση και το κολλοειδές διάλυμα σχηματίζεται. Αυτό είναι ένα μίγμα από μερικώς υδρολυμένα και μερικώς συμπυκνωμένα μονομερή. Όταν η συμπύκνωση συνεχίζεται περαιτέρω, σχηματίζεται η γέλη. Όλοι οι πόροι αυτού του πηκτώματος πληρώνονται με νερό και αλκοόλη, κάτι που είναι επομένως γνωστό ως aquagel. Όταν το aquagel ξηραίνεται με εξάτμιση λαμβάνεται αντίστοιχα μια ξηρή γέλη (xerogel). Λόγω της δράσης των τριχοειδών δυνάμεων κατά τη διάρκεια της εξάτμισης το aquagel συρρικνώνεται και μέρος της δομής του καταρρέει. Το xerogel συνεπώς δεν έχει την ίδια δομή με το aquagel. Για την αποφυγή τέτοιων τριχοειδών δράσεων το νερό στο aquagel ανταλλάσσεται με ακετόνη και στη συνέχεια με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα. Κατά την εξάτμιση του διοξειδίου του άνθρακα, η δομή του aquagel διατηρείται και λαμβάνεται ένα εύθραυστο aerogel (Pierre, 2004). Με αυτόν τον τρόπο παρασκευάζονται υδρόφιλα υδατο-, ξηρο- και αεροπηκτώματα. Με την προσθήκη στο μίγμα σύνθεσης μεθυλτριμεθοξυσιλανίου (MTMS), μπορεί να ληφθούν πηκτώματα sol-gel με υδρόφοβη επιφάνεια. Συνολικά, η μέθοδος sol-gel μπορεί να δημιουργήσει πηκτώματα με πολύ διαφορετικές ιδιότητες.

Στην περίπτωση των λιπασών, οι υδρόφοβες επιφάνειες μπορεί να έχουν μια πολύ θετική επίδραση στην δραστηρότητα τους, δεδομένου ότι είναι ικανές να προκαλέσουν διεπιφανειακή ενεργοποίηση, δηλαδή η λιπάση μπορεί να βρίσκεται στην ενεργή διαμόρφωσή της. Συνεπώς, τα υδρόφοβα sol-gels μπορούν να ενεργοποιήσουν τις λιπάσες. Επιπλέον, τα μάλλον εύθραυστα πηκτώματα sol-gel μπορούν να ενισχυθούν με την ενσωμάτωση μηχανικά πορώδων σφαιριδίων υάλου ή ινών πυριτίου κατά τη

διάρκεια της σύνθεσής τους (Orçaire et al., 2006; Reetz et al., 2003). Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ληφθούν πολύ ενεργές και ταυτόχρονα σταθερές λιπάσες.

1.7 Ακίνητοποίηση Κουτινάσης

Σε αρκετές περιπτώσεις, έχει πραγματοποιηθεί ακίνητοποίηση της κουτινάσης με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας και της ενεργότητάς της για την χρήση της σε ορισμένη κατηγορία αντιδράσεων, όπως οι αντιδράσεις σύνθεσης. Ταυτόχρονα μέσω της ακίνητοποίησης γίνεται ευκολότερη η ανάκτηση και στην συνέχεια η επαναχρησιμοποίησή της. Κάτι τέτοιο μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ακίνητοποίηση της κουτινάσης σε στερεό φορέα. Εκτός της θερμοσταθερότητας, ο φορέας προσφέρει και τον εγκλωβισμό νερού στο μικροπεριβάλλον των ενζυμικών μορίων που είναι απαραίτητο για σταθερότητα και ενεργότητα του ενζύμου. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις αποτελούν οι ακίνητοποιήσεις της ανασυνδυασμένης κουτινάσης του *Fusarium solani pisi* σε ζεόλιθο NaY και σε πολυαμίδιο Accurel PA6. Η κουτινάση και στις δύο περιπτώσεις ακίνητοποιήθηκε με εναπόθεση. Τα διαλύματα των ενζύμων που παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 9 (βέλτιστο) προστέθηκαν στους στερεούς φορείς (25 mg κουτινάσης / g φορέα). Μετά από ανάμιξη με στροβιλισμό επί 1 min, τα παρασκευάσματα ακίνητοποιημένου ενζύμου ξηράθηκαν υπό κενό για τουλάχιστον 24 ώρες.

Τα χαρακτηριστικά των ακίνητοποιημένων παρασκευασμάτων ενζύμων επηρεάστηκαν έντονα από τις ιδιότητες των φορέων ακίνητοποίησης, δηλαδή, την πορώδη δομή και την υδροφοβικότητα / υδροφιλικότητα. Η ακίνητοποιημένη κουτινάση επί του ζεολίθου NaY παρουσιάζει υψηλότερη εξάρτηση δραστηριότητας από το περιεχόμενο νερό σε σχέση με την κουτινάση που ακίνητοποιήθηκε επί του φορέα Accurel PA6. Η πολικότητα των οργανικών διαλυτών του συστήματος αντίδρασης οδηγεί επίσης σε διαφορετικές συμπεριφορές του ενζύμου κατά τη σύγκριση των δύο φορέων. Συνεπώς, η κουτινάση που ακίνητοποιήθηκε επί του υδρόφιλου φορέα (ζεόλιθος NaY) εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα στο κ-επτάνιο ($\log P = 4,0$), ενώ οι διαλύτες με υψηλότερο $\log P$ προτιμώνται από την κουτινάση που ακίνητοποιήθηκε επί του περισσότερο υδρόφοβου φορέα PA6. Αμφότεροι φορείς οδήγησαν σε μια βέλτιστη ενεργότητα για ακίνητοποίηση σε pH 9,0. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενζυμικής ενεργότητας και στους δυο φορείς ακίνητοποίησης. Τέλος η κουτινάση που ακίνητοποιήθηκε στον ζεόλιθο NaY παρουσιάζει υψηλότερη σταθερότητα σε σχέση με τον φορέα πολυαμιδίου και επομένως ο ζεόλιθος φαντάζει πολλά υποσχόμενος για την ακίνητοποίηση ενζύμων και ειδικότερα της κουτινάσης (Gonçalves et al., 1997).

Μια ακόμα περίπτωση που χρήζει αναφοράς είναι η, με ομοιοπολική σύνδεση, ακίνητοποίηση της ανασυνδυασμένης κουτινάσης του *Fusarium solani pisi*, που κλωνοποιήθηκε σε βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli*, σε δυο πυριτικούς φορείς, *Biosil-NH₂* και *Biosil-Dextran-NH₂*, και στην δεξτράνη (Gonçalves et al., 1998).

Αρχικά για την ακινητοποίηση της κουτινάσης στους φορείς *Biosil-NH₂* και *Biosil-Dextran-NH₂*, καθένας από τους δύο φορείς (1 g) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με διαλύματος γλουταραλδεΐδης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,0 για 5 λεπτά. Αμφότεροι οι φορείς ξεπλύθηκαν ακολούθως με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα της κουτινάσης (10 ml, 4 mg ml⁻¹) προστέθηκε στον ενεργοποιημένο φορέα. Η ακινητοποίηση διεξήχθη σε θερμοκρασία δωματίου για 18 h σε αναδευτήρα. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα, το υλικό διηθήθηκε και ξεπλύθηκε δύο φορές.

Όσον αφορά την σύζευξη της δεξτράνης-CHO με την κουτινάση, το μείγμα αντέδρασε για 4 ώρες με ήπια ανάδευση. Η ασύζευκτη κουτινάση διαχωρίστηκε στην συνέχεια από το υπόλοιπο μίγμα με χρωματογραφία διήθησης πηκτής

Στα υδατικά μέσα, οι ακινητοποιημένες *Biosil-NH₂*- και *Biosil-δεξτράνη-NH₂*-κουτινάσες εμφανίζουν παρόμοια καταλυτική συμπεριφορά, καθώς και μια παρόμοια συμπεριφορά ως προς τη σταθερότητα. Ωστόσο, η παρουσία του πολυσακχαρίτη επί της επιφανείας του φορέα και η δυναμική δράση του ως προς την εκλεκτική ενυδάτωση του μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου, καθιστούν αυτό το είδος φορέα ελκυστικό σε μη συμβατικές εφαρμογές, ιδίως για τις αντιδράσεις σύνθεσης (εστεροποίηση και μετεστεροποίηση). Επιπλέον, όπως απέδειξε η θερμιδομετρική ανάλυση που έλαβε χώρα, η ακινητοποίηση και στους δύο φορείς έκανε την κουτινάση πιο ανθεκτική στη θερμότητα. Η αύξηση στην θερμοκρασία μετουσίωσης (T_M) που παρατηρήθηκε για την *Biosil-Dextran-NH₂*-κουτινάση (9 °C) είναι μεγαλύτερη από εκείνη που παρατηρήθηκε για την κουτινάση-δεξτράνης (6 °C) και η οποία πιθανότατα σχετίζεται περισσότερο με τον αριθμό των ομοιοπολικών δεσμών που εμπλέκονται παρά με τη φύση του φορέα. Οι αυξήσεις που παρατηρήθηκαν στην T_M και στις τρεις περιπτώσεις αντανακλούν μια αύξηση στην σταθερότητα που απέκτησε η κουτινάση, με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μακροπρόθεσμης σταθερότητας και τη δυνατότητα για εφαρμογές σε υψηλότερη θερμοκρασία (Gonçalves et al., 1999).

Ως τελευταία και πιο πρόσφατη μέθοδος ακινητοποίησης της κουτινάσης αξίζει να αναφερθεί και η ακινητοποίηση της σε σφαιρίδια χιτοζάνης, τα οποία έχουν ενεργοποιηθεί με χρήση γλουταραλδεΐδης. Η χιτοζάνη είναι ένα από τα άφθονα φυσικά βιοπολυμερή, αποτελούμενη από β-(1,4) συνδεδεμένες μονάδες D-γλυκοζαμίνης (Kumar M., 2000). Η διαθεσιμότητα, η φθινή μέθοδος παρασκευής, μη-τοξικότητα και η βιοσυμβατότητα της την έχει καταστήσει ένα εξαιρετικό πολυμερές με εφαρμογή σε διάφορα πεδία. Η ενζυμική τεχνολογία έχει αξιοποιήσει τη χιτοζάνη για την ακινητοποίηση ενζύμων με διάφορες μεθόδους συμπεριλαμβανομένης της προσρόφησης, του εγκλεισμού και της διασταυρούμενης σύνδεσης. Οι Αμινο- και υδροξυλ- ομάδες που είναι παρούσες στην πολυμερική επιφάνεια της χιτοζάνης ευνοούν σημαντικά τη διαδικασία ακινητοποίησης με ομοιοπολικό δεσμό έπειτα από ενεργοποίηση με γλουταραλδεΐδη ή καρβοδιιμίδιο, η οποία ακολουθείται από τη σύζευξη του ενζύμου (Hung et al., 2003).

Τα σφαιρίδια χιτοζάνης τελικά απέδωσαν ένα ποσοστό ακινητοποίησης μεγαλύτερο του 70%. Η λειτουργική σταθερότητα της ακινητοποιημένης κουτινάσης (pH, θερμοκρασία, επαναχρησιμοποίηση) μελετήθηκε και έδειξε καλή σταθερότητα σε αλκαλικά pH και θερμοσταθερότητα. Ακόμη παρατηρήθηκε μια εξαιρετικά καλή ικανότητα επαναχρησιμοποίησης και αποθήκευσης ακόμα και μετά από 10 χρήσεις και

11 ημέρες αποθήκευσης, με διατήρηση πάνω από το 90% της αρχικής ενεργότητας. Επιπρόσθετα, η αντοχή στην απώλεια ενεργότητας έπειτα από επαναλαμβανόμενες ξηράνσεις με κατάψυξη αποτελεί μια υποσχόμενη παράμετρο σε διάφορες εφαρμογές όπως οι αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης. Συμπερασματικά, η κουτινάση που ακινητοποιείται σε σφαιρίδια χιτοζάνης ενεργοποιημένα με γλουταραλδεϋδη επιδεικνύει βελτιωμένη λειτουργική σταθερότητα σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο, γεγονός που το καθιστά ιδανικό για την οικονομική παραγωγή ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε βιομηχανική κλίμακα (Krishnamoorthy & Venkata, 2014).

1.8 Η κουτινάση σε οργανικούς διαλύτες

Πολλές από τις αντιδράσεις (εστεροποίηση, μετεστεροποίηση) τις οποίες καταλύει μια κουτινάση λαμβάνουν χώρα σε οργανικούς διαλύτες. Έτσι, ένα ένζυμο με ανθεκτικότητα σε κάποιους από αυτούς τους διαλύτες έχει ακόμα μεγαλύτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Η κουτινάση του *F. oxysporum* ύστερα από επώασή της σε διάφορα οργανικά μέσα (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, επτανόλη, οκτανόλη, 2-νονανόλη, εξάνιο, οκτάνιο, ισοοκτάνιο, δεκάνιο, τολουένιο, ακετόνη, τετραϋδροφουράνη) αύξησε την ενεργότητά της. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε κάποιους διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, βουτανόλη, ακετόνη, τετραϋδροφουράνη) χανόταν το μεγαλύτερο μέρος της ενεργότητας του ενζύμου (< 20%), ενώ στους υπόλοιπους αυξανόταν έντονα (150-180%) (Speranza & Macedo, 2013). Η κουτινάση του *Thielavia terrestris* επώαστηκε σε 80% οργανικών διαλυτών. Στις μεθανόλη και αιθανόλη η ενεργότητα παρέμεινε ίδια, ενώ παρατηρήθηκε ελαφρά αύξηση και μείωση στην ισοπροπανόλη και το ακετονιτρίλιο αντίστοιχα, ενώ 1,4 φορά αύξηση στο διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethyl sulfoxide, DMSO) (Yang et al., 2013). Σε μια επώαση των δύο κουτινασών *T. fusca* σε 75% οργανικού διαλύτη για, τα ένζυμα έδειξαν μεγάλη αντοχή στους διαλύτες μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, n-εξάνιο και DMSO, αλλά ήταν λιγότερο σταθερά στους διαλύτες ισοπροπανόλη και βουτανόλη. Αντίθετα, η κουτινάση του *F. solani* ήταν πολύ ασταθής σε όλους τους διαλύτες εκτός από το n-εξάνιο (30% απώλεια) (Chen et al., 2010). Η επίδραση της συγκέντρωσης της βενζυλικής αλκοόλης (BA) και του διμεθυλακεταμιδίου (DMA) (παράγοντες διόγκωσης πολυαμιδικών υφασμάτων) στον χρόνο ημιζωής της κουτινάσης GCI 2002/1410 ερευνήθηκε και βρέθηκε πως η βέλτιστη είναι 10% BA+1,5% DMA, με σκοπό την ικανοποιητική υδρόλυση πολυαμιδικών ινών (Silva et al., 2005b).

1.9 Αντιδράσεις καταλυόμενες από Κουτινάσες

1.9.1 Υδρόλυση

Η κουτινάση καταλύει την υδρόλυση εστέρων της παρανιτροφαινόλης (p-NP) με διαφορετικά μήκη ανθρακικής αλυσίδας (C₂-C₁₆), έχοντας μεγαλύτερη προτίμηση στους εστέρες με 4 άτομα άνθρακα (Chen et al., 2010; Thumarat et al., 2012; Yang et al., 2013). Επίσης, μπορεί και υδρολύει την τριβουτυρίνη (εστέρας C₄) αποτελεσματικά σε διαφασικό σύστημα, κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλίων (critical micellar concentration-CMC), ενώ σε συγκεντρώσεις που ξεπερνούν το CMC το ένζυμο μπορεί και απομακρύνει όλη την τριβουτυρίνη από την λιπιδική φάση (Flipsen et al., 1996; Chen et al., 2010). Ακόμα, έχει μελετηθεί η υδρόλυση διάφορων τριγλυκεριδίων (tricaprylin-C₈, trilaurin-C₁₂, trimyristin-C₁₄, triolein-C₁₈) σε αντίστροφα μικκύλια AOT (sodium bis[2-ethylhexyl] sulfosuccinate) /ισοοκτάνιο. Και στα δύο συστήματα προσδιορίστηκε το βέλτιστο pH 9-10 και το ένζυμο έδειξε μεγαλύτερη ενεργότητα στα υποστρώματα με το μικρότερο μήκος αλυσίδας του τριγλυκεριδίου (η τρικαπρυλίνη στην προκειμένη περίπτωση) (Melo et al., 1995). Τα δεδομένα αυτά είναι σε συμφωνία με άλλα που προέκυψαν από τη μελέτη αναλόγων τριγλυκεριδίων για την εκλεκτικότητα και ειδικότητα της κουτινάσης (Mannesse et al., 1995). Η υδρόλυση της τρικαπρυλίνης έχει μελετηθεί και με κουτινάση προσροφημένη σε ζεόλιθο NaY (Gonçalves et al., 1996b), ομοιοπολικά συζευγμένη σε πορώδες πυρίτιο και εγκλεισμένη σε αλγινικό ασβέστιο (Gonçalves et al., 1996a). Το βέλτιστο pH και στις 3 περιπτώσεις βρέθηκε να είναι το 8, ενώ η μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα εντοπίστηκε στην προσροφημένη σε ζεόλιθο κουτινάση. Για την εγκλεισμένη κουτινάση παρατηρήθηκε κινητική Michaelis-Menten για συγκεντρώσεις υποστρώματος κάτω από 200 mM, ενώ για συγκεντρώσεις πάνω από 400 mM υπήρξε παρεμπόδιση από το υπόστρωμα. Στην αντίδραση με το ακινητοποιημένο σε στερεούς φορείς ένζυμο παρατηρήθηκαν περιορισμοί διάχυσης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος (35 mM) και παρεμπόδιση σε συγκεντρώσεις πάνω από 150 mM.

1.9.2 Εστεροποίηση

Η σύνθεση των εστέρων λιπαρών οξέων με κουτινάση έχει αναλυθεί σε αντίστροφα μικκύλια τόσο ανιονικών, AOT, (Sebastião et al, 1993; Sebastião et al, 1992) όσο και κατιονικών, CTAB, τασιενεργών (Cunnah et al., 1996). Η εστεροποίηση ελαϊκού οξέος με αλειφατικές αλκοόλες με μικροενθυλακωμένη κουτινάση σε ανεστραμμένα μικκύλια AOT έδειξε ότι η κουτινάση έχει μια προτίμηση σε αλκοόλες C₅ έως C₆, αντικατοπτρίζοντας τόσο την εγγενή επιλεκτικότητα του ενζύμου όσο και τη διαφορετική προσβασιμότητα των υποστρωμάτων αλκοόλης στο ενεργό κέντρο της κουτινάσης (Sebastião et al, 1993; Sebastião et al, 1992). Η επίδραση του μήκους της αλυσίδας των λιπαρών οξέων για την εστεροποίηση της εξανόλης αξιολογήθηκε επίσης, και η μέγιστη ενεργότητα λήφθηκε με το βουτυρικό οξύ, επιβεβαιώνοντας την εκλεκτικότητα της κουτινάσης προς τα υποστρώματα βραχείας αλυσίδας. Οι ίδιες αντιδράσεις διεξήχθησαν επίσης με κουτινάση εγκλεισμένη σε ανεστραμμένα μικκύλια CTAB και μπορούν να εξαχθούν παρόμοια συμπεράσματα (Cunnah et al., 1996),

δηλαδή η ενεργότητα της κουτινάσης ήταν μέγιστη για την εστεροποίηση της εξανόλης με βουτυρικό οξύ. Ωστόσο, η ενεργότητα της κουτινάσης στα αντίστροφα μικκύλια AOT ήταν υψηλότερη από ό,τι στα αντίστροφα μικκύλια CTAB.

Η εστεροποίηση του καπρυλικού οξέος με βουτανόλη εκτελέστηκε επίσης με λυοφιλωμένη κουτινάση (Sarazin et al., 1992; Sarazin et al., 1995) σε ένα σωλήνα NMR εντός του ανιχνευτή του φασματόμετρου. Με αυτό τον τρόπο επιτεύχθηκε το 80% της εστεροποίησης μετά από 7 ώρες.

Η σύνθεση του εστέρα του βουτυρικού οξέος με τη 2-βουτανόλη πραγματοποιήθηκε από κουτινάση μικροεγκλεισμένη σε μη ιονική τασιενεργή ουσία, τη φωσφοτιδυλοχολίνη (Pinto-Sousa et al., 1994). Η ενζυμική ενεργότητα για τη σύνθεση του βυνλικού εστέρα του βουτυρικού οξέος αυξήθηκε αυξανόμενων των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων σύμφωνα με μια κινητική Michaelis-Menten. Ωστόσο, για συγκεντρώσεις 2-βουτανόλης και βουτυρικού οξέος υψηλότερες από 500 και 200 mM, αντίστοιχα, παρατηρήθηκε αναστολή της κουτινάσης. Οι φαινόμενες σταθερές Michaelis που λήφθηκαν για τη 2-βουτανόλη και το βουτυρικό οξύ ήταν 47,2 και 38,8 mM, αντίστοιχα.

Η εστεροποίηση του εξανοϊκού οξέος με εξανόλη έχει επίσης πραγματοποιηθεί σε μερικές μελέτες (Σερέτη et al., 1997; Cunnah et al., 1996). Σε υπερκρίσιμο CO₂ (Σερέτη et al., 1997), αυτή η αντίδραση ήταν πολύ αργή σε σύγκριση με ένα σύστημα αντίστροφων μικυλίων CTAB (Cunnah et al., 1996). Η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης σε υπερκρίσιμο CO₂ ήταν σημαντικά χαμηλότερη, περίπου 1,1 nmol / min.mg πρωτεΐνης, σε σχέση με τα αντίστροφα μικύλια CTAB όπου είχε τιμή 14 nmol / min.mg πρωτεΐνης. Επίσης, η ισορροπία στο υπερκρίσιμο μέσο αντίδρασης επιτεύχθηκε μόλις μετά από 5 ημέρες.

Η εστεροποίηση του λαυρικού οξέος με πεντανόλη με χρήση κουτινάσης μικροεγκλεισμένης σε αντίστροφα μικκύλια AOT διεξήχθη σαν ένα σύστημα-μοντέλο για τη μελέτη των δομικών και καταλυτικών ιδιοτήτων του ενζύμου χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία EPR του επισημασμένου δραστικής θέσης (Papadimitriou et al., 1996). Εκτιμήθηκε, επομένως, η επίδραση της περιεκτικότητας σε νερό στην ενεργότητα της κουτινάσης, με τη μέγιστη να είναι στο $w_0 = 9$. Έως $w_0 = 9$ υπήρξε αύξηση τόσο της ενεργότητας όσο και της κινητικότητας του ενεργού κέντρου. Καθώς η περιεκτικότητα σε νερό του συστήματος έγινε υψηλότερη, η κινητικότητα του περιστροφής σταθεροποιήθηκε ενώ η ενζυμική ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά. Κινητικές μελέτες επέτρεψαν τον προσδιορισμό των φαινομενικών κινητικών παραμέτρων, K_m (πεντανόλη) = 208 mM και K_m (λαυρικό οξύ) = 60 mM. Τέλος, παρουσιάστηκε η σύνθεση ολεϊκών γλυκεριδίων, μονοολεϊνης, διολεϊνης και τριελαϊνης, που καταλύεται από λυοφιλωμένη κουτινάση (Melo et al., 1995a) χρησιμοποιώντας την τεχνική μονομοριακής μεμβράνης. Η φάση του νερού αντικαταστάθηκε από γλυκερόλη, και ένα φιλμ ελαϊκού οξέος αρχικά απλώθηκε στην επιφάνεια της γλυκερόλης. Περισσότερο από το 50% του φιλμ ελαϊκού οξέος ακυλώθηκε μετά από 7 λεπτά αντίδρασης.

1.9.3 Μετεστεροποίηση

Η αντίδραση μετεστεροποίησης (αλκοόλυση) του οξικού βουτυλεστέρα με εξανόλη σε οργανικά μέσα (ισοοκτάνιο) έχει αξιολογηθεί σε διάφορα συστήματα (Serralha et al., 1998; Cunnah et al., 1996; Carvalho et al., 1997a; Carvalho et al., 1998a). Οι επιδράσεις των συνθηκών της αντίδρασης, δηλαδή το περιεχόμενο νερό, η θερμοκρασία, η μοριακότητα, το pH, οι συγκεντρώσεις εξανόλης και οξικού βουτυλεστέρα, στην ικανότητα μετεστεροποίησης της κουτινάσης η οποία ήταν μικροεγκλεισμένη σε αντίστροφα μικκύλια AOT, αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία παραγοντικού σχεδιασμού (Carvalho et al., 1997a).

Με γνώση της απόκρισης του συστήματος στο σχεδιασμό του πειράματος, υπολογίστηκαν τα αποτελέσματα του κάθε παράγοντα και προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις τους. Η μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας εφαρμόστηκε στη βελτιστοποίηση της αντίδρασης μετεστεροποίησης. Οι βέλτιστες ενεργότητες της κουτινάσης ελήφθησαν για 490 mM εξανόλης, και σε μια περιοχή θερμοκρασίας από 40 έως 50 °C. Η τιμή του w_0 επηρέασε σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητα και η βέλτιστη περιοχή ήταν μεταξύ 5-8. Μια τιμή pH μεταξύ 7-8 και μια μοριακότητα του ρυθμιστικού διαλύματος 200 mM είναι επαρκείς για την αντίδραση μετεστεροποίησης.

Η ίδια αντίδραση μετεστεροποίησης έχει επίσης αξιολογηθεί με κουτινάση προσροφημένη σε ζεόλιθους και άλλους κοινώς χρησιμοποιούμενους φορείς (πολυαμίδιο, σίλικα και αλούμινα) (Serralha et al., 1998). Η ενεργότητα της κουτινάσης για μετεστεροποίηση μετρήθηκε ως συνάρτηση της ενεργότητας του νερού. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν σε a_w 0,95 με ζεόλιθο A με διάφορα παράγωγα κατιόντα. Τα πιο υποσχόμενα αποτελέσματα λήφθηκαν για φορείς με χαμηλή οξύτητα και χαμηλό λόγο Si:Al, που αντιστοιχεί στη σύνθεση του ζεόλιθου NaY. Αυτή η τελευταία παρατήρηση είναι σύμφωνη με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν με τη σίλικα και την αλούμινα.

Η αλκοόλυση του προπιονικού μεθυλεστέρα με προπανόλη σε διάφορα επίπεδα ενυδάτωσης ($a_w = 0,2$ έως $a_w = 0,6$) μελετήθηκε σε ένα σύστημα αερίου / στερεού (Parvaresh et al., 1992; Lamare et al., 1997). Η κουτινάση βρέθηκε να έχει μια ασυνήθιστη κινητική συμπεριφορά. Παρατηρήθηκε μια σιγμοειδής σχέση μεταξύ του ποσοστού μετεστεροποίησης και της δραστηριότητας του προπιονικού μεθυλεστέρα, υποδεικνύοντας κάποια μορφή συνεταιριστικής ενεργοποίησης του ενζύμου από ένα από τα υποστρώματά του. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν σε $a_w = 0,6$.

1.9.4 Πολυμερισμός

Ακίνητοποιημένη κουτινάση του *F. solani* σε σφαιρίδια Lewatit, στη μορφή συνδεδεμένων συσσωματωμάτων (cross-linked enzyme aggregates – CLEA) συνθέσσε oligομερή nylon-4,10, nylon-6,10 και nylon-8,10, μέσω πολυσυμπύκνωσης διαμινών (1,4-butanediamine, 1,6-hexanediamine, and 1,8-diaminooctane) με διεστέρα (diethyl sebacate). Ο μεγαλύτερος ρυθμός πολυμερισμού ($DP_{max} = 16$) επιτεύχθη στη σύνθεση του nylon-8,10 σε διαλύτη διαιθυλεστέρα του σεβακικού οξέος στους 70 °C (Stavila et al., 2013a). Η ίδια κουτινάση έχει καταλύσει την πολυσυμπύκνωση των p-

xylylenediamine και diethyl sebacate με προϊόντα oligo(p-xylylene sebacamide) με υψηλές θερμοκρασίες τήξης (223-230 °C) και των dimethyl terephthalate και 1,8-diaminooctane με προϊόντα oligo(octamethylene terephthalamide) με δύο θερμοκρασίες τήξης (186 και 218 °C), ενώ μόνο μονομερή και διμερή προϊόντα προέκυψαν από την αντίδραση των dimethyl terephthalate και p-xylylenediamine (Stavila et al., 2013b).

1.10 Εφαρμογές

Οι κουτινάσες είναι ένα γκρουπ ευέλικτων και πολυλειτουργικών ενζύμων που εμφανίζουν διάφορες χρήσιμες ιδιότητες με εφαρμογές σε βιομηχανικά προϊόντα και διεργασίες. Ως λιπολυτικά ένζυμα, καταλύουν αντιδράσεις (i) υδρόλυσης που χρησιμεύουν στη βιομηχανία γάλακτος, λαδιού, απορρυπαντικών και (ii) σύνθεσης δομημένων τριγλυκεριδίων, πολυμερών, επιφανειοδραστικών και ουσιών με εφαρμογές στην κοσμετολογία, φαρμακολογία και γεωργία.

1.10.1 Γαλακτοκομικά προϊόντα & Έλαια

Η μετεστεροποίηση των λιπών και ελαίων, καθώς και η στερεοεκλεκτική εστεροποίηση αλκοολών, μπορεί να λάβει χώρα σε χαμηλή ενεργότητα νερού χρησιμοποιώντας την κουτινάση (Macedo & Pio, 2005). Η τεχνολογία τροποποίησης ελαίων και λιπών έχει προκαλέσει σημαντικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια. Το γεγονός ότι αυτές οι ουσίες μπορούν να ληφθούν από φυσικές, συχνά χαμηλού κόστους πηγές και να μετατραπούν σε σημαντικές πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα, στις χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες, εξηγεί το μεγάλο αυτό ενδιαφέρον. Ένα ιδιαίτερα σημαντικό θέμα σε αυτή το πλαίσιο είναι η τροποποίηση των λιπιδίων, προκειμένου να ταιριάζουν σε μια πολύ συγκεκριμένη εφαρμογή. Ως εκ τούτου, η βιομηχανία έχει αναπτύξει διάφορες μεθόδους για την τροποποίηση της σύνθεσης των τριγλυκεριδίων (Casey & Macrae, 1992; Hammond & Glatz, 1988).

Η βασική δομή των ελαίων και λιπών μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους: χημική τροποποίηση των λιπαρών οξέων (υδρογόνωση), κατάρρευση του εστερικού δεσμού (υδρόλυση), και την αναδιοργάνωση των λιπαρών οξέων στην κύρια αλυσίδα του τριγλυκεριδίου (εστεροποίηση). Οι βιοτεχνολογικές διεργασίες είναι μια ενδιαφέρουσα επιλογή για χρήση στη βιομηχανία ελαίων και λιπών, επειδή έχουν μια σειρά από πλεονεκτήματα, όπως καλύτερη απόδοση της μεθόδου, λιγότερη κατανάλωση ενέργειας, παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων, φθηνότερες διαδικασίες παραγωγής, και μικρότερη παραγωγή υπολείμματος. (Hammond & Glatz, 1988; Castro et al., 2004). Η υδρόλυση του λίπους του γάλακτος είναι ένας τυπικός μετασχηματισμός εξαρτώμενος από ένζυμο, όντας εγγενώς παρούσα στις διαδικασίες παραγωγής των διαφόρων γαλακτοκομικών προϊόντων. Μια τέτοια διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένζυμο που ανήκουν στην εγγενή μικροχλωρίδα (π.χ. στην παραγωγή τυριού από νωπό γάλα), ή με τη σκόπιμη χρήση εξωγενών ενζύμων.

Σύμφωνα με την εξειδίκευση της εν λόγω υδρόλυσης, το ενζυματικά τροποποιημένο λίπος γάλακτος θα εμφανίσει ποικίλες γεύσεις και οσμές: από ελεύθερο οξύ στο βούτυρο ή στην κρέμα τυριού. Ο Regado et al. (2007) πραγματοποίησαν μια ανάλυση του λίπους γάλακτος μερικής λιπόλυσης χρησιμοποιώντας 10 μικροβιακές λιπάσες και την κουτινάση του *F. solani pisi*. Τα λιπαρά οξέα που απελευθερώθηκαν στο μέσο της αντίδρασης αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας HPLC. Τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν έδειξαν ένα προφίλ ενζυματικής τροποποίησης παρόμοιο με τα διαθέσιμα εμπορικά ένζυμα. Ωστόσο, η κουτινάση παρουσίασε την υψηλότερη ενεργότητα απέναντι στα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας.

1.10.2 Τρόφιμα

Τα πιο σημαντικά λιπαρά οξέα που λαμβάνουν μέρος στη σύνθεση ελαίων που προέρχονται από τη θάλασσα (marine oils) είναι το εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και το docosahexanoic (DHA). Αυτά τα λιπαρά οξέα, τα οποία έχουν θεραπευτικές ιδιότητες στον τομέα των αυτοάνοσων και των καρδιαγγειακών παθήσεων, δεν μπορούν να ληφθούν με συμβατικές διαδικασίες θέρμανσης χωρίς ουσιαστική αποικοδόμηση (Masson et al., 2000).

Στην παραγωγή του σιροπιού ζάχαρης από το άμυλο σίτου, το κύριο υπόλειμμα είναι η ημικυτταρίνη, η οποία προέρχεται από το κυτταρικό τοίχωμα και παραμένει ως έχει καθ' όλη τη διαδικασία παραγωγής. Η συσσώρευση της ημικυτταρίνης στα κόσκια των βιομηχανικών γραμμών παρεμποδίζει τη διαδικασία διήθησης. Η ημικυτταρίνη είναι ένας ετεροπολυσακχαρίτης που περιέχει ξυλάνη, η οποία εστεροποιείται με αραβινοφουρανοσιδή και το φερουλικό οξύ. Αυτή η τροποποιημένη ξυλάνη είναι δύσκολο να υδρολυθεί με τη αποκλειστική χρήση ξυλανάσης. Όταν η ξυλανάση συνδυάζεται με αραβινοφουρανοσιδάση και εστεράσης του φερουλικού οξέος (FAE), μπορεί να βελτιωθεί η αποικοδόμηση της ξυλάνης, εξαλείφοντας έτσι τις ακαθαρσίες και υποβοηθώντας τη διαδικασία φιλτραρίσματος. Στη βιομηχανία, υπάρχει ανάγκη για ένα ακόμα πιο θερμοσταθερό ένζυμο αποικοδόμησης ξυλάνης. Σε αυτό το πλαίσιο, ο Andersen et al., (2002) ερεύνησαν την ενεργότητα των FAE μυκητιακών λιπασών και κουτινασών. Οι κουτινάσες από τους *Aspergillus oryzae*, *F. solani pisi*, και *Humicola insolence* είχαν δραστηριότητα ανώτερη από τις λιπάσες που δοκιμάστηκαν, σε τιμές pH 5,0, 7,0, και 9,0. Η κουτινάση από τον μύκητα *Humicola insolens* έδειξε την καλύτερη δραστηριότητα. Αυτά τα ένζυμα εμφανίζουν ένα προφίλ σταθερότητας που είναι κατάλληλο για βιομηχανικές διεργασίες, και επειδή έχουν μια μικρή αλλά σημαντική δραστηριότητα FAE, μπορεί να είναι ευκολότερο να εισαχθεί ένα υψηλό επίπεδο δραστηριότητας FAE στις κουτινάσες μέσω σημειακών μεταλλάξεων.

Εκμεταλλεούμενοι τη συνθετική ικανότητα των κουτινασών, μπορούμε να παράγουμε φαινολικές ενώσεις με έντονο λιπόφιλο χαρακτήρα, οι οποίες χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα κυρίως ως αντιοξειδωτικά. Γενικά οι φαινόλες είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν αρωματικό υδρογονάνθρακα συνδεδεμένο με μία υδροξυλομάδα. Φαινολικά οξέα υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες σε φρούτα, λαχανικά και αρωματικά βότανα και τους προσδίδουν την αντιοξειδωτική τους δράση. Το πρόβλημα είναι ότι οι ουσίες αυτές έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και έτσι αποκλείεται

η εφαρμογή τους σε τρόφιμα με λιπαρή βάση. Η λύση είναι η τροποποίηση των ενώσεων αυτών μέσω εστεροποίησης με αλειφατικά μόρια (λιπαρά οξέα ή αλκοόλες) για την αύξηση της υδροφοβικότητάς τους. Η τροποποίηση αυτή μπορεί να γίνει με χημικά μέσα, όμως δεν ενδείκνυται για εφαρμογές σε τρόφιμα, λόγω των έντονα διαβρωτικών οξέων που χρησιμοποιούνται. Η εναλλακτική λύση είναι φυσικά η ενζυμική τροποποίηση, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μη υδατικά μέσα (Stamatis et al., 1999). Η κουτινάση έχει δοκιμαστεί στην ενζυμική λιποφιλίωση (εστεροποίηση) των φαινολικών οξέων: κινναμικό, π-κουμαρικό, φερουλικό και π-υδροξυφαινυλ προπιονικό, με την 1-οκτανόλη. Το ένζυμο που προερχόταν από τον *F. solani* έδειξε μεγαλύτερα ποσοστά μετατροπής στο π-υδροξυφαινυλ προπιονικό οξύ (29% σε 12 h) και μικρότερα στο φερουλικό (5% σε 12 h). Βέβαια, τα ποσοστά αυτά είναι πολύ μικρότερα από τα αντίστοιχα των λιπασών που χρησιμοποιήθηκαν ως βιοκαταλύτες και ιδιαίτερα της λιπάσης της *Candida antarctica* (97 % και 11 % αντίστοιχα) (Stamatis et al., 2001).

1.10.3 Βιομηχανία Υφασμάτων (Κλωστοϋφαντουργία)

Οι συνθετικές ίνες είναι υπεύθυνες για το 50% περίπου της παγκόσμιας κλωστοϋφαντουργικής ζήτησης (Silva et al., 2005), και η παραγωγή ινών πολυεστέρα είναι μεγαλύτερη από εκείνη των ινών βαμβακιού. Λόγω της σπουδαιότητας των συνθετικών ινών για την κλωστοϋφαντουργία, υπήρξε έντονη έρευνα σχετικά με το βελτίωση των διαδικασιών παραγωγής, καθώς και βελτιώσεις στην τελική ποιότητα του προϊόντος. Οι συνθετικές ίνες έχουν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, όπως η υδροφοβικότητα, καθιστώντας άβολη την επαφή τους με το ανθρώπινο δέρμα, και χαμηλή δραστηριότητα, που θέτει κάποιες δυσκολίες στην τελική επεξεργασία των εν λόγω ινών με χρωστικούς παράγοντες.

Η χρήση ισχυρών αλκαλικών παραγόντων μπορεί να βελτιώσει την υδροφοβικότητα και δραστηριότητα αυτών των ινών, αλλά αυτές οι διαδικασίες είναι δύσκολο να ελεγχθούν και συχνά έχουν ως αποτέλεσμα την απώλεια αντοχής της ίνας (Carvalho et al., 1998; Soares et al., 2003; Vertommen et al., 2005). Εκτός αυτού, οι μεγάλες ποσότητες υδροξειδίου του νατρίου και οι υψηλές θερμοκρασίες αντίδρασης που απαιτούνται σε αυτές τις διαδικασίες, τις καθιστούν περιβαλλοντικώς μη ελκυστικές. Η καλύτερη στρατηγική είναι η τροποποίηση μόνο της επιφάνειας κατά τη διάρκεια της αναζήτησης για χαμηλότερη υδροφοβικότητα, χωρίς να αλλάξει το εσωτερικό των ινών. Πρόσφατες έρευνες που χρησιμοποιούν ένζυμα, κυρίως λιπάσες και κουτινάσες, αποδεικνύουν τη βελτίωση της ποιότητας των πολυεστερικών ινών μέσω της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών μόνο στην επιφάνεια των ινών. Οι παράμετροι της αντίδρασης είναι πολύ πιο ήπιες, παρουσιάζοντας χαμηλές ποσότητες υπολειμμάτων, και χωρίς την ανάγκη για πολύπλοκα μηχανήματα (Vertommen et al., 2005).

Οι κουτινάσες και οι καρβοξυλεστεράσες έδειξαν μια παρόμοια δυνατότητα στο να υδρολύουν δεσμούς εστέρα από ότι οι λιπάσες (Yoon et al., 2002). Ο Vertommen et al., (2005) πραγματοποίησε την ενζυματική τροποποίηση μιας επιφάνειας τερεφθαλικού πολυαιθυλενίου με χρήση της κουτινάσης του *F. solani pisi* και της λιπάσης A από τον *Candida Antarctica* σε ένα ετερογενές υδατικό σύστημα. Η

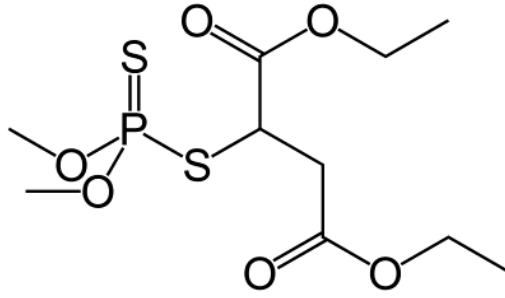
κουτινάση εμφάνισε έκδηλη υδρολυτική ικανότητα έναντι του πολυμερούς ενώ δεν ανιχνεύτηκε δραστικότητα κατά την παρουσία της λιπάσης. Οι Silva et al., (2005) χρησιμοποίησε την κουτινάση από τον *F. solani pisi* στην επιφανειακή τροποποίηση των συνθετικών ινών του πολυεστέρα, πολυαμιδίου και ακρυλικού. Η κουτινάση επιλέχθηκε για χρήση σε τροποποίηση των ινών λόγω της υδρόφοβης φύσης της και της δράσης της ενάντια βιοπολυεστέρων οι οποίοι είναι παρόντες στην φυτική επιδερμίδα. Η δραστικότητα έναντι του πολυαμιδίου προσδιορίστηκε μέσω της παραγωγής της hexamethylethylenediamine. Η δραστικότητα έναντι του πολυεστέρα μετρήθηκε από την παραγωγή του τερεφθαλικού οξέος, και έναντι του ακρυλικού με την ανίχνευση του οξικού οξέος. Η κουτινάση ήταν σε θέση να υδρολύσει δεσμούς αμιδίου, δείχνοντας καλύτερη δραστικότητα στο πολυαμίδιο σε σχέση με τον πολυεστέρα.

Οι Degani et al., (2002) χρησιμοποίησε την κουτινάση για να βελτιώσει τη διαβροχή των ινών βαμβακιού. Το ένζυμο μελετήθηκε μόνο και σε συνδυασμό με λύαση πηκτίνης. Ο συνδυασμός της κουτινάσης και λύασης πηκτίνης παρουσίασε μια συνεργιστική δράση. Η χρήση απορρυπαντικών επιφανειοδραστικών ουσιών βελτίωσε επίσης την απόδοση της αντίδρασης.

1.10.4 Γεωργία

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως για τον έλεγχο των ασθενιών των φυτών και έχουν την ιδιότητα να παραμένουν στο περιβάλλον (κυρίως στα λιπίδια) για μεγάλες χρονικές περιόδους και να προσροφούνται εύκολα από τον οργανισμό μέσω διαφόρων οδών (δέρμα, βλεννογόνους, πνεύμονες, γαστρεντερικός σωλήνας). Όπως έχει αποδειχθεί, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις είναι επικίνδυνες για το νευρικό σύστημα των ασπόνδυλων, το ανοσοποιητικό σύστημα των σπονδυλωτών και τους επινεφρίδιους αδένες και το ήπαρ των ψαριών. Επίσης, προκαλούν ανιχνεύσιμες μεταλλάξεις στο αίμα και τα λεμφικά ανθρώπινα κύτταρα (Pio & Macedo, 2009). Έτσι γίνεται αντιληπτό, ότι είναι βαρύνουσας σημασίας η χρήση μικρότερων ποσοτήτων εντομοκτόνων χωρίς όμως να μειώνεται και η δράση τους.

Η κουτινάση του *F. oxysporum* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την υποβάθμιση και την αποτοξικοποίηση του οργανοφωσφορικού μαλαθείου (Εικόνα 7) με απόδοση 50 και 60% για χρόνο αντίδρασης 15 και 30 λεπτά αντίστοιχα και με κύριο τελικό μη τοξικό προϊόν το MDA. Αντίθετα, όταν, για τον ίδιο στόχο, χρησιμοποιήθηκε εστεράση ζύμης, μόνο το 35% της αρχικής ποσότητας του μαλαθείου μετατράπηκε σε 48 ώρες, ενώ προϊόν ήταν το τοξικό MMA (Kim et al., 2006). Ακόμα, έχει αναπτυχθεί μια ενζυμική φωτομετρική ανάλυση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων, με τη χρήση της κουτινάσης του *F. solani* και στόχο την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα.



Εικόνα 7: Χημικός τύπος του οργανοφωσφορικού μαλαθείου

Η κουτινάση αποδείχθηκε ότι είναι το πιο αποτελεσματικό ένζυμο για αυτόν τον σκοπό αυτό, δηλαδή το ένζυμο του οποίου η δράση παρεμποδίζεται εντονότερα (Walz & Schwack, 2007). Με τη μέθοδο αυτή μπορούν να προσδιοριστούν σε πολύ μικρά επίπεδα τα όξον- οργανοφωσφορικά και θίολ-οργανοφωσφορικά (ύστερα από ένα βήμα οξείδωσης πριν το τεστ), ενώ τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν έδειξαν μικρότερα όρια ανίχνευσης (Walz & Schwack, 2008). Βέβαια, η παρεμπόδιση της λειτουργίας της κουτινάσης από καρβαμιδικά φυτοφάρμακα είχε μελετηθεί ήδη από την αρχή της ιστορίας της, ώστε να συνδεθεί η μόλυνση των φυτών από κουτινοπαραγωγούς μύκητες με τη δράση του ενζύμου. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η δράση του μυκητοκτόνου benomyl (methyl [1-[(butylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate) απέναντι στον *F. solani* οφείλεται στη μη-αναστρέψιμη παρεμπόδιση της κουτινάσης λόγω της αντίδρασης της ενεργούς σερίνης της με το μεταβολικό προϊόν του benomyl, n-butylisocyanate, (Köller et al., 1982).

Η κουτινάση, εκτός από την ιδιότητα που έχει να διασπά και να ανιχνεύει τα φυτοφάρμακα (Kim et al., 2006), μπορεί να χρησιμεύσει και στη μείωση της χρησιμοποιούμενης ποσότητάς τους, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητά τους. Οι ουσίες που παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση της βιοκτόνου δράσης των φυτοφαρμάκων είναι έλαια, τασιενεργά (π.χ. παράγοντες διαβροχής και διείσδυσης, διασκορπιστές), σταθεροποιητικοί παράγοντες, διαλύτες, υγροσκοπικοί παράγοντες, αφροί, αντιαφριστικοί παράγοντες, ενεργοποιητές κ.ά., τα οποία είναι μη βιοδιασπώμενα και έτσι υπάρχει περίπτωση να προκαλέσουν ασθένεια σε συνδυασμό με το φάρμακο (Iwasaki, Hioki, 1986; Poulouse, Kolattukudy, 1987). Έτσι, αναζητείται μια φιλικότερη για το περιβάλλον λύση, η οποία θα έχει και ευρύ φάσμα εφαρμογών σε διάφορα γεωργικά/κηπευτικά χημικά όπως ζιζανιοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών, μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, συμπεριλαμβανομένων των χημικών και μικροβιακών παρασιτοκτόνων και τα λιπάσματα. Όπως περιγράφεται στην πατέντα EP0197622B1, αύξηση της βιολογικής δράσης ενός βιοκτόνου πραγματοποιείται με την ενσωμάτωση στη σύστασή του μιας εστεράσης. Η μέθοδος, δηλαδή, αυτή περιλαμβάνει ένα βήμα κατά το οποίο γίνεται εφαρμογή διαλύματος μιας εστεράσης στον οργανισμό-στόχο του παρασιτοκτόνου, πριν ή ταυτόχρονα με την εφαρμογή του βιοκτόνου. Ο στόχος του παρασιτοκτόνου μπορεί να είναι κάποιο φυτό, έντομο, άκαρι, μύκητας, βακτήριο ή συνδυασμός αυτών και εκτός από εστεράσες μπορεί να είναι και λιπάσες ή κουτινάσες. Το υδατικό διάλυμα του ενζύμου πρέπει να είναι συγκέντρωσης 0,1-100 ppm και μπορεί να εφαρμοστεί με ψεκάσμο στους μίσχους ή τα φύλλα του

φυτού. Το αν θα χρησιμοποιηθεί πριν ή μαζί με το βιοκτόνο εξαρτάται από το αν το φάρμακο εμποδίζει τη λειτουργία του ενζύμου. Σε κοινά διαλύματα με παρασιτοκτόνα (Sumilex hydrate και Sumithion hydrate αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκαν η κουτινάση του βακτηριακού γένους *Colletotrichum* και του μύκητα *Botrytis* (Iwasaki, Hioki, 1986). Η πατέντα EP0272002B1 προτείνει τη χρήση κοκτέιλ των ενζύμων πηκτινάση, κυτταρινάση, ημικυτταρινάση και της κουτινάσης του *Pseudomonas putida*, με σκοπό την αύξηση της δράσης του ρυθμιστή ανάπτυξης φυτών Indole Acetic Acid (IAA) και του μυκητοκτόνου Benomyl (Poulouse, Kolattukudy, 1987).

1.10.5 Απορρυπαντικά

Σε πολλές περιπτώσεις απορρυπαντικών προστίθενται λιπολυτικά ένζυμα (συνήθως λιπάσες) με σκοπό την αύξηση των καθαριστικών ιδιοτήτων τους, καθώς επίσης και πρωτεάσες. Τα ένζυμα αυτά θα πρέπει να πληρούν κάποια χαρακτηριστικά όπως αυξημένη σταθερότητα σε ουδέτερα και ελαφρώς βασικά pH (6,5-11) και θερμοκρασίες 20-50 °C, καθώς και ανθεκτικά σε οξειδωτικά όπως το H₂O₂ και στην παρουσία άλλων ενζύμων όπως οι πρωτεάσες. Οι κουτινάσες καλύπτουν αυτούς τους περιορισμούς και έχουν καταχωρηθεί δύο πατέντες (US005512203A και EP0399681A2) που περιλαμβάνουν τη σύσταση απορρυπαντικών ευρείας χρήσης με κουτινάση (El-Sayed et al., 1990; Kolattukudy et al., 1996). Συγκεκριμένα έχει χρησιμοποιηθεί η βακτηριακή κουτινάση του στελέχους *Pseudomonas putida* (*mendocina*) ATCC53552, η οποία έχει βέλτιστο pH 7 και βέλτιστη θερμοκρασία τους 50 °C, σε συγκέντρωση 0,01-5% του βάρους του τασιενεργού (0,05-100 mg/L), το οποίο βρίσκεται σε συγκέντρωση 0,2-5 mM και το οποίο πρέπει να είναι συμβατό με το ένζυμο. Επίσης, όπως έχει αποδειχθεί, η κουτινάση είναι αποτελεσματικότερη από την εμπορική λιπάση, *lipolase*TM, στην απομάκρυνση των τριγλυκεριδίων και την υδρόλυση των λιπών χωρίς την παρουσία ιόντων ασβεστίου (Egmond & van Bommel, 1997).

1.11 Αρωματικοί (Αλειφατικοί) Εστέρες

1.11.1 Γενικά στοιχεία και εφαρμογές

Οι φυτικοί οργανισμοί, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, καλύπτονται από μια επιδερμίδα, της οποίας το βασικό συστατικό είναι η κουτίνη, και η δομή της οποίας περιλαμβάνει πολυεστερική μήτρα κουτίνης ή / και πολύπλοκων κεριών κουτίνης. Στα περισσότερα φυτικά είδη το κυρίαρχο συστατικό – κέρι αποτελείται από πολύ μακρές αλυσίδες κορεσμένων αλειφατικών συστατικών (κυρίως εστέρων και αλκοολών), με μια λειτουργική ομάδα ή δίχως λειτουργική ομάδα και επομένως οι φυτικοί οργανισμοί αποτελούν την κύρια πηγή αλειφατικών συστατικών. Όλα αυτά τα συστατικά εμφανίζονται με την μορφή ομολόγων, με μήκη αλυσίδων που ποικίλουν από C₂₄ έως C₃₄. Στην περίπτωση των εστέρων λιπαρών οξέων, επικρατούν ζυγά μήκη αλυσίδων (Racovita et al., 2015)

Οι εστέρες των λιπαρών οξέων και σακχάρων βρίσκουν ευρεία εφαρμογή ως γαλακτωματοποιητές ή επιφανειοδραστικές ουσίες σε τρόφιμα, απορρυπαντικά, καλλυντικά και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες λόγω της βιοαποικοδομησιμότητάς και της χαμηλής τοξικότητάς τους (Gulati et al., 2003). Παρομοίως, οι εστέρες αλκοολών λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας είναι σημαντικές ενώσεις για τη γεύση και το άρωμα ενός προϊόντος, ενώ οι εστέρες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας διερευνώνται για τη χρήση τους ως ανανεώσιμες πηγές καυσίμων (λ.χ. βιοντίζελ) και ως κερί στις ελαιο-χημικές βιομηχανίες (Saxena et al., 1999). Επιπλέον, οι εστέρες των λιπαρών οξέων των πολυσακχαριτών μπορούν να εφαρμοστούν για την παράδοση και ελεγχόμενη απελευθέρωση αγροχημικών (μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων), δεδομένου ότι λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα τους ενισχύουν την προσκόλληση του αγροτικού σκευάσματος στην υδρόφοβη επιφάνεια των φύλλων των φυτών και μειώνουν την έκπλυσή του (van den Broek & Boeriu, 2013). Μεταξύ αυτών, οι εστέρες λιπαρών οξέων της σορβιτόλης είναι η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία εστέρων καρβοξυλικού οξέος που χρησιμοποιείται συχνά ως τασιενεργή ουσία (Arcos et al., 1998). Μια ακόμα σημαντική κατηγορία αποτελούν οι εστέρες λιπαρών οξέων της τυροσόλης, ένα φυσικό αντιοξειδωτικό που απαντάται στα φύλλα και τον καρπό της ελιάς και κατ' επέκταση στο ελαιόλαδο.

1.11.2 Είδη σύνθεσης εστέρων και σύγκρισή τους

Επί του παρόντος, οι εστέρες των υδατανθράκων παρασκευάζονται εμπορικά με χημική εστεροποίηση με όξινα χλωρίδια, σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. διμεθυλοσουλφοξείδιο) με χρήση οργανικών και ανόργανων καταλυτών (πυριδίνη, titanium chloride, K_2CO_3 , celite) που αφήνουν ίχνη υπολειμμάτων στα τελικά προϊόντα. Γενικά, οι αντιδράσεις εστεροποίησης απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες οι οποίες, σε συνδυασμό με τους καταλύτες που χρησιμοποιούνται, μπορούν να προκαλέσουν μερική αποδόμηση των αλυσίδων του πολυσακχαρίτη και αποχρωματισμό. Η χημική εστεροποίηση είναι μη-επιλεκτική, και τόσο οι πρωτογενείς όσο και δευτερογενείς υδροξυλομάδες υποκαθίστανται, καθιστώντας αυτή τη διαδικασία κατάλληλη μόνο για την παραγωγή εστέρων υδατανθράκων με υψηλό βαθμό υποκατάστασης.

Οι ενζυμικές διεργασίες προσφέρουν μια ελκυστική εναλλακτική οδό για την σύνθεση εστέρων. Η επιλεκτική διαδικασία που καταλύεται από ένζυμα μπορεί να πραγματοποιηθεί κάτω από ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, αποφεύγοντας έτσι την αποδόμηση του πολυμερούς ακόμα και των πολυσακχαριτών. Ο σχηματισμός των δεσμών εστέρα θερμοδυναμικά ευνοείται σε χαμηλή περιεκτικότητα νερού και επομένως εναλλακτικές ενζυματικές διαδικασίες θα πρέπει να χρησιμοποιούν μέσα αντίδρασης δίχως διαλύτη, με οργανικούς διαλύτες, ή μείγματα οργανικών διαλυτών. Επίσης μέσα όπως τα ιοντικά υγρά και τα υπερκρίσιμα ρευστά, ιδιαίτερα το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($scCO_2$), μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις (van den Broek & Boeriu, 2013).

Γενικότερα, η χημική σύνθεση, ιδιαίτερα σε στερεά συστήματα, μπορεί να θεωρηθεί σήμερα ως η πιο ώριμη συνθετική τεχνολογία για την παραγωγή προϊόντων υγείας και φαρμακευτικής. Ωστόσο, η έλλειψη εξειδίκευσης και η περιβαλλοντική

επιβάρυνση αποτελούν σοβαρά μειονεκτήματα των χημικών διεργασιών που μπορούν να ξεπεραστούν με επιτυχία από την ενζυμική βιοκατάλυση (Sergeeva et al., 1997). Εντούτοις, στρατηγικές για ενζυμική σύνθεση βρίσκονται ακόμα σε πρώιμα στάδια και δεν υπάρχουν πρωτόκολλα επικύρωσης των μεθόδων και μεταφοράς τους σε μεγάλη κλίμακα. Ως τώρα, η παραγωγικότητα μέσω ενζυμικής σύνθεσης δεν είναι συγκρίσιμη με αυτή της χημικής και σε γενικές γραμμές το κόστος των βιοκαταλυτών εξακολουθεί να είναι υψηλό (Capellas et al., 1996b; Fite et al., 2002). Παρόλ' αυτά, η δυναμική των ενζυμικών διεργασιών για σύνθεση είναι προφανής δεδομένου ότι οι περισσότεροι από τους περιορισμούς μπορούν και λύνονται μέσω της έρευνας και της ανάπτυξης σε διάφορες πτυχές της ενζυμικής βιοκατάλυσης.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2^ο Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Υλικά

2.1.1 Συσκευές – Όργανα

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- pH-μετρο 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή ανάδευσης Orbit LS, Labnet (Μ. Βρετανία)
- Θερμαινόμενος ανακινούμενος επωαστήρας Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Θερμοστατούμενα υδατόλουτρα και επωαστήρες
- Περιστρεφόμενοι επωαστήρες ZHWY-211C, ZHICHENG Analytical Instruments Manufacturing Co Ltd (Κίνα)
- Φωτόμετρο UV2000, Hitachi (Η.Π.Α.)
- Σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Συσκευή υπερήχων VC 600, Sonics and Materials (Η.Π.Α.)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10, Millipore (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντροι J2-21 και TJ-6 της Beckman Coulter (Η.Π.Α.), Sorval® RC28S, DuPont (Η.Π.Α.) και μικροφυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200 (Γερμανία)
- Πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250, Molecular Devices (Λογισμικό λειτουργίας SoftMax Pro© 1994, v. 1.1, Molecular Devices Corp.)
- Ξηραντήρας κατάψυξης CHRIST Alpha 1-4, B. Braun Biotech International
- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας TLC, silica gel 60 plates, Merck (Γερμανία)
- Αντλία Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (ή Πίεσης) Jasco PU-987
- Μονάδα Ternary Gradient Jasco LG-2080-02
- Ανιχνευτής Varian, ProStar
- Ελεγκτής συστήματος διαλυτών Waters 600E, MILLIPORE
- Στήλη HPLC Macherey-Nagel CC250/4.6 Nucleosil 100-5 C18

2.1.2 Μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στην ετερόλογη έκφραση

Η κουτινάση που χρησιμοποιήθηκε, παράχθηκε ετερόλογα σε ανασυνδυασμένα στελέχη *Escherichia coli* BL21 (DE3) τα οποία έφεραν το πλασμίδιο pET22b(+) στο οποίο είχε προστεθεί το γονίδιο *cut5a* του *Fusarium oxysporum* F3, ο οποίος είχε απομονωθεί από κύμιο (Christakopoulos et al., 1989). Η έκφραση της ανασυνδυασμένης κουτινάσης έγινε με τη διατήρηση της σηματοδοτικής αλληλουχίας *pelB* του πλασμιδίου pET22b(+), με σκοπό τη μεταφορά των παραγόμενων πρωτεϊνών στο περίπλασμα των κυττάρων και την πιθανή έκκρισή τους εξωκυτταρικά. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού ήταν το Luria Bertani (LB) και το οποίο παρασκευαζόταν με απιονισμένο νερό και πριν το

εμβολιασμό αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa. Για την παραγωγή στερεού θρεπτικού υλικού προστίθετο και 1,5% άγαρ.

Θρεπτικό Μέσο	Σύσταση
Luria Bertani (LB)	1% w/v τρυπτόνη, 1% w/v NaCl, 0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης, pH 7,4

Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο Ισοπροπυλο-β-D-1-θειογαλακτοπυρανοζίτης (IPTG), ένα αντιδραστήριο της μοριακής βιολογίας. Αυτή η ένωση είναι ένας μοριακός μίμος της αλλολακτόζης, ενός μεταβολίτη λακτόζης που προκαλεί τη μεταγραφή του οπερονίου *lac*, και ως εκ τούτου χρησιμοποιείται για την επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης, όπου το γονίδιο είναι υπό τον έλεγχο του χειριστή λακτόζης (*lac*), όπως στο πλασμίδια της οικογένειας pET.

2.2 Μέθοδοι Παραγωγής και Ανάλυσης Πρωτεϊνών

2.2.1 Μετασχηματισμός (transformation) επιδεκτικών κυττάρων (competent cells)

Μετασχηματισμός κυττάρων είναι η διαδικασία κατά την οποία κύτταρα δέχονται γενετικό υλικό ξένο προς αυτά. Για να πραγματοποιηθεί αυτό πρέπει πρώτα τα κύτταρα να έχουν μετατραπεί σε παροδικώς διαπερατά (επιδεκτικά-competent) και έπειτα πρέπει να γίνει η επιλογή όσων μετασχηματίστηκαν.

Ο τρόπος μετασχηματισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το θερμικό σοκ (heat-shock transformation), που βασίζεται στην απότομη θέρμανση των επιδεκτικών κυττάρων και αποτελεί αρκετά αποδοτικό τρόπο για αρνητικά, κατά Gram, βακτήρια.

Πιο αναλυτικά για το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων και την έκφραση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν 100 μ L κυττάρων *E. coli* (επιθυμητό επιδεκτικό στέλεχος BL21) στα οποία έγινε πρώτα απόψυξη με παραμονή τους σε πάγο και 1 μ L ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα pET22b(+). Τα παραπάνω αφέθηκαν προς επώαση σε πάγο για 30 min. Στην συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ στους 42 °C για αυστηρά 60-90 s και επανατοποθετήθηκαν σε πάγο για ακόμη 5 min όπου και έλαβε χώρα προσθήκη 200 μ L LB και ύστερα επώαση στους 37 °C για 1 h. Η ποσότητα αυτή των κυττάρων επιστρώθηκε σε τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό μέσο LB και αμπικιλίνη ως αντιβιοτικό (100 μ g/mL) στο οποίο προσφέρει ανθεκτικότητα το πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε, με σκοπό την επιλογή μόνο των ανασυνδυασμένων βακτηρίων. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 16-20 h.

2.2.2 Έκφραση και Παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στα *E. Coli* BL21 (DE3)

Ένας κλώνος από το μετασχηματισμένο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 5 mL θρεπτικού μέσου LB/Αμπικιλίνη, τα οποία επώαστηκαν για 16 h

στους 37 °C υπό ανάδευση 180 rpm. Στη συνέχεια εμβολιάστηκε φιάλη των 2000 mL, η οποία περιείχε 500 mL LB/Αμπικιλίνη με 1% v/v προκαλλιέργεια και επώαστηκε (37 °C, 180 rpm) μέχρι η οπτική της πυκνότητα (OD₆₀₀) να φτάσει την τιμή 0,6 (2-4 h). Τότε προστίθενται 50 μL IPTG 1 M (τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια 0,1 mM) και επώαστηκε στους 16 °C για 16-20 h.

2.2.3 Λήψη του μίγματος των πρωτεϊνών (crude)

Τα κύτταρα από την καλλιέργεια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (30000xg, 20 min, 4 °C) και στην συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 40 mL ρυθμιστικού διαλύματος 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Ακολούθως, τα κύτταρα υπέστησαν ρήξη με υπερήχους (5 x 60 s, 50% Duty Cycle) στην συσκευή υπερήχων VC 600 (Sonics and Materials, Η.Π.Α., Εικ. 8) και τα κυτταρικά υπολείμματα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (30000xg, 20 min, 4 °C).



Εικόνα 8: Συσκευή υπερήχων VC 600 (Sonics and Materials)

Επομένως, το εσωκυτταρικό υγρό που απέμεινε είναι εκείνο που περιέχει το μίγμα των πρωτεϊνών και την κουτινάση (crude cutinase). Έπειτα, το εσωκυττάριο υγρό διηθήθηκε υπό κενό χρησιμοποιώντας διαδοχικά διηθητικό χαρτί και φίλτρα διαμέτρου πόρων 0,8 και 0,2 μm, συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης Amicon Stirred Cell 8400 με μεμβράνη PM-10 και αποθηκεύτηκε στους 4 °C. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Στην περίπτωση αυτή, ο υπολογισμός της συγκέντρωσης έγινε με βάση την καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διάφορες συγκεντρώσεις της πρότυπης πρωτεΐνης αλβουμίνη ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin-BSA).

2.2.4 Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου (Enzyme Assay)

Η ενεργότητα ενός ενζύμου αποτελεί μια από τις σημαντικότερες παραμέτρους που εξετάζονται όταν το ένζυμο ενδιαφέροντος πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε μια βιολογική εφαρμογή. Η μέθοδος μέτρησης της ενεργότητας πραγματοποιήθηκε τόσο στο ελεύθερο ένζυμο όσο και στα ακινητοποιημένα CLEAs της κουτινάσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 2 είδη υποστρώματος, το *p*-nitrophenyl butyrate (pNPB) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Phosphate Citrate pH 6,0 και το *p*-nitrophenyl laurate (pNPL). Όσον αφορά το pNPL και λόγω δυσκολίας διαλυτότητάς του στο προαναφερθέν ρυθμιστικό διάλυμα, προετοιμάστηκε νέο ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Citrate pH 6,0 το οποίο περιείχε 1% Triton-X100 και 0,125% αραβικό κόμμι. Η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος στην αντίδραση ήταν κάθε φορά 0,96 mM. Στην περίπτωση του ακινητοποιημένου ενζύμου και λόγω ταχείας υδρόλυσης του υποστρώματος pNPB και κατ' επέκταση αδυναμίας μέτρησης ενεργότητας, χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά το υπόστρωμα pNPL. Επειδή όμως η ενεργότητα της κουτινάσης εκφράζεται ως συνάρτηση του υποστρώματος pNPB, μετρήθηκε η ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου τόσο με pNPB όσο και με pNPL ώστε να μπορέσει να γίνει ο συσχετισμός μεταξύ των δύο ενεργοτήτων. Η μέτρηση βασίστηκε στην απελευθέρωση της *p*-νιτροφαινόλης (pNPh) για την οποία κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς. Όλα τα δείγματα αντιδράσεων συνοδεύονταν από αντίστοιχα τυφλά δείγματα.

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου έλαβε χώρα αντίδραση σε ειδική κυβέττα στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 στους 40 °C και για 15 min με ταυτόχρονη μέτρηση στα 410 nm. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 250 μ L από τα οποία τα 200 μ L αποτελούσαν το υπόστρωμα (pNPB και εναλλακτικά pNPL στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα) και τα 50 μ L το ελεύθερο ένζυμο.

Στην περίπτωση του ακινητοποιημένου ενζύμου η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήριο Eppendorf Thermomixer Comfort στους 40 °C και για 15 min. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 1 mL και η συγκέντρωση του ακινητοποιημένου ενζύμου 1 mg/mL. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος των 15 min τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο για 2 min για την διακοπή συνέχισης της αντίδρασης, φυγοκεντρήθηκαν για 1 min, λήφθηκε το υπερκείμενο υγρό και μετρήθηκε στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 στα 410 nm.

2.3 Ακίνητοποίηση πρωτεΐνης με τη μέθοδο της διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking)

Το μίγμα των πρωτεϊνών (crude) ακίνητοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια διαδικασία 2 βημάτων, σύμφωνα με την μέθοδο του Schoenaart et al., 2004. Αρχικά έλαβε χώρα το στάδιο της καταβύθισης όπου χρησιμοποιήθηκε διαλύτης καταβύθισης (precipitant) και ποσότητα του μίγματος ενζύμου (crude) σε αναλογία 9:1. Τα δυο συστατικά αφέθηκαν προς ανάδευση για μικρό χρονικό διάστημα σε πάγο. Στην συνέχεια ακολούθησε το βήμα της διασταυρούμενης σύνδεσης του ενζύμου (cross-linking) κατά το οποίο προστέθηκε ποσότητα γλουταραλδεΐδης και το σύστημα αφέθηκε υπό συνεχή ανάδευση σε πάγο για 3 h. Στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας απομακρύνθηκε το υπερκείμενο υγρό, ύστερα από φυγοκέντρηση, ακολούθησαν εκπλύσεις με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήσεις του πλέον ακίνητοποιημένου ενζύμου που τελικώς ξηράνθηκε με κατάψυξη και μετρήθηκε η ποσότητα και ενεργότητά του.

2.3.1 Μελέτη παραμέτρων για τη δημιουργία των CLEAs

Για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ακίνητοποίησης, ακολουθήθηκαν τρία στάδια: (1) βέλτιστη επιλογή διαλύτη καταβύθισης (precipitant), (2) βέλτιστη συγκέντρωση παράγοντα διασύνδεσης (cross-linker) και (3) βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου.

1. Μελέτη του βέλτιστου διαλύτη καταβύθισης (precipitant)

Ελέγχθηκαν 6 διαφορετικοί διαλύτες (Μεθανόλη, Αιθανόλη, Ακετόνη, Ακετονιτρίλιο, κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου, Διμεθυλοσουλφοξείδιο) με σκοπό την εξακρίβωση της επίδρασής τους στην ανάκτηση της ενεργότητας του ενζύμου ακριβώς μετά από το βήμα της καταβύθισης και πριν από την διασταυρούμενη σύνδεση. Στη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε μια συγκέντρωση διαλύτη 90% στο διάλυμα ενζύμου-precipitant. Πιο συγκεκριμένα προστέθηκαν κάθε φορά σε κωνική φιάλη 9 mL διαλύτη καταβύθισης και 1 mL μίγματος ενζύμου ώστε να πραγματοποιηθεί η καταβύθιση (precipitation). Στην συνέχεια το σύστημα φυγοκεντρούνταν για 10 λεπτά και αφού γινόταν λήψη του καταβυθισμένου ενζύμου, αυτό επαναιωρούνταν σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl pH 8,0 και ακολουθούσε μέτρηση της ενεργότητάς του.

2. Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης γλουταραλδεΐδης

Πολύ σπουδαίος παράγοντας για τη διαδικασία ακίνητοποίησης ενός ενζύμου είναι ο παράγοντας διασύνδεσης (cross-linker) και στην προκειμένη περίπτωση η γλουταραδεΐδη. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί διαλύτες καταβύθισης (συγκριτική μελέτη) για 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις γλουταραδεΐδης, 10, 50, 100 και 150 mM και αφότου η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τον τρόπο που περιγράφηκε προηγουμένως, μετρήθηκε η ενεργότητά τους. Για την μέτρηση της ενεργότητας

ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως (βλέπε Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου).

3. Μελέτη της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού διαλύματος

Το τελικό στάδιο αποτέλεσε η βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμου (9,4, 4,7, 2,47, 1,24, 0,62 mg/mL) χρησιμοποιώντας την προαναφερθείσα μέθοδο ακινητοποίησης με χρήση του καταλληλότερου διαλύτη καταβύθισης και και τη βέλτιστη συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης. Η αντίδραση που συνοδεύει τη μελέτη λάμβανε χώρα σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort στους 40 °C και για 15 min. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνταν σε πάγο για 2 min, φυγοκεντρούνταν για 1 min και τοποθετούνταν σε κυβέττα (250 μL σε κάθε θέση) στο πολυφωτόμετρο SpectraMAX 250 για μέτρηση της ενεργότητάς τους.

2.3.2 Δημιουργία CLEAs κουτινάσης σε μεγάλη κλίμακα

Η διαδικασία αυτή έγινε χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες παραμέτρους που προέκυψαν από την παραπάνω μελέτη. Η καταβύθιση (precipitation) (1^ο βήμα) πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 40 mL του μίγματος του ενζύμου (διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 8,0) σε 360 mL διαλύτη καταβύθισης (precipitant) σε κωνική φιάλη των 2 L και ακολούθησε μαγνητική ανάδευση για 15 min υπό ψύξη.

Η διασταυρούμενη σύνδεση (cross-linking) (2^ο βήμα) περιελάμβανε της βέλτιστης ποσότητας γλουταραλδεΐδης αρχικής συγκέντρωσης 10,587 M. Ο απαιτούμενος όγκος γλουταραλδεΐδης για την δημιουργία σταυροδεσμών υπολογίστηκε με βάση τα 400 mL συνολικού όγκου διαλύτη καταβύθισης και μίγματος ενζύμου και με βάση την βέλτιστη συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης.

Στην συνέχεια, και αφού προστέθηκε ο παράγοντας διασύνδεσης, το δείγμα αφέθηκε προς επώαση σε πάγο και συνεχή ανάδευση για 3 h. Ακολούθως, μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου υγρού, έλαβε χώρα έκπλυση των σχηματισμένων CLEAs με 400 mL ρυθμιστικού διαλύματος 20 μM Tris-HCl pH 8,0 και ακολούθησε φυγοκέντρωση (30000xg, 20 min, 4 °C) και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για τον καλύτερο δυνατό καθαρισμό των CLEAs. Τέλος τα CLEAs ξηράνθηκαν σε ξηραντήρα κατάψυξης (freeze-dryer) για την απομάκρυνση υγρασίας για τουλάχιστον 24 h, συλλέχθηκαν και ζυγίστηκαν για τον υπολογισμό της παραγωγής τους και συμμετείχαν σε δοκιμασίες για τον καθορισμό της ενεργότητάς τους (Enzymatic Assay).

Επιπροσθέτως, παράχθηκε και καλλιέργεια μη ανασυνδυασμένων φυσικών στελεχών *E. coli* από την οποία και πάλι συλλέχθηκε το εσωκυττάριο υγρό με διάτρηση των βακτηριακών κυττάρων και στην συνέχεια ακολούθησε ακινητοποίηση του μίγματος των πρωτεϊνών σύμφωνα με τη μέθοδο της διασταυρούμενης σύνδεσης. Στόχος της καλλιέργειας αυτής ήταν η σύγκριση της ενεργότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων που προήλθαν από τα φυσικά βακτηριακά στελέχη με την ανασυνδυασμένη ενεργότητα των CLEAs κουτινάσης.

2.4 Έλεγχος θερμικής σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενός ενζύμου είναι η αύξηση της σταθερότητάς του και η δυνατότητα να διατηρεί μέρος της ενεργότητάς του και μετά τη χρήση του σε αντιδράσεις, ακόμα και σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με ένα αντίστοιχο μη ακινητοποιημένο ένζυμο, λ.χ. η κουτινάση του *F. oxysporum*, η οποία είναι θερμοευαίσθητη.

Μετά την ολοκλήρωση της παραγωγής των CLEAs κουτινάσης, σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες, μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα του ενζύμου. Για το σκοπό αυτό προστέθηκε σε erpendorf των 1,5 mL ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου (1 mg) και στη συνέχεια προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήρα Eppendorf Thermomixer Comfort σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (από 20 έως 40 °C) και αφέθηκαν προς θέρμανση για διάφορα χρονικά διαστήματα και για συνολικό χρόνο 5 h πριν την απομάκρυνσή τους από τον επωαστήρα κάθε φορά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων, απομάκρυνση του υπερκείμενου ρυθμιστικού διαλύματος και μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου με τη χρήση και σε αυτή την περίπτωση του υποστρώματος pNPL (αναλυτικότερα βλέπε Δοκιμασία προσδιορισμού ενεργότητας ενζύμου).

2.5 Συνθέσεις Εστέρων

Μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου δοκιμάστηκε η χρήση του σε μια πρακτική εφαρμογή σύνθεσης εστέρων μέσω αντίδρασης μετεστεροποίησης.

Στο πλαίσιο αυτό ακολούθησαν διαφορές μελέτες που αφορούσαν την επιλογή των καταλληλότερων αντιδρώντων συστατικών. Ο διαλύτης στις συνθετικές αντιδράσεις ήταν κάθε φορά το ισο-οκτάνιο. Οι επιθυμητές συγκεντρώσεις των σταθερών αντιδρώντων (εστέρα ή αλκοόλης) ήταν κάθε φορά 100 mM, η συγκέντρωση του ενζύμου στις αντιδράσεις ήταν 2 mg/mL ενώ ο όγκος της κάθε αντίδρασης ήταν 500 μ L. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 50 °C σε θερμαινόμενο ανακινούμενο επωαστήρα σε 120 rpm και για 1 εβδομάδα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως λόγω της υψηλής πτητικότητας των συστατικών, τόσο των αντιδρώντων όσο και των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια τα οποία σφραγίζονταν με πρεσαριστά καπάκια.

2.5.1 Μελέτη επίδρασης της ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλης

Κατά τη μελέτη αυτή δοκιμάστηκε το ακόλουθο σχήμα αντίδρασης: μικρότερης αλυσίδας αλκοόλες (μεθανόλη, αιθανόλη, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη) μαζί με το βινυλικό βουτυλεστέρα. Η αναλογία του εστέρα προς τις αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε όλες τις περιπτώσεις 3:1. Σκόπος ήταν να εξεταστεί η απόδοση της αντίδρασης με μικρότερης αλυσίδας αλκοόλες για να διαπιστωθεί εάν η συγγένεια των μορίων και η δομή τους στο χώρο, παρουσία του διαλύτη, οδηγεί στην

υψηλότερη παραγωγή προϊόντος σε σχέση με το κύριο αντιδρών που χρησιμοποιήθηκε, την 1-βουτανόλη.

2.5.2 Μελέτη συνθηκών για βελτιστοποίηση της σύνθεσης του βουτυρικού βουτυλεστέρα

Ακολούθησαν μελέτες που αφορούσαν διάφορες παραμέτρους που επηρεάζουν την αντίδραση μετεστεροποίησης. Πιο αναλυτικά μελετήθηκαν,

- η επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της αντίδρασης. Η αναλογία αντιδρώντων ήταν 1-βουτανόλη:βινυλικός εστέρας 3:1 με επιθυμητή συγκέντρωση του εστέρα και πάλι 100 mM. Οι θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ήταν 20, 30 40, 50 και 60 °C και τα δείγματα παρέμειναν σε αυτές τις θερμοκρασίες.
- η αναλογία των δυο αντιδρώντων συστατικών. Με σταθερή συγκέντρωση τα 100 mM του βινυλικού εστέρα του βουτυρικού οξέος μελετήθηκαν οι ακόλουθες αναλογίες αντιδρώντων βινυλικού βουτυλεστέρα:1-βουτανόλης, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5.
- οι διαφορετικές συγκεντρώσεις του βινυλικού εστέρα του βουτυρικού οξέος. Διατηρήθηκε η αναλογία Vinyl Butyrate:1-Butanol 3:1 και μεταβλήθηκαν οι συγκεντρώσεις του βινυλικού εστέρα κατά τις τιμές 50, 100, 200, 300, 400 και 500 mM. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 50 °C.
- η ποσότητα του ενζύμου στην αντίδραση. Εξετάστηκε η επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην απόδοση της αντίδρασης. Η αναλογία αντιδρώντων ήταν 1-βουτανόλη:βινυλικός εστέρας του βουτυρικού οξέος 1:3 με επιθυμητή συγκέντρωση του εστέρα 100 mM. Χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, οι ακόλουθες συγκεντρώσεις ενζύμου: 0 (τυφλό δείγμα), 2, 5, 10, 20, 30, 40 mg/mL. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 50 °C σε θερμαινόμενους ανακινούμενους επωαστήρες σε 120 rpm για 1 εβδομάδα.
- η πορεία της απόδοσης της αντίδρασης με το χρόνο. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδρώντα 1-βουτανόλη και βινυλικός εστέρας του βουτυρικού οξέος στις βέλτιστες συνθήκες σε συνολικό όγκο αντίδρασης 3 mL. Στο τυφλό δείγμα δεν τοποθετήθηκε ποσότητα ενζύμου. Δείγματα ελήφθησαν και αφέθηκαν σε πάγο για 5 min ανά μισή ώρα για τις πρώτες δύο ώρες και ανά ώρα μέχρι να επιτευχθεί η μέγιστη μετατροπή (συνολικός χρόνος μελέτης 7 h). Από τις τιμές που λήφθηκαν προσδιορίστηκε και η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης.

2.6 Αναλυτικές Μέθοδοι

Η ποσοτική ανάλυση τα δειγμάτων αντιδράσεων έγινε με την βοήθεια της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (ή Πίεσης) (HPLC) σε στήλη Nucleosil C₁₈. Αποτελεί μια τεχνική στην Αναλυτική Χημεία και στηρίζεται σε αντλίες για την διέλευση υγρού διαλύτη υπό πίεση που περιέχει το εξεταζόμενο δείγμα μέσω μιας στήλης η οποία είναι πληρωμένη με στερεό προσροφητικό υλικό. Κάθε συστατικό στο δείγμα αλληλεπιδρά ελαφρώς διαφορετικά με το στερεό προσροφητικό υλικό, προκαλώντας διαφορετικούς ρυθμούς ροής για διαφορετικά συστατικά και οδηγώντας στο διαχωρισμό των συστατικών αυτών κατά την έξοδό τους από τη στήλη. Η ανίχνευση του προϊόντος επιτεύχθηκε στα 210 nm με χρόνο ανάλυσης 15 min. Η κάθε μέτρηση περιελάμβανε ένεση του δείγματος (20 μL) στην αντλία του συστήματος υγρής χρωματογραφίας (Jasco PU-987 Intelligent Prep. Pump) ενώ η έκλουση διεξαγόταν με σύστημα διαλυτών μεθανόλη:νερό σε αναλογία 7:3 v/v και με ρυθμό ροής 0,8 mL/min. Σε αρκετές περιπτώσεις πριν από την εισαγωγή του δείγματος ήταν απαραίτητη η αραίωσή του ώστε να μπορέσει να μετρηθεί ορθά από τον ανιχνευτή. Οι αποδόσεις για τη σύνθεση εστέρων βουτανόλης (butyl butyrate) και η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκαν από τη διαφορά στο ποσό του βινυλικού εστέρα του βουτυρικού οξέος στο τυφλό δείγμα με το ποσό που δεν αντέδρασε στο δείγμα της αντίδρασης και σύμφωνα με την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάστηκε για διάφορες γνωστές συγκεντρώσεις του βινυλικού βουτυλεστέρα. Από την καμπύλη αναφοράς επιλέχθηκε το γραμμικό τμήμα και επομένως οι διάφορες αραιώσεις των δειγμάτων πριν τις μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν να τοποθετηθούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης αναφοράς. Τέλος κατά τις μετρήσεις παρατηρήθηκαν και 2 κορυφές στο ίδιο μήκος κύματος πέραν του σχηματισμένου εστέρα. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο σχηματισμό ενός παραπροϊόντος της μετεστεροποίησης, της ακεταλδεΐδης, η οποία ταυτοποιήθηκε με πρότυπο διάλυμα ακεταλδεΐδης.



Εικόνα 9: Αντλία συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Jasco PU-987 σε λειτουργία.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 3^ο Παραγωγή και ακινητοποίηση της κουτινάσης *FoCut5a*

3.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένης της κουτινάσης *FoCut5a*

Όπως παρουσιάστηκε εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 2, η έκφραση της ανασυνδυασμένης κουτινάσης έγινε σε ανασυνδυασμένα στελέχη *Escherichia coli* BL21 (DE3) και η λήψη της έγινε με την μορφή μίγματος του εσωκυτταρικού κλασματος των κυττάρων, ύστερα από ρήξη τους με υπερήχους. Το μίγμα αυτό στο τελικό στάδιο της επεξεργασίας του συμπυκνώθηκε χρησιμοποιώντας συσκευή υπερδιήθησης μέχρι όγκο 45 mL και συγκέντρωση 9,4 mg/mL.

3.2 Ακινητοποίηση κουτινάσης

Η παραπάνω ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη δημιουργίας των CLEAs την κουτινάσης, καθώς και για την παρασκευή ποσότητας σε μεγάλη κλίμακα.

Ο σκοπός της παραπάνω διαδικασίας ήταν ακινητοποίηση του ενζύμου με τη μέθοδο διασταυρούμενης σύνδεσης. Για τη εξεύρεση της βέλτιστης ακινητοποίησης διεξήχθησαν μελέτες των κυριότερων παραγόντων που επηρέασαν την μέθοδο δημιουργίας των CLEAs, όπως εκείνοι παρουσιάστηκαν αναλυτικότερα στο πειραματικό μέρος.

3.2.1 Βέλτιστη επιλογή διαλύτη καταβύθισης

Η φύση ενός διαλύτη καταβύθισης είναι πολύ σημαντική παράμετρος στο πρώτο στάδιο ακινητοποίησης ενός ενζύμου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι διαλύτες: μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, ακετονιτρίλιο, κορεσμένο διάλυμα θεικού αμμωνίου, διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 2 (βλέπε Παράγραφο 2.3.1) με την αναλογία διαλύματος ενζύμου-precipitant να είναι 1:9. Από τις μετρήσεις ενεργότητας προέκυψε ο ακόλουθος πίνακας (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1: Το επί τοις % ποσοστό ενεργότητας των καταβυθισμένων ενζύμων σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο για έξι διαφορετικούς διαλύτες καταβύθισης

Διαλύτης καταβύθισης	% ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου
μεθανόλη	24,4
αιθανόλη	14,2
ακετόνη	30,4
ακετονιτρίλιο	74,9
κορ. διάλυμα θεικού αμμωνίου	89,9
διμεθυλοσουλφοξείδιο	0,02

Η ενεργότητα του ενζύμου που παρουσιάζεται στον πίνακα προκύπτει ως ποσοστό επί τοις εκατό ενεργότητας του ελεύθερου ενζύμου η οποία βρέθηκε ότι είναι 785,5 U/mL. Από τις παραπάνω τιμές εύκολα κανείς διακρίνει την υπεροχή του κορεσμένου διαλύματος θεικού αμμωνίου ως ο καταλληλότερος από τους διαλύτες καταβύθισης, ακολουθούμενος σε υψηλή τιμή ενεργότητας από το ακετονιτρίλιο. Αξιοσημείωτη είναι και η ελάχιστη ενεργότητα που προσδίδει το διμεθυλοσουλφοξείδιο με αποτέλεσμα να σημειωθεί ως ο πιο ακατάλληλος διαλύτης.

3.2.2 Βέλτιστη συγκέντρωση παράγοντα διασύνδεσης

Επόμενο βήμα για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ακινητοποίησης ενός ενζύμου είναι ο παράγοντας διασύνδεσης (cross-linker). Στις μελέτες που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε η γλουταραλδεΐδη ως ένας τέτοιος παράγοντας, κατάλληλος για τις συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση και λόγω του σχετικά χαμηλού κόστους του και της μεγάλης εμπορικής διαθεσιμότητάς του. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε τόσο το κορεσμένο διάλυμα θεικού αμμωνίου όσο και το ακετονιτρίλιο ως διαλύτες καταβύθισης καθώς αμφότεροι επέδειξαν αυξημένη ενεργότητα κατά τον αντιστοιχο έλεγχο. Η δημιουργία σταυροδεσμών πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 4 συγκεντρώσεων γλουταραλδεΐδης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2: Ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου που παράχθηκε με 2 διαφορετικούς precipitants και 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις cross-linker.

Διαλύτης Καταβύθισης	Συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης (mM)	% ενεργότητα
κ. διάλυμα θεικού αμμωνίου	10	94,0
	50	36,0
	100	18,0
	150	14,1
Ακετονιτρίλιο	10	100,0
	50	80,8
	100	89,8
	150	81,4

Η επί τοις % ενεργότητα υπολογίστηκε με βάση την μέγιστη παρατηρούμενη ενεργότητα η οποία βρέθηκε για διαλύτη καταβύθισης το ακετονιτρίλιο και συγκέντρωση γλουταραλδεΐδης 10 mM. Επίσης παρατηρείται ότι στην περίπτωση του ακετονιτρίλιου η ενεργότητα για όλες τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν είναι πάνω από το 80%, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στο κορεσμένο διάλυμα θεικού αμμωνίου όπου το ποσοστό κατέρχεται ακόμα και στο 14%. Εντούτοις στη συγκέντρωση των 10 mM και οι δύο διαλύτες συμπεριφέρονται άριστα, με το κ. διάλυμα θεικού αμμωνίου να επιβεβαιώνει την υψηλή ικανότητά του για χρήση του ως διαλύτης καταβύθισης.

3.2.3 Βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου

Σε αυτή την περίπτωση μελετήθηκαν 5 διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμου χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ακινητοποίησης που περιγράφηκε προηγουμένως και ελήφθησαν τα εξής αποτελέσματα στον Πίνακα 3.3:

Πίνακας 3.3: Ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου που παράχθηκε με 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις αρχικού μίγματος ενζύμου.

Συγκέντρωση Ενζύμου (crude) (mg/mL)	% ενεργότητα
9,4	100,0
4,7	84,5
2,5	79,7
1,2	62,7
0,6	50,3

Η επί τοις % ενεργότητα υπολογίστηκε με βάση τη μέγιστη που προέκυψε κατά τη μελέτη. Η βέλτιστη αποδείχθηκε ότι ήταν η υψηλότερη συγκέντρωση που επιτεύχθηκε κατά τη συμπύκνωση με υπερδιήθηση (9,4 mg/mL). Επιπρόσθετα, από τις τιμές ενεργότητας που προέκυψαν παρατηρείται ότι εκείνη μειώνεται όσο μειώνεται και η συγκέντρωση του ενζύμου. Για τον λόγο αυτό είναι επιθυμητή η υψηλή αρχική συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος από το οποίο θα προέλθουν τα ακινητοποιημένα ένζυμα.

3.3 Σύγκριση ενεργότητας μη ανασυνδυασμένων CLEAs και ελεύθερου ενζύμου με το ανασυνδυασμένο ακινητοποιημένο ένζυμο

Επειδή για την ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκε εσωκυτταρικό πρωτεϊνικό μίγμα (crude) και όχι καθαρό απομονωμένο ένζυμο, μελετήθηκε επίσης η ενεργότητα που παρουσιάζει το εσωκυτταρικό περιεχόμενο των φυσικών στελεχών *E. coli* BL21, δηλαδή αυτών που δεν εξέφραζαν το ανασυνδυασμένο γονίδιο της κουτινάσης, ώστε να προσδιοριστεί κατά πόσο τα φυσικά ένζυμα που εκφράζονται στα βακτήρια έχουν την ικανότητα απόδοσης ενεργότητας κουτινάσης. Τα φυσικά στελέχη καλλιεργήθηκαν όπως ακριβώς και τα ανασυνδυασμένα και στο τέλος παραλήφθηκε το πρωτεϊνικό μίγμα το οποίο μετατράπηκε σε CLEAs. Κατά την μέτρηση της ενεργότητας με την δοκιμασία που έχει αναφερθεί προηγουμένως, αποδείχθηκε πως μόνο το 1,8% από τη συνολική ενεργότητα των CLEAs κουτινάσης προερχόταν από ενδογενή ένζυμα του φυσικού στελέχους.

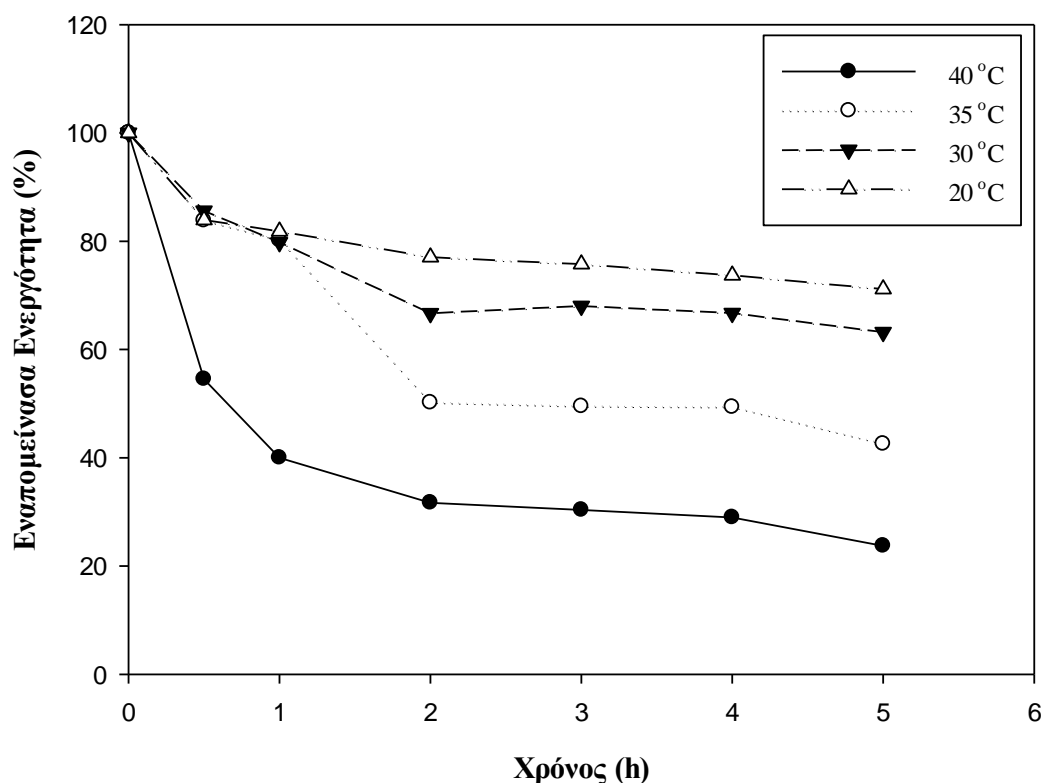
Στην συνέχεια, ελέγχθηκε το ποσοστό της ενεργότητας που διατηρούσαν τα CLEAs κουτινάσης σε σχέση με το μη ακινητοποιημένο ένζυμο. Όπως περιγράφηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, η δοκιμασία ενεργότητας (Assay) των CLEAs πραγματοποιήθηκε εναλλακτικά, λόγω ταχείας υδρόλυσης του υποστρώματος pNPB,

με τη χρήση του υποστρώματος pNPL. Η ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου μετρήθηκε και στα δύο υποστρώματα και έτσι πραγματοποιήθηκε ο κατάλληλος συσχετισμός μεταξύ των δύο υποστρωμάτων, αφού η δοκιμασία για την μέτρηση της ενεργότητας της κουτινάσης προϋποθέτει υπόστρωμα βουτυλεστέρα της π-νιτροφαινόλης. Από τη συσχέτιση προέκυψε διατήρηση της ενεργότητας της τάξης του 1,5%.

3.4 Έλεγχος θερμικής σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Για να ελεγχθεί η σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, μελετήθηκε το ποσοστό της ενεργότητας των CLEAs που απέμεινε έπειτα από θέρμανσή τους παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (20 – 40 °C) για έξι διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Για την καλύτερη απόδοση των αποτελεσμάτων ακολουθεί διάγραμμα (Διάγραμμα 3.1) με τις ενεργότητες στις διάφορες θερμοκρασίες

Διάγραμμα 3.1: Εναπομείνασα ενεργότητα ως προς χρόνο για τις διαφορετικές θερμοκρασίες.



Οι τιμές είναι υπολογισμένες σύμφωνα με τη μέγιστη τιμή ενεργότητας που είχε το ένζυμο χωρίς να υποστεί, πριν τη δοκιμασία ενεργότητας (Assay) θερμική καταπόνηση. Παρατηρείται αυξανόμενη μείωση της ενεργότητας αυξανόμενης της

θερμοκρασίας και του χρονικού διαστήματος. Πιο συγκεκριμένα, στους 20 °C μετά από 5 h θέρμανσης το ακινητοποιημένο ένζυμο χάνει λιγότερο από το 30% της αρχικής του ενεργότητας. Επιπλέον, τόσο στους 20, 30 αλλά και στους 35 °C μέχρι την πρώτη ώρα θέρμανσης παρατηρείται αντίστοιχη απώλεια ενεργότητας (περίπου 20%) ενώ πέραν της 1^{ης} ώρας αυξανόμενης της θερμοκρασίας αυξάνεται και ο ρυθμός μείωσης της ενεργότητας. Όπως είναι φυσικό, στη υψηλότερη θερμοκρασία των 40 °C ο ρυθμός μείωσης της ενεργότητας είναι ταχύτερος για τις πρώτες 2 ώρες. Ωστόσο το ποσοστό ενεργότητας 23,8% το οποίο διατηρεί το ένζυμο μετά από 5 h υποδηλώνει την σταθερότητά του στο αντίστοιχο θερμοκρασιακό περιβάλλον.

Κεφάλαιο 4^ο Αντιδράσεις Μετεστεροποίησης

4.1 Συνθέσεις Βουτυλεστέρων

Μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου ακολούθησαν αντιδράσεις μετεστεροποίησης με τα κύρια αντιδρώντα να είναι ο βινυλικός βουτυλεστέρας και η 1-βουτανόλη. Σποπός ήταν η μελέτη της απόδοσης σύνθεσης του βουτυλικού βουτυλεστέρα και η μεγιστοποίησή της μεταβάλλοντας παραμέτρους που ενδέχεται να την επηρεάσουν.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στις συνθήκες που περιγράφονται εκτενέστερα στο Κεφάλαιο 2. Ακολουθούν τα επιμέρους αποτελέσματα για τις διάφορες δοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν.

4.1.1 Επίδραση ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλης

Εξετάστηκαν ταυτόχρονα 4 διαφορετικές αλκοόλες μικρής ανθρακικής αλυσίδας (μεθανόλη, αιθανόλη, 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη) για να εξακριβωθεί, εάν υπάρχει, ο συσχετισμός της ικανότητας σύνθεσης του ενζύμου με τον αριθμό ανθράκων των μορίων των αντιδρώντων. Στον Πίνακα 4.1 απεικονίζονται οι αποδόσεις για την κάθε από τις παραπάνω αλκοόλες.

Πίνακας 4.1: Αποδόσεις των αντιδράσεων σύνθεσης που είχαν για αντιδρώντα διαφορετικές αλκοόλες.

Αλκοόλη	Απόδοση (%)
μεθανόλη	22,9
αιθανόλη	30,6
1-προπανόλη	37,8
1-βουτανόλη	42,2

Παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη απόδοση αποδίδει η χρήση της 1-βουτανόλης ως αντιδρών μαζί με το βινυλικό βουτυλεστέρα. Επιπλέον, αυξανόμενης της ανθρακικής αλυσίδας αυξάνεται και η απόδοση της σύνθεσης, με τις αλκοόλες με υψηλότερο αριθμό ανθράκων να εμφανίζουν μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε και επομένως να αποδίδουν καλύτερα στις συνθήκες της αντίδρασης.

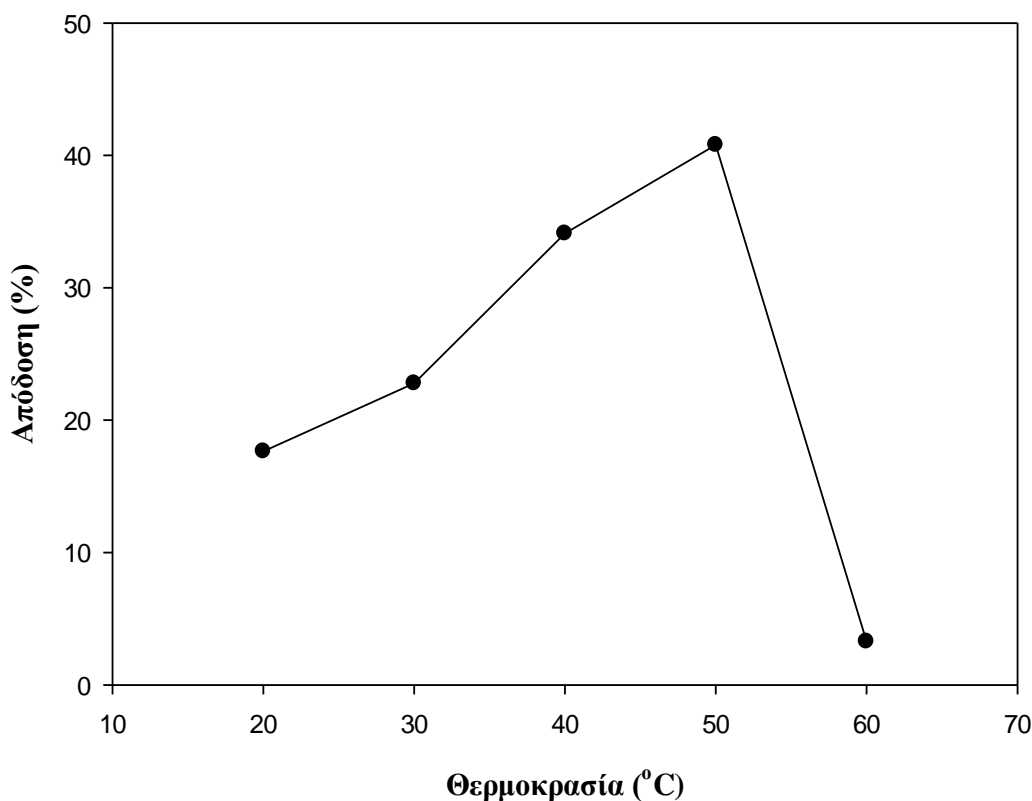
4.1.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της αντίδρασης

Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την απόδοση μιας ενζυμικής αντίδρασης με δύο τρόπους. Ο πρώτος είναι η απευθείας επίπτωση στην σταθερά ρυθμού της αντίδρασης και ο δεύτερος είναι η απενεργοποίηση του ενζύμου σε υψηλές θερμοκρασίες. Το θερμοκρασιακό εύρος μέσα στο οποίο τα ένζυμα επιδεικνύουν ενεργότητα τοποθετείται από 0 έως 100 °C. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η εξεύρεση της

βέλτιστης θερμοκρασίας λειτουργίας του ενζύμου ώστε αυτό να μην χάνει την ενεργότητά του και να αποδίδεται ο βέλτιστος ρυθμός της αντίδρασης.

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματα μετά το πέρας μίας εβδομάδας από τις 5 διαφορετικές θερμοκρασίες που εξετάστηκαν καταστρώθηκε το Διάγραμμα 4.1 της απόδοσης της αντίδρασης σε σχέση με το θερμοκρασιακό περιβάλλον.

Διάγραμμα 4.1: Απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης σε σχέση με τη θερμοκρασία διεξαγωγής της.

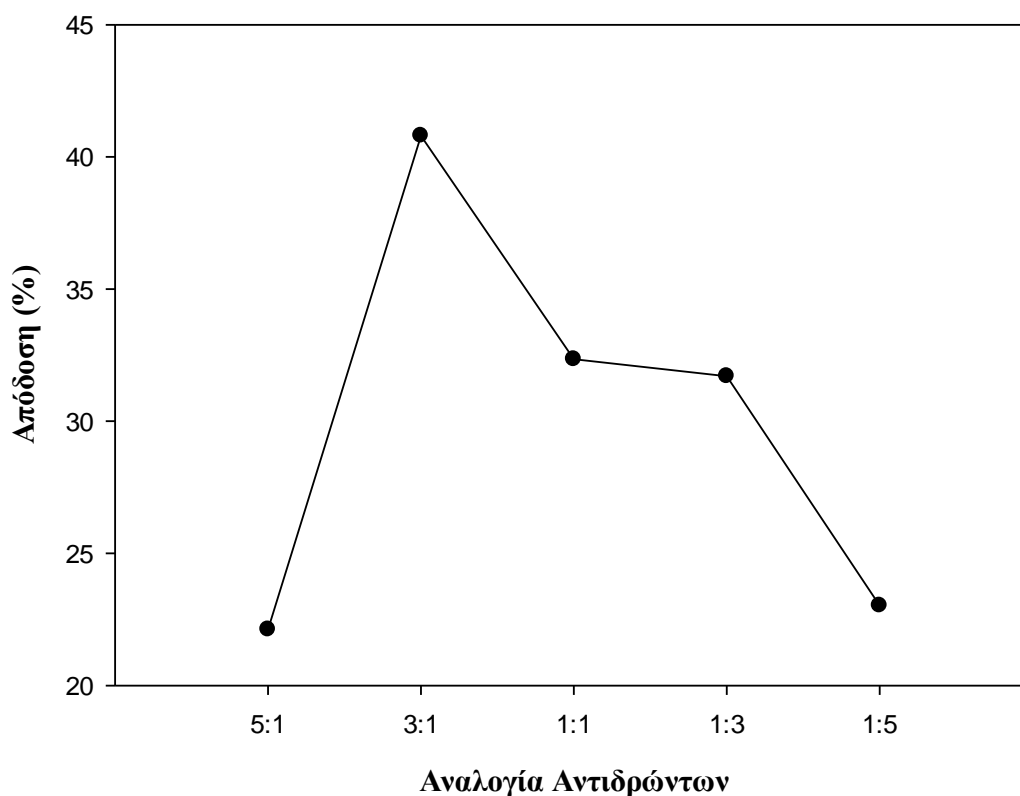


Η μέγιστη απόδοση που προέκυψε είναι 40% περίπου και παρατηρείται για θερμοκρασία 50 °C. Παρατηρείται, επίσης, μια ομαλή αύξηση της απόδοσης από τους 20 στους 30 °C, ενώ φαίνεται πιο απότομη μέχρι τη θερμοκρασία των 50 °C, οπότε και δημιουργείται και το μέγιστο στην καμπύλη. Υψηλότερες θερμοκρασίες από τους 50 °C δεν φανερώνουν την δυνατότητα αύξησης της απόδοσης καθώς μετά το θερμοκρασιακό αυτό όριο η απόδοση ελαττώνεται δραματικά, ακόμη κάτω και από την απόδοση των 20 °C. Επομένως, περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας είναι αντιοικονομική και ασύμφορη όχι μόνο από ενεργειακή άποψη αλλά και επειδή το ακινητοποιημένο ένζυμο χάνει την ικανότητα σύνθεσης.

4.1.3 Επίδραση της αναλογίας των αντιδρώντων συστατικών

Στο επόμενο στάδιο μελετήθηκε η αναλογία βινυλικού βουτυλεστέρα – 1-βουτανόλης. Και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν 5 διαφορετικές αναλογίες, η αντίδραση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 40 °C από όπου και προέκυψε το Διάγραμμα 4.2.

Διάγραμμα 4.2: Απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης σε σχέση με την αναλογία των αντιδρώντων συστατικών (βινυλικός βουτυλεστέρας:1-βουτανόλη).

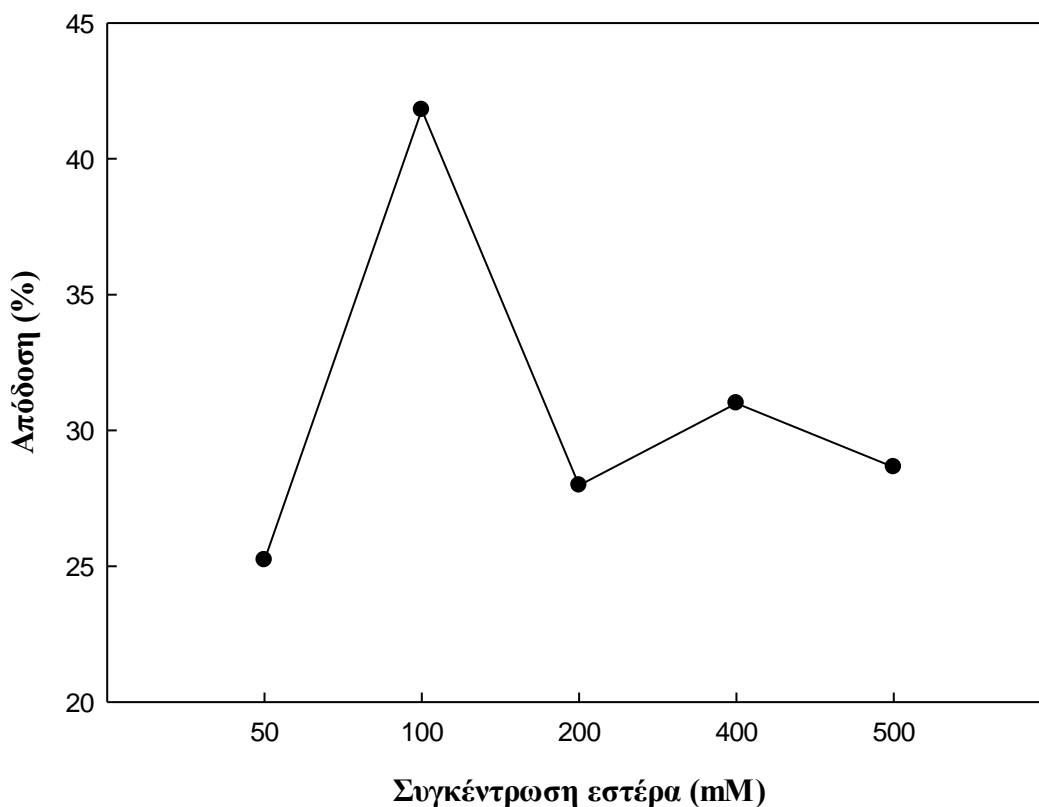


Η βέλτιστη αναλογία αντιδρώντων επιτυγχάνεται με τη χρήση 3 φορές υψηλότερης συγκέντρωσης βινυλικού βουτυλεστέρα σε σχέση με την 1-βουτανόλη, με αποτέλεσμα η απόδοση να φθάνει στο 41%. Σε εκείνο το σημείο παρουσιάζεται μέγιστο στην καμπύλη, πράγμα και επιθυμητό. Περαιτέρω αύξηση της 1-βουτανόλης έχει αρνητική επίπτωση στην απόδοση της αντίδρασης. Η μικρότερη απόδοση εμφανίζεται για τις αναλογίες 5:1 και 1:5 όπου η συγκέντρωση του ενός από τα δύο αντιδρώντα είναι υψηλή και δεν αποφέρει όφελος η επιλογή της.

4.1.4 Μελέτη συγκεντρώσεων του βινυλικού βουτυλεστέρα

Σύμφωνα με τα προαναφερθέντα αποτελέσματα σχετικά με την βέλτιστη αναλογία αντιδρώντων, στην παρούσα δοκιμασία διατηρήθηκε ο λόγος Vinyl Butyrate:1-Butanol 3:1 και κατά τη μεταβολή των συγκεντρώσεων του βινυλικού εστέρα κατά 6 διαφορετικές τιμές καταστρώθηκε το Διάγραμμα 4.3.

Διάγραμμα 4.3: Απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης σε σχέση με την μεταβολή της συγκέντρωσης του βινυλικού βουτυλεστέρα.

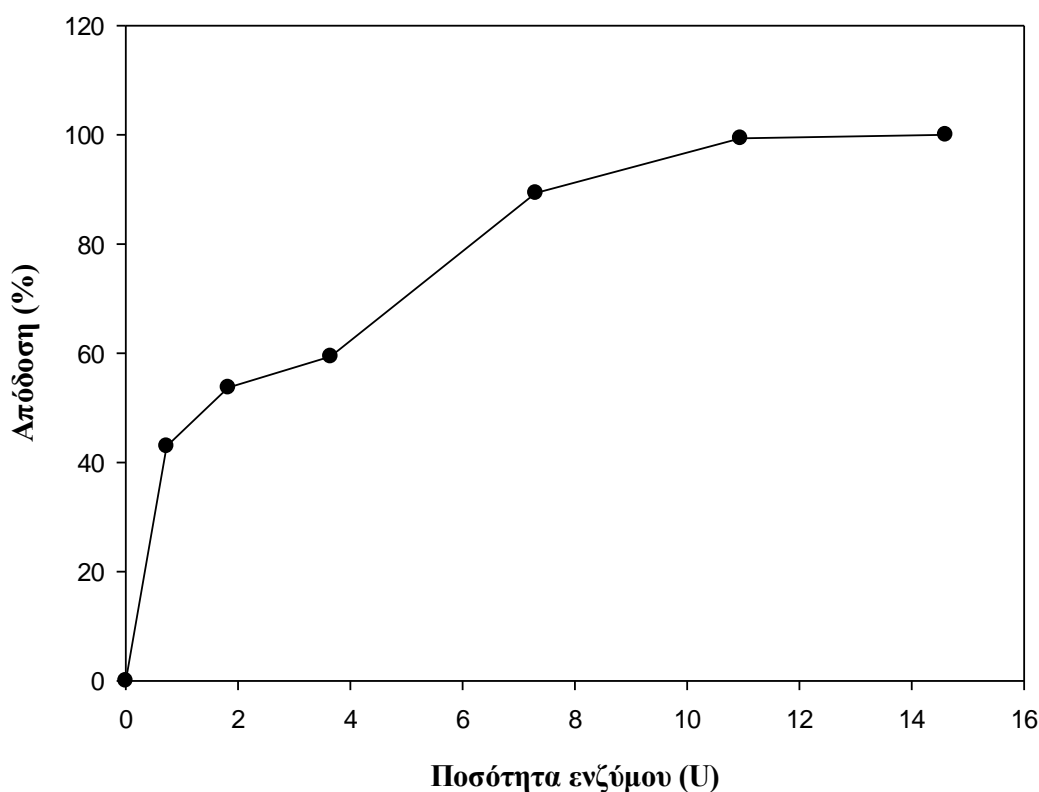


Παρατηρείται πως η αντίδραση παρουσιάζει μέγιστο στην απόδοση για συγκέντρωση βινυλικού βουτυλεστέρα ίση με 100 mM. Επιπλέον, η μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης, όπως λ.χ. στα 500 mM δεν παρουσιάζει και αντίστοιχη αύξηση στην απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης. Ακολούθως και μέχρι την τιμή των 200 mM υπάρχει μια σημαντική μείωση της απόδοσης της αντίδρασης ενώ από το σημείο αυτό και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η απόδοση μάλλον σταθεροποιείται και δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια άλλη συσχέτισή της με την αύξηση της συγκέντρωσης του εστέρα.

4.1.5 Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στην αντίδραση

Το ακινητοποιημένο ένζυμο διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο σε μια βιοκαταλυτική αντίδραση σύνθεσης. Επομένως, για να εξακριβωθεί ποιά συγκέντρωση ενζύμου είναι απαραίτητη για τη διεξαγωγή της αντίδρασης στη μέγιστη δυνατή απόδοση, εξετάστηκαν 7 διαφορετικές περιπτώσεις όπου μεταβλήθηκε (αυξήθηκε) η ποσότητα του ενζύμου. Οι περιπτώσεις αυτές παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4.4.

Διάγραμμα 4.4 : Απόδοση της αντίδρασης για διαφορετικές ποσότητες ακινητοποιημένου ενζύμου.

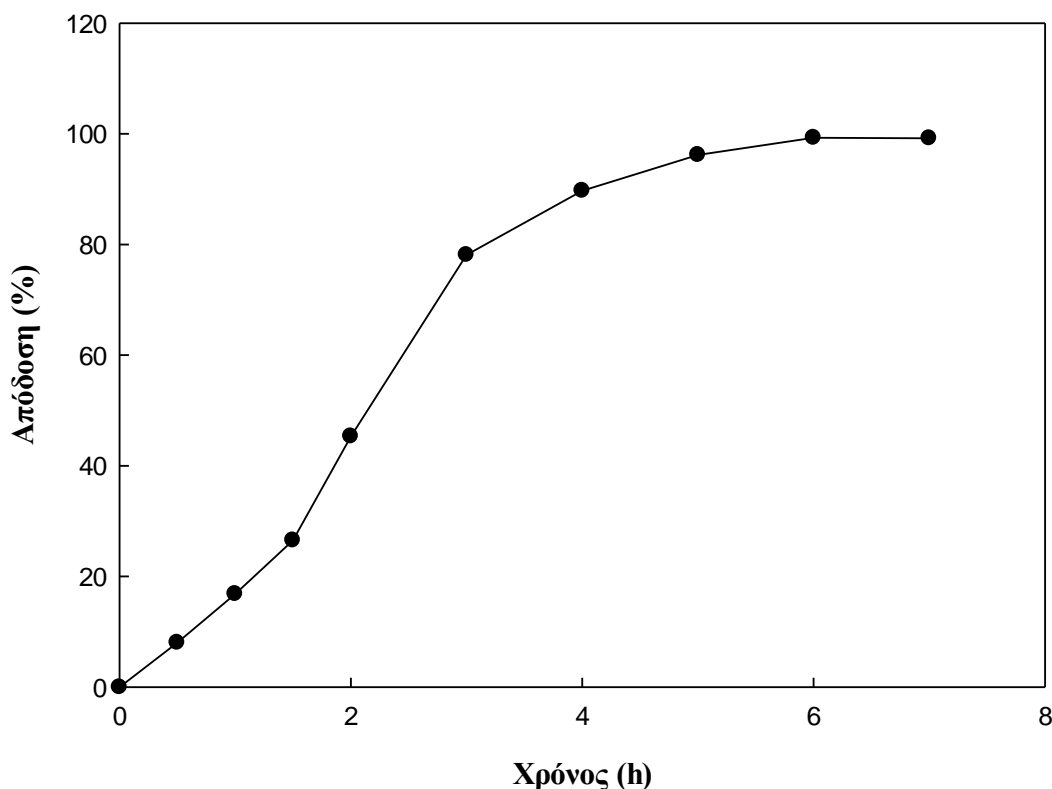


Η ποσότητα εκφράστηκε σε μονάδες ενεργότητας. Παρατηρείται μια συνεχής αυξητική τάση στην απόδοση της αντίδρασης με τη μέγιστη τιμή να επιτυγχάνεται για 14,6 U. Στην περίπτωση αυτή η απόδοση φθάνει το 100%, δεδομένου ότι κατά την ανίχνευση με τη χρήση της HPLC, το ποσό του εναπομείναντος βινυλικού βουτυλεστέρα ήταν τόσο μικρό που δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί. Η προηγούμενη, ωστόσο, μέτρηση που πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση των 11 U, έδειξε ότι το ποσοστό της μετατροπής ξεπέρασε το 99%, επομένως αποτελεί τη βέλτιστη μετρήσιμη συγκέντρωση του CLEA στην αντίδραση. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και με τη χρήση περίπου 3 φορές λιγότερης ποσότητας ενζύμου από τη βέλτιστη δυνατή, η απόδοση της αντίδρασης φθάνει το 60%, μια ικανοποιητική τιμή για τη σχέση εξοικονόμησης – απόδοσης της σύνθεσης.

4.2 Πορεία της απόδοσης της αντίδρασης με το χρόνο

Στο τελευταίο στάδιο μελέτης της μετεστεροποίησης του βινυλικού βουτυλεστέρα και χρησιμοποιώντας όλες τις βέλτιστες συνθήκες που βρέθηκαν στις προηγούμενες μελέτες, εξετάστηκε η χρονική εξέλιξη της σύνθεσης και εξάχθηκε η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Για τις 7 ώρες που μετρήθηκαν δείγματα καταστρόφηκε το Διάγραμμα 4.5 που ακολουθεί.

Διάγραμμα 4.5: Απόδοση της αντίδρασης σε σχέση με το χρόνο στις βέλτιστες συνθήκες.



Η ταχύτητα της αντίδρασης προσδιορίστηκε από την κλίση της καμπύλης για τα τέσσερα πρώτα σημεία του διαγράμματος (γραμμικό τμήμα) και υπολογίστηκε ίση με 12,5 mmol/L/h. Παρατηρείται πως για τις 4 πρώτες ώρες η αντίδραση εξελίσσεται με ταχύ ρυθμό και επιτυγχάνεται απόδοση περίπου 89%. Στην συνέχεια και για τις υπόλοιπες 3 ώρες ο ρυθμός μειώνεται λόγω και της σταδιακής απενεργοποίησης του ενζύμου, με την απόδοση, ωστόσο, να φθάνει και σταθεροποιείται μετά από 7 h σε μια τιμή πολύ κοντά στο 100%. Η εξέλιξη αυτή είναι πολύ σημαντική καθώς αποδεικνύεται πως όχι μόνο επιτυγχάνεται η μέγιστη μετατροπή αλλά και ότι η αντίδραση ουσιαστικά ολοκληρώνεται πολύ πριν τη μια εβδομάδα που είχε τεθεί ως χρονική παράμετρος στις προηγούμενες μελέτες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 5^ο Σύνοψη και συζήτηση αποτελεσμάτων

Η κουτινάση παρουσιάζει μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον σε διάφορους τομείς, όπως τα τρόφιμα και τα πολυμερή, λόγω της υψηλής δραστηριότητας και σταθερότητας του ενζύμου σε διάφορα περιβάλλοντα και συνθήκες λειτουργίας. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές βασίζονται σε αντιδράσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε μη υδατικά συστήματα. Για το λόγο αυτό έλαβε χώρα μελέτη της ακινητοποίησης της κουτινάσης και της δράσης της ως βιοκαταλύτης σε αντιδράσεις σύνθεσης με εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων.

Η έκφραση και παραγωγή της κουτινάσης *FoCut5a* του μεσόφιλου μύκητα *Fusarium oxysporum* πραγματοποιήθηκε ετερόλογα σε ξενιστή, το βακτηριακό στέλεχος *Escherichia coli* BL21 (DE3). Η κλωνοποίηση του γονιδίου *foxg_16606.3* στο pET22b(+) πραγματοποιήθηκε διατηρώντας τη σηματοδοτική αλληλουχία *pelB*, γεγονός που σημαίνει ότι έλαβε χώρα μεταφορά της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο περίπλασμα του βακτηριακού κυττάρου για να επιτευχθεί σωστότερη αναδίπλωσή της (Dimarogona et al., 2015).

Πιο συγκεκριμένα, στα βακτηριακά στελέχη *E. coli* η επαγωγή της έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη 0,1 mM isopropyl 1-thio-β-d-galactopyranoside (IPTG) και η παραγωγή έλαβε χώρα στους 16 °C. Ακολούθησε λήψη του πρωτεϊνικού μίγματος με διάρρηξη των βακτηριακών κυττάρων με υπερήχους.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μελέτη της ακινητοποίησης του μίγματος ενζύμου με χρήση της μεθόδου διασταυρούμενης σύνδεσης (cross-linking) και διασυνδέτη τη γλουταραλδεΐδη. Από τις μελέτες που ακολούθησαν επιλέχθηκε ως βέλτιστος διαλύτης καταβύθισης το ακετονιτρίλιο. Σε αντίστοιχες μελέτες που έγιναν από τους Vafiadi et al., 2007, κατά την δημιουργία CLEAs από εμπορικές εστεράσες (Ultraflo L, Depol 740L και Depol 670L) κατά το βήμα της καταβύθισης χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου, ο οποίος επιδείκνυε υψηλότερη σταθερότητα και συνθετική ικανότητα. Σε αντίστοιχη περίπτωση ακινητοποίησης της λιπάσης B του μικροοργανισμού *C. antarctica* (εμπορικό ένζυμο Novozym 435) χρησιμοποιήθηκε και πάλι το κορεσμένο διάλυμα θειικού αμμωνίου, λόγω της υψηλής ικανότητας καταβύθισης, με την ενεργότητα ανάκτησης να προσεγγίζει το 188% (Torres et al., 2014). Στην περίπτωση της κουτινάσης του *Fusarium oxysporum* που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, το αντίστοιχο μέγιστο ποσοστό για το ακετονιτρίλιο ήταν 75%.

Ακολούθως εξετάστηκε η συγκέντρωση παράγοντα διασύνδεσης που θα έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα. Έπειτα από μελέτη διαφορικών συγκεντρώσεων βρέθηκε η τιμή των 10 mM ως η πιο αποτελεσματική για την ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Βιβλιογραφικά βέλτιστες τιμές γλουταραλδεΐδης αποτελούν τα 100 mM σε διαλύτη καταβύθισης κορ. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ για την εστεράση Depol 740L και τα 10 mM στον ίδιο διαλύτη καταβύθισης για την εστεράση Ultraflo L (Vafiadi et al., 2007). Για τη περίπτωση των υδρολασών, κατηγορία στην οποία ανήκει και η κουτινάση *FoCut5a*, παράχθηκαν CLEAs της υδρολάσης BL28 του *Bacillus licheniformis* στα οποία έπειτα από μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 50 mM γλουταραλδεΐδης, ενώ στη περίπτωση εποξυ-υδρολασών από φασόλι ροβίτσα η βέλτιστη συγκέντρωση cross-linker υπολογίστηκε

στα 20 mM. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την προτίμηση κατά κανόνα μικρότερων συγκεντρώσεων γλουταραλδεϋδης, κάτω των 100 mM, καθώς όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.3, συγκεντρώσεις υψηλότερες των 100 mM μειώνουν την ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου κάτω από το 20%. Κάτι τέτοιο μπορεί να οφείλεται στην υπέρμετρη διασύνδεση των ενζύμων με αποτέλεσμα την απώλεια ενζυμικής ευελιξίας η οποία είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του ενζύμου (Yu et al., 2013; Ju et al., 2013).

Όσον αφορά το τελευταίο στάδιο μελέτης της ακινητοποίησης, η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 9,4 mg στο 1 mL διαλύματος. Στην βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιηθεί συγκέντρωση 40 mg/mL διαλύματος ενζύμου AnFaeA (εστεράση feruloyl τύπου A) στο στάδιο της καταβύθισης (Vafiadi et al., 2008) ενώ για τις λιπάσες, όπως η λιπάση QL του *Alcaligenes sp.* η συγκέντρωση του ενζύμου φθάνει τα 250 mg/mL (Wilson et al., 2006). Στην περίπτωση των εποξυ-υδρολασών που αναφέρθηκαν προηγουμένως η αντίστοιχη συγκέντρωση είναι 20 mg/mL (Yu et al., 2013). Γενικά φαίνεται πως όσο υψηλότερη η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος τόσο πιο υψηλή προκύπτει και η ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, μέχρι ένα ορισμένο όριο στο οποίο η ενεργότητα φθάνει τη μέγιστη τιμή της. Από εκεί και πέρα περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος δεν αυξάνει την ενεργότητα ενώ μάλιστα παρατηρείται και μείωσή της. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η επιπρόσθετη ποσότητα πρωτεΐνης δεν μπορεί να καταβυθιστεί ή δεν μπορεί να διασυνδεθεί.

Μια εξίσου σημαντική παράμετρος που χρήζει διερεύνησης μετά την ακινητοποίηση, αποτελεί η θερμοσταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 40 °C και χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά η ίδια ποσότητα ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ικανότητα των CLEAs κουτινάσης να διατηρούν πάνω από το 40% της αρχικής τους ενεργότητας σε θερμοκρασίες μέχρι 35 °C και μετά από 5 h, αλλά ακόμα και για τους 40 °C η τιμή δεν έπεσε κάτω από το 20%. Συγκριτικά, το ελεύθερο ένζυμο εμφάνιζε πολύ μικρή ανεκτικότητα στη θερμοκρασία καθώς ήταν σχεδόν απενεργοποιημένο μετά από 2 h στους 35 °C ενώ στον αντίποδα το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρούσε πάνω από το 50% της αρχικής ενεργότητάς του.

Ανατρέχοντας στη βιβλιογραφία, η κουτινάση *FoCut5a* ως ελεύθερο ένζυμο εμφανίζει την βέλτιστη θερμοκρασία υδρόλυσης στους 40 °C, ενώ διατηρεί περίπου το 20% της ενεργότητας αυτής στη θερμοκρασία των 70 °C (Dimarogona et al., 2015). Όσον αφορά βιβλιογραφικές μελέτες σε CLEAs εστεράσης του *A. awamori* στους 25 °C και έπειτα από μία ώρα διατηρείται το 98 % της αρχικής ενεργότητας ενώ μετά από 3 ώρες στην ίδια θερμοκρασία το ποσοστό έχει πέσει στο 71%. Τα αντίστοιχα ποσοστά για τους 65 °C είναι 88 και 52% (Fazary et al., 2009). Μελέτη θερμοσταθερότητας πραγματοποιήθηκε και για την υδρόλάση BL28 του *Bacillus licheniformis* όπου το ένζυμο στους 40 °C διατηρούσε περίπου το 70% της αρχικής του ενεργότητας έπειτα από μια ώρα (Ju et al., 2013), ενώ το αντίστοιχο ποσοστό της κουτινάσης *FoCut5a* αγγίζει το 40%.

Την ολοκλήρωση της μελέτης της ακινητοποίησης ακολούθησε η εφαρμογή του ακινητοποιημένου ενζύμου σε αντιδράσεις σύνθεσης βουτυρικών εστέρων. Οι

αλειφατικοί εστέρες μικρής αλυσίδας αποτελούν πολύ σημαντικά αρωματικά συστατικά, που εκτιμώνται ιδιαίτερα για το φρουτώδες άρωμα που παρέχουν. Χρησιμοποιούνται σε προϊόντα με άρωμα φρούτων, αρτοποιήματα, κρασιά και γαλακτοκομικά προϊόντα. Συγκεκριμένα παραδείγματα αφορούν τον αιθυλικό προπυλεστέρα, ο οποίος έχει πολλές χρήσεις σε τεχνητά αρώματα φρούτων και σε βελτιωτές αρωμάτων και, το βουτυρικό βουτυλεστέρα, η σπουδαιότητα του οποίου φαίνεται στις βιομηχανίες τροφίμων και αρωμάτων, καθώς συνεισφέρει σημαντικά στο άρωμα του μήλου, του ανανά, της μπανάνας, του βερίκοκου και του βουτύρου (Chen et al., 2013; De Barros et al., 2012; Torres et al., 2009).

Η κουτινάση που χρησιμοποιήθηκε είναι μια υδρολάση που καταλύει φυσικά υδρολύσεις υποστρωμάτων. Στην παρούσα εργασία, ωστόσο, επιδιώχθηκε ο «εξαναγκασμός» του ενζύμου για σύνθεση και όχι υδρόλυση. Αυτό επιτεύχθηκε με την απουσία υδατικής φάσης σε κάθε αντίδραση που μελετήθηκε, με χρήση, εναλλακτικά, οργανικών ουσιών ως διαλύτες. Η επίδραση των οργανικών διαλυτών στην ενεργότητα της κουτινάσης έχει το δικό της ενδιαφέρον, καθώς η κουτινάση παρουσία οργανικών διαλυτών έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει ενεργότητα για αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης (Dutta and Dasu, 2011).

Στο πλαίσιο αυτό ακολούθησαν διαφορές μελέτες για την εξεύρεση των βέλτιστων συστατικών και συνθηκών για την διεξαγωγή της αντίδρασης σύνθεσης αρωματικών βουτυλεστέρων. Ως οργανικός διαλύτης, το μέσο για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων, επιλέχθηκε το ισο-οκτάνιο, καθώς σε προκαταρκτικές μελέτες όπου έγινε και παράλληλη χρήση εξανίου, η μη ακινητοποιημένη κουτινάση εμφάνιζε αυξημένη ενεργότητα στο ισο-οκτάνιο ενώ και στη βιβλιογραφία αναφέρεται συχνά η χρήση υδρογονάνθρακων μεγάλης αλυσίδας όπως το ισο-οκτάνιο σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται κουτινάσες (De Barros et al., 2012). Επιπλέον, διερευνώντας τις επιπτώσεις της χρήσης οργανικών διαλυτών, το εξάνιο εμφανίζει μεγαλύτερη τοξικότητα σε σχέση με το ισο-οκτάνιο καθώς τα άτομα που εκτίθενται σε αυτό μακροπρόθεσμα μπορούν να εμφανίσουν νευροπάθειες, αναπαραγωγικά προβλήματα ακόμα και καρκινογενέσεις. Επιπρόσθετα, το εξάνιο έχει σοβαρότερες επιπτώσεις και στο φυσικό περιβάλλον, λόγω της μικρότερης πτητικότητάς του και της μεγαλύτερης διαλυτότητάς του στο νερό σε σχέση με το ισο-οκτάνιο. Επομένως μπορεί να ρυπάνει ευκολότερα το έδαφος αλλά και του υδάτινους πόρους, καθώς παρουσιάζει υψηλή κινητικότητα από το αρχικό σημείο απελευθέρωσής του¹. Τέλος, μια ακόμα πιθανής εξήγηση για την καλή συμπεριφορά του ισο-οκτανίου μπορεί να αποδοθεί και στη διαμόρφωση του ενζύμου, λόγω της αλληλεπίδρασής του με τα μόρια του διαλύτη, κατά την παραμονή του σε αυτόν (Speranza et al., 2013).

¹ Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη τοξικότητα και τις πιθανές επιπτώσεις των δύο οργανικών διαλυτών βλέπε τους ακόλουθους συνδέσμους :

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8058>

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_2_4-Trimethylpentane

Στην συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της ανθρακικής αλυσίδας στην απόδοση της αντίδρασης. Παρατηρήθηκε ότι τη μέγιστη απόδοση απέδιδε η χρήση της 1-βουτανόλης ως ακυλοδότη. Αντίθετα οι αλκοόλες με λιγότερους άνθρακες στο μορίο τους δεν συντελούν στην εμφάνιση υψηλών αποδόσεων. Η εξήγηση μπορεί να οφείλεται στη προτίμηση των κουτινασών σε αντιδρώντα με μικρά μήκη ανθρακικής αλυσίδας. Αναφορικά σε περιπτώσεις σύνθεσης (εστεροποίηση και μετεστεροποίηση) το ένζυμο δείχνει μεγαλύτερη προτίμηση σε αντιδρώντα (οξέα στην περίπτωση εστροποίησης ή εστέρες για μετεστεροποίηση) με αριθμό ανθράκων C4 ή C5, όπως οι αλειφατικοί εστέρες της παρούσας εργασίας (Xu et al., 2015). Χρηζουν αναφοράς οι μελέτες της επίδρασης του μήκους της αλυσίδας των αλκοολών από τους Dutta and Dasu, 2011, όπου μελετήθηκαν η βουτανόλη, η πεντανόλη, η εξανόλη, η οκτανόλη και η δεκανόλη, με τη βουτανόλη να οδηγεί σε αποδόσεις σύνθεσης κοντά στο 100% ακολουθούμενη από την πεντανόλη και αντίστοιχα από τις υπόλοιπες αλκοόλες κατά σειρά αυξανόμενου αριθμού ανθράκων. Επιπλέον, βιβλιογραφικά έχει μελετηθεί και η επίδραση των οξέων κατά την εστεροποίηση με χρήση λυοφιλιωμένης κουτινάσης, όπου το ένζυμο εμφάνισε μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για μικρότερης αλυσίδας οξέα κυρίως το βουτυρικό και το βαλερικό (C4 και C5 αντίστοιχα) σε σχέση με μεγάλης αλυσίδας οξέα όπως το οκτανοϊκό και δεκανοϊκό (De Barros et al., 2009). Ομοίως και σε αντιδράσεις υδρόλυσης οι κουτινάσες φαίνεται ότι προτιμούν τους εστέρες μικρών ανθρακικών αλυσίδων 2 ή 4 ατόμων (Chen et al., 2013).

Επόμενο βήμα αποτέλεσε η επίδραση της θερμοκρασίας στην απόδοση της αντίδρασης του βινυλικού βουτυλεστέρα με την 1-βουτανόλη. Η μέγιστη τιμή απόδοσης (~ 40%) λήφθηκε στους 50 °C ενώ περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας αποδείχθηκε ανώφελη, αφού οδήγησε στην απενεργοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου. Αξίζει να σχολιαστεί ότι η θερμοκρασία των 50 °C αποτελεί τη βέλτιστη για την αντίδραση μετεστεροποίησης, ενώ στην περίπτωση της υδρόλυσης με χρήση του ελεύθερου ενζύμου ήταν 40 °C. Αντίστοιχες βιβλιογραφικές μελέτες σύνθεσης εστέρων μικρής αλυσίδας, όπως εκείνη των Kanwar et al., (2008), όπου χρησιμοποιήθηκε μια ακινητοποιημένη λιπάση του *Bacillus coagulans* για τη σύνθεση ισοαμυλικός προπυλεστέρας, έδειξε ότι η μέγιστη σύνθεση εστέρα παραλήφθηκε για θερμοκρασία 55 °C, ενώ κατά τη χρησιμοποίηση μη ακινητοποιημένης κουτινάσης του *Burkholderia cepacia* για τη σύνθεση βουτυρικού βουτυλεστέρα μέσω εστεροποίησης η υψηλότερη μετατροπή βρέθηκε για το θερμοκρασιακό εύρος 35 – 40 °C (Dutta and Dasu, 2011).

Έχοντας κατοχυρώσει τη θερμοκρασία των 50 °C για την περαιτέρω συνέχιση των αντιδράσεων, μελετήθηκε η αναλογία βινυλικού βουτυλεστέρα – 1-βουτανόλης στο μίγμα της αντίδρασης. Από τις 5 διαφορετικές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν για την αναλογία 3:1 (Εστέρα:Αλκοόλης). Στην περίπτωση της σύνθεσης μέσω εστεροποίησης του βουτυρικού βουτυλεστέρα με χρήση μιας κουτινάσης του *Thielavia terrestris* η αναλογία βουτυρικού οξέος προς την 1-βουτανόλη ήταν 3:2 ενώ σε μια ακόμα περίπτωση μετεστεροποίησης με ακινητοποιημένη λιπάση από το βακτήριο *B. Coagulans* η μοριακή αναλογία των αντιδρώντων ισοαμυλικού προπυλεστέρα και βινυλικού προπυλεστέρα επιλέχθηκε ίση με 1:1 (Xu et al., 2015; Kanwar et al., 2008). Από αυτά τα δεδομένα δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το πω επιλέγεται η βέλτιστη αναλογία κάθε φορά,

αν και στις περιπτώσεις εστεροποίησης με οξέα, προτιμάται ίση ή χαμηλότερη συγκέντρωση του οξέος σε σχέση με την αλκοόλη καθώς το οξύ είναι τοξικό για το ένζυμο και επομένως επηρεάζει την ενεργότητά του. Στην παρούσα εργασία λόγω της αντίδρασης μετεστεροποίησης και μη χρήσης οξέος ως αντιδρών ήταν εφικτή μια αναλογία συγκέντρωσης βινυλικού εστέρα 3 φορές μεγαλύτερη από εκείνη της 1-βουτανόλης και η οποία απέδωσε και τη βέλτιστη απόδοση.

Ως συνέχεια της παραπάνω μελέτης εξετάστηκαν και διαφορετικές συγκεντρώσεις του βινυλικού βουτυλεστέρα στην αντίδραση σύνθεσης. Παρατηρήθηκε πως η αντίδραση παρουσιάζει μέγιστο στην απόδοση για συγκέντρωση βινυλικού βουτυλεστέρα ίση με 100 mM, ενώ για μεγαλύτερη αύξηση της συγκέντρωσης οδήγησε σε μειωμένη αποδοτικότητα μέχρι και 20%. Γενικά δεν βρέθηκε να υπάρχει συσχετισμός για το ποια συγκέντρωση βινυλεστέρα οδηγεί σε καλύτερα αποτελέσματα. Ακόμα και στη βιβλιογραφία οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων επιλέγονται αφότου έχουν διεξαχθεί αντίστοιχες μελέτες με διαφορετικές συγκεντρώσεις. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η περίπτωση της εστεροποίησης του βουτυρικού βουτυλεστέρα από λυοφιλιωμένη κουτινάση του *Thielavia terrestris* όπου η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος επιλέχθηκε ίση με 100 mM, και η σύνθεση του αιθυλικού καπριλεστέρα με κουτινάση του *Fusarium solani pisi* όπου για ισομοριακή αναλογία αντιδρώντων η μέγιστη απόδοση (77%) επιτεύχθηκε για συγκέντρωση 200 mM (Xu et al., 2015; De Barros et al., 2009).

Εξίσου σημαντική παράμετρο αποτελεί και η ποσότητα του ενζύμου στην πορεία και απόδοση της αντίδρασης. Στις αρχικές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ενζύμου ενεργότητας 1,5 U/mL που είναι πολύ μικρή σε σχέση με αρκετές βιβλιογραφικές τιμές, όμως κατάφερε να οδηγήσει την αντίδραση σύνθεσης του βουτυρικού βουτυλεστέρα σε απόδοση περίπου 40%. Τελικά βρέθηκε ότι η ποσότητα ενζύμου στην οποία απόδοση της αντίδρασης άγγιζε το 100% ήταν 11 U. Η ποσότητα αυτή αποδεικνύεται πολύ μικρότερη από αντίστοιχες μελέτες σε κουτινάσες και λιπάσες. Πιο αναλυτικά, κατά την εστεροποίηση για τη σύνθεση αιθυλικού καπριλεστέρα σε ισο-οκτάνιο παρουσία της λυοφιλιωμένης κουτινάσης του *Fusarium solani pisi* η μέγιστη απόδοση λήφθηκε για ποσότητα ενζύμου ενεργότητας 480 U/mL σε όγκο αντίδρασης 7 mL. Επιπλέον, σε μια μεταγενέστερη εφαρμογή, από την ίδια ερευνητική ομάδα, σύνθεσης με εστεροποίηση οξέων (C2, C4, C6, C8) με την ίδια κουτινάση, χρησιμοποιήθηκε ποσότητα ενζύμου ενεργότητας 240 U/mL σε όγκο αντίδρασης 7 mL με την απόδοση της εστεροποίησης να ξεπερνά το 95% (De Barros et al., 2009; De Barros et al., 2012). Τέλος, σημειώνεται και μια περίπτωση όπου 50 U λυοφιλιωμένης κουτινάσης του μήκυστα *Thielavia terrestris* χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση του βουτυρικού βουτυλεστέρα με εστεροποίηση και η απόδοση έφθασε κοντά στο 95% μέσα σε 8 h (Xu et al., 2015).

Η χρονική μελέτη της απόδοσης της αντίδρασης αποτέλεσε και το τελευταίο στάδιο των μελετών γύρω από την αντίδραση μετεστεροποίησης. Η σύνθεση έλαβε χώρα στις βέλτιστες συνθήκες (διαλύτη, θερμοκρασία, αναλογίας αντιδρώντων, συγκέντρωσης βινυλικού βουτυλεστέρα, ποσότητας ενζύμου) και υπολογίστηκε ότι η αρχική της ταχύτητα ήταν 12,5 mmol/L/h και ότι σε χρόνο 6 h η απόδοσή της έφθασε σχεδόν το 100%. Σε αντίστοιχες μελέτες που αφορούν τη σύνθεση εστέρων μικρής αλυσίδας, στην περίπτωση χρήσης λιπάσης του *B. coagulans* στις βέλτιστες συνθήκες η απόδοση

ανήλθε στο 61,2% σε 21 h, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε η λιπάση LipIAF5-2 για τη μετεστεροποίηση του γλυκερολικού τρι-προπυλεστέρα (glyceryl triacetate) σε ισοαμυλικό προπυλεστέρα η απόδοση έφτασε κοντά στο 100% μετά από 24 h (Kanwar et al., 2008; Brault et al., 2014). Όσον αφορά τις κουτινάσες, κατά τη σύνθεση του βουτυρικού βουτυλεστέρα με εστεροποίηση επιτεύχθηκε απόδοση 94,6% σε 25 h σε 37 °C. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν μια κουτινάση του *B. ceracia* (Dutta and Dasu, 2011). Επιπρόσθετα, οι De Barros et al., 2009 χρησιμοποίησαν μια λυοφιλωμένη κουτινάση του *Fusarium solani pisi* για τη σύνθεση αιθυλικού καπριλεστέρα και άλλων εστέρων μικρής αλυσίδας παρουσία ισο-οκτανίου. Στις βέλτιστες συνθήκες οι υψηλότερες αποδόσεις προέκυψαν με τα αντιδρώντα της εστεροποίησης να είναι το βουτυρικό οξύ (84% μετά από 6 h), το βαλερικό οξύ (96,5% μετά από 6 h). Τέλος η απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης του αιθυλικού καπριλεστέρα σε διαλύτη ισο-οκτάνιο άγγιξε το 97% μετά από 6 h. Συμπερασματικά, οι τιμές των αποδόσεων που επιτεύχθηκαν στις διάφορες μελέτες είναι αρκετά υψηλές και συμβαδίζουν ως ένα βαθμό μεταξύ τους, παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι στην παρούσα εργασία το ποσοστό μετατροπής του βινυλικού βουτυλεστέρα έφθασε το 99% μετά από 6 ώρες αντίδρασης.

5.1 Προτάσεις για το μέλλον

Οι μελλοντικές μελέτες που θα μπορούσαν να εμπλουτίσουν την παρούσα εργασία αφορούν τα εξής σημεία:

- Μελέτη της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης κουτινάσης του *F. oxysporum* και μετά από περισσότερους κύκλους με τη βοήθεια της δοκιμασίας ενεργότητας. Κάτι τέτοιο είναι εξαιρετικά πιθανό διότι το ακινητοποιημένο ένζυμο έχει τη δυνατότητα της εύκολης συλλογής και επαναχρησιμοποίησης.
- Κινητικές μελέτες της αντίδρασης μετεστεροποίησης του βινυλικού βουτυλεστέρα και της 1-βουτανόλης για την εύρεση της σταθεράς του ρυθμού της σύνθεσης.
- Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρουσα η μελέτη της ίδιας αντίδρασης, χρησιμοποιώντας όμως ακινητοποιημένο ενζύμο που θα εκφραστεί ετερόλογα σε διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος, όπως για παράδειγμα το στέλεχος *E. coli* Origami. Με αυτό τον τρόπο θα ελεγχθεί μια ενδεχόμενη διαφορά στη θερμοσταθερότητα και στη συμπεριφορά του ενζύμου στην αντίδραση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Yeats, T.H. and Rose, J.K. (2013) The Formation and Function of Plant Cuticles. *Plant physiology*, 163, 5-20

Domínguez, E., Heredia-Guerrero, J.A. and Heredia, A. (2011) The Biophysical Design of Plant Cuticles: An Overview. *New Phytologist*, **189**, 938-949

Purdy, R. and Kolattukudy, P. (1975) Hydrolysis of Plant Cuticle by Plant Pathogens. Purification, Amino Acid Composition, and Molecular Weight of Two Isoenzymes of Cutinase and a Nonspecific Esterase from *Fusarium solani* f. *pisii*. *Biochemistry*, **14**, 2824-2831

Kolattukudy, P. (1985) Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **23**, 223-250

Kerstiens, J. *Exp. Bot.* 47 (1996) 1813– 1832

M. Riederer, L. Schreiber, J. *Exp. Bot.* 52 (2001) 2023–2032

Lin, T. S. and Kolattukudy, P.E. (1980). Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. *European Journal of Biochemistry* 106:341-351

Longhi, S. and Cambillau, C. (1999) Structure-Activity of Cutinase, a Small Lipolytic Enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1441**, 185-196

Chen, Y.-M., Y. Zhu, E.C.C. Lin (1987). The organization of fuc regulon specifying L-fucose dissimilation in *Escherichia coli* K12 as determined by gene cloning. *Mol.Gen.Genet.* 210:331-337

Egmond, M.R. and de Vlieg, J. (2000) *Fusarium solani pisi* Cutinase. *Biochimie*, **82**, 1015-1021

Carvalho, C.M., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J. (1999) Cutinase: From Molecular Level to Bioprocess Development. *Biotechnology and Bioengineering*, **66**, 17-34

Pio, T.F. and Macedo, G.A. (2009) Chapter 4 Cutinases: Properties and Industrial Applications. In: Laskin, I.A., Sariaslani, S. and Geoffrey, M.G., Eds., *Advances in Applied Microbiology*, Academic Press, Waltham, 77-95

Vidinha, P., Augusto, V., Almeida, M., Fonseca, I., Fidalgo, A., Ilharco, L., Cabral, J.M. and Barreiros, S. (2006) Sol-Gel Encapsulation: An Efficient and Versatile Immobilization Technique for Cutinase in Non-Aqueous Media. *Journal of Biotechnology*, **121**, 23-33

Fett W.F., Gérard H.C., Moreau R.A., Osman S.F., and Jones L.E. (1992). Cutinase Production by *Streptomyces* spp. . *Current Microbiology*. **25**: 165-171

Speranza P., Carvalho P.O., Macedo G.A. (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. **72**: 181-186

Li, J., Liu, L., Chen, S., Du, G. and Chen, J. (2009) Advances in Cutinase Research. *Chinese Journal of Biotechnology*, **25**, 1829-1837

Sebastian, J., Chandra, A.K. and Kolattukudy, P.E. (1987). Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in phyllosphere. *Journal of Bacteriology* **169**:131-136

Chen, S., Su, L., Chen, J. and Wu, J. (2013) Cutinase: Characteristics, Preparation, and Application. *Biotechnology Advances*, **31**, 1754-1767

van Gemeren IA, Musters W, Van den Hondel CA, Verrips CT. (1995) Construction and heterologous expression of a synthetic copy of the cutinase cDNA from *Fusarium solani* pisi. *J Biotechnol*, **40**, 155–62

Calado CRC, Taipa MA, Cabral JMS, Fonseca LP. (2002) Optimisation of culture conditions and characterisation of cutinase produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*, **31**, 161–70

Sagt CMJ, Kleizen B, Verwaal R, de Jong MDM, Müller WH, Smits A, et al. (2000) Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 4940–4

Ferreira BS, Calado CRC, van Keulen F, Fonseca LP, Cabral JMS, da FonsecaMMR. (2003) Towards a cost effective strategy for cutinase production by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: strain physiological aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, **61**, 69–76

Calado CRC, Ferreira BS, Da Fonseca MMR, Cabral JMS, Fonseca LP. (2004) Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. *J Biotechnol*, **109**, 147–58

Kwon MA, KimHS, Yang TH, Song BK, Song JK. (2009) High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, **68**, 104–9

Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, et al. (2009) Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc*, **131**, 15711–6

- Nyysola A, Pihlajaniemi V, Jarvinen R, Mikander S, Kontkanen H, Kruus K, et al.** (2013) Screening of microbes for novel acidic cutinases and cloning and expression of an acidic cutinase from *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Enzyme Microb Technol*, 52, 272–8
- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee Y-M, Bostock RM.** (2002) Molecular cloning, characterization, and expression of a redox-responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Fungal Genet Biol*, 35, 261–76
- Shinozaki Y, Morita T, Cao XH, Yoshida S, Koitabashi M, Watanabe T, et al.** (2013b) Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 2951–9
- Kontkanen H, Westerholm-Parvinen A, Saloheimo M, Bailey M, Rättö M, Mattila I, et al.** (2009) Novel *Coprinopsis cinerea* polyesterase that hydrolyzes cutin and suberin. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2148–57
- Chen, S, Tong, X, Woodard, RW, Du, G, Wu, J, Chen, J. (2008)** Identification and characterization of bacterial cutinase. *J Biol Chem*, 283:25854–62
- Melo, E. P., Costa, S. M. B., Cabral, J. M. S., Fojan, P., and Petersen, S. B.** (2003b) Cutinase-AOT interactions in reverse micelles: The effect of 1-hexanol. *Chem. Phys. Lipids* 124, 37–47
- Petersen, S. B., Johnson, P. H., Fojan, P., Petersen, E. I., Petersen, M. T. N., Hansen, S., Ishak, R. J., and Hough, R. J.** (1998) Protein engineering the surface of enzymes. *J. Biotechnol.* 66, 11–26
- Petersen, M.T.N., Martel, P., Petersen, E.I., Drabløs, F. and Petersen, S.B.** (1997) Surface and electrostatics of cutinases. In: *Methods in Enzymology* 284, B. Rubin and E.A. Dennis. New York, Academic Press, 1997, pp 130-154
- Egmond, M.R., Vlieg, J., Verheij, H.M., and de Haas, G.H.** (1996) Strategies and design of mutations in lipases. In: *Engineering of/with lipases*, F.X. Malcata, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, 297-327
- Kolattukudy, P. E.** (1984) Cutinases from fungi and pollen. In “*Lipases*” (B. Borgstrom and T. Brockman, eds.), pp. 471–504. Elsevier Publishing, Amsterdam
- Ternström, T., Svendsen, A., Akke, M., and Adlercreutz, P.** (2005) Unfolding and inactivation of cutinases by AOT and guanidine hydrochloride. *Biochim. Biophys. Acta.* 1748, 74–83
- Sebastião, M. J., Cabral, J. M. S., and Aires-Barros, M. R.** (1993) Synthesis of fatty acid esters by a recombinant cutinase in reversed micelles. *Biotechnol. Bioeng.* 42, 326–332

- Gonçalves, A. M., Schacht, E., Matthijs, G., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., and Gil, M. H.** (1999) Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 60–66
- Brissos, V., Melo, EP., Martinho, JM., Cabral JM.** (2008) Biochemical and structural characterisation of cutinase mutants in the presence of the anionic surfactant AOT. *Biochim Biophys Acta* 1784(9):1326-34
- Longhi, S., Mannesse, M., Verheij, H.M., Haas, G.H., Egmond, M., Knoops-Mouthuy, E. and Cambillau, C.** (1997a) Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Science* 6:275-286
- Cygler, M. and Schrag, J.D.** (1997) Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. In: *Methods in Enzymology* 284, B. Rubin and E.A. Dennis. New York, Academic Press, 1997, pp 3-85
- Nicolas, A., Egmond, M., Verrips, C.T., Vlieg, J., Longhi, S., Cambillau, C. and Martinez, C.** (1996) Contribution of cutinase serine 42 side chain to the stabilization of the oxyanion transition state. *Biochemistry* 35:398-410
- Martinez, C., Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. and Cambillau, C.** (1992) *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* 356:615-618
- Longhi, S., Czjzek, M., Lamizin, V., Nicolas, A. and Cambillau, C.** (1997b) Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *Journal of Molecular Biology* 268:779-799
- Jelsch, C., Longhi, S. and Cambillau, C.** (1998) Packing forces in nine crystal forms of cutinase. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 31:320-333
- Prangé, T., Schiltz, M., Pernet, I., Colloc'h, N., Longhi, S., Bourguet, W. and Fourme, R.** (1998) Exploring hydrophobic sites in proteins with xenon or krypton. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 30:61-73
- Bornscheuer, U. T. and Kazlauskas, R. J.** (2006) *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd edition
- Mateo, C., Palomo J. M., Fernandez-Lorente G., Guisan J. M. and Fernandez-Lafuente R.** (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451–1463
- Sheldon, R. A.** (2007) *Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance*. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 1289–1307
- Hanefeld, U., Gardossi, L., Edmond, M.** (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38, 453-468
- Cao, L.** (2005) *Carrier-bound Immobilized Enzymes*, Wiley-VCH, Weinheim

Pierre, A. C. (2004) The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatal. Biotransform.*, 22, 145–170

Avnir, D., Coradin, Lev T., O. and Livage J. (2006) Recent bio-applications of sol-gel materials. *J. Mater. Chem.*, 16, 1013–1030

Basso, A., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P., and Sibilla, F. (2003) Organically modified xerogels as novel tailor-made supports for covalent immobilisation of enzymes (penicillin G acylase). *Tetrahedron Lett.*, 44, 5889–5891

Ferrer, M., Plou, F. J., Fuentes, G., Angeles Cruces, M., Andersen, L., Kirk, O., Christense, M. and Ballesteros, A. (2002) Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent. *Biocatal. Biotransform.*, 20, 63–71

Basso, A., Maltman, B. A., Flitsch, S. L., Margetts, G., Brazendale, I., Ebert, C., Linda, P., Verdellia, S. and Gardossi, L. (2005) Optimized polymer-enzyme electrostatic interactions significantly improve penicillin G amidase efficiency in charged PEGA polymers. *Tetrahedron*, 61, 971–976

Basso, A., Braiuca, P., Cantone, S., Ebert, C., Linda, P., Spizzo, P., Caimi, P., Hanefeld, U., Degrassi, G. and Gardossi, L. (2007) In Silico Analysis of Enzyme Surface and Glycosylation Effect as a Tool for Efficient Covalent Immobilisation of CalB and PGA on Sepabeads®. *Adv. Synth. Catal.*, 349, 877–886

Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L.T. (2008) Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 50:80–86

Orçaire, O., Buisson, P., Pierre, A.C. (2006) Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 42:106–113

Reetz, M.T., Tielmann, P., Wiesenhöfer, W., Könen, W. and Zonta, A. (2003) Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345:717–728

Gonçalves, A.P.V., Lopes, J.M., Lemos, F., Ramôa Ribeiro, F., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R. (1997) Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani* pisi. *Enzyme and Microbial Technology*, 20:93–101

Gonçalves, A. M., Schacht, E., Matthijs, G., Aires Barros, M. R., Cabral, J. M. S and Gil, M. H. (1998) Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme and Microbial Technology* 24:60–66

Kumar M. (2000) A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46:1–27

Hung TC, Giridhar, Chiou SH, Wu WT. (2003) Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26:69-78

Krishnamoorthy H. and Venkata D. V. (2014) Studies on Immobilization of Cutinases from *Thermobifida fusca* on Glutaraldehyde Activated Chitosan Beads. *British Biotechnology Journal*, 4(10):1049-1063

Speranza P., Macedo G.A. (2013) Biochemical characterization of highly organic solvent-tolerant cutinase from *Fusarium oxysporum*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2(4):372-376

Yang S., Xu H., Yan Q., Liu Y., Zhou P., Jiang Z. (2013) A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40(2):217-26

Chen S., Su L., Billig S., Zimmermann W., Chen J., Wu J. (2010) Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 63(3-4): 121-127

Silva C.E., Matama T., Guebitz G.M., Cavaco-Paulo A. (2005b) Influence of organic solvents on cutinase stability and accessibility to polyamide fibers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 43(13): 2749-2753

Thumarat U., Nakamura R., Kawabata T., Suzuki H., Kawai F. (2012) Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type polyesterase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(2): 419-430

Flipsen J.A., van der Hijden H.T., Egmond M.R., Verheij H.M. (1996) Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop tensiometer as a tool to study lipase kinetics. *Chem. Phys. Lipids*. 84(2): 105-115

Melo E.P., Aires-Barros M.R., and Cabral J.M.S. (1995) Triglyceride hydrolysis and stability of a recombinant cutinase from *Fusarium solani* in AOT-iso-octane reversed micelles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 50(1): 45-56

Mannesse M.L., Cox R.C., Koops B.C., Verheij H.M., de Haas G.H., Egmond M.R., van der Hijden H.T., and de Vlieg J. (1995) Cutinase from *Fusarium solani* pisi hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. *Biochemistry*. 34(19): 6400-6407

Gonçalves A.P.V., Lopes J.M., Lemos F., Ramôa Ribeiro F., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Aires-Barros M.R. (1996b) Zeolites as supports for enzymatic hydrolysis reactions. Comparative study of several zeolites. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 1(2): 53-60

Gonçalves A.P., Cabral J.M., and Aires-Barros M.R. (1996a) Immobilization of a recombinant cutinase by entrapment and by covalent binding. Kinetic and stability studies. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 60(3): 217-228

Sebastião, M. J., Cabral, J.M.S., and Aires-Barros, M.R. (1992) Synthesis of fatty acid esters by a recombinant cutinase in reversed micelles. In: *Biocatalysis Non-Conventional Media*, J. Tramper, M.H. Vermue, H.H. Beeftink and U. von Stockar. Elsevier Science Publishers B.V., 1992, pp. 719-724

Cunnah, P.J., Aires-Barros, M.R. and Cabral, J.M.S. (1996). Esterification and transesterification catalysed by cutinase in reverse micelles of CTAB for the synthesis of short chain esters. *Biocatalysis and Biotransformation* 14:125-146

Sarazin, C., Goethals, G., Séguin, J.P., Legoy, M.D. and Barbotin, J.N. (1992) Usefulness of NMR methods for assaying cutinase catalysed synthesis of ester in organic media. In: *Biocatalysis in Non-Conventional Media*, J. Tramper, M.H. Vermue, H.H. Beeftink and U. von Stockar. Elsevier Science Publishers B.V., 1992, pp. 23-29

Sarazin, C., Ergan, F., Séguin, J.P., Goethals, G., Legoy M.D. and Barbotin J.N. (1995) NMR on-line monitoring of esterification catalyzed by cutinase. *Biotechnology and Bioengineering*. 51:636-644

Pinto-Sousa, A.M., Cabral, J.M.S. and Aires-Barros, M.R. (1994) Ester synthesis by a recombinant cutinase in reversed micelles of a natural phospholipid. *Biocatalysis* 9:169-179

Sereti, V., Stamatis, H. and Kolisis, F.N. (1997) Improved stability and reactivity of *Fusarium solani* cutinase in supercritical CO₂. *Biotechnology Techniques* 11:661-665

Papadimitriou, V., Xenakis, A., Cazianis, C.T., Stamatis, H., Egmond, M. and Kolisis, F.N. (1996) EPR studies of cutinase in microemulsions *Annals New York Academy of Sciences* 799:275-280

Serralha, F.N., Lopes, J.M., Lemos, F., Prazeres, D.M.F., Aires-Barros, M.R. Cabral, J.M.S., and Ribeiro, F. R. (1998) Zeolites as supports for an enzymatic alcoholysis reaction. *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic* 4:303-311

Carvalho, C.M.L., Serralheiro, M.L.M., Cabral, J.M.S. and Aires-Barros, M. R. (1997a). Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enzyme and Microbiological Technology* 21: 117-123.

Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S. and Aires-Barros, M. (1998a) Kinetics and modelling of transesterification reactions catalysed by cutinase in AOT reversed micelles. *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic* 5: 361-365

- Parvaresh, F., Robert, H., Thomas, D. and Legoy, M.D.** (1992) Gas phase transesterification reactions catalyzed by lipolytic enzymes. *Biotechnology and Bioengineering* 39:467-473
- Lamare, S., Lortie, R. and Legoy, M.D.** (1997) Kinetic studies of *Fusarium solani* pisi cutinase used in a gas/solid system: transesterification and hydrolysis reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 56:1-7
- Stavila E., Arsyi R.Z., Petrovic D.M., Loos K.** (2013a) *Fusarium solani* pisi cutinase-catalyzed synthesis of polyamides. *European Polymer Journal*. 49(4): 834-842
- Stavila E., Alberda van Ekenstein G.O., and Loos K.** (2013b) Enzyme-catalyzed synthesis of aliphatic-aromatic oligoamides. *Biomacromolecules*. 14(5): 1600-1606
- Macedo, G. A., and Pio, T. F.** (2005) A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Braz. J. Microbiol.* 36, 388–394
- Casey, J., and Macrae, A.** (1992) *Biotechnology and the oleochemical industry*. Inform. 3, 203–207
- Hammond, E. G., and Glatz, B. A.** (1988) In “*Food Biotechnology*” (R. D. Kling and P. S. J. Cheetham, eds.), Vol. 2, pp. 173–217. Elsevier, Amsterdam
- Castro, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C., and Aguiar, C. L.** (2004). Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim. Nova*. 27, 146–156
- Regado, M. A., Cristóvão, B. M., Moutinho, C. G., Balcão, V. M., Aires-Barros, R., Ferreira, J. P. M., and Malcata, F. X.** (2007). Flavour development via lipolysis of milk fat: Changes in free fatty acid pool. *Int. J. Food Sci. Technol.* 42, 961–968
- Masson, W., Loftsson, T., and Haraldsson, G. G.** (2000) Marine lipids for products, soft compounds and other pharmaceutical applications. *Pharmacies*. 55, 172–177
- Andersen, A., Svendsen, A., Vind, J., Lassen, S. F., Hjort, C., Borch, K., and Patkar, S. A.** (2002) Studies of ferulic acid esterase activity in fungal lipases and cutinases. *Colloids Surf.* 26, 47–55
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N.** (1999) Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 76(12): 1505-1510
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N.** (2001) Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11(4-6): 323–328
- Soares, C. M., Teixeira, V. H., and Baptista, A. M.** (2003) Protein structure and dynamics in no aqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies. *Biophys. J.* 84, 1628–1641

- Vertommen, M. A.M. E., Nierstrasz, V. A., Van Der Veer, M., and Warmoeskerken, M.M. C. G.** (2005) Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *J. Biotechnol.* 120, 376–386
- Yoon, M., Kellis, J., and Poulouse, A. J.** (2002) Enzymatic modification of polyester. *AATCC* 2, 33–36
- Degani, O., Gepstein, S., and Dosoretz, C. G.** (2002) Potential use of cutinase in enzymatic scouring cotton fiber cuticle. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102, 277–289
- Kim Y.H., Kim S.W., Lee J.** (2006) Enzymatic degradation and detoxification of diethyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi Cutinase. *Studies in Surface Science and Catalysis.* 159: 137–140
- Walz I. and Schwack W.** (2007) Cutinase inhibition by means of insecticidal organophosphates and carbamates. 3. Oxidation of phosphorothionates by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*. *J. Agric. Food Chem.* 55(20): 8177 - 8186
- Walz I., Schwack W.** (2008) Cutinase inhibition by means of insecticidal organophosphates and carbamates Part 2: screening of representative insecticides on cutinase activity. *European Food Research and Technology.* 226(5): 1135-1143
- Köller W. and Kolattukudy P.E.** (1982) Mechanism of Action of Cutinase: Chemical Modification of the Catalytic Triad Characteristic for Serine Hydrolases. *Biochemistry.* 21(13): 3083-3090
- Iwasaki T., Hioki Y.** (1986) Enhancement of biocide activity. European Patent Office. 0197622B1
- Poulose A.J., Kolattukudy P.** (1987) Enzymes as agricultural chemical adjuvants. European Patent Office. 0272002B1
- El-Sayed M.Y., Lewis S.L., Anderson S.A., Wiersema R.J.** (1990) Lipase and cutinase surfactant systems and method useful in laundering. European Patent Office. 0399681A2
- Kolattukudy P., Poulose A.J.** (1996) Cutinase cleaning compositions. United States Patent. 005512203A
- Egmond M.R. and van Bommel C.J.** (1997) Impact of structural information on understanding lipolytic function. *Methods Enzymol.* 284: 119-129
- Racovita, R.C., Peng, C., Awakawa, T., Abe, I., Jetter, R.** (2015) Very-long-chain 3-hydroxy fatty acids, 3-hydroxy fatty acid methyl esters and 2-alkanols from cuticular waxes of *Aloe arborescens* leaves. *Phytochemistry.* 113: 183-194
- Gulati, R., Arya, P., Malhotra, B., Prasad, AK., Saxena, RJ., Kumar, J., Watterson, A.C., and Parmar, VS.** (2003) Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids:

synthesis of sorbitol 1(6) – monostearate. Commemorative Issue in Honor of Prof. Sukh Dev on the occasion of his 80th anniversary, pp. 159-170

Saxena, R.K., Ghosh, P.K., Gupta, R., Davidson, W.S., Bradoo, S. and Gulati, R. (1999) Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the Future Industry. *Current Science*, 77, 101-115.

van den Broek, L.A.M., Boeriu, C.G. (2013) Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate Polymers*. 93(1): 65-72

Arcos, JA., Bernabe, M., Otero, C. (1998) Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl sorbitol esters. *Biotechnol Bioeng*. 60(1): 53-60.

Sergeeva, M.V., Paradkar, V.M., and Dordick, J.S. (1997) Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*. 20(8): 623-628.

Capellas, M., Benaiges, M.D., Caminal, G., Gonzáles, G., López-Santín, J., and Clapés, P. (1996b) Enzymatic synthesis of a CCK-8 tripeptide fragment in organic media. *Biotechnology and Bioengineering*. 50(6): 700-708

Fité, M., Clapés, P., López-Santín, J., Benaiges, M.D and Caminal, G. (2002) Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnology Progress*. 18(6): 1214-1220.

Christakopoulos P., Macris B.J., Kekos D. (1989) Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 11(4): 236–239

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.

Schoevaart, R., Wolbers, M.W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A.P.G., van Rantwijk, F., van derWielen, L.A.M., Sheldon, R.A. (2004) Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnol. Bioeng*. 87, 754–762.

Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P. (2007) Preparation of multipurpose cross-linked enzyme aggregates and their application to production of alkyl ferulates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 54: 35-41

Torres, M.P, Foresti, M.L., Ferreira, M.L. (2014) CLEAs of *Candida antarctica* lipase B (CALB) with a bovine serum albumin (BSA) cofeeder core: Study of their catalytic activity. *Biochemical Engineering Journal*. 90: 36-43

Yu, C.Y., Li, X.F., Lou, W.Y, Zong, M.H. (2013) Cross-linked enzyme aggregates of Mung bean epoxide hydrolases: A highly active, stable and recyclable biocatalyst for asymmetric hydrolysis of epoxides. *Journal of Biotechnology*. 166(1-2): 12-19

Ju, H., Jang, E., Ryu, B.H., Kim, T.D. (2013) Characterization and preparation of highly stable aggregates of a novel type of hydrolase (BL28) from *Bacillus licheniformis*. *Bioresource Technology*. 128: 81-86

Vafiadi, C., Topakas, E., Alissandratos, A., Faulds, C.B., Christakopoulos, P. (2008) Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *Journal of Biotechnology*. 133(4): 497-504

Wilson, L., Fernández-Lorente, G., Fernández-Lafuente, R., Illanes, A., Guisán, J.M., Palomo, J.M. (2006) CLEAs of lipases and poly-ionic polymers: A simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme and Microbial Technology*. 39(4): 750-755

Topakas, E., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P. (2014) A cutinase from *Fusarium oxysporum* with potential for PET surface modification. *New Biotechnology*. 31: s90

Fazary, A.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. (2009) Biochemical studies on native and cross-linked aggregates of *Aspergillus awamori* feruloyl esterase. *International Journal of Biological Macromolecules*. 44(3): 240-248

De Barros, D.P.C., Azevedo, A.M., Cabral, J.M.S. and Fonseca, L.P. (2012) Optimization of Flavor Esters Synthesis by *Fusarium solani* pisi Cutinase. *Journal of Food Biochemistry*, 36: 275-285

Torres, S., Baigorv, M. D., Swathy, S. L., Pandey, A., and Castro, G. R. (2009) Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Research International*, 42, 454–460

Dutta, K. and Dasu, V.V. (2011) Synthesis of Short Chain Alkyl Esters Using Cutinase from *Burkholderia cepacia* NRRL B 2320. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72, 150-156.

Dimarogona, M., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., Topakas, E. (2015) Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1850(11): 2308-2317

de Barros, D.P.C., Fonseca, L.P., Fernandes, P., Cabral, J.M.S., Mojovic, L. (2009) Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 60: 178–185

Xu, H., Yan, Q., Duan, X., Yang, S., Jiang, Z. (2015) Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis. *Food Chemistry*. 188: 439-445

Kanwar, S.S., Sharma, C., Lal Verma, M., Chauhan, S., Chimni, S.S., Chauhan, G.S. (2008) Short-Chain Ester Synthesis by Transesterification Employing Poly (MAc-co-DMA-cl-MBAm) Hydrogel-Bound Lipase of *Bacillus Coagulans* MTCC-6375.

Brault, G., Shareck, F., Hurtubise, Y., Lépine, F., Doucet, N. (2014) Short-Chain Flavor Ester Synthesis in Organic Media by an *E. coli* Whole-Cell Biocatalyst Expressing a Newly Characterized Heterologous Lipase. *PLoS ONE*. 9(3): 1-9