ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

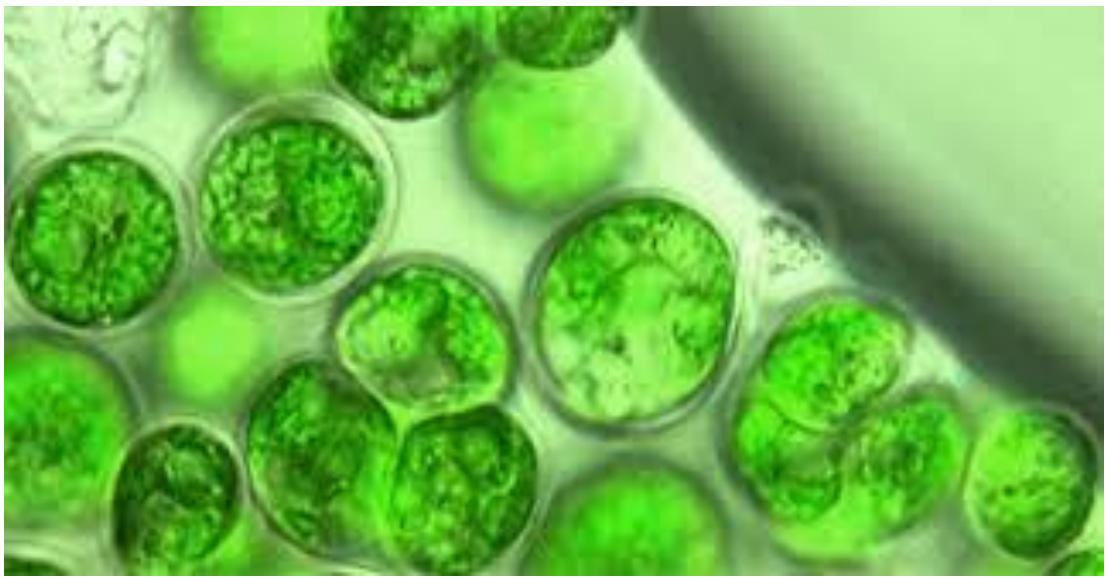
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ IV: ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη και βιοχημικός χαρακτηρισμός της λιπολυτικής δράσης των κυττάρων του θαλάσσιου μικροφύκους *Nannochloropsis oceanica*



Κατσαμπέα Αλεξάνδρα-Σοφία

Επιβλέπων: Κέκος Δημήτριος, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2016

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ε.Μ.Π. Κέκου Δημήτρη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνό μου, Καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς επίσης και τη στήριξη, την καθοδήγηση και τη βοήθεια που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και για τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της δουλειάς μου.

Φυσικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Γ. Σαββίδου για την βοήθεια της, την αμέριστη ηθική και ψυχολογική συμπαράσταση της και για την εμπειρία που απέκτησα κοντά της.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Διόμη Μάμμα, η οποία ανήκει στο Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό, για τη διαρκή επίβλεψη και βοήθεια της. Η παρουσία της ήταν καταλυτική καθ' όλη τη διάρκεια τόσο της πειραματικής διαδικασίας όσο και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ και όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας, για την ομαλή συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα στο χώρο του Εργαστηρίου.

Αλεξάνδρα Σοφία Κατσαμπέα,

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2016

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της λιπολυτικής δράσης των κυτταρικών θραυσμάτων του θαλάσσιου μικροφύκους *Nannochloropsis oceanica*. Εξαιτίας της πληθώρας των βιοτεχνολογικών εφαρμογών της ενζυμικής κατάλυσης, η ανάγκη εύρεσης νεων ενζυμικών δράσεων από μικροοργανισμούς κρίνεται απαραίτητη.

Το στέλεχος καλλιεργήθηκε σε φωτοαντιδραστήρα, όπου ο φωτισμός ήταν συνεχής και η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 20°C. Μετρήθηκε η κυτταρική ανάπτυξη του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* και στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα κύτταρα της καλλιέργειας. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων και παραλαβή των κυτταρικών θραυσμάτων (debris). Στη συνέχεια υπολογίστηκε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του ενζυμικού σκευάσματος (θραύσματα κυττάρων επαναιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα με τιμή pH 7.0) σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry και βρέθηκε ίση με 2.5 μg πρωτεϊνης/mg ξηρής βιομάζας.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της λιπολυτικής ικανότητας των κυτταρικών θραυσμάτων του μικροοργανισμού μέσω αντίδρασης υδρόλυσης σε θερμοκρασία 30°C, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα διάλυμα παρα-νίτρο-φαίνυλο λαυρικού οξέος. Ακολούθως, μελετήθηκε η θερμοσταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε θερμοκρασίες 40-90°C και βρέθηκε ότι διατηρεί το 100% της ενεργότητας του σε θερμοκρασίες έως 50°C για 1 ώρα επώασης, ενώ διατηρεί πάνω από το 80% της ενεργότητας του σε θερμοκρασίες έως 60°C για 2 ώρες επώασης. Επιπλέον, υπολογίστηκαν οι σταθερές απενεργοποίησης, η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υδρόλυσης (70.3 kJ/mol) και οι χρόνοι ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος καθώς επίσης και η μεταβολή της ενθαλπίας και εντροπίας του συστήματος.

Το ενζυμικό σκεύασμα χρησιμοποιήθηκε για τη διερεύνηση της υποστρωματικής εξειδίκευσης με τη χρήση έξι διαφορετικών εστέρων της παρα-νιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας (C2-C16) και βρέθηκε ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη εξειδίκευση σε υποστρώματα με μεγάλο μήκος ανθρακικής αλυσίδας. Ακολούθησε η εύρεση των κινητικών σταθερών της αντίδρασης υδρόλυσης για τρία διαφορετικά υποστρώματα (παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ). Από τη μελέτη αυτή προέκυψε πως το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια, δηλαδή μικρότερη σταθερά K_m, με τον εστέρα με του παλμιτικού οξέος (16 άτομα άνθρακα).

Όσον αφορά στο pH, το ενζυμικο σκευασμα εμφανίστηκε αρκετά σταθερο σε ένα ευρύ φάσμα τιμών και ως βελτιστη τιμή δράσης ήταν το 7.0.Το συμπέρασμα που προέκυψε ήταν ότι το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί πάνω από το 80% της ενζυμικής του ενεργότητας μετά από 1 ώρα επώασης σε τιμές pH 6.0-8.0, σε θερμοκρασία 30^oC.

Τέλος, διαπιστώθηκε η επίδραση διαφόρων οργανικών διαλυτών, μεταλλικών ιόντων και επιφανειοδραστικών ενώσεων στην ενζυμική ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος. Σε ότι αφορά τους οργανικούς διαλύτες, το ενζυμικό σκεύασμα έδειξε ιδιαίτερη αντοχή μετά από επώαση 24 ωρών σε n-οκτάνιο, αιθανόλη και ακετονιτρίλο. Τα αποτελέσματα της επώασης σε μεταλλικά ιόντα επέδειξαν αύξηση της ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος μετά από επώαση 1 ώρας σε $MgCl_2$ και $MnCl_2$, ενώ μετά από επώαση σε $ZuSO_4$, $CuSO_4$ και $FeCl_3$ το ενζυμικό σκεύασμα διατήρησε λιγότερο από το 50% της αρχικής του ενεργότητας. Η επώαση σε επιφανειοδραστικές ενώσεις παρουσίασε αύξηση της ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος μετά από επώαση στο SDS, ενώ για τις υπόλοιπες χρησιμοποιούμενες ενώσεις παρουσιάστηκε μείωση της ενζυμικής ενεργότητας.

Abstract

The purpose of this diploma thesis was the biochemical characterization of the lipolytic activity of cell debris of a marine microalgae, *Nannochloropsis oceanica*. Because of the variety of biotechnological applications of enzymatic catalysis, it is crucial to find new enzyme activities from microorganisms.

The strain *N.oceanica* was grown in 1L Erlenmeyer flasks containing sterilized seawater enriched with F/2 medium nutrients under aseptic conditions on an orbital shaker at 120rpm. The temperature was stable (20°C) and light intensity was used. The cell growth of *N. oceanica* was measured, and then the cells were harvested. The next step was cell lysis using the sonication devise and collection of cell debris. Then, the protein content of the enzyme formula (cell debris in a buffer with pH value 7.0) was determined according to the Lowry method and found to be equal to 2.5 μg proteins/mg of dry cell biomass.

Initially, a determination of the lipolytic activity of cell debris of the microorganism via hydrolysis reaction at 30°C using as substrate solution the p-nitro-phenyl lauric acid (pNP-L) took place. Subsequently, the thermostability of enzyme formula was studied at temperatures of 40-90°C and it was found to retain 100% of its activity at temperatures up to 50°C for 1 hour of incubation, while maintaining more than 80% of its activity at temperatures up to 60°C for 2 hours of incubation. In addition, inactivation constants, activation energy of hydrolysis reaction (70.3 kJ/mol), and half-lives of the enzyme formula were calculated as well as the variation of enthalpy and entropy of the system.

The enzyme formula was used to investigate the specificity of substrate using six different esters of p-nitrophenol with fatty acids of different carbon chain length (C2-C16) and it was found that shows greater specificity in substrates with long

carbon chain. Subsequently, the kinetic constants of hydrolysis reaction for three different substrates (para-nitrophenyl-octanoate, para-nitrophenyl-laurate and para-nitrophenyl-palmitate) were found. This study showed that the enzyme formula shows higher affinity, i.e. smaller K_m constant , with the ester of palmitic acid (16 carbon atoms).

Regarding the pH value, the enzyme formula appeared to be quite stable in a wide pH range and optimum activity value was pH 7.0. The conclusion was that the enzyme formula retains more than 80% of its initial activity after 1 hour of incubation at pH values 6.0-8.0, at 30°C.

Finally, the effect of various organic solvents, metal ions and surfactants to the enzymatic activity of the formula was found. With respect to organic solvents, the enzyme formula showed high tolerance after 24 hours incubation in n-octane, ethanol, and acetonitrile. The results of the incubation in metal ions showed increased activity of the enzyme formula after incubation for 1 hour in $MgCl_2$ and $MnCl_2$, while after incubation in $ZuSO_4$, $CuSO_4$ and $FeCl_3$ the enzyme formula retained less than 50% of its initial activity. Incubation in surfacants showed increased activity of the enzyme formula after incubation in SDS, whereas the other surfactants showed significant inhibition effect on the enzymatic activity.

Περιεχόμενα

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 8

I.1. Μικροφύκη 9

I.1.1. Γενικά για τα μικροφύκη 9

I.1.2. Κατηγορίες μικροφυκών 10

I.1.3. Το γένος *Nannochloropsis* 10

I.1.3.1. Ταξινόμηση-Μορφολογία του γένους Nannochloropsis 11

I.1.4. Καλλιέργεια μικροφυκών 13

I.1.4.1. Τύποι μεταβολισμών 14

I.1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της βιομάζας 14

I.1.4.3. Συστήματα παραγωγής 16

I.1.5. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από μικροφύκη 20

I.1.5.1. Χρωστικές ουσίες-Καροτενοειδή 21

I.1.5.2. Λιπαρά οξέα 23

I.1.5.3. Σάκχαρα 24

I.1.5.4. Αμινοξέα 24

I.1.5.5. Αντιοξειδωτικά 24

I.1.5.6. Στερόλες 25

I.1.5.7. Βιοενεργά συστατικά 25

I.1.5.8. Βιοκαύσιμα 26

I.2. Ένζυμα 30

I.2.1. Χαρακτηριστικά ενζύμων ως βιοκαταλύτες 30

I.2.2. Γενικά για τις λιπάσες 32

I.2.2.1. Ορισμός 33

I.2.2.2. Πηγές λιπασών 33

I.2.2.3. Αντιδράσεις λιπασών 34

I.2.2.4. Ιδιότητες λιπασών 36

I.2.3. Χρήση ολόκληρων κυττάρων ως βιοκαταλύτες 41

I.2.4. Ένζυμα ακινητοποιημένα σε κυτταρικά θραύσματα 43

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 45

II.1. Σκοπός 46

II.2. Συσκευές και όργανα 46

II.3. Καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* 47

II.3.1. Διατήρηση αποθέματος 47

II.3.2. Μέσο ανάπτυξης 47
II.3.3. Εμβολιασμός 48
II.4. Διαδικασία προσδιορισμού σύστασης μικροφύκους 50
II.4.1. Διαδικασία προσδιορισμού κυτταρικής ανάπτυξης 50
II.4.2. Διαδικασία παραλαβής και προσδιορισμού βιομάζας 50
II.5. Συλλογή της βιομάζας 51
II.6. Λύση κυττάρων με τη χρήση υπερήχων-Παραλαβή κυτταρικών θραυσμάτων (Debris) 52
II.7. Διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών 53
II.8. Κατασκευή καμπυλών αναφοράς της παρα-νιτροφαινόλης για τιμές pH 3-9 ... 55
II.9. Προσδιορισμός λιπολυτικής δράσης 55
II.10. Μελέτη θερμικής σταθερότητας 57
II.11. Εξειδίκευση υποστρώματος 58
II.12. Μελέτη των κινητικών παραμέτρων 58
II.13. Προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής pH και της σταθερότητας σε διάφορες τιμές pH 59
II.14. Μελέτη της σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες 59
II.15. Μελέτη της σταθερότητας σε μεταλλικά ιόντα και επιφανειοδραστικές ενώσεις 60
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 61
III.1. Σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορες θερμοκρασίες 62
III.2. Εξειδίκευση υποστρώματος 67
III.3. Εύρεση κινητικών σταθερών 70
III.4. Βέλτιστο pH της αντίδρασης υδρόλυσης 76
III.5. Σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορα pH 80
III.6. Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες 82
III.7. Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε μεταλλικά ιόντα 87
IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ 90
IV.1. Συμπεράσματα 91
IV.2. Μελλοντικοί στόχοι 96
V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ 97
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 102

I. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I.1. Μικροφύκη

Το θαλάσσιο περιβάλλον αποτελεί τα δύο τρίτα του πλανήτη μας, καλύπτει ένα σημαντικό μέρος της βιοποικιλότητάς του, και προσφέρει τεράστιες δυνατότητες για την ευημερία και την εξέλιξη των ανθρώπων. Οι εκτεταμένοι πόροι που παρέχονται με τον τρόπο αυτό αποτελούν πλέον τη βάση για πολλές οικονομικές δραστηριότητες και κοιτώντας το μέλλον, το θαλάσσιο περιβάλλον είναι σε θέση να προσφέρει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που αφορούν τη βιοτεχνολογία (Guedes et al., 2011). Από τους θαλάσσιους οργανισμούς, τα μικροφύκη είναι υπεύθυνα για πάνω από το 45% της ετήσιας καθαρής πρωτογενούς βιομάζας του πλανήτη μας (Wang et al., 2014).

I.1.1. Γενικά για τα μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι μικροσκοπικοί φωτοσυνθετικοί οργανισμοί οι οποίοι αναπτύσσονται τόσο σε αλμυρό όσο και σε γλυκό νερό. Ο φωτοσυνθετικός τους μηχανισμός είναι παρόμοιος με εκείνον των φυτών της ξηράς με τη διαφορά ότι τα μικροφύκη είναι πιο αποτελεσματικά στη μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα, κυρίως λόγω της απλής κυτταρικής δομής και του γεγονότος ότι είναι βυθισμένα σε ένα υδατικό περιβάλλον με επαρκή πρόσβαση σε νερό, CO_2, και άλλα θρεπτικά συστατικά.

Τα μικροφύκη είναι μια ομάδα οργανισμών που έχουν να γίνει το επίκεντρο του ενδιαφέροντος λόγω του υψηλού δυναμικού τους σε ότι αφορά την παραγωγή πρώτων υλών για βιοκαύσιμα, τα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, τα φάρμακα και τα βιοϋλικά. Λόγω των υψηλών αποδόσεων κατά τη φωτοσύνθεση και της ικανότητας τους να αναπτύσσονται σε εκτάσεις ακατάλληλες για γεωργία τα μικρόφυκη θεωρούνται ως μία βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι στη χρήση παραδοσιακών γεωργικών καλλιεργειών (Vieler et al., 2012).

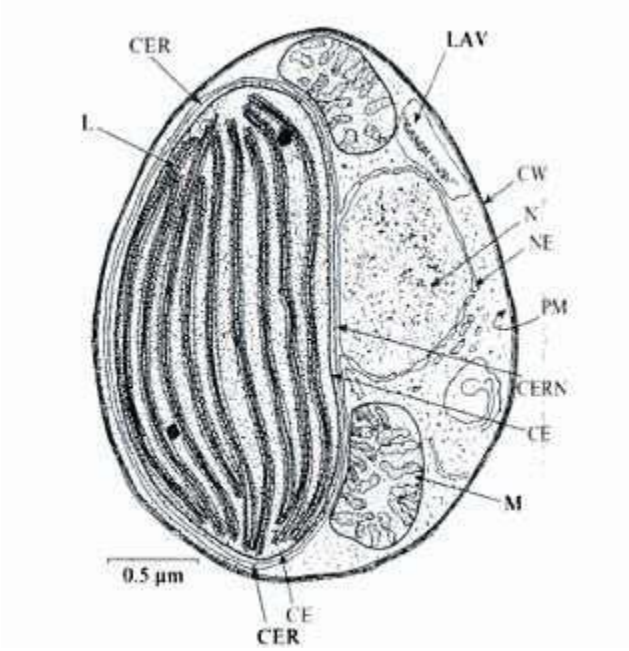
I.1.2. Κατηγορίες μικροφυκών

Τα μικροφύκη αποτελούνται από μια ομάδα προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ταξινόμηση σε κατηγορίες βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες τους, όπως ο χρωματισμός, η χημική φύση των φωτοσυνθετικών προϊόντων αποθήκευσης και άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά (Carlsson et al., 2007). Εκτιμάται ότι υπάρχουν περισσότερα από 50.000 είδη μικροφυκών, ενώ από αυτά περίπου τα 30.000 έχουν μελετηθεί και αναλυθεί (Mata et al., 2010). Οι βασικότερες κατηγορίες μικροφυκών είναι οι Cyanophyceae (μπλε πράσινα άλγη), Chlorophyceae (πράσινα άλγη), Bacillariophyceae (συμπεριλαμβανομένων των διατόμων) και Chrysophyceae (συμπεριλαμβανομένων των χρυσοφυκών) (Carlsson et al., 2007).

I.1.3. Το γένος *Nannochloropsis*

Το γένος *Nannochloropsis* κατατάσσεται στην κατηγορία των Ευστιγματόφυτων (Eustigmatophyceae), μια διαφορετική ομάδα φυκών Heterokontophyta που περιλαμβάνει καφέ άλγη και διάτομα (Vieler et al., 2012). Είναι ένα γένος μονοκύτταρων φωτοσυνθετικών μικροφυκών, που κυμαίνονται σε μέγεθος από 2 έως 5 μm και αναπτύσσονται σε θαλάσσια, γλυκά και υφάλμυρα νερά. Το φύκος *Nannochlroropsis* έχει σφαιρικό, ελαφρώς ωοειδές σχήμα και περιέχει ένα χλωροπλάστη ανά κύτταρο (Εικόνα 1). Η βασική χρωστική που παράγει είναι η βιολαξανθίνη (Hoek et al.,1995).

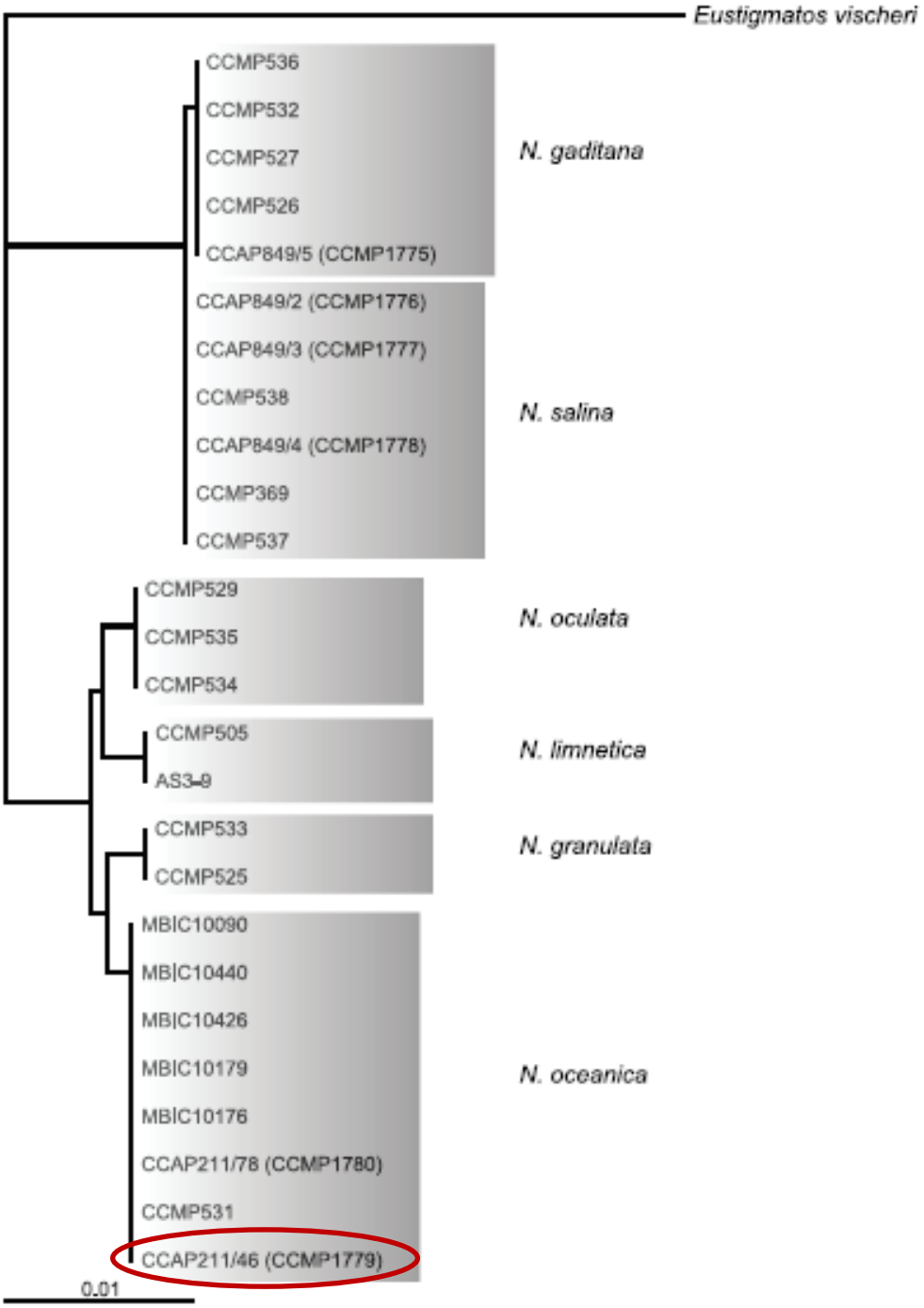
Επιπλέον, έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται με γρήγορους ρυθμούς, να συνθέτει μεγάλες ποσότητες τριακυλογλυκερολών (TAG) και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και είναι ανθεκτικό σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών (Richmond, 2004;Wei et al., 2013). Συγκεκριμένα, το λιπιδικό τους περιεχόμενο κυμαίνεται από 10 έως 60% κ.β. ξηρής ύλης ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας (Carrero et al., 2010).



Εικόνα 1. Αντιπροσωπευτική εικόνα ενός κυττάρου του *Nannochloropsis*. (Hoek et al., 1995)

I.1.3.1. Ταξινόμηση-Μορφολογία του γένους Nannochloropsis

Το γένος *Nannochloropsis* περιλαμβάνει 6 είδη: *N.oculata* (Hibberd, 1981), *N.salina* (Hibberd, 1981), *N.gaditana* (Lubian, 1982), *N.granulata* (Karlson et al., 1996), *N.limnetica* (Krienitz et al., 2000) και *N.oceanica* (Suda et al., 2002). Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2) παρουσιάζεται το φυλογενετικό δέντρο με βάση τις 18s rRNA ακολουθίες των διαφορετικών ειδών *Nannochloropsis* χρησιμοποιώντας ως εξωτερική ομάδα τον μικροοργανισμό *Eustigmatos vischeri*.



Εικόνα 2. Φυλογενετικό δέντρο σύμφωνα με τις 18s rRNA ακολουθίες των ειδών *Nannochloropsis*. Ως εξωτερική ομάδα χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Eustigmatos vischeri*. Οι ετικέτες αναφέρονται στους αριθμούς αναγνώρισης των στελεχών από τις αντίστοιχες συλλογές καλλιεργειών (Vieler et al., 2012). Το υπογραμμισμένο στέλεχος είναι εκείνο που μελετάται στην παρούσα εργασία.

Η ταξινομική αναγνώριση των ειδών *Nannochloropsis* είναι δύσκολη, λόγω του μικρού μεγέθους των κυττάρων και των απλών δομών.

Μερικά είδη *Nannochloropsis*, όπως τα *Nannochloropsis sp*., *N.oculat*a και *N.gaditana* χρησιμοποιούνται στη θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια ως σημαντική πηγή εικοσαπεντανοϊκού οξέος. Επιπλέον, διάφορα είδη *Nannochloropsis* θεωρούνται ελκυστική πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοντίζελ λόγω της ικανότητάς τους να συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Τέτοια είναι *τα Nannochloropsis sp., N.gaditana , N.oculata, N.salina* και *N.oceanica* (Bongiovani et al., 2014).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το στέλεχος *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779, το οποίο αποτελεί ένα ελκυστικό μοντέλο για τη διερεύνηση της κυτταρικής και μοριακής βιολογίας και της βιοχημείας του. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, έχει ευρέως καλλιεργηθεί και εξετασθεί για χρήση σε υδατοκαλλιέργειες, βιοενέργεια και ιατρική (Jo et al., 2015).

I.1.4. Καλλιέργεια μικροφυκών

Τα μικροφύκη ανιχνεύουν το περιβάλλον τους για πόρους. Η ανάπτυξη της βιομάζας τους (η οποία αποτελείται από 40-50% άνθρακα) εξαρτάται από την επαρκή παροχή πηγής άνθρακα και φωτός για τη διεξαγωγή της φωτοσύνθεσης (Mata et al., 2010). Ωστόσο, τα μικροφύκη μπορούν να προσαρμοστούν ή να αλλάξουν την εσωτερική τους δομή ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, ενώ έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν μία ποικιλία ενώσεων είτε με σκοπό να τις καταστήσουν θρεπτικά συστατικά είτε για να περιορίσουν μέσω αυτών την ανάπτυξη ανταγωνιστών μικροοργανισμών (Richmond, 2004).

I.1.4.1. Τύποι μεταβολισμών

Διάφοροι τύποι μεταβολισμών συναντώνται στα μικροφύκη, ο αυτότροφος, ο ετερότροφος, ο μιξότροφος και ο φωτοετερότροφος. Τα μικροφύκη χαρακτηρίζονται ως:

- Φωτοαυτότροφα, επειδή δευσμεύουν το φως ως μοναδική πηγή ενέργειας η οποία μετατρέπεται σε χημική ενέργεια μέσω φωτοσυνθετικών αντιδράσεων.
- Ετερότροφα, στην περίπτωση που εκμεταλλεύονται μόνο οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και ενέργειας.
- Μιξότροφα, εκτελώντας τη φωτοσύνθεση ως κύρια πηγή ενέργειας, παρότι και οι οργανικές ενώσεις και το CO_2 είναι ουσιώδους σημασίας. Η αμφίτροπη ανάπτυξη είναι υποπερίπτωση της μιξότροφης και σημαίνει ότι οι οργανισμοί είναι σε θέση να ζουν είτε αυτότροφα είτε ετερότροφα, ανάλογα με τη συγκέντρωση οργανικών ενώσεων και τη διαθέσιμη ένταση του φωτός.
- Φωτοετερότροφα, όταν ο μεταβολισμός στον οποίο απαιτείται το φως για να χρησιμοποιούν οι οργανικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα. Οι φωτοετερότροφοι και οι μιξότροφοι μεταβολισμοί δεν είναι πλήρως διακριτοί και μπορούν να καθοριστούν σύμφωνα με τη διαφορά της πηγής ενέργειας που απαιτείται για την ανάπτυξη και την παραγωγή ειδικών μεταβολίτων (Mata et al., 2010).

I.1.4.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της βιομάζας

Σε μία καλλιέργεια υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της καθώς επίσης και ο συνδυασμός αυτών. Οι παράγοντες αυτοί είναι:

I.1.4.2.1. Αβιοτικοί

Είναι παράγοντες όπως το φως (ποιότητα, ποσότητα), η θερμοκρασία, η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών, το O_2, το CO_2, το pH, η αλατότητα και διάφορες τοξικές χημικές ουσίες.

I.1.4.2.2. Βιοτικοί

Είναι παράγοντες όπως οι παθογόνοι μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες, ιοί) και ο ανταγωνισμός από άλλες άλγες.

I.1.4.2.3. Λειτουργικοί παράγοντες

Τέτοιοι είναι η διαλυτοποίηση ως αποτέλεσμα της ανάμειξης, ο ρυθμός αραίωσης, το βάθος, η συχνότητα της συγκομιδής και η προσθήκη του όξινου ανθρακικού νατρίου (Mata et al., 2010).

Σε αντίθεση με τα φυτά της ξηράς το περιεχόμενο στην ατμόσφαιρα διοξείδιο του άνθρακα (0.034%) δεν είναι αρκετό για την επίτευξη υψηλών ρυθμών ανάπτυξης και υψηλής παραγωγής βιομάζας από τα μικροφύκη και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η παροχή ανόργανου άνθρακα (CO_2 ή $NaHCO_3$) στο μέσο καλλιέργειας.

Τα μικροφύκη απαιτούν CO_2 για τη λειτουργία του ενζύμου καρβοξυλάση/οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης (Rubisco) και τη σύνθεση 3-φωσφογλυκερικού (κύριου υποστρώματος για την αναβολική σύνθεση σακχάρων). Παρά την πολύ μικρή συγκέντρωση CO_2 στο θαλασσινό νερό τα μικροφύκη παρουσιάζουν υψηλούς φωτοσυνθετικούς ρυθμούς. Αυτό το επιτυγχάνουν κυρίως με δύο τρόπους: (α) Με απευθείας πρόσληψη HCO^{3-} το οποίο μετατρέπεται σε CO_2 και συσσωρεύεται ενδοκυτταρικά με δράση ενδοκυτταρικής ανθρακικής ανυδράσης και (β) με εξωκυτταρική δράση ανθρακικής ανυδράσης και στη συνέχεια πρόσληψη CO_2. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις απευθείας πρόσληψης CO_2 σε μικροφύκη που στερούνται εξωκυτταρικής ανθρακικής ανυδράσης.

Η απαιτούμενη ενέργεια για τη φωτοσύνθεση λαμβάνεται από τους φωτοαυτότροφους μικροοργανισμούς με τη μορφή πυκνής ροής φωτονίων, που καταλήγουνστην επιφάνεια της καλλιέργειας. Η φωτοσυνθετικά ωφέλιμη

ακτινοβολία είναι αυτή του ορατού φωτός (380-750 nm) και μετριέται ως ενέργεια ανά μονάδα επιφάνειας W m^{-2} ή ως ροή φωτονίων ανά μονάδα επιφάνειας μmole quanta m^{-2} s^{-1} ή μE m^{-2} s^{-1} (Πετρούτσος, 2007).

Η θερμοκρασία αποτελεί τον πιο σημαντικό περιοριστικό παράγοντα, μετά το φως, για την καλλιέργεια φυκών σε αμφότερα κλειστά και ανοιχτά εξωτερικά συστήματα. Πολλά μικροφύκη μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες έως 15°C χαμηλότερες από τη βέλτιστη τους, αλλά μία υπέρβαση κατά 2-4°C από τη βέλτιστη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσει σε ολική απώλεια της καλλιέργειας (Mata et al., 2010).

Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών στο μέσο καλλιέργειας. Για παράδειγμα, μεταβάλλοντας την συγκέντρωση του αζώτου στο θρεπτικό μέσο, μεταβάλλεται η παραγωγή βιομάζας και αλλά και το ποσοστό των περιεχόμενων λιπιδίων (Piorreck et al., 1984).

Η αλατότητα, τόσο στα ανοικτά όσο και στα κλειστά συστήματα, μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και την κυτταρική σύνθεση των μικροφυκών. Κάθε μικροφύκος μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα διαφορετικό εύρος αλατότητας που μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια υψηλών θερμοκρασιών λόγω υψηλής εξάτμισης νερού η οποία προκαλεί συσσώρευση άλατος (Mata et al., 2010).

I.1.4.3. Συστήματα παραγωγής

I.1.4.3.1. Κλειστά συστήματα – Φωτοβιοαντιδραστήρες (Photobioreactors)

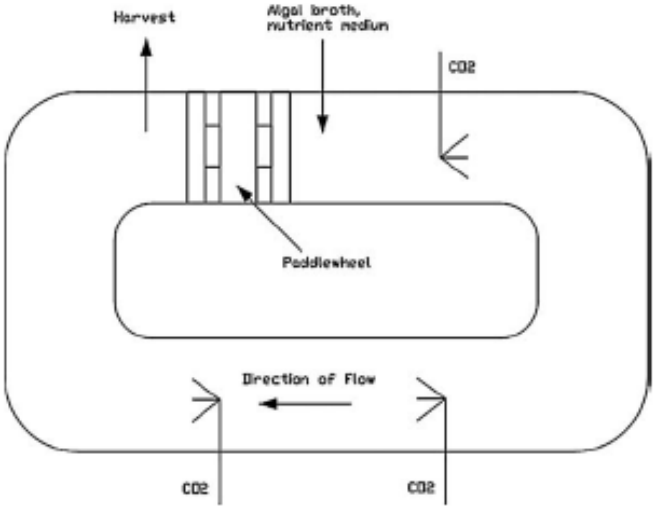
Οι φωτοβιοαντιδραστήρες (Εικόνα 3) είναι κλειστά συστήματα στα οποία υπάρχει μία ποικιλία διαμορφώσεων, π.χ. αυλωτοί, επίπεδου τύπου και στήλης φωτοβιοαντιδραστήρες (Jorquera et al., 2010; Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2013). Το νερό, τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και το CO_2 παρέχονται με ελεγχόμενο τρόπο, ενώ το οξυγόνο πρέπει να αφαιρεθεί. Τα κύτταρα λαμβάνουν το φως του

ήλιου είτε άμεσα μέσω των διαφανών τοιχωμάτων του δοχείου είτε μέσω ινών ή σωλήνων φωτός που λαμβάνουν φως από συλλέκτες ηλιακού φως (Carlsson et al., 2007).

Εικόνα 3. Σωληνωτοί Φωτοβιοαντιδραστήρες (http://www.et.byu.edu.html)

I.1.4.3.2. Ανοικτά συστήματα - Επιμήκεις λεκάνες (Open pond systems)

Τα ανοικτά συστήματα (Εικόνα 4 & 5) αποτελούνται από απλές τεχνητές λεκάνες ή φυσικές λίμνες στις οποίες καλλιεργούνται μικροφύκη. Οι θρεπτικές ουσίες παρέχονται μέσα από το νερό απορροής από τις κοντινές περιοχές ή με τη διοχέτευση νερού που προέρχεται από σταθμούς καθαρισμού / επεξεργασίας νερού, ενώ η ανταλλαγή αερίων γίνεται μέσω της φυσικής επαφής με τον περιβάλλοντα αέρα και το ηλιακό φως. Το νερό διατηρείται σε κίνηση με αναδευτήρες, και κάποιου είδους ανάμιξη μπορεί να επιτευχθεί με κατάλληλα σχεδιασμένους οδηγούς. Στις επιμήκεις λεκάνες η ψύξη πραγματοποιείται μέσω εξάτμισης με αποτέλεσμα η απώλεια νερού να είναι σημαντική (Carlsson et al., 2007, Χριστακόπουλος & Τόπακας, 2013).



Εικόνα 4. Κάτοψη ενός ανοιχτού συστήματος. Τα μικροφύκη εισάγονται μετά τη φτερωτή, και ολοκληρώνουν έναν κύκλο, ενώ το σύστημα είναι μηχανικά αεριζόμενο με CO_2. Η συγκομιδή γίνεται πριν από την φτερωτή για να ξεκινήσει και πάλι ο κύκλος (Liam et al., 2009).

Εικόνα 5. Επιμήκεις λεκάνες (https://roboplant.wordpress.com)

I.1.4.3.3. Σύγκριση συστημάτων

Η επιλογή ενός κατάλληλου συστήματος παραγωγής εξαρτάται κάθε φορά από τον σκοπό της εγκαταστάσης παραγωγής (Carlsson et al., 2007). Τόσο τα ανοιχτά συστήματα όσο και οι φωτοβιοαντιδραστήρες χρησιμοποιούνται σε εμπορική κλίμακα για την συλλογή της βιομάζας και την παραγωγή πρωτεϊνών, χρωστικών, ζωοτροφών, λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτικών. Συνήθως, οι φωτοβιοαντιδραστήρες παρουσιάζουν υψηλότερη παραγωγικότητα από τις ανοικτές λίμνες.

Τα ανοιχτά συστήματα κατασκευάζονται από λιγότερο ακριβά υλικά, η κατασκευή τους συνεπάγεται χαμηλότερο κόστος και απαιτούν λιγότερη ενέργεια για την ανάμιξη. Ωστόσο, οι ανοικτές λίμνες περιορίζονται ως προς το είδος των μικροφυκών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την καλλιέργεια, τη σχετικά μεγαλύτερη έκταση που απαιτείται, τη χαμηλότερη απόδοση του φωτός, τη χαμηλή μεταφορά μάζας αερίου / υγρού, την έλλειψη του ελέγχου της θερμοκρασίας, τον υψηλό κίνδυνο μόλυνσης της καλλιέργειας και τη χαμηλή τελική πυκνότητα αυτής (Jorquera et al., 2010). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) συνοψίζονται οι βασικές διαφορές των δύο συστημάτων.

Πίνακας 1. Σύγκριση ανοιχτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας (Pulz , 2001)

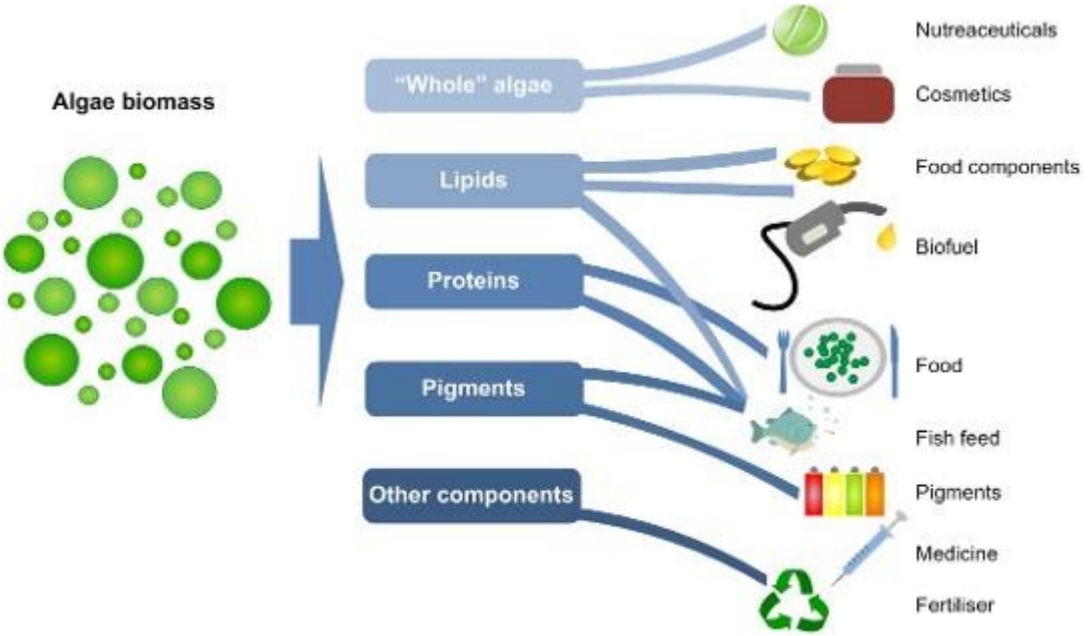
Παράμετρος	Επιμήκεις λεκάνες	Φωτοβιοαντιδραστήρες
Απαιτούμενος χώρος	Μεγάλος	Μικρός
Απώλεια νερού	Ιδιαίτερα υψηλή, συνήθως προκαλεί καθίζηση άλατος	Ελάχιστη
Απώλεια O_2	Υψηλή, εξαρτάται από το βάθος της λεκάνης	Ελάχιστη
Συγκέντρωση O_2	Συνήθως μικρή λόγω αυθόρμητης εκπομπής αερίων	Η συσσώρευση σε κλειστά συστήματα απαιτεί συσκευές ανταλλαγής αερίων (το O_2 πρέπει να αφαιρεθεί για να αποτραπεί η αναστολή της φωτοσύνθεσης και φωτοοξειδωτικές ζημιές)
Θερμοκρασία	Μεγάλο εύρος (ελέγχεται στον πυθμένα της λίμνης)	Συχνά απαιτείται ψύξη (ψεκαστήρες νερού ή λουτρά ψύξης)

Διατμητική τάση	Χαμηλή (ήπια ανάδευση)	Υψηλή (απαιτείται γρήγορη και τυρβώδης ροή για καλή ανάδευση)
Καθαρισμός	Εύκολος	Απαιτείται λόγω ανάπτυξης της βιομάζας στα τοιχώματα και λόγω ακαθαρσιών που μειώνουν την ένταση του φωτός
Κίνδυνος μόλυνσης	Υψηλός (μειώνει τον αριθμό των ειδών που μπορούν να αναπτυχθούν)	Ελάχιστος
Ποιότητα βιομάζας	Μεταβλητή	Υψηλή
Συγκέντρωση βιομάζας	Χαμηλή, 0.1 - 0.5 $g \cdot l^{-1}$	Υψηλή, 2 - 8 $g \cdot l^{-1}$
Ευελιξία παραγωγής	Περιορισμένη	Υψηλή
Έλεγχος διαδικασίας και επαναληψιμότητα	Περιορισμένη (ταχύτητα ροής, ανάδευση, έλεγχος θερμοκρασίας μόνο στον πυθμένα της λίμνης)	Πιθανός, εντός ορισμένων ορίων ανοχής
Εξάρτηση από τον καιρό	Υψηλή (ένταση φωτός, θερμοκρασία, βροχόπτωση)	Μέτρια (ένταση φωτός, απαίτηση για ψύξη)
Κόστος κεφαλαίου	Υψηλό	Πολύ υψηλό
Λειτουργικό κόστος	Χαμηλό	Πολύ υψηλό (προσθήκη CO_2, έλεγχος pH, αφαίρεση O_2, ψύξη, καθαρισμός, συντήρηση)
Κόστος συγκομιδής	Υψηλό, εξαρτάται από το είδος του μικροφύκους	Μικρότερο λόγω της υψηλής συγκέντρωσης βιομάζας και του καλύτερου ελέγχου των συνθηκών
Εμπορικές εφαρμογές	5000t βιομάζας το χρόνο	Περιορίζεται σε διαδικασίες για παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας ή μικροφυκών που χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα και φάρμακα

I.1.5. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από μικροφύκη

Τα προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας που παράγονται από μικροάλγη (Εικόνα 6) είναι οι πρωτεϊνες, οι χρωστικές ουσίες όπως η χλωροφύλλη α, τα καροτενοειδή όπως το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη, καθώς και τα μακράς αλυσίδας πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το δοκοσαεξαενοϊκό και το εικοσαπεντανοϊκό

οξύ. Επίσης, παράγονται μικρότερες ποσότητες άλλων προϊόντων, όπως η χρωστική βιλιπρωτεΐνη, φυκοκυανίνη κ.α (Borowitzka, 2013).



Εικόνα 6. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από μικροάλγη (http://www.iiasa.ac.at)

I.1.5.1. Χρωστικές ουσίες-Καροτενοειδή

Οι σημαντικότερες χρωστικές ουσίες που παράγονται από μικροφύκη είναι η χλωροφύλλη α, η φυκοβιλιπρωτεΐνη, η φυκοκυανίνη και η φυκοερυθρίνη. Οι τρεις τελευταίες συναντώνται μόνο στα άλγη και ορισμένα σκευάσματα έχουν ήδη προωθηθεί για τη χρήση τους σε τρόφιμα και καλλυντικά (Hirata et al., 2000).

Τα καροτενοειδή (Πίνακας 2) είναι δευτερογενείς μεταβολίτες, και αυτό σημαίνει ότι συνθέτονται κυρίως όταν τα κύτταρα δεν είναι πλέον στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Αυτό αποτελεί ένα πρόβλημα, και για το λόγο αυτό οι άλγες εχουν έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε καροτενοειδή, διότι ενώ η ανάπτυξη είναι ταχύτερη, τα καροτενοειδή συσσωρεύονται μόνο όταν η ανάπτυξη έχει επιβραδυνθεί ή διακοπεί. Αυτό σημαίνει ότι είτε πρέπει να εφαρμοστεί μία διαδικασία δύο σταδίων, αρχικά με την παραγωγή της βιομάζας, και έπειτα με τη συσσώρευση του προϊόντος στα κύτταρα, ή μία καλλιέργεια στην οποία ούτε η

ανάπτυξη ούτε προϊόν θα έχουν μέγιστη συσσώρευση, όμως η παραγωγικότητα του σχηματιζόμενου προϊόντος που θα επιτυγχάνεται θα είναι υψηλότερη.

Τα κυριότερα καροτενοειδή που παράγονται από μικροάλγη είναι η β-καροτένη και η ασταξανθίνη (Borowitzka, 2013). Για το χρώμα της και τη φυσιολογική λειτουργία της, η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται κυρίως στα καλλυντικά, στα τρόφιμα και ως φυσική χρωστική (Nakao et al., 2008). Τα μικροφύκη είναι επίσης πιθανή πηγή άλλων καροτενοειδών, όπως της ζεαξανθίνης, της λουτεΐνης και της κανθαξανθίνη (Borowitzka, 2013).

Πίνακας 2. Σχετική αναλογία (%) για κάθε ένα από τα κύρια καροτενοειδή επί του συνόλου των περιεχόμενων καροτενοειδών. Περιεκτικότητα χλωροφύλλης ανά κύτταρο, και αναλογία ολικών καροτενοειδών / χλωροφύλλη (Car / Chl α), σε διάφορα στελέχη *Nannochloropsis* μετά από 10 και 20 ημέρες ανάπτυξης τη καλλιέργειας (Lubian et al., 2000)

Χρωστικές ουσίες	Μέρα	N. oculata	N. hsalina	N. gaditana	KC-1 strain	Quingdao strain	NNO-1 strain
Violaxanthin	10	48.9	47.7	37.4	40.2	44.7	48.2
	20	32.0	28.0	31.7	39.5	33.0	28.9
Astaxanthin	10	2.6	5.4	6.7	5.1	2.9	6.3
	20	3.4	9.6	12.4	4.8	4.4	8.0
Antheraxanthin	10	0.9	3.4	3.5	5.0	6.7	5.6
	20	5.6	5.2	6.1	6.9	9.1	12.3
Vaucheriaxanthin	10	45.3	32.9	46.9	37.0	38.8	33.2
	20	47.2	26.5	22.8	37.8	44.5	35.5
Zeaxanthin	10	0.8	3.3	1.0	3.2	2.1	2.0
	20	1.8	5.9	4.9	3.5	5.2	12.0
Canthaxanthin	10	1.5	7.3	4.5	0.8	1.4	1.0
	20	4.5	15.9	16.9	1.6	1.8	2.4
β-carotene	10	-	-	-	8.7	3.4	3.6
	20	5.5	8.8	5.2	5.9	2.0	0.8
Chlorophyll a	10	116.4	116.8	92.6	174.5	136.6	145.9
	20	168.6	103.8	89.7	170.0	233.7	271.0
Car / Chl α	10	0.6	0.6	1.1	0.5	0.5	0.6
	20	0.8	1.3	1.1	0.8	0.6	0.7

I.1.5.2. Λιπαρά οξέα

Τα τελευταία 30 περίπου χρόνια τα μικροφύκη μελετώνται ευρέως ως πιθανές πηγές μακράς αλυσίδας πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, ειδικά εικοσαπεντανοϊκού οξέως (EPA), δοκοσαεξανοϊκού οξέως (DHA) και αραχιδονικού οξέως (AA). Μύκητες όπως οι *Thraustochytrids, Thraustochytrium* και *schizochytrium*, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εικοσαπεντανοϊκού και δοκοσαεξανοϊκού οξέως με ετερότροφη ανάπτυξη. Πολλά φωτότροφα άλγη έχουν προταθεί ως πιθανές πηγές λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Αυτά περιλαμβάνουν το *Lobosphaera (Parietochloris) Incisa*, το οποίο έχει υψηλή περιεκτικότητα σε αραχιδονικό οξύ, το *Nannochloropsis sp*. και το *Phaeodactylum tricornutum* με υψηλή περιεκτικότητα σε εικοσαπεντανοικό οξύ και το *Isochrysis sp. T.* με υψηλή περιεκτικότητα σε δοκοσαεξανοϊκό οξύ, αλλά η παραγωγικότητα αυτών των λιπαρών οξέων είναι πολύ χαμηλότερη από ό,τι στους μύκητες που καλλιεργούνται ετερότροφα. Επόμενο στόχο αποτελεί η επίτευξη της εμπορικής βιωσιμότητας αυτών των φωτοαυτότροφων μικροφυκών για τη παραγωγή των πολυακόρεστων μακριάς αλυσίδας λιπαρών οξέων (Borowitzka, 2013).

Πίνακας 3. Ποσοστιαία σύνθεση των κατηγοριών των λιπιδίων προσδιορισμένη μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας- ανίχνευση φλόγας ιονισμού. (Volkman et al., 1989)

Μικροοργανισμοί	Υδρογονάναθρακες και εστέρες (HC)	Τριγλυκερίδια (TG)	Ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA)	Στερόλες και αλκοόλες (ST)	Πολικά λιπίδια και χλωροφύλλες (POL)	Άλλα
Chaetoceros calcitrans	0.4	8.4	11.4	6.1	72.8	0.9
Chaetoceros gracilis	1.3	34.0	14.4	6.0	44.2	-
Skeletonema costatum	0.8	1.7	8.5	1.7	84.6	1.3
Thalassiosira pseudonana	1.2	14.4	1.1	2.8	80.4	-
Isochrysis sp.	0.4	2.8	<0.2%	0.2	83.0	13.5*
Pavlova lutheri	0.2	4.0	<0.2%	6.3	78.3	11.0**
Dunaliella tertiolecta	<0.2%	1.9	0.9	2.1	94.3	2.1

Nannochloris atomus	<0.2%	<0.2%	0.4	1.0	98.6	-
Tetraselmis suecica	1.8	3.3	0.8	1.9	91.5	0.7
Chroomonas salina	3.5	21.9	1.9	4.9	67.8	-

* Κυρίως C_{37} – C_{39} ακόρεστες μεθύλο- και αιθύλο- κετόνες
** Κυρίως 4-μεθυλοστερόλες και ενώσεις άγνωστης δομής

I.1.5.3. Σάκχαρα

Το κυριότερο σάκχαρο που περιέχεται στα μικροφύκη είναι η γλυκόζη, ενώ ακολουθούν η φουκτόζη, η γαλακτόζη, η μανόζη, η ραμνόζη, η ριβόζη και η ξυλόζη (Cohen Zvi, 1999).

I.1.5.4. Αμινοξέα

Σε ότι αφορά τα περιεχόμενα αμινοξέα, ουσίες όπως η μεθιονίνη (methionine), η τριπτοφάνη (tryptophan), η κυστίνη (cysteine), η ιστιδίνη (histidine), η υδροξυπρολίνη (hydroxyproline), η ασπαρτάμη (aspartame), η γλουταμίνη (glutamine) και η προλίνη (proline) μπορούν να απομονωθουν από μικροφύκη (Cohen Zvi, 1999).

I.1.5.5. Αντιοξειδωτικά

Τα μικροφύκη, όντας φυλογενετικά τα αρχαιότερα φυτά, έχουν προσαρμοστεί μοναδικά σε ακραία περιβάλλοντα κατά τη διάρκεια των δισεκατομμυρίων ετών της εξέλιξης. Λόγω της φωτότροφης ανάπτυξης τους, εκτίθενται σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη αποτελεσματικών προστατευτικών συστημάτων κατά των οξειδωτικών παραγόντων. Οι προστατευτικοί μηχανισμοί είναι σε θέση να αποτρέψουν τη συσσώρευση των ελευθέρων ριζών και ως εκ τούτου να εξουδετερώσουν τις δραστηριότητες που προσβάλλουν τα κύτταρα.

Επειδή τα αντιοξειδωτικά συστατικά προέρχονται από μια φυσική πηγή, η εφαρμογή τους στα καλλυντικά είναι δεδομένη ιδιαίτερα σε συνδυασμό με άλλες αντιοξειδωτικές ή βιοενεργές ουσίες από μικροφύκη (Pulz et al., 2004).

I.1.5.6. Στερόλες

Τα μικροφύκη παράγουν ένα ευρύ φάσμα φυτοστερολών, συμπεριλαμβανομένων της βρασικαστερόλης, της σιτοστερόλης και της στιγμαστερόλης. Η περιεκτικότητα σε στερόλη μπορεί να μεταβληθεί ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι φυτοστερόλες από μικροφύκη έχει αποδειχτεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε φαρμακευτικές εφαρμογές όσο και σε λειτουργικά τρόφιμα (Borowitzka, 2013).

I.1.5.7. Βιοενεργά συστατικά

Από τα μικροφύκη παράγονται πολλές βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες έχουν αντιβιοτικές, αντιικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιυπερτασικές και άλλες ιδιότητες. Τα μικροφύκη καλλιεργούνται επίσης για να παράγουν σταθερές ενώσεις προκειμένου να χρησιμοποιηθούν σε ιατρικές διαγνώσεις και στην έρευνα. Από τα μικροφύκη παράγονται πολλές νέες βιοδραστικές ενώσεις οι οποίες έχουν αντιβιοτικές, αντιικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιυπερτασικές και άλλες ιδιότητες.

Πολλά μικροφύκη και κυανοβακτήρια, παράγουν ισχυρές τοξίνες και ενώσεις μολύβδου που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη και τον σχεδιασμό φαρμάκων. Ένα παράδειγμα αυτού είναι η δολαστατίνη 10 το οποίο βρέθηκε ότι προέρχεται από το κυανοβακτήριο Symploca sp. Η δολαστατίνη 10 είναι η βάση του φαρμάκου *Brentuximab Vendotin* το οποίο προορίζεται για χρήση σε λέμφωμα Hodgkin και αναπλαστικό λέμφωμα μεγάλων κυττάρων. (Borowitzka, 2013)

Αρκετές εκτεταμένες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αυστραλία, τη Γερμανία και τη Γαλλία για την ανίχνευση νέων βιολογικά ενεργών ουσιών από μικροφύκη και κυανοβακτήρια έδειξαν ότι η κυτταροτοξική

δραστηριότητα μπορεί να είναι σημαντική στα αντικαρκινικά φάρμακα, ενώ κάποιες από τις παραγόμενες τοξίνες μπορεί εμφανίζουν αντι-ιική δραστηριότητα, αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση (Pulz et al., 2004).

Εικόνα 7. Εφαρμογές μικροφυκών - Συμπληρώματα διατροφής

I.1.5.8. Βιοκαύσιμα

Η αξιοποίηση των μικροφυκών στην παραγωγή βιοενέργειας (βιοντήζελ, βιο-μεθάνιο, βιοαιθανόλη, βιο-υδρογόνο) (Εικόνα 8), ή στο συνδυασμό εφαρμογών για την παραγωγή βιοκαυσίμων καθώς και στη μείωση της παράγωγης CO_2, μελετάται εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια (Carlsson et al., 2007).

Βιοντήζελ

Τα εναλλακτικά καύσιμα, όπως τα βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των εκπομπών των αερίων του θερμοκηπίου λόγω της ικανότητά τους να παγιδεύουν και να χρησιμοποιούν το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Τα μικροφύκη εμφανίζονται ως μια πιθανή πηγή για την παραγωγή βιοντήζελ.

Τα λίπη και τα έλαια αποτελούνται από τριγλυκερίδια και περιέχουν εστέρες γλυκερόλης με κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα. Τα λίπη περιέχουν τριγλυκερίδια, δι και μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs), και υδρογονάνθρακες. Σε βιομηχανική κλίμακα, η παραγωγή βιοντήζελ διεξάγεται με τη χρησιμοποίηση ελαίων, αλκοόλης (μεθανόλη ή αιθανόλη) και ανόργανου καταλύτη

σε διαφορετικές συνθήκες και η διαδικασία είναι γνωστή ως μετεστεροποίηση (Tripathi et al., 2014).

Η χρήση μικροφυκών για την παραγωγή βιοκαυσίμων όπως το βιοντήζελ δεν είναι νέα, και μια σημαντική ερευνητική προσπάθεια ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του 1990, κυρίως στις ΗΠΑ και στην Ιαπωνία, και τώρα βρίσκονται σε εξέλιξη ακόμη μεγαλύτερες προσπάθειες. Παρά το γεγονός ότι η διεργασία είναι τεχνικά εφικτή, το μεγαλύτερο εμπόδιο για την εμπορευματοποίηση παραμένει το γεγονός ότι η παραγωγή βιοκαυσίμων από μικροάλγη εξακολουθεί να είναι μία πάρα πολύ ακριβή διαδικασία και απαιτούνται σημαντικές βελτιώσεις σε όλα τα στάδια της διαδικασίας από την καλλιέργεια και τη συγκομιδή έως και την παραγωγή καυσίμων προκειμένου να είναι βιώσιμη (Borowitzka, 2013).

Επιπλέον, το έλαιο από τα μικροφύκη περιέχει ένα υψηλό βαθμό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (με τέσσερις ή περισσότερους διπλούς δεσμούς), σε σύγκριση με τα φυτικά έλαια, γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην οξείδωση κατά την αποθήκευση και ως εκ τούτου μειώνει την αποδοχή του για χρήση του σε βιοντήζελ. Ωστόσο, το πρόβλημα μπορεί να ελαχιστοποιηθεί με τη μερική καταλυτική υδρογόνωση του ελαίου. Παρ 'όλα αυτά, το βιοντήζελ από μικροφύκη έχει παρόμοιες φυσικές και χημικές ιδιότητες με το ντίζελ πετρελαίου και υπακούει στο διεθνές πρότυπο EN14214 (Dragone et al., 2010).

Βιοαιθανόλη

Η παραγωγή βιοαιθανόλης εστιάζεται στα μικροφύκη ως πρώτη ύλη για τη διαδικασία της ζύμωσης. Τα μικροφύκη αποτελούνται από υδατάνθρακες (με τη μορφή γλυκόζης, αμύλου και άλλους πολυσακχαρίτες) και πρωτεΐνες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως πηγές άνθρακα για τη ζύμωση από βακτήρια, ζυμομύκητες ή μύκητες. Για παράδειγμα, το μικροφύκος *Chlorella vulgaris* έχει θεωρηθεί ως μια πιθανή πρώτη ύλη για την παραγωγή βιοαιθανόλης, διότι μπορεί να συσσωρεύσει υψηλά επίπεδα αμύλου.

Η διαδικασία της ζύμωσης απαιτεί λιγότερη κατανάλωση ενέργειας και απλουστευμένη διαδικασία σε σύγκριση με ένα σύστημα παραγωγής βιοντήζελ. Εκτός αυτού, το CO_2 που παράγεται ως υποπροϊόν από τη διαδικασία της ζύμωσης μπορεί να ανακυκλωθεί σαν πηγή άνθρακα στη διαδικασία της καλλιέργειας μικροφυκών κι έτσι να μειωθεί η εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου. Ωστόσο, η παραγωγή βιοαιθανόλης από μικροφύκη μελετάται συνεχώς και η τεχνολογία δεν έχει ακόμη εμπορευματοποιηθεί (Dragone et al., 2010).

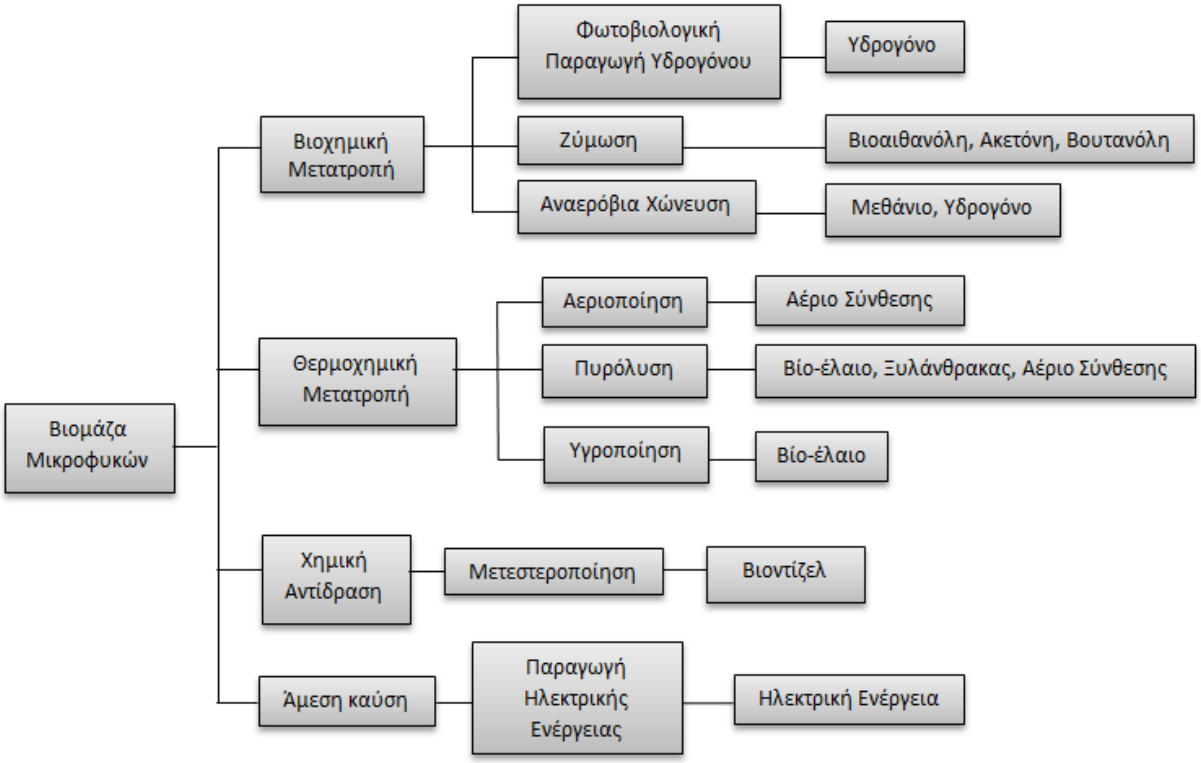
Υδρογόνο

Το υδρογόνο είναι ένα σημαντικό καύσιμο με ευρείας κλίμακας εφαρμογές στις κυψέλες καυσίμου, στην υγροποίηση άνθρακα, καθώς και στην αναβάθμιση των βαρέων ελαίων (π.χ. πίσσα). Το υδρογόνο μπορεί να παραχθεί βιολογικά με ποικίλους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της αναμορφώσεως βιο-ελαίων με ατμό και τη φωτόλυση του νερού που καταλύεται από ειδικά είδη μικροφυκών (Yanqun et al., 2008).

Το υδρογόνο που παράγεται από τα μικροφύκη είναι μία πιθανή πηγή καυσίμου για μεταφορές, αφού τα ηλεκτρόνια που προέρχονται από τη φωτοσυνθετική διάσπαση του νερού μπορούν να συζευχθούν με την παραγωγή H_2 σε πράσινα φύκη και κυανοβακτήρια (Vieler et al, 2012).

Τρεις διαφορετικοί τρόποι παραγωγής H_2 έχουν προταθεί: η άμεση και η έμμεση φωτόλυση, και η παραγωγή H_2 καθοδηγούμενη από το ATP. Η άμεση φωτόλυση προκύπτει όταν το παραγόμενο υδρογόνο και οξυγόνο συνεχώς διαχέονται μακριά. Η φωτοσύνθεση και η διάσπαση του νερού συνδέονται, με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη παραγωγή υδρογόνου και οξυγόνου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σημαντικό κίνδυνο ασφαλείας και αύξηση του κόστους κατά το διαχωρισμό του υδρογόνου και του οξυγόνου. Ως εκ τούτου, προτιμώνται οι έμμεσες μέθοδοι, όπου τα κύτταρα συσσωρεύονται σε ένα υλικό που λειτουργεί ως αποθήκη άνθρακα όπως το άμυλο, και η περιεχόμενη ενέργεια του οποίου εν μέρει μετατρέπεται σε

υδρογόνο υπό αναερόβιες συνθήκες και συνθήκες περιορισμένου θείου (Carlsson et al., 2007).



Εικόνα 8. Διεργασίες μετατροπής για την παραγωγή βιοκαυσίμων από τη βιομάζα μικροφυκών (Dragone et al.,2010).

I.2. Ένζυμα

Η εφαρμογή της γονιδιωματικής και μετα-γονιδιωματικής προσέγγισης έχει φέρει τεράστια εξέλιξη στον κόσμο των μικροφυκών. Αυτό έχει οδηγήσει στην ταυτοποίηση ενός μεγάλου αριθμού άγνωστων ειδών και, κατά συνέπεια, σε νέα δίκτυα γονίδιων, ενζύμων και μεταβολικών οδών. Επιπλέον, επιτρέπει την πρόσβαση σε άγνωστους μηχανισμούς με πιθανό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Cadoret et al., 2012).

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως καταλύτες. Είναι ικανά να καταλύουν αντιδράσεις που εμφανίζουν αυστηρή εναντιοεκλεκτικότητα, τοποεκλεκτικότητα, ή και τα δύο, κάτω από ήπιες συνθήκες. (Takeru et al.,2005).

Η ανάπτυξη της συνθετικής οργανικής χημείας έχει καταστήσει δυνατή την στερεοελεγχόμενη σύνθεση ενός πολύ μεγάλου αριθμού μορίων. Όσο το πεδίο αναπτύσσεται, οι στόχοι και οι περιορισμοί αλλάζουν. Ένα πρόβλημα που πρέπει να αντιμετωπιστεί είναι η ανάπτυξη περιβαλλοντικά αποδεκτών συνθετικών μεθόδων οι οποίοι να είναι επίσης οικονομικά αποδεκτοί. Τα ένζυμα είναι σε θέση να συμβάλουν στην επίλυση του ζητήματος αυτού, και θα πρέπει να θεωρηθούν ως μία κατηγορία χρήσιμων καταλυτών οι οποίοι πρέπει να χρησιμοποιούνται, κατά περίπτωση, για την οργανική σύνθεση.

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, οι οποίες καταλύουν τις περισσότερες βιολογικές αντιδράσεις in vivo. Μπορούν επίσης να καταλύσουν αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τόσο φυσικά όσο και μη φυσικά υποστρώματα in vitro (Wong et al., 1994).

I.2.1. Χαρακτηριστικά ενζύμων ως βιοκαταλύτες

Ως καταλύτες, τα ένζυμα έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

1. Επιταχύνουν το ρυθμό των αντιδράσεων και λειτουργούν κάτω από ήπιες συνθήκες.

2. Μπορούν να είναι άκρως επιλεκτικά για υποστρώματα και στερεοεκλεκτικά στις αντιδράσεις που καταλύουν. Η εκλεκτικότητα μπορεί να κυμαίνεται από πολύ μικρή έως πολύ μεγάλη.
3. Αποτελούν αντικείμενο ρύθμισης, δηλαδή, η καταλυτική δραστηριότητα μπορεί να επηρεαστεί έντονα από τις συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων, τα προϊόντα ή άλλες ουσίες που υπάρχουν στο διάλυμα.
4. Συνήθως καταλύουν αντιδράσεις κάτω από τις ίδιες ή παρόμοιες συνθήκες.
5. Είναι γενικά ασταθή (σε σχέση με τεχνητούς καταλύτες).

Τα χαρακτηριστικά της αστάθειας, το υψηλό κόστος, και η στενή εξειδίκευση υποστρώματος θεωρήθηκε ότι είναι τα πλέον σοβαρά μειονεκτήματα των ενζύμων για χρήση ως καταλύτες. Ως αποτέλεσμα, η εφαρμογή των ενζύμων είχε επικεντρωθεί κυρίως σε διεργασίες μικρής κλίμακας. Η αντίληψη, ωστόσο, ότι είναι εγγενώς περιορισμένοι ως καταλύτες έχει αλλάξει δραματικά τα τελευταία χρόνια, λόγω των νέων εξελίξεων στη χημεία και τη βιολογία και των νέων απαιτήσεων.

- Μεγάλος αριθμός ενζυμικών αντιδράσεων έχει αποδειχθεί ότι μετασχηματίζει φυσικά ή μη φυσικά υποστρώματα στερεοεκλεκτικά σε χρήσιμα συνθετικά ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα.
- Νέες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για να βελτιωθεί η σταθερότητα των ενζύμων και για να διευκολυνθεί η ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση τους.
- Η πρόοδος στην μοριακή και κυτταρική βιολογία και στην αναλυτική χημεία έχει επίσης δημιουργήσει νέα εργαλεία για το χειρισμό του γενετικού υλικού για την κατασκευή γονιδίων για την έκφραση των επιθυμητών πρωτεϊνών.
- Νέα ένζυμα έχουν ανακαλυφθεί και αποτελούν βασικά στοιχεία της μοριακής γενετικής και της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Αυτά τα ένζυμα και οι συναφείς τεχνικές έχουν καταστήσει δυνατή την παραγωγή χαμηλού κόστους πρωτεϊνών και ενζύμων και την ορθολογική τροποποίηση των ιδιοτήτων τους.
- Το πεδίο της ενζυμικής κατάλυσης εντείνεται περαιτέρω λόγω της ανακάλυψης νέων καταλυτικά ενεργών αντισωμάτων (Wong et al., 1994).

Μεταξύ των σημαντικών προκλήσεων που αντιμετωπίζει σήμερα η συνθετική οργανική χημεία είναι η κατανόηση σημαντικών βιολογικών διεργασιών σε πλήρη μοριακή κλίμακα, και η χρήση της αντίληψης αυτής για το σχεδιασμό και την παραγωγή χημικά καλώς καθορισμένων μορίων που είναι χρήσιμα στην ιατρική, τη γεωργία, και τη βιολογία. Δεδομένου ότι η βιολογική δραστικότητα των περισσοτέρων φαρμάκων έγκειται στην ικανότητα τους να παρεμβαίνουν στις αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-συνδέτη ή ενζύμου-υποστρώματος, μια ορθολογική προσέγγιση στο σχεδιασμό και τη σύνθεση των φαρμάκων απαιτεί μελέτες που περιλαμβάνουν μια σειρά από υποστρώματα, αναστολείς, υποκαταστάτες και παράγωγα, ορισμένα εκ των οποίων θα είναι δύσκολο να χειριστούν με τη χρήση της κλασικής μεθοδολογίας. Η κατάλυση από ένζυμα μπορεί να προσφέρει πρακτικές λύσεις γι αυτές τις κατηγορίες μορίων, και η σύνθεση με βάση τα ένζυμα έχει γίνει μια ελκυστική εναλλακτική λύση σε σχέση με τις κλασικές συνθετικές μεθόδους. Η χρήση ενζύμων, προσφέρει τοπο- και εναντιοεκλεκτικότητα, χαμηλό κόστος και περιβαλλοντικά συμβατές συνθήκες αντίδρασης (Wong et al., 1994).

I.2.2. Γενικά για τις λιπάσες

Οι λιπάσες (ακύλιο υδρολάσες τριακυλογλυκερόλης (E.C. 3.1.1.3)) αποτελούν μία από τις πιο σημαντικές κατηγορίες υδρολυτικών ενζύμων που καταλύουν τόσο την υδρόλυση όσο και τη σύνθεση των εστέρων. Οι λιπάσες έχουν μια σειρά μοναδικών χαρακτηριστικών, συμπεριλαμβανομένων της εξειδίκευσης υποστρώματος, τη στερεοειδικότητα, την τοποεκλεκτικότητα και την ικανότητα να καταλύουν μία ετερογενή αντίδραση στη διεπιφάνεια υδατοδιαλυτών και αδιάλυτων συστημάτων νερού. (Sharma et al., 2002).

Αν και έχουν βρεθεί λιπάσες σε πολλά είδη ζώων, φυτών, βακτηριδίων, ζυμομυκήτων και μυκήτων, τα ένζυμα από μικροοργανισμούς είναι πιο ενδιαφέροντα λόγω της πιθανής εφαρμογής τους σε διάφορες βιομηχανίες όπως τα τρόφιμα, τα γαλακτοκομικά, τη φαρμακευτική, τα απορρυπαντικά, την κλωστοϋφαντουργία, το βιοντίζελ, τις βιομηχανίες καλλυντικών και στη σύνθεση

χημικών, αγροχημικών, και νέων πολυμερών υλικών. Κάθε εφαρμογή διαφοροποιείται σε σχέση με την εξειδίκευση, τη σταθερότητα, τη θερμοκρασία, και την εξάρτηση από το pH ή την ικανότητα του ενζύμου να καταλύει αντιδράσεις σύνθεσης εστέρα σε οργανικούς διαλύτες. Ως εκ τούτου, η συλλογή των μικροοργανισμών με λιπολυτική δράση θα μπορούσε να διευκολύνει την ανακάλυψη νέων λιπασών. Επίσης, οι λιπάσες είναι ιδιαίτερα ελκυστικές για βιομηχανικές εφαρμογές λόγω της υψηλής τους δραστικότητας σε υψηλές θερμοκρασίες και τη σταθερότητα τους σε οργανικούς διαλύτες. (Kumar et al., 2005).

Αν και οι λιπάσες είναι από τα πιο σημαντικά ένζυμα, οι μελέτες πάνω σε αυτές προχωρούν πολύ αργά. Αυτό φαίνεται να οφείλεται στα μη καθαρισμένα παρασκευάσματα ενζύμων, την αστάθεια αυτών, τις περιορισμένες πηγές ενζύμων και τις ακαθαρσίες στα υποστρώματα (Tomizuka et al., 1966).

I.2.2.1. Ορισμός

Ως λιπάσες ορίζονται οι καρβοξυλεστεράσες οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση και τη σύνθεση των ακυλογλυκερολών μεγάλης υδρογονοανθρακικής αλυσίδας του εστεροποιημένου καρβοξυλικού οξέος (Ferrato et al., 1997). Ο όρος «μεγάλη αλυσίδα» δεν μπορεί να οριστεί με απόλυτη σαφήνεια, ωστόσο, οι ακυλογλυκερόλες με αλυσίδα άνω των 10 ατόμων άνθρακα μπορούν να θεωρηθούν ως υποστρώματα των λιπασών με την τριελαΐνη να αποτελεί το πρότυπο υπόστρωμα. Από την άλλη πλευρά, η υδρόλυση ακυλογλυκερολών μικρής αλυσίδας (κάτω των 10 ατόμων άνθρακα) συνήθως υποδηλώνει την παρουσία εστερασών (Jensen et al., 1983).

I.2.2.2. Πηγές λιπασών

Οι λιπάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Συντίθενται από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς. Οι λιπάσες που προέρχονται από μικροοργανισμούς, κυρίως

βακτήρια και μύκητες, είναι οι περισσότερο χρησιμοποιούμενοι καταλύτες στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές και στην οργανική χημεία. Μια πρόσφατη δημοσίευση των διαθέσιμων στο εμπόριο λιπασών αναφέρει ένζυμα από 34 διαφορετικές πηγές, μεταξύ των οποίων 18 από μύκητες και τα 7 από βακτήρια. Οι λιπάσες από τους μύκητες *Candida rugosa, Candida antarctica, Thermomyces lanuginosus* και *Rhizomucor miehei* και οι βακτηριακές λιπάσες από τους *Burkholderia cepacia, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas mendocina* και *Chromobacterium viscosum* αποτελούν μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα εμπορικά διαθέσιμων λιπασών οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοτεχνολογία (Jaeger et al., 1998).

Παρά την εκτεταμένη ποικιλία μικροβιακών λιπασών, η χρήση αυτών των ενζύμων σε βιομηχανική κλίμακα είναι ακόμη περιορισμένη λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής, που ευνοεί την αναζήτηση για άλλες πηγές αυτών των ενζύμων. Πρόσφατα, οι λιπάσες που προέρχονται από σπόρους φαίνεται να κεντρίζουν το ενδιαφέρον των ερευνητών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα ένζυμα αυτά παρουσιάζουν πλεονεκτήματα επί των ζωικών και των μικροβιακών λιπασών λόγω κάποιων χαρακτηριστικών, όπως η εξειδίκευση, το χαμηλό κόστος, η διαθεσιμότητα και η ευκολία καθαρισμού και αντιπροσωπεύουν μια εναλλακτική λύση για τις πιθανή εμπορική εκμετάλλευση ως βιομηχανικά ένζυμα (Barros et al., 2010).

I.2.2.3. Αντιδράσεις λιπασών

Αυτή η ομάδα ενζύμων είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την κατάλυση όχι μόνο της υδρόλυσης, αλλά και αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης. Οι δύο κύριες κατηγορίες στις οποίες οι λιπάσες καταλύουν τις αντιδράσεις είναι η υδρόλυση και η σύνθεση εστέρων (Εικόνα 9).

I. Υδρόλυση:

$$RCOOR' + H_2O \rightarrow RCOOH + R'OH$$

II. Σύνθεση:

Οι αντιδράσεις αυτής της κατηγορίας ταξινομούνται ως εξής:

α. Εστεροποίηση

$$RCOOH + R'OH \rightarrow RCOOR' + H_2O$$

β. Μετεστεροποίηση

Ενδοεστεροποίηση

$$RCOOR' + R''COOR^* \rightarrow R''COOR^* + R''COOR'$$

Αλκοόλυση

$$RCOOR' + R''OH \rightarrow RCOOR'' + R'OH$$

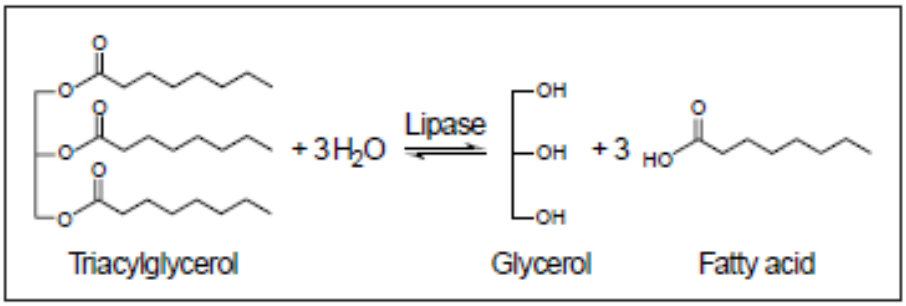
Οξεόλυση

$$RCOOR' + R''COOH \rightarrow R''COOR' + RCOOH$$

Εικόνα 9. Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες (Reis et al, 2008).

Οι τρεις τελευταίες αντιδράσεις στην παραπάνω εικόνα συχνά ομαδοποιούνται με τον ενιαίο όρο μετεστεροποίηση (Reis et al., 2008).

Οι λιπάσες δρουν, εξ ορισμού, στο οργανικό-υδατικό περιβάλλον, καταλύοντας την υδρόλυση του δεσμού του εστέρα-καρβοξυλικού και απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και οργανικές αλκοόλες. Ωστόσο, σε περιβάλλοντα ελεύθερα νερού, η αντίστροφη αντίδραση (εστεροποίηση) ή ακόμη και διάφορες αντιδράσεις μετεστεροποίησης μπορεί να συμβούν. Ο όρος μετεστεροποίηση αναφέρεται στην ανταλλαγή ομάδων μεταξύ ενός εστέρα και οξέος (οξεόλυση), μεταξύ ενός εστέρα και μιας αλκοόλης (αλκοόλυση) ή μεταξύ δύο εστέρων (εστεροποίηση) (Barros et al., 2010).



Εικόνα 10. Η καταλυτική δράση των λιπασών. Ένα τριγλυκεριδίο μπορεί να υδρολυθεί για να σχηματίσει γλυκερίνη και λιπαρά οξέα, ή η αντίστροφη (σύνθεση) αντίδραση μπορεί να συνδυάσει τη γλυκερόλη και τα λιπαρά οξέα για να σχηματίσει ένα τριγλυκεριδίο (Jaeger al., 1998).

I.2.2.4. Ιδιότητες λιπασών

Χαρακτηριστικά της αντίδρασης των λιπασών

Τα φυσικά υποστρώματα των λιπασών είναι οι τριακυλογλυκερόλες λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας. Οι ενώσεις αυτές έχουν πολύ χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, και οι λιπάσες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να καταλύουν ταχύτατα την υδρόλυση των εστερικών δεσμών στη διεπιφάνεια μεταξύ μιας αδιάλυτης φάσης του υποστρώματος και μιας υδατικής φάσης στην οποία διαλύεται το ένζυμο. Οι λιπάσες καταλύουν την υδρόλυση ενός ευρέος φάσματος αδιάλυτων στο νερό εστέρων λιπαρών οξέων, αν και οι ακυλογλυκερίνες είναι συνήθως τα καλύτερα υποστρώματα, αλλά η υδρόλυση των υδατοδιαλυτών εστέρων καρβοξυλικού οξέως με πολλές λιπάσες είναι πολύ αργή. Η ικανότητα των λιπασών να καταλύουν την υδρόλυση εστέρων αδιάλυτων λιπαρών οξέων είναι που τις διακρίνει από τις εστεράσες που καταλύουν την υδρόλυση των υδατοδιαλυτών εστέρων (Macrae et al., 1985).

Η αντίδρασης της λιπάσης στη διεπιφάνεια μεταξύ του υποστρώματος και της υδατικής φάσης προκαλεί δυσκολίες στον προσδιορισμό και την κινητική ανάλυση της αντίδρασης. Μερικά γλυκερίδια και σάπωνες των ελεύθερων λιπαρών οξέων, τα οποία σχηματίζονται κατά την αντίδραση, είναι επιφανειακά ενεργά και τείνουν να συσσωρεύονται στη διεπιφάνεια. Αυτό μπορεί να εμποδίσει την πρόσβαση της

λιπάσης προς το υπόστρωμα και, συνεπώς, είναι συχνά δύσκολο να προσδιοριστούν οι συνθήκες αντίδρασης για τις οποίες η ταχύτητα της αντίδρασης είναι σταθερή για εύλογο χρονικό διάστημα. (Macrae et al., 1985).

Δομή

Γενικά οι λιπάσες είναι όξινες γλυκοπρωτεΐνες με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 20.000 έως 60.000. Οι ενεργότητα των καθαρών πρωτεϊνών ποικίλλει από 1000 με 10.000 μονάδες (units) ανά χιλιοστόγραμμο πρωτεΐνης (1 μονάδα λιπάσης απελευθερώνει 1 μmole του λιπαρού οξέος ανά λεπτό από τριακυλογλυκερόλη). Ορισμένες λιπάσες είναι γνωστό ότι σχηματίζουν συσσωματώματα σε διάλυμα, και αυτό μπορεί να ευθύνεται για τα υψηλά μοριακά βάρη που αναφέρθηκαν. Η πλειονότητα των καθαρισμένων λιπασών έχει αποδειχθεί ότι περιέχουν μεταξύ 2% και 15% υδατάνθρακες, ενώ το μεγαλύτερο κατάλοιπο γλυκοζίτη σε όλες τις περιπτώσεις είναι μαννόζη. Οι υδατανθρακικές πλευρικές αλυσίδες των λιπασών είναι πιθανόν να μην συνδέονται με την καταλυτική δράση του ενζύμου. Για παράδειγμα, η αυτόλυση της λιπάσης Rhizopus arrhizus δίνει ένα γλυκοπεπτίδιο χαμηλού μοριακού βάρους και μια ελεύθερη-υδατανθράκων πρωτεΐνη με υψηλή δραστικότητα λιπάσης. Οι πολλαπλές μορφές λιπασών που παράγονται από ζωικούς ιστούς και μικροοργανισμούς προκύπτουν από την ένωση μεταξύ των μορίων του ενζύμου ή την ποικιλία των υδατανθράκων των πλευρικών αλυσίδων.

Ορισμένοι υποστηρίζουν ότι οι λιπάσες περιέχουν μια εξαιρετικά υψηλή αναλογία υδρόφοβων αμινοξέων και ότι το χαρακτηριστικό αυτό είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδρασή τους με υδρόφοβα υποστρώματα (Macrae et al., 1985). Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι οι λιπάσες δεν είναι περισσότερο υδρόφοβες από άλλες ομάδες ενζύμων. (Macrae et al., 1983).

Σταθερότητα θερμοκρασίας

Οι λιπάσες είναι συνήθως αρκετά σταθερές σε θερμοκρασία 30-40 °C αλλά και σε υδατικά διαλύματα που βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Οι περισσότερες λιπάσες χάνουν τη δραστικότητα τους σε θερμοκρασίες άνω των 40 °C, όμως υπάρχουν λιπάσες οι οποίες είναι πιο ανθεκτικές στη θερμότητα. Τέτοιου είδους λιπάσες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για βιομηχανικές εφαρμογές (Vakhlu et al.,2005).

Βέλτιστες τιμές pH

Οι λιπάσες έχουν ένα ευρύ προφίλ με τιμές pH μεταξύ 5 και 10, και τη μέγιστη δραστικότητα σε τιμές μεταξύ pH 6 και 8. Κάποιες εξωκυτταρικές λιπάσες είναι ιδιαίτερα ενεργές σε χαμηλές τιμές pH, ενώ υπάρχουν και αλκαλικές λιπάσες που δραστηριοποιούνται σε τιμή pH μέχρι και 11 (Vakhlu et al., 2005, Macrae A. R. et al., 1985).

Συμπαράγοντες

Συμπαράγοντες δεν απαιτούνται για την έκφραση της δραστικότητας της λιπάσης παρόλο που ουσίες οι οποίες επηρεάσουν το ποσό ή τις ιδιότητες της διασύνδεσης μεταξύ του υποστρώματος και της υδατικής φάσης έχουν επίδραση στο ρυθμό της αντίδρασης. Για παράδειγμα οι υψηλές συγκεντρώσεις επιφανειοδραστικών μπορούν να αναστείλουν την αντίδραση λόγω παρεμπόδισης της πρόσβασης του ενζύμου στο υπόστρωμά του Η συν-λιπάση επιτρέπει στην λιπάση να συνδέεται με το υπόστρωμά της με την παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων χολικών αλάτων και άλλων επιφανειοδραστικών ουσιών. Δεν υπάρχουν αποδείξεις για την παραγωγή συν-λιπασών από μικροοργανισμούς. Τα άλατα μπορούν να έχουν μια έντονη επίδραση στην αντίδραση επηρεάζοντας τον ιονισμό του λιπαρού οξέως του προϊόντος. Συγκεκριμένα, τα ιόντα ασβεστίου συχνά βοηθούν την αντίδραση

απομακρύνοντας, τα ανιόντα του λιπαρού οξέος τα οποία είναι ανασταλτικοί παράγοντες (Macrae A. R. et al., 1985).

Εξειδίκευση υποστρώματος

Η καταλυτική υδρόλυση του υποστρώματος λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια ελαίου-νερού. Συνεπώς, η ταχύτητα υδρόλυσης των εστερικών δεσμών εξαρτάται από την επιφάνεια του υποστρώματος στο μίγμα αντίδρασης. Ωστόσο, η επιφάνεια του κάθε υποστρώματος διαφέρει ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εκάστοτε υποστρώματος. Εξ αιτίας των παραπάνω παραμέτρων, οι λιπάσες κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την εξειδίκευση που επιδεικνύουν ως προς το υπόστρωμα. Οι κατηγορίες αυτές είναι: εξειδίκευση θέσης, εξειδίκευση ως προς το λιπαρό οξύ και ως προς το είδος του γλυκεριδίου (τρι-, δι- ή μονοακυλογλυκερόλες) (ΔΙΚΑΙΟΣ, 2012).

1. Εξειδίκευση θέσης

Κατά την υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών ελευθερώνονται δι- και μονοακυλογλυκερόλες, γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Οι λιπάσες μπορούν να χωριστούν σε δυο ομάδες ανάλογα με την εξειδίκευση τους ως προς τη θέση στην οποία δρουν. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μη ειδικές λιπάσες οι οποίες προσβάλλουν τους εστερικούς δεσμούς των τριακυλογλυκερολών σε τυχαίες θέσεις ελευθερώνοντας λιπαρά οξέα και από τις τρεις δυνατές θέσεις. Παραδείγματα αυτού του είδους λιπασών είναι οι *S. aureus, S. Hyicus, Corynebacterium acnes* και *Chromobacterium viscosum* (Gupta et al., 2004b). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τις 1,3-ειδικές λιπάσες οι οποίες ελευθερώνουν λιπαρά οξέα από τις θέσεις 1 και 3. Οι 1,3-ειδικές λιπάσες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς μόνο στις θέσεις 1 και 3 με τον δεσμό της θέσης 2 να παραμένει ανεπηρέαστος λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης. Ωστόσο, λόγω της αναδιάταξης που υφίσταται το μονοακυλογλυκερίδιο (μια αργή διαδικασία), το εστεροποιημένο λιπαρό οξύ της θέσης 2 μπορεί να αλλάξει θέση και να βρεθεί είτε στη θέση 1, είτε στη 3 γεγονός το οποίο επιτρέπει στις 1,3-ειδικές λιπάσες τη συνέχιση της καταλυτικής τους δράσης.

Γενικά, η εξειδίκευση θέσης των λιπασών προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας την τριελαΐνη ως υπόστρωμα στο μίγμα της αντίδρασης. Παραδείγματα μη ειδικών λιπασών αποτελούν οι λιπάσες από τα βακτήρια *Pseudomonas aeruginosa* LST-03 και *Bacillus thermoleovorans* ID-1, οι οποίες καταλύουν την υδρόλυση της τριελαΐνης και στις τρεις θέσεις. Από την άλλη, οι λιπάσες από άλλα βακτήρια, όπως ο *Bacillus sp.* THL027, τρία στελέχη του *B. stearothermophilus*, τρία στελέχη του *B. licheniformis* και ένα στέλεχος του *B. Subtilus*, παράγουν 2-μονοελαΐνη γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα είναι 1,3-ειδικές λιπάσες (ΔΙΚΑΙΟΣ, 2012).

2. Εξειδίκευση ως προς το λιπαρό οξύ

Το μήκος της υδρογονοανθρακικής αλυσίδας του εστεροποιημένου λιπαρού οξέος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση των λιπασών ως προς το λιπαρό οξύ. Ο ρυθμός με τον οποίο υδρολύεται ένας εστερικός δεσμός έναντι κάποιου άλλου εξαρτάται άμεσα από την εξειδίκευση που επιδεικνύουν οι λιπάσες προς το λιπαρό οξύ που είναι εστεροποιημένο στην θέση αυτή. Συμπερασματικά, υπάρχουν λιπάσες οι οποίες δείχνουν προτίμηση σε λιπαρά οξέα μικρής, μεσαίας ή μεγάλης αλύσου (Gupta et al., 2004b). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα λιπάσης με εξειδίκευση προς τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας είναι η λιπάση από το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* LST-03, η οποία παρουσιάζει εξειδίκευση προς την τρικαπροΐνη (C6) (Ogino et al., 2000).

3. Εξειδίκευση ως προς το είδος του γλυκεριδίου

Ο τρίτος τύπος εξειδίκευσης των λιπασών είναι η εξειδίκευση ως προς το είδος του γλυκεριδίου. Στην περίπτωση αυτή η καταλυτική δράση των λιπασών εξαρτάται από τον βαθμό εστεροποίησης της γλυκερόλης. Κάποιες από τις λιπάσες δρουν καταλυτικά μόνο όταν έχουν ως υπόστρωμα μονοακυλογλυκερόλες ενώ κάποιες άλλες διακυλογλυκερόλες (ΔΙΚΑΙΟΣ, 2012). Παραδείγματα λιπασών που δρουν καταλυτικά όταν έχουν ως υπόστρωμα μονοακυλογλυκερόλες είναι οι λιπάσες από τα βακτήρια *Pseudomonas sp.* LP7315 και *Bacillus sp.* H-257, οι οποίες υδρολύουν μόνο τις μονοακυλογλυκερόλες (Imamura et al., 2000).

Τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν γίνει και αφορούν το στέλεχος *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 έδειξαν ένα σύνολο 52 γονιδίων που

κωδικοποιούν λιπάσες, εντοπίστηκαν 42 γονίδια από 15 οικογένειες CAZy που προβλέπεται ότι κωδικοποιούν γλυκοζυλοτρανσφεράσες (GT) και 44 γονίδια από 14 οικογένειες CAZy που προβλέπεται ότι κωδικοποιούν γλυκοζιτικές υδρολάσες (GH) (Vieler et al., 2012).

I.2.3. Χρήση ολόκληρων κυττάρων ως βιοκαταλύτες

Τα τελευταία χρόνια, δίνεται ιδιαίτερη έμφαση και διεξάγονται όλο και περισσότερες έρευνες πάνω στη χρήση ολόκληρων κυττάρων ή τμημάτων αυτών αντί για τη χρήση μεμονωμένων ενζύμων. Σε σύγκριση με τα εξωκυτταρικά ελεύθερα ένζυμα, οι βιοκαταλύτες που αποτελούνται από ολόκληρα κύτταρα έχουν μια σειρά από χαρακτηριστικά που είναι ιδιαίτερα ελκυστικά για βιομηχανικές εφαρμογές μεγάλης κλίμακας (Shu et al., 2011).

Το κύριο πλεονέκτημα των βιοκαταλυτών αυτών είναι η απλούστερη και φθηνότερη διαδικασία καθαρισμού και προετοιμασίας, το γεγονός ότι τα ένζυμα δεν χρειάζεται να απομονωθούν, είναι παρόντα στο φυσικό τους περιβάλλον και ως εκ τούτου είναι συνήθως πιο σταθερά, και οι συμπαράγοντες, εάν απαιτούνται, αναγεννώνται in situ στο κύτταρο.

Υπάρχουν πολλές στρατηγικές για την αξιοποίηση των καταλυτικών δραστηριοτήτων σε μικροβιακά κύτταρα που κυμαίνονται από τη χρήση ζωντανών κυττάρων, νεκρών κυττάρων, διαπερατών κυττάρων, ή τμημάτων μεμβράνης. (Svitel et al., 2010).

Τα καθαρισμένα παρασκευάσματα ενζύμων είναι εύκολο να χειριστούν ως «κανονικοί» ετερογενείς καταλύτες και γενικά εμφανίζουν υψηλότερη εναντιο-, χημειο- και τοπο-εκλεκτικότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, η απομάκρυνση των ενζύμων από το φυσικό τους περιβάλλον (δηλαδή το μικροβιακό κύτταρο) δεν προσφέρει πλεονεκτήματα ή, ακόμα χειρότερα, έχει αρνητικές συνέπειες για το ένζυμο. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τις οξυγενάσες. Υπάρχουν πέντε βασικοί λόγοι για τους οποίους προτιμάται η χρήση ολόκληρων κυττάρων αντί καθαρισμένων ενζύμων.

Πρώτον, εάν η παρουσία άλλων ενζύμων δεν έχει αρνητικές επιπτώσεις στην καθαρότητα του προϊόντος, η χρήση ολόκληρων (νεκρών ή ζωντανών) κυττάρων είναι πιο οικονομική καθώς η απομόνωση του ενζύμου και ο καθαρισμός του είναι σημαντικοί οικονομικοί παράγοντες (Wouter et al., 2001). Ωστόσο, συνήθως υπάρχουν περισσότερες ενζυμικές δράσεις στα κύτταρα και η αναλογία τους είναι δύσκολο να ελεγχθεί (Svitel et al., 2010).

Δεύτερον, η «συσκευασία» των ενζύμων σε μικρούς «σάκους» που ονομάζονται μεμβράνες και κυτταρικά τοιχώματα (όπως δηλαδή λειτουργεί η φύση) προστατεύει το ένζυμο από δυνάμεις διάτμησης, και μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ημιζωή της δραστικότητας ενζύμου σε αναδευόμενους βιοαντιδραστήρες (Wouter et al., 2001). Οι διαδικασίες ακινητοποίησης συχνά οδηγούν σε μειωμένη δραστικότητα που οφείλεται στην ομοιοπολική ή φυσική προσάρτηση σε έναν φορέα και επιπλέον στην αντίσταση μεταφοράς μάζας εντός των σωματιδίων (Woltinger et al., 2005).

Τρίτον, η δεσμευμένη στη μεμβράνη φύση των επιθυμητών ενζύμων μπορεί να είναι ένας ακόμη λόγος για τη χρήση ολόκληρων κυττάρων. Η απομάκρυνση του ενζύμου από το περιβάλλον της μεμβράνης συχνά οδηγεί σε πλήρη ή σχεδόν πλήρη απώλεια της δραστικότητας του. Η αλκάνο-υδροξυλάση είναι ένα γνωστό παράδειγμα μιας τέτοιας ενσωματωμένης μεμβρανικής πρωτεΐνης.

Τέταρτον, πολλές ενζυμικές αντιδράσεις (π.χ. στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, όπως πενικιλίνη ή κεφαλοσπορίνη) μπορεί να είναι πολύ περίπλοκο να εκτελεστούν in vitro λόγω του αριθμού των ενζύμων, των συμπαραγόντων και των υποστρωμάτων που εμπλέκονται (Wouter A. Duetz et al., 2001). Οι βιομετασχηματισμοί παρέχουν πρόσβαση σε ασύμμετρες οξειδώσεις που είναι δύσκολο να επιτευχθούν με καθαρές χημικές μεθόδους. Οι απαιτούμενοι μειωμένοι συμπαράγοντες δημιουργούνται με καλύτερο τρόπο ως βιοκαταλύτες που αποτελούνται από ολόκληρα κύτταρα (Panke et al., 1999).

Πέμπτον, η στοιχειομετρική κατανάλωση του NAD(P)H, NAD(P)+, ATP ή άλλων συμπαραγόντων κατά τη διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης ή της αλυσίδας αντιδράσεων μπορεί να κάνει τη χρήση των ολόκληρων κυττάρων ελκυστική.

Σημαντικές διεργασίες εξαρτώμενες από το NAD(P)H περιλαμβάνουν τις υδροξυλιώσεις/εποξειδώσεις και την αναγωγή των κετονών προς χειρόμορφες αλκοόλες (Wouter et al., 2001).

I.2.4. Ένζυμα ακινητοποιημένα σε κυτταρικά θραύσματα

Σε όλα τα κύτταρα υπάρχουν ένζυμα τα οποία βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη. Τα ένζυμα που είναι συνδεδεμένα με την κυτταρική μεμβράνη (membrane-bound enzymes) εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των εσωκυτταρικών και εξωκυτταρικών ενζύμων, αφού μπορούν να θεωρηθούν φυσικώς ακινητοποιημένα ένζυμα, εμφανίζοντας τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα (Razak et al., 1999). Συγκριτικά με τα εσωκυτταρικά και εξωκυτταρικά ενζύμα, τα ένζυμα που βρίσκονται ακινητοποιημένα στις κυτταρικές μεμβράνες εμφανίζουν σταθερότητα σε μεγαλύτερο εύρος pH, ανοχή σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες και σε πολλούς οργανικούς διαλύτες, λόγω της προστασίας από τα κύτταρα (Wang et al., 2007).

Η συνθετική και υδρολυτική δραστικότητα των λιπασών που είναι συνδεδεμένες στη μεμβράνη, αυξάνεται συνήθως με προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες, όπως το ισοοκτάνιο και η ακετόνη (Wang et al., 2007).

Ο υπολογισμός της ενεργότητας μιας λιπάσης που είναι ακινητοποιημένη στην κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα σύνθετο και δύσκολο έργο. Τα διαφορετικά σημεία στα οποία μπορούν να βρεθούν οι συνδεδεμένες στο κύτταρο λιπάσες (κυτταρικό τοίχωμα, κυτταρική μεμβράνη ή στον περιπλασμικό χώρο) μπορεί να επηρεάζουν τη σταθερότητα του ενζύμου και την ικανότητα εστεροποίησης. Επιπλέον, δεν έχουν ακόμα μελετηθεί διεξοδικά οι θέσεις στις οποίες θα μπορούσαν να βρεθούν οι συγκεκριμένες λιπάσες. Έχει αναφερθεί ότι οι συνδεδεμένες στο τοίχωμα λιπάσες από τους μικροοργανισμούς *A. flavus* και *Yarrowia lipolytica* βρίσκονται στον περιπλασμικό χώρο (Wang et al., 2007).

Για παράδειγμα, λιπάσες ακινητοποιημένες σε μυκήλια από τους *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus oryzae* και *R. Oryzae*, έχουν επιτυχημένα χρησιμοποιηθεί σαν καταλύτες για τη σύνθεση αρωματικών εστέρων, την εναντιοεκλεκτική εστεροποίηση ρακεμικού μίγματος και την σύνθεση βιοντίζελ (Wang et al., 2007). Προτείνεται επίσης ότι τα κυτταρικά θραύσματα με την λύση των κυττάρων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα εξαιρετικά αποτελεσματικό ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση αλειφατικών πολυεστέρων (Sun et al., 2013).

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.1. Σκοπός

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ενζυμική δράση του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 και πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός του. Πιο συγκεκριμένα, δόθηκε ιδιαίτερο ενδιαφέρον στον προσδιορισμό της λιπολυτικής δράσης των κυτταρικών θραυσμάτων (debris) του στελέχους καθώς και στον προσδιορισμό της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στην ενζυμική δράση των θραυσμάτων αυτών.

II.2. Συσκευές και όργανα

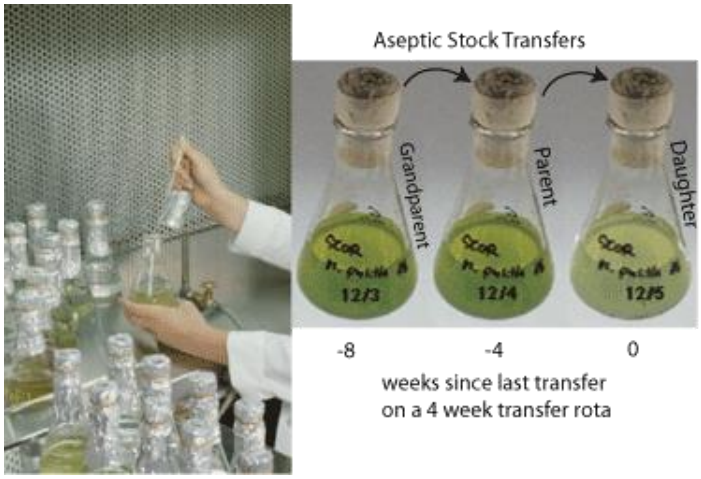
Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι τα εξής:

- Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)
- Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Σαγκάη/Κίνα)
- Θερμαινόμενος επωαστήρας με ανάδευση Eppendorf Thermomixer Comfort, Eppendorf (Γερμανία)
- Συσκευή μέτρησης pH WTW 537, WTW (Γερμανία)
- Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- Ηλεκτρονικοί ζυγοί ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή διήθησης υπό κενό
- Συσκευή υπερήχων VC 505 (500 watts) & VC 750 (750 watts), Sonics and Materials (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος Beckman J2-21 και Beckman TJ-6, Beckman (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-28S, Sorvall (Η.Π.Α.)
- Φυγόκεντρος πάγκου Eppendorf 3200, Eppendorf (Γερμανία)
- Συσκευή Λυοφιλίωσης Freezmobile, Virtis (Η.Π.Α.)
- Φωτόμετρο S-20 Spectophotometer, Boesco (Γερμανία)
- Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)

II.3. Καλλιέργεια του στελέχους *Nannochloropsis oceanica*

II.3.1. Διατήρηση αποθέματος

Κάθε στέλεχος διατηρούνταν για τρεις γενιές, σε υδατικό μέσο όγκου 50 mL, σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες όγκου 100 mL οι οποίες πωματίζονταν με υδρόφοβο βαμβάκι, χωρίς ανάδευση σε ψυγείο με ελεγχόμενη σταθερή θερμοκρασία 20°C. Η περίοδος φωτισμού ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Ως πηγή φωτεινής ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορισμού Philips TLD 865 18W, έντασης 75 μmol/m^2·sec. Κάθε 3 με 4 εβδομάδες πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργειες με χρήση νέων αποστειρωμένων κωνικών φιαλών και εμβόλιο 10% του όγκου του διαλύματος της νέας καλλιέργειας (5 mL).



Εικόνα 11. **Ανακαλλιέργειες στελέχους *Nannochloropsis oceanica***

II.3.2. Μέσο ανάπτυξης

Το στέλεχος αναπτυσσόταν σε φυσικό θαλασσινό νερό. Το νερό προτού χρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια διηθούνταν εις διπλούν. Αρχικά, πραγματοποιούνταν διήθηση με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια ακολουθούσε διήθηση υπό κενό με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0.45 μm.

Για κάθε καλλιέργεια χρησιμοποιούνταν 900mL θαλασσινού νερού το οποίο μεταφερόταν σε κωνική φιάλη των 2L. Ακολουθούσε ρύθμιση του pH στην τιμή 8.0

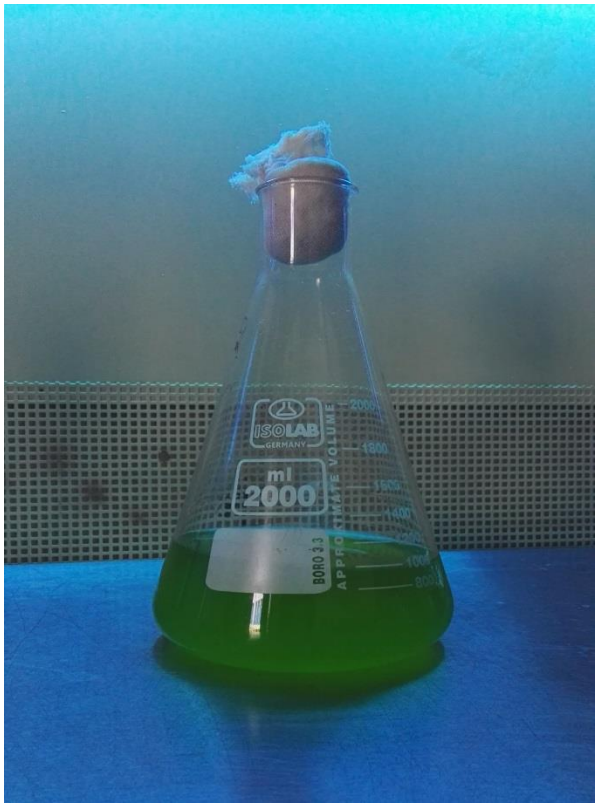
με προσθήκη 6,025g Tris και κατάλληλης ποσότητας HCl 0,05 M, ώστε να αποφεύγονται οι μεγάλες διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η κωνική φιάλη καλυπτόταν με πώμα από βαμβάκι και αλουμινόχαρτο και αποστειρωνόταν μαζί με φιαλίδιο που περιείχε 0,5g $NaHCO_3$ σε αυτόκαυστο στους 121 ^oC για 20 min. Στο αποστειρωμένο πλέον θαλασσινό νερό γινόταν προσθήκη του $NaHCO_3$, του εμπορικού μέσου ανάπτυξης F/2-medium και του εμβολίου.

II.3.3. Εμβολιασμός

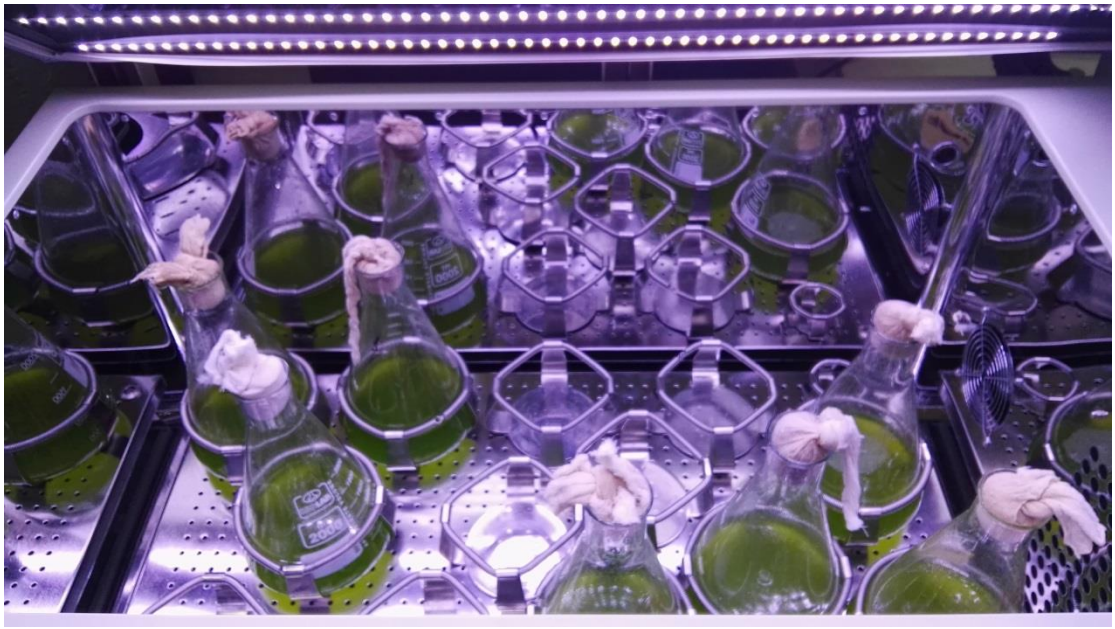
Γινόταν χρήση αξενικής αυτοτροφικής καλλιέργειας *Nannochloropsis oceanica* ηλικίας 7 ημερών, προκειμένου τα κύτταρα να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Η ποσότητα του εμβολίου ήταν το 10% (100 mL) του τελικού όγκου της επιθυμητής καλλιέργειας (1000 mL). Η όλη διαδικασία λάμβανε χώρα σε ειδικά διαμορφωμένο και αποστειρωμένο περιβάλλον (hood).

Εικόνα 12. **Ειδικά διαμορφωμένο αποστειρωμένο περιβάλλον**

Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε επωαστήρα με φως με ήπια ανάδευση στα 130 rpm, προκειμένου να αποφεύγεται η δημιουργία συσσωματωμάτων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης. Ο φωτισμός ήταν ρυθμισμένος στα 100 $\mu mol/m^2 \cdot sec$ και η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 20^oC. Ο κύκλος ανάπτυξης της κάθε καλλιέργειας διήρκησε 14 ημέρες.



Εικόνα 13. Καλλιεργεια *Nannochloropsis oceanica* 1L, 14η ημέρα.



Εικόνα 14. Καλλιέργειες του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα

II.4. Διαδικασία προσδιορισμού σύστασης μικροφύκους

II.4.1. Διαδικασία προσδιορισμού κυτταρικής ανάπτυξης

Για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης του στελέχους, λαμβάνονταν καθημερινά δείγματα (2 δείγματα των 2mL) από την καλλιέργεια. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε κυψελίδα 1cm και στη συνέχεια σε φασματοφωτόμετρο S-20 UV/VIS Spectrophotometer όπου λαμβανόταν μέτρηση σε μήκος κύματος 750nm (OD_{750}).

Εικόνα 15. Φασματοφωτόμετρο S-20 UV/VIS Spectrophotometer

II.4.2. Διαδικασία παραλαβής και προσδιορισμού βιομάζας

Ο προσδιορισμός της βιομάζας πραγματοποιούνταν μέσω της μέτρησης του ξηρού βάρους. Αρχικά λαμβανόταν δείγμα 30mL από την καλλιέργεια και ακολουθούσε διήθηση υπό κενό, σε φίλτρο διαμέτρου 0,45μm. Το φίλτρο προζυγιζόταν κάθε φορά ώστε να υπολογίζεται το καθαρό βάρος της βιομάζας. Στη συνέχεια, η βιομάζα με το φίλτρο παρέμενε στη λυοφιλίωση για 24 ώρες (overnight) για να απομακρυνθεί κάθε ίχνος υγρασίας. Στο τέλος της διαδικασίας, το φίλτρο παρέμενε για 10 λεπτά στον ξηραντήρα, για να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα λαμβάνονταν το βάρος του στον αναλυτικό ζυγό.

Εικόνα 16. Συσκευή λυοφιλίωσης και θάλαμος κενού της συσκευής

Για τον προσδιορισμό της κυτταρικής ανάπτυξης στα δείγματα χρησιμοποιούταν η μέθοδος της θολοσιμετρίας. Αρχικά λαμβανόταν η απορρόφηση του κυτταρικού αιωρήματος σε μήκος κύματος 750nm. Η ληφθείσα απορρόφηση μετατρεπόταν σε συγκέντρωση κυτταρικής μάζας (mg DCW/ml) με χρήση της αντίστοιχης καμπύλης αναφοράς. Στα δείγματα γινόταν κατάλληλη αραίωση έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι πάντα μικρότερη του 0.5. Η εξίσωση, μέσω της οποίας υπολογίζεται η συγκέντρωση της ξηρής κυτταρικής μάζας είναι:

$$\textit{Biomass (mgDCW/L)} = 227{,}08 \cdot A_{750}$$

II.5. Συλλογή της βιομάζας

Προκειμένου να συλλεχθεί η βιομάζα της εκάστοτε καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του αιωρήματος, απόχυση του υπερκείμενου υγρού και έκπλυση του καθιζήματος (βιομάζα) με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θαλασσινό νερό και τα λοιπά συστατικά. Το τελικό ίζημα που προέκυπτε ζυγιζόταν προκειμένου να υπολογιστεί το νωπό βάρος της βιομάζας που αντιστοιχούσε σε αυτό.

II.6. Λύση κυττάρων με τη χρήση υπερήχων-Παραλαβή κυτταρικών θραυσμάτων (Debris)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Το κυτταρικό διάλυμα (κύτταρα τα οποία αιωρούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα με τιμή pH 7.0) το οποίο βρισκόταν σε θερμοκρασία μικρότερη των 5°C τοποθετούνταν στη συσκευή υπερήχων.

Εικόνα 17. Συσκευή παραγωγής υπερήχων

Η κεφαλή του οργάνου βυθιζόταν στο αιώρημα και η συσκευή έμπαινε σε λειτουργία. Λόγω της αύξησης θερμοκρασίας που προκαλείται από την παραγωγή υπερήχων στο διάλυμα και η οποία μπορεί να αλλοιώσει ή και να καταστρέψει τα κύτταρα, γινόταν χρήση παγόλουτρου μέσα στο οποίο τοποθετούνταν το ποτήρι με το κυτταρικό διάλυμα καθόλη τη διάρκεια λειτουργίας της συσκευής. Επιπλέον, η εφαρμογή των υπερήχων γινόταν κατά διαστήματα ώστε να χαμηλώνει και πάλι η θερμοκρασία του μεταδότη και του κυτταρικού διαλύματος. Η διάρκεια λειτουργίας ήταν 1 λεπτό. Μετά το πέρας του λεπτού το αιώρημα τοποθετούνταν για 1 λεπτό σε πάγο και η διαδικασία επαναλαμβανόταν για συνολικά 5 λεπτά λειτουργίας.

Εικόνα 18. Δείγμα τοποθετημένο σε πάγο στη συσκευή υπερήχων

Προκειμένου να ελεγχθεί το ποσοστό της διάρρηξης, μετρήθηκε η απελευθερούμενη πρωτεΐνη μετά το πέρας του κάθε λεπτού. Τέλος, ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 15 λεπτά με απόχυση του υπερκείμενου υγρού και έκπλυση του ιζήματος με απιονισμένο νερό μέχρι τον πλήρη καθαρισμό του καθιζήματος.

II.7. Διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951) όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια :

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα απαιτούμενα διαλύματα της μεθόδου:

- A: 1% w/v $CuSO_4.5H_2O$
- B: 2% w/v sodium potassium tartrate
- C: 0,2M NaOH
- D: 4% w/v sodium carbonate
- F: 10mL Folin + 10mL H2O

Από τα παραπάνω διαλύματα παρασκευαζόταν κάθε φορά ένα νέο διάλυμα το οποίο διέθετε τις παρακάτω αναλογίες. Το τελικό Ε διάλυμα παρασκευαζόταν σε κάθε πείραμα για να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις.

- E: 49mL C + 49mL D + 1mL A + 1mL B

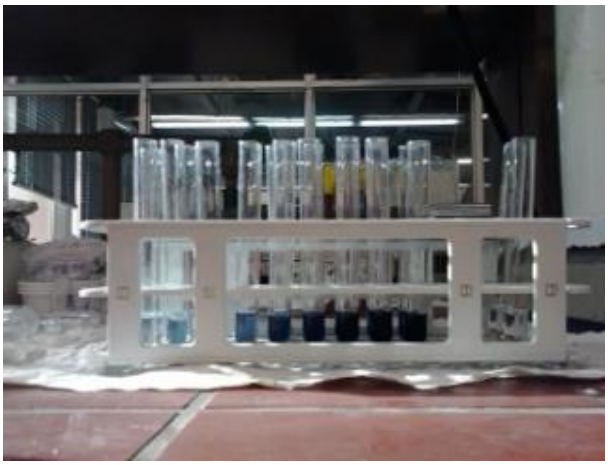
Μετά την ολοκλήρωση των διαλυμάτων ξεκινούσε η διαδικασία προσδιορισμού των πρωτεϊνών.

Προτού εφαρμοστεί η μέθοδος Lowry, έγινε καταβύθιση των πρωτεϊνών ως εξής :

Αρχικά σε 1mL ενζυμικού σκευάσματος (θραύσματα κυττάρων σε ρυθμιστικό διάλυμα με τιμή pH 7.0) προστέθηκε 1mL 5M NaOH και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 85°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε στο διάλυμα 1mL 4M HCL, ακολούθησε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση της πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry.

Ο προσδιορισμός έγινε ως εξής :

Δείγμα 0,5mL λήφθηκε (υπερκείμενο υγρό) και αναμίχθηκε καλά με 2,5mL διαλύματος Ε. Το νέο αυτό διάλυμα αναδεύτηκε ήπια και παρέμεινε σε ηρεμία για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,25mL από το διάλυμα F, αναδεύτηκαν και το νέο διάλυμα παρέμεινε σε ηρεμία αυτή τη φορά για 30 λεπτά.



Εικόνα 19. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry

Τέλος, το δείγμα φωτομετρήθηκε στα 750nm. Η εξίσωση, μέσω της οποίας υπολογίστηκε η συγκέντρωση των πρωτεϊνών του δείγματος είναι :

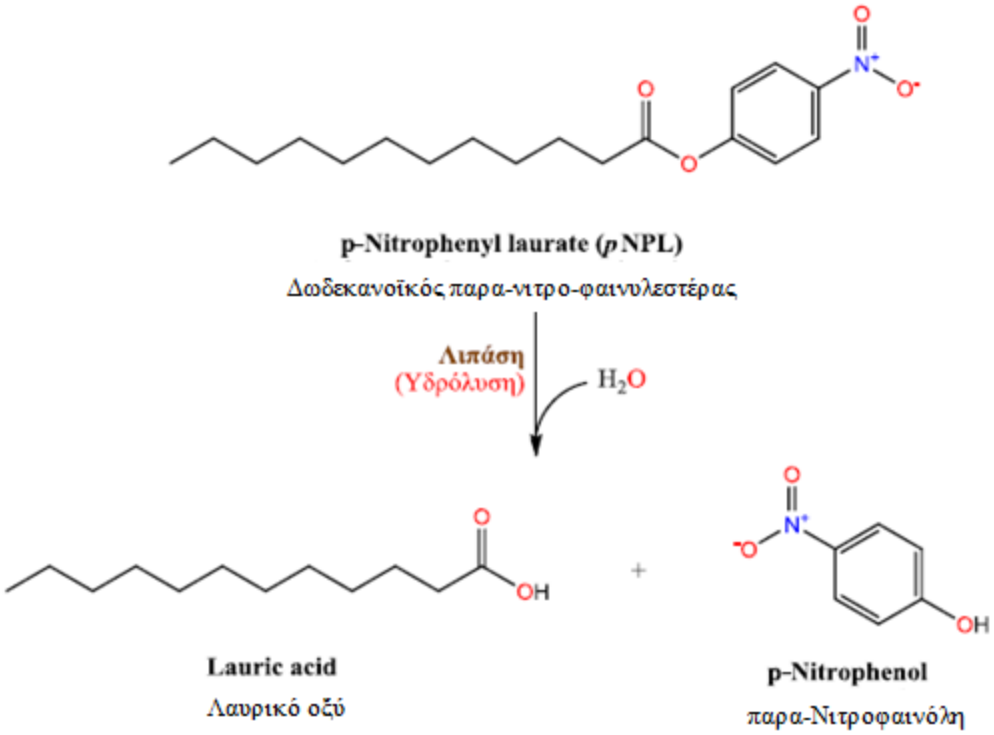
$$\mu g_{proteins}/mL_{\delta\varepsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau o\varsigma} = 0{,}5671 \cdot A_{750nm}$$

II.8. Κατασκευή καμπυλών αναφοράς της παρα-νιτροφαινόλης για τιμές pH 3-9

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς της παρα-νιτροφαινόλης, αρχικά παρασκευάστηκαν ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικών-φωσφορικών με τιμές pH 3.0-7.0, Tris-HCl με τιμές pH 7.0-9.0, Glycine-NaOH με τιμές pH 9.0-10.0 και στη συνέχεια για κάθε διάλυμα με διαφορετική τιμή pH παρασκευάστηκε διάλυμα παρα-νιτροφαινόλης συγκέντρωσης 2mM. Μετρήθηκε η απορρόφηση της παρα-νιτροφαινόλης για κάθε τιμή pH για συγκεντρώσεις 0.01, 0.03, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2 και 0.3 mM. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς.

II.9. Προσδιορισμός λιπολυτικής δράσης

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας του ενζυμικού σκευάσματος πραγματοποιούνταν χρησιμοποιώντας το παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (pNP-L) ως υπόστρωμα (Sigurgisladottir et al., 1993). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ικανότητα των ενζύμων με δράση λιπάσης να υδρολύουν τους εστέρες της παρα-νιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα, και να ελευθερώνουν την παρα-νιτροφαινόλη, το κίτρινο χρώμα της οποίας ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 410 nm. Η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της παρα-νιτροφαινόλης.



Εικόνα 20. Αντίδραση υδρόλυσης pNPL καταλυόμενη από λιπάση

Το αντιδρών μίγμα (300 μL) περιείχε: 200 μL του ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών-φωσφορικών συγκέντρωσης 50 mM, 50 μL του υποστρώματος συγκέντρωσης 0.175 mM και 50 μL ενζυμικού σκευάσματος. Το μίγμα επωάστηκε για συνολικά 10 λεπτά στους 30°C υπό ανάδευση. Δείγματα λήφθηκαν στα 0, 3, 6 και 10 λεπτά.

Η αντίδραση τερματίστηκε με την τοποθέτηση του μίγματος σε πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια, μετά από φυγοκέντρηση, λήφθηκε η τιμή της οπτικής απορρόφησης στα 410nm. Για κάθε δείγμα συμπεριλήφθηκαν 2 τυφλά δείγματα, ένα το οποίο δεν περιείχε ενζυμικό σκεύασμα και ένα το οποίο δεν περιείχε υπόστρωμα. Οι απορροφήσεις αυτών μετρήθηκαν επίσης.

Εικόνα 21. Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices)

Υπόστρωμα: Διάλυμα παρα-νιτρο-φαίνυλο-λαυρικού οξέος συγκέντρωσης 0.175mM.

Πίνακας 4. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος pNPL (pH 7.0)

Citrate (50 mM)	10,507 g/L
Phosphate (100 mM)	35,49 g/L
Αραβικό κόμμι (Arabic gum)	1,1 g/L
Triton X-100	4,44 g/L

Τονίζεται ότι ως μία ενζυμική μονάδα λιπάσης ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την υδρόλυση 1 μmole παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικού οξέος ανά λεπτό.

ΙΙ.10. Μελέτη θερμικής σταθερότητας

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος Αυτό κατέστη δυνατό με την επώαση των υπό μελέτη ενζυμικών δειγμάτων σε θερμοκρασίες 40–60°C για 0.5–8 ώρες και σε θερμοκρασίες 70–90 ^{o}C για 0.5–4 ώρες και ακολούθως εκτίμηση της ενζυμικής τους ενεργότητας. Σε όλες τις περιπτώσεις η μέτρηση της

λιπολυτικής ενεργότητας πραγματοποιήθηκε ποσοτικά με υπόστρωμα το παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ.

II.11. Εξειδίκευση υποστρώματος

Παρασκευάστηκαν έξι διαφορετικά υποστρώματα εστέρων της παρα-νιτροφαινόλης, ίδιας συγκέντρωσης. Αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν: το παρα-νίτρο-φαίνυλο-οξικό οξύ (pNP-A), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-βουτυρικό οξύ (pNP-B), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ (pNP-O), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-δεκανοϊκό οξύ (pNP-D), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (pNP-L) και το παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ (pNP-P). Με τα παραπάνω υποστρώματα πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις υδρόλυσης με σκοπό τον εντοπισμό του υποστρώματος στο οποίο το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση.

II.12. Μελέτη των κινητικών παραμέτρων

Οι κινητικές σταθερές K_m και V_{max} προσδιορίστηκαν από την ενζυμική ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος στους 30°C και σε τιμή pH 7.0 σε διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων. Πιο αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα: πάρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοικό οξύ (pNP-O), πάρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (pNP-L) και πάρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ (pNP-P). Από τα δεδομένα αυτών των αντιδράσεων υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές της εξίσωσης Michaelis-Menten, η οποία είναι της μορφής:

$$u = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου:

u ο ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης (d[P]/dt)

[S] η συγκέντρωση του υποστρώματος

V_{max} ο μέγιστος ρυθμός που επιτυγχάνεται από το σύστημα

K_m η συγκέντρωση του υποστρώματος που αντιστοιχεί σε ρυθμό αντίδρασης ίσο με το μισό της V_{max}

ΙΙ.13. Προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής pH και της σταθερότητας σε διάφορες τιμές pH

Η εκτίμηση του βέλτιστου pH δράσης πραγματοποιήθηκε με την εκτέλεση της ενζυμικής δοκιμής σε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα σε ένα εύρος τιμών pH 3.0–9.0. Σε όλες τις περιπτώσεις η θερμοκρασία στην αντίδραση της υδρόλυσης διατηρήθηκε στους 30°C.

Η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορες τιμές pH μελετήθηκε έπειτα από την επώαση του δείγματος σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH 3.0–9.0 και την μέτρηση της ενζυμικής ενεργότητας σε διαφορετικά χρονικά σημεία, δηλαδή στη 1 και τις 24 ώρες. Έπειτα, μετρήθηκε η εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητα μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης σε τιμή pH 7.0 (κιτρικά-φωσφορικά).

ΙΙ.14. Μελέτη της σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες

Η επίδραση των οργανικών διαλυτών στο ενζυμικό σκεύασμα εκτιμήθηκε έπειτα από την προσθήκη 500 μL οργανικού διαλύτη σε 25mg λυοφιλιωμένου ενζυμικού σκευάσματος. Η εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητα μετρήθηκε ύστερα από 6 και 24 ώρες επώασης στους 30 ^{o}C με υπόστρωμα το πάρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακόλουθοι: μεθανόλη, αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, τολουόλιο, ακετόνη, n-εξάνιο, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, 1-βουτανόλη, n-οκτάνιο, δωδεκάνιο, χλωροφόρμιο.

II.15. Μελέτη της σταθερότητας σε μεταλλικά ιόντα και επιφανειοδραστικές ενώσεις

Για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων μεταλλικών ιόντων και επιφανειοδραστικών ενώσεων στη σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος έγινε επώαση αυτού σε ιόντα με συγκέντρωση 1mM για 30 και 60 λεπτά και στη συνέχεια μετρήθηκε η εναπομείνουσα ενεργότητα.

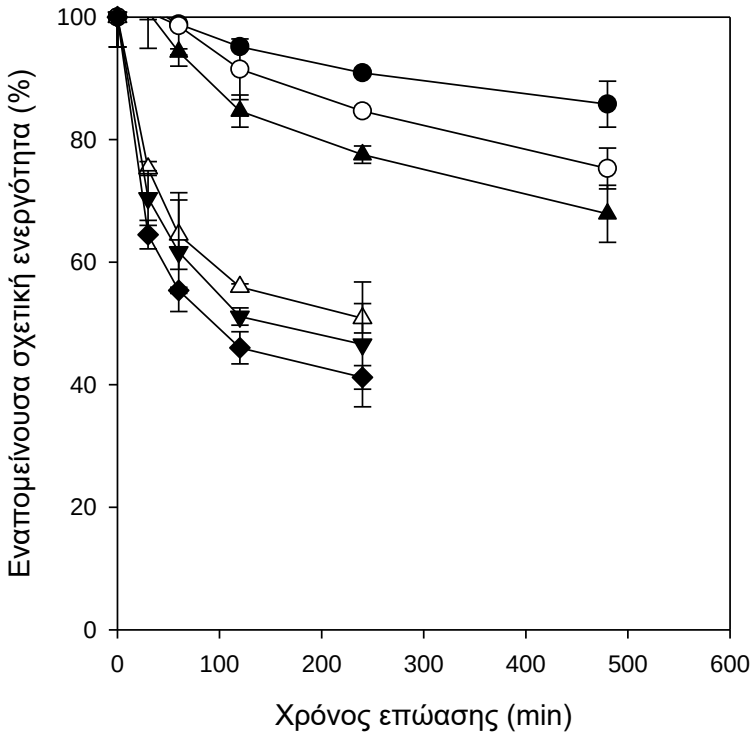
Τα μεταλλικά ιόντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής: Mn^{+2} ($MnCl_2$), Cu^{+2} ($CuSO_4$), Zn^{+2} ($ZnSO_4$), Fe^{+3} ($FeCl_3$), Ca^{+2} ($CaCl_2.6H_2O$), Co^{+2} ($CoCl_2.6H_2O$), Mg^{+2} ($MgCl_2.6H_2O$), Na^{+} (NaCl), K^{+} (KCl), $SO^{2-}_{4.}$

Οι επιφανειοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: SDS, Triton X-100, Tween 80.

III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορες θερμοκρασίες

Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε θερμοκρασίες 40-90°C και τιμή pH 7.0. Δείγματα λαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα και προσδιορίζονταν η ενεργότητα του σκευάσματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



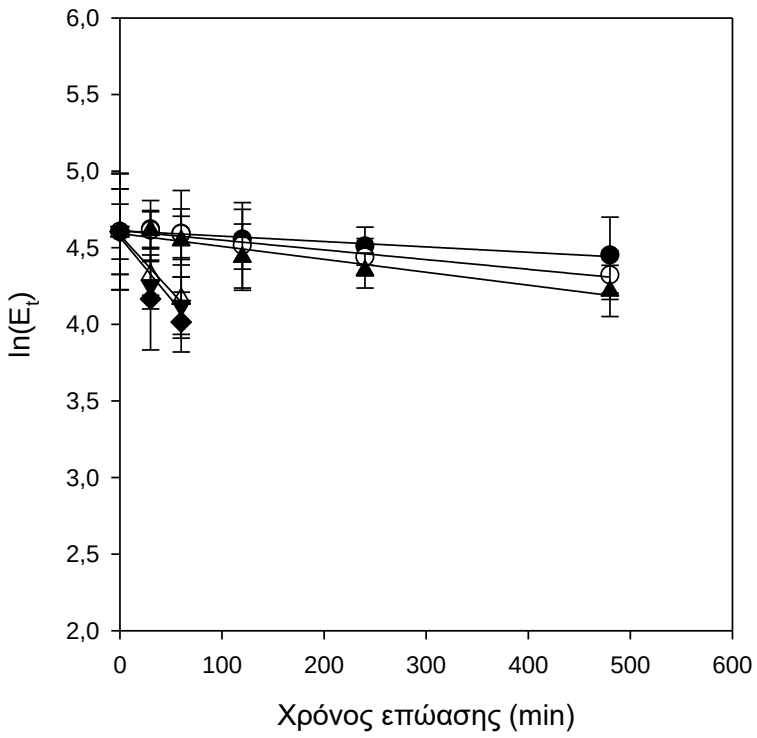
Διάγραμμα 1. Εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες. Σύμβολα: (●) 40 ^{o}C, (○) 50 ^{o}C, (▲) 60 ^{o}C, (△) 70 ^{o}C, (▼) 80 ^{o}C και (◆) 90 ^{o}C.

Το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί για πάνω από 8 ώρες επώασης στους 30 ^{o}C το 100% της αρχικής του ενεργότητας. Μετά από επώαση 30 λεπτά σε θερμοκρασίες 40-60°C, διατηρεί επίσης το 100% της ενεργότητας του. Όπως φαίνεται στο παραπάνω Διάγραμμα, η 1 ώρα επώασης στους 40, 50 και 60°C έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση περίπου του 99, 98 και 94% της αρχικής ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος, αντίστοιχα, ενώ μέχρι και τις 8 ώρες στους 40°C διατηρείται το 85% της ενεργότητας του. Στους 70, 80 και 90°C το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί στη 1 ώρα επώασης περίπου το 64, 62 και 55% της αρχικής του ενεργότητας, αντίστοιχα,

ενώ στις 4 ώρες παρατηρείται απώλεια άνω του 50% της αρχικής του ενεργότητας στις αναφερθείσες θερμοκρασίες.

Ολόκληρα κύτταρα (whole-cells) από τον μικροοργανισμό *Burkolderia sp.*ZYB002 (Shu et al., 2001) διατηρούν το 100% της ενεργότητας τους μετά από επώαση σε θερμοκρασίες 45-60°C για 1 ώρα, ενώ η προσδεδεμένη στη μεμβράνη λιπάση από τον μύκητα *Rhizopus oryzae* (Razak, et al. 1999) και μία λιπάση από τον *Cryptococcus albidus* (Tiwari et al., 2011) διατηρούν πάνω από 90% και το 100%, αντίστοιχα, της αρχικής τους ενεργότητας μετά από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία 50°C. Οι Abramic et al. (1999) και Kojima et al.(1994) σε μελέτες γύρω από λιπάσες προερχόμενες από τους μικροοργανισμούς *Streptomyces rimosus* και *Pseudomonas fluorescens AK102* παρατήρησαν ότι τα ενζυμα διατηρούν το 100% της ενεργότητας τους μετά από επώαση σε θερμοκρασίες 25-40 ^{o}C για 30 λεπτά και 35-50°C για 1 ώρα, αντίστοιχα. Μία λιπάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Candida cylindracea* (Tomizuka et al., 1965), ήταν αρκετά σταθερή σε θερμοκρασία έως και 15°C για πάνω από 30 ώρες. Σε άλλη λιπάση από τον *Lactobacillus rhamnosus* (Weingand-Ziade et al., 2003) μετά από θερμική επεξεργασία στους 45°C δεν εμφανίστηκε καμία θερμική απενεργοποίηση, ενώ η θερμική επεξεργασία σε θερμοκρασία 55°C και άνω προκάλεσε προοδευτική απενεργοποίηση του ενζύμου μέχρι και τους 75°C όπου η επώαση για 15 λεπτά προκάλεσε την πλήρη απενεργοποίηση αυτού.

Οι σταθερές απενεργοποίησης του ενζυμικού σκευάσματος (k_d, min^{-1}) για θερμοκρασίες επώασης 40, 50, 60, 70, 80 και 90 ^{o}C υπολογίστηκαν από την κλίση της ευθείας του διαγράμματος του φυσικού λογαρίθμου της εναπομείνουσας σχετικής ενεργότητας (lnE_t) συναρτήσει του χρόνου επώασης (t) του ενζυμικού σκευάσματος σε κάθε θερμοκρασία (Διάγραμμα 2, Πίνακας 5).



Διάγραμμα 2. Φυσικός λογάριθμος εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες. Σύμβολα: (●) 40 °C, (○) 50 °C, (▲) 60 °C, (△) 70 °C, (▼) 80 °C και (◆) 90 °C.

Πίνακας 5. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζυμικού σκευάσματος

Θερμοκρασία (°C)	k_d (min^{-1})
40	0,0004
50	0,0006
60	0,0008
70	0,0073
80	0,0081
90	0,0098

Η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υδρόλυσης του υποστρώματος παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (E_{ad}, kJ/mol) υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση του Arrhenius (Εξ. 1, 2 και Διάγραμμα 3) (Segel, 1975)

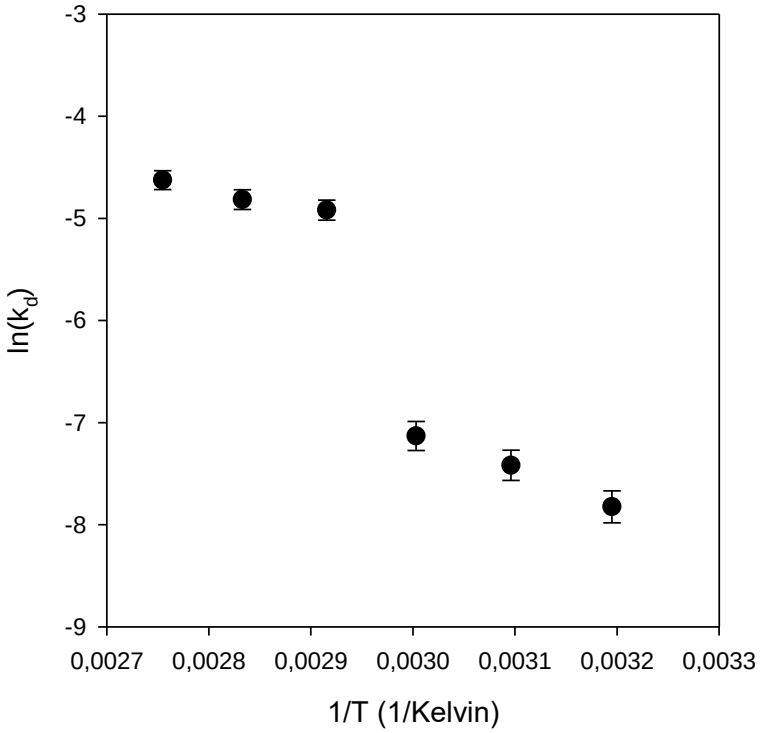
$$k_d = A_d \cdot e^{-E_a/RT} \quad \text{(Εξ. 1)}$$

ή

$$ln(k_d) = ln(A_d) - \left(\frac{E_a}{R}\right) \cdot \frac{1}{T} \quad \text{(Εξ. 2)}$$

όπου k_d, (min^{-1}) σταθερά απενεργοποίησης του ενζυμικού σκευάσματος, A_d είναι η σταθερά του παράγοντα συχνότητας ή παράγοντας Arrhenius (υποδηλώνει το

ρυθμό των συγκρούσεων και το ποσοστό των συγκρούσεων που έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση), E_a (J/mol) η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης, T (Kelvin) η θερμοκρασία και R=8.314 J/mol/K η παγκόσμια σταθερά των αερίων.



Διάγραμμα 3. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης υδρόλυσης

Ενέργεια ενεργοποίησης **Εα = 70309,84 J/mol**

Οι χρόνοι ημιζωής ($t_{1/2}$, min) του ενζυμικού σκευάσματος στις διάφορες θερμοκρασίες υπολογίστηκαν από την Εξ. 3 (Segel, 1975) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

$$t_{1/2} = \frac{0.6931}{k_d} \quad \text{(Εξ. 3)}$$

όπου $t_{1/2}$ (min) ο χρόνος ημιζωής και k_d, (min^{-1}) σταθερά απενεργοποίησης του ενζυμικού σκευάσματος.

Πίνακας 6. Χρόνοι ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος

Θερμοκρασία (^oC)	Χρόνος ημιζωής (min)
40	1732,75
50	1155,17
60	866,38
70	94,95
80	85,57
90	70,72

Το ενζυμικό σκεύασμα παρουσίασε υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υδρόλυσης συγκριτικά με λιπάσες προερχόμενες από τους μικροοργανισμούς *Rhizopus homothallicus* (Diaz et al., 2006), *Bacillus megaterium* (Lima et al., 2005) και *Aspergillus flavus* (Colla et al., 2014) των οποίων οι ενέργειες ενεργοποίησης ήταν 30 and 34.2 και 60.33kJ/mol, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, το ενζυμικό σκεύασμα παρουσιάζει χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης από εκείνη των λιπασών που λαμβάνονται μέσω στερεάς ζύμωσης (solid-state fermentation) από τον μύκητα *Geotrichum candidum* (Maldonado et al., 2006) σε θρεπτικά μέσα που περιέχουν πεπτόνη, υδρολυμένη μαγιά, και διαυγασμένο υγρό από πολτοποιημένο αραβόσιτο, οι οποίες ήταν 330, 140, και 182kJ/mol αντίστοιχα αλλά και από τον *Lactobacillus rhamnosus* (Weingand-Ziade et al., 2003) της οποίας η ενέργεια ενεργοποίησης είναι 110kJ/mol.

Σε ότι αφορά τον χρόνο ημιζωής (Πίνακας 6), το ενζυμικό σκεύασμα παρουσίασε ιδιαίτερα υψηλή αντοχή στη θερμοκρασία σε σχέση με τη λιπάση από τον μικροοργανισμό *Aspergillus flavus* (Colla et al., 2014), η οποία εμφανίζει για τις θερμοκρασίες 40, 50, 60, 70, 80 και 90^oC χρόνο ημιζωής 256.67, 69.30, 29.62, 29.74, 13.43 και 11 λεπτά, αντίστοιχα. Από την άλλη πλευρά, ο χρόνος ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος είναι μικρότερος από τον χρόνο ημιζωής που εμφανίζει η λιπάση από τον *Bacillus stearothermophilus* MC *7* (Kambourova et al., 2003) στους 70^oC (3ώρες).

Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας (ΔG^o) μιας αντίδρασης δίνεται από την εξίσωση 4.

$$\Delta G^0 = -2.3 \cdot R \cdot T \cdot logk_d \quad \text{(Εξ. 4)}$$

ή

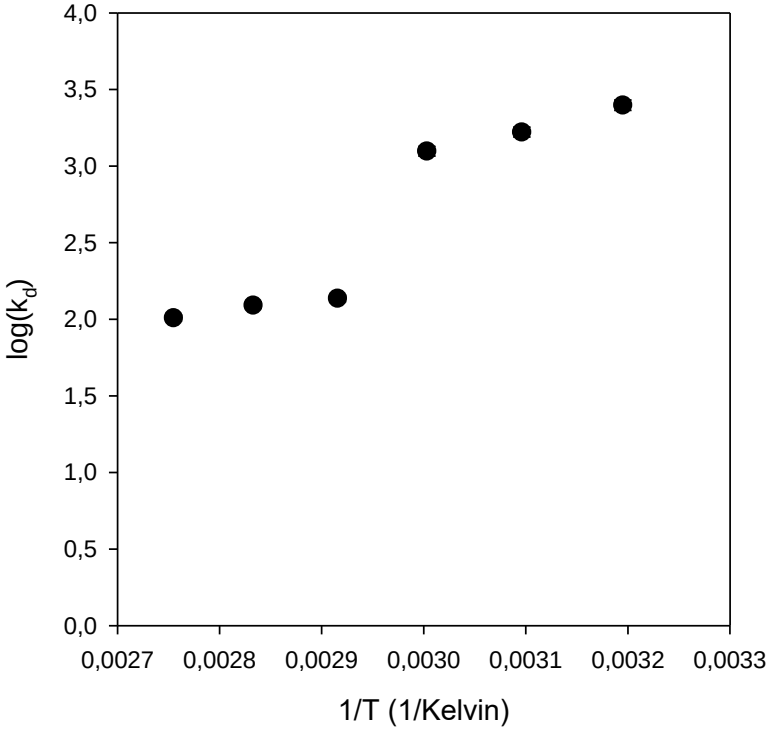
$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad \text{(Εξ. 5)}$$

όπου ΔH^0 (J/mol) είναι η μεταβολή της ενθαλπίας και ΔS^0 (J/mol/K) η μεταβολή της εντροπίας, T (Kelvin) η θερμοκρασία και R=8.314 J/mol/K η παγκόσμια σταθερά των αερίων.

Από τις εξισώσεις 4 και 5 προκύπτει:

$$-logk_d = \left(\frac{\Delta H^0}{2.3R}\right) \cdot \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^0}{2.3R} \quad \text{(Εξ. 6)}$$

από την οποία υπολογίζεται διαγραμματικά η μεταβολή της ενθαλπίας και εντροπίας του συστήματος (Διάγραμμα 4) (Segel, 1975).



Διάγραμμα 4. logP συναρτήσει του αντιστρόφου της θερμοκρασίας

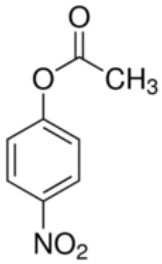
Από το διάγραμμα 4 και την εξίσωση 6 προκύπτει ότι:

ΔH^0= 70230,10 J/mol

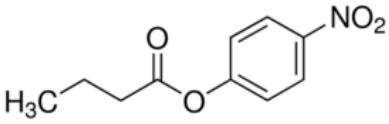
ΔS^0 = 157,47 J/mol/K

III.2. Εξειδίκευση υποστρώματος

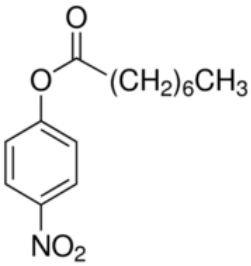
Χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικοί εστέρες της παρα-νιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας: το παρα-νίτρο-φαίνυλο-οξικό οξύ (C2), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-βουτυρικό οξύ (C4), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ (C8), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-δεκανοϊκό οξύ (C10), το παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ (C12) και το παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ (C16) (Εικόνα 22).



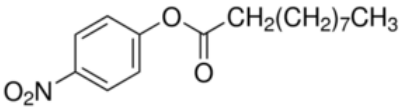
pNP-Acetate



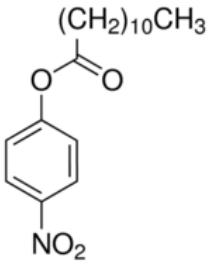
pNP-Butyrate



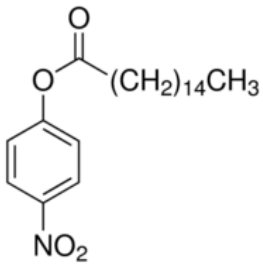
pNP-Octanoate



pNP-Decanoate



pNP-Laurate



pNP-Palmitate

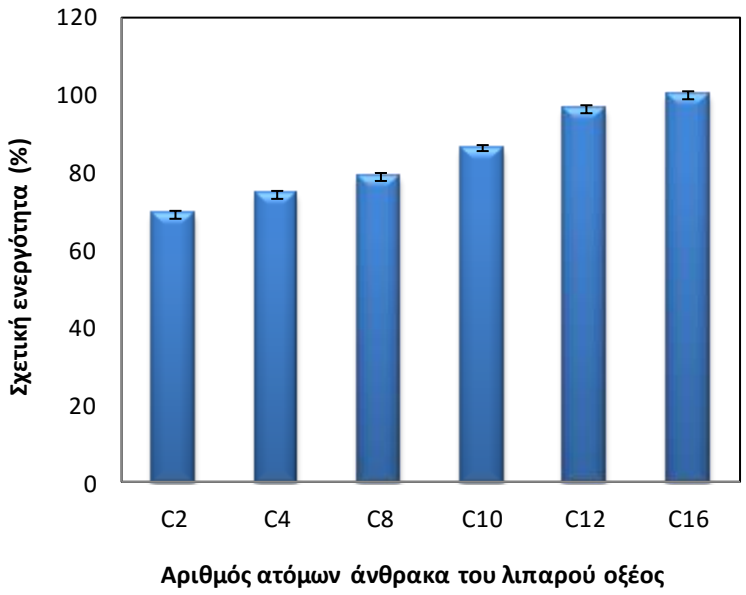
Εικόνα 22. Δομές pNP-υποστρωμάτων

Οι ταχύτητες υδρόλυσης των έξι υποστρωμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.

Πίνακας 7. Ταχύτητες υδρόλυσης υποστρωμάτων.

Υπόστρωμα	Ταχύτητα απελευθερούμενου προϊόντος (pNp) (mmole/mL/min)
pNp-Acetate	0.040 ± 0.002
pNp-Butyrate	0.044 ± 0.001
pNp-Octanoate	0.046 ± 0.002
pNp-Decanoate	0.050 ± 0.001
pNp-Laurate	0.056 ± 0.001
pNp-Palmitate	0.058 ± 0.001

Ως 100% θεωρήθηκε το υπόστρωμα στο οποίο εμφανίζεται η μέγιστη ταχύτητα απελευθέρωσης προϊόντος (ή υδρόλυσης υποστρώματος) (Διάγραμμα 5).



Διάγραμμα 5. Ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε υποστρώματα με διαφορετικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι αυξανομένου του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας αυξάνεται η δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος. Η μέγιστη ταχύτητα υδρόλυσης εμφανίστηκε στο υπόστρωμα παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ.

Εξειδίκευση στην υδρόλυση των υποστρωμάτων παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ και παλμιτικό μεθυλεστέρα (Methyl-Palmitate) παρουσιάζουν οι προσδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη λιπάσες από τους μύκητες *Geotrichum candidum* 4013 (Brobcova et al., 2010) και *Rhizopus oryzae* (Razak, et al. 1999), αντίστοιχα καθώς και οι λιπάσες από τους μικροοργανισμούς *Bacillus stearothermophilus* MC7 (Kambourova et al, 2003), *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima et al., 1994), *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar et al., 2005), *Microbacterium sp*. (Tripathi et al., 2014), *Cryptococcus albidus* (Tiwari, et al., 2011). Αντίθετα ολόκληρα κύτταρα (whole-cells) του μικροοργανισμού *Burkholderia sp.*ZYB002 (Shu et al., 2012) εμφάνισαν εξειδίκευση στο παρα-νίτρο-φαίνυλο-δεκανοϊκό οξύ. Εξειδίκευση στο ίδιο υπόστρωμα εμφάνισε και η εξωκυτταρική λιπάση του μύκητα *Geotrichum candidum* 4013 (Brobcova et al., 2010). Εξειδίκευση σε εστέρες της παρα-νιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα μικρότερης αναθρακικής αλυσίδας (C8 και C4) παρουσίασαν οι λιπάσες των μικροοργανισμών *Streptomyces rimosus* (Abramic et al., 1999) και *Bacillus* sp.RSJ-1 (Sharma et al., 2001), αντίστοιχα.

III.3. Εύρεση κινητικών σταθερών

Η εύρεση των κινητικών σταθερών (K_m, v_{max}) της υδρόλυσης των υποστρωμάτων παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ πραγματοποιήθηκε με την εξίσωση **Michaelis Menten:**

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_m + [S]} \qquad \text{(Εξ. 7)}$$

όπου :

v ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (μmole απελευθερούμενου

προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

v_{max} μέγιστος ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (μmole απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

[S] συγκέντρωση υποστρώματος (mM)

K_m σταθερά Michaelis-Menten (mM)

Η σταθερά **Michaelis-Menten** ισούται αριθμητικά με εκείνη τη συγκέντρωση υποστρώματος, στην οποία η ενζυμική ταχύτητα είναι ίση με το μισό της μέγιστης ταχύτητας v_{max}. Η σταθερά K_m θεωρείται μέτρο της συγγένειας του ενζύμου με το υπόστρωμα που καταλύει (ευκολία δημιουργίας του συμπλόκου υποστρώματος-ενζύμου). Χαμηλές τιμές της σταθεράς K_m υποδηλώνουν υψηλή συγγένεια του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα, με αποτέλεσμα η αντίδραση να προσεγγίσει την μέγιστη ταχύτητα (v_{max}) σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Υψηλές τιμές της σταθεράς K_m υποδεικνύουν ότι δεν είναι τόσο αποτελεσματική η πρόσδεση του ενζύμου στο υπόστρωμα με αποτέλεσμα η μέγιστη ταχύτητα (v_{max}) να επιτευχθεί σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Η τιμή της σταθεράς K_m είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Στην περίπτωση υψηλών συγκεντρώσεων υποστρώματος είναι δυνατό να εμφανιστεί παρεμπόδιση της ενζυμικής δράσης από το ίδιο το υπόστρωμα. Η ταχύτητα της ενζυμικής δράσης στην περίπτωση όπου εμφανίζεται το φαινόμενο της παρεμπόδισης από το υπόστρωμα περιγράφεται από την Εξίσωση 8.

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K_m + [S] + \frac{1}{K_I}[S]^2} \qquad \text{(Εξ. 8)}$$

όπου

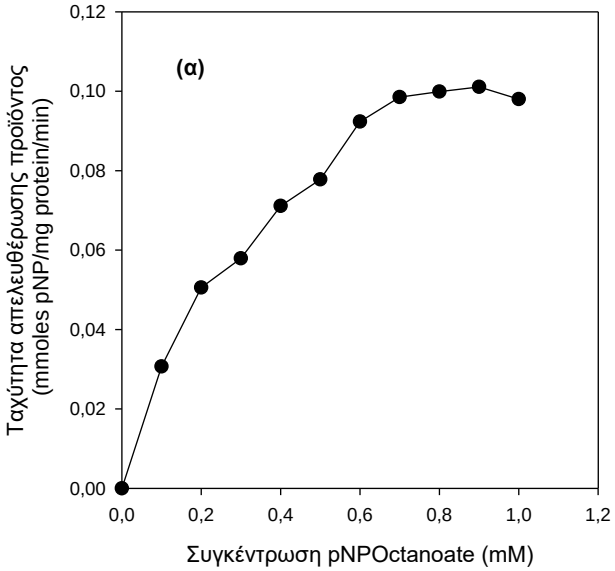
v ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (μmole απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

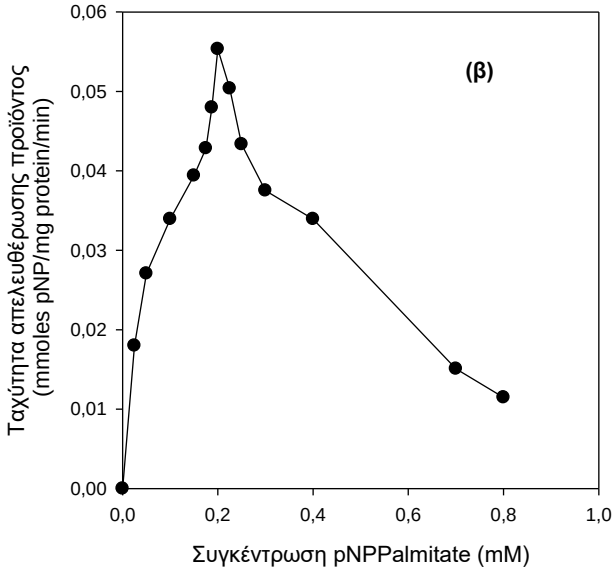
v_{max} μέγιστος ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (μmole απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

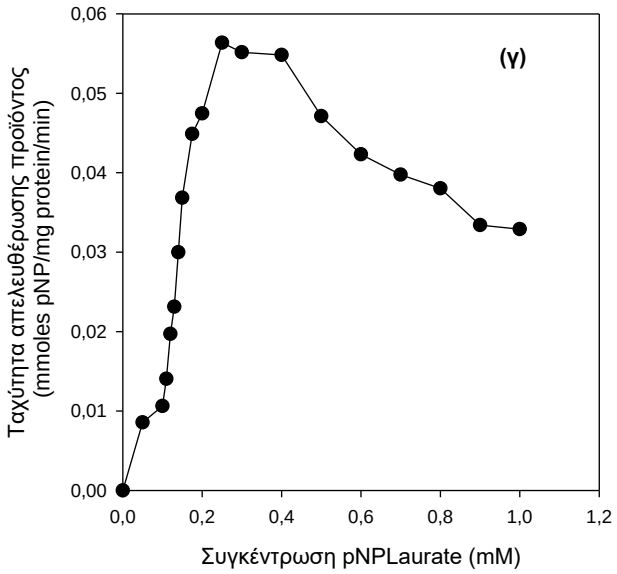
[S] συγκέντρωση υποστρώματος (mM)

K_m σταθερά Michaelis-Menten (mM)

K_I σταθερά παρεμπόδισης (mM)

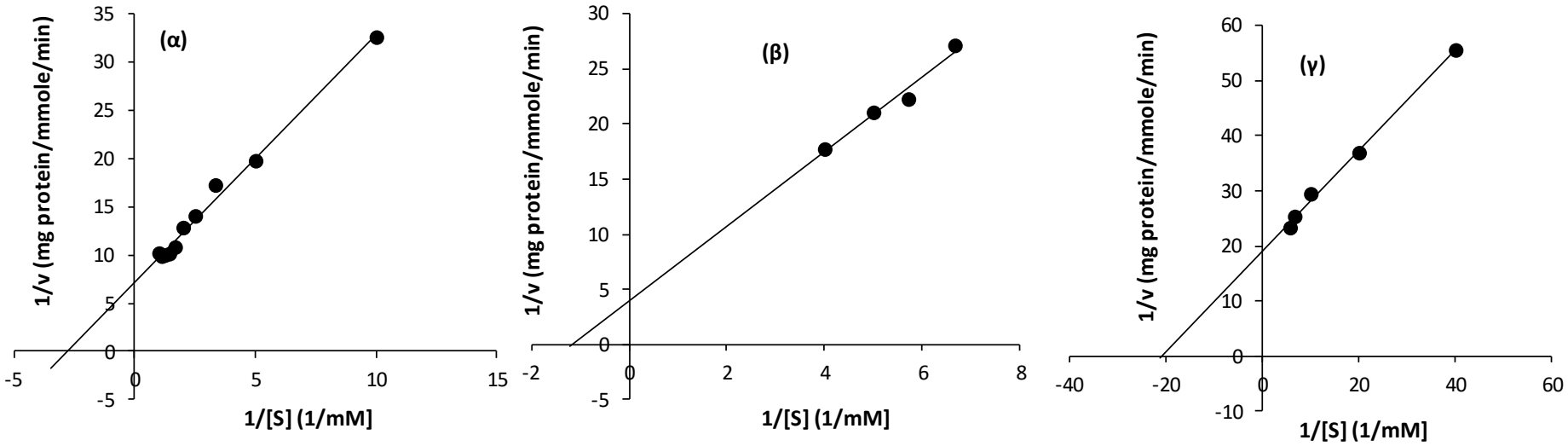

(α)
Ταχύτητα απελευθέρωσης προϊόντος
(mmoles pNP/mg protein/min)
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
Συγκέντρωση pNPOctanoate (mM)


(β)
Ταχύτητα απελευθέρωσης προϊόντος
(mmoles pNP/mg protein/min)
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
Συγκέντρωση pNPPalmitate (mM)



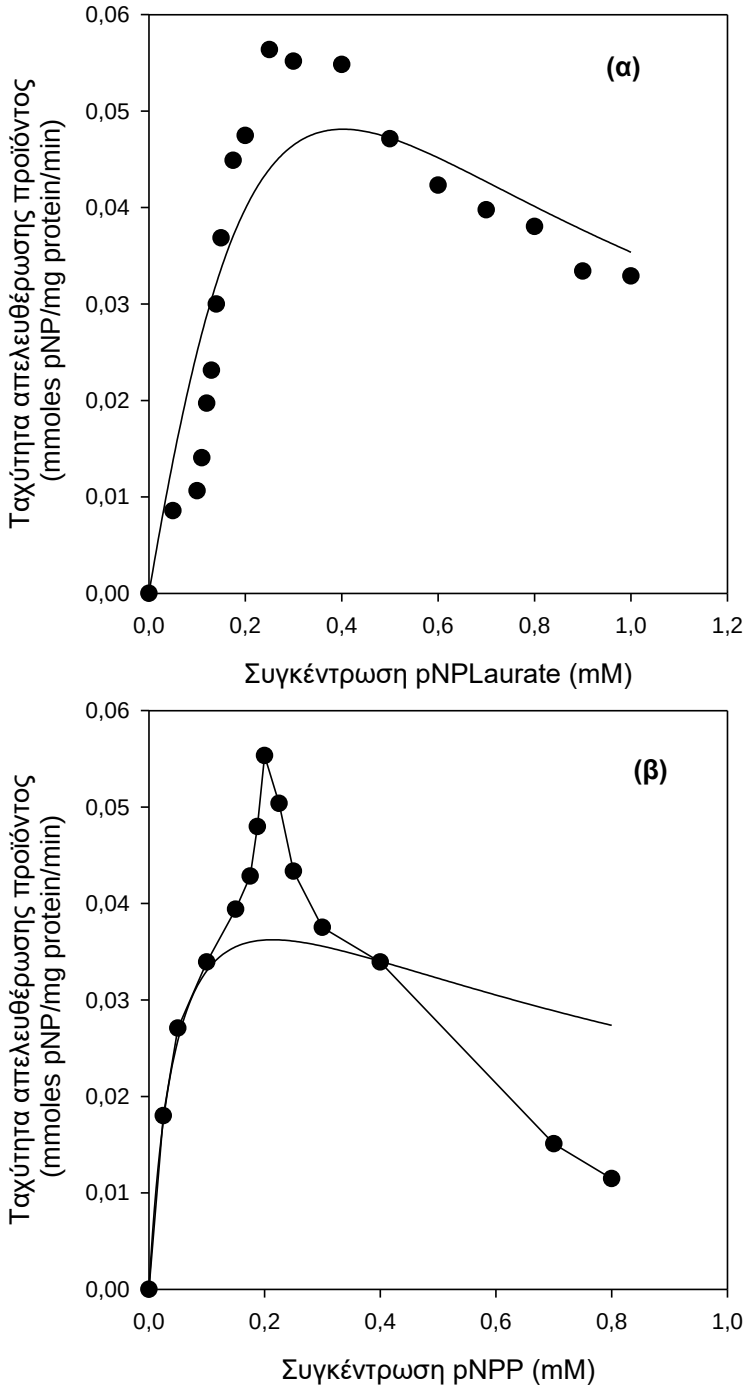
Διάγραμμα 6. Διάγραμματα Michaelis-Menten: μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, (β) παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ και (γ) παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ.

Οι κινητικές σταθερές (K_m , v_{max}) για τα εξετασθέντα υποστρώματα υπολογίστηκαν από τα διαγράμματα του αντιστρόφου της ταχύτητας συναρτήσει του αντιστρόφου της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Διαγράμματα Lineweaver-Burk) (Διάγραμμα 7). Στην περίπτωση χρήσης του παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκού οξέος ως υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε το σύνολο των πειραματικών δεδομένων για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών, ενώ στην περίπτωση του παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικού οξέος και του παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικού οξέος λόγω της παρεμπόδισης που εμφανίζεται από το υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε μέρος των πειραματικών δεδομένων.



Διάγραμμα 7. Διάγραμματα Lineweaver-Burk: μεταβολή του αντιστρόφου της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει του αντιστρόφου της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, (β) παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ και (γ) παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ.

Οι σταθερές παρεμπόδισης (K_I) υπολογίστηκαν με προσαρμογή της Εξίσωσης 8 στο σύνολο των πειραματικών δεδομένων για τα υποστρώματα παρα-νίτρο-φαίνυλο παλμιτικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ χρησιμοποιώντας τις υπολογισθείσες τιμές K_m και v_{max}. Οι προσαρμογές παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8. Προσαρμογή της εξίσωσης 8 στα δεδομένα μεταβολής ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) παρα-νίτρο-φαίνυλο λαυρικό οξύ και (β) παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ.

Οι κινητικές σταθερές συνοψίζονται στον Πίνακα 8.

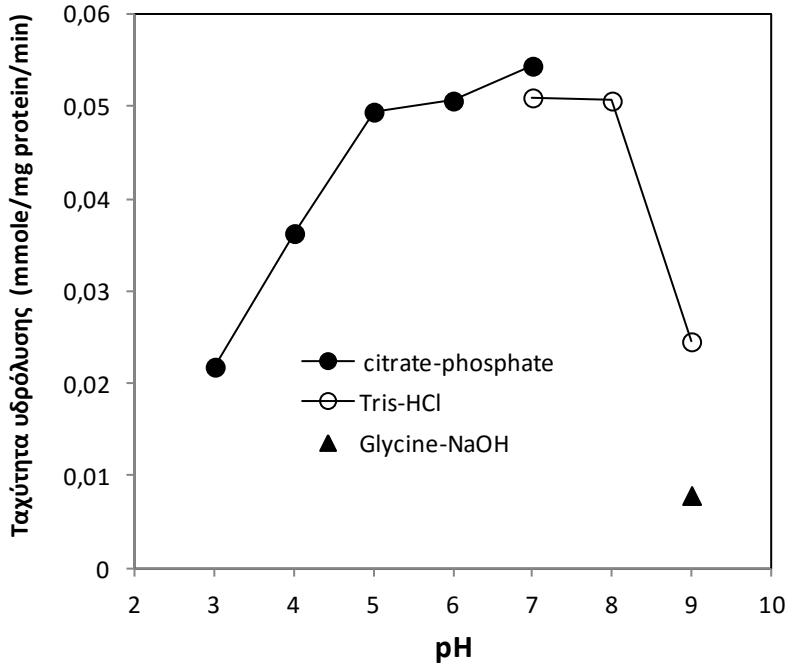
Πίνακας 8. Κινητικές σταθερές του ενζυμικού σκευάσματος

Υπόστρωμα	K_m (mM)	v_{max} (mmolepNP/mg protein/min)	K_I (mM)
pNPOctanoate	0.352 ± 0.064	0.138 ± 0.009	-
pNPLaurate	0.874 ± 0.053	0.257 ± 0.010	0.185 ± 0.004
pNPPalmitate	0.051 ± 0.001	0.054 ± 0.004	0.898 ± 0.016

Ο Πίνακας 8 δείχνει ότι το υπόστρωμα που εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια με το ενζυμικό σκεύασμα, δηλαδή το μικρότερο K_m, είναι το παρα-νίτρο-φαίνυλο παλμιτικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν από τη μελέτη της εξειδίκευσης στο υπόστρωμα για τους διάφορους εστέρες της παρα-νιτροφαινόλης. Η υπολογισθείσα τιμή του K_m του ενζυμικού σκευάσματος που μελετήθηκε για το υπόστρωμα παρα-νίτρο-φαίνυλο παλμιτικό οξύ είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες των λιπασών που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Geotrichum candidum* 4013 (Brobcova et al., 2010), *Microbacterium sp.* (Tripathi et al., 2014) και *Bacillus stearothermophilus* MC7 (M.Kambourova et al., 2003) των οποίων οι τιμές ήταν 3.75 mM, 3.2mM και 0.33mM, αντίστοιχα.

III.4. Βέλτιστο pH της αντίδρασης υδρόλυσης

Η επίδραση που έχει το pH στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε θερμοκρασία 30°C παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9.



Διάγραμμα 9. Επίδραση του pH στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος

Στο Διάγραμμα 9 παρουσιάζεται μέγιστη παρατηρούμενη ταχύτητα υδρόλυσης στην τιμή pH 7.0. Στις τιμές pH 6.0 και 8.0 το ενζυμικό σκεύασμα παρουσιάζει λίγο μικρότερη ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος, ενώ σε ακραίες τιμές pH το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει ιδιαίτερα μειωμένη ταχύτητα.

Μία λιπάση προερχόμενη από τον μικροοργανισμό *Bacillus sp.* RSJ-1 (Sharma et al., 2002) εμφανίζει μέγιστη δραστικότητα (100%) σε pH 8.0, ενώ σε pH 9.0 εμφανίζει το 99% της δραστικότητας της. Οι λιπάσες που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Rhizopus oryzae* (Razak et al. 1999) και *Aspergillus flavus* (Colla et al., 2014) εμφανίζουν βέλτιστη τιμή pH 6.0, ενώ η λιπάση από τον *Cryptococcus albidus* (Tiwari et al., 2011) εμφανίζει βέλτιστη τιμή pH 6.5. Η λιπάση που προέρχεται από ζύμωση στερεάς κατάστασης του μικροοργανισμού *Aspergillus niger* (Colla et al., 2014) καθώς και η λιπάση από τον *Candida cylindracea* (Tomizuka et al., 1966) εμφανίζουν βέλτιστη τιμή pH περίπου 7.0, ενώ οι λιπάσες από τον *Burkholderia sp.*ZYB002 (Shu et al., 2012) και τον μύκητα *Geotrichum candidum* 4013 (Brobcova et al., 2010) (τόσο η προσδεδεμένη στη μεμβράνη λιπάση όσο και η εξωκυτταρική λιπάση) εμφανίζουν βέλτιστη τιμή pH περίπου 8.0. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την ύπαρξη λιπασών από τα στελέχη *Bacillus coagulants*

BTS-3 (Kumar et al., 2005), *Microbacterium sp.* (Tripathi et al., 2014), *Pseudomonas nitroreducens και Pseudomonas fragi* (Watanabe et al., 1977)*, Streptomyces rimosus* (Abramic et al., 1999), *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima et al., 1994), *Bacillus* A30-1 (Wang et al., 1995) και *B. stearothermophilus* L1 (Kim HK et al., 1998) εμφανίζουν βέλτιστη τιμή στην αλκαλική περιοχή pH (8.5 – 10.0).

Στις τιμές pH 7.0 και 9.0 παρατηρήθηκε εξάρτηση της ταχύτητας υδρόλυσης από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος (Διάγραμμα 9). Για την τιμή pH 7.0 η ταχύτητα υδρόλυσης ήταν μεγαλύτερη όταν το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούταν από κιτρικά-φωσφορικά σε σχέση με το ρυθμιστικό διάλυμα που αποτελούταν από Tris-HCl. Αντίστοιχα, στην τιμή pH 9.0 η ταχύτητα υδρόλυσης ήταν μεγαλύτερη όταν το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούνταν από Tris-HCl από ότι όταν το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούταν από Γλυκίνη-NaOH. Παρόμοια εξάρτηση από τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος παρατηρήθηκε στη δραστικότητα μιας εξωκυτταρικής λιπάσης από τον *Streptomyces rimosus* (Abramic et al., 1999), όπου ο ρυθμός υδρόλυσης ήταν μικρότερος στην περίπτωση που το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούταν από ανθρακικό νάτριο σε σχέση με το ρυθμό της υδρόλυσης όταν το ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούταν από Tris-HCl για την ίδια τιμή pH.

Η σχέση pH-ενεργότητας εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

α) η επίδραση του pH στη διαμόρφωση του ενζύμου,

β) η επίδραση του pH στη σύνδεση ενζύμου-συνενζύμου ή προσθετικής ομάδας,

γ) η επίδραση του pH στις ομάδες του υποστρώματος που ιονίζονται

δ) η επίδραση του pH στη σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος και στους καταλυτικούς μηχανισμούς.

Με βάση ορισμένες παραδοχές και με την προϋπόθεση ότι δεν συμβαίνουν αναντίστρεπτες μεταβολές στη δομή του ενζύμου, η ταχύτητα μιας ενζυμικής δράσης σε σταθερή θερμοκρασία, δίνεται από τη σχέση:

$$v = v_{max} \frac{[S]}{Km[1 + \frac{Ka}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{Kb}] + [S]} \quad \text{(Εξ. 9)}$$

όπου

v ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (mmoles απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

v_{max} μέγιστος ρυθμός (ταχύτητα) της ενζυμικής αντίδρασης (mmole απελευθερούμενου προϊόντος/mg πρωτεϊνης/min)

[S] συγκέντρωση υποστρώματος (mM)

K_m σταθερά Michaelis-Menten (mM)

K_a σταθερά διάστασης (mM)

K_b σταθερά διάστασης (mM)

Η Εξίσωση 9 μπορεί να μετασχηματιστεί στην

$$\frac{[H^+]}{v} = \frac{K_m}{[S]K_b v_{max}}[H^+]^2 + \left(\frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{[S]v_{max}}\right)[H^+] + \frac{K_a K_m}{[S]v_{max}} \quad \text{(Εξ. 10)}$$

Η παραπάνω σχέση εκφράζει μια πολυωνυμική συνάρτηση δευτέρου βαθμού της μορφής:

$$y = ax^2 + bx + c$$

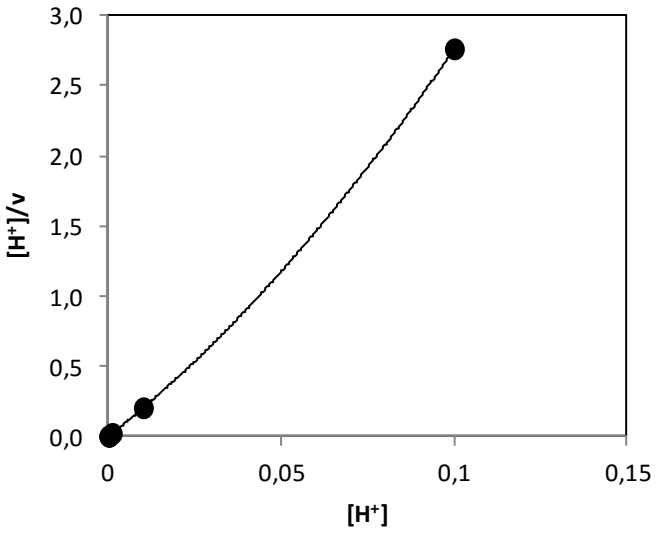
Όπου:

$$\alpha = \frac{K_m}{[S]K_b v_{max}} \quad \text{(Εξ. 11)}$$

$$b = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{[S]v_{max}} \quad \text{(Εξ. 12)}$$

$$c = \frac{K_a K_m}{[S]v_{max}} \quad \text{(Εξ. 13)}$$

Κατασκευάζεται το διάγραμμα συγκέντρωσης υδρογονοκατιότων $[H^+]$ συναρτήσει του λόγου συγκέντρωσης υδρογονοκατιότων ταχύτητας ($[H^+]/v$) (Διάγραμμα 10)



Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση υδρογονοκατιότων [H$^+$] συναρτήσει του λόγου συγκέντρωσης υδρογονοκατιότων ταχύτητας ([H$^+$]/v)

Επομένως, σύμφωνα με τη γραμμή τάσης είναι:

$$\alpha = 81.571$$
$$b = 19{,}416$$
$$c = 4 \cdot 10^{-5}$$

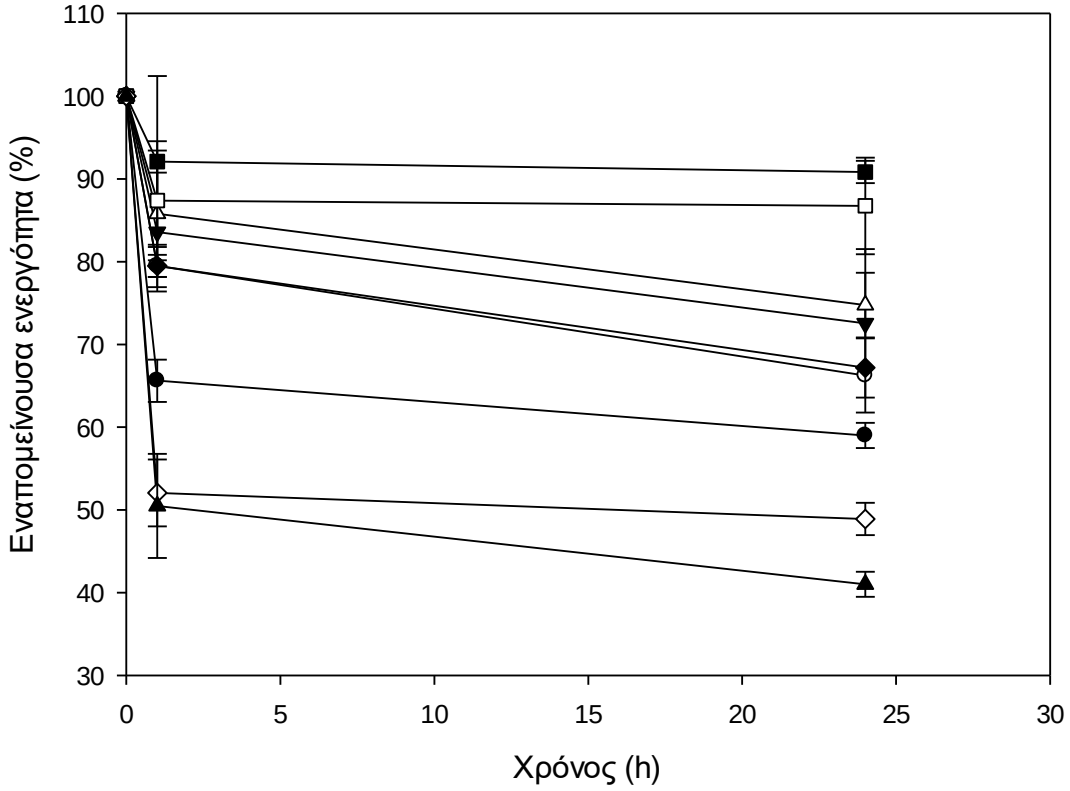
Χρησιμοποιώντας τις τιμές των K_m, v_{max}, που υπολογίστηκαν στην παράγραφο **III.3** και λαμβάνοντας υπόψη ότι η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι [S]= 0.175 mM από τις εξισώσεις 11 και 13 προκύπτει :

$$K_a = \frac{c[S]v_{max}}{K_m} = 2.06 \times 10^{-6}\ mM$$

$$K_b = \frac{K_m}{a[S]v_{max}} = 0.238\ mM$$

III.5. Σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορα pH

Η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος μετά την επώαση του για 1 και 24 ώρες σε θερμοκρασία 4°C σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH 3.0-9.0 παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 11.



Διάγραμμα 11. Ποσοστό εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH: (●) pH 3.0 phosphate-citrate, (○) pH 4.0 phosphate-citrate, (▼) pH 5.0 phosphate-citrate, (△) pH 6.0 phosphate-citrate, (■) pH 7.0 phosphate-citrate, (□)pH 7.0 Tris-HCl, (◆) pH 8.0 Tris-HCl, (◊) pH 9.0 Tris-HCl και (▲) pH 9.0 Glycine-NaOH.

Το ενζυμικό σκεύασμα έδειξε ικανοποιητική σταθερότητα σε ένα ευρύ φάσμα τιμών pH (3.0–9.0). Σε τιμή pH 3.0 το σκεύασμα διατηρεί το 59% της αρχικής του ενεργότητας μετά από 24 ώρες επώασης, ενώ για τιμές pH 4.0, 5.0 και 6.0 διατηρεί το 66.2, 72.6 και 74.8 αντίστοιχα, για τον ίδιο χρόνο επώασης. Υψηλότερη σταθερότητα εμφανίζει το ενζυμικό σκεύασμα σε pH 7.0, (90% της αρχικής του ενεργότητας μετά από 24 ώρες επώασης). Η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος μειώνεται σε υψηλότερες τιμές pH. Ειδικότερα για τιμή pH 9.0 παρατηρείται απώλεια του 59% της αρχικής ενεργότητας του σκευάσματος μετά από 24 ώρες επώασης.

Συγκριτικά με άλλες έρευνες, οι Sharon et al. (1998) και Colla et al. (2014) ανέφεραν ότι οι λιπάσες που παράγονται τους μικροοργανισμούς *P.aeruginosa* KKA-5 και *Aspergillus niger*, ήταν σταθερές σε μια περιοχή pH από 7.0 έως 10.0 για 24 ώρες

στους 30°C και 25°C, αντίστοιχα. Από τη μελέτη των Abramic et al. (1999) σε μία εξωκυτταρική λιπάση από τον *Streptomyces rimosus* βρέθηκε ότι το ένζυμο διατηρεί πάνω από το 80% της αρχικής της ενεργότητας στην περιοχή τιμών pH 6.0-9.0 μετά από 24 ώρες σε θερμοκρασία 23°C, ενώ μία λιπάση από τον *Pseudomonas nitroreducens* (Watanabe et al., 1977) διατηρεί επίσης πάνω από το 80% της αρχικής της ενεργότητας στην περιοχή τιμών pH 5.0-11.0 μετά από 24 ώρες σε θερμοκρασία 5°C. Η λιπάση που προέρχεται από βυθισμένη καλλιέργεια του μικροοργανισμού *Aspergillus flavus* (Colla et al., 2014) διατηρεί το 100% της ενεργότητας της σε τιμές pH 4.0-6.0 μετά από επώαση 24 ώρες σε θερμοκρασία 25°C.

III.6. Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες

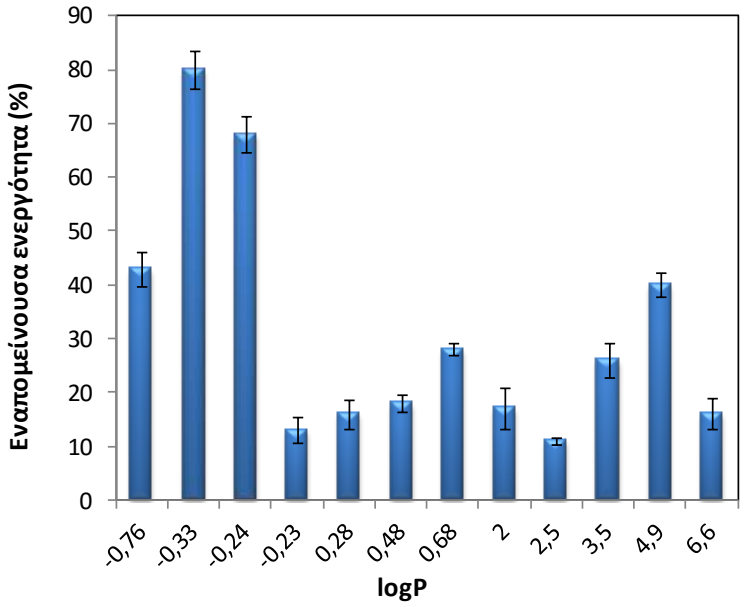
Μελετήθηκε η επίπτωση που έχουν στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος διάφοροι οργανικοί διαλύτες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.

Πίνακας 9. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 6 και 24 ώρες επώασης σε διάφορους οργανικούς διαλύτες

Διαλύτης	logP	D	Εναπομείνουσα ενεργότητα (%) μετά από επώαση		Χρόνος ημιζωής (h)
			6 ωρών	24 ωρών	
Μη πολικοί διαλύτες					
Χλωροφόρμιο	2.0	1,04	33 ± 1,62	17 ± 3,77	3.75
Τολουόλιο	2.5	0,37	13 ± 1,65	11 ± 0,55	2.04
n-Εξάνιο	3,5	0	35 ± 2,52	26 ± 3,32	3.96
n-Οκτάνιο	4,9	0	71 ± 0,65	40 ± 2,21	12.14
Δωδεκάνιο	6,6	0,07	48 ± 3,78	16 ± 2,88	5.67
Πολικοί πρωτικοί διαλύτες					
Μεθανόλη	-0,76	1,7	31 ± 1,36	43 ± 3,28	3.55
Αιθανόλη	-0,24	1,69	55 ± 2,63	68 ± 3,35	6.96
Ισοπροπανόλη	0,28	1,56	44 ± 3,28	16 ± 2,66	5.07
1-Βουτανόλη	0,78	1,66	24 ± 0,55	18 ± 1,65	2.91
Πολικοί απρωτικοί διαλύτες					
Οξικός αιθυλεστέρας	0,68	1,78	32 ± 1,38	28 ± 1,18	3.65
Ακετονιτρίλιο	-0,33	3,92	91 ± 2,63	80 ± 3,54	44.14
Ακετόνη	-0,23	2,88	15 ± 2,74	13 ± 2,47	2.19

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 9 και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Klibanov, 1997), τα περισσότερα ένζυμα είναι λιγότερο δραστικά σε οργανικούς διαλύτες από ότι στο νερό. Συγκεκριμένα, το ενζυμικό σκεύασμα φαίνεται να διατηρεί το 50% της ενεργότητας του όταν επωάζεται σε μεθανόλη, οξικό αιθυλεστέρα, 1-βουτανόλη, τολουόλιο, ακετόνη, ισοπροπανόλη, n-εξάνιο, χλωροφόρμιο. Μελέτες που έχουν γίνει σε λιπάσες από τους *Burkholderia sp.*ZYB002 (Shu et al., 2011) και *Cryptococcus albidus* (Tiwari et al.,2011) δείχνουν παρόμοια μείωση ενεργότητας σε ότι αφορά τη μεθανόλη (36%), την ακετόνη (18%) και το χλωροφόρμιο (36,2%) μετά από επώαση στους αντίστοιχους διαλύτες, ενώ πολύ χαμηλά ποσοστά εναπομείνουσας ενεργότητας σε χλωροφόρμιο (14%) και οξικό αιθυλεστέρα (15%) μετά από 30 λεπτά επώασης εμφανίζει και η λιπάση από τον μικροοργανισμό *Staphylococcus epidermidis* AT2 (Rahman et al, 2010). Μετά από 6 ώρες επώαση σε δωδεκάνιο το ενζυμικό σκεύασμα φαίνεται να διατηρεί το 50% της ενεργότητας του, ενώ μετά από 24 ώρες η εναπομείνουσα ενεργότητα είναι 16% (Πίνακας 9). Το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί την υψηλότερη εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από επώαση σε αιθανόλη (55% στις 6h και 68% στις 24 ώρες), οκτάνιο (71% στις 6h και 40% στις 24 ώρες) και ακετονιτρίλιο (91% στις 6h και 80% στις 24 ώρες) (Πίνακας 9). Σε ότι αφορά την αιθανόλη, η λιπάση από το είδος *Cryptococcus albidus* (Tiwari et al.,2011) διατηρεί συγκρίσιμο ποσοστό ενεργότητας μετά από επώαση 24 ωρών και συγκεκριμένα το 63.9% της αρχικής της ενεργότητας.

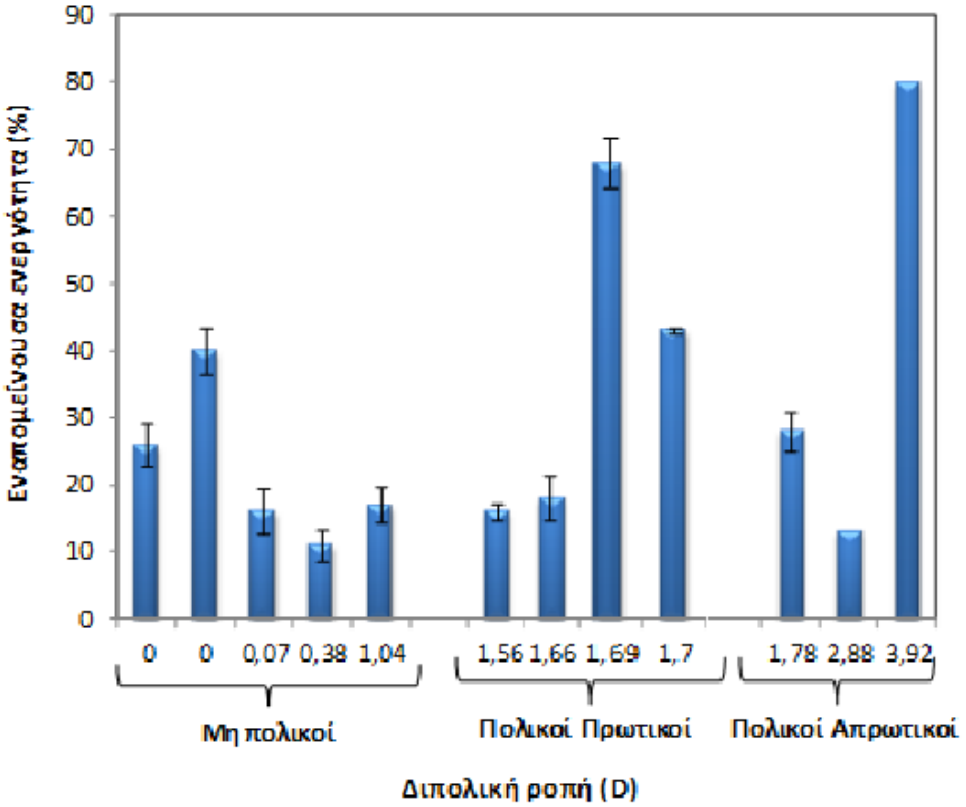
Το Log P, (λογάριθμος του συντελεστής κατανομής P), είναι το μέτρο της υδροφοβικότητας ενός οργανικού διαλύτη. Γενικά, οι υδρόφιλοι (αναμίξιμοι με το νερό) διαλύτες έχουν τιμή Log P μικρότερη του 1.0, ενώ οι υδρόφοβοι (μη αναμίξιμοι με το νερό) διαλύτες εμφανίζουν τιμή Log P μεγαλύτερη του 4.0. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του Log P, τόσο πιο υδρόφοβος είναι ο διαλύτης (Laane, 1987). Η τιμή Log P χρησιμοποιείται για τη συσχέτιση της πολικότητας ενός διαλύτη με τη δραστικότητα και σταθερότητα ενός ενζύμου σε μη υδατικές φάσεις (Lima et al., 2004).



Διάγραμμα 12. Εναπομείνουσα ενεργότητα ενζυμικού σκευάσματος συναρτήσει του logP του διαλύτη. Οι διαλυτες και οι τιμές του logP ήταν: μεθανόλη -0.76, ακετονιτρίλιο -0.33, αιθανόλη -0.24, ακετόνη -0,23, ισοπροπανόλη 0.28, 1-βουτανόλη 0.48, οξικός αιθυλεστέρας 0.68, χλωροφόρμιο 2, τολουόλιο 2.5, n-εξανιο 3.5, n-οκτάνιο 4.9 και δωδεκάνιο 6.6.

Στην παρούσα εργασία, δεν βρέθηκε κάποιου είδους συσχέτιση μεταξύ της σταθερότητας του ενζυμικού σκευάσματος και της τιμής Log P των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν (Διάγραμμα 12). Παρόμοια έλλειψη συσχέτισης έχει αναφερθεί για λιπάσες που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Acinetobacter sp.* SY-01 (Han et al., 2003), *Acinetobacter sp.* RAG-1 (Snellman et al., 2002) και *Rhizopus* sp. (Hernandez-Rodriguez et al., 2009).

Προκειμένου να καθοριστεί μια συσχέτιση μεταξύ του τύπου του διαλύτη και της σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος, οι οργανικοί διαλύτες διατάχθηκαν σύμφωνα με τη διπολική ροπή τους και τις λειτουργικές ομάδες τους (μη πολικοί, πρωτικοί πολικοί και απρωτικοί πολικοί) (Πίνακας 9). Η διπολική ροπή είναι ένα ακόμη μέτρο πολικότητας των οργανικών διαλυτών.



Διάγραμμα 13. Εναπομείνουσα ενεργότητα ενζυμικού σκευάσματος συναρτήσει της διπολικής ροπής του διαλύτη. Οι διαλύτες και οι τιμές της διπολικής ροπής ήταν: n-εξανιο 0, n-οκτάνιο 0, δωδεκάνιο 0.07, τολουόλιο 0.38, χλωροφόρμιο 1.04, ισοπροπανόλη 1.56, βουτανόλη 1.66, αιθανόλη 1.69, μεθανόλη 1.7, οξικός αιθυλεστέρας 1.78, ακετόνη 2.88 και ακετονιτρίλιο 3.92.

Η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος μετά την επώαση αυτού σε μη πολικούς διαλύτες για 24 ώρες δεν ξεπερνά το 40% της αρχικής του ενεργότητας. Σε παρόμοια μελέτη σχετικά με λιπάσες προερχόμενες από τον *Rhizopus* sp. (Hernandez-Rodriguez et al., 2009), οι εναπομείνουσες ενεργότητες μετά από 1 ώρα επώασης σε τολουόλιο και n-εξάνιο σε θερμοκρασία 25°C ήταν από 70-140% της αρχικής τους ενεργότητας. Αυτή η συμπεριφορά αποδόθηκε στο γεγονός ότι οι μη-πολικοί οργανικοί διαλύτες δεν αφαιρούν το στρώμα νερού από την επιφάνεια του ενζύμου. Αντίθετα, οι Sulong et al. (2006) βρήκαν ότι η σχετική ενεργότητα της λιπάσης που παράγεται από το βακτήριο *Bacillus sphaericus* 205Y, μειώθηκε στο 40% μετά από 30 λεπτά επώασης σε τολουόλιο στους 37°C. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι δεν είναι δυνατόν να θεσπιστεί ένας γενικός κανόνας για τη συμπεριφορά των ενζύμων σε μη πολικούς διαλύτες.

Μετά από επώαση 24 ώρες σε πολικούς πρωτικούς διαλύτες, το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί υψηλό ποσοστό εναπομείνουσας ενεργότητας μόνο στην περίπτωση της επώασης σε αιθανόλη. Για τους υπόλοιπους διαλύτες το ποσοστό εναπομείνουσας ενεργότητας είναι 40% και κάτω. Αυτή η υψηλή σχετική ενεργότητα που εμφανίζεται στην αιθανόλη ίσως οφείλεται στην μέτρια ικανότητα των αλκοολών προς σχηματισμό αμιδικών δεσμών υδρογόνου παράλληλα με την υποκατάσταση του νερού από τις ομάδες υδροξυλίου της αλκοόλης (Hernandez-Rodriguez et al., 2009).

Μελέτη που ασχολείται με την επίδραση απρωτικών πολικών διαλυτών (ακετόνη, ακετονιτρίλιο) έδειξε ότι οι περισσότεροι από τους βιοκαταλύτες που δοκιμάστηκαν είχαν υψηλή σχετική ενεργότητα (80-146%) μετά από 1 ώρα επώασης στους 25 ^{o}C. Η αστάθεια των λιπασών σε απρωτικούς πολικούς διαλύτες συχνά συνδέεται με την αφαίρεση του νερού από την επιφάνεια της πρωτεΐνης, με παράλληλη διείσδυση του διαλύτη μέσα στο ένζυμο, οδηγώντας σε ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης και επακόλουθη μετουσίωση αυτής (Azevedo et al., 2001,Wangikar et al., 1997). Υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που δείχνουν τη σταθερότητα των λιπασών σε απρωτικούς πολικούς διαλύτες. Οι Wu et al. (2007), με τη χρήση λιπάσης από τον *Mucor javanicus*, παρατήρησαν υψηλή σταθερότητα και αυξημένη δράση μετά από 2 ώρες επώασης στους 25°C σε ακετονιτρίλιο (85%), οξικό αιθυλεστέρα (168%) και ακετόνη (246%). Στην παρούσα εργασία, το ενζυμικό σκεύασμα παρουσίασε υψηλή εναπομείνουσα ενεργότητα ύστερα από 24 ώρες επώασης μόνο κατά την επώαση σε ακετονιτρίλιο (80%).

III.7. Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας σε μεταλλικά ιόντα

Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων μεταλλικών ιόντων και επιφανειοδραστικών ενώσεων στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

Πίνακας 10. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 30 και 60 λεπτά επώασης σε παρουσία μεταλλικών ιόντων

Μεταλλικό ιόν	30 λεπτά επώαση(%)	1 ώρα επώαση(%)
$CoCl_2$	99,3 ± 4,5	73,0 ± 0,89
$CaCl_2$	84,4 ± 3,14	84,4 ± 4,49
NaCl	85,8 ± 0,89	67,4 ± 0,0
ZnSO4	87,2 ± 1,62	46,8 ± 3,14
KCl	82,3 ± 4,49	85,1 ± 4,04
$MgCl_2$	106,4 ± 4,94	102,1 ± 4,49
$MnCl_2$	168,1 ± 1,8	107,8 ± 1,35
$CuSO_4$	63,1 ± 1,26	25,5 ± 1,8
$FeCl_3$	56,7 ± 1,8	49,6 ± 0,45

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα η ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος αυξάνεται μετά από την επώαση σε $MgCl_2$ και $MnCl_2$. Στο συμπέρασμα αυτό καταλήγουν και οι Suntornsuk et al.(2005) σχετικά με μία κερατινάση η οποία παράγεται από το βακτήριο *Bacillus licheniformis* κατά την οποία αυξάνεται η ενεργότητα του ενζύμου με επώαση αυτού σε 1mM $MgCl_2$ και $MnCl_2$ για 30 λεπτά, συγκεκριμένα 137% και 176% αντίστοιχα. Επώαση σε $CaCl_2$, NaCl, $ZnSO_4$ και KCl για 30 λεπτά οδηγεί στη διατήρηση περίπου του 85% της αρχικής ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος ενώ επώαση σε $CuSO_4$ και $FeCl_3$ έχει ως αποτέλεσμα μείωση άνω του 50% της ενζυμικής ενεργότητας τόσο στα 30 λεπτά επώασης όσο και στη 1 ώρα επώασης.

Πίνακας 11. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 30 και 60 λεπτά επώασης σε παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών

Επιφανειοδραστική ένωση	30 λεπτά επώαση(%)	1 ώρα επώαση(%)
SDS	129,1 ± 4,49	125, 5± 2,7
Tween 80	37,6 ± 1,71	29,1 ± 2,7
Triton X-100	34,0 ± 0,89	30,5 ± 1,36

Η επώαση του ενζυμικού σκευάσματος σε SDS έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της τάξης του 25% της αρχικης ενεργότητας. Μία λιπάση από το *Microbacterium sp.* (Tripathi et al, 2013) έδειξε παρόμοια αποτελέσματα σε ότι αφορά την επώαση του ενζύμου παρουσία της επιφανειοδραστικής ένωσης SDS (101%) για 1 ώρα. Σε ότι αφορά την επώαση σε Tween 80 και Triton X-100, παρατηρείται μείωση άνω του 50% της ενζυμικής ενεργότητας. Από τη βιβλιογραφία βρέθηκε ότι το σύνολο των κυττάρων του *Burkholderia sp. ZYB002* (Shu et al., 2011) λύονται πλήρως παρουσία 10% Triton X-100, ενώ κατά τη συγκέντρωση 0.5% (v/v) και 1% (v/v) Tween 80 προκαλείται επίσης 41.5% και 51.6% απώλεια ενεργότητας, αντίστοιχα.

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

IV.1. Συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη και ο βιοχημικός χαρακτηριμός της λιπολυτικής δράσης των κυτταρικών θραυσμάτων του θαλάσσιου μικροφύκους *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. Η καλλιέργεια του στελέχους πραγματοποιήθηκε σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με πηγή άνθρακα και θρεπτικά συστατικά. Για την παραλαβή των κυττάρων έγινε φυγοκέντρηση και στη συνέχεια ακολούθησε λύση των κυττάρων και ανάκτηση των κυτταρικών θραυσμάτων με τη χρήση συσκευής υπερήχων.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της λιπολυτικής ικανότητας των κυτταρικών θραυσμάτων του μικροοργανισμού μέσω αντίδρασης υδρόλυσης σε θερμοκρασία 30°C, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα διάλυμα παρα-νίτρο-φαίνυλο λαυρικού οξέος. Ακολούθησε η μελέτη θερμοσταθερότητας όπου προέκυψε ότι το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί για πάνω από 8 ώρες επώασης στους 30 ^{o}C το 100% της αρχικής του ενεργότητας. Μετά από επώαση 1 ώρας σε θερμοκρασίες έως 50°C διατηρεί επίσης το 100% της ενεργότητας του (Πίνακας 12). Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, υπολογίστηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υδρόλυσης του παρα-νίτρο-φαίνυλο λαυρικού οξέος η οποία έχει τιμή 70309,84 J/mol αλλά και η μεταβολή της ενθαλπίας και εντροπίας του συστήματος, 70230,10 J/mol και 157,47 J/mol/K, αντίστοιχα. Επιπλέον, το ενζυμικό σκεύασμα φαίνεται να είναι ιδιαίτερα θερμοάντοχο καθώς παρουσιάζει μεγάλους χρόνους ημιζωής.

Συσχετίζοντας, την δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος με τη φύση του υποστρώματος με τη χρήση 6 εστέρων της παρα-νιτροφαινόλης (παρα-νίτρο-φαίνυλο-οξικό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-βουτυρικό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-δεκανοϊκό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ), παρατηρήθηκε ότι αυξανομένου του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας αυξάνεται η δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος.Η μέγιστη ταχύτητα υδρόλυσης εμφανίστηκε στο υπόστρωμα παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ. Εξειδίκευση στο ίδιο υπόστρωμα εμφανίζουν αρκετές λιπάσες από άλλες μελέτες όπως για παράδειγμα οι λιπάσες που προέρχονται από

τους μικροοργανισμούς *Cryptococcus albidus* (Tiwari et al. 2011), *Bacillus stearothermophilus* MC7 (Kambourova et al. 2003) και *Microbacterium sp.* (Tripathi et al. 2014) (Πίνακας 12).

Η εύρεση των κινητικών σταθερών για τα υποστρώματα παρα-νίτρο-φαίνυλο-οκτανοϊκό οξύ, παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της εξειδίκευσης ως προς το υπόστρωμα. Το παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ εμφανίζει τη μεγαλύτερη συγγένεια με το ενζυμικό σκεύασμα, δηλαδή το μικρότερο K_m (K_m=0.051±0.001 mM). Η υπολογισθείσα τιμή του K_m του ενζυμικού σκευάσματος που μελετήθηκε για το υπόστρωμα pNPPalmitate είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες άλλων λιπασών όπως φαίνεται και στον Πίνακας 12. Στην περίπτωση του εστέρα του λαυρικού και παλμιτικού οξέος εμφανίστηκε το φαινόμενο της παρεμπόδισης από το υπόστρωμα. Υπολογίστηκαν, επίσης, τόσο ο μέγιστος ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης (v_{max}) και για τα τρία υποστρώματα όσο και η σταθερά παρεμπόδισης για το παρα-νίτρο-φαίνυλο-λαυρικό οξύ και παρα-νίτρο-φαίνυλο-παλμιτικό οξύ στα οποία εμφανίζεται η παρεμπόδιση.

Όσον αφορά στο pH, το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίστηκε αρκετά σταθερό σε ένα ευρύ φάσμα τιμών και ως άριστη τιμή δράσης ήταν το 7.0. Αρκετές λιπάσες των γενών *Aspergillus niger* (Colla et al. 2014), *Bacillus stearothermophilus* MC7 (Kambourova et al. 2003), *Bacillus coagulants* BTS-3 (Kumar et al. 2005) και *Bacillus sp.*RSJ-1 (Sharma et al. 2001) εμφανίζουν αλκαλοφιλία. Στις τιμές pH 6.0 και 8.0 το ενζυμικό σκεύασμα παρουσιάζει ελάχιστα μικρότερη ταχύτητα υδρόλυσης του υποστρώματος, ενώ σε ακραίες τιμές pH το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει ιδιαίτερα μειωμένη ταχύτητα. Από τη μελέτη της σταθερότητας του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορες τιμές pH προέκυψε ότι σε τιμή pH 3.0 το σκεύασμα διατηρεί το 59% της αρχικής του ενεργότητας μετά από 24 ώρες επώασης, ενώ για τιμές pH 4.0, 5.0 και 6.0 διατηρεί το 66.2, 72.6 και 74.8 αντίστοιχα, για τον ίδιο χρόνο επώασης. Υψηλότερη σταθερότητα εμφανίζει το ενζυμικό σκεύασμα σε pH 7.0, (90% της αρχικής του ενεργότητας μετά από 24 ώρες επώασης). Η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος μειώνεται σε υψηλότερες τιμές pH. Ειδικότερα για τιμή pH

9.0 παρατηρείται απώλεια του 59% της αρχικής ενεργότητας του σκευάσματος μετά από 24 ώρες επώασης.

Το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίστηκε αρκετά σταθερό παρουσία διαφορετικών οργανικών διαλυτών έπειτα από επώαση 6 και 24 ωρών, ενώ σε κάποιους έχασε σχεδόν όλη την ενεργότητα του. Η υψηλότερη εναπομείνουσα ενεργότητα παρατηρήθηκε μετά από επώαση σε αιθανόλη (55% στις 6h και 68% στις 24h), n-οκτάνιο (71% στις 6h και 40% στις 24h) και ακετονιτρίλιο (91% στις 6h και 80% στις 24h). Σε διαλύτες όπως η μεθανόλη, ο οξικός αιθυλεστέρας, η 1-βουτανόλη, το τολουόλιο, η ακετόνη, η ισοπροπανόλη, το n-εξάνιο, χλωροφόρμιο παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της ενζυμικής απενεργοποίησης. Η εναπομείνουσα ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος μετά την επώαση αυτού σε μη πολικούς διαλύτες (χλωροφόρμιο, τολουόλιο, n-εξάνιο, n-οκτάνιο, δωδεκάνιο) για 24 h δεν ξεπερνά το 40% της αρχικής του ενεργότητας. Μετά από επώαση 24 h σε πολικούς πρωτικούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθανόλη, ισοπροπανόλη, 1-βουτανόλη), το ενζυμικό σκεύασμα διατηρεί υψηλό ποσοστό εναπομείνουσας ενεργότητας μόνο στην περίπτωση της επώασης σε αιθανόλη. Στην περίπτωση των πολικών απρωτικών διαλυτών (οξικός αιθυλεστέρας, ακετόνη, ακετολιτρίλιο) το ενζυμικό σκεύασμα παρουσίασε υψηλή εναπομείνουσα ενεργότητα ύστερα από 24 ώρες επώασης μόνο κατά την επώαση σε ακετονιτρίλιο (80%). Πλεονεκτήματα εμφανίζει η παρουσία οργανικών διαλυτών σε συστήματα αντιδράσεων στα οποία συμμετέχουν λιπολυτικά ένζυμα σε σχέση με αυτά που εμπεριέχουν νερό λόγω της αυξημένης διαλυτότητας των υποστρωμάτων, της εύκολης ανάκτησης των προϊόντων και της δυνατότητας σύνθεσης εστερικών δεσμών. Τα συστήματα τα οποία εμφανίζουν σταθερότητα στους οργανικούς διαλύτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις τρανσεστεροποίησης καθώς και στην παραγωγή βιοντήζελ (Zhang et al., 2009).

Σε αρκετες περιπτώσεις η παρουσία συμπαραγόντων στη δράση των λιπασών ενώ δεν είναι αναγκαία, φαίνεται να ενισχύει τη δράση ή τη σταθερότητά τους (Gupta et al., 2004a). Μελετήθηκε η σταθερότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε διάφορα μεταλλικά ιόντα και επιφανειοδραστηκές ενώσεις. Η ενεργότητα του ενζυμικού

σκευάσματος αυξάνεται μετά από επώαση σε $MgCl_2$ και $MnCl_2$. Η επώαση σε $CaCl_2$, NaCl, $ZnSO_4$ και KCl για 30 min οδηγεί στη διατήρηση περίπου του 85% της αρχικής ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος ενώ η επώαση σε $CuSO_4$ και $FeCl_3$ οδηγεί στη μείωση άνω του 50% της ενζυμικής ενεργότητας. Η επώαση του ενζυμικού σκευάσματος σε SDS για 1 ώρα προκάλεσε αύξηση 25% της αρχικης ενεργότητας του ενζυμικού σκευάσματος. Αντίθετα, η επώαση σε Tween 80 και Triton X-100, προκάλεσαι μείωση άνω του 50% της ενζυμικής ενεργότητας.

Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συγκριτικά με άλλες μελέτες τόσο σε μη καθαρά όσο και σε καθαρά ένζυμα.

Πίνακας 12. Βιοχημικές ιδιότητες λιπασών από διάφορους μικροοργανισμούς

	Μικροοργανισμός	Εξειδίκευση υποστρώματος	Km (mM)	$pH_{optimum}$	$T_{stability}$ (^oC)	$pH_{stability}$	Πηγή
Ακατέργαστο ενζυμικό εκχύλισμα (crude enzymes)	*Burkolderia sp.*ZYB002 (whole-cell lipase)	pNP-Decanoate	-	8.0	45-60 (100%, 1h)	3.0-8.5 (>80%, 6h, 28°C)	Shu et al. (2001)
	Rhizopus oryzae (membrane-bound lipase)	Methyl-Palmitate	-	6.0	50 (>90%, 30 min)	4.0-8.0 (>80%, 30 min, 37°C)	Razak. et al. (1999)
	Cryptococcus albidus	pNP-Palmitate	-	6.5	50 (100%, 30 min)	6.0-7.0 (>80%, 30 min, 28°C)	Tiwari et al. (2011)
	Aspergillus flavus (βυθισμένη καλλιέργεια)	-	-	6.0	40-50 (>90%, 7h)	4.0-6.0 (~100%, 24 h, 25°C)	Colla et al. (2014)
	Aspergillus niger (ζύμωση στερεάς κατάστασης)	-	-	7.0	35-40 (>90%, 4 h)	7.0-10.0 (>60%, 24 h, 25°C)	Colla et al. (2014)
	Pseudomonas nitroreducens	-	-	9.5	20-70 (100%, 20 min)	5.0-11.0 (>80%, 24h, 5°C)	Watanabe et al. (1977)
	Pseudomonas fragi	-	-	9.5	20-70 (>90%, 20 min)	5.0-11.0 (>80%, 24h, 5°C)	Watanabe et al. (1977)
	Geotrichum candidum 4013 (cell-bound lipase)	pNP-Palmitate	3.75	8.0	-	-	Brobcova et al. (2010)
	Geotrichum candidum 4013 (extracellular lipase)	pNP-Decanoate	0.406	8.0	-	-	Brobcova et al. (2010)

	Nannochloropsis oceanica (debris)	pNP-Palmitate	0.051	7.0	20-50 (100%, 1 h)	6.0-8.0 (>80%, 1 h, 30°C)	Παρούσα εργασία
Απομονωμένα και χαρακτηρισμένα ένζυμα (pure enzymes)	*Streptomyces rimosus*	pNP-Caprilate	-	9.5	25-40 (100%, 30 min)	6.0-9.0 (>80%, 24 h, 23°C)	Abramic et al. (1999)
	Candida cylindracea	-	-	7.2	15 (100%, 30 h)	2.0-8.5 (>80%, 12 h, 5°C)	Tomizuka et al. (1966)
	Bacillus stearothermophilus MC7	pNP-Palmitate	0.33	7.5-9.0	65-75 (100%, 30 min)	7.5-9.0 (100%, 30 min, 60°C)	Kambourova et al. (2003)
	Pseudomonas fluorescens AK102	Methyl-Palmitate, Methyl-Oleate, pNP-Palmitate	-	9.0-10.0	35-50 (100%, 1 h)	4.0-11.0 (100%, 1 h, 37°C)	Kojima et al. (1994)
	Bacillus coagulants BTS-3	pNP-Palmitate	-	8.5	55 (50%,2 h)	8.5 (100%, 6 h, 55°C)	Kumar et al. (2005)
	Microbacterium sp.	pNP-Palmitate	3.2	8.5	-	-	Tripathi et al. (2014)
	*Bacillus sp.*RSJ-1	pNP-Butyrate	-	8.0	50-60 (>80%, 1.5 h)	8.0 -9.0 (>95%, 1h)	Sharma et al. (2001)

IV.2. Μελλοντικοί στόχοι

Το επόμενο βήμα στη μελέτη του συγκεκριμένου ενζυμικού σκευάσματος θα μπορούσε να είναι η μελέτη των συνθηκών καλλιέργειας οι οποίες οδηγούν στη μέγιστη παραγωγή των διαφόρων ενζυμικών δράσεων. Οι συνθήκες αυτές θα μπορούσαν να είναι:

- Η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών
- Η συγκέντρωση της προστιθέμενης πηγής άνθρακα
- Η ένταση του φωτός
- Η θερμοκρασία

Σε μετέπειτα στάδιο θα ήταν δόκιμο να γίνουν προσπάθειες για:

- Τον καθαρισμό του ενζυμικού σκευάσματος
- Την αποτελεσματική απομόνωση των διαφόρων ενζυμικών δράσεων
- Τον πλήρη χαρακτηρισμό των διαφόρων ενζυμικών δράσεων

V. ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ, ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Πίνακες

Πίνακας 1. Σύγκριση ανοιχτών και κλειστών συστημάτων καλλιέργειας (Pulz , 2001) 19

Πίνακας 2. Σχετική αναλογία (%) για κάθε ένα από τα κύρια καροτενοειδή επί του συνόλου των περιεχόμενων καροτενοειδών. Περιεκτικότητα χλωροφύλλης ανά κύτταρο, και αναλογία (ολικών καροτενοειδών / χλωροφύλλη), σε διάφορα στελέχη *Nannochloropsis* μετά από 10 και 20 ημέρες ανάπτυξης τη καλλιέργειας (Lubian et al., 2000) 22

Πίνακας 3. Ποσοστιαία σύνθεση των κατηγοριών των λιπιδίων προσδιορισμένη μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας- ανίχνευση φλόγας ιονισμού. (Volkman et al., 1989) 23

Πίνακας 4. Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος pNPL (pH 7.0) 57

Πίνακας 5. Σταθερές απενεργοποίησης του ενζυμικού σκευάσματος 64

Πίνακας 6. Χρόνοι ημιζωής του ενζυμικού σκευάσματος 66

Πίνακας 7. Ταχύτητες υδρόλυσης υποστρωμάτων. 69

Πίνακας 8. Κινητικές σταθερές του ενζυμικού σκευάσματος 76

Πίνακας 9. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 6 και 24 ώρες επώασης σε διάφορους οργανικούς διαλύτες 83

Πίνακας 10. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 30 και 60 λεπτά επώασης σε παρουσία μεταλλικών ιόντων 88

Πίνακας 11. Εναπομείνουσα ενεργότητα μετά από 30 και 60 λεπτά επώασης σε παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών 88

Πίνακας 12. Βιοχημικές ιδιότητες λιπασών από διάφορους μικροοργανισμούς 95

Εικόνες

Εικόνα 1. Αντιπροσωπευτική εικόνα ενός κυττάρου του *Nannochloropsis*. (Hoek et al., 1995) 11

Εικόνα 2. Φυλογενετικό δέντρο σύμφωνα με τις 18s rRNA ακολουθίες των ειδών *Nannochloropsis*. Ως εξωτερική ομάδα χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Eustigmatos vischeri*. Οι ετικέτες αναφέρονται στους αριθμούς αναγνώρισης των στελεχών από τις

αντίστοιχες συλλογές καλλιεργειών (Vieler et al., 2012). Το υπογραμμισμένο στέλεχος είναι εκείνο που μελετάται στην παρούσα εργασία. 12

Εικόνα 3. Σωληνωτοί Φωτοβιοαντιδραστήρες (http://www.et.byu.edu.html) 17

Εικόνα 4. Κάτοψη ενός ανοιχτού συστήματος. Τα μικροφύκη εισάγονται μετά τη φτερωτή, και ολοκληρώνουν έναν κύκλο, ενώ το σύστημα είναι μηχανικά αεριζόμενο με CO_2. Η συγκομιδή γίνεται πριν από την φτερωτή για να ξεκινήσει και πάλι ο κύκλος (Liam et al., 2009). 18

Εικόνα 5. Επιμήκεις λεκάνες (https://roboplant.wordpress.com) 18

Εικόνα 6. Προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας από μικροάλγη (http://www.iiasa.ac.at) 21

Εικόνα 7. Εφαρμογές μικροφυκών-Συμπληρώματα διατροφής 26

Εικόνα 8. Διεργασίες μετατροπής για την παραγωγή βιοκαυσίμων από τη βιομάζα μικροφυκών (Dragone et al.,2010). 29

Εικόνα 9. Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες (Reis et al, 2008). 35

Εικόνα 10. Η καταλυτική δράση των λιπασών. Ένα τριγλυκεριδίο μπορεί να υδρολυθεί για να σχηματίσει γλυκερίνη και λιπαρά οξέα, ή η αντίστροφη (σύνθεση) αντίδραση μπορεί να συνδυάσει τη γλυκερόλη και τα λιπαρά οξέα για να σχηματίσει ένα τριγλυκεριδίο (Jaeger al., 1998). 36

Εικόνα 11. Ανακαλλιέργειες στελέχους *Nannochloropsis oceanica* 47

Εικόνα 12. Ειδικά διαμορφωμένο αποστειρωμένο περιβάλλον 48

Εικόνα 13. Καλλιεργεια *Nannochloropsis oceanica* 1L, $14^{η}$ ημέρα. 49

Εικόνα 14. Καλλιέργειες του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* σε κωνικές φιάλες σε επωαστήρα 49

Εικόνα 15. Φασματοφωτόμετρο S-20 UV/VIS Spectrophotometer 50

Εικόνα 16. Συσκευή λυοφιλίωσης και θάλαμος κενού της συσκευής 51

Εικόνα 17. Συσκευή παραγωγής υπερήχων 52

Εικόνα 18. Δείγμα τοποθετημένο σε πάγο στη συσκευή υπερήχων 53

Εικόνα 19. Προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Lowry 54

Εικόνα 20. Αντίδραση υδρόλυσης pNPL καταλυόμενη από λιπάση 56

Εικόνα 21. Microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices) 57

Εικόνα 22. Δομές pNP-υποστρωμάτων 68

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1. Εναπομείνουσα ενζυμική ενεργότητα συναρτήσει του χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες. Σύμβολα: (●) 40 ^{o}C, (○) 50 ^{o}C, (▲) 60 ^{o}C, (△) 70 ^{o}C, (▼) 80 ^{o}C και (◆) 90 ^{o}C. 62

Διάγραμμα 2. Φυσικός λογάριθμος εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης σε διάφορες θερμοκρασίες. Σύμβολα: (●) 40 ^{o}C, (○) 50 ^{o}C, (▲) 60 ^{o}C, (△) 70 ^{o}C, (▼) 80 ^{o}C και (◆) 90 ^{o}C. 64

Διάγραμμα 3. Προσαρμογή της εξίσωσης Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης 65

Διάγραμμα 4. logP συναρτήσει του αντιστρόφου της θερμοκρασίας 67

Διάγραμμα 5. Ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος σε υποστρώματα με διαφορετικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας. 69

Διάγραμμα 6. Διάγραμματα Michaelis-Menten: μεταβολή της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) pNPOctanoate, (β) pNPPalmitate και (γ) pNPLaurate. 73

Διάγραμμα 7. Διάγραμματα Lineweaver-Burk: μεταβολή του αντιστρόφου της ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει του αντιστρόφου της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) pNPOctanoate, (β) pNPPalmitate και (γ) pNPLaurate. 74

Διάγραμμα 8. Προσαρμογή της εξίσωσης ? στα δεδομένα μεταβολής ταχύτητας παραγωγής προϊόντος συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος (α) pNPPalmitate και (β) pNPLaurate. 75

Διάγραμμα 9. Επίδραση του pH στη δραστικότητα του ενζυμικού σκευάσματος 77

Διάγραμμα 10. Συγκέντρωση υδρογονοκατιότων $[H^+]$ συναρτήσει του λόγου συγκέντρωσης υδρογονοκατιότων ταχύτητας ($[H^+]/v$) 80

Διάγραμμα 11. Ποσοστό εναπομείνουσας ενζυμικής ενεργότητας συναρτήσει του χρόνου επώασης σε ρυθμιστικά διαλύματα με τιμές pH: (●) pH 3.0 phosphate-citrate, (○) pH 4.0 phosphate-citrate, (▼) pH 5.0 phosphate-citrate, (△) pH 6.0 phosphate-citrate, (■) pH 7.0 phosphate-citrate, (□)pH 7.0 Tris-HCl, (◆) pH 8.0 Tris-HCl, (◊) pH 9.0 Tris-HCl και (▲) pH 9.0 Glycine-NaOH. 81

Διάγραμμα 12. Εναπομείνουσα ενεργότητα ενζυμικού σκευάσματος συναρτήσει του logP του διαλύτη. Οι διαλυτες και οι τιμές του logP ήταν: μεθανόλη -0.76, ακετονιτρίλιο -0.33, αιθανόλη -0.24, ακετόνη -0,23, ισοπροπανόλη 0.28, 1-βουτανόλη 0.48, οξικός αιθυλεστέρας 0.68, χλωροφόρμιο 2, τολουόλιο 2.5, n-εξανιο 3.5, n-οκτάνιο 4.9 και δωδεκάνιο 6.6. 85

Διάγραμμα 13. Εναπομείνουσα ενεργότητα ενζυμικού σκευάσματος συναρτήσει της διπολικής ροπής του διαλύτη. Οι διαλύτες και οι τιμές της διπολικής ροπής ήταν: n-εξανιο 0, n-οκτάνιο 0, δωδεκάνιο 0.07, τολουόλιο 0.38, χλωροφόρμιο 1.04, ισοπροπανόλη 1.56, βουτανόλη 1.66, αιθανόλη 1.69, μεθανόλη 1.7, οξικός αιθυλεστέρας 1.78, ακετόνη 2.88 και ακετονιτρίλιο 3.92. 86

VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abramic Marija, Lescic Ivana, Korica Tamara, Vitale Ljubinka, Saenger Wolfram, Pigac Jasenka, (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus,* Enzyme and Microbial Technology, 25:522–529

Azevedo A.M., Prazeres D.M.F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P., (2001). Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous–organic solvents mixtures,
Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 15 : 147–153.

Barros M., Fleuri L. F. and Macedo G. A., (2010). SEED LIPASES: SOURCES, APPLICATIONS AND PROPERTIES – A REVIEW, Brazilian Journal of Chemica Engineering, Vol. 27, No. 01, pp. 15 – 29

Bongiovani Natalia, Sanchez-Puerta M. Virginia, Popovich Cecilia and Leonardi Patricia, (2014). Molecular and phylogenetic identification of an oilproducing strain of *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) isolated from the southwestern Atlantic coast (Argentina), Revista de Biología Marina y Oceanografía, Vol. 49, Nº3: 615-623

Borowitzka M.A., (2013). High-value products from microalgae – their development and commercialization, J Appl Phycol, 25:743–756

Brabcova Jana, Zarevucka Marie and Mackova Martina, (2010). Differences in hydrolytic abilities of two crude lipases from *Geotrichum candidum* 4013, *Yeast* , 27: 1029–1038

Brennan Liam, Owende Philip, (2010). Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, Renewable and Sustainable Energy Reviews 14: 557–577

Cadoret Jean-Paul, Garnier Matthieu, Saint-Jean Bruno, (2012). Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology, Advances in Botanical Research, Volume 64, Pages 285–341

Carlsson Anders S, Beilen Jan B van , Möller Ralf, Clayton David, (2007). Micro- and Macro-Algae: utility for industrial applications, Outputs from the EPOBIO project

Carrero A., Vicente G., Rodriguez R., Linares M., G.L. del Peso, (2011). Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from Nannochloropsis microalga oil. Catalysis Today 167: 148–153

Chacon-Lee T.L. and Gonzalez-Marino G.E., (2010). Microalgae for “Healthy” Foods Possibilities and Challenges, ComprehensiveReviews inFoodScienceandFoodSafety, Vol.9

Cohen Zvi, (1999). Chemicals from Microalgae, CRC Press

Diaz J. C. M., Rodriguez J. A., Roussos S.et al., (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, no. 5, pp. 1042–1050

Dragone Giuliano, Fernandes Bruno, Vicente António A., and Teixeira José A., (2010). Third generation biofuels from microalgae, Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology

Ferrato F., Carriere F., Sarda L., Verger R., (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. See Ref. 122. pp. 327-347

Guedes A. Catarina, Amaro Helena M., Malcata F. Xavier, (2011). Microalgae As Sources of High Added-Value Compounds—A Brief Review of Recent Work. Biotechnol. Prog., 2011, Vol. 27, No. 3

Han S., Back J., Yoon M., Shin P., Cheong C., Sung M., Hong S., Chung I., Han Y., (2003). Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter species* SY-01, Biochimie, 85:501–510

Hernandez-Rodriguez Blanca, Cordova Jesus, Barzana Eduardo, Favela-Torres Ernesto, (2009). Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 61: 136–142

Gupta N., Mehra G. and Gupta R., (2004). A glycerol-inducible thermostable lipase from Bacillus sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology, Canadian Journal of Microbiology 50(5): 361-368

Gupta R., Gupta N., Rathi P., (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, Appl Microbiol Biotechnol, 64: 763–781

Hirata T., Tanaka M., Ooike M., Tsunomura T., Sakaguchi M., (2000), Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from S. platensis. J Appl Phycol 12:435–439

Hibberd D.J., (1981). Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae), Botanical Journal of the Linnean Society 82: 93-119

Hoek C., Mann D. & Jahns H. M., (1995). Heterokontophyta: Class Eystigmatophyceae. G. Thieme, *Algae: An Introduction to Phycology.* Cambridge: Cambridge University Press

Imamura, S., and Kitaure, S., (2000). Purification and characterization of a monoacylglycerol lipase from the moderately thermophilic *Bacillus* sp. H-257. *Journal of Biochemistry*, 127: 419-425

Ishige Takeru, Honda Kohsuke and Shimizu Sakayu, (2005). Whole organism biocatalysis, Current Opinion in Chemical Biology, 9:174–180

Jaeger Karl-Erich and Reetz Manfred T., (1998). Microbial lipases form versatile tools for Biotechnology, Trends in Biothechnol, Vol 16

Jensen, R. G., 1983. Detection and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. *Lipids* 18:650–657

Jo Min Jin and Hur Sung Bum, (2015). Growth and Nutritional Composition of Eustigmatophyceae Monodus subterraneus and Nannochloropsis oceanica in Autotrophic and Mixotrophic Culture, Ocean and Polar Research, Vol. 37(1):61-71

Jorquera Orlando, Kiperstok Asher, Sales Emerson A., Embiruŋu Marcelo, Ghirardi Maria L., (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors, Bioresource Technology 101: 1406–1413

Juraj Svitel, Jan Tkac, Igor Vostiar, Marian Navratil, Vladimır Stefuca, Marek Bucko and Peter Gemeiner, (2006). Gluconobacter in biosensors: applications of whole cells and enzymes isolated from gluconobacter and acetobacter to biosensor construction, Biotechnol Lett, 28:2003–2010

Kambourova M., Kirilova N., Mandeva R., Derekova A., (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC *7,* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 22: 307-313

Karlson B, D Potter, M Kuylenstierna & R Andersen. 1996. Ultrastructure, pigment composition, and 18S rRNA gene sequence for *Nannochloropsis granulata* sp. nov. (Monodopsidaceae, Eustigmatophyceae), a marine ultraplankter isolated from the Skagerrak, northeast Atlantic Ocean. Phycologia 35: 253-260

Kim HK, Park SY, Lee JK, Oh TK. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. Biosci Biotechnol Biochem 1998;62:66–71

Klibanov A.M., (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, Trends in Biothechnol, 15: 97-101

Krienitz L, D Hepperle, HB Stich & W Weiler. 2000. *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae), a new species of picoplankton from freshwater. Phycologia 39: 219-227

Kumar Satyendra, Kikon Khyodano, Upadhyay Ashutosh, Kanwar Shamsher S., Gupta Reena, (2005). Production, puriWcation, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3, Protein Expression and PuriWcation, 41:38–44

Laane C. (1987). Medium-Engineering For Bio-Organic Synthesis, Biocatalysis 1:17–22

Li Yanqun, Horsman Mark, Wu Nan, Q. Lan Christopher, Dubois-Calero Nathalie,(2008). Biofuels from Microalgae, ARTICLES: BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN, Biotechnol. Prog., 24, 815-820

Lima V.M., Krieger N., Mitchell D.A., Fontana J., (2004). Activity and stability of a crude lipase from Penicillium aurantiogriseum in aqueous media and organic solvents, Biochem. Eng. J., 18: 65–71

Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Appl Environ Microbiol 1996;62:1093–5

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem 193(1): 265-275

Lubian L. 1982. *Nannochloropsis gaditana* sp. nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. Lazaroa 4: 287-293

Lubian Luis M., Montero Olimpio , Moreno-Garrido Ignacio, Huertas I. Emma, Sobrino Cristina, Gonz´alez-del Valle Manuel, Pares Griselda (2000). Nannochloropsis (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments, *Journal of Applied Phycology* 12:249-255

Luciane Maria Colla, Aline M.M. Ficanha, Juliana Rizzardi, Telma Elita Bertolin, Christian Oliveira Reinehr and Jorge Alberto Vieira Costa, (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of *Aspergillus* through Solid-State and Submerged Fermentation, Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Article ID 725959, 9 pages

Macrae A.R., (1983). Extracellular microbial lipases. In Microbial Enzymes and Technology (W. M. Fogarty. Ed.), Applied Science, pp. 225-250

Macrae A.R. & Hammond R. C., (1985). Present and Future Applications of Lipases. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3:1, 193-218

Maldonado R. R., *Production, purification and characterization of lipase of Geotrichum candidumobtained from industrialmedia [dissertation]*, Universidade Estadual de Campinas—Unicamp, Campinas, Brazil, 2006

Mata M. Teresa, António A. Martins, Nidia. S. Caetano (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, Renewable and Sustainable Energy Reviews**,** Volume 14, Issue 1, Pages 217–232

Nakao Masahiro, Sumida Motoo, Katano Kenji and Fukami Harukazu, (2008). Enzymatic Synthesis of Astaxanthin n-Octanoic Acid Esters, Journal of Oleo Science, 57, (7) 371-374

Nobuhiro Watanabe, Yasuhide Ota, Yasuji Minoda & Koichi Yamada, (1977). Isolation and Identification of Alkaline Lipase Producing Microorganisms, Cultural Conditions and Some Properties of Crude Enzymes, Agricultural and Biological Chemistry, 41:8, 1353-1358

Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., and Ishikawa, H., (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (5): 451-457

Panke Sven, De Lorenzo Victor, Kaiser Arne, Witholt Bernard and Wubbolts Marcel, (1999). Engineering of a Stable Whole-Cell Biocatalyst Capable of (*S*)-Styrene Oxide Formation for Continuous Two-Liquid-Phase Applications, APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, p. 5619–5623, Vol. 65, No. 12

Piorreck Margret, Baasch Klaus-Hinnerk and Pohl Peter, (1984). BIOMASS PRODUCTION, TOTAL PROTEIN, CHLOROPHYLLS, LIPIDS AND FATTY ACIDS OF FRESHWATER GREEN AND BLUE-GREEN ALGAE UNDER DIFFERENT NITROGEN REGIMES, *Phyrochemisrry, Vol. 23, No. 2, pp. 207-216*

Prakash Tiwari, Mukesh K. Upadhyay, Nipun Silawat and H. N. Verma, (2011). Optimization and characterization of a thermo tolerant lipase from *Cryptococcus albidus,* Der Pharma Chemica, 3 (4):501-508

Pulz Otto, (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms, Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 57, Issue 3, pp 287–293

Pulz Otto, Gross Wolfgang, (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae, Appl Microbiol Biotechnol, 65: 635–648

Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Nor Hafizah Ahmad Kamarudin, Jalimah Yunus, Abu Bakar Salleh and Mahiran Basri, (2010). Expression of an Organic Solvent Stable Lipase from *Staphylococcus epidermidis* AT2, International Journal of Molecular Sciences, 11, 3195-3208

Razak C.N.A., Musani R., Basri M., and Salleh A.B., (1999). Characterization of Membrane-Bound Lipase from a Thermophilic *Rhizopus oryzae* Isolated from Palm Oil Mill Effluent, no. J8834, *JAOCS 76:*171–174

Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R., (2009). Lipases at interfaces: A review, Advances in Colloid and Interface Science 147–148, 237–250

Richmond A. (2004). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Science Ltd

Tomizuka Noboru, Ota Yasuhide & Yamada Koichi, (1966). Studies on Lipase from Candida cylindracea, Agricultural and Biological Chemistry, 30:6, 576-584

Tripathi Ritu, Singh Jyoti, Bharti Randhir Kumar, Thakur Indu Shekhar, (2014). Isolation, Purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production, Energy Procedia 54, 518 – 529

Segel I.H., (1975). Enzyme kinetics: Behaviour and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. Wiley Interscience publications

Sigurgisladottir S., Konraosdottir M., Jonsson A., Kristjansson J., and Matthiasson E. 1993. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Biotechnology Letters,* 15: 361-366

Sharma R., Soni S.K., Vohra R.M., Gupta L.K., Gupta J.K., (2002). Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1, Process Biochemistry 37: 1075–1084

Sharon C, Furugoh S, Yamakido T, Ogawa H, Kato Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. J Ind Microbiol Biotechnol 1998;20:304–7

Snellman E., Sullivan E., Colwell R., (2002). Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of Acinetobacter sp. RAG-1, Eur. J. Biochem., 269: 5771–5779.

Suda S, M Atsumi & H Miyashita. 2002. Taxonomic characterization of a marine *Nannochloropsis* species, *N. oceanica* sp. nov. (Eustigmatophyceae). Phycologia 41: 273-279

Sulong M.R., Abd Rahman R.N.Z.R., Salleh A.B., Basri M., (2006). A novel organic solvent tolerant lipase from Bacillus sphaericus 205y: extracellular expression of a novel OST-lipase gene**,** Protein Expr. Purif. 49(2):190–195.

Sun G.J, Guo T., Chen Y., Xu B., Guo J.H, Zhao G.N, (2013). Significant pathways detection in Osteoporosis based on the bibliometric network, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 17: 1-7

Suntornsuk Worapot, Tongjun Junthip, Onnim Poranee, Oyama Hiroshi, Ratanakanokchai Kanok, Kusamran Thanit and Oda Kohei, (2005). Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium, World Journal of Microbiology & Biotechnology , 21: 1111–1117

Vakhlu J. and Kour, A., (2006). Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Vol.9 No.1

Vieler Astrid, Guangxi Wu, Chia-Hong Tsai, Blair Bullard, Adam J. Cornish, Christopher Harvey, Ida-Barbara Reca, Chelsea Thornburg, Rujira Achawanantakun, Christopher J. Buehl, Michael S. Campbell, David Cavalier, Kevin L. Childs, Teresa J. Clark, Rahul Deshpande, Erika Erickson, Ann Armenia Ferguson, Witawas Handee, Que Kong, Xiaobo Li, Bensheng Liu, Steven Lundback, Cheng Peng, Rebecca L. Roston, Sanjaya, Jeffrey P. Simpson, Allan TerBush, Jaruswan Warakanont, Simone Zauner, Eva M. Farre, Eric L. Hegg, Ning Jiang1, Min-Hao Kuo, Yan Lu, Krishna K. Niyogi, John Ohlrogge, Katherine W. Osteryoung, Yair Shachar-Hill, Barbara B. Sears, Yanni Sun, Hideki Takahashi, Mark Yandell, Shin-Han Shiu, Christoph Benning (2012). Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga Nannochloropsis oceanica CCMP1779, *Journal Plos Genetics* 8:1-25

Volkman J. K., Jeffrey S. W., Nichols P. D., Rogers G. I. and Garland C. D., (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture, *J. Exp. Mur. Bioi. Ecol., Vol. 128,* pp. 219-240

Wang Dongmei, Xu Yan, Teng Yun, (2007). Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from Rhizopus chinensis by pretreatment with isooctane, Bioprocess and Biosystems Engineering, Volume 30, Issue 3, pp 147–155

Wang Dongmei, Kang Ning, Jing Li, Jianqiang Hu, Danxiang Han, Hui Wang, Xiaowei Zeng, Xiaoyan Jing, Qian Zhou, Xiaoquan Su, Xingzhi Chang, Anhui Wang, Wei Wang, Jing Jia, Li Wei, Yi Xin, Yinghe Qiao, Ranran Huang, Jie Chen, Bo Han, Kangsup Yoon, Russell T. Hill, Yonathan Zohar, Feng Chen, Qiang Hu, Xu Jian, (2014). Nannochloropsis Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits, Journal Plos Genetics

Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY, (1995). Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). J Ferment Bioeng, 79:433–8

Wangikar P.P., Michels P.C., Clark D.S., Dordick J.S., (1997). Structure and Function of Subtilisin BPN' Solubilized in Organic Solvents, J. Am. Chem. Soc. 119: 70–76

Ward O.P, Singh A, (2005). Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production, Process Biochemistry 40: 3627-3652

Wei Li, Xin Yi, Wang Dongmei, Jing Xiaoyan, Zhou Qian, Su Xiaoquan, Jia Jing, Ning Kang, Chen Feng, Hu Qiang and Xu Jian, (2013). Nannochloropsis plastid and mitochondrial phylogenomes reveal organelle diversification mechanism and intragenus phylotyping strategy in microalgae, BMC Genomics 2013, 14:534

Weingand-Ziadé Alexandra, Gerber-Décombaz Christiane, Affolter Michael, (2003). Functional characterization of a salt- and thermotolerant glutaminase from *Lactobacillus rhamnosus,* Enzyme and Microbial Technology, 32:862–867

Woltinger Jens, Karau Andreas, Leuchtenberger Wolfgang, Drauz Karlheinz, (2005). Membrane Reactors at Degussa, Adv. Biochem Engin/Biotechnol, 92: 289-316

Wong Chi-Huey, Whitesides G. M., (1994). Enzymes in Synthetic Organic Chemistry, Elsevier Science Ltd

Wouter A Duetz, Jan B van Beilen and Bernard Witholt, (2001). Using proteins in their natural environment: potential and limitations of microbial whole-cell hydroxylations in applied biocatalysis, Current Opinion in Biotechnology, 12:419–425

Wu J.C., Lee S.S., Mahmood M.M.B., Chow Y., Talukder M.M.R., Choi W.J., (2007). Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization**,** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 45: 108–112

Yuzo Kojima, Masaaki Yokoe & Tamio Mase, (1994). Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from Pseudomonas fluorescens AK102, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58:9, 1564-1568

Zhang A., Gao R., Diao N., Xie G., Gao G. and Cao S., (2009). Cloning, expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from Pseudomonas fluorescens JCM5963, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 56(2–3): 78-84

Zheng-Yu Shu , Ji-Guang Wu, Lan-Xing Cheng, De Chen, Yong-Mei Jiang, Xin Li, Jian-Zhong Huang, (2011). Production and Characteristics of the Whole-Cell Lipase from Organic Solvent Tolerant Burkholderia sp. ZYB002, Appl Biochem Biotechnol, 166:536–548

Δίκαιος Ιωάννης Α., (2012). ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΔΥΟ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ (ΚΑΡΒΟΞΥΛΕΣΤΕΡΑΣΗ ΚΑΙ ΦΩΣΦΟΛΙΠΑΣΗ D) ΣΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *THERMUS THERMOPHILUS,* Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Πετρούτσος Δημήτρης, (2007). Αποτοξικοποίηση χλωροφαινολών από το θαλάσσιο μικροφύκος *Tetraselmis marina,* Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Διδακτορική διατριβή

Χριστακόπουλος Π., Τόπακας Ε., (2013). Βιοτεχνολογία Παραγωγής Βιοκαυσίμων, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας IV, Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, σελ. 105-118

http://www.et.byu.edu.html

https://roboplant.wordpress.com

http://www.iiasa.ac.at