



**Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο**

Σχολή Χημικών Μηχανικών

Τομέας IV : Σύνθεσης & Ανάπτυξης Βιομηχανικών Διαδικασιών

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας

Διπλωματική Εργασία

**Μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς κυτταρικών  
μεμβρανών *Nannochloropsis* σε αντιδράσεις  
εστεροποίησης**



**Κοτίδης Παύλος**

Επιβλέπων Καθηγητής : Κέκος Δημήτριος

ΑΘΗΝΑ 2016



*Στα παιδιά που δεν μπορούν να χαμογελάσουν*





## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κέκου Δημήτριου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο της διπλωματικής μου εργασίας, Καθηγητή κ. Κέκο Δημήτρη, για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε όλη τη διάρκεια. Επίσης, ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Κολίση Φραγκίσκο για την εποπτεία, το ενδιαφέρον και τις πολύ χρήσιμες συμβουλές.

Θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου φυσικά στην υποψήφια διδάκτορα και φίλη, Μαρία Σαββίδου, για όλη την βοήθεια και την καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας. Σημαντική συμβολή στον σχεδιασμό των πειραμάτων είχαν η κα. Μαμμά Μίκυ και κα. Λυμπεροπούλου Βέρα. Και οι δύο μου προσέφεραν απεριόριστη βοήθεια σε ό,τι τους ζήτησα.

Δεν μπορώ να παραλείψω σαφώς όλους τους υποψήφιους διδάκτορες και τους συμφοιτητές μου, που περάσαμε μαζί σχεδόν κάθε μέρα του τελευταίου ακαδημαϊκού έτους, για το ευχάριστο κλίμα, τις επιστημονικές συμβουλές και τις αμέτρητες συζητήσεις.

Σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου όμως, υπήρξαν κάποιοι άνθρωποι που με στήριξαν και με ενέπνευσαν όσο κανείς. Ευχαριστώ όλους μου τους φίλους για τη στήριξη και την αγάπη τους. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Μαρία, που υπέμεινε το δύσκολο πρόγραμμα που μου επέβαλαν οι σπουδές μου.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου και την οικογένειά μου που πάντα με στήριξαν και με συμβούλευαν με μοναδικό κριτήριο την ευτυχία μου. Είμαι σίγουρος πως θα είναι μαζί μου σε ό,τι και αν αποφασίσω.

Πάυλος Κοτίδης

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2016



## Πίνακας Περιεχομένων

### Ευχαριστίες

Περίληψη..... I

Abstract..... III

### ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος

1.1	Μικροφύκη.....	3
1.1.1	Γενικά χαρακτηριστικά.....	3
1.1.2	Κατηγορίες φυκών.....	4
1.1.3	Πλεονεκτήματα χρήσης μικροφυκών.....	8
1.1.4	Προϊόντα από τα μικροφύκη.....	8
1.1.4.1	Λιπαρά οξέα.....	8
1.1.4.2	Πολυσακχαρίτες.....	10
1.1.4.3	Πρωτεΐνες και ένζυμα.....	10
1.1.4.4	Καροτενοειδή.....	11
1.1.4.5	Φυκομπιλίνες.....	12
1.1.4.6	Γλυκερόλη.....	13
1.1.4.7	Βιταμίνες.....	13
1.1.4.8	Πολυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες-Βιοπλαστικά.....	14
1.1.4.9	Παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη.....	15
1.1.5	Το γένος <i>Nannochloropsis</i> .....	17
1.1.5.1	Γενικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού <i>Nannochloropsis</i> .....	17
1.1.5.2	Κατηγοριοποίηση του μικροοργανισμού <i>Nannochloropsis</i> .....	18
1.1.5.3	Γονιδίωμα του μικροοργανισμού <i>Nannochloropsis</i> .....	18
1.2	Καλλιέργεια μικροφυκών.....	20
1.2.1	Συνθήκες ανάπτυξης και απαιτήσεις σε θρεπτικά μέσα.....	20
1.2.1.1	Θερμοκρασία.....	20
1.2.1.2	Θρεπτικά συστατικά.....	20
1.2.1.3	Αλατότητα.....	21
1.2.1.4	Φωτισμός καλλιέργειας.....	22
1.2.1.5	pH.....	22
1.2.1.6	Ανάδευση.....	22

1.2.2	Συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών .....	23
1.2.2.1	Ανοιχτές δεξαμενές .....	23
1.2.2.2	Κλειστά συστήματα-Φωτοβιοαντιδραστήρες .....	24
1.2.3	Μέθοδοι ελέγχου της ανάπτυξης των μικροφυκών .....	28
1.3	Κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα .....	29
1.3.1	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κατάλυσης σε μη συμβατικά συστήματα .....	30
1.3.2	Διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε μη συμβατικά συστήματα .....	31
1.3.2.1	Οργανικοί διαλύτες .....	31
1.3.2.2	Υπερκρίσιμα ρευστά .....	31
1.3.2.3	Ιοντικά υγρά .....	32
1.3.3	Ένζυμα που είναι σταθερά σε μη-υδατικούς διαλύτες .....	32
1.3.4	Ακίνητοποίηση ενζύμων .....	33
1.3.4.1	Μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμου .....	33
1.3.4.2	Ένζυμα ακίνητοποιημένα σε κυτταρικά θραύσματα .....	35
1.3.5	Λιπάσες .....	36
1.3.5.1	Γενικά χαρακτηριστικά λιπασών .....	36
1.3.5.2	Δομή λιπάσης .....	37
1.3.5.3	Διαφορές μεταξύ λιπάσης και εστεράσης .....	39
1.3.5.4	Καταλυτικός μηχανισμός των λιπασών .....	39

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και Υλικά .....</b>	<b>45</b>	
2.1	Συσκευές και όργανα .....	45
2.2	Μικροοργανισμός .....	45
2.2.1	Θρεπτικό μέσο .....	46
2.2.2	Συνθήκες καλλιέργειας .....	47
2.3	Συλλογή της βιομάζας .....	49
2.4	Διάρρηξη κυττάρων και ακίνητοποίηση του ενζυμικού σκευάσματος .....	49
2.5	Κατασκευή καμπυλών αναφοράς και χημική εστεροποίηση .....	51
2.6	Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης .....	53
2.6.1	Επίδραση του μεγέθους της αλυσίδας του λιπαρού οξέος .....	54
2.6.2	Επίδραση της συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος .....	54

2.6.3	Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης.....	55
2.6.4	Επίδραση του περιεχόμενου νερού στην μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος.....	55
2.6.5	Μελέτη της επίδρασης άλλων παραγόντων στην μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος.....	56
2.6.6	Μηχανισμός και κινητική της αντίδρασης εστεροποίησης.....	56
2.6.7	Επίδραση της θερμοκρασίας.....	56
2.6.8	Επίδραση του μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης.....	57
2.7	Παρακολούθηση κυτταρικής ανάπτυξης.....	57
2.8	Διαδικασία προσδιορισμού της πρωτεΐνης των κυττάρων <i>N. oceanica</i> CCMP1779 .....	58
2.9	Διαδικασία προσδιορισμού της ενεργότητας λιπάσης ενζυμικού σκευάσματος.....	59
2.10	Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων εστέρων .....	60
2.11	Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά.....	62

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

<b>Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα</b> .....	<b>65</b>	
3.1	Μελέτη κυτταρικής ανάπτυξης.....	65
3.2	Υπολογισμός ενεργότητας λιπάσης ενζυμικού σκευάσματος.....	65
3.3	Κατασκευή καμπυλών αναφοράς εστέρων .....	66
3.4	Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος από το <i>N. oceanica</i> CCMP1779.....	75
3.4.1	Επίδραση μήκους ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην αντίδραση εστεροποίησης.....	75
3.4.2	Επίδραση συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση εστεροποίησης.....	79
3.4.3	Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην αντίδραση εστεροποίησης....	81
3.4.4	Μελέτη παραγόντων που επιδρούν στη μείωση της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα κατά την αντίδραση εστεροποίησης.....	84
3.4.5	Εύρεση μηχανισμού αντίδρασης εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη και υπολογισμός κινητικών σταθερών .....	88
3.4.6	Επίδραση θερμοκρασίας στην αντίδραση εστεροποίησης.....	92
3.4.6.1	Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης.....	93

3.4.7 Επίδραση μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης στην αντίδραση εστεροποίησης.....	95
--	----

#### **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

<b>Κεφάλαιο 4. Σύνοψη και συζήτηση των αποτελεσμάτων .....</b>	<b>99</b>
4.1 Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα .....	99
4.2 Μελλοντικές προτάσεις.....	104
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>104</b>

## Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά των κυτταρικών μεμβρανών του μικροφύκου *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 σε αντιδράσεις εστεροποίησης πρότυπων λιπαρών οξέων με αιθανόλη.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *N. oceanica* σε επωαστήρες με σταθερό φωτισμό, σταθερή ταχύτητα ανάδευσης και θερμοκρασία στους 20 °C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μέσω φυγοκέντρησης. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων και η λυοφιλίωση των κυτταρικών μεμβρανών. Το ενζυμικό σκεύασμα που προέκυψε είχε ενεργότητα λιπάσης ίση με  $53,11 \pm 2,43$  Units/(mg πρωτεΐνης).

Για τον προσδιορισμό των εστέρων χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος με φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), αφού κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς για τους αντίστοιχους εστέρες. Η σύνθεση των πρότυπων εστέρων πραγματοποιήθηκε με όξινη χημική εστεροποίηση.

Οι κυτταρικές μεμβράνες του στελέχους *N. oceanica* εμφάνισαν ικανότητα σύνθεσης εστέρων διαφόρων λιπαρών οξέων με την αιθανόλη. Ακολούθησε η μελέτη της δράσης του ενζυμικού σκευάσματος. Ως διαλύτης επιλέχθηκε το n-οκτάνιο, ενώ η συγκέντρωση του λιπαρού οξέος και της αιθανόλης ήταν 50 mM. Ο συνολικός όγκος αντίδρασης ήταν 200 mL, η ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm, η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 40 °C και η συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος ήταν 70 mg/mL. Τα λιπαρά οξέα τα οποία μελετήθηκαν ήταν το δωδεκανοϊκό (λαυρικό), το τετραδεκανοϊκό (μυριστικό), το εξαδεκανοϊκό (παλμιτικό) και το οκταδεκανοϊκό (στεατικό) οξύ. Παρ' ότι η αντίδραση εστεροποίησης εμφάνισε μεγαλύτερη αρχική ταχύτητα στο μυριστικό οξύ, επιλέχθηκε το παλμιτικό οξύ για το σύνολο των πειραμάτων διότι εμφανίζει μεγαλύτερο εύρος χρήσεων και βιοτεχνολογικών εφαρμογών.

Επιπρόσθετα, μελετήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος και η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης της αντίδρασης. Προέκυψαν ίσες με 70 mg/mL και

600 grm, αντίστοιχα. Οι συνθήκες αυτές διατηρήθηκαν και στα υπόλοιπα πειράματα. Παρατηρήθηκε η πτώση της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα έπειτα από 12 ώρες, η οποία αποδόθηκε στο φαινόμενο της ρόφησης του προϊόντος από το ενζυμικό σκεύασμα. Μελετήθηκε επίσης ο μηχανισμός της αντίδρασης και υπολογίσθηκαν οι κινητικές σταθερές. Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσίασε σημαντικές ομοιότητες με τον μηχανισμό Ping-Pong, ενώ οι κινητικές σταθερές υπολογίσθηκαν ως εξής :  $v_{\max} = 7,02 \cdot 10^{-4}$  mmol εστέρα/g Ε.Σ./h,  $K_{m, \text{παλμιτικού οξέος}} = 86,96$  mM και  $K_{m, \text{αιθανόλης}} = 341,71$  mM.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην αντίδραση εστεροποίησης και προέκυψε πως η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση του ενζύμου είναι οι 40 °C. Η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης υπολογίσθηκε μέσω της εξίσωσης Arrhenius, και βρέθηκε να αντιστοιχεί σε  $48,15 \pm 4,36$  kJ/mol. Εξετάσθηκε η επίδραση του μήκους της ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας του αλκυλο-δέκτη και προέκυψε ότι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται όσο μικρότερη είναι η ανθρακική αλυσίδα της αλκοόλης.

Συνοψίζοντας, το ενζυμικό σκεύασμα (οι λυοφιλιωμένες κυτταρικές μεμβράνες του μικροφύκου *N. oceanica*), το οποίο χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία, εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα στην κατάλυση αντιδράσεων σύνθεσης.



## Abstract

The present diploma thesis examines the catalytic activity of cell debris of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 in the esterification of several fatty acids with ethanol.

The strain *N. oceanica* was grown on incubators with stable light and agitation speed and temperature at 20 °C. The cells were then isolated by centrifugation. The cell disruption by sonication and lyophilization of cell's membranes followed. The enzyme formula (lyophilized cell debris) lipolytic activity was found at  $53,11 \pm 2,43$  Units/(mg protein).

Fatty acid esters were analyzed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS). The calibration curves for fatty acid esters were prepared. Fatty acid standards were synthesized by acid esterification.

The cell debris of *N. oceanica* showed catalytic activity in the esterification of fatty acids with ethanol. For the enzymatic esterification that followed, n-octane was chosen as a solvent and the concentration of both the ethanol and the fatty acid was 50 mM. The reaction volume was 200  $\mu$ L, the agitation speed was 300 rpm, the temperature was regulated at 40 °C and the enzyme formula loading was 70 mg/mL. Four fatty acids were studied : dodecanoic (lauric) acid, tetradecanoic (myristic) acid, hexadecanoic (palmitic) acid and octadecanoic (stearic) acid. Although myristic acid showed the highest initial velocity, for the remaining experiments palmitic acid was used as a substrate as it shows a wider range of biotechnological applications.

The optimal enzyme formula loading and agitation speed were also studied and found at 70 mg/mL and 600 rpm, respectively. These conditions were maintained for the remaining experiments. After 12 h of reaction, a reduction of the palmitic ethyl ester's concentration was noticed and attributed to sorption by the enzyme formula. The mechanism of the reaction was also studied and found to likely be Ping-Pong. The kinetic constants were found to be :  $v_{max} = 7,02 \cdot 10^{-4}$  mmol ester/g E.F./h,  $K_{m,palmitic\ acid} = 86,96$  mM and  $K_{m,ethanol} = 341,71$  mM.

The study of the effect of temperature showed that the highest initial velocity was achieved at 40 °C. The activation energy of the reaction was also calculated at 48,15 ± 4,36 kJ/mol, using the Arrhenius equation. The effect of the length of the linear chain of the alcohol in the esterification reaction was studied. It was revealed that the shorter the chain was, the higher initial velocity was found.

Summarising, the enzyme formula (lyophilized cell debris of *N. oceanica*), which has been used for the first time in literature, showed satisfactory results on esterification catalysis.

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



# Κεφάλαιο 1. Θεωρητικό Μέρος

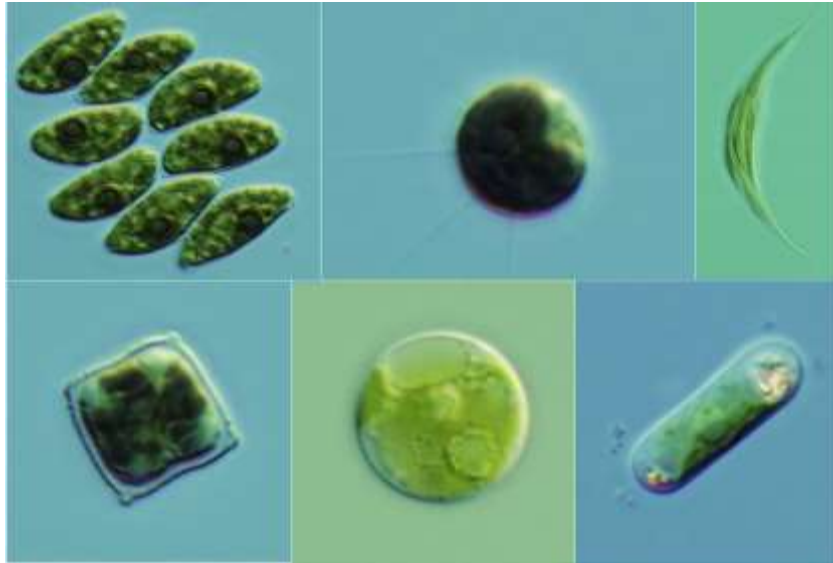
## 1.1 Μικροφύκη

### 1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Τα μικροφύκη είναι ευκαρυωτικοί φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, που διαθέτουν πλαστίδια με δύο μεμβράνες τα οποία περιέχουν χλωροφύλλη α και β (Lewis & McCourt, 2004). Κατέχουν ένα ποσοστό της τάξης του 40-50% στην παραγωγή οξυγόνου που απελευθερώνεται στην ατμόσφαιρα ενώ καταναλώνουν/δεσμεύουν περί τα  $2 \cdot 10^{12}$  kg άνθρακα από την ατμόσφαιρα (Moore, 2001).

Σήμερα, τα μικροφύκη μπορούν να παραχθούν με καλλιέργειες σε βιοντιδραστήρες και σε εξωτερικούς χώρους με στόχο την παραγωγή διάφορων προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Moazami et al., 2012). Συνήθως η παραγωγή ελαίου από τα κύτταρα των μικροφυκών, αποτελεί τη βασική εφαρμογή στη βιομηχανία. Η παραγωγικότητα των λιπιδίων των μικροφυκών μπορεί να μεταβληθεί με τη εφαρμογή διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης (Xiao, Zhang, Cui, Feng, & Cui, 2013). Οι σημαντικότερες παράμετροι που έχουν επιτυχημένα χρησιμοποιηθεί για την βελτίωση της παραγωγικότητας είναι η συγκέντρωση του CO<sub>2</sub> στον αερισμό, η ένταση του φωτός, η αλατότητα του νερού, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του αζώτου στο θρεπτικό υλικό. Στόχος της βελτιστοποίησης, είναι ο έλεγχος του μεταβολισμού του μικροφύκου και η παραγωγή μεγάλων λιπαρών οξέων (Pal, Khozin-Goldberg, Cohen, & Boussiba, 2011; Van Vooren et al., 2012).

Η διάκρισή τους βάση μεγέθους, ορίζεται ως: (1) μακροπλαγκτόν (>200 μm), (2) μικροπλαγκτόν (20-200 μm), (3) νάνοπλαγκτόν (10-20 μm), (4) ούλταπλαγκτόν (2-10μm) και (5) πίκοπλαγκτόν (0.2-2 μm) (Lee, 1999).



Εικόνα 1.1. Κύτταρα μικροφύκους που αναπτύσσονται σε απόβλητα γλυκού νερού κατά την βιοαποικοδόμηση. Από αριστερά και πάνω προς τα δεξιά και κάτω : *Scenedesmus obliquus*, *Franceia sp.*, *Ankistrodesmus sp.*, *Tetraedron sp.*, *Chlorella sp.*, *Mesotaenium sp.* (Heimann & Huerlimann, 2015)

### 1.1.2 Κατηγορίες φυκών

Η βασική διάκριση των φυκών είναι σε μικροφύκη, που αποτελούνται από μονοκύτταρους μικροοργανισμούς και σε μακροφύκη, σωματίδια που είναι ορατά με το γυμνό μάτι και μπορούν να ξεπεράσουν το μέτρο σε μέγεθος (Πετρούτσος, 2007). Οι τοποθεσίες στις οποίες αναπτύσσονται τα φύκη, έχουν ως απαραίτητη προϋπόθεση την ύπαρξη θαλασσινού ή γλυκού νερού. Εξάίρεση στην παραπάνω προϋπόθεση αποτελούν ορισμένα μικροφύκη τα οποία έχουν προσαρμοστεί και επιβιώνουν και σε ξηρές περιοχές όπως βράχους ή πέτρες (Πετρούτσος, 2007). Παρ' όλα αυτά, όλα τα μεγάλα φύκη, όπως τα φαιοφύκη, αναπτύσσονται στη θάλασσα και ορισμένες φορές αναπτύσσονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζουν μεγάλα υποθαλάσσια συμπλέγματα.

Πιο συγκεκριμένα, τα φύκη διακρίνονται στις εξής κατηγορίες (Heimann & Huerlimann, 2015; Lewis & McCourt, 2004; Πετρούτσος, 2007)

#### **Ροδοφύκη (Rhodophyta)**

Τα Ροδοφύκη είναι συνήθως πολυκύτταρα θαλάσσια φύκη τα οποία εμφανίζουν πολύπλοκη δομή και είναι ορατά με το μάτι. Εμφανίζονται βέβαια ορισμένα

μονοκύτταρα ροδοφύκη τα οποία αναπτύσσονται σε γλυκό νερό. Περιέχουν αρκετές χρωστικές πέρα της χλωροφύλλης α, όπως είναι η φυκοερυθρίνη που προσδίδει το χαρακτηριστικό ρόδινο χρώμα και η φυκοκυανίνη που απορροφά το μπλε φως. Λόγω των ιδιαίτερων αυτών χρωστικών, μπορούν να αναπτύσσονται σε μεγάλα βάθη.

### ***Φαιοφύκη (Phaeophyta)***

Τα Φαιοφύκη είναι στην πλειονότητά τους θαλάσσια πολυκύτταρα φύκη, τα οποία αναπτύσσονται ως βένθος και εμφανίζουν πολυκύτταρη δομή. Εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό καφέ χρώμα (brown algae), που οφείλεται στην ύπαρξη της χρωστικής φουκαξανθίνης. Η δομή τους ποικίλει από απλές μορφές όπως νηματοειδής και μορφές δίσκου, έως πολύπλοκες μορφές (Kelps) που σχηματίζουν ακόμα και υποθαλάσσια δάση. Απαντώνται συνήθως σε παράκτιες περιοχές, όπου και είναι ισχυρά προσκολλημένα στο υπόστρωμα.

### ***Χλωροφύκη (Chlorophyta)***

Τα Χλωροφύκη είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί και φέρουν τουλάχιστον ένα χλωροπλάστη ή πυρηνοειδή. Το μέγεθος τους ποικίλει, αφού εμφανίζονται σαν μικροφύκη ή μακροφύκη τα οποία όμως δεν ξεπερνάνε το ένα μέτρο σε μέγεθος. Σε αντίθεση με τους παραπάνω μικροοργανισμούς, λόγω της επικράτησης της χλωροφύλλης α, το χρώμα τους είναι συνήθως πράσινο (green algae). Παρ' όλα αυτά, δεν είναι απίθανη η εμφάνιση ειδών τα οποία να έχουν διαφορετικό χρώμα, αφού περιέχουν και άλλες χρωστικές όπως η χλωροφύλλη β, το καροτένιο α και β και οι ξανθοφύλλες. Τα κύτταρα μπορεί να εμφανίζουν κίνηση η οποία επιτυγχάνεται κυρίως με μαστίγια. Ο τρόπος ανάπτυξής τους είναι συνήθως αποικιακός, ενώ εμφανίζουν συχνά νηματοειδείς αποικίες.

### ***Δινοφύκη, Δινομαστογωτά, Πυροφύκη (Dinophyceae)***

Τα Δινοφύκη είναι ευκαρυωτικοί (κυρίως θαλάσσιοι) μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι αποτελούν το πιο συνηθισμένο στέλεχος που εμφανίζεται στο φυτοπλαγκτόν. Κινούνται με τη βοήθεια μαστιγίου. Ως προς το χρωματισμό, ορισμένα Δινοφύκη παράγουν αναλαμπές φωτός (βιοφωτισμός) ενώ ορισμένα

έχουν κοκκινωπό χρώμα στο νερό. Ένα πρόβλημα που συχνά εμφανίζουν, είναι η παραγωγή τοξινών που χαρακτηρίζει τα είδη αυτά.

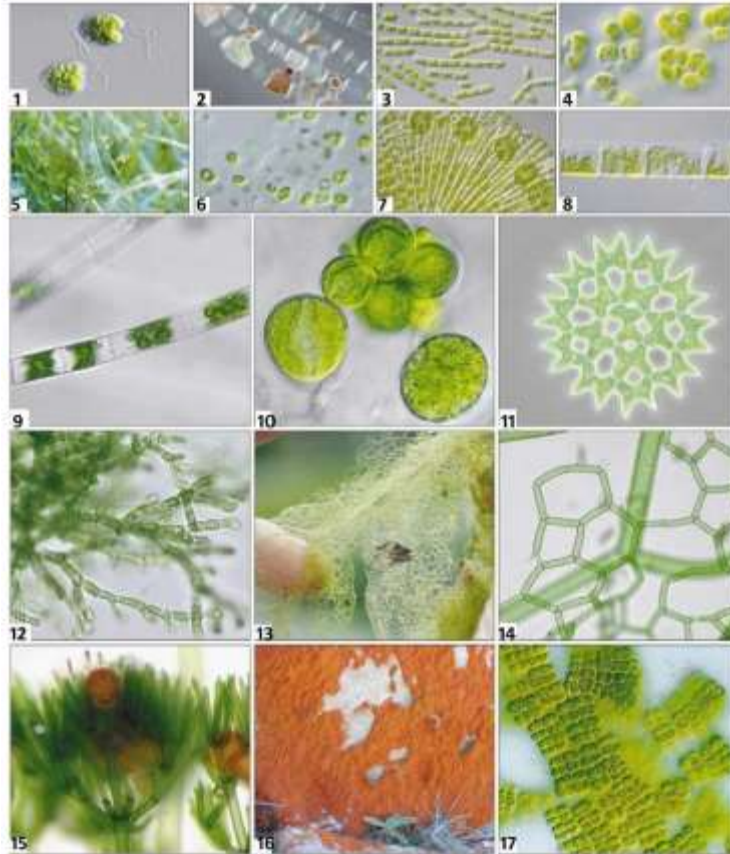
### ***Κυανοφύκη, Κυανοβακτήρια (Cyanobacteria)***

Τα Κυανοβακτήρια είναι οι μοναδικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που ανήκουν στις ομάδες των φυκών και φωτοσυνθέτουν. Δεν διαθέτουν, ως προκαρυώτες, σχηματοποιημένους πυρήνες και χλωροπλάστες και ευδοκιμούν κυρίως στο γλυκό νερό. Τέλος, αποτελούν ένα από τα βασικά είδη που βρίσκονται στο φυτοπλαγκτόν.

### ***Διάτομα (Bacillariophyta)***

Τα Διάτομα είναι ευκαρυώτες, μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί, αόρατοι με το μάτι. Εμφανίζουν μια μεγάλη ποικιλία από είδη, τα οποία ανέρχονται περί τα 16.000 είδη. Χαρακτηριστικό των φυκών αυτών είναι η συμμετρία τους, η οποία είναι είτε ακτινωτή (Centrales) είτε αμφίπλευρη (Pennales). Ανατομικά, αποτελούνται από ένα χαρακτηριστικό πυριτικό κυτταρικό τοίχωμα με ανάγλυφες διακοσμήσεις (θήκη), το οποίο με τη σειρά του αποτελείται από τις θυρίδες, δύο ίσα τμήματα που συνδέονται μεταξύ τους και εφαρμόζουν απόλυτα.





Εικόνα 1.2. Αντιπροσωπευτικά είδη φυκών: 1.Halosphaera cf. minor (prasinophyte), 2.Spirogyra maxima (charotype), 3.Klebsormidium flaccidum (charotype), 4.Chlorokybus sp. (charotype), 5.Caulerpa (anulvophyte), 6.Mesostigma (charophyte), 7.Coleochaeteorbicularis (charophyte), 8.Entransia fimbriata (charophyte), 9.Ulothrix sp. (ulvophyte) 10.Myrmecia sp. (trebouxiophyte),11.Pediastrum duplex (chlorophyte), 12.Microthamnion sp. (trebouxiophyte), 13-14.Hydrodictyon reticulatum (chlorophyte), 15.Nitella hyaline (charophyte), 16.Trentepohlia sp. (ulvophyte), 17.Chlorosarcinopsis sp. (chlorophyte) (Lewis & McCourt, 2004)

Οι τρόποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν τα φύκη είναι τρεις: (1) ως βένθος, δηλαδή φύκια τα οποία προσκολλώνται σε κάποια επιφάνεια και αναπτύσσονται εκεί, (2) ως περίφυτο, δηλαδή φύκια τα οποία προσκολλώνται στην επιφάνεια κάποια άλλης υδατικής βλάστησης και πιο συγκεκριμένα επίφυτο όταν προσκολλώνται στο εξωτερικό του φυτού και ενδόφυτο, όταν προσκολλώνται στο εσωτερικό, και τέλος (3) ως φυτοπλαγκτόν, δηλαδή φύκια τα οποία κινούνται η αιωρούνται μέσα σε υδατικό περιβάλλον.

### **1.1.3 Πλεονεκτήματα χρήσης μικροφυκών**

Τα μικροφύκη αποτελούν πηγή ενός μεγάλου αριθμού χημικών ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η μεγάλη ποικιλία που εμφανίζουν τα καθιστά εύκολα στην ανάπτυξη και καλλιέργεια, χωρίς η καλλιέργειά του να επεμβαίνει σε άλλες βιομηχανίες όπως αυτή των τροφίμων (καλλύπτοντας εκτάσεις γης που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για αυτό το σκοπό). Αναπτύσσονται σε ήπιες συνθήκες, με τη χρήση λίγων πόρων. Επίσης, μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν γενετικά με σκοπό την αύξηση της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Τα μικροφύκη αποτελούν μια από τις πιο παραγωγικές πηγές βιομάζας στη φύση, ενώ παράλληλα μπορούν να αναπτυχθούν και σε μολυσμένα νερά. Η καλλιέργειά τους είναι φιλική προς το περιβάλλον αφού εκμεταλλεύεται μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις γης, την φωτεινή ακτινοβολία του ήλιου, το CO<sub>2</sub> και νερό που δεν είναι κατάλληλο για εμπορική χρήση (Singh & Saxena, 2015).

### **1.1.4 Προϊόντα από τα μικροφύκη**

Τα βασικότερα προϊόντα που παράγονται από τα μικροφύκη περιγράφονται παρακάτω:

#### **1.1.4.1 Λιπαρά οξέα**

Τα λιπαρά οξέα εμφανίζονται στα κύτταρα σαν γλυκολιπίδια και φωσφολιπίδια σχηματίζοντας την κυτταρική μεμβράνη ή σαν αποθηκευτικά προϊόντα (Hu, Huang, Zuo, Guo, & Wei, 2008). Τα λιπίδια αυτά εμφανίζονται σε μεγάλα ποσοστά στους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια των κυττάρων. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για τις βιολογικές διεργασίες του κυττάρου είναι τα πολυακόρεστα (PUFAs), τα οποία όμως δεν συντίθενται στα ζωικά κύτταρα. Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι το λινολεϊκό οξύ (18:2 ωμέγα-6) και το α-λινοεϊκό οξύ (18:3 ωμέγα-3). Έτσι λοιπόν, τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα πρέπει να παραλαμβάνονται από την διατροφή, γιατί η έλλειψή τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα στον οργανισμό (De Jesus Raposo, De Morais, & De Morais, 2013). Πέραν των ψαριών που συνθέτουν τα

συγκεκριμένα λιπαρά αλλά εμφανίζουν τοξικότητα ως τρόφιμα, αυτά τα λιπαρά οξέα συντίθενται κυρίως από τα μικροφύκη (Skjånes, Rebours, & Lindblad, 2012).

Τα κύτταρα των μικροφυκών περιέχουν λιπίδια σε ποσοστό κατά μέσο όρο 20-26% επί της ξηρής βιομάζας. Σε συνθήκες στέρησης των θρεπτικών συστατικών, το ποσοστό των λιπαρών οξέων αυξάνεται σημαντικά σε πολλά είδη μικροφύκων. Η παραγωγή λιπιδίων επίσης εξαρτάται και από το είδος της καλλιέργειας, αν αυτή δηλαδή είναι μιξοτροφική ή αυτοτροφική, με τη δεύτερη συνήθως να αποδίδει μεγαλύτερα ποσοστά λιπιδίων, αλλά μικρότερη παραγωγή βιομάζας στην καλλιέργεια και μικρότερη σχετική αναλογία πολυακόρεστων λιπαρών.

Ένας άλλος τρόπος αύξησης της περιεκτικότητας σε λιπίδια είναι η μείωση της θερμοκρασίας της καλλιέργειας του μικροοργανισμού (Hu et al., 2008). Η χαμηλότερη θερμοκρασία εξυπηρετεί τη διατήρηση της ρευστότητας των μεμβρανών και συνεπώς τη διατήρηση των σωστών κυτταρικών διεργασιών. Επίσης, φαίνεται να επηρεάζει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων περισσότερο ως προς το είδος από ότι τη συνολική ποσότητα των λιπιδίων των κυττάρων.

Τα μικροφύκη, αποτελούν πλέον μια από τις βασικότερες πηγές λιπαρών οξέων, ιδιαίτερα για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, όπως το γ-λινολεϊκό οξύ, το αραχιδονικό οξύ, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (eicosapentaenoic, EPA) και το εικοσαεξανοϊκό οξύ (docosahexaenoic, DHA). Το πρώτο μικροφύκος που χρησιμοποιήθηκε εμπορικά για αυτό το σκοπό ήταν το *Cryptocodinium*, που αποτελεί βασική πηγή του DHA. Τα λιπαρά οξέα εκχυλίζονται με εξάνιο ύστερα από διάρρηξη των κυττάρων και ύστερα εξευγενίζονται και σταθεροποιούνται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών. Το είδος *Schizochytrium*, παράγει ένα έλαιο πλούσιο σε DHA και EPA, καθιστώντας το έτσι πολύτιμο για την αγορά, ενώ η καλύτερη πηγή του γ-λινοεϊκού οξέος είναι ο μικροοργανισμός *Spirulina platensis*.

Τα λιπαρά οξέα που συντίθενται από τα μικροφύκη αποτελούν δαπανηρή εργασία, με αποτέλεσμα να μην προτιμούνται συνήθως βιομηχανικά. Το πρόβλημα εντοπίζεται στην ανάπτυξη των κυττάρων που είναι σχετικά δαπανηρή. Η αύξηση της παραγωγικότητας σε λιπαρά οξέα στα μικροφύκη μπορεί να επιτευχθεί με τη

χρήση νέων ειδών, με τη γενετική μηχανική αλλά και την βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάπτυξης (Borowitzka, 2013).

#### **1.1.4.2 Πολυσακχαρίτες**

Ένα από τα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν από τα μικροφύκη (κυρίως από τα είδη *Porphyridium*, *Rhodella* αλλά και τα *Cyanobacteria*) είναι οι πολυσακχαρίτες. Παρ' όλα αυτά η σύνθεση πολυσακχαριτών από τα μικροφύκη δεν έχει εισέλθει στη βιομηχανία, διότι υπάρχουν πιο οικονομικά βιώσιμα προϊόντα που παράγονται από μικροφύκη και ανώτερα φυτά, όπως το άγαρ και η καραγενάνη (Borowitzka, 2013). Οι πολυσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως σταθεροποιητές γαλακτώματος, είναι ικανοί να αφαιρούν βαρέα μέταλλα από το μολυσμένο νερό, επηρεάζουν τα ρεολογικά χαρακτηριστικά του νερού και βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην ιατρική αφού εμφανίζουν αντικαρκινική και αντιϊκή δράση (De Philippis, Sili, Paperi, & Vincenzini, 2001). Η παραγωγικότητα των μικροφυκών σε πολυσακχαρίτες είναι ανάλογη με το είδος που χρησιμοποιείται, κυμαίνεται όμως από  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  έως  $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Chi, Su, & Lu, 2007). Από όλα τα είδη μικροφυκών, τα κυανοβακτήρια είναι περισσότερο μελετημένα ως προς την παραγωγή πολυσακχαριτών.

Οι διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης μπορούν να επηρεάσουν την παραγωγικότητα των κυττάρων σε πολυσακχαρίτες. Για παράδειγμα, η αζωτοπενία στα είδη *Anacystis nidulans* και στα περισσότερα *Cyanothece* οδηγεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πολυσακχαριτών, εν αντιθέσει με τα *Synechocystis* και *Phormidium* που οδηγεί σε μείωση των συγκεντρώσεων. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πολυσακχαριτών είναι η θερμοκρασία και η ηλικία της καλλιέργειας (Markou & Nerantzis, 2013).

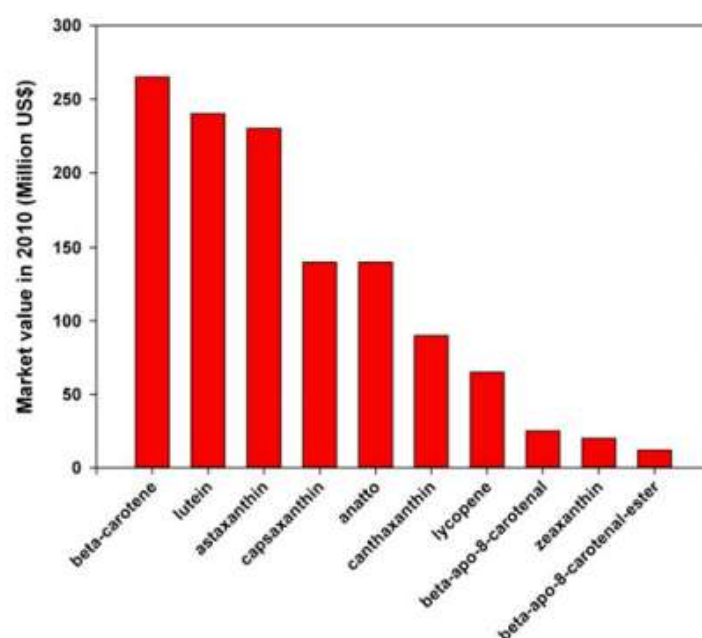
#### **1.1.4.3 Πρωτεΐνες και ένζυμα**

Τα μικροφύκη *Arthospira* και *Chlorella* χρησιμοποιούνται συχνά ως φαρμακευτικά σκευάσματα αλλά και σε λειτουργικά τρόφιμα, λόγω της μεγάλης τους περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και αμινοξέα. Ο ρόλος τους είναι η συμβολή στην προστασία του οργανισμού από ασθένειες και από την πρόκληση βλαβών στα

κύτταρα και τους ιστούς (De Jesus Raposo et al., 2013). Επίσης, το πεπτίδιο μικροκολίνη-A, που παράγεται από το κυανοβακτήριο *Lyngbya majuscula*, αναφέρεται πως έχει ανοσοκατασταλτική δράση (Janda, Langacker, Ran, & Duimering, 2010). Τα είδη *Porphyridium* και *Anabaena* συνθέτουν μεταλλοένζυμα τα οποία περιέχουν σίδηρο, μαγνήσιο ή χαλκό, και δρουν κατά των κυτταροτοξικών ελευθέρων ριζών, ως αντιοξειδωτικά. Τέλος, ο μικροοργανισμός *I. Galbana* συνθέτει το ένζυμο ανθρακική ανυδράση, ένα μεταλλοένζυμο το οποίο βρίσκεται στο ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια και είναι υπεύθυνο για την κατάλυση της μετατροπής του CO<sub>2</sub> σε ανθρακικό οξύ και όξινα ανθρακικά ιόντα στους ιστούς (De Jesus Raposo et al., 2013).

#### 1.1.4.4 Καροτενοειδή

Η βιομηχανική αγορά των καροτενοειδών το 2010 είχε αξία περίπου US\$1,2 δισεκατομμύρια, με την πλειονότητα των καροτενοειδών να συνθέτονται χημικά. Από όλα τα καροτενοειδή, το β-καροτένιο και η ασταξανθίνη αποτελούν το μεγαλύτερο κομμάτι της φυσικής παραγωγής καροτενοειδών.



Εικόνα 1.3. Αξία διαφόρων καροτενοειδών στην παγκόσμια αγορά για το έτος 2010 (Borowitzka, 2013)

Τα μικροφύκη, όπως αναφέρθηκε μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν πηγές καροτενοειδών. Μερικά παραδείγματα παραγωγής καροτενοειδών από μικροφύκη είναι τα παρακάτω: λουτεΐνη από τα *Muriellpsis*, *Scenedesmus almeriensis* και *Auxenochlorella prototheoides*, ασταξανθίνη, κανθαξανθίνη και λουτεΐνη από το *Scenedesmus komareckii*, ζεαξανθίνη από το *D. salina*, εχινενόνη από το *Botryococcus braunii*, φυκοξανθίνη από το *Phaeodactylum tricorutum* και τα άχρωμα καροτενοειδή φυτοένη και πυτοφλουένη από τον *D. salina*. Όμως, εκτός από τους μικροοργανισμούς *D. salina* και *H. pluvialis*, όπου η β-καροτένιο και η ασταξανθίνη αποτελούν το 90% των καροτενοειδών, στα περισσότερα είδη μικροφύκων το κύριο καροτενοειδές δεν ξεπερνάει το 70% των συνολικών καροτενοειδών του κυττάρου. Συνεπώς, τα καροτενοειδή που προκύπτουν ύστερα από εκχύλιση τους από το κύτταρο, αποτελούν ένα μίγμα μεγάλου αριθμού διαφορετικών καροτενοειδών, γεγονός που τα καθιστά λιγότερο ανταγωνιστικά, αφού πρέπει να ακολουθήσουν και άλλες διεργασίες για τον διαχωρισμό τους, πριν εξαχθούν στην αγορά (Borowitzka, 2013).

#### 1.1.4.5 Φυκομπιλίνες

Σε αντίθεση με τις παραπάνω χρωστικές ενώσεις οι φυκομπιλίνες, όπως είναι η φυκοκυανίνη, η φυκοερυθρίνη και η αλλοφυκοκυανίνη, εμφανίζονται μόνο στα κύτταρα μικροφύκων, όπως στη *Spirulina (Arthrospira)*, *Porphyridium*, *Rhodella* και *Galdiera*. Οι παραπάνω χρωστικές ενώσεις είναι υδατοδιαλυτές και βρίσκουν πολλές εφαρμογές τόσο στη βιομηχανία τροφίμων όσο και στη βιομηχανία καλλυντικών. Ανήκουν στις ασφαλείς για τη διατροφή χημικές ενώσεις (GRAS). Πρόσφατα, έχουν εμφανισθεί αρκετές εφαρμογές τους, όπως η χρήση τους σαν φθορίζουσες ουσίες στην κυτταρομετρία και στην ανοσολογία, σαν αντιοξειδωτικές ενώσεις στα καλλυντικά, σαν συστατικά λειτουργικών τροφίμων και για θεραπευτικούς σκοπούς (Borowitzka, 2013; Deng & Chow, 2010).

Η φυκομπιλίνη C-φυκοκυανίνη, που παράγεται από το είδος *Spirulina (Arthrospira)*, αποτελεί μία από τις πιο ακριβές χρωστικές ενώσεις, με το κόστος της να εξαρτάται από την καθαρότητά της και να κυμαίνεται στα US\$ 500- 10.000 kg<sup>-1</sup>. Η καθαρότητα της φυκοκυανίνης εκφράζεται από το λόγο των απορροφήσεων  $A_{620}/A_{280}$ . Ο λόγος

αυτός κυμαίνεται από 0,7 (για ανάγκες βιομηχανίας τροφίμων) έως 4,0 (για αναλυτικούς σκοπούς) (Rito-Palomares, Nuez, & Amador, 2001). Η σημερινή εμπορική αξία των προϊόντων φυκομπλίνης υπολογίζεται μεγαλύτερη των US\$ 60 εκατομμυρίων, ενώ η παγκόσμια ετήσια παραγωγή της *Spirulina* ξεπερνάει τους 5.000 τόνους.

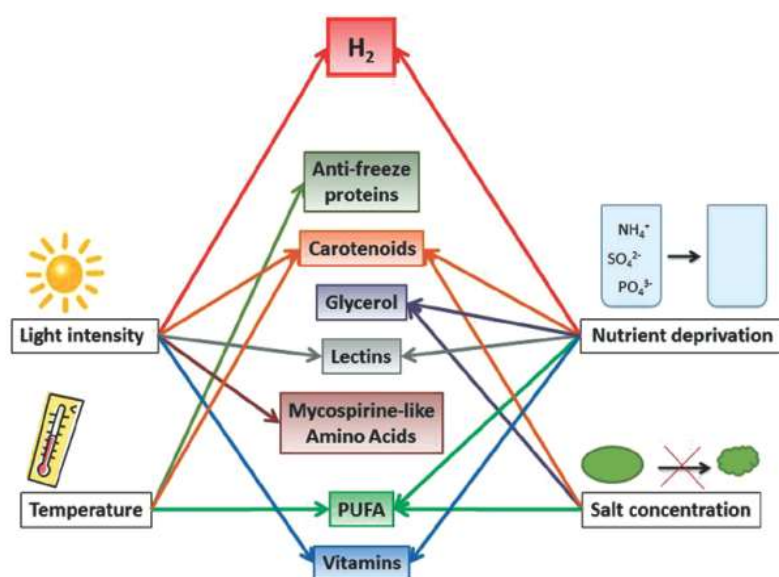
#### 1.1.4.6 Γλυκερόλη

Μέσω βιολογικών και φυσικοχημικών διεργασιών, η γλυκερόλη που περιέχεται στα κύτταρα των μικροφυκών μπορεί να οδηγήσει σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, είτε αυτά αφορούν τη βιομηχανία τροφίμων είτε τη βιομηχανία καλλυντικών. Η συσσώρευση της γλυκερόλης στα κύτταρα έχει ρυθμιστικό ρόλο, αφού συμβάλει στη ρύθιση της οσμωτικής πίεσης μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντος. Με την αύξηση της αλατότητας στα κύτταρα, η γλυκερόλη συσσωρεύεται, και σε μικροφύκη όπως το *Dunaliella* όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει 25% NaCl η συσσώρευση της γλυκερόλης φτάνει το 17% ως προς την ξηρή βιομάζα. Στο είδος *D. Salina* δεν εμφανίζεται κάποια επαγωγή στη συγκέντρωση της γλυκερόλης σε συνθήκες περιορισμού θρεπτικών συστατικών όπως το θείο, το άζωτο και ο φώσφορος. Αντιθέτως, στο είδος *Chlamydomonas reinheirdtii* το ποσοστό σε γλυκερόλη αυξάνεται περίπου οχτώ φορές σε συνθήκες μείωσης του θείου. Τέλος, η προσθήκη  $\text{Cu}^{2+}$  στο *D. Salina*, μπορεί να οδηγήσει σε 150% αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκερόλης (Markou & Nerantzis, 2013).

#### 1.1.4.7 Βιταμίνες

Αρκετά είδη μικροφυκών, όπως για παράδειγμα τα *Dunaliella tertiolecta*, *Nannochloropsis oculata*, *Spirulina platensis*, *Tetraselmis suecica* και *Euglena gracilis*, συνθέτουν φυσικά βιταμίνες, όπως η βιταμίνη E και η βιταμίνη C. Τα θρεπτικά συστατικά που καθορίζουν τη συγκέντρωση της βιταμίνης στο κύτταρο είναι το άζωτο (βιταμίνη E) και η ουρία (βιταμίνη C). Σε ετερότροφες καλλιέργειες του *E. gracilis*, όπου αντί της γλυκόζης χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ως οργανική πηγή άνθρακα, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλη) της τάξης του 400%. Επίσης, ύστερα από προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι

καλλιέργειες του μικροοργανισμού *S. platensis* απέδωσαν τέσσερις και οχτώ φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση βιταμίνης C και E, αντίστοιχα (Markou & Nerantzis, 2013).



Εικόνα 1.4. Τρόποι επαγωγής της παραγωγής ενός προϊόντος από τα μικροφύκη (Skjånes et al., 2012)

#### 1.1.4.8 Πολυυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες-Βιοπλαστικά

Οι πολυυδροξυαλκανοϊκοί εστέρες αποτελούν μια ομάδα υλικών που χρησιμοποιούνται από τους μικροοργανισμούς (κυρίως τους προκαρυωτικούς), ως αποθηκευτικοί χώροι άνθρακα και ενέργειας, και εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Το πιο απλό μέλος της ομάδας είναι ο πολυ-β-υδροξυβουτιρικός εστέρας (PHB). Το PHB, αποτελεί ένα φυσικό, θερμοπλαστικό πολυεστέρα, που εμφανίζει παρόμοιες ιδιότητες με τα συνθετικά πλαστικά. Το βασικό πλεονέκτημα των ανωτέρω εστέρων, έναντι των συνθετικών είναι η βιοαποικοδομησιμότητά τους (Wu, Wu, & Shen, 2001). Η σύνθεση των συγκεκριμένων πολυεστέρων έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση αρκετών μικροφυκών όπως τα *Spirulina sp.*, *Nostoc sp.* και *Synechocystis sp.* (Markou & Nerantzis, 2013).

Πρόσφατα, επιτεύχθηκε η σύνθεση του πολυεστέρα 3-υδροξυβουτιρικού-3-υδροξυβαλεριανικού εστέρα, εν συντομία P(3HB-co-3HV) από το είδος *Nostoc muscorum* σε ποσοστό 58-60% επί του ξηρού βάρους των κυττάρων, σε συνθήκες



έλλειψης φωσφόρου και αζώτου με την παροχή 0,4% αιθυλ-εστέρα και 0,4% βαλερικού εστέρα (Bhati & Mallick, 2012). Το σπουδαίο πλεονέκτημα αυτού του βιοπλαστικού είναι πως είναι λιγότερο εύθραυστο από τα συνθετικά πλαστικά.

#### **1.1.4.9 Παραγωγή βιοντίζελ από μικροφύκη**

Τα μικροφύκη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή των ελαίων τους (λιπαρά οξέα) τα οποία χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την παραγωγή βιοντίζελ με όξινη ή βασική χημική κατάλυση (εστεροποίηση). Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζουν τα τριτογενή συστήματα μικροφυκών είναι τα εξής: (1) εμφανίζουν μεγάλη μετατροπή του φωτός σε αξιοποιήσιμη ενέργεια για την αύξηση της βιομάζας, (2) μπορούν να αναπτυχθούν όλες τις εποχές του χρόνου σε αντίθεση με ορισμένα τρόφιμα, (3) μπορούν να αξιοποιήσουν το αλάτι και παροχές από χρησιμοποιημένο νερό, με αποτέλεσμα να μειώνεται η χρήση φρέσκου νερού, (4) δεν οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα αφού το CO<sub>2</sub> που απελευθερώνεται κατά την καύση του βιοκαυσίμου, έχει απορροφηθεί κατά την αύξηση της βιομάζας και (5) δεν παράγουν τοξικά παραπροϊόντα, ενώ τα παραγώμενα καύσιμα είναι και βιοδιασπώμενα (Mata, Martins, & Caetano, 2010; Porphy & Farid, 2012).

Η τιμή του βιοντίζελ που προέρχεται από μικροφύκη και παράγεται σε βιομηχανική κλίμακα, κυμαίνεται στα \$39-\$69 US/βαρέλι, τιμή η οποία προέκυψε από μελέτες το 1996 (Benemann and Oswald et al. 1996). Το 2008 η αντίστοιχη τιμή του βιοντίζελ προέκυψε ως \$52-\$91 US/βαρέλι. Σύμφωνα με πιο σύγχρονες μελέτες (Schenk et al., 2008), το κόστος προκύπτει πως είναι \$84 US/βαρέλι. Οι συνθήκες στις οποίες στηρίχθηκαν και οι δύο μελέτες ανέφεραν πως θα χρησιμοποιούνταν 400 ανοιχτές δεξαμενές, καθαρό CO<sub>2</sub> και η παραγωγικότητα θα ανέρχεται περίπου στα 30-60 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> με 50% απόδοση σε έλαια από τη βιομάζα. Οι τόσο υψηλές αποδόσεις είναι θεωρητικά ρεαλιστικές, όμως δεν έχουν επιτευχθεί ακόμα.

Σύμφωνα με τη βιομηχανία Scambiotic Ltd (Israel), το κόστος του ξηρού μικροφύκου εκτιμάται στα \$0,34 US/kg. Η παραγωγικότητα ήταν 20 g m<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup> και το συνολικό περιεχόμενο σε λίπη ήταν 8-40%. Υποθέτοντας πως το μέσο περιεχόμενο σε λίπη είναι 24% και πως η εξαγωγή τους δεν κοστίζει επιπλέον, τότε

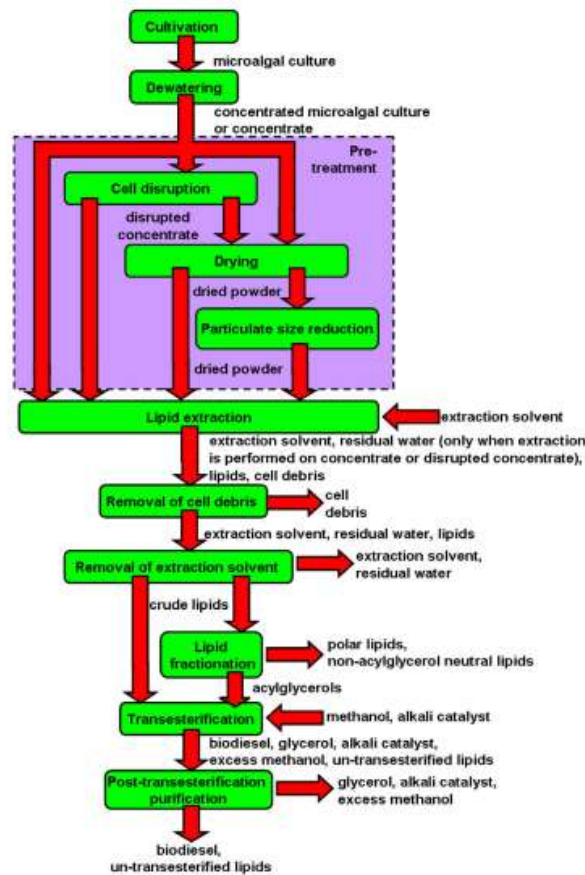
το κόστος για τα λίπη ανέρχεται σε \$1,42 US/kg ή σε \$209 US/βαρέλι, τιμή υπερδιπλάσια των ελαίων πρώτης γενιάς (\$90 US/βαρέλι).

Το κόστος παραγωγής βιοντίζελ από τα μικροφύκη, αποτελεί ένα ζήτημα που απασχολεί αρκετό καιρό την επιστημονική κοινότητα. Σε πρόσφατη μελέτη (Abdo et al., 2016), χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη μικροφυκών, τη *Spirulina maxima* και τη *Microcystis aeruginosa*, και προέκυψε πως το κόστος του παραγόμενου βιοντίζελ αντιστοιχούσε σε \$1235 US/τον και στις δύο περιπτώσεις.

Η βασική ιδέα πίσω από την παραγωγή βιοντίζελ από τα μικροφύκη είναι η αξιοποίηση της μεγάλης περιεκτικότητας (80%-90%) σε λιπαρά οξέα που εμφανίζει, και η εστεροποίησή τους προς βιοντίζελ. Επίσης, ο βασικός λόγος για την ραγδαία ανάπτυξη της συγκεκριμένης βιομηχανικής εφαρμογής, αποτελεί το γεγονός πως το βιοντίζελ από μικροφύκη είναι ένα καύσιμο τρίτης γενιάς. Δηλαδή, το βιοντίζελ κατά την καύση του απελευθερώνει ανάλογο CO<sub>2</sub> με αυτό που έχει προσλάβει κατά την ανάπτυξή του, διατηρώντας έτσι το ισοζύγιο CO<sub>2</sub> στην ατμόσφαιρα, και μη επαβαρύνοντάς την. Ένδειξη της σπουδαιότητας αυτής της εφαρμογής, αποτελεί το γεγονός πως αν χρησιμοποιούταν για παραγωγή μικροφυκών το 1-3% της συνολικά καλλιεργήσιμης γης στις ΗΠΑ, τότε θα μπορούσαν να καλυφθούν περίπου το 50% των συνολικών αναγκών για καύσιμα (Chisti, 2007).

Η παραγωγικότητα των μικροφυκών σε βιοντίζελ εξαρτάται από αρκετούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (Jing Lu, Sheahan, & Fu, 2011) και έχει μελετηθεί αρκετές φορές ως υποψήφια πηγή παραγωγής βιοντίζελ (Rodolfi, Zittelli, Barsanti, Rosati, & Tredici, 2003) αφού τρία είδη *Nannochloropsis* έχουν λιπιδικό περιεχόμενο μεγαλύτερο από 30% και λιπιδική παραγωγικότητα 55 με 61 mg·L<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>.

Η συνήθης διαδικασία η οποία ακολουθείται για την συλλογή των λιπαρών οξέων από τη μικροφύκη παρουσιάζεται παρακάτω στο διάγραμμα. Τα βασικά σημεία της παραγωγικής διαδικασίας είναι η καλλιέργεια, η συλλογή της βιομάζας, η διάσπαση των κυττάρων, η εκχύλιση των λιπαρών και η εστεροποίηση τους (Halim, Danquah, & Webley, 2012).



Εικόνα 1.5. Διαδικασία παραγωγής βιοντίζελ από μικροφύκη (Halim et al., 2012)

### 1.1.5 Το γένος *Nannochloropsis*

#### 1.1.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού *Nannochloropsis*

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Nannochloropsis oceanica* CCMP 1779. Γενικότερα, το γένος *Nannochloropsis* εμφανίζει ορισμένα χαρακτηριστικά τα οποία έχουν μεγάλο ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον και ανήκει στους μονοκύτταρους θαλάσσιους οργανισμούς, στην κατηγορία των Eustigmatophyceae (Rodolfi et al., 2003). Το μέγεθος του *Nannochloropsis* αναφέρεται βιβλιογραφικά ως 2-5 μm, μέγεθος σχετικά μικρό για την κατηγορία των φυκών (Dongmei Wang et al., 2014).

Τα μικροφύκη συνθέτουν λιπαρά οξέα (Fatty Acids, FAs) και τα χρησιμοποιούν ως δομικές μονάδες για το σχηματισμό διαφόρων ειδών λιπιδίων. Γενικά, τα κορεσμένα και τα μονο-ακόρεστα λιπαρά είναι αυτά που συναντώνται πιο συχνά στα μικροφύκη. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη του γένους *Nannochloropsis* εμφανίζουν

μεγάλες συγκεντρώσεις στα λιπαρά οξέα C14:0, C16:0, C16:1, C20:4 και C20:5. Τα FAs εμφανίζονται σε διάφορα λιπίδια όπως στα ουδέτερα (Neutral Lipids, NLs), στα πολικά (Polar Lipids, PLs) και στα γλυκολιπίδια (Glucose Lipids, GLs), και η συμβολή τους σε κάθε ένα από αυτά τα λιπίδια διαφέρει ανάλογα με το είδος του λιπιδίου (Vanitha, Narayan, Murthy, & Ravishankar, 2007). Η σύνθεση και ο ρόλος των λιπαρών οξέων στα ουδέτερα και πολικά λιπίδια έχουν μεγάλη σημασία για τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να γίνει ο διαχωρισμός των λιπιδίων (Meireles, Guedes, & Malcata, 2003).

### **1.1.5.2 Κατηγοριοποίηση του μικροοργανισμού *Nannochloropsis***

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί και περιγραφεί πλήρως έξι (6) είδη του γένους *Nannochloropsis* (Kagan & Matulka, 2015):

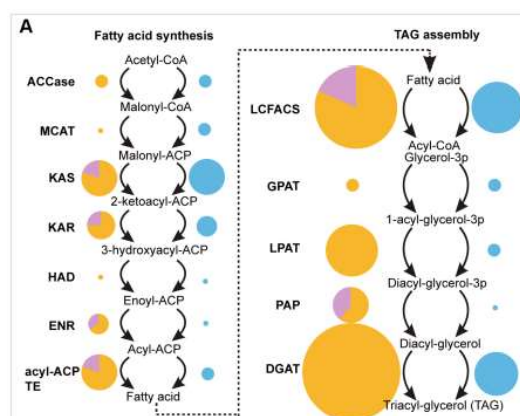
- *N. gaditana*, L.M.Lubián, 1982
- *N. granulate*, B.Karlson & D.Potter, 1996
- *N. limnetica*, L.Krienitz, D.Hepperle, H.-B.Stich & W.Weiler 2000
- *N. oceanica*, Suda & Miyashita, 2002
- *N. oculata*, (Droop) D.J.Hibberd 1981
- *N. salina*, D.J.Hibberd, 1981

Από τα έξι συνολικά είδη που υπάρχουν, τρία (*gaditana*, *salina*, *oculata*) εμφανίζουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε λιπίδια. Το είδος *gaditana* εμφανίζει υψηλή παραγωγή βιομάζας καθώς και υψηλή παραγωγή λιπιδίων. Αναπτύσσεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ένα μεγάλο εύρος pH, θερμοκρασιών και αλατότητας (Radakovits et al., 2012).

### **1.1.5.3 Γονιδίωμα του μικροοργανισμού *Nannochloropsis***

Πρόσφατα, το πρώτο γονιδίωμα (first draft genome sequence) και οι μέθοδοι γενετικής τροποποίησης του είδους *N. gaditana* καθώς και η υψηλής απόδοσης μέθοδος ομόλογου ανασυνδυασμού του *Nannochloropsis* έγιναν διαθέσιμα (Kilian, Benemann, Niyogi, & Vick, 2011). Με βάση την γενετική αλληλουχία, η ρύθμιση της παραγωγής λιπιδίων έχει περιγραφεί με λεπτομέρεια. Νέες μέθοδοι τροποποίησης

και ομόλογου ανασυνδυασμού έχουν εισάγει τον μικροοργανισμό *Nannochloropsis* στους χώρους της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής.



Εικόνα 1.6. Σύνθεση των FAs και TAG στο *Nannochloropsis* και στο *C. reinhardtii*. Τα ένζυμα απεικονίζονται με κίτρινο και μπλε χρώμα αντίστοιχα, ενώ με μωβ απεικονίζονται τα θεωρούμενα HGT γονίδια (Dongmei Wang et al., 2014)

Από την αλληλούχηση του γονιδιώματος του μικροοργανισμού *Nannochloropsis gaditana* (Radakovits et al., 2012), προέκυψε πως το γονιδίωμα των κυττάρων περιέχει συγκεκριμένες αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για την έκφραση ενζύμων όπως είναι οι λιπάσες (TAG-lipase), καθώς και άλλα 32 ένζυμα (όπως ACSL long-chain acyl-CoA ligase) που χρησιμοποιούνται για την αποσύνθεση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και 15 ένζυμα (όπως KASI/II fatty acid synthase) που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση ελεύθερων λιπαρών οξέων.

Διαθέσιμο είναι και το γονιδίωμα του *Nannochloropsis oceanica* το οποίο εμφάνισε 80% ομολογία στις πρωτεΐνες με το αντίστοιχο του *N. gaditana*. Κατά τη μελέτη του *N. oceanica* CCMP 1779 παρατηρήθηκαν 52 γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν λιπάσες (putative lipase encoding genes) (Vieler et al., 2012).

## **1.2 Καλλιέργεια μικροφυκών**

### **1.2.1 Συνθήκες ανάπτυξης και απαιτήσεις σε θρεπτικά μέσα**

#### **1.2.1.1 Θερμοκρασία**

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης των μικροφυκών δεν μπορεί εύκολα να αποδοθεί μέσα σε ένα στενό εύρος θερμοκρασιών, λόγω της μεγάλης ποικιλίας μικροφυκών που εμφανίζονται στη φύση. Παρ' όλα αυτά, τα περισσότερα είδη μικροφυκών αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 15-35 °C (όπως π.χ. το *Chlorella*). Άλλα είδη όμως αναπτύσσονται σε μικρότερα και πιο συγκεκριμένα εύρη θερμοκρασιών, όπως το *Haematococcus*. Τα περισσότερα όμως, αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες 25 -30 °C. Θερμοκρασίες μικρότερες των 15 °C οδηγούν σε σημαντική μείωση της ανάπτυξης των μικροφυκών, ενώ θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 35 °C μπορεί να οδηγήσουν στην καταστροφή των κυττάρων.

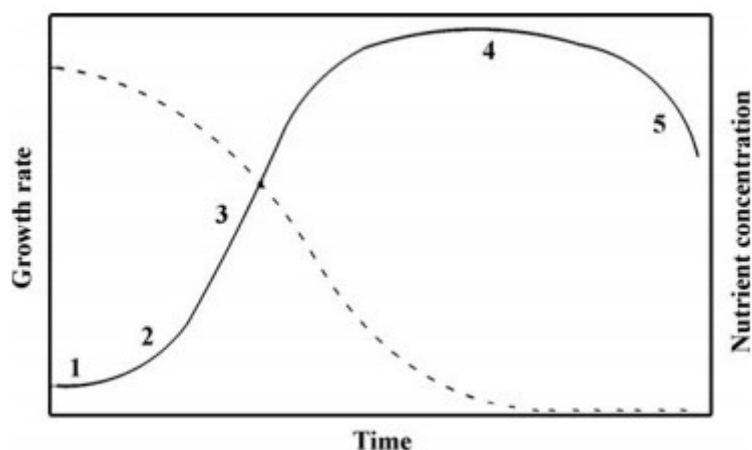
Παρ' όλα αυτά, πολλά μικροφύκη μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που είναι ακόμα και 15 °C χαμηλότερες από την βέλτιστη, αλλά ακόμα και η μεταβολή της θερμοκρασίας μόνο κατά 2 – 4 °C μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια βιομάζας. Οι διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης μπορεί να επηρεάσουν τις ανάγκες για θρεπτικά συστατικά των μικροφυκών, τον μεταβολισμό τους και τη σύνθεση του κυττάρου (Richmond & Zou, 1999).

#### **1.2.1.2 Θρεπτικά συστατικά**

Τα πιο σημαντικά θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη τους μικροφύκους είναι το άζωτο, ο φώσφορος και ο άνθρακας. Κάθε είδος εμφανίζει τις δικές του βέλτιστες συγκεντρώσεις στα παραπάνω θρεπτικά συστατικά. Ο περιορισμός των θρεπτικών συστατικών μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της παραγωγής κάποιου προϊόντος. Για παράδειγμα τα περισσότερα είδη ανταποκρίνονται στον περιορισμό του αζώτου (αζωτοπενία) αυξάνοντας το λιπιδικό τους περιεχόμενο. Ο ρόλος του φωσφόρου είναι εξαιρετικά σημαντικός αφού συμμετέχει στον μεταβολισμό και τη ρύθμιση του κυττάρου, στη σύνθεση ενζύμων, φωσφολιπιδίων και ενεργειακών μονάδων όπως τα AMP, ADP και ATP. Η πηγή άνθρακα είναι απαραίτητη για τη φωτοσύνθεση. Στις ανοιχτές δεξαμενές ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται το

ατμοσφαιρικό CO<sub>2</sub>, ενώ όταν δεν επαρκεί παρέχεται από τεχνητές πηγές. Στους φωτοβιοαντιδραστήρες η πηγή άνθρακα παρέχεται συνήθως μέσω ανόργανων χημικών ενώσεων (Lundquist, Woertz, Quinn, & Benemann, 2010).

Άλλα θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη των μικροφυκών είναι τα κατιόντα Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> και Ca<sup>2+</sup>, ιχνοστοιχεία όπως χαλκού, σιδήρου και ψευδάργυρου αλλά και βιταμίνες όπως η B<sub>12</sub> (Miyamoto, Watanabe, Takenaka, & Nakano, 2002; Moheimani, 2005).



Εικόνα 1.7. Ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων μικροφύκους και συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου. Φάσεις ανάπτυξης : 1 : λογαριθμική φάση, 2 : εκθετική φάση ανάπτυξης, 3 : γραμμική φάση ανάπτυξης, 4 : στάσιμη φάση ανάπτυξης και 5 : φάση θανάτου (Mata et al., 2010)

### 1.2.1.3 Αλατότητα

Κάθε είδος μικροφύκους εμφανίζει βέλτιστη ανάπτυξη σε διαφορετικό εύρος αλατότητας. Τα περισσότερα μικροφύκη αναπτύσσονται σε αλατότητες 20–24 g·L<sup>-1</sup>. Η αλατότητα του νερού μπορεί να αυξηθεί τόσο σε ανοιχτά όσο και σε κλειστά συστήματα καλλιέργειας, λόγω της εξάτμισης. Μείωση της αλατότητας παρατηρείται μόνο σε ανοιχτά συστήματα λόγω βροχόπτωσης. Παρά την μεγάλη ανοχή που εμφανίζουν τα μικροφύκη στις διάφορες τιμές αλατότητας, η απομάκρυνση από τη βέλτιστη τιμή αλατότητας μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική μείωση της ταχύτητας ανάπτυξης μια καλλιέργειας. Οι αλλαγές στην αλατότητα μπορούν να επηρεάσουν τα μικροφύκη με τρεις τρόπους : (1) οσμωτικό στρες, (2)

ιοντικό στρες και (3) αλλαγή της αναλογίας των ιόντων στο κύτταρο (Moheimaní, 2005).

#### **1.2.1.4 Φωτισμός καλλιέργειας**

Το φως που δεσμεύεται από τις χρωστικές ουσίες που συμμετέχουν στη φωτοσύνθεση, είναι περίπου δέκα φορές μεγαλύτερο κάτω από πλήρη έκθεση σε ήλιο ( $200 \mu\text{mol φωτονίων m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), από αυτό που απαιτείται για την ανάπτυξη των κυττάρων. Δηλαδή, περίπου το 90% των φωτονίων που δεσμεύονται από τα κύτταρα, μπορούν να μετατραπούν σε θερμότητα και σε φθορισμό. Σε εσωτερικά συστήματα όπως οι φωτοβιοαντιδραστήρες, ο φωτισμός είναι ελεγχόμενος και ρυθμίζεται κάθε φορά ανάλογα με το είδος του μικροφύκου που καλλιεργείται (Vonshak & Torzillo, 2010).

#### **1.2.1.5 pH**

Το pH της καλλιέργειας, όπως και οι περισσότερες συνθήκες, εξαρτάται απόλυτα από το είδος του μικροφύκου που αναπτύσσεται. Γενικά, το pH των περισσότερων καλλιεργειών μικροφύκου είναι ελαφρώς βασικό (μεταξύ 7 και 9). Αλλαγές στο pH κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας μπορεί να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της απόδοσης σε βιομάζα (Moheimaní, 2005).

#### **1.2.1.6 Ανάδευση**

Η ανάδευση αποτελεί ένα βασικό παράγοντα ανάπτυξης μιας καλλιέργειας αφού διευκολύνει την ομογενοποίηση της καλλιέργειας και την μεταφορά θερμότητας. Σε μεγάλες καλλιέργειες είναι απαραίτητη η έντονη ανάδευση ώστε να μην παραμένουν τα κύτταρα για μεγάλο χρονικό διάστημα στο σκοτάδι. Από την άλλη πλευρά, υψηλές ταχύτητες ανάδευσης μπορούν να καταστρέψουν τα κύτταρα προκαλώντας διατμητικές τάσεις. Η βέλτιστη ανάδευση εξαρτάται κάθε φορά από το μικροφύκο που χρησιμοποιείται και δεν μπορεί να αποδοθεί γενικά για όλα τα είδη (Barbosa, 2003; Mata et al., 2010).



## 1.2.2 Συστήματα καλλιέργειας μικροφυκών

Οι μεγάλες κατηγορίες συστημάτων ανάπτυξης των μικροφυκών είναι δύο. Στην πρώτη, η καλλιέργεια των μικροφυκών πραγματοποιείται σε ανοιχτά συστήματα μεγάλης έκτασης, ενώ στη δεύτερη σε κλειστά συστήματα-φωτοβιοαντιδραστήρες (Hallmann & Hallman, 2007).

### 1.2.2.1 Ανοιχτές δεξαμενές

Οι δεξαμενές που χρησιμοποιούνται δεν έχουν μεγάλο βάθος (της τάξης των 10 έως 50 cm) έτσι ώστε ο φωτισμός των κυττάρων να είναι ομοιόμορφος, ενώ η κατανάλωση ενέργειας για την ανάμιξη υγρού/αέριου καθώς και της μεταφοράς τους ( $4 \text{ W/m}^3$ ), είναι η ελάχιστη. Το θεραπευτικό μέσο της καλλιέργειας βρίσκεται εκτεθημένο στην ατμόσφαιρα, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η εξάτμιση του υγρού μέσου και συνεπώς η εύκολη ρύθμιση της θερμοκρασίας. Το βασικό πλεονέκτημα αυτού του τρόπου καλλιέργειας είναι η ευκολία κατασκευής και λειτουργίας σε σχέση με τα κλειστά συστήματα των βιοαντιδραστήρων (Ugwu, Aoyagi, & Uchiyama, 2008). Επίσης, είναι κατασκευασμένες από υλικά χαμηλού κόστους, ενώ και ο σχεδιασμός τους δεν είναι ιδιαίτερα δαπανηρός. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούνται εκτενώς σε βιομηχανική κλίμακα για την ανάπτυξη των μικροφυκών και κυανοβακτηρίων, όπως τα *Arthrospira platensis*, *Dunaliella salina*, *Anabaena sp.*, *Phaeodactylum tri-cornutum*, *Pleurochrysis carterae*, *Chlorella sp.* και *Nannochloropsis* (Jorquera, Kiperstok, Sales, Embiruçu, & Ghirardi, 2010).

Οι ανοιχτές δεξαμενές όμως εμφανίζουν και αρκετά μειονεκτήματα. Βασικότερο όλων είναι ο κίνδυνος μόλυνσης της καλλιέργειας από άλλους γρήγορα αναπτυσσόμενους ετερότροφους μικροοργανισμούς. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ανοιχτές καλλιέργειες να χρησιμοποιούνται πλέον μόνο για τους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν κάτω από εξαιρετικά ακραίες συνθήκες και συνεπώς δεν αποτελούν εύκολο θήραμα για τους άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης, στις ανοιχτές καλλιέργειες παρατηρείται ελλιπής φωτισμός των κυττάρων, απώλειες από εξάτμιση του υγρού μέσου καθώς και διάχυση του  $\text{CO}_2$  στην ατμόσφαιρα. Για την βιομηχανική εκμετάλλευση μέσω αυτής της μεθόδου απαιτούνται μεγάλες εκτάσεις γης. Τέλος συχνά, λόγω της ανεπαρκούς ανάδευσης

παρατηρούνται χαμηλά φαινόμενα μεταφοράς μάζας με αποτέλεσμα την μικρή παραγωγικότητα σε βιομάζα, ειδικά αν συγκριθεί αυτή η μέθοδος με τους βιοαντιδραστήρες (Ugwu et al., 2008).



Εικόνα 1.8. Καλλιέργεια μικροφυκών σε ανοιχτές δεξαμενές

### 1.2.2.2 Κλειστά συστήματα-Φωτοβιοαντιδραστήρες

Στα κλειστά συστήματα χρησιμοποιούνται αντιδραστήρες (κλειστοί ή ημι-κλειστοί με φυσικό ή φυσικό/τεχνητό φως) που είναι κατασκευασμένοι από γυαλί, διαπερατά πλαστικά δοχεία ή σωλήνες οι οποίοι είναι τοποθετημένοι οριζόντια ή κάθετα, δημιουργώντας διάφορους σχηματισμούς όπως βρόγχοι, πηνία, σειρές ή φράκτες, στους οποίους τα μικροφύκη ρέουν συνεχώς. Οι κλειστοί φωτοβιοαντιδραστήρες χρησιμοποιούνται βιομηχανικά για τους παρακάτω μικροοργανισμούς: *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Arthrospira platensis*, *Nannochloropsis*, *Chlorella sarokiniana*, *Haematococcus pluviialis*, *Tetraselmis suecica* και *Chlorella vulgaris* (Jorquera et al., 2010). Γενικά, οι φωτοβιοαντιδραστήρες εμφανίζουν μεγαλύτερη ογκομετρική παραγωγικότητα από τις ανοιχτές δεξαμενές, καλύτερη δέσμευση της ηλιακής ή τεχνητής ακτινοβολίας, ενώ η κατανάλωση ενέργειας για την ανάμιξη και τη διακίνηση ρευστών και αέριων ποικίλει ( $55-3000 \text{ W/m}^3$ ), όντας όμως σίγουρα μεγαλύτερη από αυτή των ανοιχτών δεξαμενών.

Παρακάτω αναφέρονται οι τέσσερις βασικές κατηγορίες φωτοβιοαντιδραστήρων (Ugwu et al., 2008):

- **Φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας:** Το σπουδαίο πλεονέκτημα αυτών των αντιδραστήρων είναι η μεγάλη επιφάνεια διαθέσιμη για φωτισμό. Κατασκευάζονται κυρίως από διαφανή και διαπερατά στο φως υλικά, με στόχο τη μέγιστη εκμετάλλευση της φωτεινής ακτινοβολίας. Η συσσώρευση του διαλυτοποιημένου οξυγόνου στους φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας είναι σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με τους οριζόντιους αντιδραστήρες. Επίσης, επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις φωτοσύνθεσης καθιστώντας έτσι τους συγκεκριμένους βιοαντιδραστήρες μια εξαιρετική επιλογή για την καλλιέργεια μικροφυκών. Τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν οι συγκεκριμένοι βιοαντιδραστήρες είναι η δυσκολία ελέγχου της θερμοκρασίας της καλλιέργειας, η δυσκολία μεταφοράς της τεχνολογίας από εργαστηριακό σε βιομηχανικό επίπεδο λόγω δυσκολίας και πολυπλοκότητας της κατασκευής, ενώ είναι πιθανό τα κύτταρα να υποστούν υδροδυναμικό στρες.
- **Σωληνοειδής φωτοβιοαντιδραστήρες:** Ανάμεσα σε όλα τα είδη φωτοβιοαντιδραστήρων, οι σωληνοειδής αντιδραστήρες είναι οι πιο κατάλληλοι για καλλιέργειες σε εξωτερικούς χώρους. Οι περισσότεροι αντιδραστήρες αυτού του τύπου είναι κατασκευασμένοι είτε από πλαστικό είτε από γυαλί, και οι καλλιέργειες ανακυκλώνονται με αντλία ή κατά προτίμηση με ένα σύστημα ανόδου με αέρα. Η διάταξη των σωλήνων μπορεί να είναι οριζόντια, κάθετη, σχεδόν οριζόντια, κωνική ή με κλίση (Molina, Fernández, Acién, & Chisti, 2001). Η ανάδευση και η ανάμειξη των καλλιεργειών στους σωληνοειδής βιοαντιδραστήρες επιτυγχάνεται συνήθως με αεραντλία.

Οι αντιδραστήρες αυτού του τύπου διαθέτουν μεγάλη επιφάνεια για την απορρόφηση φωτός, είναι κατάλληλοι για τις εξωτερικές καλλιέργειες, βοηθούν ώστε να αποκτηθεί μεγάλη παραγωγικότητα σε βιομάζα και είναι σχετικά οικονομικοί. Από την άλλη πλευρά, οι καλλιέργειες που αναπτύσσονται στους συγκεκριμένους αντιδραστήρες εμφανίζουν βαθμιδώσεις στο pH και στις

συγκεντρώσεις του CO<sub>2</sub> και του O<sub>2</sub> κατά μήκος των σωληνών, ενώ απαιτούνται μεγάλες εκτάσεις γης για την εγκατάστασή τους. Επίσης, παρουσιάζουν χαμηλά φαινόμενα μεταφοράς μάζας, ενώ είναι δύσκολος ο έλεγχος της θερμοκρασίας. Κατά την εφαρμογή των αντιδραστήρων σε βιομηχανική κλίμακα, το μήκος πρέπει να διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερο κατά την αύξηση της διαμέτρου των σωληνών ώστε ο λόγος τους να παραμένει σχετικά κοντινός στο 0,96. Σε αυτή την περίπτωση, τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο κάτω μέρος των σωληνών δεν δέχονται αρκετό φως για τη σωστή ανάπτυξή τους, εκτός και αν η ανάδευση είναι μεγάλη (Ugwu, Ogbonna, & Tanaka, 2003).

- **Φωτοβιοαντιδραστήρες με κάθετες στήλες:** Οι αντιδραστήρες αυτού του τύπου είναι χαμηλού κόστους, σχετικά συμπαγείς ως προς τον όγκο της κατασκευής τους και εύκολοι στο χειρισμό. Επιπλέον, είναι εύκολο να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανική κλίμακα, ενώ η απόδοσή τους σε βιομάζα μπορεί να προσεγγίσει αυτή των σωληνοειδών φωτοβιοαντιδραστήρων, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Sanchez Miron, Cermen Garcia, Garcia Camacho, Molina Grima, & Chisti, 2002). Εμφανίζουν επίσης έντονα φαινόμενα μεταφοράς, καλή ανάδευση χωρίς όμως να αναπτύσσονται υψηλές διατμητικές τάσεις, χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, αποστειρώνονται εύκολα και επιτρέπουν την ίση κατανομή της φωτεινής ακτινοβολίας στα κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, οι φωτοβιοαντιδραστήρες με κάθετες στήλες διαθέτουν μικρή επιφάνεια απορρόφησης, για την κατασκευή τους απαιτούνται συγκεκριμένα υλικά, παρουσιάζουν δυσκολία στη θερμοστάτηση, ενώ υπάρχει η πιθανότητα να υποστούν υδροδυναμικό στρες.
- **Φωτοβιοαντιδραστήρες με εσωτερικό φωτισμό:** Σε αυτού του τύπου τους αντιδραστήρες, ως πηγή φωτισμού χρησιμοποιούνται φθορίζουσες λάμπες. Επίσης, οι αντιδραστήρες είναι εξοπλισμένοι με ειδικούς αναδευτήρες για ανάδευση της καλλιέργειας, ενώ είναι απαραίτητη η παροχή αέρα και CO<sub>2</sub> σε διάφορα σημεία της καλλιέργειας. Οι συγκεκριμένοι αντιδραστήρες μπορούν να τροποποιηθούν έτσι ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο η τεχνητή όσο και η ηλιακή ακτινοβολία (Ogbonna, Ichige, & Tanaka, 2002). Σε αυτή την

περίπτωση, οι λάμπες φθορισμού απενεργοποιούνται όταν το φυσικό φως επαρκεί για την φωτοσύνθεση. Το μεγάλο πλεονέκτημα αυτών των φωτοβιοαντιδραστήρων είναι το γεγονός πως μπορούν να αποστειρωθούν θερμικά κάτω από υψηλή πίεση, και έτσι οι πιθανότητες μόλυνσης ελαχιστοποιούνται. Επιπλέον η πηγή φωτός μπορεί να είναι διαρκής τόσο τη μέρα όσο και το βράδυ (φυσικό και τεχνητό φως). Παρ' όλα αυτά, οι αντιδραστήρες αυτού του τύπου έχουν μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις.



Εικόνα 1.9. Διάφορα είδη βιοαντιδραστήρων: Α) Φωτοβιοαντιδραστήρες με κάθετες στήλες, Β) Φωτοβιοαντιδραστήρες επίπεδης πλάκας, Γ) Σωληνοειδής φωτοβιοαντιδραστήρες και Δ) Φωτοβιοαντιδραστήρες με εσωτερικό φωτισμό

Σε κάθε σύστημα καλλιέργειας, αρκετοί είναι οι παράγοντες που πρέπει να τηρούνται και να ελέγχονται έτσι ώστε η παραγωγικότητα της βιομάζας να διατηρείται στα επιθυμητά επίπεδα. Οι παράγοντες αυτοί είναι: (i) το βάθος της καλλιέργειας ή η οπτική διαπερατότητα των σωλήνων για τα ανοιχτά και κλειστά συστήματα αντίστοιχα, (ii) η ανατάραξη και η ανάδευση που χρησιμοποιείται, (iii) η παροχή θρεπτικών υλικών και η ανταλλαγή αερίων, (iv) το είδος αντιδραστήρα (διαλείποντος έργου, συνεχούς ή ημι-συνεχούς, συνδυασμός αντιδραστήρων), (v) η

συγκέντρωση της βιομάζας και η επιφανειακή πυκνότητα και (vi) η κατάσταση εγκλιματισμού και προσαρμογής των μικροφυκών (Richmond, 2004).

### **1.2.3 Μέθοδοι ελέγχου της ανάπτυξης των μικροφυκών**

Η επιτυχής ανάπτυξη των μικροφυκών απαιτεί την διαρκή παρακολούθηση των φυσικοχημικών παραμέτρων της καλλιέργειας, όπως το pH, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του διαλυτοποιημένου οξυγόνου και οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών συστατικών. Μία βασική μέθοδος παρακολούθησης της ανάπτυξης των μικροφυκών είναι ο έλεγχος μέσω του μικροσκοπίου, έτσι ώστε να ελεγχθούν οι μορφολογικές αλλαγές ή οι πιθανές επιμολύνσεις από άλλα είδη μικροφυκών, βακτήρια, πρωτόζωα ή μύκητες. Οι συγκέντρωσεις και η σύσταση του θρεπτικού υλικού μπορούν να καθοριστούν από τη μέτρηση του αζώτου, ενώ η συγκέντρωσή του μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέτρο για την προσθήκη άλλων θρεπτικών συστατικών που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη.

Η ανάδευση της καλλιέργειας θα πρέπει να είναι ισχυρή έτσι ώστε να θεωρείται αρκετή για την ομοιογενή κατανομή του θρεπτικού υλικού αλλά και του φωτός, απαραίτητου παράγοντα για την ανάπτυξη του μικροφύκου. Επίσης, η ανάδευση προστατεύει την καλλιέργεια από την συσσώρευση του οξυγόνου στην καλλιέργεια, ειδικά όταν τα κύτταρα αναπτύσσονται σε ένα κλειστό σύστημα. Στην πραγματικότητα, η υπερβολική συγκέντρωση οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε αναστολή της φωτοσύνθεσης και συνεπώς σε μείωση της κυτταρικής βιομάζας. Από την άλλη πλευρά, μια πολύ ισχυρή ανάδευση και ανάμιξη μπορεί να προκαλέσει υδροδυναμικό στρες και συνεπώς μείωση της παραγωγικότητας.

Ο βιοφυσικός και βιοχημικός έλεγχος, αποτελούν ένα τρόπο απεικόνισης της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Συνεπώς πρέπει να πραγματοποιούνται έλεγχοι ώστε να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες στις οποίες η καλλιέργεια παρουσιάζει είτε τη μέγιστη παραγωγή βιομάζας είτε τη σύνθεση κάποιου συγκεκριμένου προϊόντος.

Η συγκέντρωση του διαλυτοποιημένου οξυγόνου αποτελεί έναν αξιόπιστο και ευαίσθητο δείκτη για τη φωτοσυνθετική ικανότητα της καλλιέργειας. Συγκεντρώσεις οξυγόνου της τάξης του  $35 - 45 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ , αντιπροσωπεύουν τη μέγιστη τιμή

υπερκορεσμού σε O<sub>2</sub>, που σε σχέση με τον αέρα μπορεί να αγγίζει και το 500%. Αυτές οι τιμές έχουν παρατηρηθεί σε μεγάλες καλλιέργειες *Spirulina* (της τάξης των 1000 m<sup>-2</sup>), σε ανοιχτές καλλιέργειες όπου η ανάδευση ήταν ανεπαρκής.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης είναι ένας σημαντικός και εξαιρετικά χρήσιμος δείκτης, για την μέτρηση της ανάπτυξης μιας καλλιέργειας μικροφυκών (Vonshak & Torzillo, 2010). Η μη επεμβατικότητα της μεθόδου, η ευαισθησία, η ευκολία χρήσης καθώς και η έγκαιρη πρόβλεψη των αποτελεσμάτων, καθιστούν τη μέθοδο ως μία εύκολη και κατάλληλη τεχνική.

Η οπτική πυκνότητα και οι κύκλοι φωτός και σκότους των κυττάρων αποτελούν τους βασικότερους παράγοντες ανάπτυξης της καλλιέργειας. Οι κύκλοι φωτός και σκότους προκαλούνται από την ανάδευση της καλλιέργειας και πρέπει να είναι σύντομοι (Nedbal, Tichý, Xiong, & Grobbelaar, 1996).

Πιο συγκεκριμένα η οπτική πυκνότητα (Optical Density, OD), αποτελεί ένα μέγεθος που μπορεί εύκολα να μετρηθεί και είναι μια βασική εικόνα ως προς το επίπεδο ανάπτυξης των κυττάρων. Η οπτική πυκνότητα για τα μικροφύκη, μετριέται στα 750 nm. Παραδόξως, η μέγιστη παραγωγικότητα των κυττάρων προκύπτει όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε καλλιέργεια περιορισμένης παροχής φωτός (πυκνές καλλιέργειες), στην οποία όμως ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ο μισός του μέγιστου (Richmond, 2004).

### **1.3 Κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα**

Στα μη συμβατικά συστήματα, η αντίδραση πραγματοποιείται απουσία νερού, με αποτέλεσμα ορισμένες αμφίδρομες αντιδράσεις να οδηγούνται προς την αντίθετη κατεύθυνση (Klibanov, 2001). Έναντι του νερού χρησιμοποιούνται ως διαλύτες συνήθως οργανικοί διαλύτες, υπερκρίσιμα ρευστά ή ιοντικά υγρα (Ionic Liquids, ILs) (Tsitsimpikou, Stamatis, Sereti, Daflos, & Kolisis, 1998). Τα περισσότερα ένζυμα, καταλύουν τις αντιδράσεις αμφίδρομα, χωρίς όμως να ελέγχουν προς πια κατεύθυνση δρουν, αφού αυτό εξαρτάται από το περιβάλλον της αντίδρασης.

### 1.3.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κατάλυσης σε μη συμβατικής συστήματα

Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζει η κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα συνοψίζονται παρακάτω (Cao & Matsuda, 2016) :

- Κατάλυση πολλών χημικών αντιδράσεων που δεν πραγματοποιούνται σε υδατικά συστήματα.
- Εύκολος διαχωρισμός του βιοκαταλύτη από τον οργανικό διαλύτη και τα προϊόντα, λόγω της εξάτμισης του οργανικού διαλύτη σε χαμηλές θερμοκρασίες και πιέσεις.
- Αυξημένη διαλυτότητα των υδροφοβικών υποστρωμάτων σε υδροφοβικούς διαλύτες.
- Περιορισμός των παράπλευρων αντιδράσεων που οφείλονται στην παρουσία νερού.
- Βελτίωση και καλύτερος έλεγχος της χημείο-, τόπο- και στέρεο-εκλεκτικότητας του ενζύμου.
- Ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου, ακόμα και όταν δεν είναι ακινητοποιημένο.
- Περιορισμός της παρεμπόδισης από το υπόστρωμα ή το προϊόν.
- Βελτίωση της σταθερότητας του ενζύμου σε διάφορες θερμοκρασίες.
- Περιορισμός επιμολύνσεων από μικροοργανισμούς.

Επίσης, παρότι σε οργανικό περιβάλλον εμφανίζεται μετουσίωση των ενζύμων, αφού τότε ξεδιπλώνεται η πολυπεπτιδική αλυσίδα, αυτό συμβαίνει μόνο όταν το ένζυμο εμφανίζει υψηλή ευκαμψία (flexibility), η οποία ενισχύεται όταν υπάρχει παρουσία νερού. Απουσία νερού, τα ένζυμα είναι ιδιαίτερα σταθερά σε οργανικούς διαλύτες αφού είναι άκαμπτα (Klibanov, 2001).

Όμως, η μη συμβατική κατάλυση εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα (Cao & Matsuda, 2016) :

- Απενεργοποίηση ενζύμου.



- Περιορισμοί στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας στα διφασικά συστήματα και σε διαλύτες με υψηλό ιξώδες.
- Ανάγκη για αυστηρό έλεγχο της ενεργότητας του νερού σε αντιδράσεις συμπύκνωσης.

### **1.3.2 Διαλύτες που χρησιμοποιούνται σε μη συμβατικά συστήματα**

#### **1.3.2.1 Οργανικοί διαλύτες**

Αποτελούν τους πιο συνηθισμένους διαλύτες σε μη συμβατικά συστήματα λόγω της αυξημένης σταθερότητας που εμφανίζουν τα ένζυμα σε οργανικά διαλύματα (Klibanov, 2001). Διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνά είναι οι αδιάλυτοι στο νερό : εξάνιο, αιθανικός αιθυλεστέρας, ισοπροπυλεστέρας, κανονικό οκτάνιο και οι διαλυτοί στο νερό 2-προπανόλη και το διμεθυλοσουλφοξείδιο. Η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην αντίδραση θα πρέπει να μην εμποδίζει τη δράση του ενζύμου (Cao & Matsuda, 2016).

#### **1.3.2.2 Υπερκρίσιμα ρευστά**

Υπερκρίσιμα χαρακτηρίζονται τα ρευστά που έχουν περάσει το κρίσιμο σημείο και εμφανίζουν ιδιότητες τόσο υγρού (πυκνότητα) όσο και αέριου (διαχυτότητα, χαμηλό ιξώδες, σχεδόν μηδενική επιφανειακή τάση). Η χρήση των υπερκρίσιμων ρευστών ως διαλύτες σε αντιδράσεις, διευκολύνει τον διαχωρισμό του προϊόντος από τον διαλύτη γιατί το ρευστό αεριοποιείται και εξατμίζεται απλά με αποσυμπίεση.

Το CO<sub>2</sub> είναι ένας φιλικός προς το περιβάλλον διαλύτης και το κρίσιμο σημείο του εμφανίζεται στους 31 °C και 7,4 MPa. Η πολικότητα του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη του εξάνιου, με αποτέλεσμα τα υδροφοβικά υποστρώματα να διαλυτοποιούνται αποτελεσματικότερα στο διοξείδιο του άνθρακα. Εξίσου καλός διαλύτης είναι και το υπερκρίσιμο CHF<sub>3</sub> (κρίσιμο σημείο : 26 °C και 4,9 MPa), του οποίου η πολικότητα μεταβάλλεται σημαντικά με τη μεταβολή της θερμοκρασίας και της πίεσης. Για αυτό το λόγο, καθίσταται κατάλληλος διαλύτης τόσο για υδροφοβικές όσο και υδρόφιλες ενώσεις (Cao & Matsuda, 2016).

### 1.3.2.3 Ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά (Ionic Liquids, ILs) είναι διαλύτες που αποτελούνται μόνο από ιόντα και βρίσκονται σε υγρή κατάσταση μέχρι τους 100 °C. Δηλαδή, είναι άλατα με χαμηλό σημείο ζέσης. Παραμένουν σταθερά συνήθως σε θερμοκρασίες μέχρι 200 °C, ενώ ορισμένα μέχρι τους 400 °C. Ο μεγάλος αριθμός πιθανών συνδυασμών ανιόντων - κατιόντων, δίνει τη δυνατότητα σχηματισμού πολλών ιοντικών υγρών. Είναι σημαντικό πως η αλλαγή της δομής των ιόντων μπορεί να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στη συμπεριφορά του ιοντικού υγρού.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα ILs δεν εμφανίζουν μετρήσιμη τάση ατμών. Έτσι, δεν υπάρχουν απώλειες προς το περιβάλλον λόγω εξάτμισης όπως παρατηρείται στους οργανικούς διαλύτες, ενώ εμφανίζουν και μεγάλη απόδοση στην ανάκτηση του προϊόντος κατά την απόσταξη. Εναλλακτικά, το προϊόν μπορεί να ανακτηθεί με εκχύλιση υγρού-υγρού, αφού οι πυκνότητες των ιοντικών υγρών είναι σχετικά υψηλές (1,12-2,40 g·cm<sup>3</sup>) και διαχωρίζονται εύκολα από τους οργανικούς διαλύτες, επιτρέποντας την εύκολη απομόνωση του προϊόντος. Επίσης, ο διαχωρισμός διευκολύνεται και από την μεγάλη πολικότητα που εμφανίζουν. Η πολικότητα του ιοντικού υγρού καθορίζεται από τη φύση των ιόντων από τα οποία αποτελείται και μπορεί να διαφοροποιείται αρκετά (Glaser, 2004).

### 1.3.3 Ένζυμα που είναι σταθερά σε μη-υδατικούς διαλύτες

Η σταθερότητα των ενζύμων στους οργανικούς διαλύτες εξαρτάται από : (1) το είδος του ενζύμου, (2) εάν είναι ακινητοποιημένο, (3) την παρουσία ή όχι πρόσθετων όπως η ζάχαρη, (4) το περιεχόμενο νερό και (5) το είδος του διαλύτη (Cao & Matsuda, 2016).

Τα φυσικά ένζυμα που εμφανίζουν σταθερότητα στους οργανικούς διαλύτες χωρίς κάποια επεξεργασία είναι η LST-03 λιπάση (λιπάση του μικροοργανισμού *Pseudomonas aeruginosa* LST-03), η PST-01 πρωτεάση (πρωτεάση του μικροοργανισμού *P. aeruginosa* PST-01) καθώς και άλλες λιπάσες από τους μικροοργανισμούς *P. aeruginosa* YS-7, *Fusarium heterosporum*, *Pseudomonas* B11-1, *P. ceracia* και *Candida rugosa* (Ogino & Ishikawa, 2001). Από τα ακινητοποιημένα

ένζυμα, οι ακινητοποιημένες λιπάσες εμφανίζουν την μεγαλύτερη σταθερότητα σε μη υδατικούς διαλύτες. Πολύ μεγάλη σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες εμφανίζουν και τα ένζυμα που προέρχονται από θερμοφίλους μικροοργανισμούς, αφού η σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες φαίνεται πως συνδέεται με τη σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες (Cao & Matsuda, 2016).

#### **1.3.4 Ακινητοποίηση ενζύμων**

Προκειμένου να είναι οικονομικά συμφέρον και αποδοτικό ένα ένζυμο θα πρέπει να μπορεί να ανακυκλωθεί και να διατηρεί την ενεργότητά του μετά την αντίδραση. Στα πλεονεκτήματα τα οποία προσφέρει η ενζυμική ακινητοποίηση, πέρα από τη σταθερότητα και τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου περιλαμβάνονται ο αμεσος τερματισμός της αντίδρασης και η απαλλαγή του πειραματιστή από την ανάγκη για ανάκτηση και καθαρισμό του ενζύμου (Idris & Bukhari, 2012).

##### **1.3.4.1 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμου**

Ορισμένες μέθοδοι ακινητοποίησης (Datta, Christena, & Rajaram, 2012; Ogino & Ishikawa, 2001; Tischer & Wedekind, 1999) του ενζύμου στο φορέα είναι οι εξής:

- Χημική διαμόρφωση ενζύμων με αμφιπαθητικές ενώσεις : Όταν τα ένζυμα συνδέονται σε αμφιπαθητικές ενώσεις γίνονται διαλυτά σε υδατικά και οργανικά συστήματα. Λόγω της χημικής τροποποίησης των ελεύθερων αμινομάδων των ενζύμων, χάνεται ένα μέρος της ενεργότητάς τους. Παραδείγμα χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη μέθοδο είναι αμφιπαθητικά πολυμερή, όπως η πολυαιθυλενογλυκόλη (Polyethylene Glucol, PEG). Τα ένζυμα που είναι τροποποιημένα από PEG δεν εμφανίζουν μείωση της δραστηότητάς τους σε οργανικούς διαλύτες, καθώς τα μόρια της PEG δημιουργούν μια υδρόφιλη αλυσίδα γύρω από το κέντρο του ενζύμου, προστατεύοντάς το έτσι από τον οργανικό διαλύτη.
- Φυσική κατεργασία με λιπίδια και επιφανειοδραστικές ουσίες : Επιτυγχάνεται μέσω της λυοφιλίωσης του ενζύμου παρουσία λιπιδίων η επιφανειοδραστικών ουσιών. Τα λυοφιλιωμένα ένζυμα είναι διαλυτά στους οργανικούς διαλύτες και

διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την ενεργότητά τους. Ο μηχανισμός που τα λιπίδια και οι επιφανειοδραστικές ουσίες προστατεύουν το ένζυμο είναι παρόμοιος με τον αντίστοιχο της PEG.

- Ένζυμα σε στερεή κατάσταση : Στερά ένζυμα παράγονται με κρυστάλλωση, λυοφιλίωση ή καθίζηση με προσθήκη ακετόνης σε υδατικό διάλυμα. Η διατήρηση της καταλυτικής δραστηριότητας των λυοφιλιωμένων ενζύμων εξηγείται από το σχηματισμό μιας στιβάδας πρωτεϊνών στην επιφάνεια του στερεού ενζύμου που προστατεύει το καταλυτικό κέντρο από την επαφή με οργανικό διαλύτη. Όμως, λόγω της πολύ κοντινής θέσης που βρίσκονται τα λυοφιλιωμένα κύτταρα, δεν χρησιμοποιείται όλη η επιφάνεια του ενζύμου και είναι απαραίτητη η προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου στην αντίδραση (φαινόμενο της σπηλιάς, cage effect).
- Ενθυλάκωση σε : κυτταρικές μεμβράνες, μικροκάψουλες, λιποσώματα, οργανικούς διαλύτες, γέλη, ιστούς.

Υπάρχουν τέσσερις τρόποι (Tischer & Wedekind, 1999) να ακινητοποιηθεί το ένζυμο σε μια επιφάνεια:

1. Πραγματοποίηση μιας κατάλληλης αντίδρασης για την ακινητοποίηση πριν την σύδεση του ενζύμου με τον φορέα. Σε αυτή τη μέθοδο, παρουσιάζεται μεγάλη απώλεια ενεργότητας, επειδή η πρωτεΐνη τροποποιείται από χημικές ενώσεις που είναι εξαιρετικά δραστικές και όχι πάντα απολύτως συμβατές με το ένζυμο. Αυτό μπορεί να οδηγήσει αργότερα σε μείωση της καταλυτικής ενεργότητας του ενζύμου ή σε αλλαγή της δομής του και συνεπώς την απενεργοποίησή του.
2. Ο φορέας τροποποιείται και ενεργοποιείται. Το ένζυμο προσδένεται κάτω από καθορισμένες συνθήκες στο φορέα μέσω αυθόρμητης αντίδρασης.
3. Χρήση ενός παράγοντα σύζευξης για την ένωση του φορέα και του ενζύμου. Αυτό μπορεί να οδηγήσει και σε ένδομοριακές και διαμοριακές συνδέσεις ενζύμων.
4. Το ένζυμο μπορεί να τροποποιηθεί με τεχνικές ανασυνδασμένου DNA, έτσι ώστε η παραγόμενη πρωτεΐνη να περιέχει συγκεκριμένες ομάδες που απορροφούνται και προσδένονται σε ειδικούς φορείς λόγω βιοσυγγένειας.

Μερικά υλικά τα οποία χρησιμοποιούνται ως φορείς κατά την ακινητοποίηση είναι τα φυσικά πολυμερή όπως το άλας αλγινικού οξέως, η χιτοζάνη και χιτίνη, το κολλαγόνο, η καραγενάνη, η ζελατίνη, η κυτταρίνη, το άμυλο και η πηκτίνη. Επίσης, χρησιμοποιούνται και συνθετικά πολυμερή αλλά και ανόργανα υλικά όπως ο ζεόλιθος, τα κεραμικά, πυριτικά υλικά, γυαλί και ενεργός άνθρακας (Datta et al., 2012).

#### **1.3.4.2 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, Musani, Basri, & Salleh, 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 (Dong Wang, Xu, & Teng, 2007).

Τα ένζυμα αυτά μπορούν να ακινητοποιηθούν εύκολα στις κυτταρικές μεμβράνες, μετά την λύση των κυττάρων, μέσω της λυοφιλίωσης ή *in situ* μετά από κατεργασία με ακετόνη (Szczena-Antczak, Antczak, Rzycka, & Bielecki, 2002). Επίσης, έχει προταθεί η προκατεργασία των κυτταρικών θραυσμάτων με ισοοκτάνιο, έτσι ώστε να αντικατασταθεί η ακινητοποίηση μέσω λυοφιλίωσης που οδηγεί σε μερική μείωση της ενεργότητας του ενζύμου (Dong Wang et al., 2007). Η συνθετική και υδρολυτική δραστηριότητα της λιπάσης που είναι συνδεδεμένη στη μεμβράνη, αυξάνεται συνήθως με προκατεργασία με οργανικούς διαλύτες, όπως το ισοοκτάνιο και η ακετόνη που αναφέρθηκαν προηγουμένως.

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 (Dong Wang et al., 2007).

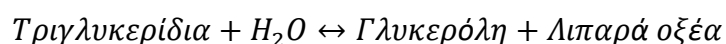
Υπό συγκεκριμένες συνθήκες, η εμφάνιση αυξημένης εξωκυτταρικής ενεργότητας μιας λιπάσης ακολουθείται από ταυτόχρονη πτώση της ενεργότητας των λιπασών από τους πρωτοπλάστες στα κύτταρα. Συνεπώς, προκύπτει το συμπέρασμα πως η λιπάση που βρίσκεται συνδεδεμένη στη κυτταρική μεμβράνη αποτελεί ένα ενδιάμεσο κατά την έκκριση της εξωκυτταρικής λιπάσης (Kennedy et al., 1979).

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 (Dong 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).

### **1.3.5 Λιπάσες**

#### **1.3.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά λιπασών**

Οι λιπάσες είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση. Η αντίδραση που καταλύουν σε υδατικό περιβάλλον περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:



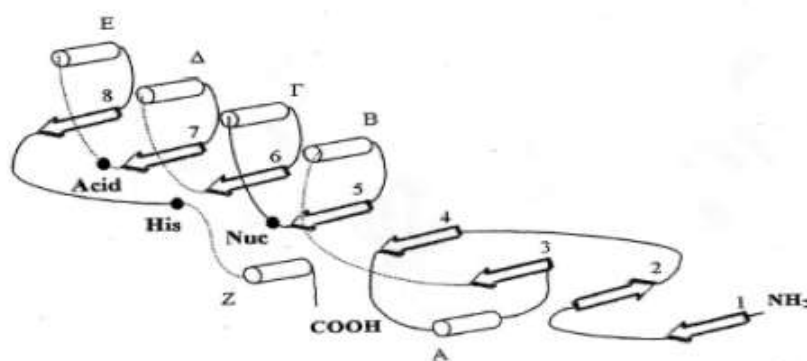
Οι λιπάσες αποτελούν μια κατηγορία ενζύμων, τα οποία έχουν πολύπλευρες δράσεις όπως αυτές της φωσφολιπάσης, λυσοφωσφολιπάσης, εστεράσης της χοληστερόλης, κουτινάσης ή αμιδάσης (Svendsen, 2000). Γενικά, οι λιπάσες

εμφανίζουν προτίμηση σε συγκεκριμένα υποστρώματα είτε αυτά είναι τριγλυκερίδια είτε διγλυκερίδια και συνεπώς έχουν και μονογλυκερίδια και διγλυκερίδια ως παραπροϊόντα εκτός από γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Εναλλακτικά, οι λιπάσες αναφέρονται ως ένζυμα που έχουν τη δυνατότητα να καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης και σύνθεσης εστέρων, και μπορούν να αντιδράσουν ανεξαρτήτως από την παρουσία ή μη μιας σαφώς καθορισμένης διεπιφάνειας (Lopes, Fraga, Fleuri, & Macedo, 2011).

### 1.3.5.2 Δομή λιπάσης

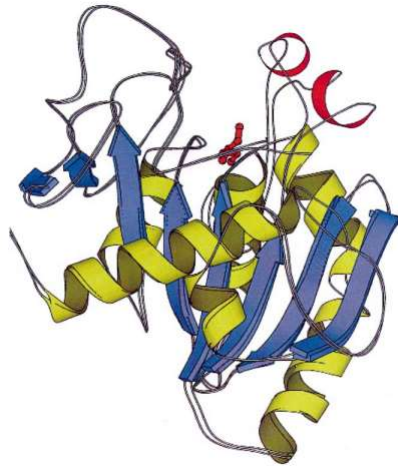
Η δομή των λιπασών, όπως και όλων των πρωτεϊνών, διακρίνεται ως εξής:

- Πρωτοταγής δομή : Οι λιπάσες δεν εμφανίζουν κάποιο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό στην πρωτοταγή δομή τους που να τις διαχωρίζει αισθητά από τα υπόλοιπα ένζυμα. Παρ' όλα αυτά, εμφανίζουν συχνά την κοινή αλληλουχία Gly/Ala-X-Ser-X-Gly (Schmid & Verger, 1998).
- Δευτεροταγής δομή : Η δευτεροταγής δομή των λιπασών, εμφανίζει ορισμένες ιδιαιτερότητες που τις διακρίνουν από τα υπόλοιπα ένζυμα. Σχηματίζεται από παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα τα οποία συνδέονται με α-έλικες (εικόνα 1.10). Η δομή αυτή, που ονομάζεται διαμόρφωση α/β-υδρολάσης, εμφανίζεται πέρα από τις λιπάσες και στην εστεράση, στην καρβοξυπεπτιδάση II, στην υδρολάση της δι-ενολακτόνης και στη δι-εχαλογενάση.



Εικόνα 1.10. Διαμόρφωση α/β υδρολάσης. Τα β-πτυχωτά φύλλα (1-8) είναι συνδεδεμένα με τις α-έλικες (A-Z).

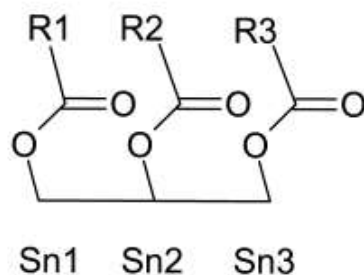
- Τριτοταγής δομή: Η τριτοταγής δομή τα λιπάσης προκύπτει από την τρισδιάστατη απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης.



Εικόνα 1.11. Κρυσταλλική δομή της λιπάσης *Humicola lanuginosa*. Τα β-πτυχωτά φύλλα παρουσιάζονται με μπλε χρώμα ενώ οι α-έλικες με κίτρινο. Με κόκκινους ράβδους απεικονίζεται η δραστική θέση της σερίνης (Lawson, Brzozowski, Rety, Verma, & Dodson, 1994).

Η τοπο-εκλεκτικότητα που εμφανίζουν οι λιπάσες είναι συνήθως αυξημένη για τις θέσεις *sn1* και *sn3* και λιγότερο για τις θέσεις *sn2*. Η θέση στην οποία εμφανίζει τοπο-εκλεκτικότητα η λιπάση είναι σημαντική για την κατασκευή δομημένων λιπιδίων. Η τοπο-εκλεκτικότητα μιας λιπάσης συνήθως εντοπίζεται με αντιδράσεις υδρόλυσης όπου ένα γνωστό υπόστρωμα υδρολύεται μερικώς από τη λιπάση και όλα τα προϊόντα οδηγούνται προς χαρακτηρισμό. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι η πιθανότητα αλλαγής θέσης του αλκυλίου, που μπορεί να οδηγήσει σε λάθος συμπέρασμα (Chandler, 2001). Με βάση την τοπο-εκλεκτικότητα, οι λιπάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη, ανήκουν οι λιπάσες που υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς μόνο στη θέση 1 και 3 και ονομάζονται λιπάσες α-τύπου. Στην δεύτερη κατηγορία, ανήκουν οι λιπάσες που καταλύουν όλους τους εστερικούς δεσμούς και αποτελούν τις λιπάσες αβ-τύπου (Matorí, Asahara, & Ota, 1991).





Εικόνα 1.12. Οι θέσεις τοπο-εκλεκτικότητας της λιπάσης στη γλυκερόλη

### 1.3.5.3 Διαφορές μεταξύ λιπάσης και εστεράσης

Οι διαφορές μεταξύ της λιπάσης και της εστεράσης συχνά δεν είναι διακριτές (Lopes et al., 2011). Οι λιπάσες είναι δραστικότερες σε υποστρώματα τα οποία δεν είναι υδατοδιαλυτά και κυρίως σε τριγλυκερίδια που έχουν συντεθεί από λιπαρά οξέα μακράς ανθρακικής αλυσίδας. Αντιθέτως, οι εστεράσες εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα σε τριγλυκερίδια που προέρχονται από λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα μικρότερη των έξι ανθράκων (<C<sub>6</sub>). Επίσης, οι λιπάσες εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες από τις εστεράσες. Βασική όμως διαφορά μεταξύ των δύο ενζύμων, είναι η εμφάνιση διεπιφανειακής ενεργοποίησης από τις λιπάσες, δράση την οποία δεν εμφανίζουν οι εστεράσες (Verger, 1997). Όταν η λιπάση βρίσκεται σε ανοικτή διαμόρφωση, τότε προσδένεται στη διεπιφάνεια, με αποτέλεσμα η διαμόρφωσή της να σταθεροποιείται και το ένζυμο να είναι ενεργοποιημένο. Τέλος, το βέλτιστο pH δράσης των λιπασών αναφέρεται ως 8-9, ενώ το αντίστοιχο διάστημα στις εστεράσες καλύπτει τις τιμές του pH 5,5-6,5 (Fojan, Jonson, Petersen, & Petersen, 2000; Neves Petersen, Fojan, & Petersen, 2001).

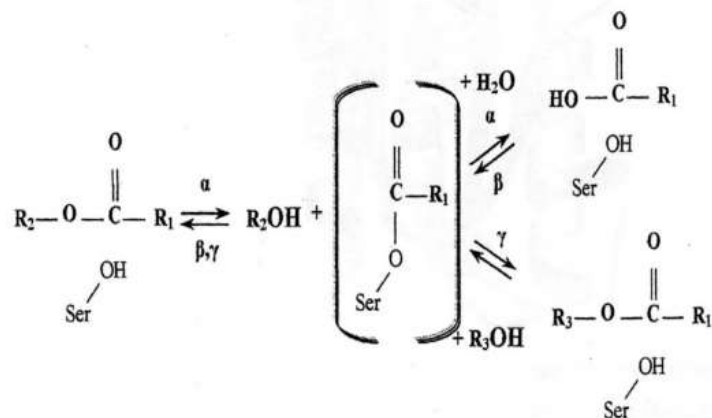
### 1.3.5.4 Καταλυτικός μηχανισμός των λιπασών

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι λιπάσες καταλύουν τις αντιδράσεις στις οποίες συμμετέχουν, είναι όμοιος με τον αντίστοιχο των εστερασών. Αρχικά, σχηματίζεται το σύμπλοκο Michaelis-Menten στο πρώτο στάδιο της ακετυλίωσης, το οποίο προκύπτει από την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η πρώτη τετραεδρική ενδιάμεση κατάσταση σχηματίζεται λόγω της ηλεκτρονιόφιλης προσβολής του άνθρακα στον άνθρακα του καρβονυλίου του εστέρα. Ως δέκτης

πρωτονίου από τη σερίνη, δρα η ιστιδίνη του ενεργού κέντρου, βοηθώντας έτσι την ηλεκτρονιόφιλη προσβολή του άνθρακα. Η ιστιδίνη με τη σειρά της, σταθεροποιείται από το ασπαρτικό ή γλουταμινικό οξύ (τρίτο αμινοξύ του ενεργού κέντρου), μέσω δεσμών υδρογόνου. Η οξυανική οπή που αποτελείται από άτομα αζώτου δύο ή τριών κύριων αλυσίδων, σταθεροποιεί το αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο του καρβονυλίου. Το ενδιάμεσο σύμπλεγμα αποδομείται και οδηγεί στο σχηματισμό του αλκυλο-ενζύμου ενδιάμεσου αφού απομακρυνθεί η αλκοόλη (δέκτης πρωτονίου ιστιδίνης).

Εν συνεχεία, ακολουθεί η υδρόλυση του ενδιάμεσου από μόρια νερού, με τη δράση των ίδιων αμινοξέων του ενεργού κέντρου. Το τριγλυκερίδιο σε συνδυασμό με το ηλεκτρονιόφιλο οξυγόνο της σερίνης σχηματίζει ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, του οποίου ο εστερικός δεσμός υδρολύεται και απελευθερώνεται ένα τριγλυκερίδιο. Τέλος, το λιπαρό οξύ αποσπάται αφού η αλκυλιωμένη σερίνη αντιδρά με ένα μόριο νερού και το αλκυλιωμένο ένζυμο διαχωρίζεται (Smith, Faustinella, & Chan, 1992).

Πιο συγκεκριμένα, στις αντιδράσεις μη συμβατικής εστεροποίησης στις οποίες συμμετέχουν οι λιπάσεις, αρχικά σχηματίζεται το αλκυλο-ένζυμο ενδιάμεσο, όπου ο αλκυλο-δότης είναι ένα καρβοξυλικό οξύ. Εν συνεχεία, το ενδιάμεσο αντιδρά με τον αλκυλο-δέκτη που είναι μία αλκοόλη (πχ. μεθανόλη, αιθανόλη). Μόλις σχηματιστεί το ενδιάμεσο, μπορεί να αντιδράσει με κάθε αλκυλο-δέκτη, με την προϋπόθεση ότι ο δέκτης είναι ικανός να φτάσει την αλκυλο-ομάδα (de Zoete, van Rantwijk, & Sheldon, 1994).

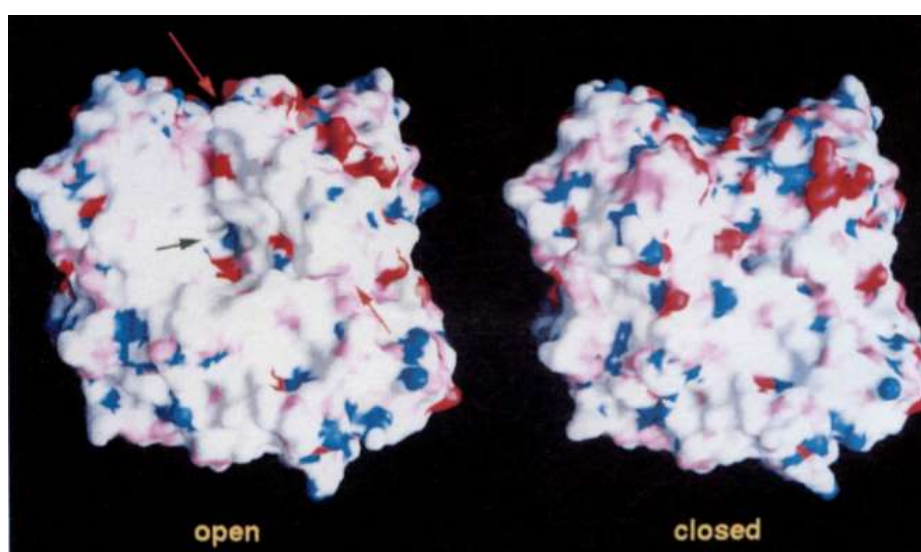


Εικόνα 1.13. Μη συμβατική κατάλυση από λιπάση (α) υδρόλυση, (β) εστεροποίηση και (γ) μετεστεροποίηση

Χαρακτηριστικό των λιπασών είναι η ύπαρξη πεπτιδικού καλύμματος (lid), το οποίο προστατεύει το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το πεπτιδικό κάλυμμα αποτελείται από εξι έως τριάντα αμινοξέα, τα οποία σχηματίζουν μία ή περισσότερες α-έλικες. Τα περισσότερα ένζυμα λοιπόν, ενεργοποιούνται όταν μετακινείται το πεπτιδικό κάλυμμα και εμφανίζεται το ενεργό κέντρο. Ως προς το ενεργό κέντρο, διακρίνονται δύο κατηγορίες λιπασών. Στην πρώτη, το ενεργό κέντρο είναι σχηματισμένο και έτοιμο να δράσει μόλις εμφανισθεί από το πεπτιδικό κάλυμμα. Στην δεύτερη κατηγορία, στην οποία ανήκει και η παγκρεατική λιπάση, απαιτείται και η επιπλέον μετακίνηση και άλλων αμινοξέων (πέρα του πεπτιδικού καλύμματος) έτσι ώστε να καταστεί έτοιμο το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στην παγκρεατική λιπάση συγκεκριμένα, τα επιπλέον αμινοξέα που σχηματίζουν ένα βρόγχο είναι εννέα (Van Tilbeurgh et al., 1993).

Παραδείγματα και άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στη δράση της λιπάσης, είναι και η ύπαρξη μιας συν-λιπάσης (co-lipase), δηλαδή μιας δεύτερης πρωτεΐνης η οποία σταθεροποιεί την ανοικτή διαμόρφωση της λιπάσης που πρόκειται να δράσει, έτσι ώστε να είναι εμφανές το ενεργό κέντρο (Van Tilbeurgh et al., 1993). Άλλος παράγοντας που έχει βρεθεί πως συμμετέχει στη σταθεροποίηση της ανοικτής διαμόρφωσης στην λιπάση από το *Rhizomucor miehei*, είναι ο σχηματισμός μιας ιοντικής γέφυρας μεταξύ μιας αργινίνης και ενός ασπαρτικού οξέος του καλύμματος (Norin, Haeffner, Achour & Hult, 1994).

Παρ' όλα αυτά, ορισμένες λιπάσες εμφανίζουν ανοικτό το πεπτιδικό τους κάλυμμα, ακόμα και όταν δεν βρίσκονται παρουσία του υποστρώματος (Grochulski et al., 1993). Έχουν προταθεί λοιπόν δύο μοντέλα τα οποία προσπαθούν να εξηγήσουν το παραπάνω φαινόμενο. Στο πρώτο, αναφέρεται ότι σε ορισμένα ένζυμα η διαφορά ελεύθερης ενέργειας μεταξύ της κλειστής και ανοικτής διαμόρφωσης είναι αρκετά μικρή, έτσι ώστε ένα μέρος του ενζύμου να διατηρείται σε ανοικτή διαμόρφωση σε υδατικά διαλύματα (Burley, Stephen K., Kim, Joseph L, 1994). Στο δεύτερο, έχει προταθεί πως επικρατεί μια δυναμική ισορροπία μεταξύ της ανοικτής και κλειστής διαμόρφωσης των περισσότερων λιπασών (Kempner, 1993).



Εικόνα 1.14. Ανοικτή και κλειστή διαμόρφωση της λιπάσης του *Candida rugosa* (CRL). Στην ανοικτή διαμόρφωση το πράσινο βέλος υποδεικνύει το ενεργό κέντρο του ενζύμου, ενώ ανάμεσα στα δύο πορτοκαλί βέλη βρίσκεται το πεπτιδικό κάλυμμα (lid) (Pawel Grochulski, Li, Schrag, & Cygler, 1994).

Οι λιπάσες ακολουθούν συγκεκριμένους μηχανισμούς και κινητικές αντίδρασης. Μερικοί από τους πιο σημαντικούς τύπους μηχανισμού αντίδρασης είναι: Michaelis-Menten, Ping-Ping, Ping-Pong Bi-Bi, Τυχαία (ordered) Bi-Bi και Τυχαία Uni-Bi (Malcata, Reyes, Garcia, Hill, & Amundson, 1992).

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και Υλικά

### 2.1 Συσκευές και όργανα

Οι συσκευές και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναφέρονται παρακάτω:

- 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 υπερκάρου νερού Direct-Q, Millipore (Η.Π.Α.)
- 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 UV-VIS Cam Spec M302, Labequip (Καναδάς)
- Φωτόμετρο S-20 Spectrophotometer, Boesco (Γερμανία)
- Αέριος χρωματογράφος Varian 450-GC συζευγμένος με συσκευή φασματομετρίας μάζας Varian 220-MS, Varian (Η.Π.Α.)

### 2.2 Μικροοργανισμός

Ο μικροοργανισμός ο οποίος μελετήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων είναι ο *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 που προμηθεύτηκε από το Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton.

## 2. 2.1 Θρεπτικό μέσο

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε (f/2 medium) αποτελούνταν από τέσσερα διαλύματα, καθένα από τα οποία είχε την παρακάτω σύσταση:

*Διάλυμα Α:* 75 g/L NaNO<sub>3</sub> σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O

*Διάλυμα Β:* 6.65 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O

*Διάλυμα Γ (ιχνοστοιχείων):* Σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O προστίθενται τα παρακάτω άλατα στις εξής περιεκτικότητες:

Πίνακας 2.1. Περιεκτικότητες διαλύματος Γ σε διάφορα άλατα

Συστατικό	Περιεκτικότητα (mg/L)
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3150
Na <sub>2</sub> EDTA	4160
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180

*Διάλυμα Δ (βιταμινών):* Σε απιονισμένο H<sub>2</sub>O προστίθενται οι παρακάτω ενώσεις στις εξής περιεκτικότητες:

Πίνακας 2.2. Περιεκτικότητες διαλύματος Δ στις βιταμίνες Β1, Η και Β12

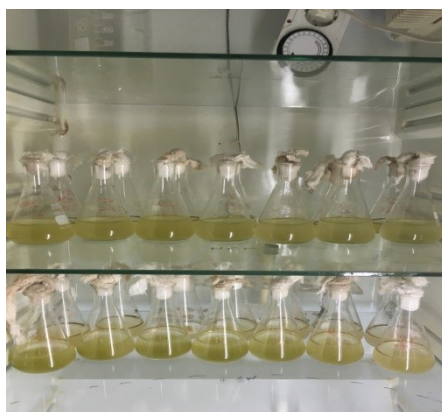
Συστατικό	Περιεκτικότητα (mg/L)
Θειαμίνη HCl (vit. Β1)	100.0
Βιοτίνη (vit. Η)	0.5
Κυανοκοβαλαμίνη (vit. Β12)	0.5



Αφού παρασκευασθούν τα παραπάνω, προστίθεται 1 mL από κάθε διάλυμα σε 1L θαλασσινού νερού επαρκώς φιλτραρισμένου. Η αποστείρωση του θαλασσινού νερού με τα διαλύματα που προστέθηκαν διαρκεί 15 min, σε πίεση 15 psi. Η αποστείρωση του διαλύματος των βιταμινών γινόταν με αποστειρωμένο φίλτρο και όχι στο αυτόκαυστο προς αποφυγήν καταστροφής των βιταμινών (Guillard & Ryther, 1962).

### 2.2.2 Συνθήκες καλλιέργειας

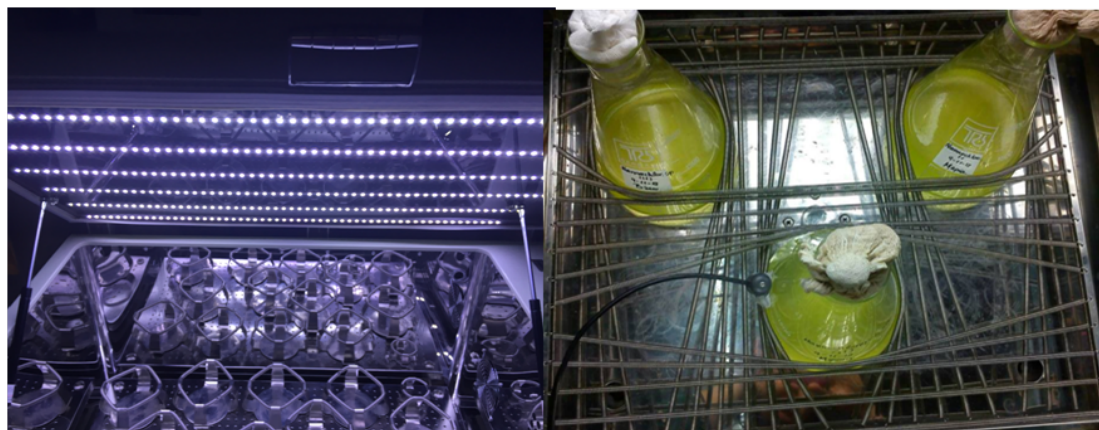
Το στέλεχος *Nannochloropsis* διατηρούνταν σε 50 mL υγρό περιβάλλον (ανακαλλιέργειες) σε κωνικές φιάλες των 100 mL, καλυμμένες με υδρόφοβο βαμβάκι σε επωαστήρα με θερμοκρασία 20 °C, φωτιζόμενο με λάμπες εντασης 75  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , σε κύκλους φωτός, δηλαδή 16 ώρες φώς και 8 ώρες σκοτάδι. Το εμβόλιο αποτελούσε το 10 %v/v του τελικού όγκου της καλλιέργειας και μεταφέρθηκε από ανακαλλιέργεια των 50 mL σε καινούργιο θρεπτικό μέσο (2 %v/v ως προς τον τελικό όγκο της ανακαλλιέργειας). Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το  $\text{NaHCO}_3$  σε συγκέντρωση 0,5 gr/L<sub>καλλιέργειας</sub>.



Εικόνα 2.1. Ανακαλλιέργειες του στελέχους *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779

Για την προετοιμασία του εμβολίου της καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκαν προκαλλιέργειες όγκου 500 mL σε κωνικές φιάλες του 1 L. Χρησιμοποιήθηκαν 450mL αποστειρωμένου θαλασσινού νερού (έπειτα από διπλή διήθηση με διηθητικό χαρτί) και 10%v/v του τελικού όγκου εμβόλιο από την ανακαλλιέργεια. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε ( $\text{NaHCO}_3$ ) είχε συγκέντρωση 1,5 gr/L<sub>καλλιέργειας</sub>, αφού προηγουμένως είχε αποστηρωθεί. Οι προκαλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε

επωαστήρα μόνιμης ανάδευσης 131 grm (προς αποφυγή δημιουργίας συσσωματώματων και καθίζησης των κυττάρων), διαρκούς φωτισμού έντασης 100  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  και θερμοκρασίας 20 °C.



Εικόνα 2.2. Επωαστήρας ZHWY-211C, Zhicheng (Σαγκάη/Κίνα) και καλλιέργειες *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 σε κωνικές φιάλες 2 L

Οι καλλιέργειες, όπως και οι προκαλλιέργειες, πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένο περιβάλλον (hood) για την αποφυγή πιθανών μολύνσεων, ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα με τις παραπάνω συνθήκες. Ο όγκος της καλλιέργειας ήταν 1 L σε κωνικές φιάλες των 2 L. Το εμβόλιο ήταν 10%v/v του τελικού όγκου από την προκαλλιέργεια την 7<sup>η</sup> μέρα ανάπτυξής της, το θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε σε ποσοστό 2 %v/v ως προς τον τελικό όγκο και η πηγή άνθρακα 1,5 gr/L<sub>καλλιέργειας</sub>, αφού προηγουμένως είχε αποστειρωθεί. Προκειμένου να διατηρηθεί σταθερό το pH (8.0) της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0,05 M, προσθέτοντας Tris-Base σε συγκέντρωση 6,053 gr/L<sub>καλλιέργειας</sub>. Η αποστείρωση σε όλες τις περιπτώσεις πραγματοποιήθηκε σε αυτόκαυστο, για 20 min στους 120 °C.



Εικόνα 2.2. Αυτόκαυστο Labo Autoclave, SANYO (Η.Π.Α.)

## 2.3 Συλλογή της βιομάζας

Για την συλλογή της βιομάζας ακολούθησε φυγοκέντρηση του συνόλου της καλλιέργειας για 20 min με ταχύτητα 10000 rpm και θερμοκρασία 0 °C. Μετά την απόχυση του υπερκείμενου υγρού, ακολούθησαν τρεις (3) εκπλύσεις με απιονισμένο νερό για 10 min και απόχυση κάθε φορά του υπερκείμενου υγρού. Στόχος ήταν η αφαίρεση των πιθανών αλάτων που βρίσκονται στο θαλασσινό νερό. Έπειτα η βιομάζα καταψύχθηκε σε χαμηλή θερμοκρασία (-4 °C).



Εικόνα 2.4. Με τη σειρά : Φυγόκεντρος Beckman TJ-6, Beckman J2-21, Beckman (Η.Π.Α.) και ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC-28S, Sorvall (Η.Π.Α.) που χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή βιομάζας

## 2.4 Διάρρηξη κυττάρων και ακινητοποίηση του ενζυμικού σκευάσματος

Έπειτα από τη συλλογή της βιομάζας η οποία πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρηση (10.000 rpm, 10 min, 0 °C), ακολούθησε η λύση των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων (διάρκεια 8 min με διακοπή κάθε 1 min για την αποφυγή υπερθέρμανσης και έντασης 160W) και η έκπλυσή τους με απιονισμένο νερό (τέσσερις φορές στις ανωτέρω συνθήκες ώστε να απομακρθούν τα άλατα). Έπειτα πραγματοποιήθηκε συλλογή των μεμβρανών με φυγοκέντρηση (τέσσερις φορές στις ανωτέρο συνθήκες με επαναδιάλυση σε απιονισμένο νερό) και ακολούθως οι μεμβράνες επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0.



Εικόνα 2.5. Συσκευή λυοφιλίωσης Freezmobile, Virtins (Η.Π.Α.) και συσκευή υπερήχων VC 505 (500 watts) & VC 750 (750 watts), Sonics and Materials (Η.Π.Α.)

Ο όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος που προστίθεται για την επαναδιάλυση προκύπτει συναρτήση του νωπού βάρους των κυττάρων που απομονώνονται από την καλλιέργεια, και πιο συγκεκριμένα από τη σχέση:

$$V_{buffer} = 6 \cdot m_{\text{νωπού βάρους κυττάρων}} + 5$$

Η ακινητοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών έγινε μέσω λυοφιλίωσης. Η διάρκεια της λυοφιλίωσης ήταν 24 h (overnight), με στόχο την ήπια αφυδάτωση.



Εικόνα 2.6. Ενζυμικό σκεύασμα μετά την λυοφιλίωση



## 2.5 Κατασκευή καμπυλών αναφοράς και χημική εστεροποίηση

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς (C(mM)-Area) του κάθε εστέρα, πραγματοποιήθηκε σύνθεση του αντίστοιχου εστέρα με χημική εστεροποίηση.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ανάκτησης του σχηματιζόμενου εστέρα από την αντίδραση χημικής εστεροποίησης. Η αντίδραση εστεροποίησης είναι ισομοριακή, δηλαδή η ποσότητα του σχηματιζόμενου εστέρα αντιστοιχεί ισομοριακά στην ποσότητα λιπαρού οξέος που προστέθηκε. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων για τρία διαθέσιμα λιπαρά οξέα (δωδεκανοϊκό, εξαδεκανοϊκό και στεατικό οξύ). Επειδή η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στο GC-MS δεν επιτρέπει την μέτρηση των λιπαρών οξέων, μετρήθηκαν οι παραγόμενοι εστέρες και συγκρίθηκαν με πρότυπα διαλύματα ώστε να βρεθεί η συγκέντρωσή τους. Έτσι προέκυψε ο παρακάτω πίνακας:

Πίνακας 2.3. Ανάκτηση σχηματιζόμενου εστέρα κατά τον έλεγχο της απόδοσης της χημικής εστεροποίησης

Λιπαρό οξύ	Συγκέντρωση οξέος (μg/mL)	Συγκέντρωση εστέρα (μg/mL)	Ανάκτηση (%)
Λαυρικό (C12:0)	95	103	108.4%
Παλμιτικό (C16:0)	252	252	100%
Στεατικό (C18:0)	105	113	107.6%

Η ανάκτηση αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του σχηματιζόμενου εστέρα προς τη συγκέντρωση του οξέος. Σε όλες τις περιπτώσεις η ανάκτηση βρέθηκε στην περιοχή του 100%, λαμβάνοντας υπ' όψην και τα τυχόν σφάλματα του οργάνου. Έτσι, για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς θεωρήθηκε πως η απόδοση της χημικής εστεροποίησης μέσω της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε, ήταν 100%.

Για τη χημική εστεροποίηση των πρότυπων λιπαρών οξέων λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό και στεατικό οξύ και τη δημιουργία των καμπυλών αναφοράς για τους αντίστοιχους αιθυλεστέρες πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω βήματα (Kail, Link, & Morreale, 2012). Αρχικά δημιουργήθηκε διάλυμα οκτανίου 1 mL με τις παρακάτω συγκεντρώσεις οξέων :

Πίνακας 2.4. Συγκεντρώσεις πρότυπων λιπαρών οξέων στο n-οκτάνιο

Λιπαρό οξύ	Συγκέντρωση (mM)
Λαυρικό οξύ	15
Μυριστικό οξύ	11
Παλμιτικό οξύ	12
Στεατικό οξύ	9

Ύστερα, σε 200 mL του διαλύματος προστέθηκαν 2,5 mL EtOH/HCl 8% v/v και το τελικό μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία τουλάχιστον 60 °C για 15 min. Ύστερα ακολούθησε εκχύλιση (τέσσερις φορές) με 0,5 mL εξάνιο και 0,5 mL διαλύματος CaCl<sub>2</sub> 5 %w/v (το οποίο προστέθηκε μόνο κατά την πρώτη εκχύλιση). Έγινε η υπόθεση πως η μεταροπή των οξέων σε εστέρες είναι 100%.

Το προκύπτον διάλυμα είχε όγκο 2 mL και ήταν αραιωμένο 10 φορές. Ύστερα από διαδοχικές αραιώσεις κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς, αφού τα δείγματα μετρήθηκαν μέσω GC-MS. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα σημεία για τον κάθε εστέρα.

Πίνακας 2.5. Συγκεντρώσεις λαυρικού, μυριστικού, παλμιτικού και στεατικού αιθυλεστέρα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του κάθε εστέρα

Σημείο	Συγκέντρωση λαυρικού αιθυλεστέρα (mM)	Συγκέντρωση μυριστικού αιθυλεστέρα (mM)	Συγκέντρωση παλμιτικού αιθυλεστέρα (mM)	Συγκέντρωση στεατικού αιθυλεστέρα (mM)
1	0,019	0,014	0,015	0,011
2	0,037	0,028	0,030	0,023
3	0,075	0,057	0,060	0,046
4	0,150	0,113	0,121	0,091

Η σύνθεση του μέθυλ-,πρόπυλ- και βούτυλεστέρα του παλμιτικού οξέος, πραγματοποιήθηκε με χημική εστεροποίηση, ακολουθώντας τη μέθοδο που εφαρμόστηκε στους άλλους τέσσερις εστέρες. Όμως για τη σύνθεση του παλμιτικού μεθυλεστέρα, προπυλεστέρα και βουτυλεστέρα, αυτή τη φορά ο καταλύτης (HCl) βρισκόταν κάθε φορά σε διαφορετικό διαλύτη, δηλαδή στη μεθανόλη (HCl /MeOH 8 % v/v), 1-προπανόλη (HCl /προπανόλη 8 % v/v) και 1-βουτανόλη (HCl /βουτανόλη 8

%v/v), αντίστοιχα. Οι συνθήκες και η διαδικασία σύνθεσης και εκχύλισης/προετοιμασίας των δειγμάτων ήταν ίδιες με αυτές των αιθυλεστέρων, με τη χρήση του αντίστοιχου διαλύματος καταλύτη, όπως αναφέρθηκε.

Οι συγκεντρώσεις των εστέρων του παλμιτικού που χρησιμοποιήθηκαν για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς, είναι οι παρακάτω:

Πίνακας 2.6. Συγκεντρώσεις παλμιτικού μεθυλεστέρα, προπυλεστέρα και βουτυλεστέρα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του κάθε εστέρα

Σημείο	Συγκέντρωση παλμιτικού μεθυλεστέρα (mM)	Συγκέντρωση παλμιτικού προπυλεστέρα (mM)	Συγκέντρωση παλμιτικού βουτυλεστέρα (mM)
1	0,001	0,00125	0,002
2	0,005	0,0025	0,004
3	0,01	0,005	0,008
4	0,05	0,01	0,015

## 2.6 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης

Χρησιμοποιήθηκαν θερμαινόμενοι επωαστήρες με ανάδευση (Eppendorf Thermomixer Comfort των 1,5 mL και 2 mL) για όλες τις αντιδράσεις μικρού όγκου. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν 200  $\mu$ L, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε το n-οκτάνιο και το υπόστρωμα ένα καρβοξυλικό οξύ και η αιθανόλη, με σκοπό την σύνθεση αιθυλεστέρων. Η συγκέντρωση του κάθε υποστρώματος ήταν 50 mM, και η συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος ήταν 70 mg/mL (ως προς τον όγκο της αντίδρασης). Επιλέχθηκαν ως αρχικές συνθήκες των αντιδράσεων τα 300 rpm ως ταχύτητα ανάδευσης και θερμοκρασία 40 °C (Surendhiran & Razack, 2015). Οι παραγόμενοι εστέρες ταυτοποιήθηκαν ποιοτικά και μετρήθηκαν ποσοτικά με GC-MS (Varian 450-GC, , Varian 220-MS) για ροή αερίου 1,4 mL/min. Για κάθε σειρά αντιδράσεων, πραγματοποιήθηκαν παράλληλα και αντιδράσεις όπου το λυοφιλιωμένο ενζυμικό σκεύασμα ήταν απενεργοποιημένο (15 min στους 100 °C), καθώς και αντιδράσεις στις οποίες απουσίαζαν τα υποστρώματα. Σκοπός αυτού, ήταν η εξακρίβωση πως η σύνθεση του εστέρα προκύπτει από τη δράση του ενζυμικού σκευάσματος.



Εικόνα 2.7. Thermomixer Comfort, για Eppendorf (Γερμανία) των 1,5mL και 2mL

### **2.6.1 Επίδραση του μεγέθους της αλυσίδας του λιπαρού οξέος**

Μελετήθηκε η εκλεκτικότητα του ενζυμικού σκευάσματος ως προς τα τέσσερα διαθέσιμα λιπαρά οξέα (λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό και στεατικό οξύ) σε συγκέντρωση 50 mM. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες : ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm, θερμοκρασία : 40 °C, συγκέντρωση αιθανόλης : 50 mM, διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L και συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL. Ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12 και 24 ώρες αντίδρασης. Η δειγματοληψία σε κάθε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### **2.6.2 Επίδραση της συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος**

Μελετήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση εστεροποίησης του παλμιτικού οξέος με την αιθανόλης στις εξής συγκεντρώσεις : 30, 50, 70, 90 mg/mL. Οι υπόλοιπες συνθήκες παρέμειναν ως εξής : ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm, διαλύτης : n-οκτάνιο, θερμοκρασία : 40 °C, συγκέντρωση αιθανόλης : 50 mM, συγκέντρωση παλμιτικού οξέος : 50 mM και όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L. Ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12, 24, 36 και 48 ώρες αντίδρασης. Κάθε δείγμα σε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.



### **2.6.3 Επίδραση ταχύτητας ανάδευσης**

Μελετήθηκαν διάφορες ταχύτητες ανάδευσης (300, 600, 900, 1200 rpm) στην αντίδραση εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη σε n-οκτάνιο, με τις υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης να παραμένουν ως εξής: θερμοκρασία : 40 °C, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL, διαλύτης : n-οκτάνιο, συγκέντρωση αιθανόλης : 50 mM, συγκέντρωση παλμιτικού οξέος : 50 mM και όγκος αντίδρασης : 200 μL. Ελήφθησαν δείγματα στις 3, 6, 9, 12 και 15 ώρες αντίδρασης. Κάθε δείγμα σε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### **2.6.4 Επίδραση του περιεχόμενου νερού στην μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος**

Λόγω της μείωσης της συγκέντρωσης του προϊόντος, μελετήθηκε η πιθανότητα να οφείλεται στο υπολειπόμενο νερό μετά τη λυοφιλίωση, το νερό δηλαδή που παράγεται κατά την εστεροποίηση ή που πιθανώς να περιείχαν οι οργανικοί διαλύτες και το ενζυμικό σκεύασμα. Η ύπαρξη νερού θα μπορούσε να δικαιολογήσει την υδρόλυση του προϊόντος και συνεπώς τη μείωση της συγκέντρωσής του. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν τρεις σειρές αντιδράσεων. Στην πρώτη, οι συνθήκες ήταν : θερμοκρασία : 40 °C, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL, συγκέντρωση αιθανόλης : 50 mM, συγκέντρωση παλμιτικού οξέος : 50 mM, διαλύτης : n-οκτάνιο και όγκος αντίδρασης : 200 μL. Στην δεύτερη, οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ίδιες μόνο που οι οργανικοί διαλύτες και τα υποστρώματα είχαν επωαστεί με μοριακά κόσκινα (1 gr μοριακά κόσκινα στο 50 mL διαλύματος). Στην τρίτη σειρά αντιδράσεων, πέρα από τους διαλύτες και τα υποστρώματα, τα μοριακά κόσκινα είχαν προστεθεί και στην αντίδραση έτσι ώστε να απορροφηθεί το παραγόμενο από την εστεροποίηση νερό αλλά και το νερό που μπορεί να περιείχε το ενζυμικό παρασκεύασμα. Ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12 και 24 ώρες της αντίδρασης. Κάθε δείγμα σε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### **2.6.5 Μελέτη της επίδρασης άλλων παραγόντων στην μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος**

Εξετάσθηκε αν η δράση κάποιου άλλου ενζύμου στο ενζυμικό σκεύασμα είναι υπεύθυνη για την μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος ή οφείλεται σε κάποιο φυσικοχημικό φαινόμενο. Για το σκοπό αυτό, προστέθηκε ως υπόστρωμα μόνο παλμιτικός αιθυλεστέρας, συγκέντρωσης 2 mM σε n-οκτάνιο. Συγκεκριμένα οι συνθήκες ήταν : θερμοκρασία : 40 °C, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L. Η συγκέντρωση του εστέρα μετρήθηκε στους χρόνους 0, 12 και 24 ώρες. Κάθε δείγμα σε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### **2.6.6 Μηχανισμός και κινητική της αντίδρασης εστεροποίησης**

Διατηρώντας σταθερή τη συγκέντρωση της αιθανόλης στις τιμές 10, 20, 35 και 50 mM αντίστοιχα για κάθε σειρά πειραμάτων, μεταβλήθηκε η συγκέντρωση του παλμιτικού οξέος με τιμές : 10, 25, 50, 100 και 200 mM. Οι υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης ήταν : θερμοκρασία : 40 °C, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, διαλύτης : n-οκτάνιο, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L. Οι αντιδράσεις όλες διέρκησαν 12 ώρες. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Στόχος ήταν, η συσχέτιση της ταχύτητας της αντίδρασης με την συγκέντρωση του παλμιτικού οξέος για σταθερή συγκέντρωση αιθανόλης, με σκοπό την εύρεση του μηχανισμού της αντίδρασης και εν συνεχεία των κινητικών σταθερών.

### **2.6.7 Επίδραση της θερμοκρασίας**

Μελετήθηκε η αντίδραση σε διαφορετικές θερμοκρασίες (20, 30, 40, 50 °C). Οι υπόλοιπες συνθήκες της αντίδρασης ήταν : ταχύτητα ανάδευσης 600 rpm, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος 70 mg/mL, διαλύτης n-οκτάνιο, συγκέντρωση αιθανόλης : 50 mM, συγκέντρωση παλμιτικού οξέος : 50 mM και όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L. Οι αντιδράσεις όλες διέρκησαν 12 ώρες και πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2.6.8 Επίδραση του μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του μεγέθους της ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας διαφόρων αλκοολών (μεθανόλη, αιθανόλη, n-προπανόλη και n-βουτανόλη) και η εύρεση του καλύτερου αλκύλο-δέκτη, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σε χρόνους 6, 12 και 24 ωρών με τις εξής συνθήκες: συγκέντρωση αλκοόλης : 50 mM, συγκέντρωση παλμιτικού οξέος : 50 mM, διαλύτης : n-οκτάνιο, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40 °C. Ο όγκος της αντίδρασης ήταν πάλι 200 μL. Ελήφθησαν δείγματα στις 6, 12 και 24 ώρες αντίδρασης. Κάθε δείγμα σε διαφορετικό χρόνο, αποτελούσε και διαφορετική αντίδραση. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 2.7 Παρακολούθηση κυτταρικής ανάπτυξης

Η συγκέντρωση της βιομάζας ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) προσδιοριζόταν με έμμεσο τρόπο, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της θολοσιμετρίας. Για το σκοπό αυτό, λαμβάνονταν κάθε δύο μέρες δείγματα όγκου 2 mL από την καλλιέργεια. Μετρήθηκε η απορρόφηση του κυτταρικού αιωρήματος σε μήκος κύματος 750 nm και σε κυψελίδα 1 cm στο φωτόμετρο S-22 UV/VIS Spectrophotometer. Η οπτική πυκνότητα συσχετίστηκε κάθε φορά με την αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς.

Η καμπύλη αναφοράς συσχέτισης ξηρής κυτταρικής βιομάζας περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\text{Βιομάζα } \left(\frac{\text{mg}_{DCW}}{\text{L}}\right) = 227,08 \cdot OD_{750nm}$$

## 2.8 Διαδικασία προσδιορισμού της πρωτεΐνης των κυττάρων *N. oceanica* CCMP1779

Οι πρωτεΐνες (ολικές) προσδιορίστηκαν με την χρωματομετρική μέθοδο Lowry (Lowry, Rosebrough, Lewis Farr, & Randall, 1951). Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αλβουμίνης. Η φωτομέτρηση έγινε στα 750 nm.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν 1mL κύτταρικά θραύσματα (debris).

### Διαλύματα για τη μέθοδο

Για την εφαρμογή της μεθόδου παρασκευάστηκαν οχτώ (8) διαλύματα:

- Διάλυμα Α : 1 % w/v  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,5 gr σε 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Διάλυμα Β : 2 % w/v άλας Rochelle (1 gr σε 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Διάλυμα Γ : 0,2 M NaOH (0,8 gr σε 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Διάλυμα Δ : 4 % w/v ανθρακικό νάτριο (2 gr σε 50 mL  $\text{H}_2\text{O}$ )
- Διάλυμα Ε : 5 mL Folin + 5 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- Διάλυμα Ζ : 24,5 mL Διάλυμα Γ + 24,5 mL Διάλυμα Δ + 0,5 mL Διάλυμα Α + 0,5 mL Διάλυμα Β
- NaOH 5M : 2 gr NaOH σε 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- HCl 4M : 3,28 mL HCl 37% σε 6,72 mL  $\text{H}_2\text{O}$



Εικόνα 2.8. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Lowry

### Πειραματική Διαδικασία

Αρχικά, σε 1 mL κυτταρικών θραυσμάτων προστέθηκε 1 mL 5 M NaOH και το μίγμα επωάσθηκε για 10 min σε υδατόλουτρο των 85 °C. Έπειτα, προστέθηκε 1 mL 4 M HCl. Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για τρία (3) δείγματα (ένα εκ των οποίων είναι το τυφλό). Τα τρία δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και διατηρήθηκε το υπερκείμενο. Σε 0,5 mL του υπερκείμενου προστέθηκαν με την παρακάτω σειρά:

- 2,5 mL Διάλυμα Z. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και ηρεμία για 10 min
- 0,25 mL Διάλυμα E. Ακολούθησε ήπια ανάδευση και ηρεμία για 30 min

Έπειτα ακολούθησε φωτομετρήση στα 750 nm χρησιμοποιώντας ως τυφλό, δείγμα το οποίο αποτελείται από 2,5 mL Διάλυμα Z, 0,25 mL Διάλυμα E και 0,5 mL απιονισμένου H<sub>2</sub>O (αντί του υπερκείμενου).

Η εξίσωση μέσω της οποίας έγινε ο υπολογισμός των πρωτεϊνών είναι η παρακάτω:

$$\frac{\mu\text{g}_{\text{proteins}}}{\text{mL}_{\text{δείγματος}}} = 0,5671 \cdot OD_{750\text{nm}}$$

## **2.9 Διαδικασία προσδιορισμού της ενεργότητας λιπάσης ενζυμικού σκευάσματος**

Μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit, U) ορίζεται το ποσό του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmol προϊόντος ανά λεπτό, σε συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος και σε συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας και pH.

Για τον υπολογισμό της ενεργότητας λιπάσης του ενζυμικού σκευάσματος πραγματοποιήθηκε μια σειρά από αντιδράσεις στις παρακάτω συνθήκες : 30 °C, 1000 rpm και σε χρόνους 0,3,6 και 10 min. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε φιαλίδια αντίδρασης (erpendorf) των 2 mL σε thermomixer. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Διάλυμα 1 : 18 μg pNP-L + 6 mL propanol

- Διάλυμα 2 : 113 mL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 (διβασικό φωσφορικό νάτριο 100 mM/κιτρικό οξύ 50 mM) + 0,25 gr Arabic gum + 0,5 gr Triton X-100
- Διάλυμα αντίδρασης : 4,5 mL Δ/μα. 2 + 0,5 mL Δ/μα. 1

Έπειτα παρασκευάστηκε το δείγμα, καθώς και τα δύο τυφλά δείγματα (“τυφλό ενζύμου” και “τυφλό υποστρώματος”).

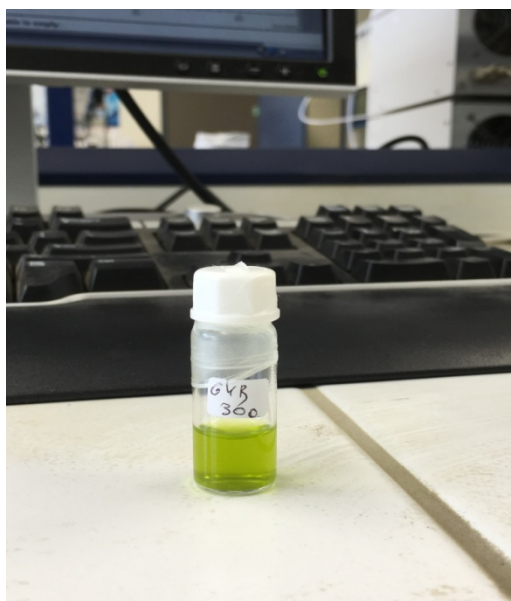
- Δείγμα : 200 μL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 (διβασικό φωσφορικό νάτριο 100 mM/κιτρικό οξύ 50 mM) + 50 μL κυτταρικά θραύσματα + 50 μL διάλυμα αντίδρασης
- Τυφλό ενζύμου: 50 μL κυτταρικά θραύσματα + 250 μL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0
- Τυφλό υποστρώματος: 50 μL διάλυμα αντίδρασης + 250 μL ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0

Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν εις διπλούν. Μετά την αντίδραση τα δείγματα παρέμειναν για 10 min στον πάγο ώστε να σταματήσει η αντίδραση. Έπειτα, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 min και από το υπερκείμενο 250 μL οδηγήθηκε προς φωτομέτρηση στα 410 nm.

## 2.10 Ποσοτικός προσδιορισμός παραγόμενων εστέρων

Για την μέτρηση των παραγόμενων εστέρων από τις ενζυμικές αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας, GC-MS (Varian 450-GC, , Varian 220-MS). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με ροή 1,4 mL/min. Για την προετοιμασία του δείγματος, ώστε να είναι κατάλληλο για μέτρηση στο GC-MS, πραγματοποιήθηκε τετραπλή εκχύλιση των εστέρων σε εξάνιο. Αναλυτικά, στα 200 μL της αντίδρασης προστέθηκε αρχικά διάλυμα 0,5 mL CaCl<sub>2</sub> 5% w/v και 0,5 mL εξάνιο ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις. Ύστερα, απομακρύνθηκε η πάνω φάση (εξάνιο) και στην κάτω φάση (CaCl<sub>2</sub>) προστέθηκε εκ νέου 0,5mL εξάνιο, έτσι ώστε η εκχύλιση να έχει απόδοση της τάξης 99%. Στη συνέχεια συλλέχθηκε η πάνω φάση, ενώ η κάτω απορρίπτεται. Η συγκεκριμένη

διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Το δείγμα περιείχε τους εκχυλισμένους εστέρες και ήταν έτοιμο για ανάλυση.



Εικόνα 2.9. Εκχύλισμα εστέρων σε εξάνιο

Για την ανάλυση στο χρωματοφράγο GC-MS απαιτείται 1  $\mu\text{L}$  από το εκχυλισμένο δείγμα. Η μέθοδος που επιλέχθηκε, είναι η FAME HP 88, κατάλληλη για τη μέτρηση των εστέρων που παράγονται κατά την εστεροποίηση από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του Varian 450-GC ορίστηκε ως εξής: Αρχική θερμοκρασία 125  $^{\circ}\text{C}$  και αύξηση της θερμοκρασίας στους 145  $^{\circ}\text{C}$  με ρυθμό 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Παραμονή στους 145  $^{\circ}\text{C}$  για 26 min και έπειτα αύξηση της θερμοκρασίας έως τους 220  $^{\circ}\text{C}$  με ρυθμό 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Κάθε μέτρηση διαρκούσε συνολικά 66 min.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του Varian 220-MS ήταν το εύρος μαζών ( $m/z$ ) : 40 έως 650 και η αναμονή έναρξης λειτουργίας 8min μετά την είσοδο του δείγματος ώστε να εξατμιστεί ο διαλύτης. Ως αναλυτής χρησιμοποιήθηκε παγίδα ιόντων (Ion trap), ενώ ως πηγή ιονισμού η πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact). Οι διαστάσεις της στήλης (Agilent Technologies VF-23ms, Ολλανδία) που χρησιμοποιήθηκε ήταν 60 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ .



Εικόνα 2.10. Χρωματογράφος GC-MS Variant, Variant (Η.Π.Α.) που χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των εστέρων

## 2.11 Χημικά αντιδραστήρια-Αναλώσιμα υλικά

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma – Aldrich (Η.Π.Α.), Panreac (Ισπανία), Merck (Γερμανία), Lach-Ner (Τσεχία), LAB-SCAN (Ιρλανδία) και Fisher Scientific (Η.Π.Α), και η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού. Τα πλαστικά και γυάλινα εργαστηριακά είδη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Greiner-Bio One (Γερμανία), Eppendorf (Γερμανία), Whatman (Ηνωμένο Βασίλειο), Millipore (Η.Π.Α.), Sterilin Limited (Ηνωμένο Βασίλειο), SIMAX (Τσεχία), SCHOTT AG (Γερμανία/αυ), BOMEX (Κίνα) και ISO LAB (Γερμανία).



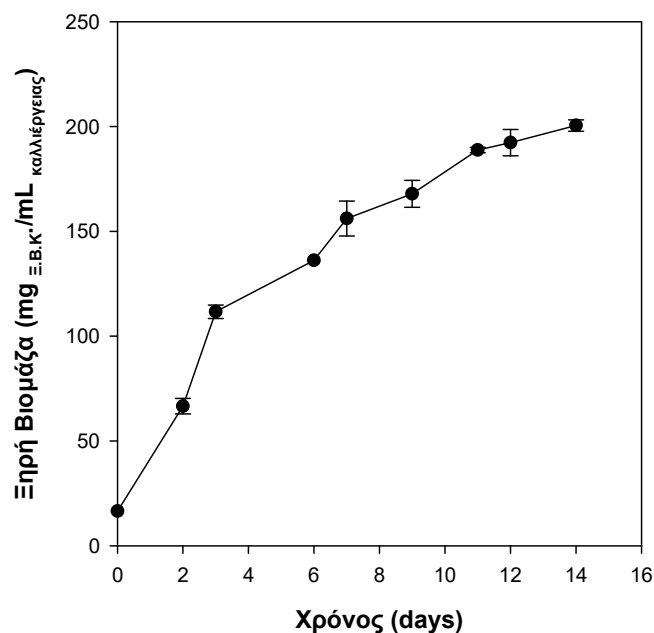
## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



## Κεφάλαιο 3. Αποτελέσματα

### 3.1 Μελέτη κυτταρικής ανάπτυξης

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των καλλιιεργειών γινόταν ανά δύο ημέρες, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα:



Διάγραμμα 1.1. Παρακολούθηση ανάπτυξης κυττάρων του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779

Η τιμή του pH των καλλιιεργειών παρέμενε σχετικά σταθερή (ίση με 8) καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης των καλλιιεργειών. Αυτό οφείλεται στην προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 0,05 M.

### 3.2 Υπολογισμός ενεργότητας λιπάσης ενζυμικού σκευάσματος

Εξαιτίας του γεγονότος ότι κάθε καλλιέργεια αποτελούσε και ένα ξεχωριστό σύστημα, η ενεργότητα λιπάσης του ενζυμικού σκευάσματος διέφερε κάθε φορά, από τη μία καλλιέργεια στην άλλη. Για το λόγο αυτό λοιπόν, το σύνολο των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας δύο μεγάλες ποσότητες ενζυμικού σκευάσματος (συλλογή

περίπου 15 L καλλιέργειας για την κάθε μία από τις δύο παρτίδες). Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκαν οι ενεργότητες των δύο παρτίδων ώστε να διαπιστωθεί ότι η ενεργότητα του ενζυμικού σκευάσματος είναι σχετικά ίδια στις δύο μεγάλες παρτίδες.

Σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry υπολογίστηκε η περιεκτικότητα της κάθε παρτίδας σε συνολικές πρωτεΐνες ίση με :  $0,523 \frac{\mu\text{g πρωτεΐνης}}{\text{mL δείγματος}}$

Πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενεργότητας λιπάσης του ενζυμικού σκευάσματος και σε συνδυασμό με την περιεχόμενη πρωτεΐνη του δείγματος προέκυψε ίση με:

$$53,11 \pm 2,43 \frac{\text{Units}}{\text{mg πρωτεΐνης}}$$

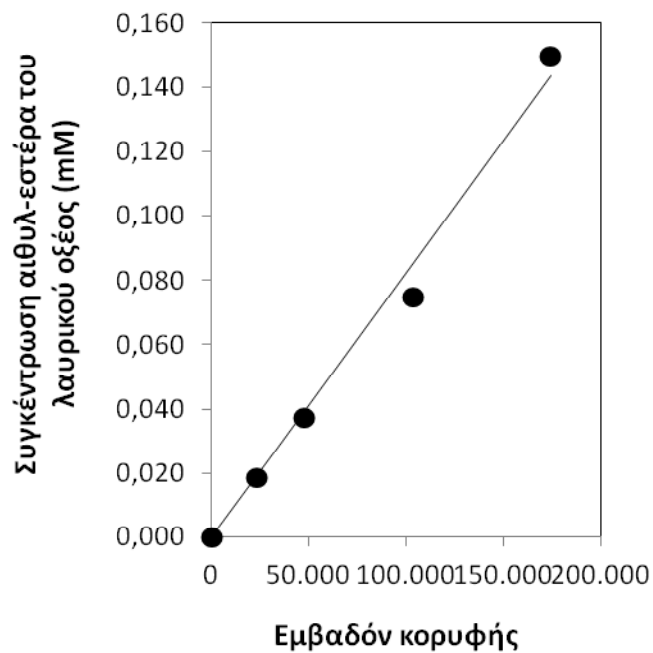
### 3.3 Κατασκευή καμπυλών αναφοράς εστέρων

Ο προσδιορισμός των εστέρων των λιπαρών οξέων πραγματοποιήθηκε με χρήση GC-MS (Varian 450-GC, , Varian 220-MS). Ακολούθησε χημική σύνθεση των εστέρων όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.5 του Κεφαλαίου Μέθοδοι και Υλικά.

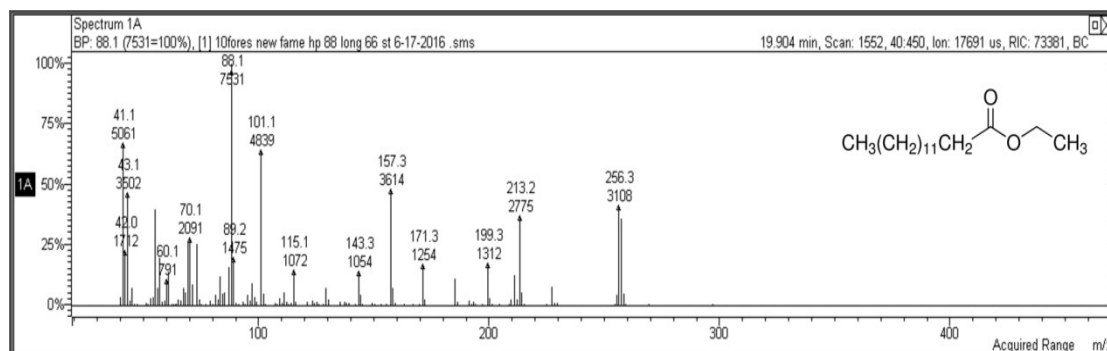
Μέσω της καμπύλης αναφοράς συνδέθηκε το αποδιδόμενο εμβαδόν κορυφής από το GC-MS, με τη συγκέντρωση του αντίστοιχου εστέρα. Τα ιόντα ποσοτικοποίησης (quantifying ions) που χρησιμοποιήθηκαν για τους αιθυλεστέρες του λαυρικού, παλμιτικού , μυριστικού και στεατικού ήταν ήταν τα 101+88.

Ομοίως, για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς του παλμιτικού μεθυλεστέρα, του παλμιτικού προπυλεστέρα και παλμιτικού βουτυλεστέρα χρησιμοποιήθηκε το GC-MS. Τα ιόντα ποσοτικοποίησης (quantifying ions) που χρησιμοποιήθηκαν για τον παλμιτικό μεθυλεστέρα ήταν τα 43+74+87, για τον παλμιτικό προπυλεστέρα 43+61+73 και τον παλμιτικό βουτυλεστέρα 56+83. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις συγκεντρώσεις για κάθε εστέρα (παράγραφος 2.5) ώστε να κατασκευασθεί η καμπύλη αναφοράς, ενώ το φάσμα κάθε εστέρα αποτέλεσε και τον τρόπο ταυτοποίησης της ένωσης από το GC-MS.

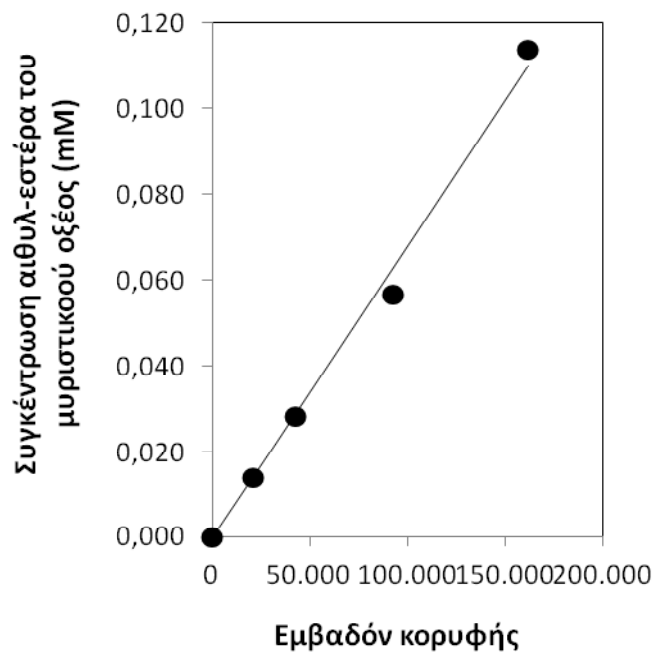




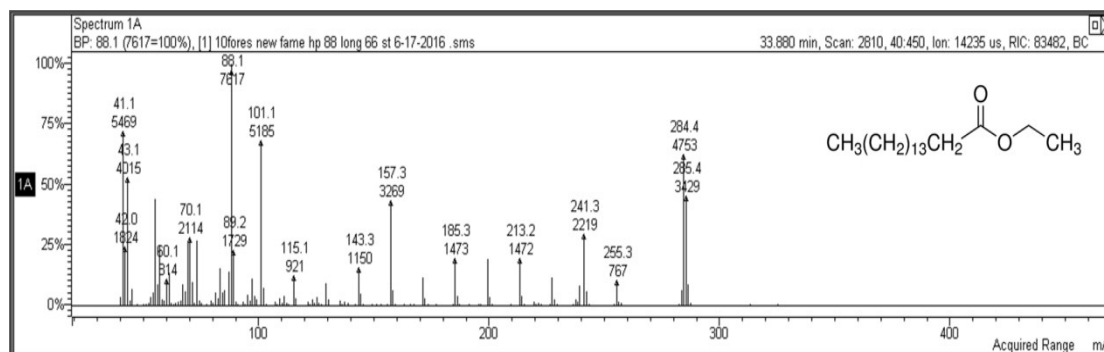
Διάγραμμα 3.2. Καμπύλη αναφοράς λαυρικού αιθυλεστερά



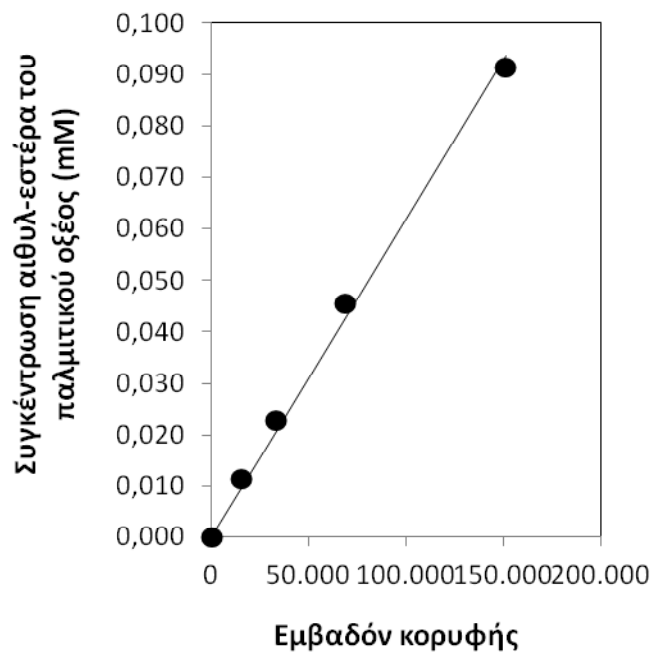
Σχήμα 3.3. Θραύσματα ιόντων από το MS του μυριστικού αιθυλεστερά



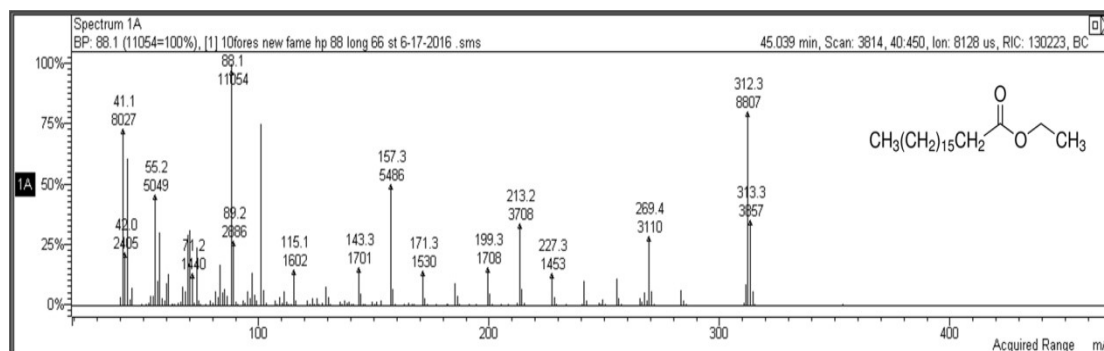
Διάγραμμα 3.3. Καμπύλη αναφοράς μυριστικού αιθυλεστέρα



Σχήμα 3.4. Θραύσματα ιόντων από το MS του παλμιτικού αιθυλεστέρα

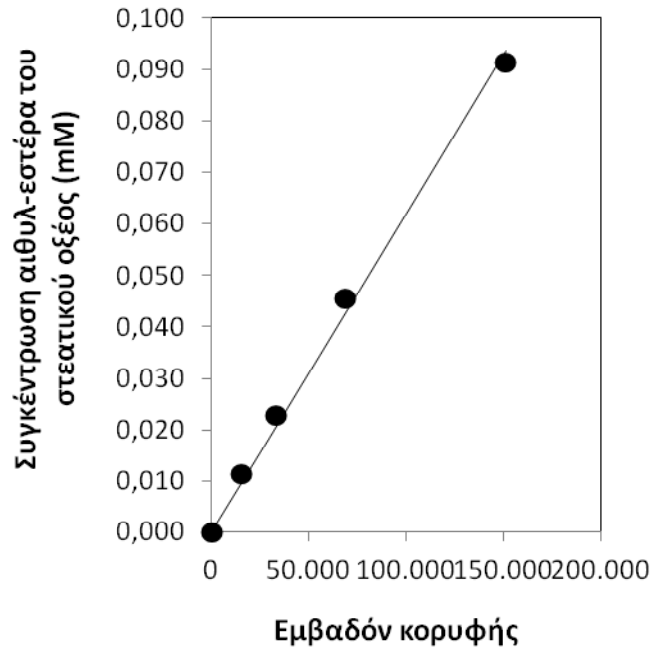


Διάγραμμα 3.4. Καμπύλη αναφοράς παλμιτικού αιθυλεστέρα

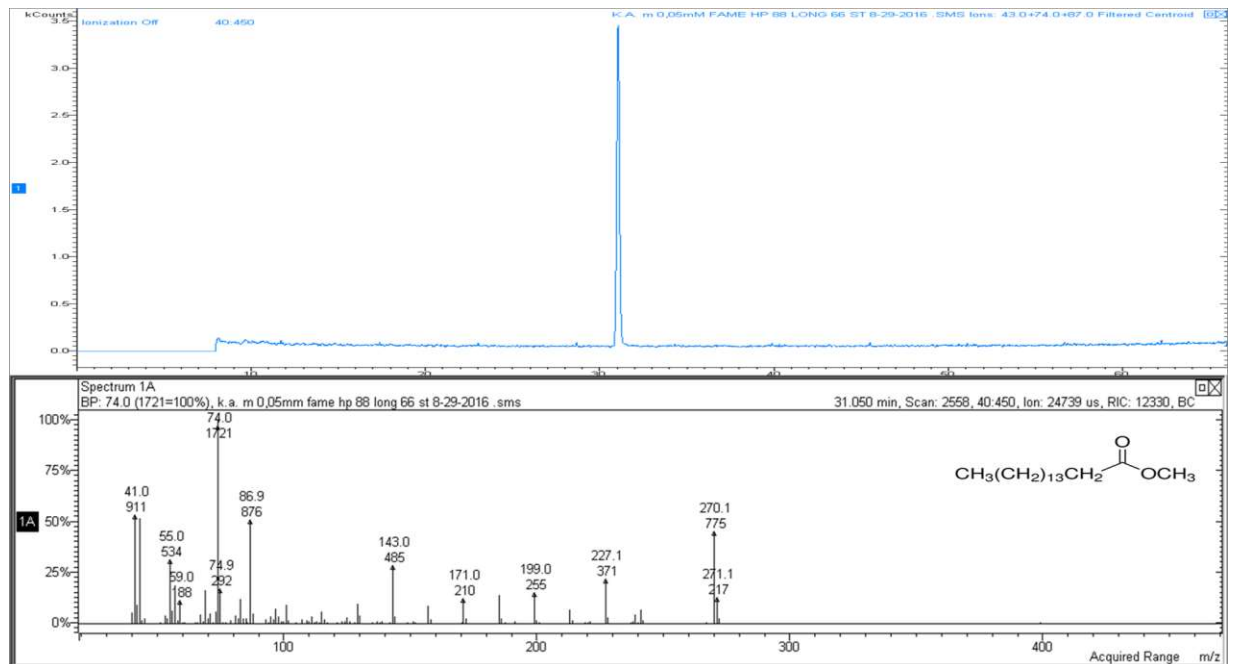


Σχήμα 3.5. Θραύσματα ιόντων από το MS του στεατικού αιθυλεστέρα

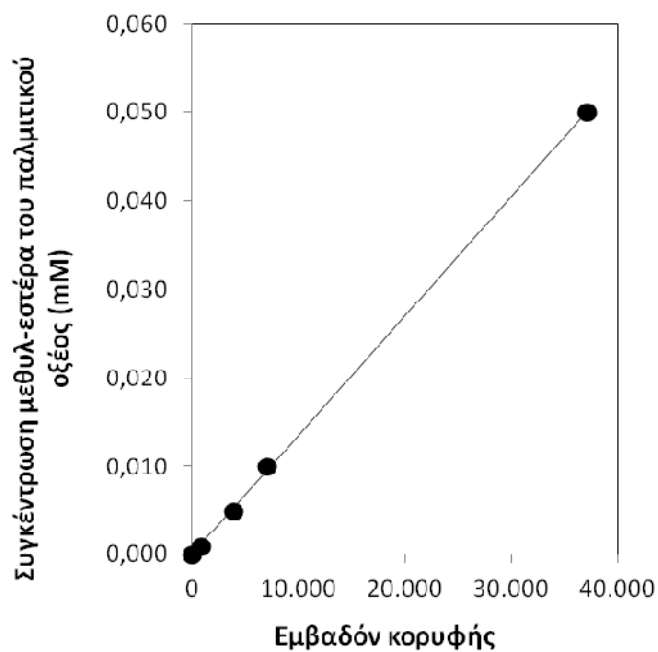




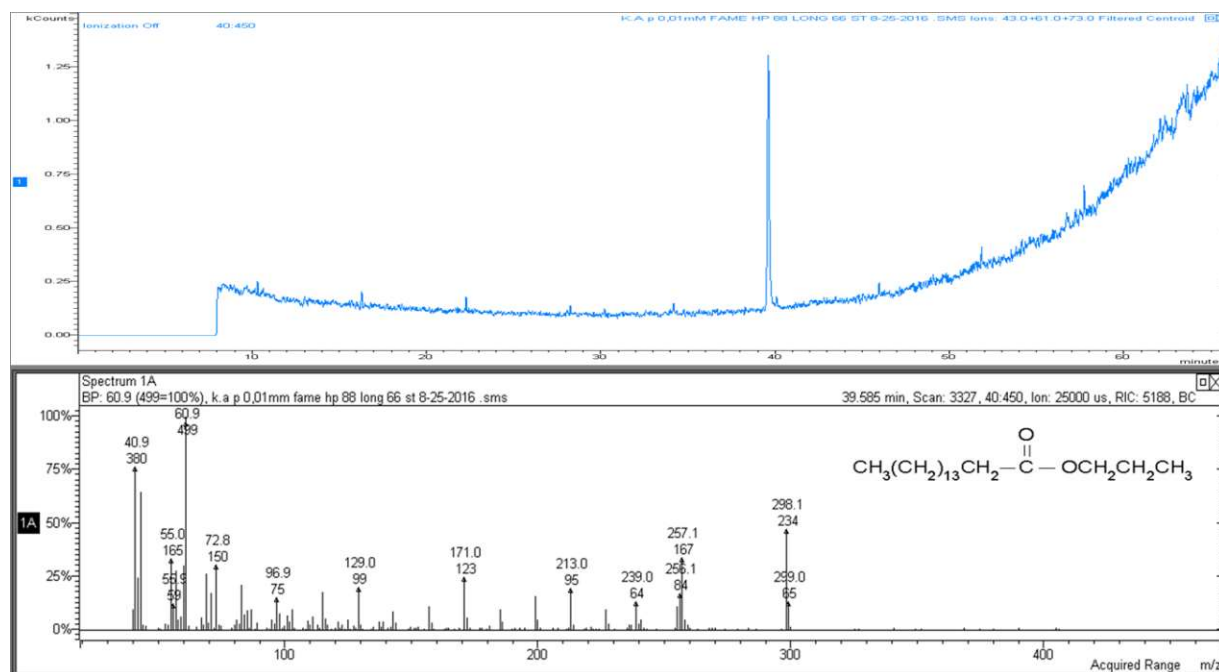
Διάγραμμα 3.5. Καμπύλη αναφοράς στεατικού αιθυλεστέρα



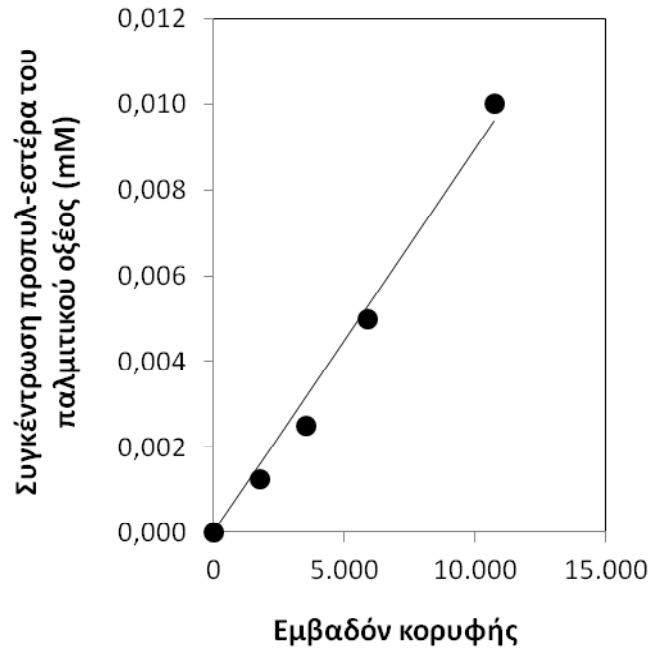
Σχήμα 3.6. Χρόνος έκλουσης παλμτικού μεθυλεστέρα στο GC-MS και θραύσματα ιόντων από το MS



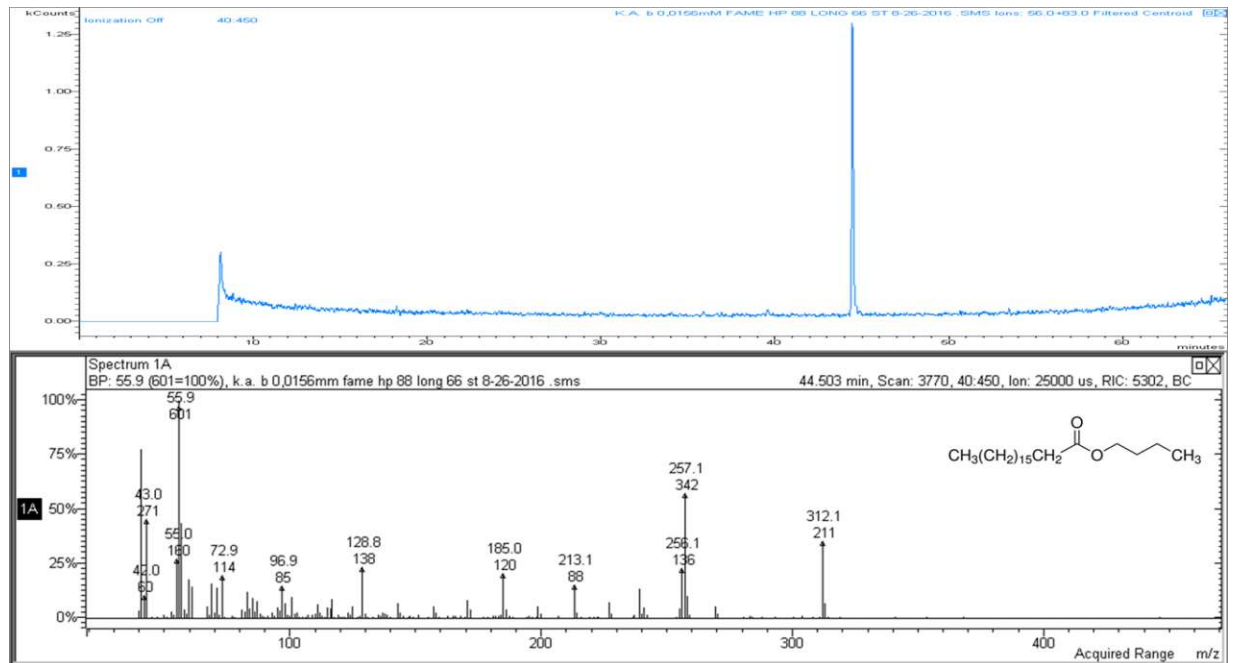
Διάγραμμα 3.6. Καμπύλη αναφοράς παλμιτικού μεθυλεστέρα



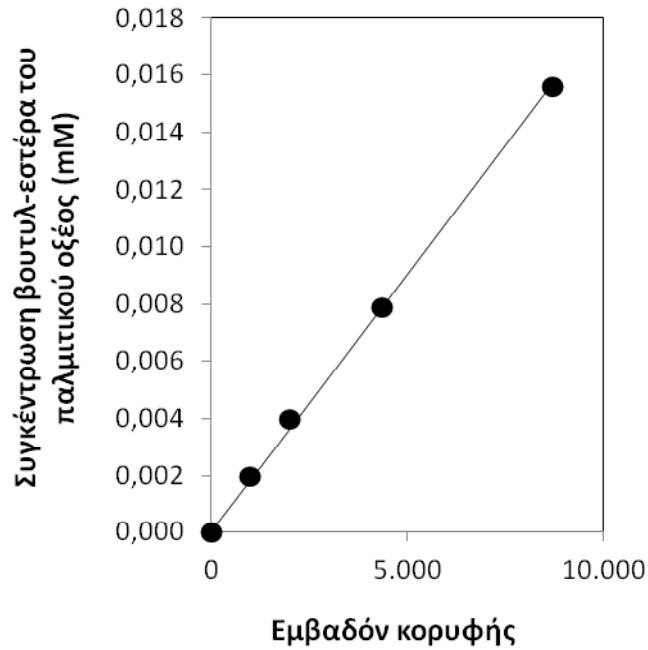
Σχήμα 3.7. Χρόνος έκλουσης παλμιτικού προπυλεστέρα στο GC-MS και θραύσματα ιόντων από το MS



Διάγραμμα 3.7. Καμπύλη αναφοράς παλμιτικού προπυλεστέρα



Σχήμα 3.8. Χρόνος έκλουσης παλμιτικού βουτυλεστέρα στο GC-MS και θραύσματα ιόντων από το MS



Διάγραμμα 3.8. Καμπύλη αναφοράς παλμιτικού βουτυλεστέρα

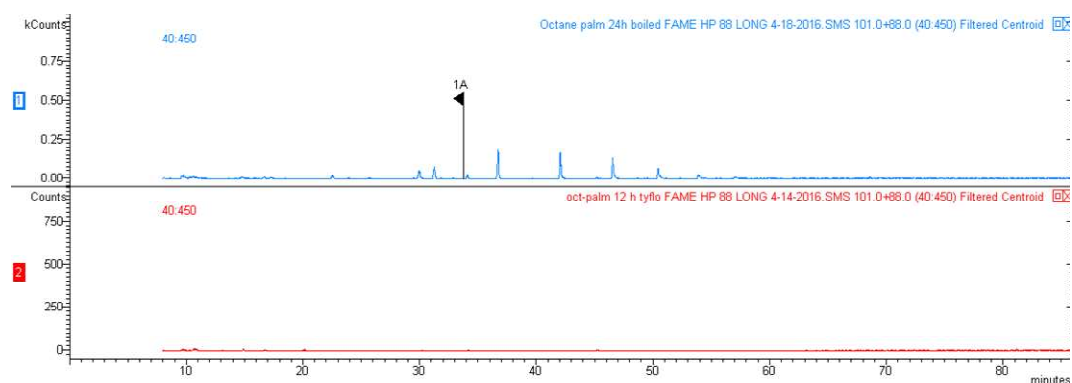
Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι η σύνδεση μεταξύ του αποδιδόμενου εμβαδού της κορυφής που προκύπτει από το GC-MS και της συγκέντρωσης για κάθε αιθυλεστέρα, είναι:

- λαυρικός αιθυλεστέρας :  $C(mM) = 8,24 \cdot 10^{-7} * Area,$  ( $R^2 = 0,9840$ )
- μυριστικός αιθυλεστέρας :  $C(mM) = 6,79 \cdot 10^{-7} * Area,$  ( $R^2 = 0,9904$ )
- παλμιτικός αιθυλεστέρας :  $C(mM) = 6,38 \cdot 10^{-7} * Area,$  ( $R^2 = 0,9988$ )
- στεατικός αιθυλεστέρας :  $C(mM) = 6,20 \cdot 10^{-7} * Area,$  ( $R^2 = 0,9941$ )
- παλμιτικός μεθυλεστέρας :  $C(mM) = 1,35 \cdot 10^{-6} * Area,$  ( $R^2 = 0,9977$ )
- παλμιτικός προπυλεστέρας :  $C(mM) = 8,92 \cdot 10^{-7} * Area,$  ( $R^2 = 0,9820$ )
- παλμιτικός βουτυλεστέρας :  $C(mM) = 1,81 \cdot 10^{-6} * Area,$  ( $R^2 = 0,9980$ )

### 3.4 Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος από το *N. oceanica* CCMP1779

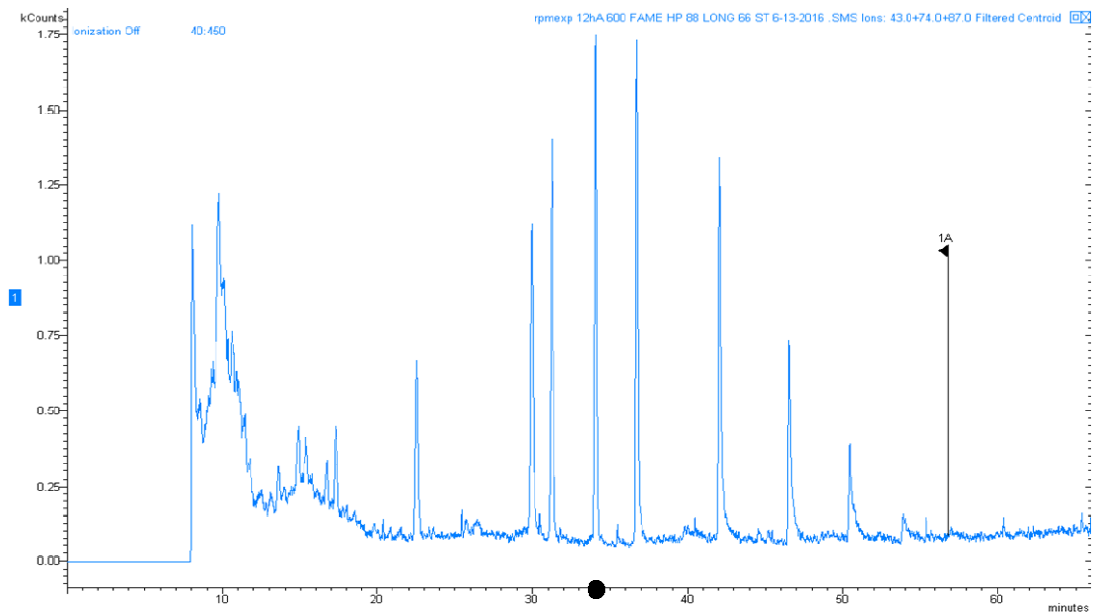
#### 3.4.1 Επίδραση μήκους ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην αντίδραση εστεροποίησης

Αρχικά, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως όλα τα τυφλά δείγματα, αλλά και αυτά που περιείχαν απενεργοποιημένο ένζυμο, δεν οδήγησαν σε καμία παραγωγή εστέρα όπως φαίνεται στις παρακάτω εικόνες (Σχήμα 3.9), με αποτέλεσμα να αποδοθεί ασφαλώς η παραγωγή του εστέρα στη δράση του ενζυμικού σκευάσματος.



Σχήμα 3.9. Χρωματογράφημα δείγματος με απενεργοποιημένο ένζυμο (μπλε) και δείγματος χωρίς υποστρώματα (κόκκινο)

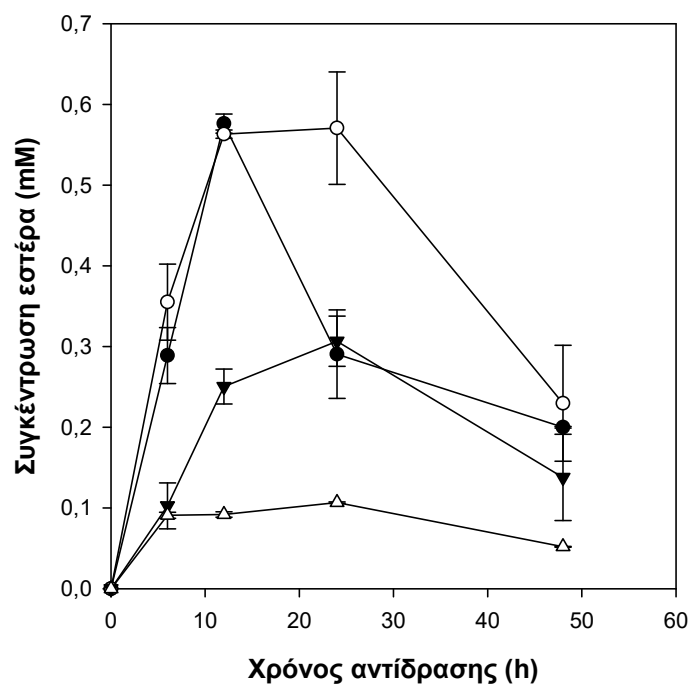
Σε αντίθεση, τα χρωματογραφήματα που προέκυψαν από τις αντιδράσεις όπου το ένζυμο δεν ήταν απενεργοποιημένο και τα υποστρώματα είχαν προστεθεί κανονικά, είχαν την παρακάτω μορφή (Σχήμα 3.10). Ο εστέρας (παλμιτικός αιθυλεστέρας) εντοπίζεται περίπου στα 34 min, εκεί όπου έχει επισημανθεί με το αντίστοιχο σύμβολο (●). Οι υπόλοιπες κορυφές αντιστοιχούν σε σύνθετες χημικές ενώσεις που πιθανώς προήλθαν από το ενζυμικό σκεύασμα.



Σχήμα 3.10. Χρωματογράφημα δείγματος που προέκυψε από την ενζυμική εστεροποίηση παλμιτικού οξέος με αιθανόλη, (●) εμφάνιση του παλμιτικού αιθυλεστέρα.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά λιπαρά οξέα με σκοπό την εύρεση του οξέος στο οποίο το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτά ήταν το λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό και στεατικό οξύ. Η συγκέντρωση κάθε φορά ήταν ίδια για όλα τα οξέα, δηλαδή 50 mM. Όλες οι υπόλοιπες συνθήκες παρέμειναν ίδιες (50 mM EtOH, 300 rpm, περιεκτικότητα ενζυμικού παρασκευάσματος : 70 mg/mL, θερμοκρασία : 40 °C). Η μέτρηση των εστέρων που σχηματίστηκαν πραγματοποιήθηκε με GC-MS (Varian 450-GC, , Varian 220-MS) και η μετατροπή τους σε συγκέντρωση μέσω της καμπύλης αναφοράς.

Στο Διάγραμμα 3.9 παρουσιάζεται η συσχέτιση της συγκέντρωσης του προϊόντος (λαυρικός, μυριστικός, παλμιτικός και στεατικός αιθυλεστέρας) με τον χρόνο αντίδρασης :



Διάγραμμα 3.9. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου εστέρα και επίδραση του λιπαρού οξέος στην αντίδραση εστεροποίησης με αιθανόλη από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP 1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης: n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200 mL, υποστρώματα : 50 mM λιπαρού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40 °C

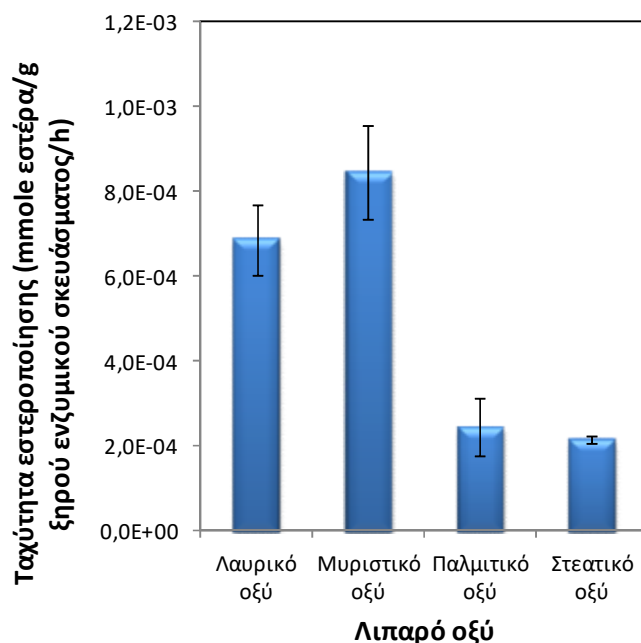
Σύμβολα: (●) λαυρικό οξύ, (○) μυριστικό οξύ, (▼) παλμιτικό οξύ και (△) στεατικό οξύ.

Από το διάγραμμα της χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης του παραγόμενου αιθυλεστέρα, προκύπτει ότι μετά τις 12 ώρες για το λαυρικό και μυριστικό οξύ και μετά τις 24 ώρες για το παλμιτικό και το στεατικό οξύ, παρατηρείται πτώση της συγκέντρωσης του προϊόντος. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς οφείλεται στο φαινόμενο της ρόφησης του προϊόντος από το ενζυμικό σκεύασμα και μελετήθηκε στην παράγραφο 3.4.4.

Στο Διάγραμμα 3.10 που ακολουθεί παρουσιάζεται η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης σύνθεσης των τεσσάρων εστέρων (αιθυλεστέρας του λαυρικού, μυριστικού, παλμιτικού και στεατικού οξέος) στις 6 ώρες αντίδρασης. Η ταχύτητα της αντίδρασης, προκύπτει από την απλή διαίρεση της συγκέντρωσης του παραγόμενου παλμιτικού αιθυλεστέρα, προς τον αντίστοιχο χρόνο της αντίδρασης

και τη συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος (ξηρό ενζυμικό σκεύασμα) στην αντίδραση.

$$\text{Ταχύτητα αντίδρασης (mmole} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{Συγκέντρωση εστέρα (mmole} \cdot \text{L}^{-1})}{\text{Χρόνος (h)} \cdot \text{Συγκέντρωση Ενζυμικού Σκευάσματος (g} \cdot \text{L}^{-1})}$$



Διάγραμμα 3.10. Επίδραση του μεγέθους της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην αντίδραση εστεροποίησης με αιθανόλη από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκους *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu\text{L}$  υποστρώματα : 50 mM λιπαρού οξέος, , 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}\text{C}$

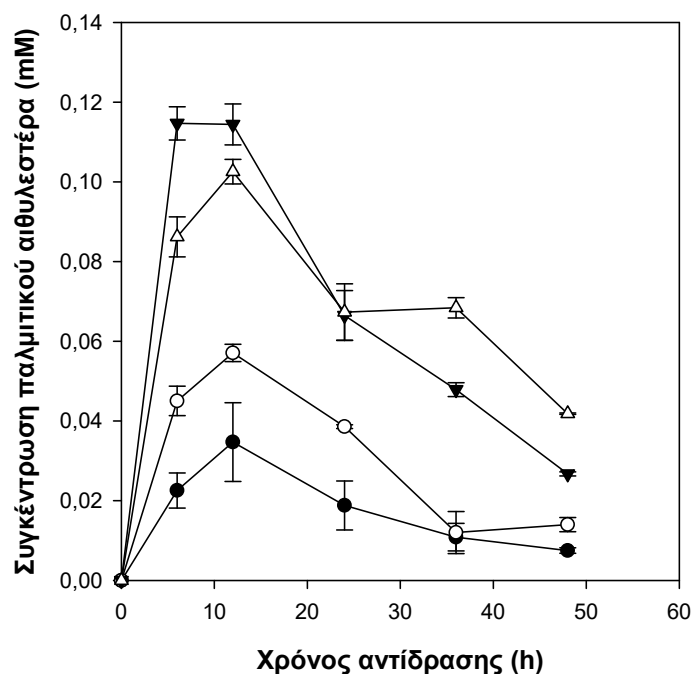
Από το τελευταίο διαγράμμα προκύπτει ότι το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση στο μυριστικό οξύ, με το λαυρικό, παλμιτικό και στεατικό να ακολουθούν σε φθίνουσα σειρά. Η εμφάνιση μεγαλύτερης εκλεκτικότητας στο μυριστικό οξύ (C:14), που έχει μικρότερη ανθρακική αλυσίδα συγκριτικά με μεγαλύτερα λιπαρά οξέα όπως το παλμιτικό (C:16) και το στεατικό (C:18) έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιπτώσεις όπως στην ακινητοποιημένη λιπάση της *Candida rugosa* και δεν αποτελεί χαρακτηριστικό που εντάσσει ένα ένζυμο υποχρεωτικά στις εστεράσες (Janssen, Sjursnes, Vakurov, & Halling, 1999).



Παρά την ανάδειξη του μυριστικού οξέος ως το καλύτερο υπόστρωμα για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, στα υπόλοιπα πειράματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το παλμιτικό οξύ, διότι ενώ η διαφορά στην μετατροπή του υποστρώματος και στην αρχική ταχύτητα ήταν μικρή, το παλμιτικό οξύ εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών στο τομέα της βιοτεχνολογίας και αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ των μικροφυκών (Alien & Abdulagatov, 2016; Chen et al., 2015; Harada et al., 2002; Yoo, Jun, Lee, Ahn, & Oh, 2010).

### 3.4.2 Επίδραση συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση εστεροποίησης

Μελετήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ενζυμικού σκευάσματος: 30, 50, 70 και 90 mg/mL. Όλες οι άλλες συνθήκες παρέμειναν σταθερές. Πραγματοποιήθηκε μελέτη της χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης του προϊόντος. Από τα πειραματικά δεδομένα προέκυψε το διάγραμμα συγκέντρωσης του προϊόντος συναρτήσει του χρόνου.



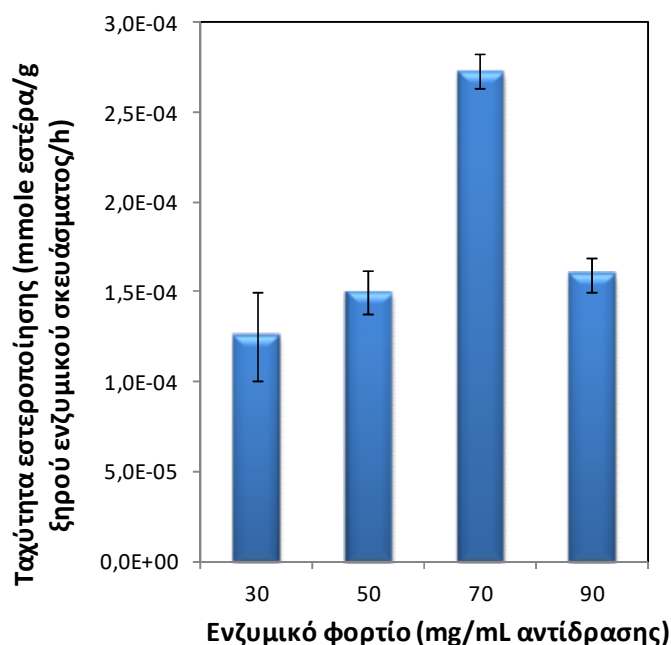
Διάγραμμα 3.11. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου παλμιτικού αιθυλεστέρα και επίδραση της ενζυμικού φορτίου στην αντίδραση εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη από το ενζυμικό σύστημα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης: διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu\text{L}$ , υποστρώματα : 50 mM παλμιτικού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}\text{C}$

Σύμβολα: (●) 30 mg/mL, (○) 50 mg/mL, (▼) 70 mg/mL και (△) 90 mg/mL

Στο Διάγραμμα 3.11 παρατηρείται πως μετά τις 12 ώρες, σε όλες τις συγκεντρώσεις του ενζυμικού σκευάσματος, εμφανίζεται μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος. Το φαινόμενο αυτό αποδόθηκε στην ρόφηση του εστέρα από το ενζυμικό σκεύασμα, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 3.4.4.

Επίσης, υπολογίσθηκαν οι αρχικές ταχύτητες της αντίδρασης (0-6 ώρες για όλες τις αντιδράσεις).



Διάγραμμα 3.12. Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση εστεροποίησης με αιθανόλη και παλμιτικό οξύ, από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu\text{L}$  υποστρώματα : 50 mM παλμιτικού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}\text{C}$

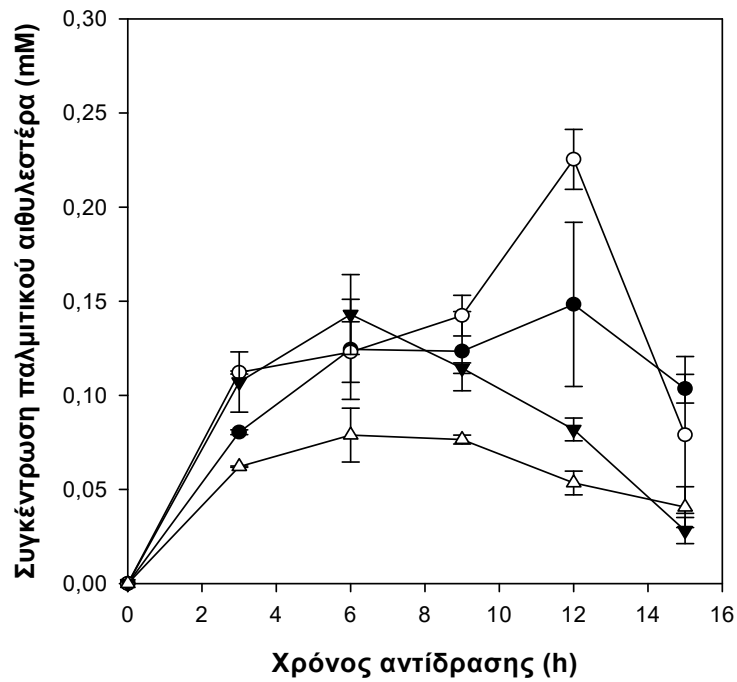
Προκύπτει λοιπόν ότι η βέλτιστη συγκέντρωση του ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση είναι τα 70 mg/mL. Η περαιτέρω αύξηση του ενζυμικού φορτίου στα 90

mg/mL, οδηγεί σε μείωση της ταχύτητας της αντίδρασης. Το φαινόμενο αυτό συμβαίνει συχνά σε ενζυμικές εστεροποιήσεις (Facioli & Barrera-Arellano, 2001) και βρίσκεται σε συμφωνία με άλλες αναφορές (Shah & Gupta, 2007; Jegannathan, Jun-Yee, Chan, & Ravindra, 2010; Maceiras, Vega, Costa, Ramos, & Marquez, 2009), στις οποίες βρέθηκε ότι η αύξηση της ακινητοποιημένης λιπάσης από ένα σημείο και μετά οδηγεί σε χαμηλότερες αποδόσεις μετατροπών σε προϊόν, φαινόμενο που αποδίδεται στο γεγονός ότι το επιπλέον ένζυμο συμπλοκοποιείται και μειώνει τη δραστικότητα της λιπάσης (Li & Yan, 2010) καθώς και στο ότι η αντίσταση σε εξωτερικά φαινόμενα μεταφοράς περιορίζει την πραγματοποίηση της εστεροποίησης (Tamalampudi et al., 2008).

### **3.4.3 Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην αντίδραση εστεροποίησης**

Η ταχύτητα ανάδευσης αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στις αντιδράσεις εστεροποίησης, ιδιαίτερα όταν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο. Στο σύστημα αντίδρασης με ακινητοποιημένο ένζυμο, τα αντιδραστήρια πρέπει να διαχυθούν από τον κύριο όγκο του υγρού στην εξωτερική επιφάνεια των σωματιδίων και ύστερα στους εσωτερικούς πόρους του ενζύμου. Οι περιορισμοί των εξωτερικών φαινομένων μεταφοράς μπορούν να μειωθούν όταν η αντίδραση πραγματοποιείται στη βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης (Kumari, Maharatra, Garlapati, & Banerjee, 2009).

Μελετήθηκε η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην εστεροποίηση του παλμτικού οξέος με αιθανόλη. Εξετάστηκαν τέσσερις διαφορετικές ταχύτητες ανάδευσης 300, 600, 900, 1200 rpm και η επιλογή πραγματοποιήθηκε με βάση τη μέγιστη αρχική ταχύτητα εστεροποίησης. Οι αντιδράσεις μελετήθηκαν σε πιο στενά χρονικά όρια, ώστε να εξακριβωθεί ο χρόνος στον οποίο παρατηρείται η μέγιστη μετατροπή σε προϊόν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.13.



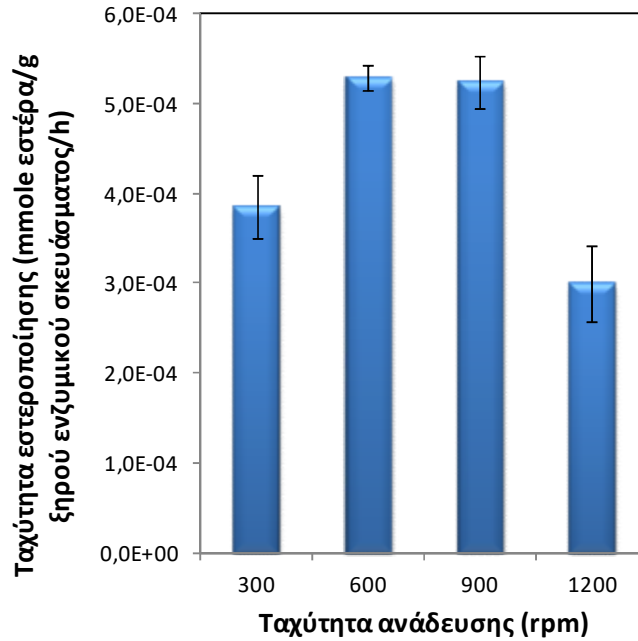
Διάγραμμα 3.13. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου παλμιτικού αιθυλεστέρα και επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην αντίδραση εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη από το ενζυμικό σύστημα του *μικροφύκους N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200 mL, υποστρώματα : 50 mM παλμιτικού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40°C

Σύμβολα: (●) 300rpm, (○) 600rpm, (▼) 900rpm και (△) 1200 rpm

Η μέγιστη μετατροπή της αντίδρασης για ταχύτητα ανάδευσης 300 rpm και 600 rpm εμφανίστηκε στις 12 ώρες ενώ για 900 rpm και για 1200 rpm στις 6 ώρες αντίδρασης. Η μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος μελετήθηκε στην παράγραφο 3.4.4.

Οι αρχικές ταχύτητες εστεροποίησης (0 – 3 ώρες) συναρτήσει της ταχύτητας ανάδευσης παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.14.



Διάγραμμα 3.14. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην ταχύτητα της αντίδρασης εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη από το ενζυμικό σύστημα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης: διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200 mL, υποστρώματα : 50 mM παλμιτικού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40°C

Από το Διάγραμμα 3.14 προκύπτει ότι η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης είναι τα 600 rpm. Μετά τα 600 rpm, ιδιαίτερα στα 1200 rpm, εμφανίζεται μια σημαντική μείωση της αρχική ταχύτητας. Το φαινόμενο αυτό (δηλαδή το φαινόμενο της μεγαλύτερης αρχικής ταχύτητας σε μικρότερες ταχύτητες ανάδευσης) συναντάται συχνά στις ενζυμικές εστεροποιήσεις (Surendhiran & Razack, 2015; Yadav & Lathi, 2003). Η μείωση της απόδοσης της αντίδρασης στα 900 και 1200 rpm, είναι πολύ πιθανό να οφείλεται στην καταστροφή του ενζύμου λόγω υψηλών διατμητικών τάσεων, στη ταχύτερη εξάτμιση του διαλύτη ή στο γεγονός ότι ένα μέρος του ενζύμου βρέθηκε εκτός της υγρής φάσης της αντίδρασης αφού παρέμεινε στα τοιχώματα των φιαλιδίων που πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις. (Šabeder, Habulin, & Knez, 2006).

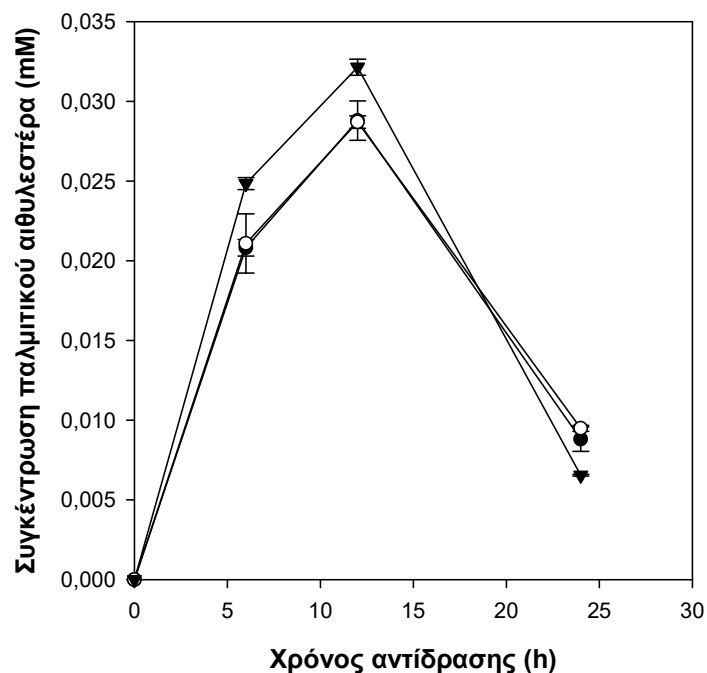
#### **3.4.4 Μελέτη παραγόντων που επιδρούν στη μείωση της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα κατά την αντίδραση εστεροποίησης**

Στα παρακάτω πειράματα, μελετήθηκε η μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος που παρατηρήθηκε μετά τις 12 ώρες αντίδρασης, σύμφωνα με τις παράγραφους 3.4.1., 3.4.2 και 3.4.3.

Αρχικά εξετάστηκε αν το περιεχόμενο ή παραγόμενο (από την αντίδραση εστεροποίησης) νερό συμβάλλει στην μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος με την πάροδο της αντίδρασης μετά τις 12 ώρες. Για την απομάκρυνση του νερού επιλέχθηκε η χρήση μοριακών κόσκινων (molecular sieves). Ειδικότερα η πρώτη προσέγγιση περιελάμβανε επώαση του διαλύτη και των υποστρώματων με μοριακά κόσκινα (συγκέντρωση 1 gr μοριακών κόσκινων/50 mL υγρού) για 24 ώρες. Στόχος ήταν ο περιορισμός του νερού που πιθανώς περιέχει ο διαλύτης και τα υποστρώματα.

Η δεύτερη προσέγγιση περιελάμβανε πέρα από την επώαση του διαλύτη και των υποστρωμάτων με μοριακά κόσκινα, προσθήκη μοριακών κόσκινων και στη αντίδραση (συγκέντρωση 1 gr μοριακών κόσκινων/50 mL αντίδρασης) έτσι ώστε να απομακρυνθεί το παραγόμενο νερό από την αντίδραση.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.15 όπου οι δύο προαναφερθείσες αντιδράσεις συγκρίνονται με την αντίδραση εστεροποίησης η οποία πραγματοποιείται απουσία μοριακών κόσκινων (όπως στις προηγούμενες παραγράφους). Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του προϊόντος μειώνεται παρουσία και απουσία μοριακών κόσκινων.



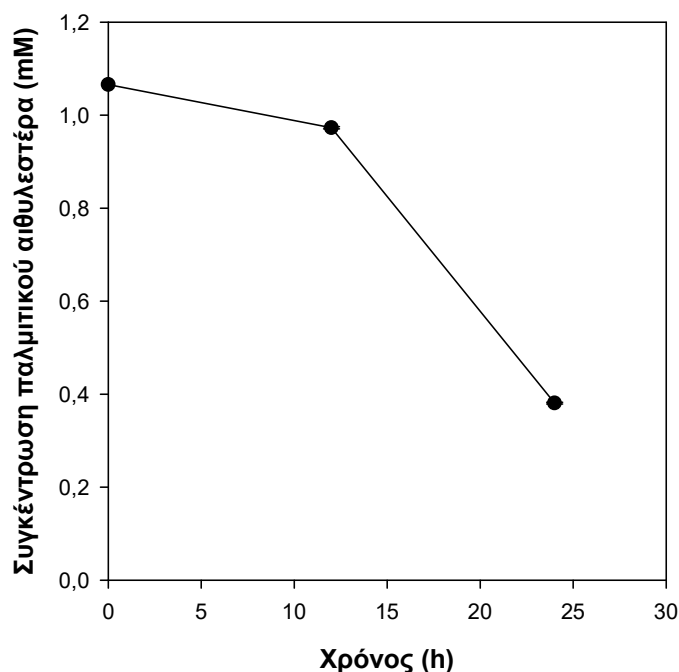
Διάγραμμα 3.15. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παραγόμενου παλμιτικού αιθυλεστέρα στην αντίδραση εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L, υποστρώματα : 50 mM παλμιτικού οξέος, 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}$ C

Σύμβολα : (●) χωρίς μοριακά κόσκινα (○) μοριακά κόσκινα στο διαλύτη και τα υποστρώματα (▼) μοριακά κόσκινα στο διαλύτη, τα υποστρώματα και την αντίδραση

Συμπερασματικά λοιπόν, ούτε το νερό που πιθανώς περιείχαν ο διαλύτης, το ενζυμικό σκεύασμα και τα υποστρώματα, ούτε και το παραγόμενο νερό από την αντίδραση, ευθύνονται για την μείωση της συγκέντρωσης του σχηματιζόμενου εστέρα.

Ακολούθως εξετάστηκε η πιθανότητα υδρόλυσης του παραγόμενου εστέρα από κάποιο άλλο ένζυμο που περιέχεται στο σκεύασμα. Έτσι χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα της αντίδρασης ο εστέρας του παλμιτικού οξέος συγκέντρωσης 2 mM σε n-οκτάνιο. Επιπλέον η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε με απενεργοποιημένο ενζυμικό σκεύασμα. Δείγματα ελήφθησαν στις 0, 12 και 24 ώρες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3.16.



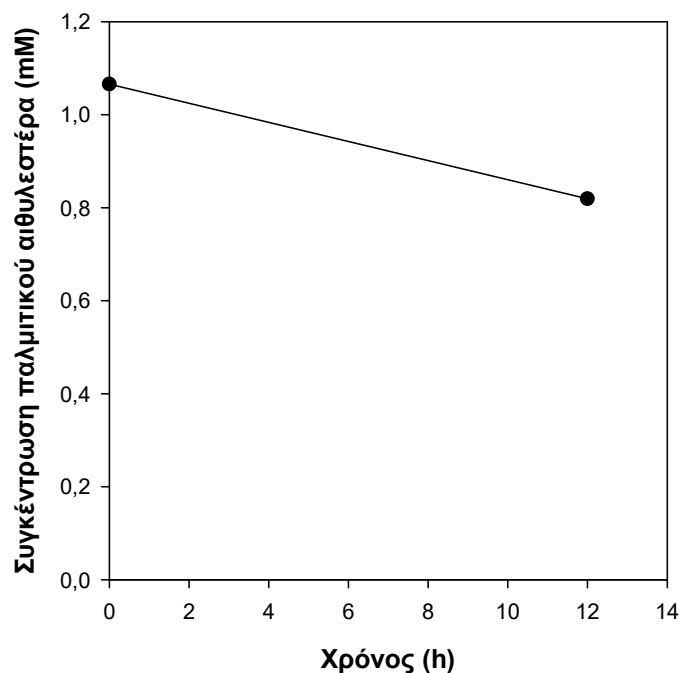
Διάγραμμα 3.16. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα στις συνθήκες αντίδρασης εστεροποίησης από το ενζυμικό σύστημα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L, υποστρώματα : 2 mM παλμιτικός αιθυλεστέρας, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}$ C

Όπως προκύπτει από το Διάγραμμα 3.16, η συγκέντρωση του εστέρα μειώνεται, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην ύπαρξη κάποιου άλλου ένζυμου στο ενζυμικό σκεύασμα, που χρησιμοποιεί τον εστέρα ως υπόστρωμα.

Όπως προαναφέρθηκε, ο παλμιτικός αιθυλεστέρας 2 mM σε n-οκτάνιο, προστέθηκε και σε απενεργοποιημένο (15 min στους 100  $^{\circ}$ C) ένζυμο. Ελήφθησαν δείγματα στις 0 και 12 ώρες. Τα αποτελέσματα (Διάγραμμα 3.17) έδειξαν ότι και στο απενεργοποιημένο ένζυμο υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα.





Διάγραμμα 3.17. Χρονική μεταβολή της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα στις συνθήκες αντίδρασης εστεροποίησης με απενεργοποιημένο ένζυμο, από το ενζυμικό σύστημα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L, υποστρώματα : 2 mM παλμιτικός αιθυλεστέρας, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, απενεργοποιημένο ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40 °C

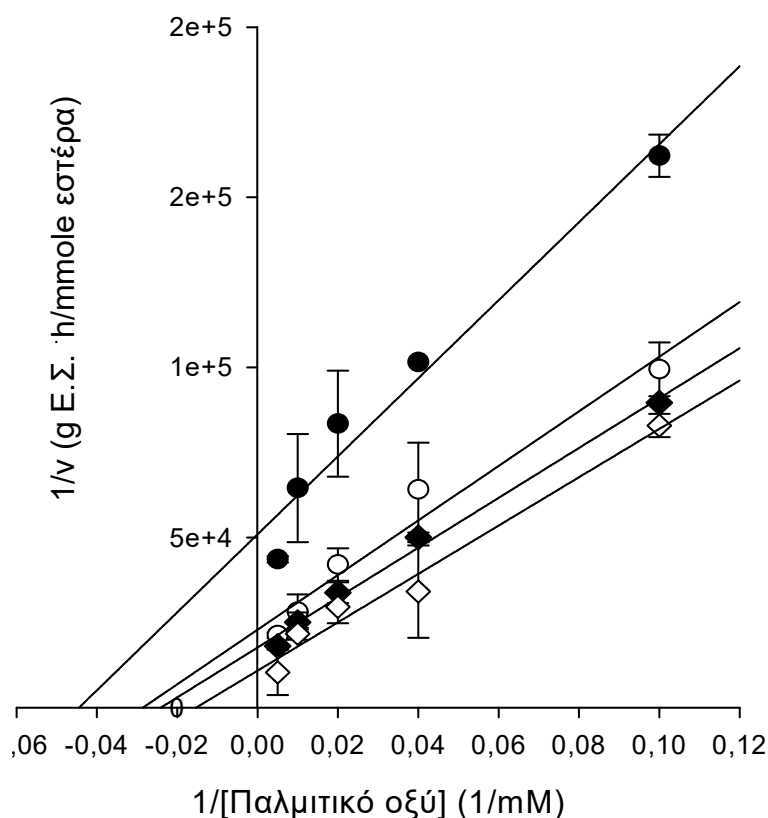
Από τα παραπάνω, προκύπτει ότι εφόσον παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης του παλμιτικού αιθυλεστέρα με χρήση μη απενεργοποιημένου και απενεργοποιημένου ενζυμικού σκευάσματος, η μείωση αυτή δεν είναι δυνατόν να οφείλεται στη δράση κάποιου άλλου ενζύμου.

Προτείνεται λοιπόν, ότι η μείωση της συγκέντρωσης του εστέρα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης είναι πιθανό να οφείλεται στη ρόφησή του από το στερεό μέρος της αντίδρασης δηλαδή, το ενζυμικό σκευάσμα. Η μορφή του ενζυμικού σκευάσματος μοιάζει με σκόνη και για αυτό είναι πολύ πιθανό να οδηγεί στη ρόφηση του προϊόντος, όταν αυτό παράγεται κατά την ενζυμική εστεροποίηση.

### 3.4.5 Εύρεση μηχανισμού αντίδρασης εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη και υπολογισμός κινητικών σταθερών

Έγινε προσπάθεια εξαγωγής του μηχανισμού με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων όπου η συγκέντρωση της αιθανόλης παρέμενε σταθερή στα 10, 20, 35 και 50 mM, αντίστοιχα για κάθε πείραμα, ενώ η συγκέντρωση του παλμιτικού οξέος λάμβανε τις εξής τιμές: 10, 25, 50, 100 και 200 mM. Από τα πειραματικά αποτελέσματα υπολογίσθηκαν οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων στις 12 ώρες.

Από τις προκύπτουσες ταχύτητες των αντιδράσεων, κατασκευάστηκε το διάγραμμα Lineweaver-Burk το οποίο συσχετίζει το αντίστροφο της ταχύτητας εστεροποίησης με το αντίστροφο της συγκέντρωσης του παλμιτικού οξέος για τις τέσσερις συγκεντρώσεις αιθανόλης (Διάγραμμα 3.18).

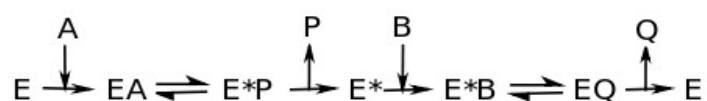


Διάγραμμα 3.18. Lineweaver-Burk για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης στις συνθήκες αντίδρασης εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη, από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu\text{L}$ , υποστρώματα : παλμιτικό οξύ, αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40  $^{\circ}\text{C}$

Σύμβολα: (●) 10 mM, (○) 20 mM, (◆) 35 mM και (◇) 50 mM αιθανόλης

Οι ευθείες που προκύπτουν τείνουν να είναι παράλληλες. Έτσι λοιπόν, η τάση για παραλληλία σε συνδυασμό με την μείωση της αποτέμνουσας των ευθειών όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της αιθανόλης, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός που πιθανώς διέπει την αντίδραση είναι τύπου Ping-Pong (Perez Galende et al., 2015). Στο συγκεκριμένο μηχανισμό κατά την ενζυμική εστεροποίηση των λιπαρών οξέων, το ένζυμο αρχικά προσδένεται με το λιπαρό οξύ και δημιουργεί ένα ενδιάμεσο λιπαρού οξέος-ενζύμου. Εναλλακτικά, αντί του λιπαρού οξέος στο ελεύθερο ένζυμο μπορεί να προσδεθεί η αλκοόλη και να σχηματισθεί ένα ενδιάμεσο αλκοόλης-ενζύμου, το οποίο όμως δεν οδηγεί σε προϊόντα. Το ενδιάμεσο λιπαρό οξύ-ένζυμο μετασχηματίζεται μέσω ισομερισμού σε ακυλο-ενδιάμεσο και απελευθερώνεται το νερό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να προσδένεται στο ακυλο-ενδιάμεσο η αιθανόλη που αποτελεί το δεύτερο υπόστρωμα (ή όποια αλκοόλη χρησιμοποιείται) και να δημιουργείται ένα νέο σύμπλοκο το οποίο τελικά διασπάται και οδηγεί στο σχηματισμό του εστέρα (επιθυμητό προϊόν) και την ανάκτηση του ενζύμου (Bezbradica et al., 2013).

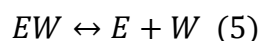
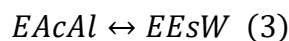
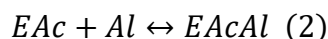
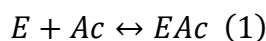


Εικόνα 3.1. Τα διαδοχικά βήματα στον μηχανισμό Ping-Pong

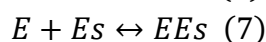
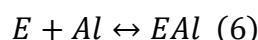
Ο μηχανισμός Ping-Pong είναι ο πιο συχνά εμφανιζόμενος στις ενζυμικές εστεροποιήσεις που καταλύονται από λιπάσες (Garcia, Coteron, Martinez, & Aracil, 1996; Garcia, Sanchez, Martinez, & Aracil, 1999; Yadav & Lathi, 2004). Παρεμπόδιση μπορεί να δημιουργηθεί λόγω της πρόσδεσης του δεύτερου υποστρώματος (αλκοόλης) στο ένζυμο, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο που δημιουργείται (dead end complex), όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως να μην οδηγεί σε κάποιο προϊόν.

Τα βασικά βήματα λοιπόν της αντίδρασης εστεροποίησης αλλά και της παρεμπόδισης, περιγράφονται παρακάτω:

- Στάδια αντίδρασης:



- Στάδια παρεμπόδισης:



όπου, Ac : Λιπαρό οξύ, Al : Αλκοόλη, E : Ελεύθερο ένζυμο, W : Νερό και Es : Εστέρας

Η εξίσωση που διέπει τον μηχανισμό Ping-Pong (Perez Galende et al., 2015) έχει ως εξής:

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[Παλμιτικό \text{ οξύ}] \cdot [Αιθανόλη]}{K_{m(\text{παλμιτικό οξύ})} \cdot [Αιθανόλη] + K_{m(\text{αιθανόλη})} \cdot [Παλμιτικό \text{ οξύ}] + [Παλμιτικό \text{ οξύ}] \cdot [Αιθανόλη]}$$

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια υπολογισμού των κινητικών σταθερών ( $v_{max}$ ,  $K_{m, \text{παλμιτικού οξέος}}$  και  $K_{m, \text{αιθανόλης}}$ ) της αντίδρασης. Από το Διάγραμμα 3.18 προέκυψαν οι φαινόμενες μέγιστες ταχύτητες τις αντίδρασης (η αποτέμνουσα ισούται με το  $1/v_{max}$ ) και τα φαινόμενα  $K_m$  των δύο υποστρωμάτων (η κλίση ισούται με το  $K_m/v_{max}$ ), όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 3.1. Φαινόμενες κινητικές αντίδρασης, όπως προκύπτουν από τις ευθείες Lineweaver-Burk

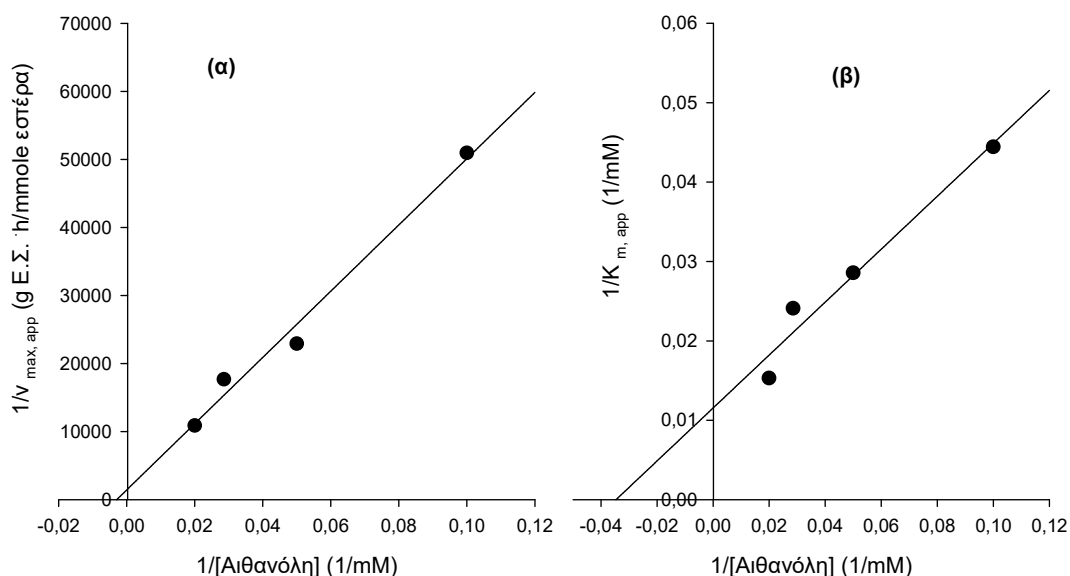
Συγκέντρωση αιθανόλης (mM)	$1/v_{max,app}$	$K_{m,app}$ (mM)
10	50936	22,51
20	22915	35,01
35	17664	41,50
50	10869	65,37

Ο υπολογισμός των πραγματικών κινητικών σταθερών προέκυψε από τη διαγραμματική απεικόνιση των παρακάτω εξισώσεων (Perez Galende et al., 2015):

$$\frac{1}{V_{max,app}} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m(αιθανόλη)}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[Αιθανόλη]}$$

$$\frac{1}{K_{m,app}} = \frac{1}{K_m(παλμιτικό οξύ)} + \frac{K_m(αιθανόλη)}{K_m(παλμιτικό οξύ)} \cdot \frac{1}{[Αιθανόλη]}$$

Σχηματίστηκαν τα παρακάτω διαγράμματα συσχέτισης των  $1/v_{max,app}$  και  $1/K_{m,app}$  με το αντίστροφο της συγκέντρωσης της αιθανόλης:



Διάγραμμα 3.19. (α) Συσχέτιση της φαινόμενης ταχύτητας με την συγκέντρωση της αιθανόλης για τον υπολογισμό του  $v_{max}$ , (β) Συσχέτιση του φαινομένου  $K_{m,app}$  με την συγκέντρωση της αιθανόλης για τον υπολογισμό των  $K_{m,παλμιτικού\ οξέος}$  και  $K_{m,αιθανόλης}$

Από την αποτέμνουσα του Διαγράμματος 3.19 (α) προκύπτει η  $1/v_{max}$  και συνεπώς η  $v_{max}$ . Το γινόμενο της κλίσης ( $K_{m,αιθανόλης} / v_{max}$ ) του Διαγράμματος 3.19 (α) με την μέγιστη ταχύτητα όπως προέκυψε από την αποτέμνουσα, οδηγεί στον υπολογισμό του  $K_{m,αιθανόλης}$ , ενώ η  $K_{m,παλμιτικού\ οξέος}$  προκύπτει από την αποτέμνουσα ( $1/K_{m,παλμιτικού\ οξέος}$ ) του Διαγράμματος 3.19 (β).

Τα αποτελέσματα από τους υπολογισμούς των κινητικών σταθερών της αντίδρασης συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

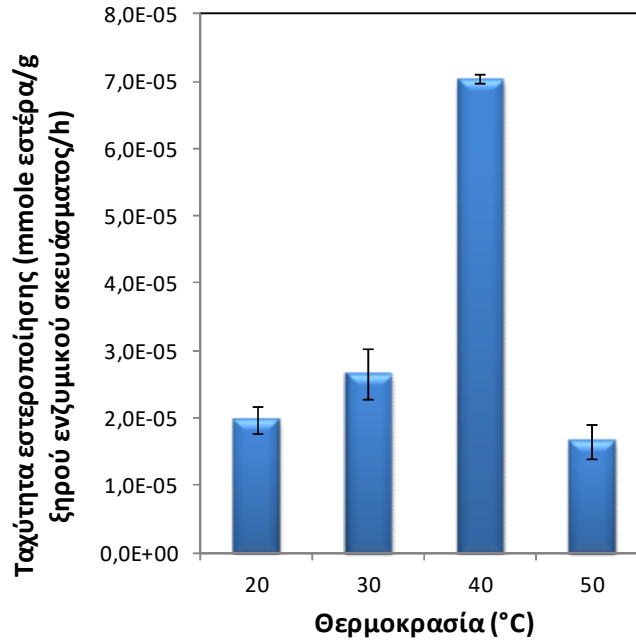
Πίνακας 3.2. Κινητικές σταθερές αντίδρασης εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη

Κινητικές σταθερές	
$v_{max}$ (mmol εστέρα/g Ε.Σ./h)	$7,02 \times 10^{-4}$
$K_m$ (παλμιτικό οξύ) (mM)	86,96
$K_m$ (αιθανόλη) (mM)	341,71

### 3.4.6 Επίδραση θερμοκρασίας στην αντίδραση εστεροποίησης

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες των ενζυμικών αντιδράσεων. Οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερες αποδόσεις, όμως μπορούν ταυτόχρονα να οδηγήσουν σε καταστροφή του ενζύμου αλλά και σε ταχύτερη εξάτμιση του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται (Jike Lu, Nie, Xie, Wang, & Tan, 2007; Nie, Xie, Wang, & Tan, 2006).

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του ενζύμου έγινε με την πραγματοποίηση τεσσάρων αντιδράσεων, με τη θερμοκρασία να είναι ο μόνος παράγοντας που άλλαζε. Εξετάσθηκαν οι θερμοκρασίες 20, 30, 40 και 50 °C. Όλες οι αντιδράσεις διήρκεσαν 12 ώρες, χρόνος στον οποίο εμφανίζεται η μεγαλύτερη απόδοση της αντίδρασης. Η επίδραση της θερμοκρασίας στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.20.



Διάγραμμα 3.20. Επίδραση της θερμοκρασίας στην αντίδραση εστεροποίησης παλμιτικού οξέος με αιθανόλη από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκου *N. oceanica* CCMP1779.

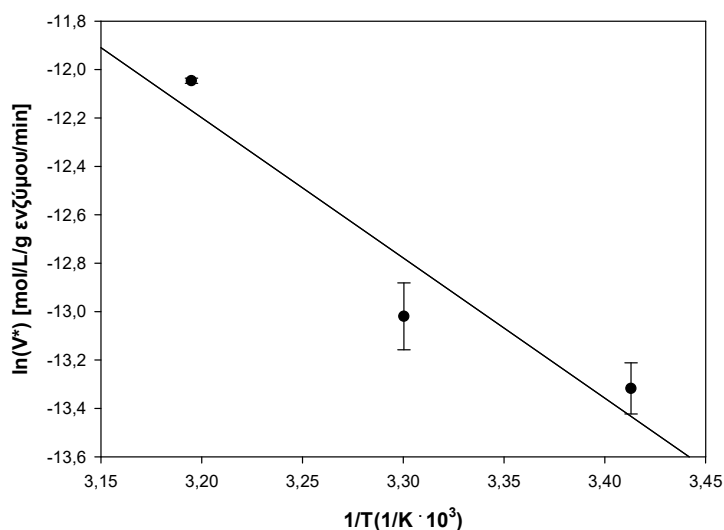
Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu$ L υποστρώματα : 50 mM αιθανόλη, 50 mM παλμιτικό οξύ, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL, ταχύτητα ανάδευσης 600 rpm και θερμοκρασία : 20, 30, 40 και 50 °C

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της λιπάσης είναι οι 40 °C. Με την αύξηση της θερμοκρασίας αρχικά παρατηρείται αύξηση και της ταχύτητας σχηματισμού του προϊόντος, άρα και καλύτερη δράση του ενζύμου. Όμως, στους 50 °C η δράση του ενζύμου φαίνεται να μειώνεται σημαντικά. Άρα, προκύπτει ότι στους 40 °C η δράση του ενζύμου είναι η βέλτιστη. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσιάζουν και άλλα ακινητοποιημένα ένζυμα όπως η λιπάση της *Pseudomonas ceracia* που εμφανίζει βέλτιστη δράση στους 35°C (Noureddini, Gao, & Philkana, 2005).

#### 3.4.6.1 Υπολογισμός ενέργειας ενεργοποίησης της αντίδρασης

Από τα αποτελέσματα για τις θερμοκρασίες 20, 30 και 40 °C, μπορεί να υπολογιστεί και η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης, σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius. Για το σκοπό αυτό υπολογίζεται ο ρυθμός της αντίδρασης ( $V^*$ ) ως η συγκέντρωση του προϊόντος προς την ποσότητα του ενζύμου και προς το αντίστοιχο χρονικό

διάστημα της αντίδρασης [mol παλμιτικού αιθυλεστέρα ·L<sup>-1</sup>·(g ενζύμου)<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>]. Η ποσότητα του ενζύμου σε κάθε αντίδραση ήταν 14 mg (70mg/mL). Έτσι λοιπόν κατασκευάζεται το διάγραμμα ln(V\*) – 1/T, όπου η θερμοκρασία είναι εκφρασμένη σε Kelvin (Royon, Daz, Ellenrieder, & Locatelli, 2007).



Διάγραμμα 3.21. Εξίσωση Arrhenius για τις θερμοκρασίες 20, 30 και 40 °C. Συσχέτιση ρυθμού αντίδρασης με τη θερμοκρασία για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης.

Η εξίσωση Arrhenius συνδέει τα δύο παραπάνω μεγέθη ως εξής:

$$\ln(V^*) = \ln A - \frac{E_a}{R \cdot T}$$

όπου,  $A$ : σταθερά εξίσωσης Arrhenius

$E_a$  : ενέργεια ενεργοποίησης

$$R = 8,314 \frac{J}{K \cdot mol}$$

Από τη κλίση λοιπόν της ευθείας (-5,7919) προκύπτει πως η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης είναι:

$$E_a = 48,15 \pm 4,36 \frac{kJ}{mol}$$

Στην ενζυμική σύνθεση μεθυλεστέρων σε διαλύτη t-βουτανόλη και με ακινητοποιημένη λιπάση *Candida antartica* η αντίστοιχη ενέργεια ενεργοποίησης

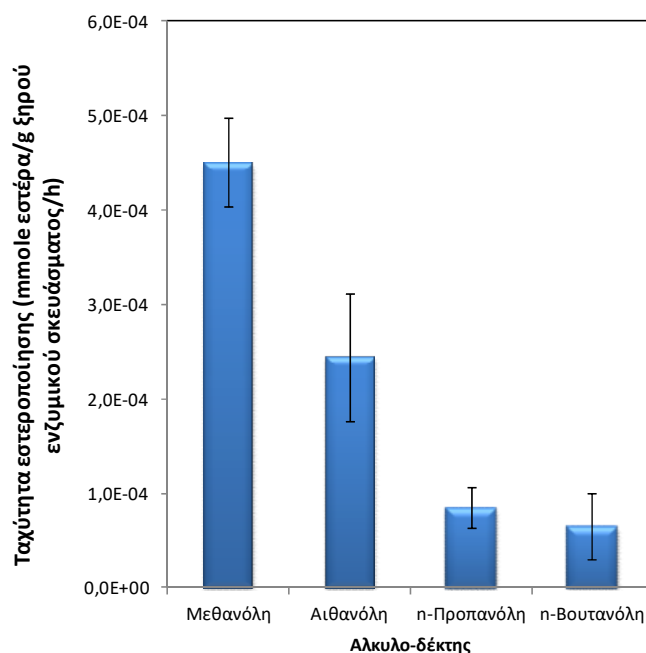


είναι  $19 \pm 2$  kJ/mol (Royon et al., 2007), ενώ μικρότερη εμαφνίστηκε και η ενέργεια ενεργοποίησης της ενζυμικής (ακίνητοποιημένη λιπάση από τον μικροοργανισμό *Mucor miehei*) εστεροποίησης n-καπριλικού οξέος σε n-οκτάνιο, που βρέθηκε 22,31 kJ/mol (Huang et al., 2005). Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν αρκετές περιπτώσεις ενζυμικής εστεροποίησης που παρουσιάζουν μεγαλύτερη ή παραπλήσια ενέργεια ενεργοποίησης, όπως η ενζυμική (Novozym 435) σύνθεση αιθυλεστέρα του καστορέλαιου, μεθυλεστέρα και αιθυλεστέρα του λινελαίου με τιμές 55, 46,5 και 70 kJ/mol, αντίστοιχα (Varma & Madras, 2007).

#### **3.4.7 Επίδραση μεγέθους ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης στην αντίδραση εστεροποίησης**

Μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αλκοόλες ως αλκυλο-δέκτες, πέραν της αιθανόλης. Μελετήθηκε δηλαδή η επίδραση του μεγέθους της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης, όταν αυτή είναι ευθύγραμμη. Οι αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μεθανόλη, η n-προπανόλη και η n-βουτανόλη. Υπολογίστηκαν οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων στη σύνθεση του εκάστοτε εστέρα για το χρονικό διάστημα 0-12 ώρες.

Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο Διάγραμμα 3.22.



Διάγραμμα 3.22. Επίδραση του μεγέθους της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης στην αντίδραση εστεροποίησης με παλμιτικό οξύ από το ενζυμικό σκεύασμα του μικροφύκους *N. oceanica* CCMP1779.

Συνθήκες αντίδρασης : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200 mL υποστρώματα : 50 mM αλκοόλη, 50 mM παλμιτικό οξύ, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL, ταχύτητα ανάδευσης : 600 rpm και θερμοκρασία : 40 °C

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η μεθανόλη αποτελεί τον καλύτερο αλκυλο-δέκτη για την αντίδραση εστεροποίησης με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος από το μικροφύκος *Nannochloropsis oceanica*. Ακολουθεί η αιθανόλη, η n-προπανόλη και η n-βουτανόλη σε φθίνουσα σειρά. Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η δράση του ενζύμου ευνοείται όσο μικρότερο είναι το μέγεθος της ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης.

Παρόμοια μελέτη για τις τέσσερις αυτές αλκοόλες σε ακινητοποιημένη λιπάση (whole cell) του *R. oryzae* αλλά και σε Novozym 435, έχει καταλήξει σε όμοια αποτελέσματα, με τη δράση του ενζύμου να ελαττώνεται με την αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης και την μεθανόλη να εμφανίζεται ως ο πιο κατάλληλος αλκυλο-δέκτης για την αντίδραση εστεροποίησης (Tamalampudi et al., 2008).

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ



## Κεφάλαιο 4. Σύνοψη και συζήτηση των αποτελεσμάτων

### 4.1 Συνοπτικά αποτελέσματα και συμπεράσματα

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των κυτταρικών μεμβρανών του μικροφύκου *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 σε αντιδράσεις εστεροποίησης πρότυπων λιπαρών οξέων με αιθανόλη. Το συγκεκριμένο ενζυμικό σκεύασμα επιλέχθηκε λόγω της ευκολίας παραγωγής του, της ευκολίας ακινητοποίησης των κυτταρικών θραυσμάτων αλλά και λόγω της πρωτοπορίας που παρουσιάζει η μελέτη των ενζυμικών δράσεων από μικροφύκη, τα οποία έως σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (λιπαρά οξέα, καροτενοειδή κ.τ.λ.).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του μικροοργανισμού *N. oceanica* σε επωαστήρες με σταθερό φωτισμό, σταθερή ταχύτητα ανάδευσης και θερμοκρασία στους 20 °C. Καθ' όλη την διάρκεια της καλλιέργειας, διατηρήθηκαν σταθερές οι συνθήκες ανάπτυξης και τα κύτταρα συλλέχθηκαν μέσω φυγοκέντρησης. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων με τη χρήση της συσκευής υπερήχων και η παραλαβή των κυτταρικών θραυσμάτων. Το σύστημα οδηγήθηκε προς λυοφιλίωση, με στόχο την ακινητοποίηση των κυτταρικών μεμβρανών.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, από την αλληλούχιση του γονιδιώματος του μικροοργανισμού *Nannochloropsis gaditana* (Radakovits et al. 2012), προέκυψε πως το γονιδίωμα των κυττάρων περιέχει συγκεκριμένες αλληλουχίες που χρησιμοποιούνται για την έκφραση ενζύμων όπως είναι οι λιπάσες (TAG-lipase) (Dongmei Wang et al., 2014). Η ύπαρξη ενζυμικών δράσεων, όπως αυτές που αναφέρονται στην παρούσα εργασία, δικαιολογούνται από το γεγονός ότι το γονιδίωμα του *N. oceanica* εμφανίζει κατά 80% ομολογία στις πρωτεΐνες με το αντίστοιχο του *N. gaditana*. Επίσης, κατά τη μελέτη του *N. oceanica* CCMP 1779 παρατηρήθηκαν 52 γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν λιπάσες (putative lipase encoding genes) (Vieler et al. 2012).

Εν συνεχεία, μετρήθηκε η ενεργότητα λιπάσης του ενζυμικού σκευάσματος και βρέθηκε  $53,11 \pm 2,43$  Units/mg<sub>πρωτεΐνης</sub>. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε

πρωτεΐνες (% επί ξηρού βάρους), πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry από την οποία προέκυψε ότι η συνολική περιεκτικότητα πρωτεΐνης στο ενζυμικό σκεύασμα είναι 0,523  $\mu\text{g}_{\text{πρωτεΐνης}}/\text{mL}_{\text{δείγματος}}$ .

Προκειμένου να σχεδιασθούν οι καμπύλες αναφοράς, συντέθηκαν χημικά οι αντίστοιχοι εστέρες των λιπαρών οξέων. Η χημική σύνθεση των εστέρων (αιθυλεστέρας του δωδεκανοϊκού, τετραδεκανοϊκού, εξαδεκανοϊκού, οκταδεκανοϊκού οξέος και μεθυλ-, προπυλ- και βουτυλ-εστέρας του εξαδεκανοϊκού οξέος) ακολούθησε συγκεκριμένο πρωτόκολλο (Kail et al., 2012) και η μετατροπή των λιπαρών οξέων στους αντίστοιχους εστέρες θεωρήθηκε ως 100%, ύστερα από έλεγχο της ανάκτησης των εστέρων ως προς το λιπαρό οξύ. Οι εστέρες μετρήθηκαν ποσοτικά με τη χρήση του αέριου χρωματογράφου με φασματόμετρο μάζας GC-MS (Varian 450-GC, , Varian 220-MS). Η ροή του φέροντος αερίου (He) ήταν 1,4 mL/min.

Ακολούθως, μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες στην αντίδραση εστεροποίησης με τη χρήση του ενζυμικού σκευάσματος από το μικροφύκος *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 και υποστρώματα ένα λιπαρό οξύ και μία αλκοόλη.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του μεγέθους της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην αντίδραση εστεροποίησης με τη χρήση αιθανόλης ως αλκυλοδέκτη και πιο συγκεκριμένα στην αρχική ταχύτητα αντίδρασης (0-6 ώρες). Τα τέσσερα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν ήταν : το λαυρικό οξύ (C:12), το μυριστικό οξύ (C:14), το παλμιτικό οξύ (C:16) και το στεατικό οξύ (C:18). Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής : διαλύτης : n-οκτάνιο, όγκος αντίδρασης : 200  $\mu\text{L}$ , υποστρώματα : 50 mM λιπαρό οξύ και 50 mM αιθανόλη, ταχύτητα ανάδευσης : 300 rpm, ενζυμικό φορτίο : 70 mg/mL και θερμοκρασία : 40 °C. Από τη συγκεκριμένη μελέτη, προέκυψε ότι το ενζυμικό σκεύασμα εμφανίζει εξειδίκευση στο μυριστικό οξύ, ενώ το λαυρικό, παλμιτικό και στεατικό οξύ ακολούθησαν σε φθίνουσα σειρά. Παρ' όλα αυτά, τα πειράματα συνεχίστηκαν με τη χρήση παλμιτικού οξέος, διότι ενώ η διαφορά στην μετατροπή του υποστρώματος και στην αρχική ταχύτητα ήταν μικρή, το παλμιτικό οξύ εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερο εύρος βιοτεχνολογικών εφαρμογών και αποτελεί το κύριο λιπαρό οξύ που συνθέτουν τα μικροφύκη (Aliiev & Abdulagatov, 2016; Chen et al., 2015; Harada et al., 2002; Yoo et al., 2010). Η

εξειδίκευση των λιπολυτικών δράσεων σε ένα οξύ με σχετικά μικρή ανθρακική αλυσίδα δεν είναι κάτι που συναντάται πρώτη φορά, αφού έχει παρατηρηθεί και στην ακινητοποιημένη λιπάση της *Candida rugosa* (Janssen et al., 1999).

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μελέτη της χρονικής μεταβολής της συγκέντρωσης του προϊόντος για όλα τα λιπαρά οξέα (λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό και στεατικό) στους χρόνους 0, 6, 12, 24 και 48 ώρες. Προέκυψε ότι μετά τις 24 ώρες όλα τα δείγματα εμφάνισαν πτώση της συγκέντρωσης του προϊόντος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μελέτη της βέλτιστης συγκέντρωσης ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση. Οι τιμές της συγκέντρωσης ήταν οι εξής : 30, 50, 70 και 90 mg/mL. Από την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (0 - 6 ώρες), προέκυψε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος στην αντίδραση είναι 70 mg/mL αφού εκεί εμφανίστηκε η μέγιστη αρχική ταχύτητα. Τα ακόλουθα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση ενζυμικού σκευάσματος 70 mg/mL. Η μείωση της αρχικής ταχύτητας αντίδρασης με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζυμικού σκευάσματος στα 90 mg/mL αποδίδεται στη συσσωμάτωση του επιπλέον ενζύμου που ελαττώνει την ενεργότητα της λιπολυτικής δράσης (Li & Yan, 2010) καθώς και στο γεγονός ότι η αντίσταση στα εξωτερικά φαινόμενα μεταφοράς περιορίζει την πραγματοποίηση της εστεροποίησης (Tamalampudi et al., 2008).

Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της χρονικής μεταβολής (0, 6, 12, 24, 36, 48 ώρες) της συγκέντρωσης του προϊόντος για όλες τις συγκεντρώσεις του ενζυμικού σκευάσματος και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του αιθυλεστέρα του εξαδεκανοϊκού οξέος μετά τις 12 ώρες.

Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στην ταχύτητα της αντίδρασης. Υπολογίσθηκε η αρχική ταχύτητα (0 - 6 ώρες) αντίδρασης για ρυθμό ανάδευσης 300, 600, 900 και 1200 rpm. Προέκυψε πως η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης ήταν τα 600 rpm. Η πτώση της ταχύτητας της αντίδρασης με την αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης (μετά τα 600 rpm) αποδόθηκε στην μερική καταστροφή του ενζύμου λόγω υψηλής ανάδευσης και στην παραμονή μέρους του ενζυμικού σκευάσματος στα τοιχώματα των φιαλιδίων αντίδρασης (Šabeder et al., 2006). Τα υπόλοιπα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με ταχύτητα ανάδευσης 600 rpm.

Πραγματοποιήθηκε επίσης μελέτη της χρονικής μεταβολής (0, 3, 6, 9, 12 ώρες) της συγκέντρωσης του προϊόντος για όλες τις ταχύτητες ανάδευσης και παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης του αιθυλεστέρα του δωδεκανοϊκού οξέος μετά τις 12 ώρες για τα 600rpm.

Η μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος μελετήθηκε περαιτέρω με στόχο τον εντοπισμό της αιτίας που προκαλούσε την πτώση. Παρότι απομακρύνθηκε όλο το περιεχόμενο νερό τόσο από τον οργανικό διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε όσο και από τα υποστρώματα με τη χρήση μοριακών κοσκίνων (1 gr / 50 mL), η μείωση της συγκέντρωσης συνέχισε να είναι αισθητή. Στη συνέχεια, μοριακά κόσκινα προστέθηκαν και στην αντίδραση (1 gr / 50 mL), προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το παραγόμενο νερό καθώς και αυτό που πιθανώς παρέμεινε στο ενζυμικό σκεύασμα μετά τη λυοφιλίωση. Η μείωση της συγκέντρωσης του προϊόντος παρέμεινε αισθητή. Συνεπώς, η μείωση της συγκέντρωσης του παλμιτικού εστέρα πιθανών δεν προκλήθηκε από την υδρόλυση του εστέρα λόγω του περιεχόμενου ή παραγόμενου νερού. Εν συνεχεία, με δεδομένες τις συνθήκες αντίδρασης (ταχύτητα ανάδευσης: 600 rpm, ενζυμικό φορτίο: 70 mg/mL και θερμοκρασία: 40 °C), προστέθηκε ως υπόστρωμα ο αιθυλεστέρας του εξαδεκανοϊκού οξέος αντί του εξαδεκανοϊκού οξέος και της αιθανόλης. Παρατηρήθηκε πάλι πτώση της συγκέντρωσης του εστέρα, η οποία όμως εμφανίστηκε από την αρχή (0 ώρες) και ήταν της τάξης του 50%. Έτσι, απορρίφθηκε η πιθανότητα της δράσης κάποιου άλλου ενζύμου στο ενζυμικό σκεύασμα και υποτέθηκε το ενδεχόμενο της ρόφησης του εστέρα από τη στερεή φάση της αντίδρασης, δηλαδή από το ενζυμικό σκεύασμα.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον συγκέντρωσε η μελέτη του μηχανισμού και της κινητικής της αντίδρασης. Οι ευθείες του διαγράμματος Lineweaver-Burk (αντίστροφο αρχικής ταχύτητας-αντίστροφο συγκέντρωσης παλμιτικού οξέος) για τις τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις αιθανόλης έτειναν να είναι παράλληλες. Προέκυψε λοιπόν ότι ο μηχανισμός της αντίδρασης πιθανώς να είναι Ping-Pong. Επίσης, από τη συσχέτιση των φαινόμενων μέγιστων ταχυτήτων και των φαινόμενων  $K_m$  με τη συγκέντρωση της αιθανόλης υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές της αντίδρασης εστεροποίησης ως εξής :  $v_{max} = 7,02 \cdot 10^{-4}$  mmol εστέρα/g E.Σ./h,  $K_{m, \text{παλμιτικού οξέος}} = 86,96$  mM και  $K_{m, \text{αιθανόλης}} = 341,71$  mM.



Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στην αντίδραση. Υπολογίσθηκαν οι αρχικές ταχύτητες (12 ώρες) της αντίδρασης για τις θερμοκρασίες 20, 30, 40 και 50 °C. Προέκυψε ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη συγκεκριμένη αντίδραση είναι οι 40 °C. Όμοια συμπεριφορά, όπως αναφέρεται και στα αποτελέσματα, παρουσιάζει η ακινητοποιημένη λιπάση της *Pseudomonas ceracia* η οποία εμφανίζει βέλτιστη δράση στους 35 °C (Nouredдини et al., 2005). Επιπλέον, υπολογίσθηκε η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης με τη χρήση της εξίσωσης Arrhenius. Προέκυψε ότι, η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης είναι  $48,15 \pm 4,36$  kJ/mol. Η τιμή αυτή βρίσκεται ανάμεσα σε ενέργειες ενεργοποίησης άλλων αντιδράσεων, όπως της εστεροποίησης n-καπριλικού οξέος από τη λιπάση του μικροοργανισμού *Mucor miehei* (22,31 kJ/mol) και τη σύνθεση αιθυλεστέρα του καστορέλαιου από το Novozym 435 (55 kJ/mol) (Huang et al., 2005; Varma & Madras, 2007).

Εν κατακλείδι, η μελέτη της επίδρασης του μήκους της ευθύγραμμης ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης στην ταχύτητα της αντίδρασης, οδήγησε στο συμπέρασμα πως η αντίδραση διευκολύνεται όσο μικρότερη είναι η ανθρακική αλυσίδα. Το ένζυμο εμφάνισε μεγαλύτερη εξειδίκευση στη μεθανόλη, ενώ ακολούθησε η αιθανόλη, η n-προπανόλη και η n-βουτανόλη. Σύμφωνα με τον Tamalampudi (Tamalampudi et al., 2008), παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και η ακινητοποιημένη λιπάση του *R. Oryzae* (whole cell) καθώς και το σκεύασμα Novozym 435, στις τέσσερις αυτές αλκοόλες.

## 4.2 Μελλοντικές προτάσεις

Ορισμένα θέματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική εργασία και τα οποία θα μπορούσαν να μελετηθούν μελλοντικά, είναι:

- Η εύρεση της συγκεκριμένης λιπάσης που συμμετέχει στην αντίδραση εστεροποίησης που μελετήθηκε. Εντοπισμός του γονιδίου έκφρασης της λιπάσης.
- Η βελτιστοποίηση του θρεπτικού υποστρώματος για την αύξηση της ενζυμικής παραγωγής.
- Η ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της λιπάσης, με στόχο την μεγιστοποίηση της ενεργότητας και συνεπώς τις μεγαλύτερες αποδόσεις στην εστεροποίηση.
- Καθαρισμός του ενζύμου από τα κυτταρικά υπολείμματα, εργαστηριακή μελέτη του και πλήρης χαρακτηρισμός του. Μελέτη του καθαρού ενζύμου πριν και μετά την ακινητοποίησή του σε άλλους εμπορικούς φορείς.
- Η αξιοποίηση όλων των χρήσιμων προϊόντων που μπορεί να αποδώσει ο μικροοργανισμός *N. oceanica* (λιπαρά οξέα, πρωτεΐνες, καροτενοειδή κ.τ.λ.) παράλληλα με την απομόνωση των κυτταρικών θραυσμάτων που παρουσίασαν λιπολυτικές δράσεις. Θεωρώντας πως τα κύτταρα του μικροφύκου αποτελούν ένα μικρό βιοδιυλιστήριο, είναι σκόπιμο να αξιοποιούνται όλα τα συστατικά που περιέχει.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

**Abdo, S. M., Abo El-Enin, S. A., El-Khatib, K. M., El-Galad, M. I., Wahba, S. Z., El Diwani, G., & Ali, G. H.** (2016). Preliminary economic assessment of biofuel production from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 55, 1147–1153.

**Aliev, A. M., & Abdulagatov, I. M.** (2016). The study of microalgae *Nannochloropsis salina* fatty acid composition of the extracts using different techniques. SCF vs conventional extraction. *Journal of Molecular Liquids*.

**Barbosa, M.** (2003). *Microalgal photobioreactors: - up and optimisation Scale*. Wageningen Food and Bioprocess Engineering Group.

**Bezbradica, D., Stojanovic, M., Velickovic, D., Dimitrijevic, A., Carevic, M., Mihailovic, M., & Milosavic, N.** (2013). Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester. *Biochemical Engineering Journal*, 71, 89–96.

**Bhati, R., & Mallick, N.** (2012). Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer by a N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium, *Nostoc muscorum* Agardh. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 87(4), 505–512.

**Borowitzka, M. A.** (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), 743–756.

**Burley, Stephen K., Kim, Joseph L.,** (1994). Grease pit chemistry exposed. A clutch of recent lipase structures lift the lid on the mechanism of interfacial activation and the determinants of lipase substrate specificity. *Nature*, 1(9), 638–653.

**Cao, C., & Matsuda, T.** (2016). *Biocatalysis in Organic Solvents , Supercritical Fluids and Ionic Liquids*. *Organic Synthesis Using Biocatalysis*. Elsevier Inc.

**Chandler, I. C.** (2001). Determining the regioselectivity of immobilized lipases in triacylglycerol acidolysis reactions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(7), 737–742.

- Chen, W., Ma, L., Zhou, P., Zhu, Y., Wang, X., Luo, X., Yu, L.** (2015). A novel feedstock for biodiesel production: The application of palmitic acid from *Schizochytrium*. *Energy*, *86*, 128–138.
- Chi, Z., Su, C. D., & Lu, W. D.** (2007). A new exopolysaccharide produced by marine *Cyanothece* sp. 113. *Bioresource Technology*, *98*(6), 1329–1332.
- Chisti, Y.** (2007). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, *26*(3), 126–131.
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S.** (2012). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 1–9.
- De Jesus Raposo, M. F., De Morais, R. M. S. C., & De Morais, A. M. M. B.** (2013). Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*, *93*(15), 479–486.
- De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., & Vincenzini, M.** (2001). Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. *Journal of Applied Phycology*, *13*(4), 293–299.
- de Zoete, M. C., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A.** (1994). Lipase-catalyzed transformations with unnatural acyl acceptors. *Catalysis Today*, *22*(3), 563–590.
- Deng, R., & Chow, T. J.** (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*, *28*(4), 33–45.
- Facioli, N. L., & Barrera-Arellano, D.** (2001). Optimisation of enzymatic esterification of soybean oil deodoriser distillate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(12), 1193–1198.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., & Petersen, S. B.** (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, *82*(11), 1033–1041.
- Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M., & Aracil, J.** (1996). Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases. *Chemical Engineering*

*Science*, 51(11), 2841–2846.

**Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M., & Aracil, J.** (1999). Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(7), 584–590.

**Glaser, R.** (2004). Heterogeneous Catalysis in Non-Conventional Solvents.

**Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Cygler, M.** (1993). Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12843–12847.

**Grochulski, P., Li, Y., Schrag, J. D., & Cygler, M.** (1994). Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, 3(1), 82–91.

**Guillard, R. R. L., & Ryther, J. H.** (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229–240.

**Halim, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A.** (2012). Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 30(3), 709–732.

**Hallmann, A.**, (2007). Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant J*, 1(1), 81–98.

**Harada, H., Yamashita, U., Kurihara, H., Fukushi, E., Kawabata, J., & Kamei, E.** (2002). Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Research*.

**Heimann, K., & Huerlimann, R.** (2015). Microalgal Classification. *Handbook of Marine Microalgae*, 25–41.

**Hu, L., Huang, B., Zuo, M. M., Guo, R. Y., & Wei, H.** (2008). Preparation of the phycoerythrin subunit liposome in a photodynamic experiment on liver cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1539–1546.

**Huang, W., Xia, Y. M., Gao, H., Fang, Y. J., Wang, Y., & Fang, Y.** (2005). Enzymatic esterification between n-alcohol homologs and n-caprylic acid in non-aqueous medium under microwave irradiation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,

35(4–6), 113–116.

**Idris, A., & Bukhari, A.** (2012). Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*, 30(3), 550–563.

**Janda, L. A., Langacker, R. W., Ran, B., & Duimering, P. R.** (2010). A review on marine immunomodulators, 1(1), 751–758.

**Janssen, A. E. M., Sjursnes, B. J., Vakurov, A. V., & Halling, P. J.** (1999). Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(8–9), 463–470.

**Jegannathan, K. R., Jun-Yee, L., Chan, E. S., & Ravindra, P.** (2010). Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in  $\kappa$ -carrageenan. *Fuel*, 89(9), 2272–2277.

**Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E. A., Embiruçu, M., & Ghirardi, M. L.** (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101(4), 1406–1413.

**Kagan, M. L., & Matulka, R. A.** (2015). Safety assessment of the microalgae *Nannochloropsis oculata*. *Toxicology Reports*, 2, 617–623.

**Kail, B. W., Link, D. D., & Morreale, B. D.** (2012). Determination of Free Fatty Acids and Triglycerides by Gas Chromatography Using Selective Esterification Reactions, 40(12), 1–6.

**Kempner, E. S.** (1993). Movable lobes and flexible loops in proteins: Structural deformations that control biochemical activity. *FEBS Letters*, 326(1).

**Kennedy, B., Lennarz, W. J., Natl, W. J. P., Sci, A.,** (1979). Characterization of the Extracellular Relationship to a Membrane-bound Lipase of *Bacillus subtilis* and Its Lipase Found in a Mutant Strain. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(4), 1080–1089.

**Kilian, O., Benemann, C. S. E., Niyogi, K. K., & Vick, B.** (2011). High-efficiency

homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52).

**Klibanov, A.** (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents, 409(January), 786–790.

**Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V. K., & Banerjee, R.** (2009). Enzymatic transesterification of Jatropha oil. *Biotechnology for Biofuels*, 2(1), 1.

**Lawson, D. M., Brzozowski, M., Rety, S., Verma, C., & Dodson, G. G.** (1994). Probing the nature of substrate binding in *Humicola lanuginosa* lipase through X-ray crystallography and intuitive modelling. *Protein Engineering*, 7(4), 543–50.

**Lewis, L., & McCourt, R.** (2004). Green algae and the origin of land plants 1. *American Journal of Botany*, 91(10), 1535–1556.

**Li, Q., & Yan, Y.** (2010). Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. *Applied Energy*, 87(10), 3148–3154.

**Lopes, D. B., Fraga, L. P., Fleuri, L. F., & Macedo, G. A.** (2011). Lipase and esterase: to what extent can this classification be applied accurately? *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 603–613.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A., & Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.

**Lu, J., Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T.** (2007). Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125. *Process Biochemistry*, 42(9), 1367–1370.

**Lu, J., Sheahan, C., & Fu, P.** (2011). Metabolic engineering of algae for fourth generation biofuels production. *Energy Environ. Sci.*, 4(7), 2451–2466.

**Lundquist, T. J., Woertz, I. C., Quinn, N. W. T., & Benemann, J. R.** (2010). A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. *Energy*



- Maceiras, R., Vega, M., Costa, C., Ramos, P., & Marquez, M. C.** (2009). Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. *Fuel*, *88*(11), 2130–2134.
- Malcata, F. X., Reyes, H. R., Garcia, H. S., Hill, C. G., & Amundson, C. H.** (1992). Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, *14*(6), 426–446.
- Markou, G., & Nerantzis, E.** (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advances*, *31*(8), 1532–1542.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S.** (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *14*(1), 217–232.
- Matori, M., Asahara, T., & Ota, Y.** (1991). Positional specificity of microbial lipases. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *72*(5), 397–398.
- Meireles, L. A., Guedes, A. C., & Malcata, F. X.** (2003). Lipid class composition of the microalga *Pavlova lutheri*: Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(8), 2237–2241.
- Miyamoto, E., Watanabe, F., Takenaka, H., & Nakano, Y.** (2002). Uptake and physiological function of vitamin B12 in a photosynthetic unicellular coccolithophorid alga, *Pleurochrysis carterae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *66*(1), 195–8.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Eghtesadi, R., & Nejad, A. S.** (2012). Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, *39*(June 2016), 449–453.
- Moheimani, N.R.** (2005). The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide bioremediation. *Algal Biotechnology Laboratory*, 252.
- Molina, E., Fernández, J., Ación, F. G., & Chisti, Y.** (2001). Tubular photobioreactor

design for algal cultures. *Journal of Biotechnology*, 92(2), 113–131.

**Moore, A.** (2001). *Blooming prospects?*

**Nedbal, L., Tichý, V., Xiong, F., & Grobbelaar, J. U.** (1996). Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. *Journal of Applied Phycology*, 8, 325–333.

**Neves Petersen, M. T., Fojan, P., & Petersen, S. B.** (2001). *How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution.* *Journal of Biotechnology* (Vol. 85).

**Nie, K., Xie, F., Wang, F., & Tan, T.** (2006). Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43(1–4), 142–147.

**Norin, M., Haeffner, F., Achour, a, Norin, T., & Hult, K.** (1994). Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 3(9), 1493–1503.

**Noureddini, H., Gao, X., & Philkana, R. S.** (2005). Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, 96(7), 769–777.

**Ogbonna, J. C., Ichige, E., & Tanaka, H.** (2002). Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(4), 532–538.

**Ogino, H., & Ishikawa, H.** (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(2), 109–116.

**Pal, D., Khozin-Goldberg, I., Cohen, Z., & Boussiba, S.** (2011). The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(4), 1429–1441.

**Perez Galende, P., Hidalgo Cuadrado, N., Kostetsky, E. Y., Roig, M. G., Villar, E., Shnyrov, V. L., & Kennedy, J. F.** (2015). Kinetics of Spanish broom peroxidase obeys a

Ping-Pong Bi-Bi mechanism with competitive inhibition by substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 1005–1011.

**Porphy, S. J., & Farid, M. M.** (2012). Feasibility Study for Production of Biofuel and Chemicals from Marine Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Basic Mass and Energy Analysis. *ISRN Renewable Energy*, 2012, 1–11.

**Radakovits, R., Jinkerson, R. E., Fuerstenberg, S. I., Tae, H., Settlage, R. E., Boore, J. L., & Posewitz, M. C.** (2012). Draft genome sequence and genetic transformation of the oleaginous alga *Nannochloropsis gaditana*. *Nature Communications*, 3, 686.

**Razak, C. N. A., Musani, R., Basri, M., & Salleh, B.** (1999). Characterization of membrane-bound lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* isolated from palm oil mill effluent. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(2), 171–174.

**Richmond, A.** (2004). 8 Biological Principles of Mass Cultivation, 125–176.

**Richmond, A., & Zou, N.** (1999). Efficient utilisation of high photon irradiance for mass production of photoautotrophic micro-organisms. *Journal of Applied Phycology*, 11(1), 123–127.

**Rito-Palomares, M., Nuez, L., & Amador, D.** (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(12), 1273–1280.

**Rodolfi, L., Zittelli, G. C., Barsanti, L., Rosati, G., & Tredici, M. R.** (2003). Growth medium recycling in *Nannochloropsis* sp. mass cultivation. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 243–248.

**Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., & Locatelli, S.** (2007). Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology*, 98(3), 648–653.

**Šabeder, S., Habulin, M., & Knez, Ž.** (2006). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Food Engineering*, 77(4), 880–886.

- Sanchez Miron, A., Cermen Garcia, M. C., Garcia Camacho, F., Molina Grima, E., & Chisti, Y.** (2002). Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, *31*(7), 1015–1023.
- Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., Hankamer, B.** (2008). Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *BioEnergy Research*, *1*(1), 20–43.
- Schmid, R. D., & Verger, R.** (1998). the open form . As with all lipases whose Lipases : Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Analysis*, *37*(12), 1608–1633.
- Shah, S., & Gupta, M. N.** (2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. *Process Biochemistry*, *42*(3), 409–414.
- Singh, J., & Saxena, R. C.** (2015). An Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. *Handbook of Marine Microalgae*, 11–24.
- Skjånes, K., Rebours, C., & Lindblad, P.** (2012). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, *33*(January 2012), 1–44.
- Smith, L. C., Faustinella, F., & Chan, L.** (1992). Lipases: three-dimensional structure and mechanism of action. *Current Opinion in Structural Biology*, *2*(4), 490–496.
- Sun, Y., Yang, Y., Wang, C., Liu, J., Shi, W., Zhu, X., Li, Q.** (2013). Cell debris self-immobilized thermophilic lipase: A biocatalyst for synthesizing aliphatic polyesters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *170*(2), 399–405.
- Surendhiran, D., & Razack, A.** (2015). An alternative method for production of microalgal biodiesel using novel Bacillus lipase. *3 Biotech*, 715–725.
- Svendsen, A.** (2000). Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1543*(2), 223–238.
- Szczesna-Antczak, M., Antczak, T., Rzycka, M., & Bielecki, S.** (2002). Catalytic properties of membrane-bound Mucor lipase immobilized in a hydrophilic carrier.

*Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20, 261–268.

**Tamalampudi, S., Talukder, M. R., Hama, S., Numata, T., Kondo, A., & Fukuda, H.** (2008). Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 185–189.

**Tischer, W., & Wedekind, F.** (1999). Immobilized enzymes: methods and applications. *Biocatal. Discov. to Appl.*, 200, 95–126.

**Tsitsimpikou, C., Stamatis, H., Sereti, V., Daflos, H., & Kolisis, F. N.** (1998). Acylation of glucose catalysed by lipases in supercritical carbon dioxide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 71(4), 309–314.

**Ugwu, C. U., Aoyagi, H., & Uchiyama, H.** (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 99(10), 4021–4028.

**Ugwu, C. U., Ogbonna, J. C., & Tanaka, H.** (2003). Design of static mixers for inclined

**Van Tilbeurgh, H., Egloff, M. P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., & Cambillau, C.** (1993). Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*, 362(6423), 814–820.

**Van Vooren, G., Le Grand, F., Legrand, J., Cuine, S., Peltier, G., & Pruvost, J.** (2012). Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresource Technology*, 124(June 2016), 421–432.

**Vanitha, A., Narayan, M. S., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A.** (2007). Comparative study of lipid composition of two halotolerant alga, *Dunaliella bardawil* and *Dunaliella salina*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(5), 373–

**Varma, M. N., & Madras, G.** (2007). Synthesis of biodiesel from castor oil and linseed oil in supercritical fluids. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(1), 1–6.

**Verger, R.** (1997). “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*, 15(1), 32–38.

- Vieler, A., Wu, G., Tsai, C. H., Bullard, B., Cornish, A. J., Harvey, C., Benning, C.** (2012). Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLoS Genetics*, *8*(11).
- Vonshak, A., & Torzillo, G.** (2010). Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications, 342.
- Wang, D., Ning, K., Li, J., Hu, J., Han, D., Wang, H., Xu, J.** (2014). *Nannochloropsis* Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits. *PLoS Genetics*, *10*(1).
- Wang, D., Xu, Y., & Teng, Y.** (2007). Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *30*(3), 147–155.
- Wu, G. F., Wu, Q. Y., & Shen, Z. Y.** (2001). Accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Bioresource Technology*, *76*(2), 85–90.
- Xiao, Y., Zhang, J., Cui, J., Feng, Y., & Cui, Q.** (2013). Metabolic profiles of *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under nitrogen-deficiency stress. *Bioresource Technology*, *130*, 731–738.
- Yadav, G. D., & Lathi, P. S.** (2003). Kinetics and mechanism of synthesis of butyl isobutyrate over immobilised lipases. *Biochemical Engineering Journal*, *16*(3), 245–252.
- Yadav, G. D., & Lathi, P. S.** (2004). Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *27*(2–3), 113–119.
- Yoo, C., Jun, S. Y., Lee, J. Y., Ahn, C. Y., & Oh, H. M.** (2010). Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, *101*(1), S71–S74.

**Πετρούτσος, Δ.** (2007). Αποτοξικοποίηση χλωροφαινολών από το χλωροφαινολών από το θαλάσσιο μικροφύκος *Tetraselmis marina*.