



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ (Ι) ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

## Ανάπτυξη μεθοδολογίας ακινητοποίησης του ενζύμου λιπάση σε καινοτόμες υδρογέλες

Σαγιάς Γεώργιος

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Αναστασία Δέτση, Καθηγήτρια ΕΜΠ



Αθήνα, Ιούλιος 2024

## Περίληψη

Οι λιπάσες αποτελούν μια ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία ενζύμων, που αξιολογείται σε βιοκαταλυτικές δράσεις. Προέρχονται από την ευρύτερη ομάδα των υδρολασών και καταλύουν μεγάλο αριθμό υδρολυτικών αντιδράσεων ελαίων, λιπαρών, ενώ συμμετέχουν και σε αντιδράσεις σύνθεσης, όπως η εστεροποίηση. Συμβάλλουν στην ανάπτυξη διεργασιών με πράσινο και βιώσιμο χαρακτήρα, αφού επιτυγχάνεται ταχύτερη αντίδραση, υπό πιο ήπιες συνθήκες και δίνεται η δυνατότητα σύνθεσης μορίων με υψηλή εκλεκτικότητα.

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (NaDESs) είναι μίγματα διαφορετικών φυσικών συστατικών (στερεών ή υγρών), δοτών και δεκτών ηλεκτρονίων, που αλληλεπιδρούν μέσω δεσμών υδρογόνου σχηματίζοντας υγρό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Χαρακτηρίζονται από πράσινο χαρακτήρα, μιας και είναι βιοσυμβατοί, βιοαποικοδομήσιμοι, ενώ δεν εμφανίζουν τοξικότητα και η παρασκευή τους είναι απλή και οικονομική. Στην περίπτωση της διπλωματικής αυτής, τα συντιθέμενα NaDESs έχουν ως κύρια συστατικά τους ωσμωλύτες που αποτελούν μικρά μόρια τα οποία συντίθενται από τα κύτταρα με στόχο την απόκριση σε εξωτερικές μεταβολές του περιβάλλοντος.

Στόχος της διπλωματικής εργασίας είναι η σύνθεση των NaDESs που βασίζονται σε ωσμωλύτες και ο χαρακτηρισμός τους (pH, ιξώδες, πολικότητα). Τα επιτυχημένα NaDESs που συντέθηκαν είναι τα Bet/Gly/W (1:2:4), Pro/Gly/W (1:2:4), Sar/Gly/W (1:2:4), Sorb/Gly/W (1:2:5), Bet/Sorb/W (1:1:4), Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5), Ur/Sorb/W (1:1:3). Με την χρήση των διαλυτών αυτών, σχηματίζονται διαλύματα λιπάσης σε NaDES, καθώς και ευτηκτογέλες αλγινικού που περιλαμβάνουν NaDES και εγκλείουν λιπάση στην δομή τους.

Μελετώντας την ενεργότητα κατά την αποθήκευση της λιπάσης εντός των διαλυτών NaDESs τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν για τους διαλύτες Sorb/Gly/W (1:2:5) και Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5). Το NaDES Sorb/Gly/W υπερέχει στην υψηλή ενεργότητα της λιπάσης κατά τις πρώτες ημέρες αποθήκευσής της σε αυτό, ενώ το NaDES Ur/Sorb/Gly/W αναδεικνύεται, διότι διατηρεί σταθερή και σε ικανοποιητικά επίπεδα την ενεργότητα της λιπάσης σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης (55 ημέρες). Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στην σταθερότητα του ενζύμου, φαίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας του ενζύμου εντός των NaDESs. Ωστόσο, τα περισσότερα από τα NaDESs που μελετήθηκαν είναι ανώτερα όσον αφορά την διατήρηση της ενεργότητας της λιπάσης έπειτα από 10 ημέρες αποθήκευσης, συγκριτικά με ένα ρυθμιστικό διάλυμα.

Οι δύο βέλτιστες ευτηκτογέλες για αποθήκευση λιπάσης, είναι οι ευτηκτογέλες αλγινικού με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W, οι οποίες έχουν μεγάλη σταθερότητα και οδηγούν σε υψηλές τιμές ενεργότητας της λιπάσης. Η υψηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης 25°C οδηγεί σε υπερδιπλάσια μείωση της ενεργότητας (50-60%) των δύο βέλτιστων ευτηκτογελεών, έναντι της αντίστοιχης

μείωσης (20%) στην θερμοκρασία των 4°C, σε 35 ημέρες αποθήκευσης. Σημειώνεται ότι η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W υπερέρχει ελαφρώς όσον αφορά την ενεργότητα σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης.

Από την σύγκριση της αποθήκευσης της λιπάσης σε συστήματα NaDESs και σε ευτηκτογέλες για το βέλτιστο NaDES Sorb/Gly/W, παρατηρείται ότι το σύστημα λιπάσης σε ευτηκτογέλη έχει μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας με διαφορά άνω του 40% σε όλη την διάρκεια της αποθήκευσης, έναντι της λιπάσης σε NaDES Sorb/Gly/W που παρουσιάζει μικρότερες τιμές ενεργότητας. Συνολικά, η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W αποτελεί την καλύτερη επιλογή σχετικά με την διατήρηση της λιπάσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, με την ταυτόχρονη επίτευξη υψηλής ενεργότητας σε αντιδράσεις καταλυόμενες από την λιπάση.

Τέλος, γίνεται εφαρμογή των καταλυτικών συστημάτων λιπάσης σε αντιδράσεις υδρόλυσης και μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, όπου πραγματοποιείται η αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) με λιπάση κατά την οποία η απόδοση και η ταχύτητα της αντίδρασης φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλές (8% σε 5 ημέρες αντίδρασης). Η αντίστοιχη αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος με λιπάση δεν φαίνεται να πραγματοποιείται, αφού ακόμη και έπειτα από 5 ημέρες αντίδρασης δεν εμφανίζεται συγκέντρωση παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος. Δοκιμάστηκε και η αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με 1-οκτανόλη σε περιβάλλον NaDES με λιπάση, κατά την οποία έπειτα από 2 ημέρες αντίδρασης η ποσότητα όλου του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα έχει καταναλωθεί και έχει σχηματιστεί p-κουμαρικό οξύ σε απόδοση 24%. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αξιολογικό δεδομένου ότι στην αντίδραση δεν έχει προστεθεί ποσότητα νερού εκτός από αυτή που περιέχεται στο NaDES. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία της 1-οκτανόλης, η οποία είναι λιπόφιλη και βοήθησε στη διαλυτοποίηση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο σύστημα.

Λέξεις κλειδιά: Λιπάση, Ένζυμο, Φυσικοί Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες (NaDESs), Ωσμωλύτες, Υδρόλυση, Μετεστεροποίηση, Ευτηκτογέλες, Αλγινικό νάτριο, Ακίνητοποίηση, 4-παλμιτικός νιτροφαινυλεστέρας, p-κουμαρικός μεθυλεστέρας

## Abstract

Lipases are a widely used class of enzymes, utilized in biocatalytic reactions. They belong to the wide group of hydrolases and can catalyze numerous hydrolytic reactions of oils and fats, while also can participate in synthesis reactions, such as esterification. They contribute to the development of processes with a green and sustainable character, since a faster reaction is achieved, under milder conditions and it is possible to synthesize molecules with high selectivity.

Natural deep eutectic solvents (NaDESs) are mixtures of different natural components (solid or liquid), electron donors and acceptors, which are bonded through a dense network of hydrogen bonds, resulting to the formation of a liquid at ambient temperature. They are characterized by a green character, since they are biocompatible and biodegradable, while they do not show toxicity and their preparation is simple and cost effective. In this diploma thesis, the synthesized NaDESs comprise of osmolytes, which are small molecules that are synthesized by cells, as a response to external changes in the environment.

The aim of the diploma thesis is the synthesis of NaDESs based on osmolytes and their characterization (pH, viscosity, polarity). The successful NaDESs synthesized are Bet/Gly/W (1:2:4), Pro/Gly/W (1:2:4), Sar/Gly/W (1:2:4), Sorb/Gly/W (1:2:5), Bet/Sorb/W (1:1:4), Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5), Ur/Sorb/W (1:1:3). These solvents are utilized for the preparation of solutions of lipase in NaDES, as well as alginate eutectogels that include NaDES and enclose lipase in their structure.

The study of the lipase activity during the storage of the lipase in NaDESs solvents, exhibits that the best results are obtained for Sorb/Gly/W (1:2:5) and Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5) solvents. NaDES Sorb/Gly/W excels in high lipase activity during the first days of its storage in it, while NaDES Ur/Sorb/Gly/W stands out, because it maintains stable and satisfactory levels of lipase activity during long periods of storage (55 days). Regarding the effect of temperature, it is observed that an increase in storage temperature leads to a decrease in enzyme activity within NaDESs. However, most NaDES are superior in maintaining lipase activity after 10 days of storage, compared to buffer solution.

The two optimal eutectogels for lipase storage are alginate eutectogels with NaDES Sorb/Gly/W and Sar/Gly/W, which have high stability and lead to high lipase activity. The higher storage temperature of 25°C leads to a more than two-fold decrease in the activity (50-60%) of the two optimal eutectogels, compared to the corresponding decrease (20%) at the temperature of 4°C, in 35 days of storage. It is noted that the eutectogel with Sorb/Gly/W is slightly superior, in terms of activity at long storage times.

From the comparison of lipase storage in NaDESs systems and in eutectogels for the optimal NaDES Sorb/Gly/W, it is observed that the lipase system in eutectogel has greater activity values with a difference of more than 40% throughout the storage period, compared to lipase in NaDES Sorb/Gly/W showing lower activity

values. Overall, the eutectogel with Sorb/Gly/W is the best choice in terms of retaining lipase for long periods of time, while achieving high activity in lipase-catalyzed reactions.

Finally, the lipase catalytic systems are applied in hydrolysis and transesterification reactions of methyl p-coumarate, where the hydrolysis reaction of methyl p-coumarate is carried out in a NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) environment with lipase, in which the yield and reaction speed appear to be quite low (8% in 5 days of reaction). The corresponding hydrolysis reaction of methyl p-coumarate in a buffer solution environment with lipase does not proceed to the formation of the desired product, since even after 5 days of reaction the concentration of produced p-coumaric acid is zero. The transesterification reaction of methyl p-coumarate with 1-octanol in a NaDES environment with lipase is also tested, in which after 2 days of reaction the whole amount of methyl p-coumarate has reacted and p-coumaric acid was produced (24% yield). This is an interesting result considering that in this reaction the only amount of water present is the water of the NaDES. The formation of the hydrolyzed product is probably owed to the presence of 1-octanol which is more lipophilic and facilitates the dissolution of methyl p-coumarate in the system.

**Keywords:** Lipase, Enzyme, Natural Deep Eutectic Solvents (NaDESs), Osmolytes, Hydrolysis, Transesterification, Eutectogels, Sodium alginate, Immobilization, 4-nitrophenyl palmitate, methyl p-coumarate

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2023-2024, υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας κ. Αναστασίας Δέτση.

Θα ήθελα, πρωτίστως να ευχαριστήσω την κ. Δέτση για την ανάθεση του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος και καινοτόμου θέματος της διπλωματικής μου εργασίας, για την άψογη συνεργασία και την σημαντική καθοδήγησή της κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας. Οι στοχευμένες συμβουλές και λύσεις της, αναφορικά με τις δυσκολίες που εμφανίζονταν στην πειραματική πορεία, είχαν καταλυτικό ρόλο στην ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Επιπλέον, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Υποψήφια Διδάκτορα στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας Ε.Μ.Π., Μαρία-Άννα Καραδένδρου για την πολύτιμη υποστήριξή της σε όλη την διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, για τις χρήσιμες συμβουλές της, τις ευρείες γνώσεις που μου μετέδωσε και την απροβλημάτιστη καθημερινή συνεργασία μας για την περάτωση της εργασίας.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την ευχάριστη συνεργασία, την θετική ατμόσφαιρα και την ομαδικότητα που διακατείχε το εργαστήριο.

Τέλος, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στην οικογένεια μου και στους φίλους μου, για την στήριξη και συμπαράσταση σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	1
Abstract .....	3
Πρόλογος .....	5
Κατάλογος Εικόνων .....	9
Κατάλογος Πινάκων .....	10
Κατάλογος Σχημάτων .....	11
1. Θεωρητικό Μέρος .....	13
1.1 Λιπάση .....	13
1.1.1 Παραγωγή λιπάσης .....	13
1.1.2 Απομόνωση λιπάσης .....	14
1.1.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες .....	14
1.1.4 Εφαρμογές .....	17
1.2 Πράσινη Χημεία .....	19
1.3 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες .....	23
1.3.1 Σχεδιασμός πράσινων διαλυτών .....	23
1.3.2 Ορισμός Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών .....	23
1.3.3 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες .....	25
1.3.4 Ωσμωλύτες και osmo-DESS .....	26
1.3.4.1 NaDESS σε φυσικά συστήματα .....	26
1.3.4.2 Ορισμός – Κατηγοριοποίηση ωσμωλυτών .....	26
1.3.4.3 Συνεργιστική δράση ωσμωλυτών .....	27
1.3.4.4 Σχηματισμός DESS από ωσμωλύτες .....	28
1.3.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESS .....	29
1.3.5.1 Ιξώδες .....	29
1.3.5.2 Πυκνότητα .....	29
1.3.5.3 pH .....	29
1.3.5.4 Πολικότητα .....	30
1.3.5.5 Ιοντική Αγωγιμότητα .....	30
1.3.5.6 Επιφανειακή τάση .....	30
1.3.5.7 Σημείο τήξης .....	30
1.3.5.8 Δείκτης διάθλασης .....	31
1.3.5.9 Επίδραση προσθήκης νερού στις ιδιότητες των DESS .....	31
1.3.6 Μέθοδοι σύνθεσης DESS .....	32

1.3.7 Εφαρμογές των DESs .....	32
1.3.8 Πλεονεκτήματα των DESs .....	35
1.4 Υδρογέλες.....	35
1.4.1 Ορισμός και ιδιότητες υδρογελών .....	35
1.4.2 Πολυμερή για σύνθεση υδρογελών.....	36
1.4.3 Σύνθεση και εφαρμογές υδρογελών.....	37
1.5 Ευτηκτογέλες .....	38
1.5.1 Ορισμός - Πλεονεκτήματα.....	38
1.5.2 Δεσμοί για τον σχηματισμό γελών .....	38
1.5.3 Σύνθεση ευτηκτογελών.....	39
1.5.4 Κατηγορίες και χαρακτηρισμός ευτηκτογελών .....	40
1.5.5 Εφαρμογές ευτηκτογελών .....	42
1.6 Σταθεροποίηση λιπάσης σε DESs .....	43
1.6.1 Λιπάσες σε περιβάλλον DES εντός φυσικών συστημάτων .....	43
1.6.2 Επίδραση νερού και θερμοκρασίας .....	43
1.6.3 Εφαρμογές λιπασών σε DESs .....	44
1.6.4 Ενεργότητα λιπασών σε DESs.....	46
1.7 Ακίνητοποίηση ενζύμων σε υδρογέλες/ευτηκτογέλες .....	47
1.7.1 Στόχοι ακίνητοποίησης.....	47
1.7.2 Φορείς ακίνητοποίησης .....	47
1.7.3 Μέθοδοι ακίνητοποίησης .....	48
1.7.4 Εφαρμογές ακίνητοποιημένων ενζύμων σε γέλες.....	50
1.8 Μέθοδοι ταυτοποίησης.....	52
1.8.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	52
1.8.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	54
2. Πειραματικό Μέρος.....	56
2.1 Σκοπός.....	56
2.2 Όργανα/συσκευές και αντιδραστήρια .....	56
2.3 Γενική μέθοδος σύνθεσης NaDESs .....	58
2.4 Χαρακτηρισμός NaDESs.....	61
2.4.1 Μέθοδος μέτρησης πολικότητας .....	61
2.4.2 Μέθοδος μέτρησης ιξώδους .....	62
2.4.3 Μέθοδος προσδιορισμού pH.....	62
2.5 Διαλυτοποίηση και σταθεροποίηση του ενζύμου λιπάση σε NaDES.....	62



2.6 Γενική μέθοδος σύνθεσης ευτηκτογελών .....	63
2.7 Ακινητοποίηση του ενζύμου λιπάση σε ευτηκτογέλες .....	63
2.8 Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης.....	64
2.8.1 Ενεργότητα λιπάσης σε NaDESs .....	65
2.8.2 Ενεργότητα λιπάσης σε ευτηκτογέλες .....	67
2.9 Διερεύνηση του πεδίου εφαρμογής των καταλυτικών συστημάτων .....	68
2.9.1 Σύνθεση p-κουμαρικού μεθυλεστέρα.....	69
2.9.2 Υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με λιπάση .....	69
2.9.3 Υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με λιπάση.....	70
2.9.4 Μετεστεροποίηση (αλκοόλυση) του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με λιπάση.....	70
2.9.5 Ποσοτικοποίηση του p-κουμαρικού οξέος και του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, καμπύλη αναφοράς σε HPLC.....	71
3. Αποτελέσματα .....	73
3.1 Σύνθεση NaDESs .....	73
3.2 Χαρακτηρισμός NaDESs.....	74
3.2.1. Ιξώδες.....	74
3.2.2 pH.....	75
3.2.3 Πολικότητα .....	76
3.3 Μελέτη ενεργότητας λιπάσης σε NaDESs.....	77
3.4 Μελέτη ενεργότητας λιπάσης σε ευτηκτογέλες.....	88
3.5 Εφαρμογή των καταλυτικών συστημάτων σε αντίδραση υδρόλυσης/μετεστεροποίησης εστέρα .....	95
3.5.1 Ταυτοποίηση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (NMR) .....	95
3.5.2 Καμπύλη αναφοράς μέσω HPLC .....	96
3.5.3 Αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με λιπάση .....	97
3.5.4 Υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με λιπάση.....	99
3.5.5 Αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με n-οκτανόλη παρουσία λιπάσης .....	100
4. Συμπεράσματα .....	102
5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	104
Βιβλιογραφία .....	105

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ενεργή και μη ενεργή διαμόρφωση λιπάσης, αλληλεπίδραση σε υδατικό σύστημα και υδρόφοβη επιφάνεια.....	15
Εικόνα 2: Εφαρμογές των λιπασών.....	17
Εικόνα 3: 12 αρχές της Πράσινης Χημείας.....	20
Εικόνα 4: Σημείο τήξεως ευτηκτικού μίγματος (a) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (b) δύο συστατικών, όπου $M_p$ : σημείο τήξης, $\Delta T_f$ : ταπείνωση σημείου τήξης, $E_p$ : ευτηκτικό σημείο και $E_c$ : ευτηκτική αναλογία. ....	24
Εικόνα 5: Αντίδραση υδρόλυσης του R, S-οξικού φαινυλαιθυλεστέρα.....	45
Εικόνα 6: Ακίνητοποιημένα ένζυμα σε υδρογέλες, μέθοδοι ακίνητοποίησης.....	48
Εικόνα 7: Χημικές μετατοπίσεις των βασικών χαρακτηριστικών ομάδων.....	53
Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας του φασματόμετρου NMR....	53
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας και λειτουργίας της HPLC.	55
Εικόνα 10: Σχηματιζόμενες ευτηκτογέλες αλγινικού με χρήση διαφορετικών NaDESs σε κάθε περίπτωση.....	64
Εικόνα 11: Αντίδραση υδρόλυσης παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα καταλυόμενη από λιπάση προς σχηματισμό νιτροφαινόλης και παλμιτικού οξέος.....	65
Εικόνα 12: Μεταβολή χρώματος εξαιτίας της αντίδρασης υδρόλυσης του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα σε δείγματα διαλυτοποιημένης ευτηκτογέλης. ....	68
Εικόνα 13: Αντίδραση εστεροποίησης για παραγωγή του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα.....	69
Εικόνα 14: Αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα καταλυόμενη από λιπάση, με χρήση NaDES ως διαλύτη, προς παραγωγή p-κουμαρικού οξέος. ....	70
Εικόνα 15: Αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα καταλυόμενη από λιπάση, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος pH=7 ως διαλύτη, προς παραγωγή p-κουμαρικού οξέος. ....	70
Εικόνα 16: Αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με την 1-οκτανόλη καταλυόμενη από λιπάση, με χρήση NaDES ως διαλύτη, προς παραγωγή p-κουμαρικού οκτυλεστέρα.....	71
Εικόνα 17: Φάσμα $^1H$ NMR του παραγόμενου p-κουμαρικού μεθυλεστέρα.....	95

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιούνται στην διεξαγωγή των πειραμάτων .....	56
Πίνακας 2: Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην διεξαγωγή των πειραμάτων .....	57
Πίνακας 3: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό .....	58
Πίνακας 4: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Προλίνη-Γλυκερόλη-Νερό .....	59
Πίνακας 5: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Σαρκοσίνη-Γλυκερόλη-Νερό .....	59
Πίνακας 6: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό.....	59
Πίνακας 7: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Βεταΐνη-Σορβιτόλη-Νερό.....	60
Πίνακας 8: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό.....	60
Πίνακας 9: Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Ουρία-Σορβιτόλη-Νερό.....	61
Πίνακας 10: Σχηματιζόμενες ευτηκτογέλες αλγινικού.....	64
Πίνακας 11: Ενώσεις και ποσότητες που συνθέτουν το ρυθμιστικό διάλυμα.....	65
Πίνακας 12: Τα συστατικά που δοκιμάστηκαν για τη σύνθεση NaDESs και οι γραμμομοριακές αναλογίες μεταξύ τους.....	73
Πίνακας 13: Τιμές ιξώδους των NaDESs και ρυθμίσεις οργάνου (Anton Paar ViscoQC 100) κατά την μέτρηση.....	74
Πίνακας 14: Μετρούμενες τιμές pH των NaDESs και θερμοκρασία κατά την μέτρηση.....	75
Πίνακας 15: Μετρούμενες τιμές πολικότητας των NaDESs.....	76
Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 4 °C.....	78
Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 25 °C.....	80
Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 50 °C.....	83
Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες σε θερμοκρασία 4 °C.....	88
Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες σε θερμοκρασία 25 °C.....	90

## Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1: Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες.....	15
Σχήμα 2: Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.....	25
Σχήμα 3: Καμπύλη αναφοράς παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP), απορρόφηση (A) συναρτήσει της συγκέντρωσης της pNP (μM).....	78
Σχήμα 4: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 4°C.....	79
Σχήμα 5: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 25°C.....	81
Σχήμα 6: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 50°C.....	84
Σχήμα 7: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDESs Sorb/Gly/W (1:2:5) σε θερμοκρασίες 4, 25, 50°C.....	86
Σχήμα 8: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDESs Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5) σε θερμοκρασίες 4, 25, 50°C.....	87
Σχήμα 9: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 4°C.....	89
Σχήμα 10: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 25°C.....	91
Σχήμα 11: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W σε θερμοκρασίες 4, 25°C.....	93
Σχήμα 12: Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών με NaDES Sorb/Gly/W, καθώς και εντός διαλύματος λιπάσης Sorb/Gly/W σε θερμοκρασίες 4, 25°C.....	94
Σχήμα 13: Χρωματογράφημα διαλύματος p-κουμαρικού οξέος και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με συγκέντρωση 100 mg/L για κάθε ένωση. Η κορυφή σε χρόνο 4.4 min αντιστοιχεί στο p-κουμαρικό οξύ και σε χρόνο 6.6 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα.....	96
Σχήμα 14: Καμπύλη αναφοράς p-κουμαρικού οξέος (αριστερά) και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (δεξιά), Area[*10 <sup>6</sup> ] το εμβαδό της κορυφής που προκύπτει και Conc.[*10 <sup>2</sup> ] η συγκέντρωση της ένωσης που μετράται εκφρασμένη σε mg/L (ppm).....	97

Σχήμα 15: Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε NaDES για $t = 5$ h, η κορυφή στα 6.52 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα.....	98
Σχήμα 16: Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε NaDES για $t = 5$ days, η κορυφή στα 3.985 min αποδίδεται στο p-κουμαρικό οξύ (2) και στα 6.97 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα (1).....	98
Σχήμα 17: Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για $t = 3$ h, όπου η κορυφή στα 6.951 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα .....	99
Σχήμα 18: Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για $t = 5$ days, όπου η κορυφή στα 7.057 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα .....	100
Σχήμα 19: Χρωματογράφημα αντίδρασης αλκοόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) με 1-οκτανόλη σε NaDES για $t = 1$ h, όπου η κορυφή στα 6.981 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα .....	101
Σχήμα 20: Χρωματογράφημα αντίδρασης αλκοόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) με 1-οκτανόλη σε NaDES για $t = 2$ days, όπου η κορυφή στα 4.532 min αντιστοιχεί στο p-κουμαρικό οξύ.....	101

# 1. Θεωρητικό Μέρος

## 1.1 Λιπάση

Τα ένζυμα αποτελούν πλέον ένα αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης βιομηχανίας, μιας και επιταχύνουν πληθώρα αντιδράσεων. Η συνεχής έρευνα και ανάπτυξη των μεθόδων καλλιέργειας των ενζύμων τα καθιστά οικονομικά βιώσιμα για χρήση σε μεγάλη κλίμακα. Βασική εφαρμογή των ενζύμων συναντάται στην κατάλυση αντιδράσεων υδρόλυσης, για τις οποίες χρησιμοποιείται το 75% των παραγόμενων ενζύμων.<sup>4</sup> Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία ενζύμων, που χρησιμοποιείται σε βιοκαταλυτικές δράσεις είναι οι λιπάσες. Προέρχονται από την ευρύτερη ομάδα των υδρολασών, συνεπώς καταλύουν μεγάλο αριθμό υδρολυτικών αντιδράσεων ελαίων, λιπαρών, ενώ συμμετέχουν και σε αντιδράσεις σύνθεσης, όπως η εστεροποίηση.<sup>1,2</sup>

Με την ενζυμική τους δράση συμβάλλουν στην ανάπτυξη διεργασιών με πράσινο και βιώσιμο χαρακτήρα, αφού επιτυγχάνεται ταχύτερη αντίδραση, υπό ήπιες συνθήκες και η διαδικασία απλοποιείται έναντι ενός κοινού μονοπατιού οργανικής σύνθεσης. Επιπλέον, τα παραπροϊόντα ή απόβλητα ελαχιστοποιούνται και δίνεται η δυνατότητα σύνθεσης ενώσεων με υψηλή τοποεκλεκτικότητα, χημειοεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα.<sup>3</sup>

### 1.1.1 Παραγωγή λιπάσης

Οι λιπάσες προέρχονται συνήθως από μικροβιακές καλλιέργειες βακτηρίων, μυκήτων, σπόρια μικροοργανισμών, ενώ επιπλέον απομονώνονται από τον άνθρωπο και ζωικές πηγές (αγελάδες, χοίρους κ.ά.) κυρίως από το πάγκρεας υγιών ατόμων.<sup>2</sup> Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς που παράγουν λιπάσες είναι βακτήρια, μύκητες, ζύμες και ακτινομύκητες από τα γένη *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Pichia*, *Streptomyces*.<sup>4</sup>

Οι μικροβιακές λιπάσες παράγονται συνήθως σε βυθισμένη καλλιέργεια, ενώ υπάρχουν αναφορές για σύνθεση μέσω ζύμωσης σε στερεά κατάσταση ή και καλλιέργεια με χρήση ακινητοποιημένων κυττάρων.<sup>5,6</sup> Η παραγωγή των λιπασών επηρεάζεται από την συγκέντρωση και το είδος των χρησιμοποιούμενων πηγών άνθρακα και αζώτου στην κυτταρική καλλιέργεια, το pH, την θερμοκρασία, την περιεκτικότητα σε οξυγόνο. Σημαντικός παράμετρος για καλύτερη απόδοση είναι η ύπαρξη μιας λιπιδικής πηγής άνθρακα, δηλαδή η χρήση περίπου 1% ελαίου ή λιπαρού στο μέσο καλλιέργειας.<sup>7</sup> Οι πιο συνηθισμένες πηγές αζώτου είναι η πεπτόνη, η σόγια και το εκχύλισμα μαγιάς, ενώ αναφέρεται ότι οι οργανικές πηγές αζώτου οδηγούν σε μεγαλύτερη παραγωγή λιπάσης. Ακόμη, η χρήση ιόντων μαγνησίου, ασβεστίου και σιδήρου στο μέσο καλλιέργειας ενισχύει σημαντικά την ποσότητα της λιπάσης που παράγεται από τους μικροοργανισμούς *Bacillus species* και *Aspergillus Niger*.<sup>4</sup>

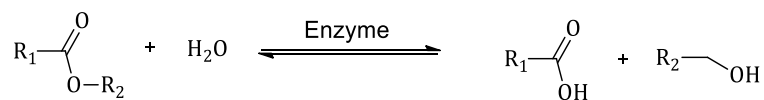
### 1.1.2 Απομόνωση λιπάσης

Για την χρήση των λιπασών στην κατάλυση αντιδράσεων στις περισσότερες εφαρμογές απαιτείται πλήρης ή τουλάχιστον σε μεγάλο βαθμό διαχωρισμός τους από το μέσο καλλιέργειάς. Μερικές από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές καθαρισμού λιπασών αποτελούν η κατακρήμνιση, η στήλη φιλτραρίσματος με γέλη, η χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, η χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής και η χρωματογραφία συγγένειας. Για καλύτερο διαχωρισμό οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται και συνδυαστικά. Ενδεικτικά, για την απομόνωση λιπάσης από τον μικροοργανισμό *P. aeruginosa* γίνεται χρήση υπερδιήθησης για πύκνωση του ενζυμικού διαλύματος, ακολουθεί χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής και τέλος φιλτράρισμα μέσω γέλης. Μια πιο περίπλοκη τεχνική εφαρμόζεται στην περίπτωση της εξωκυτταρικής λιπάσης που προέρχεται από το *Rhizopus oryzae*, κατά την οποία υφίσταται κατακρήμνιση με άλας θειικού αμμωνίου, κατόπιν χρησιμοποιείται χρωματογραφία ιοντοεναλλαγής με χαρακτηριστική ομάδα sulforpropyl (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) και φιλτράρισμα με γέλη, ενώ επαναλαμβάνεται η στήλη ιοντοεναλλαγής για μεγαλύτερη καθαρότητα του τελικού ενζύμου. Για βιομηχανικές εφαρμογές μεγάλης κλίμακας δεν απαιτείται η μέγιστη καθαρότητα της λιπάσης, οπότε μπορούν να εφαρμοστούν λιγότερα βήματα διαχωρισμού για μείωση του απαιτούμενου κόστους.<sup>4, 8, 9</sup>

### 1.1.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες

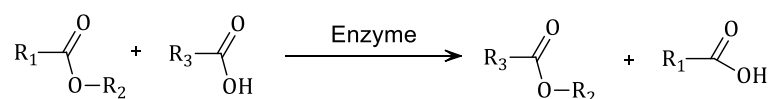
Για την καλύτερη ανάλυση της δράσης των λιπασών γίνεται διάκριση μεταξύ των αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν. Οι δύο βασικές κατηγορίες είναι οι αντιδράσεις υδρόλυσης και οι αντιδράσεις σύνθεσης. Σημαντικό τους πλεονέκτημα είναι η δυνατότητα κατάλυσης πολλαπλών αντιδράσεων από το ίδιο ενεργό κέντρο της λιπάσης γεγονός που αυξάνει τις εφαρμογές τους.<sup>2, 10</sup> Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις λιπάσες συνοψίζονται παρακάτω (Σχήμα 1).

#### Υδρόλυση και εστεροποίηση

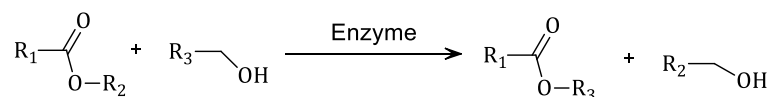


#### Μετεστεροποιήσεις

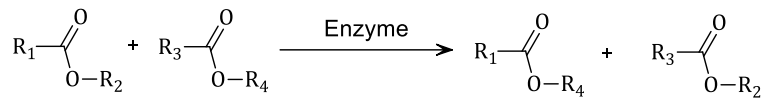
##### Οξεόλυση



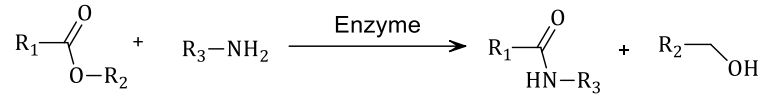
##### Αλκοόλυση



### Διεστεροποίηση

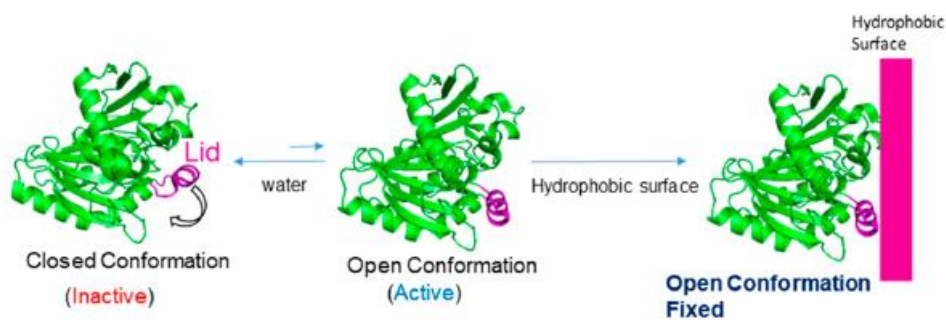


### Αμινόλυση



**Σχήμα 1:** Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες <sup>26</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι λιπάσες υφίστανται σε δύο καταστάσεις ισορροπίας, την κλειστή και την ανοιχτή δομή, που μεταφράζεται σε ανενεργή και ενεργή δομή ενζύμου, αντίστοιχα. Σε υδατικά συστήματα οι περισσότερες λιπάσες εμφανίζονται με την κλειστή δομή τους, με το ενεργό κέντρο να βρίσκεται εντός του ενζύμου σε μη άμεσα προσβάσιμη υδρόφοβη περιοχή. Η ανοιχτή δομή της λιπάσης επιτυγχάνεται με την ύπαρξη διεπιφάνειας νερού – λιπιδίου, στην οποία το τμήμα που εμποδίζει την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο προσροφάται φυσικά στα λιπίδια και το ενεργό κέντρο απελευθερώνεται, οπότε η λιπάση αποκτά την ενεργή δομή της.<sup>10, 14</sup> Η δράση της λιπάσης στην διεπιφάνεια οδηγεί σταδιακά σε μείωση της ενεργότητάς της λόγω μετουσίωσης, φαινόμενο που εντείνεται σε υψηλές θερμοκρασίες και τυρβώδης συνθήκες, ενώ η χρήση πολυπροπυλενογλυκόλης μειώνει καθοριστικά το ρυθμό μετουσίωσης. Για την καλύτερη διαχείριση των λιπασών χρησιμοποιούνται σε ακινητοποιημένη μορφή, η οποία επιτυγχάνεται με προσρόφηση σε υδρόφοβη μήτρα, με εγκλεισμό σε πολυμερικές γέλες, με προσρόφηση σε μακροπορώδης ρητίνες ιοντοεναλλαγής και με ενθυλάκωση σε λιπιδικά σωματίδια. <sup>4</sup>



**Εικόνα 1:** Ενεργή και μη ενεργή διαμόρφωση λιπάσης, αλληλεπίδραση σε υδατικό σύστημα και υδρόφοβη επιφάνεια. <sup>15</sup>

Στις αντιδράσεις υδρόλυσης πραγματοποιείται διάσπαση τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και λιπαρά οξέα. Συνεπώς, η υδρολυτική δράση αφορά κυρίως τα έλαια και τα λίπη. Ακόμη, μπορούν να υδρολύσουν εστέρες γλυκερόλης με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης ευνοούνται σε υδατικό περιβάλλον και δρουν στην διεπιφάνεια μεταξύ ελαίου και νερού <sup>11</sup>, ενώ δεν κατορθώνουν να υδρολύσουν ικανοποιητικά ένα υπόστρωμα που βρίσκεται διαλυμένο σε υδατική φάση. <sup>4</sup>



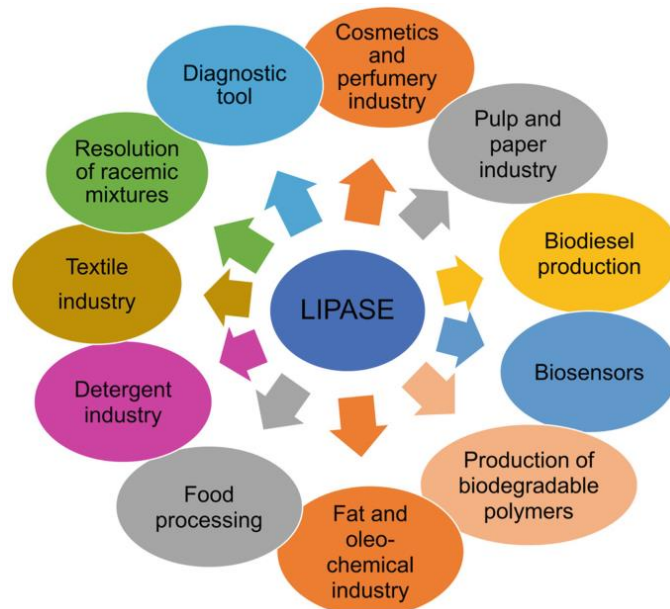
Όσον αφορά τις ανθρώπινες λιπάσες (παγκρεατικές) για να ενεργοποιηθούν απαιτούν διεπιφανειακή ενεργοποίηση. Για το σκοπό αυτό το υπόστρωμα πρέπει να γαλακτωματοποιηθεί σε σταγονίδια με φωσφολιπίδια. Επιπλέον, το κλειδί για την ενεργοποίηση τους είναι μια μικρή πρωτεΐνη, όπου αναφέρεται ως συν-λιπάση, η οποία προσδένεται στο μη καταλυτικό τμήμα του ενζύμου και αλληλεπιδρά με την περιοχή που παρεμποδίζει την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Τα σχηματιζόμενα σταγονίδια και η συν-λιπάση κατορθώνουν να μετατοπίσουν τα τμήματα γύρω από το ενεργό κέντρο και να επιτρέψουν την είσοδο στην υδρόφοβη περιοχή που βρίσκεται το ενεργό κέντρο. Έτσι το υπόστρωμα μπορεί να διέλθει στην υδρόφοβη περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο και να αλληλεπιδράσει με αυτό. Η παραπάνω ενεργοποίηση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χρήση πολυηλεκτρολυτών (αντί της συν-λιπάσης) και του γαλακτωματοποιημένου υποστρώματος. Συνεπώς, οι λιπάσες δεν είναι πάντοτε σε ενεργή μορφή και πρέπει να προηγηθούν οι κατάλληλες τροποποιήσεις.<sup>2</sup> Η πλειοψηφία των λιπασών για να λειτουργήσει αποτελεσματικά και να αποκτήσει την μέγιστη ενεργότητα χρειάζεται την συμβολή συν-λιπασών, οι οποίες είναι είτε ιόντα μετάλλων που αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, είτε οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται για μεταφορά υδριδίου. Στις λιπάσες η πιο κοινή συν-λιπάση είναι τα ιόντα ασβεστίου.<sup>21</sup>

Πολλές λιπάσες είναι ενεργές σε οργανικό περιβάλλον (ή περιβάλλον με πολύ μικρή περιεκτικότητα νερού έναντι της οργανικής φάσης) και καταλύουν αντιδράσεις εστεροποίησης, μετεστεροποίησης, τοποεκλεκτικής ακυλίωσης γλυκόλης και σύνθεσης πεπτιδίων.<sup>4</sup> Επιπλέον, εξαιτίας της δυνατότητας των λιπασών να καταλύουν διαφορετικές αντιδράσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τροποποίηση τριγλυκεριδίων. Σε μη υδατικά συστήματα ορισμένες λιπάσες εμφανίζουν αυξημένη ανθεκτικότητα, άρα και προοπτική για επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου. Η οργανική φάση μπορεί να τροποποιήσει την εκλεκτικότητα και ειδίκευση του ενζύμου ενισχύοντας το εύρος αντιδράσεων που καταλύονται. Σημαντική παράμετρο αποτελεί η ευκολότερη πρόσβαση και αλληλεπίδραση της λιπάσης με πιο λιπόφιλα υποστρώματα, τα οποία δεν είναι διαχειρίσιμα σε υδατικό μέσο. Συνήθως, στην οργανική φάση μπορούν να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις υποστρώματος με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγικότητα και ρυθμό αντίδρασης, που αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την εφαρμογή των λιπασών σε βιομηχανική κλίμακα.<sup>3</sup>

Σε ένα οργανικό μέσο, οι λιπάσες μπορούν ακόμη να καταλύσουν την αντίδραση των καρβοξυλικών οξέων με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς τον σχηματισμό υπεροξυκαρβοξυλικών οξέων.<sup>12</sup> Αντίστοιχα με αυτή την αντίδραση πραγματοποιείται και η εποξείδωση ακόρεστων οργανικών ενώσεων. Ακόμη, οι λιπάσες συμβάλλουν σε αντιδράσεις που εμπλέκουν δεσμούς μεταξύ ανθράκων και μεταξύ άνθρακα και ετεροατόμων (S, O, N).<sup>13</sup>

### 1.1.4 Εφαρμογές

Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ευρέως από την βιομηχανία για την επεξεργασία ελαίων, λιπαρών, την παρασκευή απορρυπαντικών, την επεξεργασία τροφίμων, την κατασκευή χαρτιού, την σύνθεση χημικών ενώσεων καθώς και φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων.<sup>2,4</sup> Οι εφαρμογές συνοψίζονται και στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2: Εφαρμογές των λιπασών<sup>26</sup>

Πιο συγκεκριμένα στην βιομηχανία απορρυπαντικών και καθαριστικών οι λιπάσες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση των λιπών. Για το σκοπό αυτό επιλέγονται λιπάσες που καταλύουν μεγάλο εύρος αντιδράσεων, είναι ανθεκτικές σε θερμοκρασίες 30-60 °C και αλκαλικές τιμές pH 10-11 και τέλος συνυπάρχουν με άλλα ένζυμα χωρίς να χάνουν την ενεργότητά τους. Οι πιο κοινές λιπάσες σε απορρυπαντικά είναι η 'Lipolase' και η 'Lumafast' που προέρχονται από τους μικροοργανισμούς *Thermomyces lanuginosus* και *Pseudomonas mendocina* αντίστοιχα.<sup>16</sup>

Στην βιομηχανία προϊόντων χαρτιού οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ως καταλύτες για την διάσπαση των λιπιδικών μορίων του ξύλου που δημιουργούν προβλήματα στην κατασκευή και επεξεργασία του χαρτιού. Η λιπάση από τον μύκητα *Candida rugosa* έχει χρησιμοποιηθεί για την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων του ξύλου με απόδοση 90%, αποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα της διεργασίας.<sup>4,16</sup>

Σημαντική είναι και η χρήση των λιπασών στην βιομηχανία τροφίμων. Οι λιπάσες επιτρέπουν την τροποποίηση των αλυσίδων των λιπαρών οξέων ως προς το μέγεθος και την θέση τους, ενώ μπορούν να αντικαταστήσουν και ολόκληρες αλυσίδες λιπαρών, με αποτέλεσμα την αναβάθμιση των λιπιδίων και την βελτίωση των ιδιοτήτων τους για χρήση σε τρόφιμα. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και για την βελτίωση της γεύσης και του αρώματος των τροφίμων είτε υδρολύοντας τα λιπαρά, είτε μέσω της σύνθεσης εστέρων με μικρή αλυσίδα.<sup>3,1</sup>

Μια διαδεδομένη εφαρμογή είναι η αντίδραση μετεστεροποίησης από ακινητοποιημένη λιπάση *Rhizomucor miehei*, που εμπλέκει την αντικατάσταση του παλμιτικού οξέος από το στεατικό οξύ σε φοινικέλαιο, με αποτέλεσμα την αναβάθμιση της ποιότητας του ελαίου για χρήση στην βιομηχανία κακάο.<sup>17</sup> Ακόμη, εφαρμόζονται στην επεξεργασία του γάλακτος, υδρολύοντας τα λιπαρά του και ενισχύοντας την γεύση και πήξη των γαλακτοκομικών.<sup>1</sup> Αναφέρεται και η χρήση λιπάσης για την παρασκευή μαργαρίνης μέσω αντίδρασης οξέολυσης, που ανήκει στην κατηγορία των μετεστεροποιήσεων.<sup>25</sup>

Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται και σε αντιδράσεις οργανικής σύνθεσης. Το σημαντικό τους πλεονέκτημα είναι η κατάλυση χημείο-, τόπο- και στερεοεκλεκτικών αντιδράσεων παράγοντας με ευκολία καθαρές εναντιομερείς ενώσεις. Λειτουργούν στην διεπιφάνεια μεταξύ λιπόφιλων και υδρόφιλων συστατικών και είναι ανθεκτικές σε οργανικούς διαλύτες. Η υδρολυτική δράση ευνοείται σε υδατικό περιβάλλον, ενώ η έλλειψη νερού οδηγεί σε συνθετική δράση των λιπασών. Και στις δύο περιπτώσεις πραγματοποιούνται αντιδράσεις με αυξημένο ρυθμό και εναντιοεκλεκτικότητα, οι οποίες εναλλακτικά θα απαιτούσαν πολλαπλά βήματα παρασκευής μέσω κοινής οργανικής σύνθεσης.<sup>4,18</sup> Μια σημαντική αντίδραση με την χρήση λιπάσης αποτελεί ο διαχωρισμός των εναντιομερών ενώσεων μέσω εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εστεροποίηση με λιπάση από τον μικροοργανισμό *C. Antarctica* σε μη υδατικό μέσο εμφανίζει εκλεκτικότητα ως προς το R- ισομερές της κετοπροφαίνης σε ένα μη χειρόμορφο διαλύτη.<sup>19</sup> Ακόμη, οι λιπάσες χρησιμοποιούνται για αντιδράσεις ακυλίωσης στεροειδών και σακχάρων με υψηλή τοποεκλεκτικότητα. Στην βιβλιογραφία αναφέρεται παραγωγή μονοακυλιωμένων σακχάρων σε άνυδρη πυριδίνη από τριαιθυλεστέρα και μονοσακχαρίτες, καθώς και η αντίστοιχη απακυλίωση με χρήση λιπάσης από το μικροοργανισμό *A. niger*.<sup>20</sup>

Αξίζει να γίνει αναφορά και στην παραγωγή βιοντήζελ μέσω καταλυόμενης από λιπάσες εστεροποίησης τριγλυκεριδίων με μεθανόλη προς τον σχηματιζόμενο εστέρα.<sup>3,10</sup> Στον τομέα της ενέργειας γίνεται χρήση λιπασών για την εστεροποίηση οξέων μακράς αλυσίδας με τελικό προϊόν μεθυλ- και αιθυλεστέρες που χρησιμοποιούνται για εμπλουτισμό καυσίμων.<sup>4</sup> Μια άλλη εφαρμογή συναντάται στην επεξεργασία δερμάτων κατά την οποία πραγματοποιείται υδρόλυση των λιπαρών ενώσεων του δέρματος για αναβάθμιση της ποιότητας και διευκόλυνση των μετέπειτα επεξεργασιών.<sup>2,3</sup>

Τέλος, αναλύονται οι χρήσεις των λιπασών στον τομέα της φαρμακευτικής και την σημασία τους για τον ανθρώπινο οργανισμό. Στον ανθρώπινο οργανισμό οι λιπάσες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση αμφίφιλων ενώσεων, που συγκεντρώνονται στον οργανισμό και εξαιτίας της φύσης τους δεν είναι εύκολο να μεταβολιστούν, σχηματίζοντας τα αντίστοιχα οξέα και αλκοόλες τα οποία είναι πολικά με αποτέλεσμα να μεταβολίζονται πιο άμεσα.<sup>21</sup> Επίσης, έχουν ενεργό ρόλο στην πέψη, στην μεταφορά και απορρόφηση των τριγλυκεριδίων, γεγονός που συνδέεται άμεσα με τις χαμηλής και υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες και επηρεάζει την κατανομή της χοληστερόλης στον οργανισμό μεταξύ του συκωτιού

και των ιστών. Συνεπώς, ο ρόλος των λιπασών στον άνθρωπο είναι καθοριστικός για βασικές λειτουργίες του οργανισμού.<sup>24</sup>

Επιπλέον, οι λιπάσες που συναντώνται στον οργανισμό αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την φαρμακοκινητική και την βιοδιαθεσιμότητα των εστέρων που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα ή προφάρμακα, αφού καθορίζουν την κινητική που ακολουθεί η διάσπαση του φαρμάκου στον οργανισμό.<sup>22</sup> Μια ακόμη χρήση είναι η κατασκευή συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων (Drug Delivery Systems - DDSs) βασισμένα σε λιπιδικά σωματίδια, τα οποία διασπώνται από τις ανθρώπινες λιπάσες και ακολουθεί η αποδέσμευση της δραστικής φαρμακευτικής ένωσης. Ο σχεδιασμός τέτοιων συστημάτων απαιτεί την γνώση της σταθερότητας των σωματιδίων και τον ρυθμό της καταλυτικής υδρόλυσης των λιπιδίων.<sup>23</sup>

## 1.2 Πράσινη Χημεία

Στην σημερινή εποχή η ανάγκη προστασίας του περιβάλλοντος αποτελεί ένα φλέγον ζήτημα. Η συνθήκη αυτή επηρεάζει προφανώς και την συνεχώς αναπτυσσόμενη βιομηχανία, η οποία φέρει σημαντικό μερίδιο ευθύνης. Για την εξάλειψη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων πραγματοποιείται συνεχής έρευνα για την τροποποίηση των πρακτικών που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή, ενώ το ιδεατό σενάριο είναι η επίτευξη μιας ισορροπίας μεταξύ της αποδοτικότητας και βιωσιμότητας των διεργασιών και του χαμηλού περιβαλλοντικού αποτυπώματος. Η παραπάνω ανάλυση μπορεί να τοποθετηθεί υπό τον όρο Πράσινη Χημεία, που ορίζεται ως ο σχεδιασμός χημικών προϊόντων και διεργασιών με στόχο την μέγιστη δυνατή μείωση της χρήσης και της παραγωγής επικίνδυνων ουσιών.<sup>27, 28</sup> Η πράσινη χημεία ξεκινά από την αρχική ιδέα της σύνθεσης ενός προϊόντος και ακολουθεί όλη την πορεία μέχρι και την τελική χρήση του ή την τελική του απόρριψη, ενώ ο τελικός στόχος είναι η βιωσιμότητα του σχεδιασμού σε μοριακό επίπεδο. Επιπλέον, εισάγει την ιδέα μείωσης των επικίνδυνων διεργασιών ή χημικών ουσιών κατά την παραγωγή, που οδηγεί αυτόματα στην μείωση του ρίσκου αστοχιών και ατυχημάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πράσινη χημεία δεν περιορίζεται σε εργαστηριακές δοκιμές, αντιθέτως επηρεάζει την βιομηχανία, την προστασία του περιβάλλοντος, την εκπαίδευση, εμπλέκοντας πολλούς κλάδους με κοινούς κατά βάση στόχους, δίνοντας έναν κοινό τρόπο σκέψης και δράσης. Για να υπάρχει πιο στοχευμένη μελέτη το 1998 εισήχθησαν από τους Anastas και Warner οι 12 αρχές της πράσινης χημείας που αποτελούν σχεδιαστικές κατευθύνσεις και παρέχουν τις βάσεις για τον ορθό και βιώσιμο σχεδιασμό διεργασιών και χημικών ουσιών. Οι κανόνες εμπεριέχουν την αρχική επιλογή των πρώτων υλών, την επιλογή της αντίδρασης, τον διαχωρισμό των προϊόντων, τα παραγόμενα παραπροϊόντα και την βιοαποικοδόμηση των τελικών ενώσεων, συνεπώς ελέγχεται ολόκληρη η πορεία της διαδικασίας και το αποτέλεσμα είναι το βέλτιστο.



**Εικόνα 3:** 12 αρχές της Πράσινης Χημείας

Οι αρχές της Πράσινης Χημείας παρουσιάζονται παρακάτω: <sup>27, 28</sup>

### 1) Πρόληψη δημιουργίας αποβλήτων

Είναι προτιμότερη η αποφυγή παραγωγής τους κατά τον σχεδιασμό της διεργασίας σε αντίθεση με την επεξεργασία και τον καθαρισμό τους αφού έχουν ήδη παραχθεί. Ως απόβλητα θεωρούνται οι ενώσεις που παράγονται και δεν έχουν κάποια χρήσιμη εφαρμογή και επομένως δεν μπορούν να εκμεταλλευτούν περαιτέρω καθώς και η ενέργεια που χάνεται από το σύστημα χωρίς να αξιοποιηθεί. Τα απόβλητα εμφανίζονται με πολλές μορφές και επηρεάζουν το περιβάλλον ανάλογα με την ποσότητα, την φύση, την τοξικότητα και τον τρόπο που απορρίπτονται. Σε περιπτώσεις όπου η παραγωγή αποβλήτων είναι αναπόφευκτη ο σχεδιασμός της διεργασίας οφείλει να προβλέπει ώστε τα απόβλητα να επεξεργάζονται πριν την απόρριψή τους ή να χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη σε μια άλλη βιομηχανική εφαρμογή.

### 2) Οικονομία ατόμου

Με τον όρο αυτό εννοείται η προσπάθεια χρήσης κατάλληλων αντιδράσεων, ώστε τα χρησιμοποιούμενα αντιδρώντα να συμμετέχουν με τον μεγαλύτερο δυνατό βαθμό στο τελικό προϊόν της αντίδρασης. Το ιδανικό σενάριο αποτελεί η χρήση όλων των αντιδρώντων στην σύνθεση της τελικής ένωσης ώστε να προκύπτει δείκτης οικονομίας ατόμου ίσος με την μονάδα. Ο δείκτης αυτός εκφράζεται από τον λόγο του μοριακού βάρους του προϊόντος προς το σύνολο των μοριακών βαρών των αντιδρώντων. Μικρή τιμή του δείκτη αντιστοιχεί σε ύπαρξη παραπροϊόντων ή αντιδρώντων που δεν έχουν αντιδράσει, τα οποία θεωρούνται απόβλητα και πρέπει να απομακρυνθούν και να διαχειριστούν.

### 3) Λιγότερο επικίνδυνη χημική σύνθεση

Η αρχή αυτή περιλαμβάνει την προσπάθεια σχεδιασμού αντιδράσεων που χρησιμοποιούν μη τοξικά αντιδρώντα και μεθοδολογίες, καθώς και αβλαβή παραγόμενα προϊόντα. Αποτελεί ένα δύσκολο στόχο που προϋποθέτει εκτενή

μελέτη και έρευνα. Μερικές από τις προσεγγίσεις που ακολουθούνται είναι οι διαδοχικές αντιδράσεις, η ενεργοποίηση C-H, η μετάθεση και οι ενζυμικές αντιδράσεις.<sup>29, 30</sup>

#### 4) Σχεδιασμός ασφαλέστερων χημικών προϊόντων

Αναφέρεται στον σχεδιασμό αντιδράσεων με μειωμένη τοξικότητα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον, χωρίς όμως να υπονομεύεται η ποιότητα και λειτουργικότητα του τελικού προϊόντος. Για την επίτευξη του στόχου απαιτείται κατανόηση των ιδιοτήτων μιας ένωσης σε μοριακό επίπεδο.

#### 5) Χρησιμοποίηση ασφαλέστερων διαλυτών και βοηθητικών ουσιών

Οι διαλύτες αποτελούν τα βασικότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται σε μεγάλες ποσότητες στην σύνθεση χημικών ενώσεων, συνεπώς είναι καθοριστικοί παράγοντες για το κόστος και το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των διεργασιών. Σε πρώτο στάδιο θα πρέπει οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες να μην είναι τοξικοί, εύφλεκτοι, διαβρωτικοί καθώς και να μην είναι πτητικοί και ιδιαίτερα διαλυτοί στο νερό για αποφυγή μόλυνσης του αέρα και των υδάτων. Στόχος είναι ο περιορισμός της χρήσης των κοινών διαλυτών και ο πιο ενεργειακά αποδοτικός διαχωρισμός τους από το τελικό προϊόν. Για το σκοπό αυτό έχουν συντεθεί και ερευνηθεί νέοι εναλλακτικοί διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά, το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα, υπερκρίσιμα υγρά και βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Το νερό αποτελεί έναν προτιμητέο διαλύτη, αφού είναι άμεσα προσβάσιμο σε μεγάλες ποσότητες και μη τοξικό.

#### 6) Ενεργειακά αποδοτικός σχεδιασμός

Η χρήση ενέργειας αυξάνει το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της διεργασίας, ιδιαίτερα όταν προέρχεται από ορυκτά καύσιμα. Γι' αυτό πρέπει να σχεδιάζονται χημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση, συνθήκες που εξασφαλίζουν και την ασφάλεια της διεργασίας πέραν του οικονομικού κόστους. Ως μέση λύση προτείνεται η χρήση ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές ή από βιομάζα.

#### 7) Χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών

Αναζήτηση πρώτων υλών για σύνθεση ενώσεων και παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές και ανεξαρτητοποίηση από τους ορυκτούς πόρους. Η πιο υποσχόμενη ανανεώσιμη πηγή είναι η βιομάζα, η οποία είναι ομοιόμορφα κατανομημένη και προσβάσιμη, ενώ με την κατάλληλη επεξεργασία προκύπτουν σημαντικές δομικές μονάδες για την σύνθεση ενώσεων, αλλά και την κάλυψη ενεργειακών αναγκών.

#### 8) Αποφυγή/μείωση των χημικών παραγώγων

Κατά την σύνθεση μίας ένωσης πρέπει να ακολουθείται η πιο σύντομη πορεία προς το τελικό προϊόν. Είναι σημαντικό να αποφεύγονται οι παραγωγοποιήσεις, όπως η χρήση προστατευτικών ομάδων και ενδιάμεσων, διότι προστίθενται επιπλέον βήματα σύνθεσης, αντιδραστήρια και διαλύτες, γεγονός που οδηγεί σε

παραγωγή αποβλήτων, αύξηση της τοξικότητας και της επικινδυνότητας της διεργασίας.

#### 9) Κατάλυση αντιδράσεων

Οι καταλύτες αποτελούν την καλύτερη επιλογή για την σύνθεση ενώσεων έναντι της χρήσης αντιδραστηρίων σε στοιχειομετρική αναλογία. Εμφανίζουν αυξημένη εκλεκτικότητα και μειώνουν τις ενεργειακές απαιτήσεις της αντίδρασης. Με τη χρήση τους εξοικονομούνται πρώτες ύλες, ενέργεια, ενώ διευκολύνεται η απομόνωση των προϊόντων, εξαιτίας του απλοποιημένου συστήματος. Ένα καθοριστικό πλεονέκτημα είναι και η μείωση του χρόνου αντίδρασης, χαρακτηριστικό που δύσκολα επιτυγχάνεται με την κοινή σύνθεση. Ιδιαίτερα, τα ένζυμα αποτελούν βιολογικούς καταλύτες που μπορούν να καταλύσουν με υψηλό ρυθμό αντίδρασης την σύνθεση οργανικών ενώσεων. Δρουν με εκλεκτικό τρόπο και παράγουν ενώσεις με εναντιοεκλεκτικότητα. Η αντίστοιχη δράση είναι ιδιαίτερα δύσκολο να επιτευχθεί με έναν κοινό καταλύτη ή μέσω κλασικής οργανικής σύνθεσης και απαιτεί πολλαπλά συνθετικά βήματα.

#### 10) Σχεδιασμός για αποικοδόμηση

Οι χημικές ενώσεις που παράγονται, θα πρέπει στο τέλος του κύκλου ζωής τους να είναι δυνατόν να αποικοδομηθούν σε απλούστερες ενώσεις που δεν παραμένουν για μεγάλο διάστημα στο περιβάλλον και δεν εμφανίζουν τοξικότητα. Η προσέγγιση αυτή αποτελεί και έναν έμμεσο τρόπο διαχείρισης των αποβλήτων, εξοικονομώντας ενέργεια και οικονομικούς πόρους.

#### 11) Ανάλυση σε πραγματικό χρόνο για αποτροπή μόλυνσης

Η ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών για την παρακολούθηση της πορείας σύνθεσης μιας αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο μέσα στον αντιδραστήρα, αποτελεί ένα απαραίτητο εργαλείο για τον έλεγχο της αντίδρασης και την πρόληψη δημιουργίας ανεπιθύμητων ενώσεων. Με αυτό τον τρόπο εντοπίζεται άμεσα κάθε αστοχία του συστήματος ώστε να μην μολυνθεί το τελικό προϊόν και το σημαντικότερο να μην υπάρξει ζήτημα ασφάλειας. Ακόμη, σε γενικό πλαίσιο είναι σημαντική και η ανάπτυξη μεθόδων μέτρησης και χαρακτηρισμού ενώσεων που δεν χρησιμοποιεί τοξικές ενώσεις και δεν παράγει υπερβολικά απόβλητα.

#### 12) Εγγενώς ασφαλέστερες χημικές αντιδράσεις/διεργασίες για πρόληψη ατυχημάτων

Η επιλογή αντιδραστηρίων οφείλει να γίνεται με πρωταρχικό μέλημα την αποφυγή ατυχημάτων, οπότε οι χημικές ενώσεις θα πρέπει να μην είναι τοξικές, εύφλεκτες, εκρηκτικές. Επιπλέον, πρέπει να γίνεται συνολική αξιολόγηση των κινδύνων μιας διεργασίας (τοξικότητα, φυσικοί και παγκόσμιοι κίνδυνοι, υψηλή πίεση/θερμοκρασία), ώστε να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα εκδήλωσης ατυχήματος.

## 1.3 Βαθέως Ευτηκτικοί Διαλύτες

### 1.3.1 Σχεδιασμός πράσινων διαλυτών

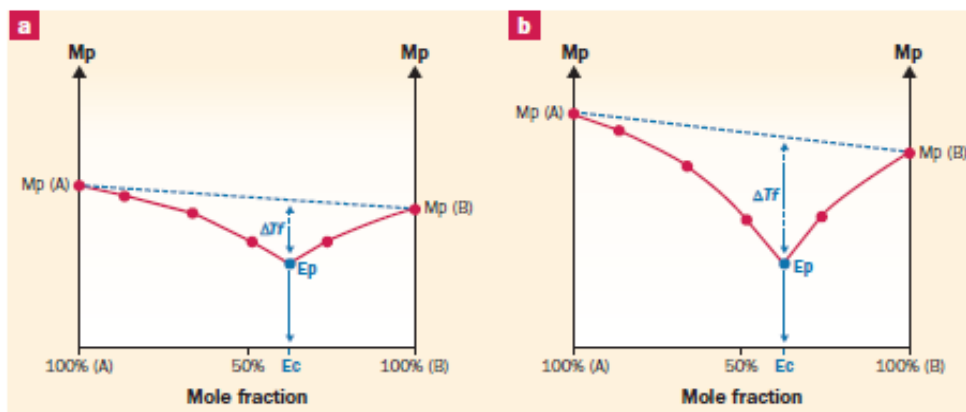
Η ανάγκη υιοθέτησης μιας νέας πιο φιλικής προς το περιβάλλον θεώρησης στον σχεδιασμό διεργασιών, οδηγεί την παγκόσμια βιομηχανία προς την Πράσινη Χημεία εστιάζοντας σε βιώσιμες πρώτες ύλες, ανανεώσιμα υλικά και ενέργεια και γενικότερα χρήση προϊόντων φυσικής προέλευσης.

Οι διαλύτες αποτελούν ενώσεις με ευρεία εφαρμογή σε όλες τις πτυχές της βιομηχανίας και συνεπώς επιβαρύνουν οικονομικά τις διεργασίες και παράλληλα ενισχύουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμά τους. Επιπλέον, οι περισσότεροι οργανικοί διαλύτες είναι πτητικοί και δημιουργούν ζητήματα ασφαλείας και τοξικότητας. Ενδεικτικά, χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως το εξάνιο και η ακετόνη, ενώσεις ιδιαίτερα πτητικές που επιβαρύνουν το περιβάλλον, είναι τοξικές, εύφλεκτες και δεν βιοαποικοδομούνται άμεσα. Οι οργανικοί διαλύτες αυτοί δεν συμμορφώνονται με τις αρχές που θέτει η πράσινη χημεία και είναι επιτακτική η χρήση νέων διαλυτών με πράσινο χαρακτήρα. Για το σκοπό αυτό έχουν συντεθεί νέοι εναλλακτικοί διαλύτες, όπως τα ιοντικά υγρά, τα υπερκρίσιμα υγρά και οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες. Το νερό αποτελεί έναν προτιμητέο διαλύτη, αφού είναι άμεσα προσβάσιμο σε μεγάλες ποσότητες και μη τοξικό.<sup>31, 32, 33</sup>

### 1.3.2 Ορισμός Βαθέως Ευτηκτικών Διαλυτών

Οι βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Deep Eutectic Solvents-DESs) αναφέρθηκαν αρχικά στην βιβλιογραφία από τον Abbott το 2003 και αποτελούν μια σχετικά νέα γενιά διαλυτών.<sup>34</sup> Σχηματίζονται από δύο ή περισσότερα υγρά ή στερεά συστατικά, τα οποία συνθέτουν ένα ομογενές ευτηκτικό υγρό μίγμα. Το ευτηκτικό αυτό μίγμα προκύπτει κυρίως μέσω δημιουργίας δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών, αλλά και άλλων δυνάμεων όπως αλληλεπιδράσεις van der Waals. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα συστατικά που απαρτίζουν τους DESs είναι κατά βάση μη τοξικά. Στους διαλύτες αυτούς εμφανίζεται μεγάλη ταπείνωση του σημείου πήξεως (από 100 έως 200 °C) στην αναλογία χρησιμοποιούμενων συστατικών που αντιστοιχεί στην ευτηκτική σύσταση, σε αντίθεση με απλά ευτηκτικά μίγματα όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4. Τα περισσότερα DESs σε συνθήκες περιβάλλοντος βρίσκονται σε υγρή μορφή και εμφανίζουν μικρή πτητικότητα.<sup>35, 38, 39, 40</sup>

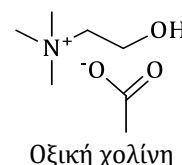
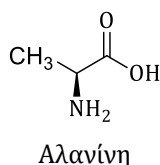
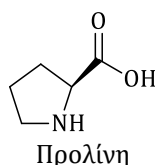
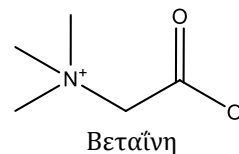
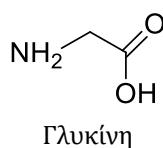
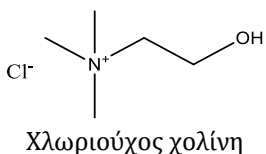




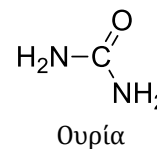
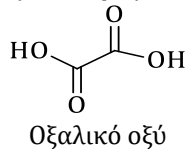
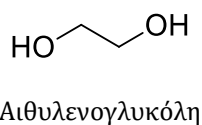
**Εικόνα 4:** Σημείο τήξεως ευτηκτικού μίγματος (a) και βαθέως ευτηκτικού μίγματος (b) δύο συστατικών, όπου Mp: σημείο τήξης,  $\Delta T_f$ : ταπείνωση σημείου τήξης, Ep: ευτηκτικό σημείο και Ec: ευτηκτική αναλογία.<sup>35</sup>

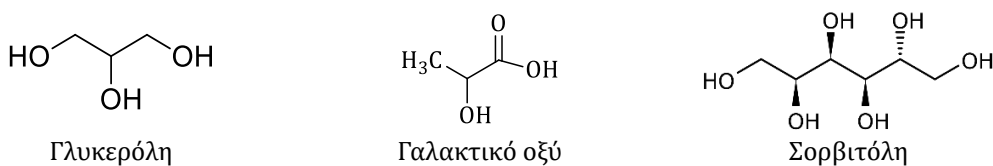
Τα δύο απαραίτητα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών είναι ένας δέκτης δεσμού υδρογόνου (HBA: Hydrogen Bond Acceptor) και ένας δότης δεσμού υδρογόνου (HBD: Hydrogen Bond Donor). Οι ενώσεις αυτές συμμετέχουν σε ανταλλαγή πρωτονίων και ηλεκτρονίων σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου συμβάλλοντας στη σύνθεση του διαλύματος. Με την χρήση συγκεκριμένης αναλογίας μεταξύ των συστατικών σχηματίζεται το DES. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ενώσεων που δρουν ως δέκτες δεσμού υδρογόνου (HBAs) είναι τα άλατα του τεταρτοταγούς αμμωνίου (όπως η χλωριούχος χολίνη), η βεταΐνη, η προλίνη, η αλανίνη, το χλωριούχο τριμεθυλαμμώνιο, ενώ ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως δότες δεσμού υδρογόνου (HBDs) είναι τα καρβοξυλικά οξέα (οξαλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, φορμικό οξύ, κιτρικό οξύ, ακρυλικό οξύ), τα σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη, ξυλόζη), οι αλκοόλες (αιθυλενογλυκόλη, γλυκερόλη, 1,2-προπανοδιόλη), η ουρία, τα αμιδιό (N-μεθυλαιθαναμίδιο, N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο.<sup>36, 37, 38, 39, 40, 41</sup> Μερικοί από τους πιο διαδεδομένους δέκτες και δότες δεσμών υδρογόνου παρατίθενται στο ακόλουθο Σχήμα 2.

#### Δέκτες δεσμού υδρογόνου (HBAs)



#### Δότες δεσμού υδρογόνου (HBDs)





**Σχήμα 2:** Δότες και δέκτες δεσμών υδρογόνου που χρησιμοποιούνται στη σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών.

### 1.3.3 Φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες (Natural Deep Eutectic Solvents-NaDESs) αποτελούν μια υποκατηγορία των DESs, αφού η βασική διαφορά τους είναι η χρήση συστατικών φυσικής προέλευσης, χαρακτηριστικό που συμμορφώνεται με τους κανόνες που θέτει η πράσινη χημεία. Συνεπώς, η χρήση τους είναι περιβαλλοντικά ορθότερη αφού τα φυσικά συστατικά που χρησιμοποιούνται είναι μη τοξικά, άμεσα διαθέσιμα και βιοαποικοδομήσιμα, ενώ είναι γενικά οικονομικά συμβάλλοντας στην βιωσιμότητα των εφαρμογών τους. Για την κατασκευή των NaDESs χρησιμοποιούνται πρωτογενείς μεταβολίτες, όπως αμινοξέα (προλίνη, αλανίνη), σάκχαρα (σακχαρόζη, φρουκτόζη), οξέα οργανικής προέλευσης (γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ), πολυόλες (γλυκερόλη, σορβιτόλη) και παράγωγα χολίνης (χλωριούχος χολίνη). Σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται και η χρήση νερού ως τρίτο συστατικό των NaDESs. Τουλάχιστον δύο από αυτές τις ενώσεις (ένα συστατικό δραστικό ως δότης και ένα ως δέκτης δεσμού υδρογόνου) αναμειγνυόμενες σε συγκεκριμένη αναλογία σχηματίζουν NaDES. <sup>33, 39, 41</sup>

Επιπλέον, τα NaDESs χαρακτηρίζονται ως μια νέα κατηγορία υγρών που συναντώνται σε ζωντανούς οργανισμούς και συνυπάρχουν με την υδατική και λιπιδική φάση των κυττάρων. Έχουν ενεργό ρόλο στη μεταφορά ουσιών και την σύνθεση ενώσεων. Επιπλέον, μπορούν να εφαρμοστούν σε διατάξεις εκχύλισης με τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ του NaDES και των εκχυλιζόμενων ενώσεων αυξάνοντας την απόδοση. Σημαντική είναι και η προστατευτική δράση των NaDES απέναντι στην αποικοδόμηση ευαίσθητων ενώσεων, οι οποίες σταθεροποιούνται από το πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου και διατηρούνται αναλλοίωτες. Εξαιτίας της δομής τους χαρακτηρίζονται και ως ένα υπερμοριακό υγρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου, το οποίο μειώνει σημαντικά την θερμοκρασία κατάψυξης σε σχέση με τα επιμέρους συστατικά και εμποδίζει την ελεύθερη κίνηση των μορίων νερού με αποτέλεσμα να εμφανίζει εξαιρετικές αντιπαγετικές ιδιότητες για εφαρμογή στην βιομηχανία τροφίμων. <sup>42</sup>

Η δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε μεγάλη γκάμα δεκτών και δοτών δεσμών υδρογόνου και την τροποποίηση των αναλογιών μεταξύ τους επιτρέπει στους ερευνητές τον σχεδιασμό ενός NaDES ανάλογα με τις ανάγκες της εκάστοτε εφαρμογής. Μερικά επιπλέον πλεονεκτήματά τους είναι η βιωσιμότητα της χρήσης τους, η ευκολία και το χαμηλό κόστος στην παρασκευή τους χωρίς

παραγωγή παραπροϊόντων, η ελάχιστη πτητικότητα και τοξικότητά τους, ενώ είναι και βιοσυμβατά επιτρέποντας την χρήση τους σε βιολογικές αντιδράσεις.<sup>40</sup>

Τα NaDESs εφαρμόζονται σε εκχυλίσματα βιοδραστικών ενώσεων (π.χ. φαινολικές ενώσεις) από φυτά, στην διαλυτοποίηση της κυτταρίνης, του αμύλου και του DNA. Έχουν χρησιμοποιηθεί και ως μέσα για σύνθεση οργανικών ενώσεων, καθώς και σε ηλεκτροχημικές εφαρμογές. Στην φαρμακευτική βιομηχανία και σε καλλυντικά σκευάσματα χρησιμοποιούνται ως διαλύτες και ως εκχυλιστικά μέσα. Στον τομέα της βιοκατάλυσης τα NaDESs έχουν εξαιρετική εφαρμογή χάρη στην βιοσυμβατότητά τους (αποτελούν φυσικό περιβάλλον για ένζυμα, πρωτεΐνες, βιοδραστικά μόρια) και εμπλέκονται σε ενζυμικές αντιδράσεις κατευθύνοντας την αντίδραση προς τα επιθυμητά προϊόντα, ενώ παράλληλα προστατεύουν τις παραγόμενες ενώσεις, βελτιώνουν την διαλυτότητα των υποστρωμάτων και ενισχύουν την απόδοση της αντίδρασης. Ακόμη, υπάρχουν αναφορές για χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές και στην δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα.<sup>33, 40</sup> Συνεπώς, τα NaDES αποτελούν ιδιαίτερα ικανούς διαλύτες με φυσικό και πράσινο χαρακτήρα και παρουσιάζονται ως εναλλακτική για τους οργανικούς διαλύτες και τα ιοντικά υγρά.<sup>39</sup>

### **1.3.4 Ωσμωλύτες και osmo-DESs**

#### **1.3.4.1 NaDESs σε φυσικά συστήματα**

Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες συναντώνται σε πολλά ζωικά και φυτικά συστήματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το σιρόπι σφενδάμου, το οποίο αποτελείται κυρίως από σακχαρόζη και μικρότερες ποσότητες άλλων σακχάρων και μηλικού οξέος, τα οποία ως αυτόνομες ενώσεις βρίσκονται σε στερεά κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακόμη στα φυτά οι NaDESs συμβάλλουν στον μεταβολισμό των κυττάρων, αφού με την βοήθειά τους, πολλές μεταβολικές ενώσεις που δεν έχουν καλή αναμιξιμότητα με το νερό μπορούν να αποθηκευτούν, να συντεθούν και να μεταφερθούν μέσω αυτών των συστημάτων. Επιπλέον, τα NaDESs είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά σε ακραίες συνθήκες ξηρασίας αλλά και ψύχους με αποτέλεσμα να δημιουργούν ένα σταθερό σύστημα, προστατεύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες, τα ένζυμα και τους μεταβολίτες από τις εξωτερικές διακυμάνσεις. Με το πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου περιορίζουν την κινητικότητα του νερού και αποτρέπουν την μετατροπή του σε πάγο, οπότε στην κυτταρική μεμβράνη δεν εμφανίζονται ρήγματα και ωσμωτικά φαινόμενα.

<sup>41, 42</sup>

#### **1.3.4.2 Ορισμός – Κατηγοριοποίηση ωσμωλυτών**

Στο σημείο αυτό θα γίνει αναφορά και προσπάθεια σύνδεσης μεταξύ των ωσμωλυτών και των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Οι ωσμωλύτες αποτελούν μικρά μόρια που συντίθενται από τα κύτταρα με στόχο την απόκριση σε εξωτερικές μεταβολές του περιβάλλοντος. Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται σε πολλά βιολογικά συστήματα, όπως τα φυτά, τα εξτρεμόφιλα βακτήρια και τα νεφρικά κύτταρα θηλαστικών. Η βασική λειτουργία αυτών των ενώσεων είναι η αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας των μακρομορίων του έμβιου

συστήματος χωρίς να επηρεάζουν αρνητικά τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Η κατασκευή νέων διαλυτών που μιμούνται συστήματα ωσμωλυτών ή περιέχουν ωσμωλύτες αποτελεί πεδίο για περαιτέρω έρευνα.<sup>36</sup>

Οι ωσμωλύτες με βάση την χημική τους δομή χωρίζονται σε κατηγορίες:

- i) Πολυόλες (γλυκερόλη, σορβιτόλη, αιθυλενογλυκόλη, ινοσιτόλη)
- ii) Σάκχαρα (γλυκόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη, φρουκτόζη, μαννόζη)
- iii) Αμινοξέα (προλίνη, αλανίνη, ταυρίνη, βαλίνη, σερίνη, ιστιδίνη)
- iv) Μεθυλαμίνες (σαρκοσίνη, βεταΐνη, N-οξειδίο τριμεθυλαμίνης – TMAO)
- v) Ενώσεις μεθυλοσουλφονίου (dimethylsulfoniopropionate – DMSP)
- vi) Υ-συζευγμένες ενώσεις (ουρία, γουανιδίνες, αργινίνη)

Οι ωσμωλύτες της κατηγορίας (i) εμφανίζονται σε όλους τους οργανισμούς, της κατηγορίας (ii) συναντώνται σε φυτικούς ιστούς και έντομα, της κατηγορίας (iii) σε φυτά και προκαρυωτικά κύτταρα, της κατηγορίας (iv) σε φυτά και θαλάσσιους οργανισμούς, της κατηγορίας (v) σε θαλάσσιους οργανισμούς, ενώ της κατηγορίας (vi) κυρίως σε θηλαστικά και ψάρια. Συνεπώς, οι ωσμωλύτες συναντώνται με διαφορετικές χημικές μορφές σε όλα τα έμβια συστήματα.

Μια άλλη κατηγοριοποίηση των ωσμωλυτών βασίζεται στην επίδρασή τους στα βιολογικά μακρομόρια και ειδικότερα στις πρωτεΐνες. Η πρώτη κατηγορία αποτελεί τους μετουσιωτικούς και καταστρεπτικούς ωσμωλύτες που αναφέρονται και ως χαότροπα (chaotropes) και περιλαμβάνουν ενώσεις όπως η ουρία, η γουανιδίνη και η αργινίνη. Την δεύτερη κατηγορία αποτελούν οι κοσμότροποι (kosmotropes) και συμβατοί ωσμωλύτες, που περιλαμβάνουν ενώσεις όπως μεθυλαμίνες, πολυόλες, αμινοξέα και σάκχαρα. Οι χαοτροπικοί ωσμωλύτες διασπούν την δομή και την λειτουργία των μακρομορίων, ενώ οι κοσμότροποι ωσμωλύτες προστατεύουν και ευνοούν την αρχική δομή της πρωτεΐνης και τείνουν να αντιστέκονται στην καταστρεπτική συμπεριφορά των χαοτρόπικων.<sup>36</sup>

#### 1.3.4.3 Συνεργιστική δράση ωσμωλυτών

Η παρουσία μόνο ενός είδους ωσμωλυτών (χαοτροπικών ή κοσμότροπων) σε ένα σύστημα έχει καταστρεπτικές επιπτώσεις για αυτό, ενώ η προσθήκη ωσμωλυτών και από τις δύο κατηγορίες οδηγεί σε σταθεροποίηση του συστήματος. Ενδεικτικό παράδειγμα αποτελεί η μεμονωμένη χρήση ουρίας (chaotropes) ή βεταΐνης (kosmotropes) που αναστέλλει την παραγωγή πρωτεϊνών, ενώ η ταυτόχρονη χρήση τους οδηγεί σε αποκατάσταση της λειτουργίας σύνθεσης πρωτεϊνών.<sup>43</sup> Συνεπώς, η ύπαρξη ωσμωλυτών σε συγκεκριμένες αναλογίες και συνδυασμούς χημικών κατηγοριών σε φυσικά συστήματα σχετίζεται με το γεγονός, ότι οι κοσμοτροπικοί ωσμωλύτες χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση της καταστρεπτικότητας της ουρίας απέναντι σε πρωτεϊνικά συστήματα και βιολογικά μόρια. Οι πιο συνήθεις μοριακές αναλογίες για αναστολή της μετουσιωτικής δράσης της ουρίας είναι μεθυλαμίνη:ουρία – 1:2, ταυρίνη:ουρία – 1.5:2.<sup>44</sup>

Η παραπάνω συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί στην αλλαγή της δομής και την αλληλεπίδραση των ωσμωλυτών με γειτονικά μόρια νερού, αναδιατάσσοντας το δίκτυο δεσμών υδρογόνου, πράγμα που σταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Μια άλλη θεώρηση συνδέεται με την άμεση αλληλεπίδραση των ωσμωλυτών με τα πρωτεϊνικά αμινοξέα των πλευρικών αλυσίδων με αποτέλεσμα να διατηρείται η δομή της πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι ωσμωλύτες σχηματίζουν μεταξύ τους ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου που οδηγεί σε βαθέως ευτηκτικό σύστημα προστατεύοντας τα βιολογικά μόρια, εμπλέκοντας την έννοια του σχηματισμού DESs από ωσμωλύτες. Το γενικό συμπέρασμα είναι η ύπαρξη συνέργειας μεταξύ των κοσμοτροπικών ωσμωλυτών (βεταΐνη, σαρκοσίνη, ΤΜΑΟ) και της ουρίας, η οποία δίνει μεγαλύτερη σταθερότητα στο σύστημα, σε σύγκριση με την χρήση ενός μεμονωμένου κοσμοτροπικού ωσμωλύτη χωρίς παρουσία χαοτροπικού.<sup>36</sup>

#### 1.3.4.4 Σχηματισμός DESs από ωσμωλύτες

Ορισμένες από τις ενώσεις που αποτελούν κοσμοτροπικούς ωσμωλύτες, όπως οι πολυόλες (σορβιτόλη, γλυκερόλη), τα σάκχαρα, τα αμινοξέα (προλίνη), η βεταΐνη και η ουρία (χαοτροπικός ωσμωλύτης), χρησιμοποιούνται και για την σύνθεση φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDESs). Η βεταΐνη, η σαρκοσίνη και το ΤΜΑΟ (μεθυλαμίνες – κοσμοτροπικοί ωσμωλύτες) σχηματίζουν επιτυχώς βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες με όλους τους χαοτροπικούς ωσμωλύτες (ουρία, αργινίνη, γουανιδίνη).<sup>36</sup> Συνεπώς, είναι εφικτή η χρήση ενός χαοτροπικού και ενός κοσμοτροπικού ωσμωλύτη, για τον σχηματισμό DES δύο συστατικών. Σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται και η ανάγκη χρήσης νερού για την σύνθεση ορισμένων DESs σε ποσοστό περίπου 5-35 %w/w, το οποίο χρησιμοποιείται για την καλύτερη ανάπτυξη του δικτύου δεσμών υδρογόνου. Ενδεικτικά κάποια από τα DESs που σχηματίζονται είναι τα ακόλουθα: Βεταΐνη:Γλυκερόλη:Νερό (1:2:2), Σαρκοσίνη:Γλυκερόλη:Νερό (1:2:4), Σορβιτόλη:Ουρία:Νερό (2:3:1).<sup>36</sup>

Στην φύση, οι ωσμωλύτες συναντώνται σε ζεύγη που αποτελούνται από ένα χαοτροπικό και έναν ή περισσότερους κοσμοτροπικούς. Για παράδειγμα, σε ορισμένα αμφίβια εντοπίζεται σύστημα ωσμωλυτών που περιέχει ουρία, γλυκόζη και γλυκερόλη, ενώ σε ψάρια βρέθηκε ουρία, ΤΜΑΟ και γλυκερόλη.<sup>45</sup> Επιπλέον, σε φυτά, ιστούς θηλαστικών και θαλάσσιων οργανισμών έχουν εντοπιστεί συστήματα που χρησιμοποιούν μεγαλύτερο αριθμό ωσμωλυτών, όπως ο συνδυασμός ουρίας, βεταΐνης, ΤΜΑΟ, ταυρίνης, είτε ο συνδυασμός ΤΜΑΟ, ουρίας, βεταΐνης, ινοσιτόλης, α-αμινοξέων.<sup>36</sup>

Από την πλευρά τους τα DESs από ωσμωλύτες εμφανίζουν εξαιρετικές ιδιότητες όσον αφορά την προστασία ενζύμων. Ακόμη, ο σχηματισμός τους αποτελεί μια αντιστρεπτή διεργασία, με αποτέλεσμα να μπορούν να συντίθενται και να διαλύονται εντός των συστημάτων με σχετική ευκολία, ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο το περιεχόμενο νερό των κυττάρων και άλλες σημαντικές ιδιότητες, όπως το pH, την ωσμωτική πίεση, την πολικότητα και το ιξώδες. Η παρουσία DESs σε φυτά έχει μελετηθεί και τα DESs θεωρούνται το τρίτο υγρό μέσο που υφίσταται. Χρησιμοποιούνται για διαλυτοποίηση ενώσεων, μεταφορά ουσιών, ρύθμιση του περιεχόμενου νερού στα φυτά και προστασία σε αντίξοες συνθήκες.<sup>46</sup> Η θεώρηση αυτή επιβεβαιώνεται μιας και τα osmo-DESs αποτελούν και τον τρόπο που τα

κύτταρα διατηρούνται σταθερά σε συνθήκες ψύχους ή ξηρασίας, δηλαδή περιπτώσεις όπου το περιεχόμενο νερό στα κύτταρα είναι ελάχιστο, με αποτέλεσμα να ευνοείται η σύνθεση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Έτσι, ελαττώνεται η θερμοκρασία πήξης του συστήματος και ο οργανισμός δεν επηρεάζεται.<sup>36</sup>

### **1.3.5 Φυσικοχημικές ιδιότητες των DESs**

Τα DESs εμφανίζουν ενδιαφέρουσες φυσικοχημικές ιδιότητες που τα καθιστούν ελκυστικά σε πολλές βιομηχανικές εφαρμογές. Η ποικιλία των δυνατών συνδυασμών ενώσεων προς των σχηματισμό DESs και η ελευθερία στην τροποποίηση των αναλογιών μεταξύ τους καθώς και η προσθήκη νερού, δίνουν την δυνατότητα σχεδίασης διαλυτών με τις επιθυμητές ιδιότητες για κάθε εφαρμογή. Η χαμηλή πτητικότητα, η μη τοξικότητα, η σταθερότητα και η βιοαποικοδομησιμότητα αποτελούν ιδιότητες που εμφανίζονται στην πλειονότητα των DESs. Ακολουθεί αναφορά στις βασικές φυσικοχημικές ιδιότητές τους, ειδικότερα στο ιξώδες, στην πυκνότητα, στο pH, στην πολικότητα, στην αγωγιμότητα, στην επιφανειακή τάση και στο σημείο τήξης.

#### **1.3.5.1 Ιξώδες**

Το ιξώδες σχετίζεται με τις μοριακές δυνάμεις συνοχής, όπως οι δεσμοί υδρογόνου και οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις van der Waals. Καθορίζει την ρευστότητα του υγρού και συνεπώς επιδρά καθοριστικά στα φαινόμενα μεταφοράς μάζας του συστήματος. Γενικά, τα DESs έχουν υψηλές τιμές ιξώδους, τυπικά πάνω από 100 mPa·s, σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες και το νερό (1 mPa·s). Το υψηλό ιξώδες αποδίδεται στο εκτεταμένο και πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ των συστατικών του DES. Επιπλέον, η ύπαρξη πολλών ομάδων υδροξυλίου φαίνεται να αυξάνει την τιμή του ιξώδους, διότι ευνοεί το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου. Το ιξώδες των DESs δημιουργεί προβλήματα στην χρήση τους ως διαλύτες, ενώ αντιμετωπίζεται με την προσθήκη ποσότητας νερού στο σύστημα ή την αύξηση της θερμοκρασίας, αποτελεί όμως πλεονέκτημα για την αποθήκευση ευαίσθητων βιοδραστικών ενώσεων.<sup>41, 47, 48</sup>

#### **1.3.5.2 Πυκνότητα**

Η πυκνότητα των DESs είναι μεγαλύτερη από του νερού και μειώνεται με γραμμικό τρόπο καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία ή προστίθεται νερό στο DES. Τυπικές τιμές πυκνότητας για DESs είναι 1.0 - 1.6 g/cm<sup>3</sup>. Ακόμη, η πυκνότητα επηρεάζεται από την επιλογή του δότη δεσμού υδρογόνου και την αναλογία μεταξύ των συστατικών του DES.<sup>48</sup>

#### **1.3.5.3 pH**

Η τιμή του pH είναι ιδιαίτερα σημαντική για την χρήση των DES σε βιομηχανικές εφαρμογές που εμπλέκουν ρύθμιση του συστήματος για σύνθεση ενώσεων ή χρησιμοποιούν βιοκαταλύτες με βέλτιστο εύρος λειτουργίας pH, ενώ σημαντική είναι και η προστασία των διατάξεων της διεργασίας. Το pH των DESs μπορεί να πάρει μεγάλο εύρος τιμών, ανάλογα με τα συστατικά από τα οποία αποτελείται

και μπορεί να προσαρμοστεί κατάλληλα, ανάλογα με την εφαρμογή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου σχεδιασμού είναι η επιλογή όξινων συστατικών, η οποία οδηγεί σε παραγωγή DESs με όξινο pH. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η τιμή του pH ελαττώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. <sup>48</sup>

#### **1.3.5.4 Πολικότητα**

Η πολικότητα αποτελεί βασική παράμετρο για έναν διαλύτη καθώς καθορίζει την δυνατότητα διαλυτοποίησης ενώσεων σε αυτόν. Τα DESs που περιέχουν οξέα είναι τα πιο πολικά, και με σειρά φθίνουσας πολικότητας ακολουθούν τα DESs με παρουσία αμινοξέων, σακχάρων και πολυολών. Μια μέθοδος αύξησης της πολικότητας ενός συστήματος DES είναι η προσθήκη νερού. Ενδεικτικές τιμές για τα DESs με οξέα είναι 44.8 kcal/mol, με αμινοξέα 48 kcal/mol, με σάκχαρα και πολυόλες 50 kcal/mol. Οι τιμές αυτές είναι αρκετά κοντά στην πολικότητα του νερού (48.2 kcal/mol), αποδεικνύοντας την καλή διαλυτική ικανότητα των DES, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις είναι καλύτερη και από του νερού. <sup>41</sup>

#### **1.3.5.5 Ιοντική Αγωγιμότητα**

Στη γενική περίπτωση, τα DESs είναι πιο αγωγίμα σε σύγκριση με το νερό. Η σειρά κατάταξης των DESs κατά μειούμενη αγωγιμότητα με βάση τα χρησιμοποιούμενα συστατικά σύνθεσης είναι: βάσεις/πολυόλες > βάσεις/οργανικά οξέα, βάσεις/σάκχαρα > οργανικά οξέα/αμινοξέα > οργανικά οξέα/σάκχαρα > σάκχαρα. Η αγωγιμότητα εμφανίζει ανοδική τάση με αύξηση της θερμοκρασίας κυρίως λόγω μείωσης του ιξώδους, ενώ με την τροποποίηση της περιεκτικότητας σε νερό η συμπεριφορά της αγωγιμότητας δεν είναι άμεσα προβλέψιμη και φαίνεται να εξαρτάται από τα συστατικά που συνθέτουν κάθε DES. Μια τυπική τιμή αγωγιμότητας για DESs είναι περίπου 200  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . <sup>41</sup>

#### **1.3.5.6 Επιφανειακή τάση**

Η επιφανειακή τάση εξαρτάται άμεσα από το σύνολο των δυνάμεων μεταξύ των συστατικών του DES. Εξαιτίας του πυκνού δικτύου δεσμών υδρογόνου τα DESs παρουσιάζουν αρκετά υψηλές τιμές επιφανειακής τάσης με ένα γενικό εύρος 35 – 75 mN/m. Όσον αφορά την θερμοκρασιακή εξάρτηση, ακολουθεί παρόμοια συμπεριφορά με το ιξώδες, δηλαδή μειώνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Οι μεγαλύτερες τιμές επιφανειακής τάσης συναντώνται σε DESs πλούσια σε σάκχαρα. <sup>41, 48</sup>

#### **1.3.5.7 Σημείο τήξης**

Το σημείο τήξης ενός DES είναι καθοριστικό για την αξιολόγηση της χρησιμότητάς του ως διαλύτης και είναι κατά πολύ χαμηλότερο από τα αντίστοιχα σημεία τήξης των καθαρών ενώσεων που απαρτίζουν το DES. Ως αποτέλεσμα τα περισσότερα DESs βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20 °C). Η ιδιότητα αυτή αποδίδεται στο πλέγμα δεσμών υδρογόνου που οδηγεί σε έντονη ταπείνωση του σημείου πήξεως του DES. Συνεπώς, τα DESs αποτελούν ικανούς διαλύτες με ένα εύρος λειτουργίας τουλάχιστον από 0 - 100 °C. <sup>47, 48</sup>

### 1.3.5.8 Δείκτης διάθλασης

Ο δείκτης διάθλασης σχετίζεται με την διαπερατότητα του φωτός από το DES και δίνει στοιχεία για την καθαρότητα του διαλύτη. Ενδεικτικά για DES χλωριούχου χολίνης/φρουκτόζης και χλωριούχου χολίνης/γλυκόζης, ο δείκτης διάθλασης είναι περίπου 1.51 και 1.66 αντίστοιχα.<sup>41</sup>

### 1.3.5.9 Επίδραση προσθήκης νερού στις ιδιότητες των DESs

Το νερό χρησιμοποιείται ευρέως για την τροποποίηση των ιδιοτήτων των DESs, ώστε να βελτιωθεί η αποδοτικότητα χρήσης τους σε πρακτικές εφαρμογές. Η πιο σημαντική ιδιότητα που μεταβάλλεται με την προσθήκη νερού είναι το ιξώδες, αφού μια αραίωση του DES χλωριούχου χολίνη/ουρία κατά 10% κατά βάρος με νερό συνεπάγεται μείωση του ιξώδους κατά 80%. Με τον τρόπο αυτό τα φαινόμενα μεταφοράς στο DES ευνοούνται και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα σε εφαρμογές εκχύλισης ή για διαλυτοποίηση ενώσεων. Επιπλέον, η παρουσία νερού αυξάνει τις τιμές πολικότητας βελτιώνοντας την διαλυτική ικανότητα, ενώ ενισχύει και την αγωγιμότητα του συστήματος.<sup>48</sup>

Στοιχεία από μετρήσεις σε NMR δείχνουν ότι η προσθήκη νερού οδηγεί σε τροποποίηση του δικτύου δεσμών υδρογόνου και αποδυναμώνει το συνολικό πλέγμα. Το νερό στο σύστημα των DESs επιδρά ως δότης δεσμών υδρογόνου. Συνολικά, η προσθήκη νερού μέχρι ενός ορίου φαίνεται να επωφελεί τις ιδιότητες των DESs και να διευρύνει το πεδίο εφαρμογής και την αποτελεσματικότητά τους.<sup>41</sup> Η υπερβολική προσθήκη νερού στο DES, όμως, μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αποδυνάμωση του δικτύου δεσμών που το συγκρατεί και να καταστραφεί η έννοια του DES, μιας και οι αλληλεπιδράσεις του νερού με τα επιμέρους συστατικά είναι κυρίαρχες. Η ποσότητα νερού που αποτελεί το όριο πέραν του οποίου παύει να υφίσταται DES διαφοροποιείται ανάλογα την σύνθεση του κάθε DES, την ισχύ και το πλήθος των δεσμών που το σχηματίζουν. Μια προσεγγιστική τιμή που διαχωρίζει την έννοια «νερό σε DES» από την έννοια «DES σε νερό» αποτελεί η περιεκτικότητα νερού έως 40 – 50% κατά βάρος. Αραίωση του DES με νερό σε ποσοστό άνω του 50% καταλύει την δομή και τις ιδιότητες του DES και το αποτέλεσμα είναι πλέον ένα υδατικό διάλυμα που εμπεριέχει τα επιμέρους συστατικά του DES.<sup>33, 36, 49</sup>

Ακόμη, η προσθήκη νερού φαίνεται να ευνοεί τις υδρολυτικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε συστήματα DESs. Συγκεκριμένα, περιεκτικότητα νερού περίπου 30 %w/w αποτελεί την βέλτιστη συνθήκη για την πραγματοποίηση υδρολυτικών δράσεων.<sup>33</sup> Πολλά από τα γνωστά DESs απαιτούν παρουσία νερού σε ποσοστό 5 – 35 %w/w για να διατηρούνται στην υγρή φάση και να είναι σταθερά σε βάθος χρόνου και θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μια μικρή ποσότητα νερού σε DES ενισχύει το δίκτυο δεσμών υδρογόνου, αφού το νερό δρα ως επιπλέον δότης δεσμών υδρογόνου.<sup>36</sup> Επιπροσθέτως, η ύπαρξη ποσότητας νερού είναι σημαντική και για την πραγματοποίηση ενζυμικών αντιδράσεων. Ένα άνυδρο DES παρεμποδίζει την δράση των ενζύμων, ενώ μια μικρή προσθήκη νερού βελτιώνει σημαντικά την ενεργότητα του συστήματος. Για παράδειγμα, η καταλύομενη από λιπάση αντίδραση του methyl p-coumarate σε περιβάλλον καθαρού DES έχει μικρή μετατροπή, ωστόσο η προσθήκη νερού 8 %v/v



τετραπλασιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης.<sup>10</sup> Συνεπώς, οι ενζυμικές αντιδράσεις σε DES προϋποθέτουν την χρήση νερού για επίτευξη υψηλής ενεργότητας. Τέλος, αναφέρεται ότι τα υδρόφιλα DESs απαιτούν περισσότερο νερό για να αυξήσουν την ενεργότητα του διαλυμένου ενζύμου, σε σχέση με ένα πιο υδρόφοβο σύστημα όπου η παρουσία νερού δεν είναι ιδιαίτερα απαραίτητη.<sup>40</sup>

### 1.3.6 Μέθοδοι σύνθεσης DESs

Η σύνθεση των DESs αποτελεί μια απλή και οικονομική διεργασία. Απαιτείται η ύπαρξη ενός δότη (HBD) και ενός δέκτη (HBA) δεσμών υδρογόνου, ενώ συχνά χρησιμοποιείται και μικρή ποσότητα νερού. Η πιο απλή μεθοδολογία είναι η παρασκευή μέσω θέρμανσης, κατά την οποία τα συστατικά που συνθέτουν το DES αναμειγνύονται στην επιθυμητή γραμμομοριακή αναλογία και ακολουθεί συνεχής θέρμανση και ανάδευση μέχρι τον σχηματισμό ενός ομογενούς, διαγούσ υγρού, χωρίς στερεά υπολείμματα. Η θερμοκρασία που επιλέγεται στην περίπτωση αυτή είναι 50 – 80 °C και διατηρείται σταθερή μέχρι τον πλήρη σχηματισμό του DES. Υπό ανάπτυξη πολύ υψηλών θερμοκρασιών (>100 °C) ενδέχεται να εμφανιστεί αποικοδόμηση των συστατικών του DES. Ο τυπικός χρόνος για τον σχηματισμό είναι 1 – 2 ώρες υπό τις συνθήκες θέρμανσης και ανάδευσης που προαναφέρονται.<sup>10, 40, 50, 51</sup>

Μια εναλλακτική μέθοδος είναι η εξάτμιση υπό κενό. Τα συστατικά του DES διαλύονται σε επαρκή ποσότητα νερού και κατόπιν το νερό απομακρύνεται από το σύστημα μέσω εξάτμισης σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού σε θερμοκρασία 50 °C. Το λαμβανόμενο υγρό DES τοποθετείται σε ξηραντήρα για πλήρη απομάκρυνση του νερού έως ότου σταθεροποιηθεί το βάρος του (θεωρείται ότι οι ενώσεις που απαρτίζουν το DES δεν εμφανίζουν πτητικότητα).<sup>41, 50</sup>

Ακόμη, για την σύνθεση DES εφαρμόζεται η μέθοδος της λυοφιλοποίησης. Συγκεκριμένα, τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την σύνθεση του DES διαλύονται σε νερό. Κατά την λυοφιλοποίηση το νερό απομακρύνεται και ανακτάται το τελικό DES.<sup>41</sup>

Εναλλακτικά, οι υπέρηχοι έχουν εφαρμοστεί για την παρασκευή DES, τοποθετώντας τα αντίστοιχα συστατικά που έχουν αναμειχθεί σε φιαλίδιο, που τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων. Το λουτρό θερμοστατείται με κυκλοφορία του νερού, μιας και λόγω των υπερήχων η θερμοκρασία στο σύστημα αυξάνεται. Η συσκευή υπερήχων ρυθμίζεται σε ισχύ 250 W και συχνότητα 40 kHz.<sup>52</sup> Η κατεργασία σταματάει όταν σχηματιστεί ομοιογενές και διάφανο υγρό. Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί και μικροκύματα, στα οποία υποβάλλονται τα επιμέρους συστατικά και το τελικό DES λαμβάνεται μέσα σε μερικά δευτερόλεπτα.<sup>51</sup>

### 1.3.7 Εφαρμογές των DESs

Τα DESs αποτελούν οικονομικούς, φιλικούς για το περιβάλλον πράσινους διαλύτες. Ακόμη, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους, όπως η χαμηλή τάση ατμών, η καλή αγωγιμότητα, η βιοαποικοδομησιμότητα και η μη τοξικότητα, καθιστούν

τα DESs ως εξαιρετικούς εναλλακτικούς διαλύτες για πληθώρα εφαρμογών. Ενδεικτικά, τα DESs χρησιμοποιούνται στην κατάλυση, στην ηλεκτροχημεία, στη νανοτεχνολογία, στην επεξεργασία της βιομάζας, στην εκχύλιση, στην βιοτεχνολογία, στην βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών.<sup>37, 41</sup> Επιπλέον, διαλυτοποιούν επιτυχώς την κυτταρίνη, το DNA και ενώσεις με αυξημένη λιποφιλία.<sup>40</sup>

Η πιο διαδεδομένη εφαρμογή των DESs είναι η εκχύλιση ενώσεων. Εξαιτίας της δομής τους τα DESs εμφανίζουν μεγάλη διαλυτική ικανότητα σε φυσικές ενώσεις, με μεγάλο εύρος πολικότητας στο οποίο η ιδιότητα αυτή διατηρείται, οπότε μπορούν να εκχυλίσουν ένα μεγάλο εύρος βιοδραστικών ενώσεων (όπως φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή) από φυσικά προϊόντα. Το δίκτυο δεσμών υδρογόνου των DESs συμβάλλει στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στο DES και την εκχυλιζόμενη ένωση, με αποτέλεσμα την καλύτερη διαλυτοποίηση και την αύξηση της απόδοσης της εκχύλισης. Εναλλακτικά, τα DESs δρουν καταστρέφοντας τις δομές που περιλαμβάνουν τις βιοδραστικές ενώσεις, όπως το κυτταρικό τοίχωμα, απελευθερώνοντας ευκολότερα τις επιθυμητές ενώσεις. Ακόμη, οι δεσμοί ενισχύουν την σταθερότητα του εκχυλίσματος και προστατεύουν ευαίσθητες εκχυλιζόμενες ενώσεις από υποβάθμιση. Η εκχυλιστική ικανότητα των DESs είναι ανώτερη σε σχέση με κοινούς οργανικούς διαλύτες.<sup>41</sup>

Μια εξίσου σημαντική εφαρμογή των DESs συναντάται στην επεξεργασία της βιομάζας. Τα DESs χρησιμοποιούνται για την προκατεργασία της βιομάζας, δηλαδή τον διαχωρισμό της σε λιγνίνη, κυτταρίνη και ημικυτταρίνη, λειτουργώντας ως διαλύτες. Τα περισσότερα DESs διαλυτοποιούν σε μεγάλο βαθμό την λιγνίνη, ενώ η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη είναι ελάχιστα ή καθόλου διαλυτές σε αυτά. Η διαλυτότητα σε λιγνίνη βελτιώνεται με αύξηση της περιεκτικότητας του δότη ηλεκτρονίων του DES, αφού με τον τρόπο αυτό ενισχύεται το δίκτυο δεσμών υδρογόνου και η λιγνίνη προσκολλάται πιο ισχυρά στο διαλύτη. Έχουν γίνει πειράματα επεξεργασίας βιομάζας από σιτηρά και ρύζι με χρήση του DES γαλακτικό οξύ/χλωριούχος χολίνη (5:1), κατά την οποία η λιγνίνη διαλυτοποιείται με μεγάλη επιτυχία στο DES, ενώ η κυτταρίνη και η ημικυτταρίνη δεν είναι διαλυτές με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι η προσθήκη 5% w/w νερού αυξάνει την εκχυλιστική ικανότητα του συστήματος. Επιπλέον, το DES μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε επόμενο στάδιο ως διαλύτης και για την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης προς σχηματισμό σακχάρων, ενώ στο τέλος των διεργασιών το DES μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί για αρκετές επαναλήψεις χωρίς ιδιαίτερη μεταβολή των ιδιοτήτων του. Συνολικά, τα DESs μπορούν να αντικαταστήσουν πλήρως τους τοξικούς οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην κατεργασία βιομάζας, να μειώσουν το κόστος και να βελτιώσουν το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της διεργασίας.<sup>41, 53</sup>

Επιπροσθέτως, τα DESs βρίσκουν εφαρμογή και στον κλάδο της βιοκατάλυσης, δηλαδή εφαρμόζονται, ως μέσα για την επίτευξη ενζυμικών αντιδράσεων. Το ένζυμο και το υπόστρωμα διαλύονται σε DES, το οποίο λειτουργεί ως διαλύτης,

υποκαθιστώντας τους συμβατικούς διαλύτες, και πραγματοποιείται η αντίδραση. Μάλιστα, ορισμένα DESs αυξάνουν την ενζυμική ενεργότητα σε σχέση με τα συμβατικά χρησιμοποιούμενα μέσα αντίδρασης, ενώ παράλληλα ενισχύουν και την ανθεκτικότητα των ενζύμων σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας. Ακόμη, επιτρέπουν μεγαλύτερο εύρος συνθηκών δράσης και δυνατότητα χρησιμοποίησης του ίδιου ενζύμου για περισσότερο χρόνο, χωρίς σημαντικές μεταβολές στην ενεργότητα. Για την επίτευξη των βέλτιστων συνθηκών αντίδρασης, απαιτείται η σωστή επιλογή και τροποποίηση του DES ανάλογα τις ανάγκες τόσο της αντίδρασης, όσο και του βιοκαταλύτη. Μια ενδιαφέρουσα εφαρμογή βιοκατάλυσης σε περιβάλλον DES αποτελεί η βιομετατροπή της ισοευγενόλης σε βανιλίνη με κατάλυση από ολόκληρα κύτταρα. Ο διαλύτης DES συμβάλλει στην ευκολότερη διαπερατότητα του υποστρώματος δημιουργώντας ρήγματα τις κυτταρικές μεμβράνες. Με τον τρόπο αυτό το ένζυμο και το υπόστρωμα αλληλεπιδρούν πιο άμεσα αυξάνοντας την αποδοτικότητα της διεργασίας.<sup>41, 54</sup>

Η φυσική προέλευση των διαλυτών αυτών, σε συνδυασμό με την μη τοξικότητα, την σταθερότητα και την βιοσυμβατότητα, επιτρέπει την χρήση τους στην φαρμακευτική βιομηχανία. Εφαρμόζονται ως διαλύτες για την εκχύλιση βιοδραστικών ενώσεων από φυτικές πηγές και ως μέσα διαλυτοποίησης δυσδιάλυτων στο νερό ενώσεων. Με την χρήση των DESs σε φαρμακευτικά σκευάσματα οι δραστικές ουσίες είναι πιο σταθερές, έχουν μεγαλύτερη βιοδιαθεσιμότητα, με αποτέλεσμα την απαίτηση μικρότερης ποσότητας φαρμάκου για την ίδια φαρμακολογική δράση. Επιπλέον, με την βοήθεια των DESs οι δραστικές ουσίες αφομοιώνονται και κατανέμονται καλύτερα στον οργανισμό, μιας και διευκολύνεται η διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών.<sup>41, 55</sup>

Μια λιγότερο διαδεδομένη εφαρμογή αποτελεί η χρήση των DESs σε ηλεκτροχημικές εφαρμογές, αφού εμφανίζουν καλή αγωγιμότητα. Παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση πολυφαινολών χρησιμοποιώντας ποσότητα DES στο σύστημα, το οποίο δρα ως ηλεκτρολύτης και ενισχύει το σήμα που λαμβάνεται. Η μέθοδος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ακρίβεια, επαναληψιμότητα, ευκολία και οικονομία.<sup>56</sup> Ακόμη, έχουν γίνει μελέτες για χρήση DESs σε διεργασίες που περιλαμβάνουν μεταλλικά υλικά. Συγκεκριμένα, ιόντα μετάλλων τοποθετούνται σε DESs βελτιώνοντας την διαλυτότητα και την εναπόθεση σε επιφάνειες, ενώ έχει γίνει προσπάθεια εφαρμογής DES στην επεξεργασία μετάλλων.<sup>57</sup>

Τέλος, γίνεται χρήση των DESs ως κινητή φάση σε χρωματογραφικές στήλες. Τα DESs αποτελούν εξαιρετικούς διαλύτες και εκχυλιστικά μέσα συνθέτοντας δεσμούς υδρογόνου με διάφορες ενώσεις. Επιπλέον, τα DESs ανάλογα τα επιμέρους συστατικά τους μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα ώστε να έχουν την επιθυμητή πολικότητα, άρα και μεγαλύτερη συγγένεια με την επιθυμητή ένωση που διαχωρίζεται μέσω της στήλης, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό.<sup>58</sup>

### 1.3.8 Πλεονεκτήματα των DESs

Συνολικά, τα DESs αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη νέα γενιά διαλυτών που εναρμονίζονται με τις σύγχρονες ανάγκες για μείωση του κόστους παραγωγής και την προστασία του περιβάλλοντος. Η χρήση των DESs ικανοποιεί πολλές από τις αρχές της πράσινης χημείας, όπως η παραγωγή όσο το δυνατόν λιγότερων αποβλήτων, αφού τα DESs συντίθενται χωρίς παραπροϊόντα και οι διεργασίες που εφαρμόζονται δεν απαιτούν διαχωρισμούς οπότε και η οικονομία ατόμων είναι υψηλή (1η, 2η αρχή). Επιπλέον, μπορούν να σχεδιαστούν κατάλληλα ώστε να μην είναι επιβλαβείς για τον άνθρωπο και το περιβάλλον (5η αρχή). Επιτρέπουν την εκχύλιση, την διαλυτοποίηση ενώσεων και την πραγματοποίηση αντιδράσεων με μεγαλύτερη ευκολία και απόδοση, σε πιο ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, άρα συμβάλλουν στο χαμηλό ενεργειακό αποτύπωμα των διεργασιών (6η αρχή). Ακόμη, είναι βιοαποικοδομήσιμα σε βάθος χρόνου, διότι διασπώνται σε επιμέρους συστατικά φυσικής προέλευσης (10η αρχή). Τέλος, εμφανίζουν χαμηλή έως και μηδενική τοξικότητα, δεν είναι εύφλεκτα ή εκρηκτικά, συνεπώς είναι σύμφωνα και με την 12η αρχή της πράσινης χημείας.

Σε σύγκριση με τα ιοντικά υγρά, τα οποία αποτελούν και αυτά μία κατηγορία πράσινων διαλυτών με παρόμοιες ιδιότητες τα DESs, τα τελευταία φαίνεται να υπερέχουν. Η πλειοψηφία των ιοντικών υγρών δεν σχηματίζονται από αμιγώς φυσικές ενώσεις, αλλά από πιο τοξικές ενώσεις, η παρασκευή τους είναι πιο σύνθετη, η δυνατότητα τροποποίησης των συστατικών που τα απαρτίζουν και των αναλογιών μεταξύ τους είναι σαφώς πιο περιορισμένη και δεν είναι βιοσυμβατά. Αντιθέτως, τα DESs είναι πολύ πιο φιλικά προς το περιβάλλον, με μεγαλύτερη ποικιλία και δυνατότητες σχεδιασμού, μεγαλύτερη οικονομική αποδοτικότητα, ενώ δίνουν τη δυνατότητα εφαρμογής σε περισσότερα συστήματα, όπως η εκχύλιση υδρόφοβων ενώσεων.<sup>41, 54, 59</sup>

## 1.4 Υδρογέλες

### 1.4.1 Ορισμός και ιδιότητες υδρογελών

Οι υδρογέλες αποτελούν μη διαλυτά στο νερό πολυμερικά δίκτυα με πορώδη δομή. Έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και εμφανίζονται σε τρισδιάστατη μορφή. Το βασικό τους χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα απορρόφησης και συγκράτησης μεγάλης ποσότητας νερού, με αποτέλεσμα να αυξάνεται έντονα ο όγκος και η μάζα τους, χωρίς όμως να χάνεται η τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους. Συνήθως, υπό συνθήκες όπου έχουν απορροφήσει νερό, διατηρούν σε καλό βαθμό την σκληρότητα και την αντοχή τους. Ένας παραπλήσιος ορισμός αναφέρει ως υδρογέλη, ένα πολυμερές δίκτυο με διασταυρούμενη σύνδεση μεταξύ των αλυσίδων, που διογκώνεται με την παρουσία νερού και παράγεται από ένα ή περισσότερα είδη δομικών μονάδων που σχηματίζουν ένα πλέγμα διασταυρούμενων δεσμών.<sup>1,60</sup> Για την σύνθεση υδρογελών επιλέγονται συνήθως φιλικά προς το περιβάλλον και οικονομικά φυσικά πολυμερή, τα οποία συντίθενται κατά κύριο λόγο από πολυσακχαρίτες, όπως η χιτοζάνη, το άμυλο, η κυτταρίνη, το αλγινικό, η πηκτίνη και η αγαρόζη, ή αποτελούνται κυρίως από

πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ζελατίνη.<sup>61</sup> Η σύνδεση των δομικών μονάδων της υδρογέλης πραγματοποιείται με φυσικούς ή χημικούς δεσμούς διασταυρούμενης πρόσδεσης.

Οι δομή των υδρογελών και οι ιδιότητές τους προσδίδουν πολλαπλά πλεονεκτήματα. Σχεδόν όλες οι υδρογέλες είναι βιοαποικοδομήσιμες, βιοσυμβατές και μη τοξικές, αφού προέρχονται από πολυμερή φυσικής προέλευσης. Ακόμη, έχουν αντιβακτηριδιακές ιδιότητες και ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία και το pH. Η μηχανική αντοχή τους είναι ικανοποιητική και ορισμένες υδρογέλες εμφανίζουν ελαστικότητα χωρίς να χάνουν την αρχική τους δομή. Τέλος, μπορούν να εγκλείσουν βιοδραστικές ενώσεις στη δομή τους με μεγάλη αποτελεσματικότητα.<sup>61</sup> Το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η μεγάλη απορρόφηση νερού χωρίς όμως να είναι διαλυτές σε αυτό. Η ικανότητα συγκράτησης νερού (swelling) υπολογίζεται από τον λόγο της μάζας του κατακρατούμενου νερού και της μάζας της ξηρής γέλης στην αρχική της μορφή και εκφράζεται σε g νερού ανά g ξηρής υδρογέλης.<sup>62</sup>

#### 1.4.2 Πολυμερή για σύνθεση υδρογελών

Για καλύτερη κατανόηση των δομικών μονάδων που συνθέτουν τις υδρογέλες, γίνεται αναφορά στα πιο διαδεδομένα φυσικά πολυμερή. Η χιτοζάνη αποτελεί ένα πολυμερές που παράγεται μέσω αποακετυλίωσης της χιτίνης και τελικά είναι η ένωση της γλυκοζαμίνης και της ακετυλογλυκοζαμίνης σε αναλογία περίπου 70:30 μεταξύ των δύο συστατικών αντίστοιχα. Το μοριακό της βάρος κυμαίνεται από 50-1000 kDa και είναι ο δεύτερος πιο άφθονος φυσικός πολυσακχαρίτης μετά την κυτταρίνη. Η χιτοζάνη παρόλο που είναι αδιάλυτη στο νερό, διαλύεται σε αραιά υδατικά διαλύματα οξέων, έχει υδρόφιλο χαρακτήρα και θεωρείται ως κατιοντικό πολυμερές. Χρησιμοποιείται για παραγωγή υδρογελών, φιλμ και ινών. Οι υδρογέλες χιτοζάνης εφαρμόζονται στην μεταφορά φαρμάκων εγκλωβίζοντας ενώσεις που προστατεύονται και απελευθερώνονται ελεγχόμενα, σε δερματικά επιθέματα για επούλωση πληγών, σε ενυδατικά σκευάσματα και στην αποκατάσταση εδαφών χάρη στην ικανότητά τους να δεσμεύουν βαρέα μέταλλα.<sup>1, 2, 3</sup>

Ένας ακόμη φυσικός πολυσακχαρίτης είναι το αραβικό κόμμι (Arabic gum) που προέρχεται από το δέντρο της ακακίας. Είναι ένας άμορφος, μη τοξικός πολυσακχαρίτης, ο οποίος είναι διαλυτός στο νερό. Αποτελείται από μίγμα γλυκοπρωτεϊνών και σακχάρων (αραβινόζη, γαλακτόζη), ενώ περιέχει και άλατα ασβεστίου, μαγνησίου και καλίου. Χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική βιομηχανία και στα τρόφιμα.<sup>1</sup>

Τα άλατα του αλγινικού οξέος, που παράγονται με βάση το αλγινικό οξύ που προέρχεται από θαλάσσια άλγη, αποτελούν μη τοξικά, βιοσυμβατά, οικονομικά προσιτά και φυσικά διασπώμενα πολυμερή. Το αλγινικό είναι ανιοντικός πολυσακχαρίτης με καλή διαλυτότητα στο νερό. Αξιοποιείται από την βιομηχανία τροφίμων ως πρόσθετο, ενώ μπορεί να δράσει ως φορέας ενώσεων με την χρήση

του σε γέλες. Εξαιτίας του ανιοντικού χαρακτήρα, η τροποποίησή του είτε χημικά είτε φυσικά είναι εφικτή με στόχο τον σχηματισμό φορέων όπως υδρογέλες, ίνες και μικροκάψουλες. Για την δημιουργία υδρογέλης χρησιμοποιείται διάλυμα άλατος αλγινικού νατρίου στο οποίο προστίθενται υπό ήπιες συνθήκες δισθενή ιόντα όπως  $Ca^{2+}$  και  $Ba^{2+}$  τα οποία αντικαθιστούν τα ιόντα  $Na^+$  και σχηματίζουν το δίκτυο των δεσμών μεταξύ των αλυσίδων. Το μοριακό βάρος του αλγινικού που είναι άμεσα διαθέσιμο κυμαίνεται στα 32000 – 400000 g/mol, ενώ το αλγινικό μεγάλου μοριακού βάρους αλυσίδα εμφανίζει μεγάλο ιξώδες δυσκολεύοντας την χρήση του. <sup>1, 61</sup>

Μια ακόμη επιλογή για σύνθεση υδρογελών είναι η χρήση κυτταρίνης, δηλαδή του πιο διαδεδομένου και άφθονου φυσικού πολυμερούς με ευρεία εφαρμογή και ελάχιστο κόστος. Οι υδρογέλες κυτταρίνης είναι βιοσυμβατές και μη τοξικές με αποτέλεσμα την χρήση τους σε τρόφιμα, για μεταφορά φαρμάκων στον οργανισμό και για ακινητοποίηση ενζύμων. Υπάρχουν και άλλα φυσικά πολυμερή όπως η καραγενάνη και η πηκτίνη που χρησιμοποιούνται κυρίως σε εφαρμογές τροφίμων.<sup>1</sup>

Πέραν των φυσικών πολυμερών για την σύνθεση υδρογελών έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα συστήματα με στόχο την βελτίωση των ιδιοτήτων της τελικής γέλης. Τα φυσικά πολυμερή παρουσιάζουν συχνά προβλήματα ανομοιογένειας στη δομή και την σταθερότητα, όπως και στον έλεγχο της ζελατινοποίησής τους. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων προτείνεται η χρήση μιας ημισυνθετικής ή συνθετικής μεθόδου για τροποποίηση του σχηματισμού της υδρογέλης προς τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Ένα τέτοιο παράδειγμα ενός αμιγώς συνθετικού μορίου είναι η πολύ-βινυλική αλκοόλη (polyPVA), η οποία είναι υδατοδιαλυτή, μη τοξική, με ημικρυσταλλική μορφή και πλήρη βιοσυμβατότητα. Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η σταθερότητα και η αντοχή της υδρογέλης, σχηματίζοντας ταυτόχρονα μια βελτιωμένη πορώδη δομή, με παρουσία νερού σε κρυσταλλική και ελεύθερη μορφή, γεγονός που ενισχύει την αποτελεσματικότητα της υδρογέλης, κυρίως ως προς την ακινητοποίηση διάφορων ενώσεων. Ακόμη, χρησιμοποιείται το συνθετικό πολυμερές πολυακρυλαμίδιου (PAAm) που είναι υδατοδιαλυτό, βιοσυμβατό και ελαστικό, με εφαρμοσιμότητα σε διαχωρισμό στερεού-υγρού, ως φιλμ και ως βοηθητικό της ζελατινοποίησης σε τρόφιμα. Εναλλακτική μέθοδος, είναι η επιλογή ενός συνδυασμού μεταξύ του υδρόφιλου πολυμερούς polyHEMA και του υδρόφοβου μεθακρυλικού μεθυλεστερά (MAA) και ο σχηματισμός υδρογέλης μέσω συμπολυμερισμού. Με την επιλογή αυτή βελτιώνεται η μηχανική αντοχή και ελέγχεται ο βαθμός διόγκωσης της υδρογέλης κατά την παρουσία νερού. <sup>1, 61</sup>

### 1.4.3 Σύνθεση και εφαρμογές υδρογελών

Οι υδρογέλες αποτελούν ένα σύστημα εύκολο στη σύνθεσή του, που χρησιμοποιεί κυρίως φυσικά συστατικά. Η βιοαποικοδομησιμότητα, η βιοσυμβατότητα, η

ανθεκτικότητα, η ικανότητα συγκράτησης νερού και το μειωμένο κόστος των πρώτων υλών τις καθιστούν εξαιρετικές επιλογές ως φορείς φαρμακευτικών ενώσεων και ενζύμων. Ο έλεγχος της αποδέσμευσης ενώσεων και ο αποτελεσματικός εγκλεισμός ενζύμων για βιοκαταλυτικές αντιδράσεις αποτελούν τις κυριότερες εφαρμογές τους. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές για χρήση τους σε συστήματα βιοαισθητήρων ως αγωγοί, στην επεξεργασία ρύπων (συγκράτηση μετάλλων), σε συστήματα αποθήκευσης νερού και σε επούλωση τραυμάτων λόγω διατήρησης υγρασίας στην περιοχή και αντιμικροβιακής ιδιότητας.<sup>1, 61</sup>

## **1.5 Ευτηκτογέλες**

### **1.5.1 Ορισμός - Πλεονεκτήματα**

Οι ευτηκτογέλες αποτελούν συστήματα γελών παραπλήσια με τις υδρογέλες που προαναφέρονται. Η βασική τους διαφορά αφορά στην χρήση βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (DESs) ως υγρή φάση για την σύνθεση της ευτηκτογέλης, σε αντίθεση με τις υδρογέλες όπου η υγρή φάση είναι υδατική. Η χρήση των DESs σε γέλες προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα, όπως η χαμηλή πτητικότητα, η καλύτερη σταθερότητα και η αυξημένη αγωγιμότητα. Μια πολύ σημαντική παράμετρος είναι η δυνατότητα επιλογής και σύνθεσης ευτηκτογελών με τις επιθυμητές ιδιότητες, μιας και τα χρησιμοποιούμενα DESs εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία και επιλογές στον σχεδιασμό τους. Επιπλέον, χάρη στην χρήση των DESs δίνονται και περισσότερες εναλλακτικές για τον τρόπο σχηματισμού της ευτηκτογέλης, δηλαδή τον χρησιμοποιούμενο πολυσακχαρίτη ή πολυμερές καθώς και τον τύπο των σχηματιζόμενων δεσμών (ομοιοπολικοί, μη ομοιοπολικοί, διασταυρούμενη σύνδεση κ.ά.).<sup>37, 38</sup>

Συνεπώς, ευτηκτογέλη θεωρείται η ένωση μεταξύ ενός DES και ενός στερεού μέσου ακινητοποίησης, με στόχο την δημιουργία μια τελικής ιξωδοελαστικής δομής με καλή ανθεκτικότητα και χρήσιμες ιδιότητες. Για τον χαρακτηρισμό μιας δομής ως ευτηκτογέλη θα πρέπει να μην εμφανίζει ρευστότητα, δηλαδή να διατηρείται πάνω σε μια επιφάνεια χωρίς αλλαγές στο σχήμα της και να περιέχει υγρά συστατικά σε ποσοστό τουλάχιστον 50 % κατά βάρος.<sup>38</sup>

### **1.5.2 Δεσμοί για τον σχηματισμό γελών**

Η πιο εύκολη μέθοδος σχηματισμού ευτηκτογελών είναι μέσω δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων που συνθέτουν την συνολική διαμόρφωση. Παρόλα αυτά, οι ομοιοπολικοί δεσμοί εντός της γέλης την καθιστούν εξαιρετικά εύθραυστη με μειωμένη ελαστικότητα, συνθέτοντας ένα ισχυρά συνδεδεμένο και πυκνό δίκτυο. Ακόμη, οι δεσμοί αυτοί είναι αναντίστρεπτοι, οπότε η γέλη δεν είναι ικανή να αυτοεπιδιορθωθεί σε περίπτωση αλλοίωσης.

Για τον σχηματισμό ευτηκτογελών με καλύτερα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη ευελιξία, επιλέγεται η χρήση μη ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των πολυμερών του δικτύου. Στους δεσμούς αυτούς περιλαμβάνονται οι δεσμοί υδρογόνου, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι δυνάμεις που οφείλονται σε διαφορά πολικότητας σε σχέση με το διαλύτη και οι δυνάμεις διπόλου-διπόλου. Ακόμη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ζελατινοποιητές μικρού μοριακού βάρους (Low Molecular Weight Gelators - LMWGs) και κολλοειδείς δομές που σχηματίζουν ένα δίκτυο διασταυρούμενων μη ομοιοπολικών δεσμών με βελτιωμένη δόμηση. Στις περιπτώσεις αυτές η ευτηκτογέλη έχει την δυνατότητα να τροποποιηθεί και να επεξεργαστεί χωρίς να χάσει την δομή της, αφού οι δεσμοί στο δίκτυό της είναι αντιστρεπτοί. Σημειώνεται ότι είναι δυνατή η χρήση δύο διαφορετικών ειδών πολυμερών που συνθέτουν το δίκτυο για καλύτερα αποτελέσματα.<sup>38</sup>

Η χρήση των μη ομοιοπολικών δεσμών για σύνθεση ευτηκτογέλης προϋποθέτει την ύπαρξη σχετικά ισχυρών δυνάμεων μεταξύ των μονάδων της στερεής φάσης που συνθέτει το τρισδιάστατο δίκτυο, οι οποίες υπερσχύουν των αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DES και της στερεής φάσης. Έτσι, η τελική ευτηκτογέλη έχει πιο συνεκτική δομή, όμως πρέπει να προληφθούν τυχόν πολύ ισχυρές αλληλεπιδράσεις της στερεής φάσης που οδηγούν σε συσσωματώσεις και ως αποτέλεσμα υπονομεύεται η κατανομή του πλέγματος στην γέλη και εμφανίζεται ανομοιομορφία με επίπτωση στις ιδιότητες. Γι' αυτό τον λόγο επιλέγεται κυρίως η σύνθεση διασταυρούμενου πολυμερούς δικτύου ή δικτύου από LMWGs με την χρήση δεσμών υδρογόνου. Η ισχύς των μη ομοιοπολικών δεσμών κυμαίνεται από 5 – 30 kJ/mol, περίπου δύο τάξεις μεγέθους μικρότερη από τους ομοιοπολικούς δεσμούς. Τέλος, σημαντική είναι και η επίδραση του πλήθους των δεσμών υδρογόνου που υπάρχουν στο DES, αφού επηρεάζουν την τελική ισχύ των μη ομοιοπολικών δεσμών που συνθέτουν την ευτηκτογέλη και ειδικότερα τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.<sup>38</sup>

### 1.5.3 Σύνθεση ευτηκτογελών

Ένα παράδειγμα σχηματισμού ευτηκτογέλης που εμπλέκει μη ομοιοπολικούς δεσμούς είναι η γέλη με DES αιθυλενογλυκόλη/χλωριούχο χολίνη (2:1), για την οποία επιλέγονται δύο ειδών πολυμερών για την ζελατινοποίηση. Αρχικά, χρησιμοποιείται η πολυβινυλική αλκοόλη (Polyvinyl alcohol - PVA) που σχηματίζει κρυσταλλική δομή με δεσμούς υδρογόνου και στη συνέχεια τοποθετείται πολυακρυλικό οξύ (Polyacrylic acid - PAA) που συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου με το PVA και τον εαυτό του. Ο συνδυασμός αυτός ενισχύει τις μηχανικές ικανότητες (εφελκυσμός, θραύση) της ευτηκτογέλης.<sup>38</sup>

Οι ευτηκτογέλες μπορούν να παρασκευαστούν και με την χρήση ζελατινοποιητών μικρού μοριακού βάρους (LMWGs) σε ποσοστό περίπου 5 %κ.β., που διαλύονται σε DES υπό θέρμανση. Με την πτώση της θερμοκρασίας σχηματίζεται αυτόματα το δίκτυο των δεσμών και παραλαμβάνεται η γέλη. Η σύνθεση της δομής επιτυγχάνεται από δεσμούς υδρογόνου και από δυνάμεις που οφείλονται στην διαφορά πολικότητας. Μια εναλλακτική επιλογή αποτελεί ο συνδυασμός ενός



LWVG και ενός μονομερούς όπως το υδρόξυ-αιθυλακρυλαμίδιο (Hydroxyethyl acrylamide - HEAA). Ο LWVG και το μονομερές HEAA διαλύονται στο DES υπό θέρμανση και προστίθεται MBA που δρα ως συνδετικός κρίκος και συνθέτει ομοιοπολικούς δεσμούς. Κατά την ψύξη σχηματίζεται το αρχικό δίκτυο που περιλαμβάνει το LWVG, με τον σχηματισμό γέλης με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Κατόπιν, με εφαρμογή ακτινοβολίας UV πραγματοποιείται ο συμπολιμερισμός ελευθέρων ριζών μεταξύ του HEAA και του MBA προς τον σχηματισμό του πολυμερούς PHEAA με ομοιοπολική σύνδεση. Τελικά, προκύπτει ένα υβριδικό δίκτυο που συνδυάζει διαφορετικούς τύπους δεσμών και είδη δομών, αποδίδοντας εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες.<sup>38</sup>

Ορισμένα είδη πολυμερών από βιολογικές πηγές εφαρμόζονται για την σύνθεση ευτηκτογελών. Τα πολυμερή αυτά είναι βιοσυμβατά, οικονομικά και σε συνδυασμό με τα NaDES μπορούν να αποτελέσουν ένα συνολικά βιοσυμβατό σύστημα. Ένα παράδειγμα αποτελεί η ζελατίνη, η οποία ενώνεται με το DES υπό θέρμανση και κατά την ψύξη σχηματίζεται αυθόρμητα η γέλη. Η συμπεριφορά του συστήματος οφείλεται στην ελάττωση των δεσμών της τριπλής έλικας εξαιτίας της παρουσίας του DES και τον ταυτόχρονο σχηματισμό μη ομοιοπολικών δεσμών, προσδίδοντας καλύτερη δομή και πιο ομοιόμορφη ευτηκτογέλη. Σε μελέτη που έγινε, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη νερού κατά 5%w/w στο σύστημα βελτιώνει τους δεσμούς του δικτύου και οδηγεί σε μια πιο ανθεκτική γέλη. Ακόμη μία εξαιρετική ένωση για τον σχηματισμό γέλης είναι και η κυτταρίνη βακτηριακής προέλευσης, η οποία σχηματίζει ένα ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου με το DES και μεταξύ των τμημάτων κυτταρίνης με αποτέλεσμα την σύνθεση ευτηκτογέλης ακόμα και με προσθήκη 1% w/w κυτταρίνης.<sup>38</sup>

Συνολικά, για την καλύτερη σύνθεση ευτηκτογελών με χρήση μικρότερης ποσότητας πολυμερούς ή πολυσακχαρίτη είναι χρήσιμη η προσθήκη μιας μικρής ποσότητας νερού στο σύστημα. Η χρήση νερού σε ποσοστό έως περίπου 10% κατά βάρος δεν επηρεάζει την δομή του χρησιμοποιούμενου DES και συμβάλλει στην καλύτερη συναρμογή του πολυμερούς δικτύου και την βέλτιστη αλληλεπίδραση του DES με την υπόλοιπη δομή. Επιπλέον, για πολλά είδη ζελατινοποιητών είναι αναγκαία η θέρμανση του συστήματος σε θερμοκρασία  $\approx 80$  °C για τουλάχιστον 5 min ώστε να σχηματιστεί η ευτηκτογέλη κατά την διάρκεια της ψύξης.<sup>39</sup>

#### **1.5.4 Κατηγορίες και χαρακτηρισμός ευτηκτογελών**

Για τον χαρακτηρισμό των ευτηκτογελών και την μελέτη των ιδιοτήτων τους πραγματοποιούνται οι παρακάτω έλεγχοι/μετρήσεις. Η δομή της γέλης παρατηρείται με την βοήθεια μικροσκοπίου και λαμβάνεται φάσμα FTIR από 4000-600  $\text{cm}^{-1}$  για την παρατήρηση των δεσμών υδρογόνου. Η χημική σύνθεση ελέγχεται μέσω φασματοσκοπίας XPS (X-ray photoelectron spectroscopy). Η απορρόφηση υγρασίας και η ικανότητα συγκράτησης νερού από την ευτηκτογέλη είναι σημαντικοί παράμετροι για την ευστάθειά της και

υπολογίζονται τοποθετώντας την γέλη σε περιβάλλον υψηλής υγρασίας και βυθίζοντάς την σε απεσταγμένο νερό μέχρι σταθερής μάζας. Ακόμη, μετράται και η μηχανική αντοχή μέσω άσκησης εφελκυστικής τάσης σε δείγμα γέλης, όπου θεωρείται ότι τα DES που περιέχουν περισσότερα υδροξύλια σχηματίζουν και πιο ανθεκτικές γέλες εξαιτίας του πυκνότερου δικτύου δεσμών υδρογόνου. Η ανθεκτικότητά της σε χαμηλές θερμοκρασίες διαπιστώνεται ελέγχοντας την ελαστικότητα έπειτα από παραμονή στους -50 °C για 24 h. Τέλος, σχηματίζεται ισόθερμη ρόφησης για την γέλη και μελετάται η συμπεριφορά της σε ραγδαίες θερμοκρασιακές μεταβολές.<sup>42</sup>

Οι ευτηκτογέλες με DESs χωρίζονται σε τρεις διαφορετικούς τύπους. Στην πρώτη κατηγορία κατατάσσονται οι γέλες στις οποίες το περιεχόμενο DES λειτουργεί αποκλειστικά ως διαλύτης. Για παράδειγμα, η παραγωγή μιας ευτηκτογέλης με καλή αγωγιμότητα πραγματοποιείται από το DES χλωριούχος χολίνη/ουρία/γλυκερόλη, μέσα στο οποίο διαλύεται ποσότητα ακρυλαμίδιου και ο πολυμερισμός εκκινείται με την προσθήκη υπερθειικού αμμωνίου. Μεταξύ του σχηματιζόμενου πολυμερούς και του DES διαμορφώνεται συμπαγές δίκτυο δεσμών υδρογόνου, δίνοντας αντοχή και ελαστικότητα στην ευτηκτογέλη.<sup>37</sup>

Στην επόμενη περίπτωση ανήκουν οι ευτηκτογέλες στις οποίες το DES λειτουργεί ταυτόχρονα ως διαλύτης και ως μονομερές που συμβάλλει στον σχηματισμό της γέλης. Δηλαδή, κάποιο από τα συστατικά του DES έχει την ικανότητα να σχηματίζει πολυμερές δίκτυο. Με τον τρόπο αυτό, το σχηματιζόμενο DES εμπεριέχει ήδη το μονομερές που θα σχηματίσει την γέλη, γεγονός που αποτελεί μια πιο οικονομικά βιώσιμη πρακτική. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί το DES χλωριούχος χολίνη/ακρυλικό οξύ, στο οποίο το ακρυλικό οξύ λειτουργεί και ως μονομερές. Με την προσθήκη υπεροξειδίου του βενζολίου για την έναρξη του πολυμερισμού, σχηματίζεται πολυακρυλικό οξύ που οδηγεί στην δόμηση της ευτηκτογέλης. Μια παρόμοια γέλη σχηματίζεται με την χρήση του DES χλωριούχος χολίνη/μηλεϊνικό οξύ/ακρυλικό οξύ, στο οποίο ο πολυμερισμός του μηλεϊνικού και του ακρυλικού οξέος πραγματοποιείται με την βοήθεια UV ακτινοβολίας. Η σχηματιζόμενη ευτηκτογέλη απαρτίζεται από ισχυρό δίκτυο δεσμών υδρογόνου με ικανότητα επανασχηματισμού και υψηλή αγωγιμότητα. Με την τροποποίηση των αναλογιών μεταξύ του μηλεϊνικού και του ακρυλικού μπορεί να γίνει προσαρμογή των ιδιοτήτων της τελικής γέλης, όπως αύξηση μηχανικής αντοχής, ανθεκτικότητας σε διαλύτες και ακραίες θερμοκρασίες.<sup>37</sup>

Η τελευταία κατηγορία αφορά τα συστήματα υπερμοριακών ευτηκτογελών στα οποία τα DESs λειτουργούν ως διαλύτες. Μια περίπτωση υπερμοριακής ευτηκτογέλης αποτελεί η χρήση του DES χλωριούχος χολίνη/φαινυλοξικό οξύ με την επιλογή των αμινοξέων ισολευκίνη και τρυπτοφάνη ως παράγοντες χηλικοποίησης, δηλαδή την δημιουργία δεσμών με μεταλλοϊόντα που συμβάλλουν στην σύνθεση της ευτηκτογέλης. Ακόμη, αναφέρεται η χρήση υδρόφοβων DESs που περιέχουν λιπαρά οξέα μεγάλης αλυσίδας, τα οποία με προσθήκη ποσότητας νερού στο σύστημα τείνουν να συσσωματώνονται εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς πολικότητας. Με την συσσωμάτωση αυτή σχηματίζονται σταδιακά γέλες με εξαιρετικές εφαρμογές στην βιοϊατρική και στην επεξεργασία

υδάτων. Τέλος, έχει χρησιμοποιηθεί DES χλωριούχου χολίνης/ουρίας στο οποίο προστίθεται ποσότητα DBS (1,3:2,4-dibelzylidene-d-sorbitol). Στο σύστημα αυτό σχηματίζονται διαμοριακές, μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις με αποτέλεσμα την σύνθεση υπερμοριακής ευτηκτογέλης.<sup>37</sup>

### 1.5.5 Εφαρμογές ευτηκτογελών

Τα διάφορα είδη ευτηκτογελών που αναπτύχθηκαν εμφανίζουν ικανοποιητική βιοδιαθεσιμότητα, υψηλές τιμές ηλεκτρικής αγωγιμότητας, ενώ η σύνθεση τους είναι οικονομική και απλή. Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πληθώρα εφαρμογών. Συστήματα ευτηκτογελών δύνανται να λειτουργήσουν ως υπερπυκνωτές για αποθήκευση ενέργειας, μιας και διαθέτουν μεγάλη ενεργειακή πυκνότητα και μικρό κόστος. Έχει κατασκευαστεί πειραματικά διάταξη όπου η γέλη χρησιμοποιείται ως διαχωριστής/ηλεκτρολύτης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων ενεργοποιημένων ιών άνθρακα. Μια άλλη ενδιαφέρουσα εφαρμογή είναι η χρήση γελών σε ηλεκτρονικά συστήματα που απαιτούν ελαστικότητα, όπως στην εφαρμογή των ευτηκτογελών στο ανθρώπινο σώμα για παρακολούθηση της κινητικότητάς του. Πολλά υποσχόμενη είναι και η ενσωμάτωσή των ευτηκτογελών σε μπαταρίες ως συστήματα με μειωμένη ευφλεκτότητα και καλή ηλεκτροχημική συμπεριφορά.<sup>37</sup>

Ακόμη, οι ευτηκτογέλες συναντώνται σε ιατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι γέλες περιέχουν DESs στην δομή τους, οπότε αποτελούν ικανούς διαλύτες για πληθώρα ενώσεων με μεγάλο εύρος πολικότητας. Έτσι, μπορούν να ακινητοποιήσουν στο εσωτερικό τους μια βιοδραστική ένωση που θα χορηγηθεί ως φάρμακο, όπως η δεξαμεθαζόνη, και να την απελευθερώσουν με ελεγχόμενο τρόπο και μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα στον επιθυμητό στόχο. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται και ως φορείς για αποθήκευση και προστασία ευαίσθητων ενώσεων, όπως το ασκορβικό οξύ για εκτεταμένες περιόδους, χωρίς να υποβαθμίζεται η ένωση, ιδιότητα που οφείλεται στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που συνθέτει ένα ευσταθές σύστημα. Επιπροσθέτως, έχει γίνει εφαρμογή ευτηκτογελών σε καθαρισμό νερού με ικανοποιητικά αποτελέσματα για δέκα επαναλήψεις χωρίς να χαθεί η αποδοτικότητα της διεργασίας και η δομή της ευτηκτογέλης. Τέλος, σημαντικές είναι και οι αντιπαγετικές ιδιότητες των ευτηκτογελών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε τρόφιμα για την αποφυγή παγοποίησης στην επιφάνεια, αλλά και τον σχηματισμό κρυστάλλων πάγου στο εσωτερικό του τροφίμου, διατηρώντας την υψηλή ποιότητα του προϊόντος. Για τον σκοπό αυτό επιλέγονται γέλες που περιέχουν DESs με πολλά υδροξύλια, όπως προλίνη/σορβιτόλη ή προλίνη/γλυκόζη, που σχηματίζουν πιο πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου και συνεπώς καλύτερη αντοχή.<sup>37,42</sup>

## 1.6 Σταθεροποίηση λιπάσης σε DESs

### 1.6.1 Λιπάσες σε περιβάλλον DES εντός φυσικών συστημάτων

Όπως αναπτύχθηκε κατά την ανάλυση των ωσμωλυτών, η παρουσία τους σε διάφορους συνδυασμούς σε ένα σύστημα συμβάλλει καθοριστικά στην σταθερότητά του. Από πειράματα μοριακής δυναμικής προέκυψε ότι πρωτεΐνες μικρής έλικας και λιπάσες εμφανίζουν μεγάλη δομική σταθερότητα σε περιβάλλον DES χλωριούχου χολίνης/ουρίας (1:2). Ο μηχανισμός δράσης εμπλέκει την έλξη της ουρίας από την χλωριούχο χολίνη μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, με στόχο την απομάκρυνση της ουρίας από την περιοχή άμεσης επαφής με την πρωτεΐνη, μιας και η ουρία επηρεάζει την πρωτεϊνική δομή. Συνεπώς, σε ζωντανά συστήματα η προστασία και σταθεροποίηση των πρωτεϊνών και των ενζύμων βασίζεται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη ωσμωλυτών που συνθέτουν DESs. Τα DESs έχουν ενεργό ρόλο στην οργάνωση και τις λειτουργίες ορισμένων βιολογικών συστημάτων και εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία του κυττάρου ως συσσωματώματα ή στρώσεις, ενώ συχνά βρίσκονται σε κυστίδια και πλαστίδια.<sup>36</sup>

### 1.6.2 Επίδραση νερού και θερμοκρασίας

Ένζυμα όπως λακκάσες, λιπάσες και διάφορα ακόμη υδρολυτικά ένζυμα εμφανίζουν ελάχιστη ενεργότητα ή είναι πλήρως ανενεργά όταν βρίσκονται διαλυμένα σε καθαρό DES ή το περιεχόμενο νερό είναι ελλιπές. Με την προσθήκη νερού στο DES η ενεργότητα των ενζύμων αποκαθίσταται σταδιακά μέχρι την επίτευξη της μέγιστης ενεργότητας για ποσοστό νερού περίπου 80% w/w, σημείο στο οποίο το DES έχει πάψει να υπάρχει λόγω αραίωσης και πλέον επικρατεί ένα υδατικό διάλυμα των συστατικών του DES. Αντίθετα, η σταθερότητα των ενζύμων ευνοείται σε DES με ελάχιστη περιεκτικότητα σε νερό. Δηλαδή, με την απουσία νερού τα DES προστατεύουν και διατηρούν την δομή των ενζύμων. Με τον ίδιο τρόπο δρουν και σε βιολογικά συστήματα, καθώς σε ακραίες συνθήκες ξηρασίας, παγωνιάς τα DES διατηρούν τα ένζυμα ανενεργά και δομικά αναλλοίωτα, ενώ με την αποκατάσταση των περιβαλλοντικών συνθηκών το νερό εισέρχεται στα κύτταρα και διαλυτοποιεί εκ νέου το DES και τα ένζυμα ενεργοποιούνται. Από πειραματικές εφαρμογές προκύπτει ότι κατά την υδρόλυση του κουμαρικού μεθυλεστερά καταλυόμενη από λιπάση, η αντίδραση οδηγεί σε ελάχιστη μετατροπή σε καθαρό DES, ενώ με προσθήκη 8% νερού ο ρυθμός της τετραπλασιάζεται. Παρόμοια συμπεριφορά συναντάται και στην αντίδραση εστεροποίησης του βενζοϊκού οξέος και της γλυκερόλης σε περιβάλλον DES.<sup>10, 36</sup>

Η παρουσία του νερού στα DESs σταδιακά αποδυναμώνει το δίκτυο δεσμών υδρογόνου ανάλογα το ποσοστό του, οπότε αναμένεται σε μεγάλες ποσότητες νερού σε DES η ικανότητα προστασίας και διατήρησης ενζύμων να είναι σημαντικά μειωμένη, ενώ η αντοχή τους σε υψηλή θερμοκρασία είναι υποβαθμισμένη. Από μετρήσεις θερμοαλκαλόφιλης λιπάσης σε DES (χλωριούχος χολίνη/ουρία) έπειτα από επώαση, προκύπτει ότι η παρουσία νερού σε ποσοστό

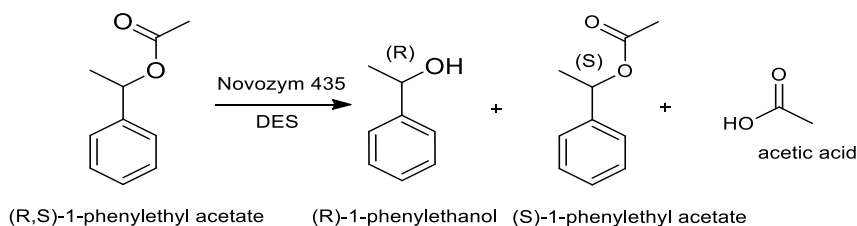
20% κ.β. αυξάνει την ενεργότητα της λιπάσης κατά 3.5 φορές σε σύγκριση με το καθαρό DES. Η παραπάνω συνθήκη ισχύει για ήπιες θερμοκρασίες. Αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 75 °C, η προσθήκη νερού ευνοεί την ενεργότητα της λιπάσης με βέλτιστη προσθήκη νερού 5% κ.β., ενώ μεγαλύτερο ποσοστό νερού υποβαθμίζει σημαντικά την ενεργότητα, αφού σε ποσοστό νερού μόλις 20% κ.β. η λιπάση έχει απενεργοποιηθεί. Με τον τρόπο αυτό αποδεικνύεται η σημασία του DES για την διατήρηση της σταθερότητας του ενζύμου, καθώς και ο καθοριστικός ρόλος του νερού για την μέγιστη ενεργοποίηση του ενζύμου εντός του DES. Με την χρήση μοριακής δυναμικής προκύπτει ότι σε καθαρό DES οι λιπάσες εμφανίζουν μικρές διακυμάνσεις, οι οποίες ενισχύονται καθώς προστίθεται νερό και η δομή αλλοιώνεται σταδιακά. Η χρήση του νερού εντός του DES σε συνδυασμό με την αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την κινητικότητα και την διαμόρφωση της ανοιχτής δομής του ενζύμου, με αποτέλεσμα την μέγιστη ενεργότητα του συστήματος.<sup>10, 63</sup>

Επιπλέον, αναφέρεται ότι ένζυμα, όπως πρωτεάσες, λιπάσες, λακκάσες είναι ιδιαίτερα σταθερά σε ακραίες θερμοκρασίες όταν βρίσκονται σε DESs και ειδικότερα σε DESs που περιλαμβάνουν φυσικούς ωσμωνλύτες (γλυκερόλη, σάκχαρο, βεταΐνη). Συνεπώς, ο σχηματισμός τέτοιων συστημάτων είναι συχνός σε οργανισμούς που αντιμετωπίζουν υψηλές θερμοκρασίες. Έχει γίνει μελέτη της σταθεροποίησης ενζύμου, συγκεκριμένα λυσοζύμης (υδρολυτικό ένζυμο), σε DESs που περιέχουν φυσικά συστατικά όπως βεταΐνη, σαρκοσίνη, εκτοΐνη και γλυκερόλη και περιεκτικότητα 20 %κ.β. σε νερό. Το ένζυμο που τοποθετήθηκε στο DES σαρκοσίνη/γλυκερόλη/νερό εμφανίζει την καλύτερη ενεργότητα έπειτα από 7 ημέρες επώασης του συστήματος στους 45 °C, μιας και διατηρεί την αποτελεσματικότητά του κατά 95 %. Την ίδια ώρα, αποθήκευση του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα και DES χλωριούχου χολίνης/γλυκερόλης ελάττωσε την ενεργότητα του ενζύμου έπειτα από τον ίδιο χρόνο επώασης, με αποτέλεσμα έπειτα από 7 ημέρες το ένζυμο να διατηρεί το 80 % της ενεργότητάς του. Συνεπώς, αποδεικνύεται ότι τα DESs δρουν προστατευτικά στα ένζυμα και αποτελούν ικανό περιβάλλον για μακρά αποθήκευσή τους, ιδιότητα που οφείλεται κυρίως στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου που επικρατεί στα DESs και προσδίδει σταθερή δομή. Η χρήση ακόμη πιο σύνθετων και πολυσυστατικών DESs, βασισμένων σε ωσμωνλύτες, βελτιώνει περαιτέρω την ικανότητα διατήρησης ενζύμων, με ελάχιστη μείωση της ενεργότητας συγκριτικά με υδατικά μέσα αποθήκευσης ή συνθετικά DESs.<sup>36</sup>

### 1.6.3 Εφαρμογές λιπασών σε DESs

Πέρα από την αποθήκευση ενζύμων σε DESs μελετάται και η χρήση τέτοιων συστημάτων σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, σε περιβάλλον DES η αντίδραση υδρόλυσης του R, S-οξικού φαινυλαιθυλεστέρα καταλύεται από την λιπάση (Novozym 435) προς τον σχηματισμό R-1-φαινυλαιθανόλης και οξικού οξέος, ενώ ο εναντιομερής S-οξικός φαινυλαιθυλεστέρας δεν καταλύεται από την λιπάση. Τα DESs βελτιώνουν την διαλυτότητα των υποστρωμάτων, ιδιαίτερα σε λιγότερο πολικές ενώσεις, αυξάνουν την ενζυμική ενεργότητα και σταθερότητα

και συμβάλλουν στην εναντιοεκλεκτικότητα των αντιδράσεων. Η λιπάση λειτουργεί βέλτιστα υπό ήπιες συνθήκες pH, συνεπώς επιλέγονται ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα DESs (χλωριούχος χολίνη/αιθυλενογλυκόλη, χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη).



**Εικόνα 5:** Αντίδραση υδρόλυσης του R, S-οξικού φαινυλαιθυλεστέρα <sup>33</sup>

Η μετατροπή και η παραγωγικότητα της αντίδρασης δεν επηρεάζονται σημαντικά από την χρήση DES ως διαλύτη έναντι ενός υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος. Αντιθέτως, η σταθερότητα του ενζύμου είναι σαφώς μεγαλύτερη σε περιβάλλον DES, αφού ενδεικτικά έπειτα από 28 ημέρες παραμονής της λιπάσης σε DES χλωριούχου χολίνης/γλυκερόλης η ενεργότητα είναι ίση με το 80 % της αρχικής, ενώ η αντίστοιχη λιπάση σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφανίζει μόλις το 40% της αρχικής ενεργότητάς της. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η ενεργότητα του ενζύμου κατά την παραμονή του σε DESs μειώνεται πιο έντονα κατά τις πρώτες 3 - 5 ημέρες και έπειτα τείνει να σταθεροποιείται με μια ελάχιστη μείωση ακόμα και σε χρόνο 30 ημερών. Όσον αφορά το περιεχόμενο νερό, είναι απαραίτητο για τις ενζυμικές αντιδράσεις υδρόλυσης και η προσθήκη νερού στο DES χλωριούχου χολίνης/γλυκερόλης μέχρι 40 % κατά βάρος αυξάνει την μετατροπή της αντίδρασης. Η βέλτιστη θερμοκρασία που επιλέγεται για την συγκεκριμένη λιπάση είναι οι 50 °C, ενώ γενικότερα οι λιπάσες είναι ανθεκτικά ένζυμα σε θερμοκρασιακή καταπόνηση ειδικότερα όταν βρίσκονται εντός του DES. <sup>33</sup>

Μετά το πέρας της αντίδρασης τα προϊόντα (R-1-φαινυλαιθανόλη, S-οξικός φαινυλαιθυλεστέρας) απομακρύνονται μέσω εκχύλισης σε οξικό αιθυλεστέρα, το ένζυμο συγκεντρώνεται μέσω φιλτραρίσματος. Το DES που παραμένει επαναχρησιμοποιείται ως διαλύτης σε νέο κύκλο αντίδρασης. Η ανακύκλωση του DES πραγματοποιείται με επιτυχία αφού το ανακυκλωμένο DES δεν επηρεάζει την αποδοτικότητα και εκλεκτικότητα της αντίδρασης, όμως έπειτα από 5 επαναλήψεις το 35% του DES χάνεται λόγω των διεργασιών διαχωρισμού. Η αντίδραση είναι εφαρμόσιμη και σε μεγάλη κλίμακα παραγωγής, με παρόμοια αποτελέσματα ως προς την μετατροπή και την ανάκτηση του DES. <sup>33</sup>

Τα DESs που περιέχουν γλυκερόλη μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή βιοκαυσίμων μέσω βιοκαταλυτικών συστημάτων. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται λιπάσες που εισάγονται στο DES. Μια ακόμη εφαρμογή είναι η χρήση της λιπάσης από τον μικροοργανισμό *Candida antarctica* (CALB) σε αντίδραση μετεστεροποίησης τριγλυκεριδίων με αιθανόλη με την παρουσία DES ως διαλύτη, λαμβάνοντας υψηλές μετατροπές. Τα DES που συντίθενται από χλωριούχο χολίνη ως HBA και αλκοόλες ή οξέα ως HBD ενισχύουν σημαντικά την ενεργότητα των υδρολασών και των πρωτεασών. Ακόμη, το DES χλωριούχος

χολίνη/γλυκερόλη χρησιμοποιείται ως διαλύτης στην ενζυμική μεταστεροποίηση του ελαίου σόγιας με μεθανόλη και επιτυγχάνεται 88 % μετατροπή των τριγλυκεριδίων σε 24 h. Συνεπώς, πολλά DESs είναι βιοσυμβατά με ένζυμα και μπορούν να αποτελέσουν ικανούς διαλύτες για βιομόρια, ενώ ταυτόχρονα αποτελούν και φορείς για την σταθεροποίησή τους.<sup>40</sup>

#### 1.6.4 Ενεργότητα λιπασών σε DESs

Από δοκιμές διάφορων DESs σχετικά με την ικανότητά τους να ενεργοποιούν λιπάσες διαφορετικών ειδών προέκυψαν τα παρακάτω. Η επιλογή του DES χλωριούχος χολίνη/σακχαρόζη (ή γλυκόζη) οδηγεί τα ένζυμα σε αυξημένη ενεργότητα σε σχέση με την αντίστοιχη λιπάση σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, με ποσοστό αύξησης έως και 350 % της αντίστοιχης ενεργότητας στο υδατικό περιβάλλον. Αντιθέτως, το DES χλωριούχος χολίνη/γλυκερόλη παρεμποδίζει την ενεργότητα των λιπασών. Οι περισσότερες λιπάσες αποδίδουν την μέγιστη ενεργότητά τους σε τιμές pH 6 – 8. Με την χρήση DESs ως διαλύτες οι λιπάσες είναι το ίδιο αποτελεσματικές σε μεγαλύτερο εύρος pH, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μετατοπίζεται ελαφρώς η βέλτιστη τιμή λειτουργίας τους. Ακόμη, οι τιμές pH στις οποίες το ένζυμο απενεργοποιείται τείνουν να είναι πιο ακραίες, εξαιτίας των δεσμών εντός του DES. Σχετικά με την θερμοκρασία η βέλτιστη τιμή δράσης είναι οι 40 °C, ενώ σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C σε υδατικό περιβάλλον τα ένζυμα σταδιακά μετουσιώνονται. Με επώαση των λιπασών για 12 h σε ρυθμιστικό διάλυμα προέκυψε μείωση της ενεργότητας στο μισό σε θερμοκρασία 50 – 60 °C. Παρόλα αυτά, με επώαση των λιπασών σε DES δεν παρατηρείται ελάττωση της ενεργότητας ακόμα και στους 60 °C, αποδεικνύοντας την προστασία που παρέχουν τα DES. Η ενεργότητα εντός των DES διατηρείται σε υψηλά επίπεδα μέχρι τους 80 °C, φαινόμενο που αποδίδεται στην ελεγχόμενη αφυδάτωση του ενζύμου κατά την παρατεταμένη παραμονή σε υψηλή θερμοκρασία με αποτέλεσμα να μην αλλοιώνεται.<sup>40</sup>

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και το γεγονός ότι το περιεχόμενο νερό επηρεάζει την δομή του ενζύμου. Το DES χλωριούχος χολίνη/σακχαρόζη/νερό εμφανίζει αυξημένη ενεργότητα σε συστήματα που δεν προστίθεται επιπλέον νερό, μιας και το DES διαθέτει ήδη την απαραίτητη ποσότητα για την ενεργοποίηση της λιπάσης. Από τη άλλη, το DES χλωριούχος χολίνη/σακχαρόζη δεν εμπεριέχει νερό στη δομή του και συνεπώς η λιπάση δεν εμφανίζει ικανοποιητική ενεργότητα. Για το άνυδρο DES η βέλτιστη ενεργότητα προκύπτει έπειτα από προσθήκη νερού κατά 60 %v/v και επιπλέον υπερέρχει του DES που εκ των προτέρων περιλαμβάνει νερό στην δομή του, πιθανότατα εξαιτίας μικρότερου ιξώδους και διαλυτοποίησης της λιπάσης. Συνεπώς, το νερό καθορίζει την υδρολυτική δράση των λιπασών και γενικότερα τα υδρόφιλα DES απαιτούν περισσότερο νερό συγκριτικά με τα πιο λιπόφιλα. Τέλος, το DES και ειδικότερα η μορφή που εμπεριέχει νερό μπορεί να αποθηκεύσει εντός του λιπάσες με εξαιρετικά αποτελέσματα, αφού σε 72 h και θερμοκρασία 4 °C η ενεργότητα σε σχέση με την αντίστοιχη του ρυθμιστικού διαλύματος είναι σαφώς πιο αυξημένη.<sup>40</sup>

## **1.7 Ακίνητοποίηση ενζύμων σε υδρογέλες/ευτηκτογέλες**

### **1.7.1 Στόχοι ακίνητοποίησης**

Τα ένζυμα αποτελούν τους βέλτιστους καταλύτες βιοχημικών αντιδράσεων, με μεγάλη εκλεκτικότητα και μη τοξικό χαρακτήρα. Η χρήση τους παρόλο που διευκολύνει και επιταχύνει την παραγωγή προϊόντων επιβαρύνει σημαντικά το κόστος παραγωγής. Και αυτό γιατί, τα εμπορικά ένζυμα παράγονται συνήθως μέσω των καλλιιεργειών μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες), πρακτική που είναι σύνθετη και συνεπώς κοστοβόρα. Επιπλέον, τα περισσότερα ένζυμα είναι δύσκολο να επαναχρησιμοποιηθούν και να συλλεχθούν μετά το πέρας της αντίδρασης. Σε ελεύθερη μορφή τα ένζυμα επηρεάζονται από τις πρωτεάσες των βιολογικών συστημάτων και η ενεργή δομή τους είναι ευάλωτη με αποτέλεσμα την σταδιακή μείωση την ενεργότητάς τους. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που δυσκολεύουν την χρήση των ενζύμων εφαρμόζεται η μέθοδος σταθεροποίησης ενζύμων μέσω ακίνητοποίησης τους. Η ακίνητοποίηση των ενζύμων στοχεύει στην καλύτερη διαχείρισή τους από άποψη ανακύκλωσης και χρήσης σε πολλαπλές επαναλήψεις αντίδρασης, καθώς και στην εξασφάλιση της ενεργής δομής του ενζύμου και την προστασία του από παράγοντες μετουσίωσης ή παρεμπόδισης της καταλυτικής δράσης.<sup>1,62</sup>

### **1.7.2 Φορείς ακίνητοποίησης**

Συνήθως, τα ένζυμα ακινητοποιούνται με τη χρήση φορέων, όπως ένα πολυμερικό πλέγμα και με την δέσμευσή τους σε επιφάνειες. Ένας κατάλληλος φορέας για ακίνητοποίηση ενζύμων θα πρέπει να είναι οικονομικός, αδρανής ως προς το ένζυμο και τις εμπλεκόμενες στην αντίδραση ενώσεις, δομικά σταθερός. Ακόμη, είναι απαραίτητη η αυξημένη μηχανική αντοχή, η δυνατότητα διατήρησης ή και βελτίωσης της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου, η ανάκτηση μετά το πέρας της αντίδρασης για επαναχρησιμοποίηση, η αποφυγή προσρόφησης άλλων ειδών στην δομή και η προστασία του ενζύμου από επιμολύνσεις. Με βάση τα παραπάνω οι υδρογέλες και οι ευτηκτογέλες (σε περίπτωση χρήσης DESs) αποτελούν χρήσιμους φορείς ενζύμων, προσφέροντας σταθερότητα στα ένζυμα και αντοχή σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και διαλυτών. Τέλος, αναφέρεται και η χρήση υδρόφοβων δομών για ακίνητοποίηση ως μια γενικότερη μέθοδος.<sup>1</sup>

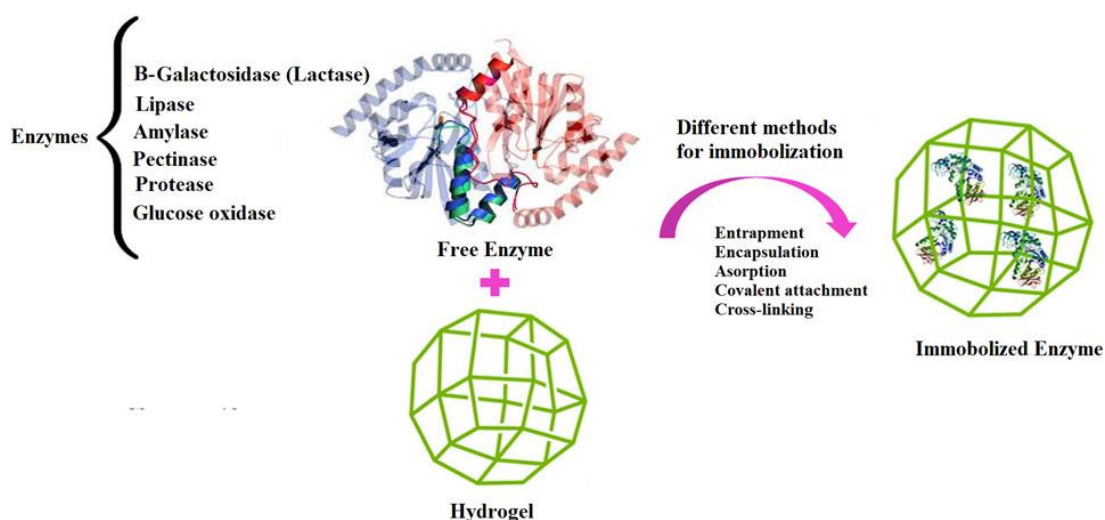
Για την ακίνητοποίηση ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί υδρογέλες με πολυμερικές μήτρες, όπως χιτοζάνη, αλγινικό, αραβικό κόμμι. Τα ένζυμα που επιλέγονται είναι κυρίως λιπάσες, πρωτεάσες, αμυλάσες και λακτάσες. Η παρουσία νερού και η πορώδης δομή εντός των συστημάτων των υδρογελών δημιουργεί ευνοϊκές συνθήκες για την λειτουργία των ενζύμων και την προστασία τους από μετουσίωση. Για παράδειγμα, η ακίνητοποίηση λακτάσης σε περιβάλλον υδρογέλης αλγινικού αυξάνει την ενεργότητα και την σταθερότητα σε μεγάλο εύρος συνθηκών. Ακόμη, η χρήση υδρογέλης αλγινικού για ακίνητοποίηση



πεκτινάσης σταθεροποιεί το ένζυμο και παρατείνει την δράση του, αφού έπειτα από τρεις επαναλήψεις χρήσης του η ενεργότητά του έχει μειωθεί μόλις κατά 20 %.<sup>1, 64, 65</sup>

### 1.7.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση σε υδρογέλες πραγματοποιείται με πολλούς τρόπους που κατατάσσονται σε δύο βασικές κατηγορίες, την φυσική και χημική ακινητοποίηση. Στην φυσική ακινητοποίηση εμπλέκονται ασθενείς αλληλεπιδράσεις όπως δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ του ενζύμου και της μήτρας ακινητοποίησης. Επιπλέον, η φυσική πρόσδεση είναι αντιστρεπτή. Αντίθετα, στην χημική ακινητοποίηση σχηματίζονται ισχυροί ομοιοπολικοί δεσμοί ανάμεσα σε ένζυμο και φορέα, οι οποίοι είναι αναντίστρεπτοι. Οι πιο κοινές μέθοδοι που εφαρμόζονται είναι η προσρόφηση, η ενθυλάκωση, ο εγκλωβισμός, η ομοιοπολική σύνδεση και η διασταυρούμενη σύνδεση. Η ακινητοποίηση των ενζύμων σε γέλες παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 6.<sup>1, 61, 68</sup>



Εικόνα 6: Ακινητοποιημένα ένζυμα σε υδρογέλες, μέθοδοι ακινητοποίησης<sup>1</sup>

Ο εγκλεισμός του ενζύμου είναι μια φυσική μέθοδος ακινητοποίησης, σχετικά απλή και οικονομική στην εφαρμογή της, κατά την οποία το ένζυμο παγιδεύεται εντός της πολυμερικής μήτρας. Το βασικό πλεονέκτημα εντοπίζεται στην απουσία δεσμών μεταξύ του πολυμερούς και του ενζύμου και έτσι το ένζυμο δεν υφίσταται δομικές τροποποιήσεις με αποτέλεσμα να διατηρεί την ενεργότητά του. Το ένζυμο εγκλωβίζεται με διάφορους τρόπους, αφού μπορεί να εγκλειστεί σε μια πυκνή πολυμερική διασταυρούμενη δομή, να διαλυθεί σε μια μη υδατική φάση ή και να διαχωριστεί από ένα διάλυμα με τη χρήση μιας ημιπερατής μικροκάψουλας. Οι υδρογέλες αποτελούν εξαιρετικές δομές για την εφαρμογή της μεθόδου του εγκλωβισμού, διότι έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα και πορώδη δομή. Το ένζυμο μπορεί να παγιδευτεί με μεγάλη αποτελεσματικότητα εντός της υδρογέλης κατά

την διαδικασία της σύνθεσής της. Το πρόβλημα που εμφανίζει η μέθοδος του εγκλεισμού αφορά την διαρροή ενζύμου από την υδρογέλη κατά την χρήση της σε υδατικά διαλύματα, αφού το ένζυμο δεν προσαρτάται στο πολυμερές και κατά την διόγκωση αποδεσμεύεται. Επιπλέον, σε πολύ πυκνές δομές είναι πιθανή η εμφάνιση μειωμένης μεταφοράς μάζας που επηρεάζει την απόδοση του συστήματος και περιορίζει την ενεργότητα του ενζύμου. Σε πειραματική εφαρμογή πραγματοποιείται εγκλεισμός λιπάσης σε υδρογέλη χιτοζάνης και παρατηρείται βελτιωμένη ενεργότητα, ενώ η διαρροή του ενζύμου από το σύστημα είναι αμελητέα. Εξαιτίας της βιοσυμβατότητας της γέλης, εμφανίζει μεγάλη συγγένεια με την λιπάση συμβάλλοντας στην προστασία του ενζύμου.<sup>1, 60, 68</sup>

Η προσρόφηση του ενζύμου σε επιφάνεια του φορέα ακινητοποίησης αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο κατά την οποία σχηματίζονται μη ομοιοπολικοί δεσμοί, δηλαδή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, δεσμοί υδρογόνου μεταξύ του φορέα ακινητοποίησης και του ενζύμου. Η προσρόφηση είναι αντιστρεπτή διεργασία, χαμηλού κόστους και προσδίδει στα ένζυμα ανθεκτικότητα απέναντι σε μετουσιωτικούς παράγοντες, ενώ αποτρέπει και την συσσωμάτωσή τους. Οι δυνάμεις συγκράτησης είναι ασθενείς και συχνά παρατηρείται απώλεια ενζύμου. Μια εφαρμογή της προσρόφησης εμπλέκει την ακινητοποίηση λιπάσης σε σφαιρίδια αγαρόζης, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργότητα, την καλύτερη διαχείριση και επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου, ιδιότητες που οφείλονται στην υδροφοβικότητα των σφαιριδίων που βελτιώνουν συγγένεια μεταξύ της αγαρόζης και της λιπάσης. Το κόστος της διεργασίας μειώνεται λόγω της διατήρησης του ενζύμου για περισσότερους κύκλους αντίδρασης.<sup>1</sup>

Στις χημικές μεθόδους ακινητοποίησης συμπεριλαμβάνονται η ομοιοπολική σύνδεση και η διασταυρούμενη πρόσδεση. Στην περίπτωση αυτή σχηματίζονται ομοιοπολικοί, μη αντιστρεπτοί δεσμοί μεταξύ του πολυμερούς και του ενζύμου, μέσω πραγματοποίησης αντίδρασης. Οι πλευρικές ομάδες αμινοξέων των ενζύμων (ιστιδίνη, ασπαρτικό οξύ) χρησιμοποιούνται για την επίτευξη της σύνδεσης με την πολυμερική μήτρα. Με τους ομοιοπολικούς δεσμούς η πρόσδεση του ενζύμου είναι ισχυρή και έτσι μειώνεται η διαρροή ενζύμου, αυξάνεται η σταθερότητά του και ανακτάται με ευκολία. Παρόλα αυτά η ύπαρξη ισχυρών δεσμών μπορεί να οδηγήσει σε δομικές μεταβολές του ενζύμου και μερική του μετουσίωση, με αποτέλεσμα την μείωση της ενεργότητας. Ακόμη, μπορεί να υπάρξει δυσκολία στην μεταφορά ενώσεων προς το ένζυμο. Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων και την βελτίωση της ενεργότητας χρησιμοποιούνται ενώσεις «spacers» (π.χ. hexamethylene diamine, 1,3-diaminopropane) που παρεμβάλλονται ανάμεσα στην πολυμερική μήτρα και το ένζυμο. Η πρόσδεση των ενζύμων πραγματοποιείται μόνο σε δραστικές ομάδες της πολυμερικής μήτρας, όπως καρβοξυλομάδες, αμινομάδες, υδροξυλομάδες, συνεπώς ο αριθμός των ενζύμων που μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά είναι περιορισμένος, γεγονός που περιορίζει την προοπτική του συστήματος για μεγάλη παραγωγικότητα. Παράδειγμα εφαρμογής της μεθόδου αποτελεί η

ακίνητοποίηση λιπάσης σε υδρογέλη χιτοζάνης. Η πρόσδεση πραγματοποιείται με την προσθήκη γλουταραλδεύδης στο σύστημα, με την βοήθεια της οποίας σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ της αλδεϋδομάδας και των αμινομάδων της λιπάσης. Η γλουταραλδεϋδη χρησιμοποιείται για την επίτευξη της διασταυρούμενης πρόσδεσης με μεγάλη αποτελεσματικότητα χάρη στην διαλυτότητά της στο νερό και συμβάλλει καθοριστικά στην διατήρηση των ιδιοτήτων του ενζύμου. <sup>1, 2, 61, 66</sup>

Γενικότερα, η φυσική μέθοδος ακίνητοποίησης ενζύμων που περιλαμβάνει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου, δυνάμεις van der Waals είναι πιο εύκολο να πραγματοποιηθεί, επιτρέπει την ανάκτηση του ενζύμου λόγω της αντιστρεπτότητας της σύνδεσης του και δίνει μεγαλύτερη ευελιξία εφαρμογών στο σύστημα. Το ισοηλεκτρικό σημείο (PI) του ενζύμου έχει καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία και την ισχύ του ακίνητοποιημένου συστήματος ενζύμου-πολυμερούς. Όταν το ένζυμο βρίσκεται σε διάλυμα με pH μικρότερο του ισοηλεκτρικού του σημείου είναι θετικά φορτισμένο, συνεπώς η προσθήκη μιας υδρογέλης με αρνητικό φορτίο, όπως η υδρογέλη αλγινικού, οδηγεί στον σχηματισμό ηλεκτροστατικών δεσμών μεταξύ ενζύμου και υδρογέλης, ακίνητοποιώντας επιτυχώς το ένζυμο. Άρα, το pH έχει επίδραση στην φυσική ακίνητοποίηση, ενώ σημαντική είναι και η μέτρηση του ζ-δυναμικού για την αναγνώριση της ισχύος της πρόσδεσης των ενζύμων στο πολυμερές της υδρογέλης. Σχετικά με την διαρροή του ενζύμου κατά την φυσική ακίνητοποίηση αναφέρεται ότι σε υψηλές θερμοκρασίες και μεγάλους χρόνους παραμονής το φαινόμενο επιταχύνεται. Ακόμη, η πορώδης δομή επηρεάζει την ακίνητοποίηση των ενζύμων, μιας και μια υδρογέλη με διατεταγμένη μικροδομή και ομοιόμορφα καταναμημένους πόρους προσφέρει μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια για τον βέλτιστο εγκλωβισμό του ενζύμου. Επιπλέον, το περιεχόμενο νερό παίζει καθοριστικό ρόλο στο σύστημα καθώς επηρεάζει τον βαθμό διόγκωσης της γέλης και κατ' επέκταση την ενεργότητά του ενζύμου αλλά και την αποκόλλησή του από το πολυμερές. <sup>60, 67</sup>

#### **1.7.4 Εφαρμογές ακίνητοποιημένων ενζύμων σε γέλες**

Οι γέλες με ακίνητοποιημένα ένζυμα χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα της βιοκατάλυσης. Ενδεικτικά, στην βιβλιογραφία αναφέρεται η χρήση συνθετικής υδρογέλης από HEMA, ιτακονικό οξύ για ακίνητοποίηση λακκάσης με εφαρμογή στον καθαρισμό υδατικών απόβλητων και την ανάκτηση χρήσιμων ενώσεων από αυτά. Επιπλέον, έχει συντεθεί υδρογέλη με αφυδρογονάσες οι οποίες αποτελούν και δομικά συστατικά της γέλης και ενώνονται με την βοήθεια της εξαϊστιδίνης μέσω διασταυρούμενης σύνδεσης. Μια ακόμα υδρογέλη που συντίθεται από αναγωγάσες μέσω σύνδεσης πεπτιδίων, χρησιμοποιείται στην αναγωγή της 3,4-διυδροϊσοκινολίνης προς αμίνη εντός αντιδραστήρα με διατήρηση της ενεργότητας του ενζύμου σε υψηλά επίπεδα για τουλάχιστον 40 ώρες συνεχούς λειτουργίας. <sup>61</sup>

Η ακινητοποίηση μπορεί να εφαρμοστεί και σε ολόκληρους μικροοργανισμούς που παράγουν κάποιο ένζυμο, όπως τα κύτταρα του *Saccharomyces cerevisiae*. Η υδρογέλη διατάσσεται σε μορφή φιλμ σε αντιδραστήρα και τα παραγόμενα ένζυμα καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του φουμαρικού οξέος σε μηλικό οξύ. Ακόμη, έχουν κατασκευαστεί υδρογέλες με την χρήση 3D εκτύπωσης, κατά την οποία ένα διάλυμα αγαρόζης αναμειγνύεται με εστεράση και εισάγεται στον εκτυπωτή. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα σχεδιασμού του σχήματος του πολυμερούς για βέλτιστη λειτουργία και ενεργότητα το ενζύμου. Συνολικά, η εφαρμογή των ακινητοποιημένων ενζύμων σε υδρογέλες εντοπίζεται κυρίως σε καταλυτικές αντιδράσεις σε διαλύματα ή εντός αντιδραστήρων. Η μετατόπιση σε μεγάλη κλίμακα είναι σχετικά απλή και αφορά κυρίως συστήματα αντιδραστήρων συνεχούς ροής, ενώ εμφανίζεται και η προοπτική χρήσης ως πληρωτικό υλικό σε στήλες.<sup>61</sup>

Μια εφαρμογή που μελετάται είναι η ακινητοποίηση λιπάσης σε πολυμερές χιτοζάνης. Στην μια περίπτωση, η λιπάση ακινητοποιείται μέσω προσρόφησης. Η απόδοση της ακινητοποίησης μειώνεται σε περίπτωση χρήσης μεγάλης αρχικής συγκέντρωσης ενζύμου, εξαιτίας των περιορισμένων θέσεων πρόσδεσης στο πολυμερές και της δημιουργίας συσσωματωμάτων ενζύμου. Επιπλέον, από υψηλή συγκέντρωση ακινητοποιημένων ενζύμων προκαλείται μείωση της ενεργότητας του συστήματος, γεγονός που οφείλεται σε προβλήματα μεταφοράς μάζας, στην συσσωμάτωση των ενζύμων που παρεμποδίζει τα ενεργά κέντρα και στην τροποποίηση της διαμόρφωσης των ακινητοποιημένων ενζύμων. Συνεπώς, η επιλογή της κατάλληλης ποσότητας ενζύμου είναι απαραίτητη για την βελτιστοποίηση της ενεργότητας και της παραγωγικότητας. Στην δεύτερη περίπτωση, η λιπάση ακινητοποιείται μέσω εγκλωβισμού στην υδρογέλη με αποτέλεσμα την ικανότητα ακινητοποίησης μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου. Η συμπεριφορά αυτή οφείλεται στην πρόσδεση του ενζύμου σε όλη την δομή της υδρογέλης έναντι της προσρόφησης που αφορά την επιφανειακή πρόσδεση. Ακόμη, ο εγκλεισμός είναι πιο ισχυρός και αποτελεσματικός, οπότε μεγαλύτερος αριθμός ενζύμων κατακρατείται με επιτυχία. Παρόλα αυτά η ενεργότητα της λιπάσης σε εγκλωβισμένη μορφή είναι χαμηλότερη συγκριτικά με την προσροφημένη, αφού το εγκλωβισμένο ένζυμο είναι κατανεμημένο σε όλη την πολυμερική δομή και εμφανίζονται περιορισμοί στην μεταφορά μάζας του υποστρώματος. Συμπληρωματικά, ο περιορισμός των λιπασών εντός του πολυμερούς υποβαθμίζει ελαφρώς την δομή τους και την ευκολία σύνδεσης του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο. Όσον αφορά την σταθερότητα του ενζύμου, ο εγκλωβισμός προσφέρει καλύτερη προστασία στο ένζυμο λόγω της μείωσης της κινητικότητάς του και της πορώδους δομής που το περιβάλλει, σε αντίθεση με το επιφανειακά προσροφημένο ένζυμο που επηρεάζεται άμεσα από εξωτερικούς παράγοντες και είναι επιρρεπές σε εκρόφιση.<sup>3</sup>

## 1.8 Μέθοδοι ταυτοποίησης

### 1.8.1 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για την ταυτοποίηση οργανικών ενώσεων και μελέτη της δομής τους με ευρεία εφαρμογή στην οργανική σύνθεση, στην παραγωγή φαρμάκων κ.ά. Η τεχνική χρησιμοποιεί τις μαγνητικές ιδιότητες ορισμένων ατομικών πυρήνων. Οι πυρήνες αυτοί απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που αντιστοιχεί στην διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο καταστάσεων ιδιοστροφορμής (spin), υπό συνθήκες που υφίσταται ισχυρό μαγνητικό πεδίο.

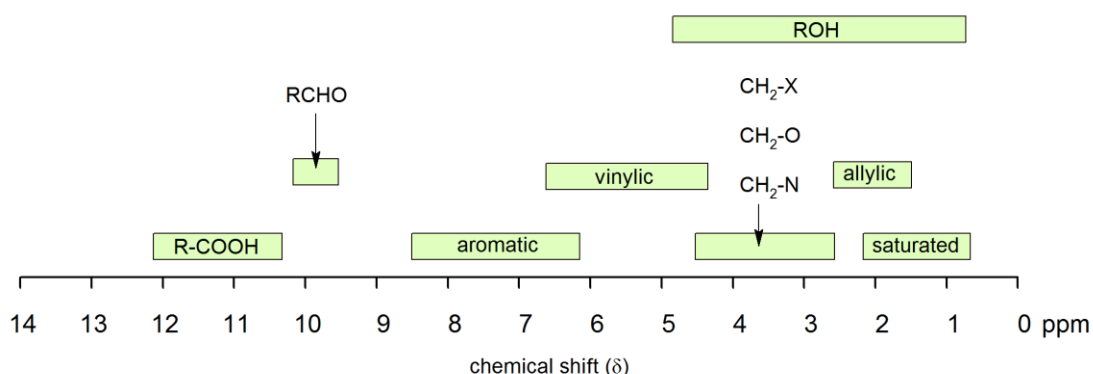
Οι πυρήνες που εμφανίζουν spin και μπορούν να ανιχνευθούν μέσω NMR είναι αυτοί που έχουν περιττό μαζικό αριθμό και άρτιο ή περιττό ατομικό αριθμό, όπως το  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  και τα spin τους λαμβάνουν τιμές που είναι περιττά πολλαπλάσια του  $1/2$ , καθώς και πυρήνες με άρτιο μαζικό αριθμό και περιττό ατομικό αριθμό, όπως  $^2\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$  τα spin των οποίων είναι ακέραιοι αριθμοί. Αντίθετα, οι πυρήνες με άρτιο ατομικό και μαζικό αριθμό όπως  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ,  $^{12}\text{C}$  έχουν κβαντικό αριθμό spin  $I=0$ , οπότε η ιδιοστροφορμή τους είναι μηδενική και συνεπώς δεν μπορούν να ανιχνευθούν μέσω NMR.

Χωρίς την εφαρμογή του μαγνητικού πεδίου οι πυρήνες υιοθετούν τυχαία οποιαδήποτε από τις πιθανές διαμορφώσεις, δηλαδή για spin  $1/2$  οι πιθανές διαμορφώσεις του  $I$  είναι  $+1/2$  (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) και  $-1/2$  (υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση). Κατά την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου ( $B$ ) το spin των πυρήνων προσανατολίζεται παράλληλα με το μαγνητικό πεδίο, οπότε  $I = +1/2$  ή αντιπαράλληλα με το μαγνητικό πεδίο οπότε και το  $I = -1/2$ . Σημειώνεται ότι η τάση είναι ο σχηματισμός περισσότερων πυρήνων στην χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, σε σχέση με το πλήθος των πυρήνων με υψηλή ενέργεια.

Στο σημείο αυτό με εισαγωγή μιας πηγής ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο εύρος συχνότητας των ραδιοκυμάτων, οι πυρήνες με χαμηλή ενέργεια διεγείρονται προς την κατάσταση υψηλής ενέργειας με αναστροφή του spin. Η παραπάνω συνθήκη ονομάζεται συντονισμός. Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση ( $B$ ) του μαγνητικού πεδίου που εφαρμόζεται, τόσο μεγαλύτερο είναι και το ενεργειακό χάσμα μεταξύ των δύο καταστάσεων, οπότε η απαιτούμενη ενέργεια για μετάβαση σε κατάσταση συντονισμού και αντιστροφή του spin είναι μεγαλύτερη.

Πέραν από τους πυρήνες το μαγνητικό πεδίο επηρεάζει και τα ηλεκτρόνια που τους περιβάλλουν. Τα ηλεκτρόνια δημιουργούν με την σειρά τους επαγόμενο μαγνητικό πεδίο αντίθετο με το εξωτερικό εφαρμοζόμενο πεδίο. Συνεπώς, τα ηλεκτρόνια μεταβάλλουν το μαγνητικό πεδίο που εφαρμόζεται σε κάθε πυρήνα, με διαφορετική επίδραση ανάλογα την θέση του κάθε πυρήνα στην συνολική ένωση. Το μαγνητικό πεδίο των ηλεκτρονίων προστατεύει τους πυρήνες και συνεπώς απαιτείται μεγαλύτερο μαγνητικό πεδίο για να επιτευχθεί συντονισμός και αντιστροφή του spin. Η χημική μετατόπιση ( $\delta$ ) εκφράζεται σε μονάδες ppm και αναδεικνύει τον βαθμό προστασίας ενός πυρήνα. Η μεγαλύτερη προστασία

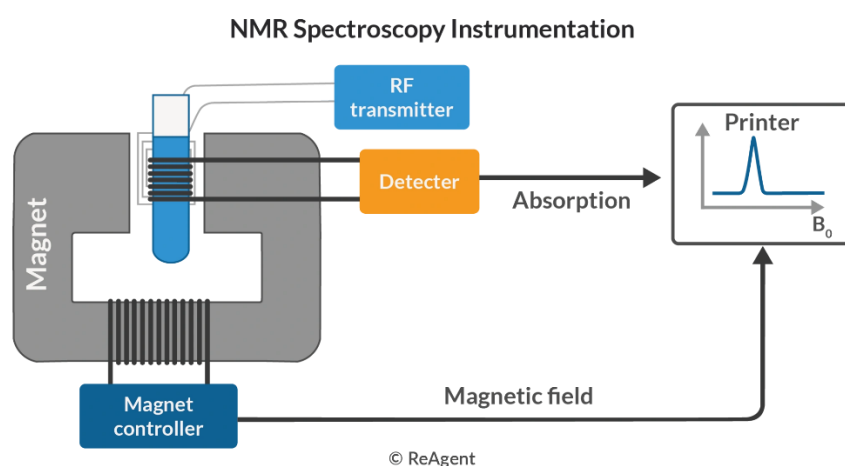
ενός πυρήνα μεταφράζεται σε μικρότερη χημική μετατόπιση. Οι διπλοί δεσμοί μειώνουν την προστασία των πυρήνων έναντι των απλών δεσμών, ενώ οι ηλεκτραρνητικές ομάδες αποπροστατεύουν τους πυρήνες.



**Εικόνα 7:** Χημικές μετατοπίσεις των βασικών χαρακτηριστικών ομάδων. Map: Organic Chemistry (Wade)

Οι συνηθέστεροι τύποι συσκευών NMR που χρησιμοποιούνται είναι τα φασματομέτρα συνεχούς κύματος (CW-NMR) και τα παλμικά φασματομέτρα (FT-NMR). Τα περισσότερα NMR ανιχνεύουν τα πρωτόνια ( $^1\text{H}$  NMR) και τους πυρήνες άνθρακα  $^{13}\text{C}$ . Κατά την μέτρηση η ακτινοβολία που εκπέμπεται είναι σταθερή και μεταβάλλεται σταδιακά η ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Κάθε πυρήνας εμφανίζει συντονισμό σε διαφορετική περιοχή και η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας καταγράφεται και μετατρέπεται στις αντίστοιχες κορυφές των πυρήνων. Στην περίπτωση του FT-NMR η ακτινοβολία (ραδιοκύμα) παράγεται από γεννήτρια, ενισχύεται και μεταδίδεται σε μορφή παλμού στο δείγμα. Η ακτινοβολία που παράγεται οδηγείται στον δέκτη που περιβάλλει το δείγμα, ενισχύεται και φτάνει στον ανιχνευτή. Έπειτα από μετασχηματισμό Fourier δίνεται το τελικό φάσμα της ένωσης που μετράται.

71, 72



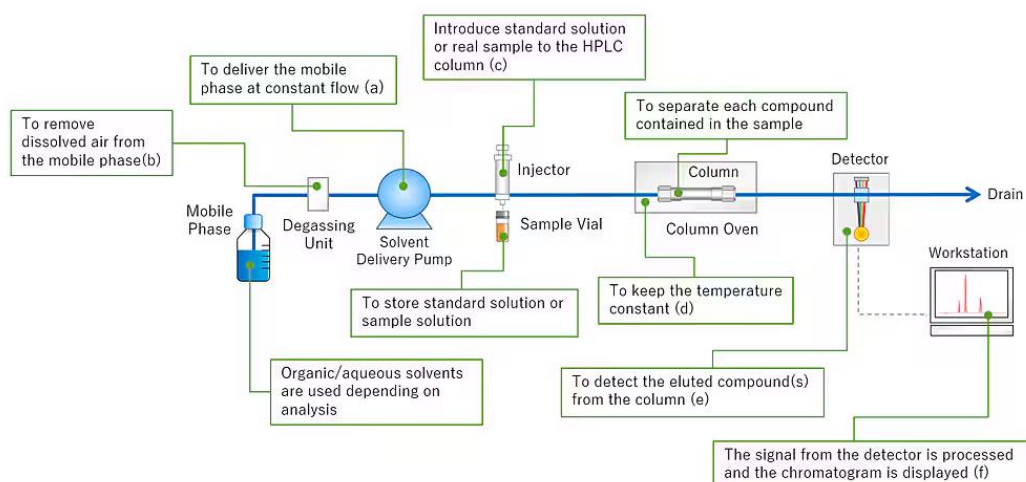
**Εικόνα 8:** Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας του φασματομέτρου NMR

### 1.8.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η χρωματογραφία HPLC αποτελεί μια εξαιρετική τεχνική για ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις οργανικών ενώσεων καθώς και για τον διαχωρισμό τους σε ορισμένες περιπτώσεις. Η λειτουργία της βασίζεται στην ύπαρξη δύο φάσεων, μιας στατικής φάσης που αποτελείται συνήθως από στερεό (π.χ. silica) σε κατάλληλη κοκκομετρία και μιας κινητής φάσης που τροφοδοτείται παράλληλα με το μετρούμενο δείγμα στην χρωματογραφική στήλη. Το δείγμα που μετράται αποτελείται από ενώσεις που εμφανίζουν διαφορά πολικότητας και κατ'επέκταση η αλληλεπίδρασή της καθεμίας με το σύστημα της κινητής και στατικής φάσης είναι διαφορετική με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται εντός της στήλης και να έχουν έναν χαρακτηριστικό χρόνο έκλουσης από αυτή. Η μέτρηση μέσω HPLC προϋποθέτει την πλήρη διαλυτοποίηση των επιθυμητών ενώσεων σε διαλύτες πριν την λήψη του μετρούμενου δείγματος. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διαχωρισμός ενώσεων και ταυτοποίηση τους μέσω του χρόνου έκλουσης (retention time). Η πίεση της κινητής φάσης εντός της στήλης είναι υψηλή για τον βέλτιστο διαχωρισμό.

Σημαντικό πλεονέκτημα είναι η χρήση δειγμάτων μικρού όγκου και η οικονομία διαλυτών για λήψη αξιόπιστων μετρήσεων, όπου ενδεικτικά σε μια μέτρηση μπορεί να ληφθεί όγκος δείγματος 10  $\mu\text{L}$  και η ροή της κινητής φάσης να τεθεί στο 1 ml/min. Ακόμη, η ευαισθησία και η ανάλυση της μεθόδου είναι υψηλή για μετρήσεις ακόμα και σε κλίμακα ppb. Ο πιο κοινός ανιχνευτής που τοποθετείται σε διατάξεις HPLC είναι το φασματοφωτόμετρο UV-Vis που λαμβάνει συνεχώς το φάσμα των συστατικών που εξέρχονται από την στήλη στο εύρος 190-750nm.

Οι δύο βασικοί τύποι χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) κατά την οποία η στατική φάση είναι πολική (π.χ. silica) και η κινητή φάση μη πολική (εξάνιο, βενζόλιο) και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase) όπου η στατική φάση είναι μη πολική και η κινητή φάση πολική (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, νερό). Με βάση την αρχή του διαχωρισμού των ενώσεων εμφανίζονται υποκατηγορίες όπως η χρωματο-γραφία απορρόφησης, ιοντοεναλλαγής, συγγένειας. Η κινητή φάση μπορεί να ρέει είτε με σταθερή σύσταση των συστατικών της (isocratic elution), είτε με σταδιακά μεταβαλλόμενη σύσταση (gradient elution) με στόχο την ταχύτερη έκλυση των ενώσεων που εκλούνται σε μεγάλους χρόνους και την βέλτιστη λειτουργία για πολυσυστατικά δείγματα. Στην στήλη οι ενώσεις που εμφανίζουν συγγένεια με την κινητή φάση συμπαρασύρονται από αυτή και εκλούνται πρώτες, δηλαδή όσο μεγαλύτερη η συγγένεια με την κινητή φάση, τόσο μικρότερος ο χρόνος παραμονής εντός της στήλης. Αντίθετα, η συγγένεια των ενώσεων με την κινητή φάση καθυστερεί την πορεία τους κατά μήκος της στήλης και συνεπώς εκλούνται σε μεγαλύτερους χρόνους. Η βασική διάταξη ενός χρωματογράφου HPLC παρουσιάζεται παρακάτω.<sup>73</sup>



**Εικόνα 9:** Σχηματική αναπαράσταση οργανολογίας και λειτουργίας της HPLC <sup>74</sup>

Περιγράφοντας συνοπτικά την λειτουργία της HPLC, αρχικά οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται λαμβάνονται σε κατάλληλη αναλογία με την βοήθεια αντλίας και διέρχονται από συσκευή απαερίωσης ώστε να εξασφαλιστεί σταθερή ροή της κινητής φάσης. Στο σημείο αυτό οι διαλύτες διέρχονται από την στήλη και ένας δειγματολήπτης τοποθετεί το μετρούμενο δείγμα σε κατάλληλη ποσότητα εντός της κινητής φάσης. Η στήλη θερμοστατείται με χρήση φούρνου για να μην υπάρχουν εξωτερικές επιρροές στο σύστημα. Οι ενώσεις εξέρχονται σταδιακά από την στήλη και καταγράφονται από τον ανιχνευτή σε πραγματικό χρόνο, ενώ το λαμβανόμενο σήμα μετατρέπεται στο αντίστοιχο χρωματογράφημα. <sup>74</sup>



## 2. Πειραματικό Μέρος

### 2.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη μεθοδολογίας ακινητοποίησης του ενζύμου λιπάση σε συστήματα ευτηκτογελών. Πιο συγκεκριμένα συντίθενται και αξιολογούνται δομικά και φυσικοχημικά διάφορα είδη βαθέως ευτηκτικών διαλυτών που βασίζονται σε φυσικά συστατικά βασισμένα σε ωσμωνώτες ζωντανών συστημάτων όπως η βεταΐνη και η ουρία. Κατόπιν, μελετάται η σταθεροποίηση της λιπάσης εντός των συστημάτων των DESs, δηλαδή παρατηρείται η εξέλιξη της ενεργότητάς της κατά την αποθήκευση σε DESs σε διαφορετικές θερμοκρασίες.

Με την βοήθεια των πράσινων διαλυτών DESs που έχουν μελετηθεί αναπτύσσεται μέθοδος ακινητοποίησης της λιπάσης σε συστήματα ευτηκτογελών. Για την κατασκευή της ευτηκτογέλης χρησιμοποιείται αλγινικό νάτριο ως πολυσακχαρίτης για την ζελατινοποίηση και ποσότητα από DES. Στα συστήματα αυτά τοποθετείται λιπάση με στόχο την βέλτιστη ακινητοποίησή της. Για την αξιολόγηση των ευτηκτογελών μελετάται η ενεργότητα της λιπάσης κατά την αποθήκευση των γελών σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Έτσι, αναδεικνύεται η αντοχή και η σταθερότητα του ενζύμου που τοποθετείται στην ευτηκτογέλη, καθώς και η αξία ακινητοποίησης σε συστήματα ευτηκτογελών.

### 2.2 Όργανα/συσκευές και αντιδραστήρια

Στους ακόλουθους πίνακες παρουσιάζονται όλα τα όργανα, οι συσκευές και τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πραγματοποίηση των πειραματικών διατάξεων παρασκευής των DESs και των ευτηκτογελών, μέτρησης της ενεργότητας της λιπάσης.

**Πίνακας 1:** Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιούνται στην διεξαγωγή των πειραμάτων

Όργανο/ Συσκευή	Κατασκευαστής	Μοντέλο
Ζυγός ακριβείας (max 110 g)	KERN	ADB 200-4
Ζυγός ακριβείας (max 2 g)	Sartorius	M2P
Μαγνητικός αναδευτήρας με θερμαινόμενο μάτι	Witeg	MSH-20A
Αναδευτήρας Vortex	Lox Instruments	V05 series
Λουτρό υπερήχων	Branson	2210 Ultrasonic Bath
Αντλία κενού	Edwards	-
Πεχάμετρο	Metria	M21
Συσκευή Λυοφιλίωσης	Frozen In Time	Lablyo Mini
Επωαστήρας	-	-
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Microplate Reader)	BioTek	Epoch 2
Φασματοφωτόμετρο UV-Vis	Jasco	V-770 UV-Vis/NIR

Συσκευή NMR	Varian Gemini	300
Ιξωδόμετρο	Anton Paar	ViscoQC 100
Χρωματογράφος (HPLC)	Shimadzu	LC-2030C 3D Plus

**Πίνακας 2:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην διεξαγωγή των πειραμάτων

<b>Αντιδραστήριο</b>	<b>Μοριακός τύπος</b>	<b>Προμηθευτής</b>
Υπερκάθαρο νερό	H <sub>2</sub> O	-
Γλυκερόλη	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Kalo Chem
Άνυδρη Βεταΐνη	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Glentham Life Sciences
L-Προλίνη	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Glentham Life Sciences
Σαρκοσίνη	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Fluka
Σορβιτόλη	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Chemco
Ουρία	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	Penta Chem. Unlimited
Όξινο Φωσφορικό κάλιο	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Penta
Δισόξινο φωσφορικό κάλιο	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Penta Chem. Unlimited
Αραβικό κόμμι	-	Glentham Life Sciences
Triton-X	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> , n=9-10	-
Παλμιτικός p-νιτροφαινυλεστέρας (pNPP)	C <sub>22</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>4</sub>	Thermo Scientific
Ισοπροπανόλη	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Acros Organics
Lipase AS Amano (LAY0651455S)	-	Amano
Αλγινικό νάτριο	-	Glentham Life Sciences
p-κουμαρικό οξύ	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Fluorochem
p-κουμαρικός μεθυλεστέρας	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	-
Μεθανόλη	CH <sub>4</sub> O	-
Θειικό οξύ	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-
Όξινο ανθρακικό νάτριο	NaHCO <sub>3</sub>	Penta
Διαιθυλαιθέρας	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	-
Θειικό νάτριο	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Lach-Ner
Πετρελαϊκός αιθέρας	-	-
Αιθανικός αιθυλεστέρας	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-

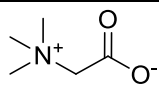
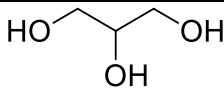

### 2.3 Γενική μέθοδος σύνθεσης NaDESs

Για την παρασκευή των φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDESs) επιλέγεται η μέθοδος της ελεγχόμενης θέρμανσης υπό ανάδευση. Αρχικά, ζυγίζονται, σε ζυγό ακριβείας, οι απαραίτητες ποσότητες από κάθε συστατικό, οι οποίες προκύπτουν με βάση την επιθυμητή γραμμομοριακή αναλογία μεταξύ τους. Κατόπιν, τα συστατικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη και το σύστημα εισάγεται σε ελαιόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας 70°C με συνεχή ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές, διαυγές υγρό χωρίς ίχνος στερεών υπολειμμάτων. Στο σημείο αυτό, το NaDES αφήνεται να ψυχθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αποθηκεύεται σε γυάλινο φιαλίδιο (vial). Η διάρκεια της θέρμανσης υπό ανάδευση για την σύνθεση κάθε NaDES μεταβάλλεται ανάλογα τα συστατικά που επιλέγονται, αλλά και τις μοριακές αναλογίες. Τα NaDESs που παρασκευάζονται, οι απαιτούμενες ποσότητες και αναλογίες μεταξύ των συστατικών και οι συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας παρουσιάζονται παρακάτω.

- **Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό (Bet-Gly-W) (1:2:4)**

Η σύνθεση του NaDES Bet-Gly-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 3 g άνυδρης βεταΐνης (0.026 mol) και 4.79 g γλυκερόλης (0.052 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 1.87 g νερού (0.104 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:2:4. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 h.

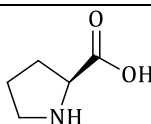
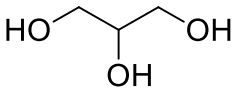

**Πίνακας 3:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό (Bet-Gly-W)	1:2:4	 Βεταΐνη MW=117.15 g/mol	 Γλυκερόλη MW=92.09 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

- **Προλίνη-Γλυκερόλη-Νερό (Pro-Gly-W) (1:2:4)**

Η σύνθεση του NaDES Pro-Gly-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 3 g προλίνης (0.026 mol) και 4.79 g γλυκερόλης (0.052 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 1.87 g νερού (0.104 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:2:4. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 h.

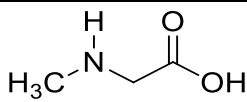
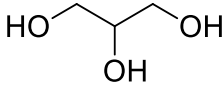

**Πίνακας 4:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Προλίνη-Γλυκερόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Προλίνη-Γλυκερόλη-Νερό (Pro-Gly-W)	1:2:4	 Προλίνη MW=115.13 g/mol	 Γλυκερόλη MW=92.09 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

• **Σαρκοσίνη-Γλυκερόλη-Νερό (Sar-Gly-W) (1:2:4)**

Η σύνθεση του NaDES Sar-Gly-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 3 g σαρκοσίνης (0.0337 mol) και 6.207 g γλυκερόλης (0.0674 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 2.426 g νερού (0.1348 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:2:4 μεταξύ των συστατικών Sar-Gly-W. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 h.

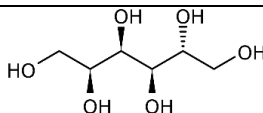
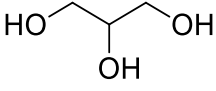

**Πίνακας 5:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Σαρκοσίνη-Γλυκερόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Σαρκοσίνη-Γλυκερόλη-Νερό (Sar-Gly-W)	1:2:4	 Σαρκοσίνη MW=89.09 g/mol	 Γλυκερόλη MW=92.09 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

• **Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό (Sorb-Gly-W) (1:2:5)**

Η σύνθεση του NaDES Sorb-Gly-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 4 g σορβιτόλης (0.022 mol) και 4.052 g γλυκερόλης (0.044 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 1.980 g νερού (0.110 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:2:5 μεταξύ των συστατικών Sorb-Gly-W. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 h.

**Πίνακας 6:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό

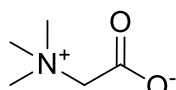
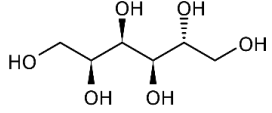

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
	1:2:5			

Σορβιτόλη- Γλυκερόλη- Νερό (Sorb-Gly-W)		Σορβιτόλη MW=182.17 g/mol	Γλυκερόλη MW=92.09 g/mol	Νερό MW=18.02 g/mol
--	--	------------------------------	--------------------------------	---------------------------

- **Βεταΐνη-Σορβιτόλη-Νερό (Bet-Sorb-W) (1:1:4)**

Η σύνθεση του NaDES Bet-Sorb-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 4 g βεταΐνης (0.034 mol) και 6.194 g σορβιτόλης (0.034 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 2.448 g νερού (0.136 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:1:4 μεταξύ των συστατικών Bet-Sorb-W. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 1 h.

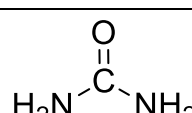
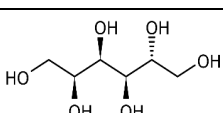
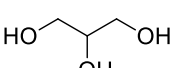

**Πίνακας 7:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Βεταΐνη-Σορβιτόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Βεταΐνη- Σορβιτόλη- Νερό (Bet-Sorb- W)	1:1:4	 Βεταΐνη MW=117.15 g/mol	 Σορβιτόλη MW=182.17 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

- **Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό (Ur-Sorb-Gly-W) (2:1:1:5)**

Η σύνθεση του NaDES Ur-Sorb-Gly-W πραγματοποιείται σύμφωνα με την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 2.5 g ουρίας (0.042 mol), έπειτα 3.82 g σορβιτόλης (0.021 mol) και 1.93 g γλυκερόλης (0.021 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 1.89 g νερού (0.105 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 2:1:1:5 μεταξύ των συστατικών Ur-Sorb-Gly-W. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 90 min.

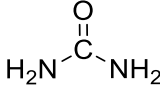
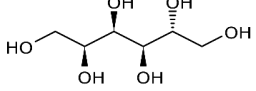

**Πίνακας 8:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3	Συστατικό 4
Ουρία- Σορβιτόλη - Γλυκερόλη -Νερό (Ur-Sorb- Gly-W)	2:1:1:5	 Ουρία MW=60.06 g/mol	 Σορβιτόλη MW=182.17 g/mol	 Γλυκερόλη MW=92.09 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

- **Ουρία-Σορβιτόλη-Νερό (Ur-Sorb-W) (1:1:3)**

Η σύνθεση του NaDES Ur-Sorb-W ακολούθησε την γενική μέθοδο σύνθεσης NaDES. Αρχικά τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη 2 g ουρίας (0.0333 mol) και 6.07 g σορβιτόλης (0.0333 mol), ενώ στο τέλος προστίθενται και 1.8 g νερού (0.1 mol). Οι ποσότητες ακολουθούν την γραμμομοριακή αναλογία 1:1:3 μεταξύ των συστατικών Ur-Sorb-W. Η θερμοκρασία που επιλέγεται κατά την σύνθεση είναι 70 °C και ο χρόνος που απαιτείται είναι 90 min.

**Πίνακας 9:** Συστατικά, γραμμομοριακή αναλογία, συντακτικοί τύποι και μοριακά βάρη για το NaDES Ουρία-Σορβιτόλη-Νερό

Όνομα NaDES	Μοριακή αναλογία	Συστατικό 1	Συστατικό 2	Συστατικό 3
Ουρία-Σορβιτόλη-Νερό (Ur-Sorb-W)	1:1:3	 Ουρία MW=60.06 g/mol	 Σορβιτόλη MW=182.17 g/mol	 Νερό MW=18.02 g/mol

## 2.4 Χαρακτηρισμός NaDESs

### 2.4.1 Μέθοδος μέτρησης πολικότητας

Η πολικότητα των διαλυτών NaDESs μετράται με την χρήση του δείκτη Ερυθρό του Νείλου (Nile Red). Το διάλυμα του ερυθρού του νείλου που χρησιμοποιείται στις μετρήσεις παρασκευάζεται λαμβάνοντας 31  $\mu\text{L}$  από το δείκτη Nile Red τα οποία αραιώνονται με 969  $\mu\text{L}$  αιθανόλης. Στην συνέχεια, ποσότητα περίπου 2 ml από το NaDES τοποθετούνται σε κυψελίδα και γίνεται φωτομέτρησή του σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (BioTek Epoch2) στο εύρος 400-700 nm. Η μέτρηση του φάσματος σκέτου NaDES αποτελεί την μέτρηση του τυφλού δείγματος (baseline). Στο σημείο αυτό, στην κυψελίδα που περιέχει το καθαρό δείγμα διαλύτη NaDES προστίθεται ποσότητα 80  $\mu\text{L}$  του διαλύματος Nile Red-αιθανόλης που παρασκευάστηκε και η κυψελίδα ανακινείται ώστε το Nile Red να κατανεμηθεί σε όλο τον όγκο του NaDES σχηματίζοντας ένα ομογενές σύστημα. Κατόπιν, λαμβάνεται εκ νέου φάσμα στο εύρος 400-700 nm για το σύστημα του NaDES που περιέχει το διαλύτη Nile Red. Από το φάσμα αυτό, εντοπίζεται το μήκος κύματος που αντιστοιχεί στην μέγιστη απορρόφηση του δείγματος εντός του μετρούμενου εύρους και συμβολίζεται ως  $\lambda_{\text{max}}$ . Με βάση την τιμή  $\lambda_{\text{max}}$  υπολογίζεται η ενέργεια μοριακής μετάβασης, που προκύπτει από την σχέση:

$$E_{\text{NR}} = \frac{28591}{\lambda_{\text{max}}} \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{mol}} \right]$$

#### 2.4.2 Μέθοδος μέτρησης ιξώδους

Το ιξώδες των NaDESs μετράται με την βοήθεια του περιστροφικού ιξωδόμετρου (Anton Paar ViscoQC 100). Για την μέτρηση αρχικά γίνεται ρύθμιση του οργάνου, ώστε να είναι απόλυτα ευθυγραμμισμένο σύμφωνα με τις οδηγίες που εμφανίζονται στην οθόνη του. Κατόπιν, 6 – 7 ml δείγματος NaDES μεταφέρεται στο δοχείο του ιξωδόμετρου, η άτρακτος βυθίζεται στο δείγμα και προσαρμόζεται κατάλληλα ώστε να επιτρέπεται η αιώρηση της, να καλύπτεται εντελώς από NaDES, και να μηδενιστεί η ροπή (% torque). Η άτρακτος που επιλέγεται είναι η SC4-18 με εύρος μέγιστου μετρούμενου ιξώδους από 60 έως 750 mPa·s.

Στο στάδιο αυτό επιλέγεται το επιθυμητό πρόγραμμα μέτρησης που οριοθετεί τις περιστροφές (rpm) της ατράκτου και το εύρος του ιξώδους που μετράται. Για την λήψη της τιμής ως αξιόπιστη πρέπει κατά την μέτρηση η ροπή που επιτυγχάνεται να είναι στο εύρος 50 – 70 %. Σε περίπτωση υπέρβασης του ορίου ροπής (>80 %) επιλέγεται μικρότερη ταχύτητα περιστροφής μιας και το ιξώδες είναι μεγαλύτερο από το εύρος τιμών που επιλέχθηκε αρχικά. Αντίστοιχα, όταν η ροπή είναι κάτω από 40 – 50 % επιλέγεται πρόγραμμα με μεγαλύτερη ταχύτητα περιστροφής, αφού το ιξώδες είναι μικρότερο από το εύρος των επιλεγμένων τιμών που έγινε αρχικά. Έπειτα από δοκιμές για την επίτευξη της βέλτιστης ροπής, όταν βρεθεί στο εύρος 50 – 70 %, καταγράφεται η τιμή του ιξώδους του δείγματος το οποίο εκφράζεται σε μονάδες mPa·s.

#### 2.4.3 Μέθοδος προσδιορισμού pH

Η μέτρηση του pH πραγματοποιείται στο πεχάμετρο Metria M21. Αρχικά, γίνεται βαθμονόμηση του οργάνου με πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα (buffer) με pH=7 και pH=4. Έπειτα από κάθε μέτρηση πραγματοποιείται έκπλυση του ηλεκτροδίου με υπερκάρθαρο νερό. Κατόπιν, το ηλεκτρόδιο βυθίζεται στο μετρούμενο NaDES και καταγράφεται η τιμή του pH και η θερμοκρασία της μέτρησης αφού σταθεροποιηθούν πλήρως.

#### 2.5 Διαλυτοποίηση και σταθεροποίηση του ενζύμου λιπάση σε NaDES

Για την μέτρηση της σταθερότητας του ενζύμου λιπάση (Lipase AS “Amano” LAY0651455S) που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Aspergillus Niger* όταν αυτή διαλυθεί στους βαθέως ευτηκτικούς διαλύτες που συντέθηκαν, δημιουργούνται διαλύματα λιπάσης με συγκέντρωση 1 mg/mL NaDES. Αναλυτικότερα, σε 6 ml NaDES προστίθενται 6 mg λιπάσης και ακολουθεί ανάδευση έως ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως η λιπάση. Η ίδια μεθοδολογία ακολουθείται σε κάθε ένα από τα NaDESs που κατασκευάστηκαν (Bet-Gly-W, Pro-Gly-W, Sar-Gly-W, Sorb-Gly-W, Bet-Sorb-W, Ur-Sorb-Gly-W, Ur-Sorb-W) καθώς και σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο χρησιμοποιείται ως μέτρο σύγκρισης της ενεργότητας της λιπάσης, μεταξύ υδατικών συστημάτων και διαλυτών

NaDESs. Τα ενζυμικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν φυλάσσονται στους 4, 25 και 50°C.

## 2.6 Γενική μέθοδος σύνθεσης ευτηκτογελών

Για τον σχηματισμό των ευτηκτογελών χρησιμοποιούνται τα NaDESs που παρασκευάστηκαν ως υγρή φάση (διαλύτης). Ως ζελατινοποιητής επιλέγεται το άλας αλγινικού νατρίου, που αποτελεί πολυσακχαρίτη σε μορφή άλατος, σε όλες τις περιπτώσεις ευτηκτογελών. Στις ευτηκτογέλες συμπεριλαμβάνεται και ποσότητα λιπάσης για ακινητοποίηση και μελέτη της δράσης του συστήματος.

Κατά την σύνθεση των ευτηκτογελών, αρχικά, ζυγίζεται με ακρίβεια ποσότητα NaDES 3 g και τοποθετείται σε γυάλινο φιαλίδιο (vial). Το NaDES θερμαίνεται σε ελαιόλουτρο υπό συνεχή ανάδευση μέχρι σταθερής θερμοκρασίας 70 °C. Κατόπιν, προστίθεται σταδιακά ποσότητα αλγινικού 10% βάρος κατά βάρος του συνολικού NaDES που χρησιμοποιείται (0,3 g αλγινικού νατρίου) και το σύστημα παραμένει υπό ανάδευση και θέρμανση μέχρι να διαλυτοποιηθεί η προστιθέμενη ποσότητα αλγινικού νατρίου και να παραληφθεί μία ομοιογενής ευτηκτογέλη. Στην συνέχεια, η ευτηκτογέλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου ψυχθεί φυσιολογικά ( $\approx 25$  °C).

## 2.7 Ακινητοποίηση του ενζύμου λιπάση σε ευτηκτογέλες

Για την ακινητοποίηση του ενζύμου κατασκευάζεται υδατικό διάλυμα λιπάσης με συγκέντρωση 40 mg λιπάσης/mL διαλύματος. Η λιπάση που χρησιμοποιείται είναι η Lipase AS "Amano" LAY0651455S και διατίθεται σε μορφή ξηρής σκόνης.

Αφού η ευτηκτογέλη έχει ψυχθεί προστίθεται ποσότητα διαλύματος λιπάσης 20% όγκο κατά βάρος του αρχικού NaDES που χρησιμοποιείται (0.6 ml διαλύματος). Μετά την προσθήκη του ενζυμικού διαλύματος λιπάσης, η ευτηκτογέλη αναδεύεται με στόχο την ενσωμάτωση του διαλύματος λιπάσης στην ευτηκτογέλη και την ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου εντός του συστήματος. Κατόπιν, η ευτηκτογέλη καταψύχεται για τουλάχιστον 24 h και ακολουθεί η λυοφιλοποίησή της (συσκευή λυοφιλοποίησης Frozen In Time, Lablyo Mini).. Σε τελική μορφή η λαμβανόμενη ευτηκτογέλη έχει συμπαγή δομή και διατηρείται ως ενιαία μάζα, ενώ εμφανίζει ελαστικότητα. Τα συστήματα ευτηκτογέλης-ενζύμου που παραλαμβάνονται φυλάσσονται στους 4 και στους 25°C.



**Πίνακας 10:** Σχηματιζόμενες ευτηκτογέλες αλγινικού

Κωδικός	NaDES	Πολυσακχαρίτης	Ένζυμο
1	Bet/Gly/W 1:2:4		
2	Pro/Gly/W 1:2:4	Αλγινικό νάτριο 10 % w/w NaDES	Λιπάση 20% v/w NaDES
3	Sar/Gly/W 1:2:4		
4	Sorb/Gly/W 1:2:5		
5	Ur/Sorb/Gly/W 2:1:1:5		
6	Ur/Sorb/W 1:1:3		



Ευτηκτογέλη  
με NaDES  
Bet-Gly-W



Ευτηκτογέλη με  
NaDES  
Pro-Gly-W



Ευτηκτογέλη με  
NaDES  
Sar-Gly-W



Ευτηκτογέλη  
με NaDES  
Sorb-Gly-W



Ευτηκτογέλη με  
NaDES  
Ur-Sorb-Gly-W

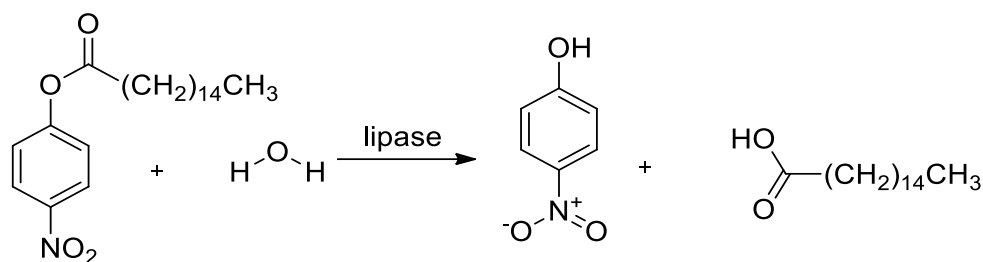


Ευτηκτογέλη με  
NaDES  
Ur-Sorb-W

**Εικόνα 10:** Σχηματιζόμενες ευτηκτογέλες αλγινικού με χρήση διαφορετικών NaDESs σε κάθε περίπτωση

## 2.8 Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης

Για την ποσοτικοποίηση και μελέτη της ενεργότητας της λιπάσης χρησιμοποιείται η μέθοδος προσδιορισμού μέσω πραγματοποίησης χημικής αντίδρασης καταλυόμενη από την λιπάση. Η αντίδραση που επιλέγεται είναι η υδρόλυση του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα (p-nitrophenyl palmitate) καταλυόμενη από λιπάση προς σχηματισμό p-νιτροφαινόλης και παλμιτικού οξέος. Η παραγόμενη p-νιτροφαινόλη αποτελεί μια ένωση με υποκίτρινη χρώση, συνεπώς μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με μέτρηση σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis στα 410 nm.



MW: 377.52 g/mol

MW: 139.11 g/mol

MW: 256.42 g/mol

**Εικόνα 11:** Αντίδραση υδρόλυσης παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα καταλυόμενη από λιπάση προς σχηματισμό νιτροφαινόλης και παλμιτικού οξέος.

### 2.8.1 Ενεργότητα λιπάσης σε NaDESs

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της λιπάσης σε NaDES κατασκευάζεται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κατάλληλο υπόστρωμα παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα.

- **Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών**

**Πίνακας 11:** Ενώσεις και ποσότητες που συνθέτουν το ρυθμιστικό διάλυμα

Dipotassium Phosphate	Monopotassium Phosphate	Water
$K_2HPO_4$	$KH_2PO_4$	$H_2O$
9.3 mg	6.3 mg	100 ml

Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) αποτελείται από όξινο φωσφορικό κάλιο και δισόξινο φωσφορικό κάλιο, με τελική συγκέντρωση 1mM και pH = 7. Για την παρασκευή ζυγίζονται 9.3 mg όξινου φωσφορικού καλίου ( $K_2HPO_4$ ) και 6.3 mg δισόξινου φωσφορικού καλίου ( $KH_2PO_4$ ) και τοποθετούνται σε δοχείο ζέσεως. Στην συνέχεια, με ογκομετρικό κύλινδρο προστίθενται στο δοχείο ζέσεως 90 ml υπερκάθαρου νερού και ακολουθεί ανάδευση μέχρι πλήρους διάλυσης των στερεών  $K_2HPO_4$  και  $KH_2PO_4$ . Κατόπιν, μετράται το pH του διαλύματος και προσαρμόζεται στην τιμή 7, με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 1M. Τέλος, προστίθενται υπερκάθαρο νερό, έως ότου ο τελικός όγκος του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 100 ml.

- **Παρασκευή υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα για μέτρηση ενζυμικών διαλυμάτων (NaDES + lipase)**

Αρχικά, σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) προστίθενται ποσότητες αραβικού κόμμι (arabic gum) και Triton-X (τασιενεργό), με τελικές συγκεντρώσεις 1.1 mg/ml ρυθμιστικού και 4.4

mg/ml ρυθμιστικού, αντίστοιχα.. Ακολουθεί ήπια ανάδευση για περίπου 30 min για ενσωμάτωση του αραβικού κόμμι και του Triton-X στο διάλυμα. Παράλληλα, παρασκευάζεται διάλυμα του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα σε ισοπροπανόλη με συγκέντρωση 1 mg/ml ισοπροπανόλης.

Τέλος γίνεται η προσθήκη του διαλύματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα σε ισοπροπανόλη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει το Arabic gum και το Triton-X σε αναλογία 1:9. Κατά την προσθήκη εμφανίζεται θολερότητα η οποία όμως εξαλείφεται έπειτα από ανάδευση για 5 min. Το τελικό υπόστρωμα, διατηρείται σε φιάλη amber. Σε περίπτωση που εμφανιστεί κίτρινη χρώση σε έντονο βαθμό συνεπάγεται ότι έχει υπάρξει υδρόλυση του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα και συντίθεται εκ νέου.

- **Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης (διαλύματα NaDES+lipase)**

Η μέτρηση της ενεργότητας της λιπάσης σε διαλύτες NaDESs πραγματοποιείται σε microplate reader (BioTek Epoch2), που προσφέρει την δυνατότητα μέτρησης πολλών δειγμάτων ταυτόχρονα, ενώ χρησιμοποιούνται και μικρές ποσότητες από τα αντιδραστήρια. Αρχικά, τοποθετούνται 80  $\mu$ L ενζυμικού διαλύματος λιπάσης (NaDES+lipase) εντός του plate. Στην συνέχεια, προστίθενται 20  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος (buffer). Τέλος, σε κάθε θέση εισάγονται 100  $\mu$ L υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα. Η συγκέντρωση λιπάσης που χρησιμοποιείται σε κάθε μετρούμενο δείγμα είναι 0.4 mg λιπάσης/ml μετρούμενου δείγματος, ενώ αντίστοιχα, η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα στο μετρούμενο δείγμα εντός του plate είναι 0.05 mg παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα/ml μετρούμενου δείγματος. Για κάθε NaDES αλλά και για την περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος με λιπάση, οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται τρεις φορές με στόχο την εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων. Την στιγμή που τοποθετείται το υπόστρωμα η αντίδραση ξεκινά και λαμβάνονται άμεσα οι μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων για τον χρόνο  $t = 0$  min. Ακολουθούν μετρήσεις απορρόφησης και έπειτα από διάστημα επώασης  $t = 60$  min. Στον χρόνο μεταξύ των μετρήσεων το plate επωάζεται στους 37 °C. Η μέτρηση της απορρόφησης γίνεται σε μήκος κύματος 410 nm. Κατά την πορεία της αντίδρασης τα δείγματα εμφανίζουν κίτρινη χρώση εξαιτίας της παραγωγής νιτροφαινόλης.

Από τις τρεις μετρήσεις που λαμβάνονται για κάθε περίπτωση δειγμάτων εξάγεται η μέση τιμή απορρόφησης (A) των τιμών αυτών. Κατόπιν, υπολογίζεται η διαφορά της απορρόφησης μεταξύ της χρονικής στιγμής  $t = 60$  min και  $t = 0$  min ( $A_{t=60\text{min}} - A_{t=0\text{min}}$ ). Η διαφορά της απορρόφησης του δείγματος αντιστοιχεί σε ποσότητα παραγόμενης pNP από την αντίδραση υδρόλυσης που καταλύεται από την λιπάση. Με την χρήση καμπύλης αναφοράς (απορρόφηση συναρτήσεως της συγκέντρωσης pNP) η διαφορά απορρόφησης μεταφράζεται άμεσα σε συγκέντρωση παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP).

### 2.8.2 Ενεργότητα λιπάσης σε ευτηκτογέλες

Η ενεργότητα της λιπάσης σε ευτηκτογέλες μετράται χρησιμοποιώντας την ίδια αντίδραση υδρόλυσης του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση υπολογισμού της ενεργότητας των διαλυμάτων λιπάσης σε NaDESS. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται είναι αυτό που περιγράφεται παραπάνω, δηλαδή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) συγκέντρωσης 1 mM και pH = 7. Η μεθοδολογία παρασκευής του υποστρώματος, διαλυτοποίησης της γέλης και μέτρησης της ενεργότητάς της αναπτύσσεται παρακάτω.

Κατά τις μετρήσεις χρησιμοποιούνται αντίστοιχες συγκεντρώσεις λιπάσης και υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα, με στόχο την άμεση σύγκριση μεταξύ της ενεργότητας της λιπάσης σε συστήματα ευτηκτογελών και της λιπάσης εντός των NaDESS.

- **Σύνθεση υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα για αντίδραση ευτηκτογελών**

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την μέτρηση της ενεργότητας των ευτηκτογελών συντίθεται με τον ακόλουθο τρόπο. Αρχικά, σε κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ) προστίθενται ποσότητες αραβικού κόμμι (arabic gum) και του Triton-X (τασιενεργό) με τελικές συγκεντρώσεις 2.75 mg/ml και 11 mg/ml ρυθμιστικού, αντίστοιχα.. Ακολουθεί ανάδευση για περίπου 30 min για ενσωμάτωση του αραβικού κόμμι και του Triton-X στο διάλυμα.

Παράλληλα, παρασκευάζεται διάλυμα του 4-παλμιτικού νιτροφαινυλεστέρα σε ισοπροπανόλη με συγκέντρωση 2.5 mg παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα/ml ισοπροπανόλης.

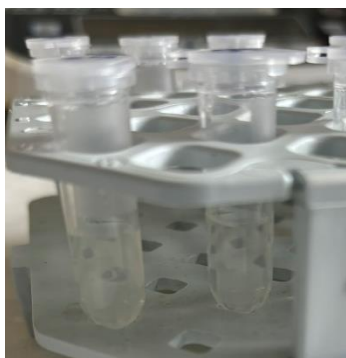
Στο τελικό στάδιο, γίνεται η προσθήκη του διαλύματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα σε ισοπροπανόλη εντός του ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει ήδη το Arabic gum και το Triton-X σε αναλογία 1:9. Το υπόστρωμα συντίθεται πριν από κάθε μέτρηση ενεργότητας, αφού εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσής του είναι ευαίσθητο σε υδρόλυση ακόμη και χωρίς παρουσία ενζύμου.

- **Μέτρηση ενεργότητας λιπάσης σε ευτηκτογέλες**

Για την μέτρηση της ενεργότητας των ευτηκτογελών, αρχικά ζυγίζεται ποσότητα 50 mg ευτηκτογέλης και τοποθετείται σε Eppendorf. Κατόπιν, προστίθενται 800  $\mu$ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και ακολουθεί ανάδευση σε vortex για την διαλυτοποίηση της ευτηκτογέλης. Στο σημείο αυτό προστίθενται 200  $\mu$ L υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα και το Eppendorf αναδεύεται ελαφρώς. Το συνολικό μετρούμενο δείγμα έχει όγκο 1 ml. Το δείγμα τοποθετείται σε κυψελίδα και μετράται η απορρόφησή του στα 410 nm για την χρονική στιγμή  $t = 0$  min, όπου το υπόστρωμα τοποθετείται στο αντιδρών σύστημα. Έπειτα, το δείγμα επώαζεται για 60 min σε θερμοκρασία 37 °C και επαναλαμβάνεται η μέτρηση της απορρόφησής του. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε

φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Jasco, V-770 UV-Vis/NIR) με την χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) ως τυφλό δείγμα (blank). Κατά την πορεία της αντίδρασης τα δείγματα εμφανίζουν κίτρινη χρώση εξαιτίας της παραγωγής νιτροφαινόλης. Για κάθε περίπτωση ευτηκτογέλης η μέτρηση ενεργότητας της λιπάσης πραγματοποιείται σε τρεις επαναλήψεις.

Δείγμα για μέτρηση  
ενεργότητας ευτηκτογέλης την  
χρονική στιγμή  $t = 0$



Δείγμα ευτηκτογέλης έπειτα  
από επώαση στους 37 °C για 60  
min



**Εικόνα 12:** Μεταβολή χρώματος εξαιτίας της αντίδρασης υδρόλυσης του παλμιτικού p-νιτροφαινολεστέρα σε δείγματα διαλυτοποιημένης ευτηκτογέλης.

Σημειώνεται ότι δημιουργείται και ένα διάλυμα που αποτελείται από 800  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος και 200  $\mu\text{L}$  υποστρώματος χωρίς παρουσία ευτηκτογέλης και κατ' επέκταση λιπάσης. Το διάλυμα αυτό μετράται την  $t = 0$ , επωάζεται όπως και τα υπόλοιπα δείγματα και επαναλαμβάνεται η μέτρησή του στην  $t = 60 \text{ min}$ . Η διαφορά απορρόφησης του δείγματος αυτού αντιστοιχεί στην αντίδραση υδρόλυσης του υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινολεστέρα που γίνεται αυθόρμητα χωρίς την παρουσία λιπάσης.

Από τις τρεις μετρήσεις που λαμβάνονται για κάθε περίπτωση δειγμάτων εξάγεται η μέση τιμή απορρόφησης ( $A$ ) των τιμών αυτών. Κατόπιν, υπολογίζεται η διαφορά της απορρόφησης μεταξύ της χρονικής στιγμής  $t = 60 \text{ min}$  και  $t = 0 \text{ min}$  ( $A_{t=60\text{min}} - A_{t=0\text{min}}$ ). Η διαφορά της απορρόφησης του δείγματος αντιστοιχεί σε ποσότητα παραγόμενης pNP από την αντίδραση υδρόλυσης που καταλύεται από την λιπάση. Από την τιμή αυτή αφαιρείται η απορρόφηση που προκύπτει από την αντίδραση του συστήματος χωρίς ένζυμο για λήψη πιο αξιόπιστων και αντιπροσωπευτικών τιμών που περιέχουν μόνο την καθαρή δράση του ενζύμου. Με την χρήση καμπύλης αναφοράς (απορρόφηση συναρτήσει της συγκέντρωσης pNP) η διαφορά απορρόφησης μεταφράζεται άμεσα σε συγκέντρωση παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP).

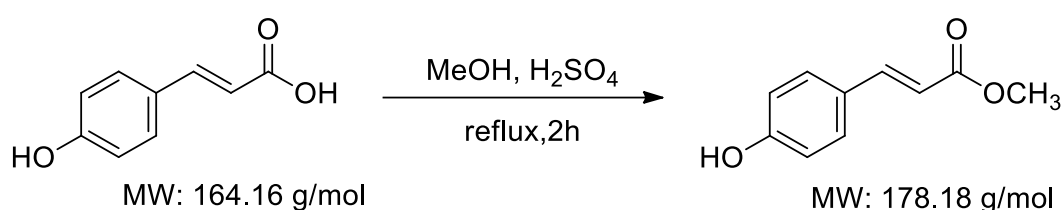
## 2.9 Διερεύνηση του πεδίου εφαρμογής των καταλυτικών συστημάτων

Το πεδίο εφαρμογής των νέων καταλυτικών συστημάτων NaDES-λιπάση διερευνήθηκε ως προς το υπόστρωμα του ενζύμου και ως προς το είδος της αντίδρασης που μπορεί να πραγματοποιηθεί. Το υπόστρωμα που επιλέχθηκε

είναι ο p-κουμαρικός μεθυλεστέρας και οι αντιδράσεις που μελετήθηκαν είναι η υδρόλυση και η μετεστεροποίηση.

### 2.9.1 Σύνθεση p-κουμαρικού μεθυλεστέρα

Στο σημείο αυτό γίνεται παρασκευή ενός εστέρα μέσω κλασικής αντίδρασης εστεροποίησης. Ο εστέρας που προκύπτει χρησιμοποιείται για την περαιτέρω υδρόλυσή του με την χρήση λιπάσης ως καταλύτη σε περιβάλλον NaDESs. Συγκεκριμένα, παράγεται ο μεθυλεστέρας του p-κουμαρικού οξέος (methyl p-coumarate) μέσω εστεροποίησης του p-κουμαρικού οξέος (p-coumaric acid) με μεθανόλη και χρήση θεικού οξέος ως καταλύτη. Η αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω.



**Εικόνα 13:** Αντίδραση εστεροποίησης για παραγωγή του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα.

Για την αντίδραση ζυγίζονται με ακρίβεια 200 mg κουμαρικού οξέος (1.218 mmol) και τοποθετούνται σε σφαιρική φιάλη των 150 ml. Κατόπιν, προστίθενται 70 ml μεθανόλης (περίσσεια) και 4-5 σταγόνες πυκνού θεικού οξέος (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ως καταλύτης. Η σφαιρική φιάλη τοποθετείται σε κάθετο ψυκτήρα υπό θέρμανση στους 65°C και ανάδευση για 2 ώρες. Η πορεία της αντίδρασης, καθώς και η καθαρότητα του τελικού προϊόντος παρακολουθούνταν με TLC και αναλογία κινητής φάσης πετρελαϊκού αιθέρα: οξικού αιθυλεστέρα (PE:EtOAc) 6:4.

Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστίθενται 200 mg όξινου ανθρακικού νατρίου (NaHCO<sub>3</sub>) στην σφαιρική φιάλη και το διάλυμα εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού μέχρι ξηρού. Το στερεό διαλύεται με νερό και εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (Et<sub>2</sub>O) τρεις φορές. Ακολούθως, η οργανική φάση ξηραίνεται με προσθήκη θεικού νατρίου (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα κενού και το στερεό που λαμβάνεται ξηραίνεται σε αντλία κενού. Το προϊόν που παραλαμβάνεται υπόκειται σε καθαρισμό με την βοήθεια χρωματογραφικής στήλης σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα και οξικού αιθυλεστέρα με αναλογία 9:1.

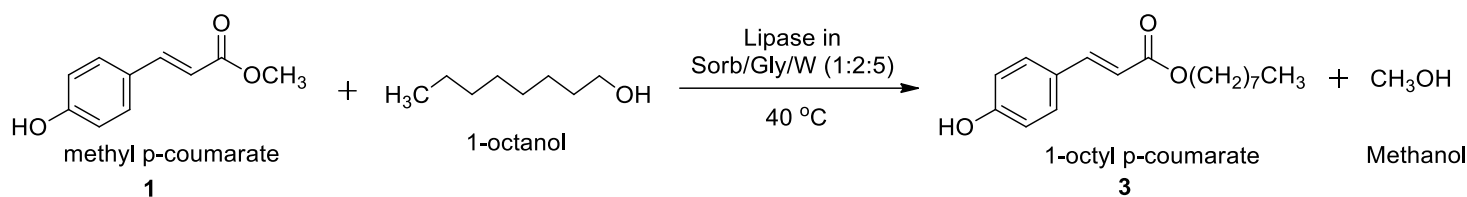
Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίστηκε 45% (96.4 mg).

### 2.9.2 Υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με λιπάση

Η αντίδραση εμπλέκει την υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον βαθέως ευτηκτικού διαλύτη (NaDES) και με χρήση της λιπάσης (lipase AS "Amano") ως καταλύτη της αντίδρασης.



παρασκευάζεται προηγουμένως (Παράγραφος 2.9.1) και για την αντίδραση επιλέγεται ως διαλύτης το NaDES Sorbitol-Glycerol-Water (1:2:5), στο οποίο η λιπάση βρέθηκε να εμφανίζει την βέλτιστη δράση της σε υδρολυτικά συστήματα. Η συνολική αντίδραση παρουσιάζεται παρακάτω.



**Εικόνα 16:** Αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με την 1-οκτανόλη καταλυόμενη από λιπάση, με χρήση NaDES ως διαλύτη, προς παραγωγή p-κουμαρικού οκτυλεστέρα

Για την αντίδραση χρησιμοποιούνται 7.1 mg (40 μmol) p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, 31.3 mg (240 μmol) 1-οκτανόλης, 1ml NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) που περιέχει 10 mg λιπάσης (lipase AS “Amano”), οπότε η συγκέντρωση της λιπάσης είναι 10 mg/mL. Τα παραπάνω συστατικά τοποθετούνται σε γυάλινο φιαλίδιο (vial) και η αντίδραση πραγματοποιείται υπό συνεχή ήπια ανάδευση και θέρμανση του συστήματος στους 40 °C.

### 2.9.5 Ποσοτικοποίηση του p-κουμαρικού οξέος και του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, καμπύλη αναφοράς σε HPLC

Για τον άμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ενώσεων p-κουμαρικό οξύ και p-κουμαρικός μεθυλεστέρας σχηματίζονται οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς μέσω HPLC. Αρχικά, συντίθενται πρότυπα διαλύματα του p-κουμαρικού οξέος και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με συγκεντρώσεις 120, 100, 80, 60, 40 ppm από κάθε ένωση. Οι ενώσεις διαλύονται σε μεθανόλη και δημιουργούνται τρία δείγματα για κάθε συγκέντρωση. Τα δείγματα αυτά αναλύονται στην HPLC με τις παρακάτω χρωματογραφικές συνθήκες:

**Αναλυτική στήλη:** αντίστροφης φάσεως C18, υδρόφοβη, 250 x 4.6 mm, 5 μm

**Σύστημα έκλουσης:** σύστημα διαλυτών σταθερής σύστασης, ισοκρατική έκλουση, νερό/μεθανόλη 60:40 για 15 min

**Ταχύτητα ροής:** 1 mL/min

**Θερμοκρασία φούρνου (LC):** 25 °C

**Ανιχνευτής:** UV/Vis (310 nm)

Η καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται χρησιμοποιείται για την μελέτη της αντίδρασης μετατροπής του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα που καταλύεται από λιπάση σε περιβάλλον διαλυτών NaDESs ή σε ρυθμιστικό διάλυμα. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιούνται με την παραλαβή δείγματος από το δοχείο αντίδρασης



σε διάφορες χρονικές στιγμές και την κατάλληλη αραίωση αυτού πριν την μέτρηση σε HPLC.

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Σύνθεση NaDESs

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε μελέτη σύνθεσης και αξιοποίησης βαθέως ευτηκτικών διαλυτών ως μέσα σταθεροποίησης της λιπάσης. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 12) παρουσιάζονται οι διαφορετικοί συνδυασμοί και η γραμμομοριακή αναλογία των συστατικών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το αν η εκάστοτε δοκιμή οδήγησε σε επιτυχημένη σύνθεση του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη.

**Πίνακας 12:** Τα συστατικά που δοκιμάστηκαν για τη σύνθεση NaDESs και οι γραμμομοριακές αναλογίες μεταξύ τους

Συστατικά NaDES	Αναλογία moles	Επιτυχημένη σύνθεση
Βεταΐνη-Γλυκερόλη-Νερό	1:2:4	NAI
Προλίνη-Γλυκερόλη-Νερό	1:2:4	NAI
Σαρκοσίνη-Γλυκερόλη-Νερό	1:2:4	NAI
Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό	1:2:5	NAI
Βεταΐνη-Σορβιτόλη-Νερό	1:1:4	NAI
Ουρία-Σορβιτόλη	1:1	OXI
	1:2	OXI
	2:1	OXI
Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη	2:1:1	OXI
Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη-Νερό	2:1:1:5	NAI
Ουρία-Σορβιτόλη- Νερό	1:1:3	NAI

Τα NaDESs που παρασκευάστηκαν επιτυχώς, είναι πλήρως διαυγή και ομοιογενή υγρά και διατηρούν την σύστασή τους σε συνθήκες περιβάλλοντος χωρίς προβλήματα κρυστάλλωσης των συστατικών τους.

Το μείγμα Ουρία-Σορβιτόλη σε οποιαδήποτε αναλογία εξετάστηκε, χωρίς την παρουσία νερού δεν σχηματίζει ομοιογενές διάλυμα καθώς παραμένει αδιάλυτη ποσότητα, ενώ έπειτα από ψύξη σε θερμοκρασία 25°C το σύστημα στερεοποιείται. Επιπλέον, κατά την σύνθεση του NaDES Ουρία-Σορβιτόλη-Γλυκερόλη (2:1:1) σχηματίζεται ομοιογενές υγρό, το οποίο κατά την ψύξη του αποκτά υψηλό ιξώδες και δεν είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί. Στις παραπάνω περιπτώσεις η παρουσία μικρής ποσότητας νερού στο σύστημα οδηγεί τελικά σε παραγωγή ενός σταθερού NaDES με βελτιωμένο ιξώδες και το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης ακόμη και σε χαμηλές θερμοκρασίες.

### 3.2 Χαρακτηρισμός NaDESs

Τα NaDES που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν ως προς τρία φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (ιξώδες, pH, πολικότητα), τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στην χρήση τους ως διαλύτες.

#### 3.2.1. Ιξώδες

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 13) παρουσιάζονται οι τιμές ιξώδους στους 25 °C για τα NaDES που συντέθηκαν επιτυχώς.

**Πίνακας 13:** Τιμές ιξώδους των NaDESs και ρυθμίσεις οργάνου (Anton Paar ViscoQC 100) κατά την μέτρηση.

NaDES	Ιξώδες (mPa·s)	Torque (%)	Ταχύτητα (rpm)
Bet/Gly/W (1:2:4)	34.68	57.8	50
Pro/Gly/W (1:2:4)	105.90	70.6	20
Sar/Gly/W (1:2:4)	33.66	56.1	50
Sorb/Gly/W (1:2:5)	191.10	63.7	10
Bet/Sorb/W (1:1:4)	391.40	52.1	4
Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	82.79	55.3	20
Ur/Sorb/W (1:1:3)	319.20	52.8	5

Το ιξώδες παίζει καθοριστικό ρόλο στην χρήση και εφαρμοσιμότητα των NaDESs μιας και επηρεάζει τα φαινόμενα μεταφοράς ενώσεων εντός των διαλυτών, την ρευστότητά τους και την γενικότερη διαχείρισή τους σε αντιδράσεις, εκχυλίσεις και εφαρμογές μεγάλης κλίμακας. Όπως προκύπτει από τον παραπάνω Πίνακα 13, όλα τα NaDESs αποτελούν από την φύση τους αρκετά ιξώδη ρευστά εξαιτίας του δικτύου δεσμών υδρογόνου που σχηματίζεται μεταξύ των συστατικών τους. Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι το νερό στους 25 °C έχει τιμή ιξώδους 0.89 mPa·s και η αιθανόλη 1.07 mPa·s. Συνεπώς, το ιξώδες των NaDESs σε θερμοκρασία περιβάλλοντος διαφέρει κατά μία με δύο τάξεις μεγέθους σε σχέση με τους περισσότερους κοινούς οργανικούς διαλύτες και το νερό, οπότε αναμένονται και αλλαγές στην συμπεριφορά μεταξύ των συστημάτων.

Στα NaDESs Bet/Gly/W (1:2:4), Pro/Gly/W (1:2:4), Sar/Gly/W (1:2:4), Sorb/Gly/W (1:2:5) η γλυκερόλη λειτουργεί ως δότης δεσμών υδρογόνου (HBD) και τα NaDES έχουν ίδιες μοριακές αναλογίες μεταξύ των συστατικών τους. Παρόλα αυτά, το ιξώδες τους διαφέρει σημαντικά εξαιτίας των διαφορετικών HBAs που χρησιμοποιούνται. Στην περίπτωση των NaDESs Bet/Gly/W και Sar/Gly/W το ιξώδες τους ( $\approx 35$  mPa·s) είναι το μικρότερο από όλα τα συστήματα διαλυτών που κατασκευάζονται. Ακολουθεί το NaDES Pro/Gly/W με τριπλάσια τιμή ιξώδους (105.9 mPa·s) και τέλος το NaDES με ακόμη μεγαλύτερο ιξώδες Sorb/Gly/W (191.1 mPa·s). Συνεπώς, η επιλογή του δέκτη δεσμών υδρογόνου επηρεάζει καθοριστικά την τιμή του ιξώδους του NaDESs, καθώς σε κάθε περίπτωση ένωσης τροποποιείται το πλήθος των σχηματιζόμενων δεσμών υδρογόνου. Γενικά, η σύνθεση ενός πυκνού δικτύου δεσμών υδρογόνου οδηγεί σε NaDESs με αυξημένο ιξώδες.

Τα δύο πιο ιξώδη NaDESs που κατασκευάζονται είναι τα Bet/Sorb/W (1:1:4) και U/Sorb/W (1:1:3) με τιμές ιξώδους 391.4 mPa·s και 319.2 mPa·s αντίστοιχα. Συνεπώς, προκύπτει ότι η σορβιτόλη ως δότης δεσμών υδρογόνου (HBD) σχηματίζει πολύ ιξώδη NaDESs ακόμα και με την παρουσία νερού στο σύστημα. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στα έξι υδροξύλια που περιέχει η σορβιτόλη τα οποία συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και συνθέτουν πυκνό δίκτυο που περιορίζει την κινητικότητα των μορίων, σε αντίθεση με την γλυκερόλη (HBD) όπου έχει τρία υδροξύλια στο μόριό της με αποτέλεσμα να σχηματίζει λιγότερους δεσμούς υδρογόνου άρα και ένα λιγότερο ιξώδες NaDES.

Μια βελτιωμένη εκδοχή με μειωμένο ιξώδες (82.79 mPa·s) αποτελεί το NaDES Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5). Σε σύγκριση με το Ur/Sorb/W (1:1:3) εμπεριέχει ως επιπλέον συστατικό την γλυκερόλη (HBD) που είναι ένας λιγότερο ισχυρός δότης δεσμών υδρογόνου έναντι της σορβιτόλης με αποτέλεσμα την μείωση του ιξώδους. Αναφέρεται ότι τα NaDESs με ιξώδες μέχρι 100 mPa·s είναι σχετικά εύκολα διαχειρίσιμα ως διαλύτες για εκχυλίσματα, διαλυτοποίηση και αποθήκευση ενώσεων. Σε πολύ ιξώδη συστήματα η διαλυτοποίηση ενώσεων είναι σαφώς πιο δύσκολη και απαιτεί ανάδευση για μεγάλο χρονικό διάστημα ή υποβοήθηση μέσω ήπιας θέρμανσης, ενώ υπάρχει κίνδυνος παρεμπόδισης της μεταφοράς μάζας σε περίπτωση που εμπλέκεται χημική αντίδραση.

### 3.2.2 pH

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 14) παρουσιάζονται οι τιμές pH για τα NaDES που συντέθηκαν επιτυχώς.

**Πίνακας 14:** Μετρούμενες τιμές pH των NaDESs και θερμοκρασία κατά την μέτρηση.

NaDES	pH	T (°C)
Bet/Gly/W (1:2:4)	7.66	24.3
Pro/Gly/W (1:2:4)	6.63	24.5
Sar/Gly/W (1:2:4)	6.48	24.8
Sorb/Gly/W (1:2:5)	4.25	24.9
Bet/Sorb/W (1:1:4)	7.79	22.0
Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	6.29	22.0
Ur/Sorb/W (1:1:3)	6.84	22.0

Το pH αποτελεί μια καθοριστική ιδιότητα των NaDESs, καθώς επηρεάζει τις εφαρμογές τους ως διαλύτες σε εκχυλίσματα, στην διαλυτοποίηση ενώσεων, ενώ είναι πολύ σημαντικό και για συστήματα που εμπλέκουν χημικές ή βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των δεκτών και δοτών δεσμών υδρογόνου επηρεάζουν και διαμορφώνουν το pH του NaDES. Όλα τα NaDESs που συντίθενται έχουν pH που κυμαίνεται από 6 έως 8. Το εύρος αυτό είναι συμβατό με το βέλτιστο εύρος pH για την δράση της λιπάσης που χρησιμοποιείται στην συνέχεια. Επίσης, η τιμή του pH καθορίζει έως ένα

βαθμό και την ακινητοποίηση της λιπάσης στις ευτηκτογέλες λόγω ύπαρξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.

Εξαιρέση αποτελεί το NaDES Sorb/Gly/W, το οποίο εμφανίζει αρκετά όξινο pH 4.25, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στην σύνθεση πυκνού δικτύου με πολλούς δεσμούς υδρογόνου και τον όξινο χαρακτήρα της σορβιτόλης. Ακόμη, τα NaDESs Pro/Gly/W (1:2:4), Sar/Gly/W (1:2:4) έχουν χαμηλότερο pH, λόγω ύπαρξης καρβοξυλικών ομάδων στην δομή τους οι οποίες προσδίδουν όξινο χαρακτήρα.

### 3.2.3 Πολικότητα

Οι τιμές πολικότητας μετρούνται με την χρήση διαλύματος του δείκτη Nile Red και μέτρηση του  $\lambda_{\max}$  σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis που μεταφράζεται μέσω της εξίσωσης ( $E_{NR} = \frac{28591}{\lambda_{\max}}$ ) σε ενέργεια μοριακής μετάβασης ( $E_{NR}$ ). Η μέθοδος μέτρησης με τον δείκτη Nile red είναι ευρέως διαδεδομένη για τον υπολογισμό της πολικότητας των NaDESs.<sup>69</sup> Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον ακόλουθο Πίνακα 15.

**Πίνακας 15:** Μετρούμενες τιμές πολικότητας των NaDESs.

NaDES	$\lambda_{\max}$ (nm)	$E_{NR}$ (kcal/mol)
Bet/Gly/W (1:2:4)	575	49.72
Pro/Gly/W (1:2:4)	576	49.64
Sar/Gly/W (1:2:4)	580	49.29
Sorb/Gly/W (1:2:5)	585	48.87
Bet/Sorb/W (1:1:4)	596	47.97
Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	592	48.29
Ur/Sorb/W (1:1:3)	594	48.13
Αιθανόλη	548	52.17
Νερό	593	48.20

Η πολικότητα είναι μια βασική παράμετρος για τις χημικές αντιδράσεις σε διαλύτες NaDESs, καθορίζει την απόδοση, την εκλεκτικότητα και την ταχύτητα της αντίδρασης. Επίσης, εμπλέκεται στην διαλυτότητα των ουσιών εντός των NaDESs.<sup>70</sup> Τα NaDESs με την μεγαλύτερη πολικότητα μετατοπίζουν το  $\lambda_{\max}$  σε μεγαλύτερες τιμές και συνεπώς έχουν μικρότερη τιμή ενέργειας μοριακής μετάβασης ( $E_{NR}$ ). Στην γενική περίπτωση, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου σε ένα NaDES, τόσο μεγαλύτερη αναμένεται να είναι και η πολικότητά του. Η θεώρηση ισχύει στην περίπτωση του NaDES Bet/Sorb/W (1:1:4), το οποίο εμφανίζει την μεγαλύτερη πολικότητα (μικρότερη τιμή  $E_{NR}=47.97$  kcal/mol) και σχηματίζει πυκνό δίκτυο δεσμών υδρογόνου στην δομή του μιας και η σορβιτόλη αποτελείται από πληθώρα υδροξυλίων που συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου.

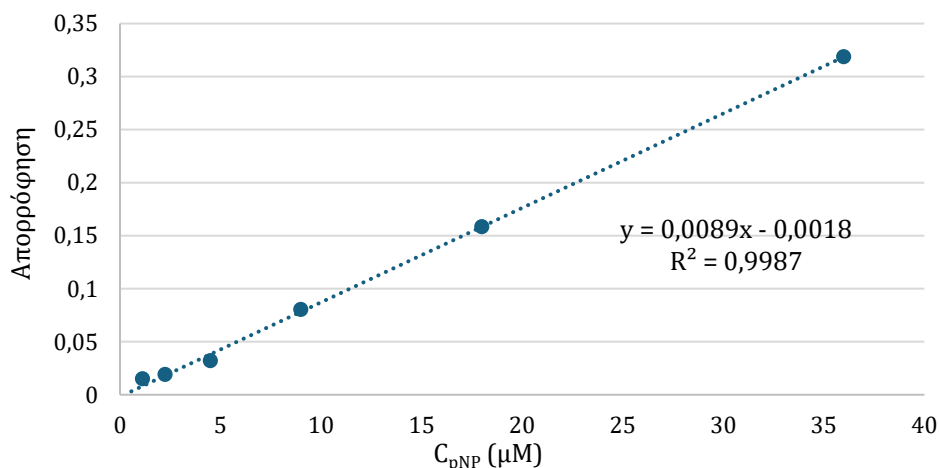
Επιπλέον, παρατηρείται ότι τα NaDESs Bet/Gly/W, Pro/Gly/W, Sar/Gly/W, Sorb/Gly/W περιέχουν την γλυκερόλη ως δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) και αποτελούν τις περιπτώσεις με την μικρότερη πολικότητα, εξαιτίας των λιγότερων δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται σε αυτά τα NaDESs. Σαφέστατα υπάρχει επίδραση και από τους δέκτες δεσμών υδρογόνου (HBA) μιας και υπάρχει μια μικρή διαφοροποίηση μεταξύ της χρήσης διαφορετικών ενώσεων όπως βεταΐνη, προλίνη και σαρκοσίνη. Συνεπώς, τα επιμέρους συστατικά των NaDESs και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (κυρίως οι δεσμοί υδρογόνου) καθορίζουν την πολικότητα του διαλύτη.

Για λόγους σύγκρισης αναφέρεται ότι το νερό εμφανίζει  $\lambda_{\max} = 593$  και συνεπώς  $E_{NR} = 48.2$  kcal/mol, ενώ η αιθανόλη εμφανίζει  $\lambda_{\max} = 548$  και συνεπώς  $E_{NR} = 52.17$  kcal/mol. Συνεπώς, τα NaDESs που χρησιμοποιούνται είναι πιο πολικά από την αιθανόλη, αφού εμφανίζουν  $E_{NR}$  μικρότερα από της αιθανόλης. Ως προς το νερό τα NaDESs είναι λιγότερο πολικά μιας και έχουν  $E_{NR} > 48.2$  kcal/mol, εκτός από τις περιπτώσεις Bet-Sorb-W (1:1:4) και Ur-Sorb-W (1:1:3) όπου η πολικότητά τους είναι λίγο μεγαλύτερη από του νερού.

### 3.3 Μελέτη ενεργότητας λιπάσης σε NaDESs

- **Καμπύλη αναφοράς παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP)**

Η διαδικασία μέτρησης της συγκέντρωσης της παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP) εξαιτίας της ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα περιγράφεται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Για την μετατροπή της διαφοράς απορρόφησης ( $A_{t=60\text{min}} - A_{t=0\text{min}}$ ) που μετράται σε UV-Vis στα 410 nm, στην αντίστοιχη συγκέντρωση νιτροφαινόλης κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς κατασκευάζοντας πρότυπα διαλύματα νιτροφαινόλης (pNP) συγκεντρώσεων από 36  $\mu\text{M}$  έως 0.56  $\mu\text{M}$  με διαδοχικές αραιώσεις με αιθανόλη τα οποία μετρούνται σε UV-Vis. Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει είναι:  $A = 0.0089 \cdot C_{\text{pNP}} - 0.0018 \Rightarrow C_{\text{pNP}} = \frac{A+0.0018}{0.0089}$ , όπου A η διαφορά της απορρόφησης ( $A_{t=60\text{min}} - A_{t=0\text{min}}$ ) των δειγμάτων και  $C_{\text{pNP}}$  [ $\mu\text{M}$ ] η συγκέντρωση της παραγόμενης νιτροφαινόλης. Το αντίστοιχο διάγραμμα φαίνεται παρακάτω.



**Σχήμα 3:** Καμπύλη αναφοράς παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP), απορρόφηση (A) συναρτήσει της συγκέντρωσης της pNP (μM)

- **Αποτελέσματα ενεργότητας λιπάσης σε NaDESs**

Η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης που παράγεται κατά την αντίδραση σχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα της λιπάσης εντός των NaDESs, μιας και η αντίδραση είναι ενζυμικά καταλυόμενη. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης/παραμονής της λιπάσης σε NaDESs και έτσι κατασκευάζονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης νιτροφαινόλης (pNP) που παράγεται σε 60 min αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Το πείραμα πραγματοποιείται σε τρεις θερμοκρασίες αποθήκευσης των ενζυμικών διαλυμάτων (4, 25, 50 °C) για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των συστημάτων σε διαφορετικές συνθήκες και την αντίστοιχη συγκριτική αποτίμησή τους. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα ακόλουθα διαγράμματα που περιλαμβάνουν το σύνολο των μετρούμενων NaDESs για κάθε μία από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης των συστημάτων NaDES με λιπάση. Συμπεριλαμβάνονται και οι αντίστοιχοι πίνακες με τα δεδομένα συγκέντρωσης της παραγόμενης pNP συναρτήσει του χρόνου παραμονής της λιπάσης εντός των NaDESs.

Σημειώνεται ότι κατά την μέτρηση της ενεργότητας της λιπάσης στα NaDESs Bet/Gly/W, Sarc/Gly/W και Bet/Sorb/W παρατηρήθηκε δημιουργία ιζήματος, καθιστώντας την μέτρηση αδύνατη και επομένως τα δεδομένα αυτά δεν έχουν συμπεριληφθεί στα αποτελέσματα.

- **Αποθήκευση λιπάσης σε NaDESs στους 4 °C**

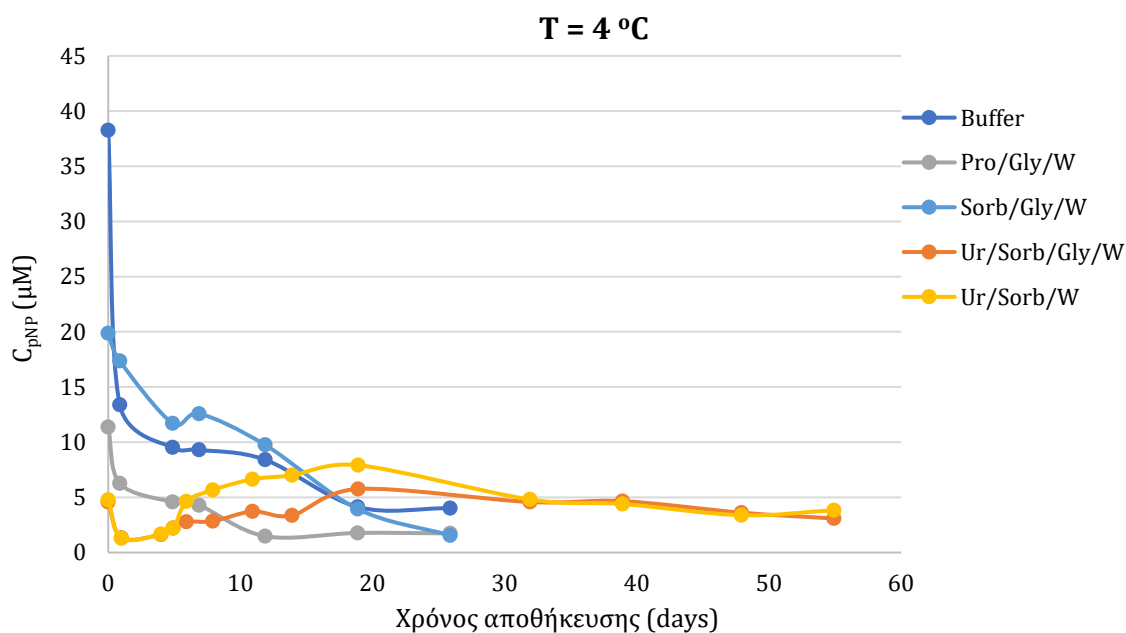
Ακολουθούν τα αποτελέσματα που αφορούν τα συστήματα λιπάσης σε NaDESs που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4 °C.

**Πίνακας 16:** Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 4 °C.

Θερμοκρασία αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs - **T = 4 °C**

t (days)	Ρυθμιστικό διάλυμα (pH=7)	Pro/Gly/W (1:2:4)	Sorb/Gly/W (1:2:5)	t (days)	Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	Ur/Sorb/W (1:1:3)
0	38,25	11,36	19,87	0	4,58	4,77
1	13,39	6,27	17,36	1	1,33	1,29
5	9,53	4,58	11,70	4	1,63	1,66
7	9,30	4,28	12,58	5	2,22	2,19
12	8,40	1,48	9,75	6	2,79	4,62
19	4,13	1,78	3,95	8	2,84	5,67
26	4,02	1,74	1,55	11	3,72	6,64
				14	3,37	7,00
				19	5,76	7,92
				32	4,58	4,81
				39	4,66	4,40
				48	3,61	3,39
				55	3,09	3,84

Το διάγραμμα συγκέντρωσης της pNP συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης σε θερμοκρασία 4°C παρουσιάζεται παρακάτω.



**Σχήμα 4:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 4°C.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 4 προκύπτει η πορεία της ενεργότητας της λιπάσης εντός των NaDESs και του ρυθμιστικού διαλύματος με διατήρηση του συστήματος στους 4°C. Όσον αφορά την αρχική ενεργότητα, δηλαδή χρόνος αποθήκευσης  $t=0$ , παρατηρείται η μέγιστη παραγωγή pNP, η οποία επιτυγχάνεται εντός του ρυθμιστικού διαλύματος. Παρόλα αυτά, σημειώνεται ότι το ρυθμιστικό διάλυμα υποβαθμίζει την ενεργότητα της λιπάσης κατά 65% σε μόλις 1 - 2 ημέρες παραμονής της σε αυτό. Κατόπιν, η μείωση της ενεργότητας της λιπάσης εντός του ρυθμιστικού διαλύματος συνεχίζεται με μειούμενο ρυθμό,



ενώ η τιμή της ενεργότητας στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι μικρότερη από τις αντίστοιχες ενεργότητες της λιπάσης εντός των περισσότερων NaDESs για χρόνους αποθήκευσης άνω των 15 ημερών. Μάλιστα, μετά το πέρας 15 περίπου ημερών, η λιπάση σε ρυθμιστικό διάλυμα είναι ικανή να παράγει μόλις το 20% της ποσότητας της pNP σε σχέση με τον χρόνο  $t=0$ .

Όσον αφορά τα NaDESs κατά τους αρχικούς χρόνους, ο διαλύτης Sorb/Gly/W δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα ενεργότητας της λιπάσης μέχρι τις 15 ημέρες, που είναι αρκετά κοντινά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Η ενεργότητα της λιπάσης εντός του συστήματος Sorb/Gly/W παρουσιάζει σχετικά σταθερό ρυθμό μείωσης μέχρι τις 25 ημέρες όπου η δράση της λιπάσης είναι μικρότερη από την αντίστοιχη του ρυθμιστικού. Το NaDESs Pro/Gly/W έχει εξ' αρχής μειωμένη ικανότητα παραγωγής pNP, οπότε η λιπάση δεν δρα αποτελεσματικά στο περιβάλλον του, όμως παρατηρείται ότι μετά τις 10 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα τείνει σε μια μικρή τιμή, η οποία όμως διατηρείται σταθερή μέχρι το πέρας των μετρήσεων.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, εμφανίζουν τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W τα οποία έχουν την μικρότερη αρχική ενεργότητα έναντι όλων των μελετούμενων NaDESs, παράγοντας μόλις 5  $\mu\text{M}$  pNP στον χρόνο αποθήκευσης  $t=0$ . Από τις 5 ημέρες και έπειτα η ενεργότητα της λιπάσης, εντός των NaDESs αυτών, αποκαθίσταται στα αρχικά επίπεδα και το σύστημα διατηρεί την λιπάση ενεργή ακόμη και μετά το πέρας 55 ημερών αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDES. Η παρατηρούμενη πτώση της ενεργότητας για τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W είναι της τάξης του 30% στις 55 ημέρες. Συνεπώς, τα NaDESs που περιέχουν ουρία σε συνδυασμό με σορβιτόλη, παρόλο που η ενεργότητα της λιπάσης στο περιβάλλον τους δεν είναι η βέλτιστη συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα και τα υπόλοιπα NaDESs, προσφέρουν μεγάλη σταθερότητα στην λιπάση και δεν επηρεάζουν την ενεργότητα της για μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης. Μεταξύ των δύο NaDESs, το Ur/Sorb/W έχει μεγαλύτερη ενεργότητα στις πρώτες 30 ημέρες σε σχέση με το Ur/Sorb/Gly/W, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους αποθήκευσης οι ενεργότητες πρακτικά εξισώνονται. Γενικότερα, ένα τέτοιο σύστημα είναι κατάλληλο για εφαρμογές όπου απαιτείται μεγάλη διατηρησιμότητα του ενζύμου και δεν είναι αναγκαία η υψηλή ενεργότητα στους αρχικούς χρόνους αποθήκευσης για άμεση παραγωγή κάποιου επιθυμητού προϊόντος.

- **Αποθήκευση λιπάσης σε NaDESs στους 25 °C**

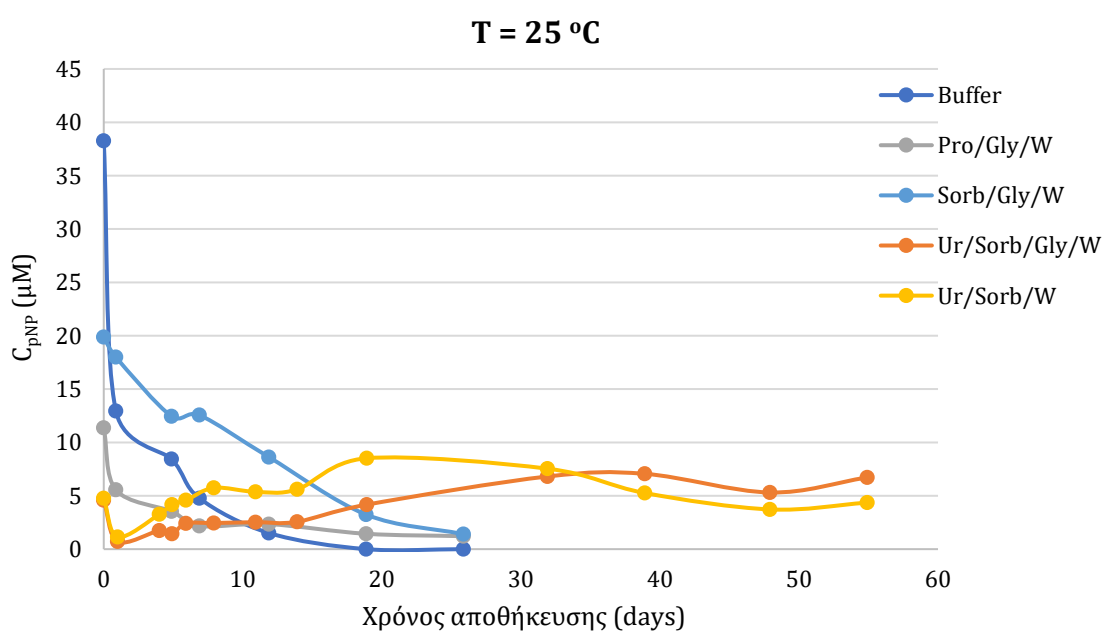
Ακολουθούν τα αποτελέσματα που αφορούν τα συστήματα λιπάσης σε NaDESs που αποθηκεύονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25 °C.

**Πίνακας 17:** Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 25 °C.

Θερμοκρασία αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs -  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$

t (days)	Ρυθμιστικό διάλυμα (pH=7)	Pro/Gly/W (1:2:4)	Sorb/Gly/W (1:2:5)	t (days)	Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	Ur/Sorb/W (1:1:3)
0	38,25	11,36	19,87	0	4,58	4,77

1	12,94	5,56	17,99	1	0,71	1,14
5	8,44	3,54	12,45	4	1,74	3,27
7	4,77	2,17	12,56	5	1,44	4,17
12	1,51	2,34	8,63	6	2,41	4,58
19	0,00	1,44	3,24	8	2,45	5,75
26	0,00	1,21	1,40	11	2,52	5,37
				14	2,56	5,60
				19	4,17	8,52
				32	6,81	7,54
				39	7,06	5,26
				48	5,31	3,72
				55	6,72	4,36



**Σχήμα 5:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 25°C.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 5, στην περίπτωση των δειγμάτων που αποθηκεύονται στους 25 °C παρατηρείται ότι το ρυθμιστικό διάλυμα ακολουθεί παρόμοια πορεία με την περίπτωση των 4 °C, δηλαδή κατά την αρχική αποθήκευση η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται με ραγδαίο ρυθμό αφού σε 1 ημέρα η παραγωγή pNP μειώνεται κατά 65%. Στην συνέχεια, η ενεργότητα εντός του ρυθμιστικού διαλύματος μειώνεται σταδιακά μέχρι περίπου τις 15 ημέρες αποθήκευσης όπου η ενεργότητα έχει μηδενιστεί και το ένζυμο έχει απενεργοποιηθεί πλήρως. Συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα στους 4 °C το οποίο στις 26 ημέρες παρουσιάζει το 5% της αρχικής ενεργότητας της λιπάσης, συμπεραίνεται ότι η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει αρνητικά τον χρόνο και την αποτελεσματικότητα αποθήκευσης του ενζύμου.

Η περίπτωση του διαλύτη NaDES Sorb/Gly/W δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα ενεργότητας της λιπάσης μέχρι τις 16 ημέρες αποθήκευσης, ενώ η ενεργότητα είναι μεγαλύτερη και από την αντίστοιχη του ρυθμιστικού διαλύματος καθόλη

την διάρκεια των μετρήσεων μετά την 1<sup>η</sup> ημέρα. Η υποβάθμιση της λιπάσης εντός του συστήματος Sorb/Gly/W ακολουθεί σχεδόν γραμμική πορεία μέχρι τις 26 ημέρες όπου η δράση της λιπάσης είναι ελάχιστη (7% της αρχικής τιμής ενεργότητας). Το NaDES Pro/Gly/W έχει μικρότερη ικανότητα παραγωγής pNP και η λιπάση δεν έχει μεγάλη ενεργότητα εντός αυτού συγκριτικά με το NaDES Sorb/Gly/W. Όμως, παρατηρείται ότι μετά τις 15 ημέρες αποθήκευσης λιπάσης σε Pro/Gly/W η ενεργότητά τείνει σε μια τιμή παραγόμενης pNP, η οποία διατηρείται σταθερή μέχρι το πέρας των μετρήσεων. Στις 26 ημέρες η ενεργότητα εντός των NaDESs Sorb/Gly/W και Pro/Gly/W είναι σχεδόν ίδια, αλλά η τιμή της είναι πολύ μικρή (5-10% της αρχικής).

Όσον αφορά τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W τα οποία έχουν την μικρότερη αρχική ενεργότητα έναντι όλων των μελετούμενων NaDESs, παράγοντας μόλις 5  $\mu$ M pNP στον χρόνο αποθήκευσης  $t=0$ . Κατόπιν, ακολουθεί ένα διάστημα των 3 πρώτων ημερών που η ενεργότητά τους μειώνεται σε σχέση με την αρχική, χρονικό διάστημα που πιθανότατα αποτελεί τον χρόνο προσαρμογής του ενζύμου στο σύστημα του NaDES. Από τις 5 ημέρες, η ενεργότητα της λιπάσης, εντός των NaDESs αυτών, αποκαθίσταται στα αρχικά επίπεδα ή και λίγο αυξημένη. Έπειτα, μεταξύ της 15<sup>ης</sup> και της 30<sup>ης</sup> ημέρας αποθήκευσης η ενεργότητα έχει αυξητική τάση, ιδιαίτερα στην περίπτωση του διαλύτη Ur/Sorb/W. Στην συνέχεια, το σύστημα διατηρεί την λιπάση ενεργή, με σχετικά σταθερή τιμή ενεργότητας κοντά στην αρχική τιμή, ακόμη και μετά από 55 ημέρες αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDES. Η παρατηρούμενη πτώση της ενεργότητας για τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W είναι αμελητέα στις 55 ημέρες αποθήκευσης της λιπάσης. Σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης το σύστημα Ur/Sorb/Gly/W φαίνεται να διατηρεί καλύτερα την λιπάση και την ενεργότητά της σε θερμοκρασία 25°C, έναντι της περίπτωσης αποθήκευσης των 4°C όπου η ενεργότητα στα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W είναι παρόμοια.

Συνεπώς, τα NaDESs που περιέχουν ουρία σε συνδυασμό με σορβιτόλη, παρόλο που η ενεργότητα της λιπάσης στο περιβάλλον τους δεν είναι η βέλτιστη συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα και τα υπόλοιπα NaDESs, προσφέρουν μεγάλη σταθερότητα στην λιπάση. Μεταξύ των δύο NaDESs το Ur/Sorb/W έχει μεγαλύτερη ενεργότητα στις πρώτες 35 ημέρες σε σχέση με το Ur/Sorb/Gly/W, συμπεριφορά που αντιστρέφεται σε μεγαλύτερους χρόνους αποθήκευσης με το NaDES Ur/Sorb/Gly/W να είναι η καλύτερη επιλογή σε χρόνο άνω των 35 ημερών. Και οι δύο επιλογές είναι εξαιρετικές σε σύγκριση με τα υπόλοιπα NaDESs όπου η ενεργότητα της λιπάσης στο εσωτερικό τους διατηρείται για τον υποδιπλάσιο χρόνο. Γενικότερα, ένα τέτοιο σύστημα είναι κατάλληλο για εφαρμογές όπου απαιτείται μεγάλη διατηρησιμότητα του ενζύμου και δεν είναι αναγκαία η υψηλή ενεργότητα στους αρχικούς χρόνους αποθήκευσης.

- **Αποθήκευση λιπάσης σε NaDESs στους 50 °C**

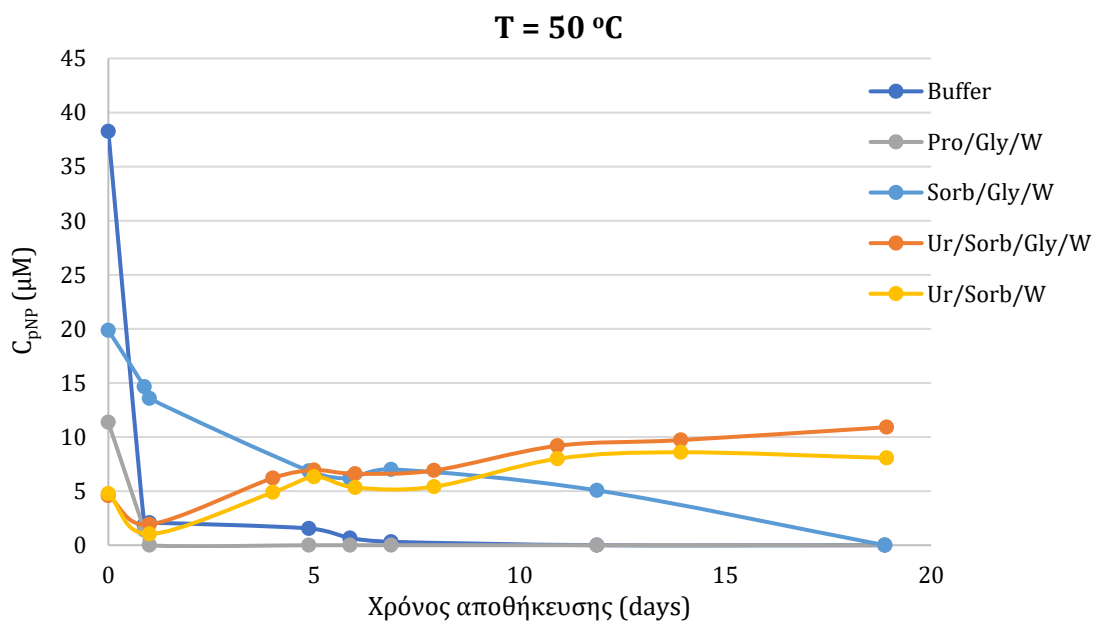
Ακολουθούν τα αποτελέσματα που αφορούν την περίπτωση αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 50 °C.

**Πίνακας 18:** Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε NaDESs σε θερμοκρασία 50 °C.

Θερμοκρασία αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs - T = 50 °C						
t (days)	Ρυθμιστικό διάλυμα (pH=7)	Pro/Gly/W (1:2:4)	Sorb/Gly/W (1:2:5)	t (days)	Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	Ur/Sorb/W (1:1:3)
0	38,25	11,36	19,87	0	4,58	4,77
0,9	1,87	1,40	14,66	1	1,93	1,04
1	2,07	0,00	13,57	4	6,21	4,88
5	1,55	0,00	6,87	5	6,94	6,33
6	0,65	0,00	6,19	6	6,61	5,33
7	0,31	0,00	7,01	8	6,91	5,41
12	0,00	0,00	5,07	11	9,19	7,99
19	0,00	0,00	0,00	14	9,72	8,59
				19	10,91	8,07

Στα NaDESs και το δείγμα του ρυθμιστικού διαλύματος η χρονική εξέλιξη της ενεργότητας είναι γενικά φθίνουσα με μικρές διακυμάνσεις σε μερικά πειραματικά σημεία. Στις περιπτώσεις που προκύπτουν μηδενικές τιμές συγκέντρωσης παραγόμενης pNP θεωρείται ότι η αντίδραση δεν έχει προχωρήσει και η καταλυτική δράση της λιπάσης είναι μηδενική, οπότε το ένζυμο είναι απενεργοποιημένο. Μια ακόμη παρατήρηση αφορά το NaDES Pro/Gly/W στο οποίο η συγκέντρωσή της παραγόμενης pNP μηδενίζεται έπειτα από 1 ημέρα αποθήκευσης.

Οι μετρήσεις για την λιπάση εντός των NaDESs στους 50 °C σταματούν στις 19 ημέρες αποθήκευσης, μιας και στις περιπτώσεις του ρυθμιστικού διαλύματος και των διαλυτών Pro/Gly/W και Sorb/Gly/W η ενεργότητα της λιπάσης έχει μηδενιστεί σε αυτό τον χρόνο. Για τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W η λιπάση είναι ενεργή στις 19 ημέρες αποθήκευσης, παρόλα αυτά σε χρόνους μέτρησης άνω των 19 ημερών το σύστημα της λιπάσης σε NaDESs παρουσιάζει ένα ελαφρύ θόλωμα που επηρεάζει την ακρίβεια των μετρήσεων δίνοντας αρκετά υψηλές τιμές ενεργότητας. Συνεπώς, επιλέγεται να μην διατηρηθούν οι τιμές μετρούμενης ενεργότητας για χρόνους μεγαλύτερους από 19 ημέρες. Ακόμη, η επανάληψη του πειράματος αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs στους 50°C δίνει παρόμοια αποτελέσματα, οπότε οι μετρήσεις είναι επαναλήψιμες και αξιόπιστες. Το διάγραμμα συγκέντρωσης της pNP συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης σε θερμοκρασία 50°C παρουσιάζεται παρακάτω.



**Σχήμα 6:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων NaDESs σε θερμοκρασία 50°C.

Από το Σχήμα 6 παρατηρείται ότι το ρυθμιστικό διάλυμα ακολουθεί παρόμοια πορεία με τις περιπτώσεις αποθήκευσης σε μικρότερες θερμοκρασίες. Η διαφορά στους 50°C έγκειται στο γεγονός ότι η ενεργότητα της λιπάσης εντός του ρυθμιστικού διαλύματος μειώνεται με πολύ μεγαλύτερο ρυθμό, αφού έπειτα από μια ημέρα αποθήκευσης της λιπάσης η ενεργότητά της μειώνεται κατά 95%. Κατόπιν, η ελάχιστη αυτή ενεργότητα διατηρείται μέχρι τις 10 ημέρες παραμονής και στην πορεία η λιπάση απενεργοποιείται αφού δεν παράγεται ποσότητα pNP κατά την αντίδραση. Συνεπώς, σε υψηλές θερμοκρασίες το ρυθμιστικό διάλυμα είναι ακατάλληλο για διατήρηση λιπάσης και η χρήση του ως φορέας του ενζύμου δεν είναι βιώσιμη.

Μελετώντας την καμπύλη του NaDES Sorb/Gly/W, στους αρχικούς χρόνους μέχρι 5 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα της λιπάσης είναι η μεγαλύτερη συγκριτικά με τα υπόλοιπα NaDESs. Σε μεγαλύτερους χρόνους ακολουθεί μια σταθερή φθίνουσα πορεία και στις 19 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα της λιπάσης έχει μηδενιστεί. Άρα, το βέλτιστο εύρος χρήσης για το σύστημα Sorb/Gly/W με λιπάση είναι από την στιγμή σύνθεσής του μέχρι και την 7<sup>η</sup> ημέρα παραμονής του ενζύμου σε αυτό, καθώς σε μεγαλύτερους χρόνους υπάρχουν συστήματα NaDESs για καλύτερη διατήρηση της λιπάσης. Όσον αφορά το NaDES Pro/Gly/W η αποθήκευση της λιπάσης στο περιβάλλον του σε υψηλές θερμοκρασίες είναι ανεπιτυχής, αφού σε 24 h το ένζυμο δεν εμφανίζει ενεργότητα και η γενικότερη τάση του είναι υποδεέστερη ακόμη και από την περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος.

Τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W έχουν παρόμοια εξέλιξη όσον αφορά την συγκέντρωση της pNP. Κατά την πρώτη ημέρα η ενεργότητά του ενζύμου μειώνεται σημαντικά, όμως επανέρχεται στα αρχικά επίπεδα έπειτα από 4 ημέρες παραμονής της λιπάσης στα NaDESs. Η εξήγηση της αρχικής μείωσης της

ενεργότητας βασίζεται στην ύπαρξη ενός αρχικού χρονικού διαστήματος προσαρμογής του ενζύμου εντός των διαλυτών. Στην συνέχεια, από τις 5 μέχρι και τις 12 ημέρες η ενεργότητα εμφανίζει αυξητική τάση και καταλήγει σχεδόν να διπλασιαστεί σε σχέση με την τιμή της στον χρόνο  $t=0$ . Στο σημείο αυτό το σύστημα φαίνεται να σταθεροποιείται και μέχρι τις 19 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα διατηρείται σταθερή και σε υψηλά επίπεδα. Συγκρίνοντας τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W μεταξύ τους, στους 50 °C το σύστημα Ur/Sorb/Gly/W δίνει μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενης pNP άρα και μεγαλύτερη δραστικότητα της λιπάσης σε όλους τους χρόνους μέτρησης. Παρόλα αυτά η διαφορά μεταξύ τους είναι της τάξης του 20%.

Συνολικά, συμπεραίνεται ότι τα NaDESs που περιέχουν ουρία διατηρούν σταθερή την ενεργότητα της αποθηκευμένης σε αυτά λιπάσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, έναντι των άλλων βαθέως ευτηκτικών διαλυτών. Ωστόσο, για συστήματα που απαιτείται η βέλτιστη ενεργότητα του ενζύμου και μικρότεροι χρόνοι αποθήκευσης του ενζύμου στους διαλύτες, η επιλογή του NaDESs Sorb/Gly/W είναι προτιμότερη, μιας και ενισχύει σημαντικά την ενεργότητα και κατ' επέκταση την παραγωγή προϊόντος από την αντίδραση.

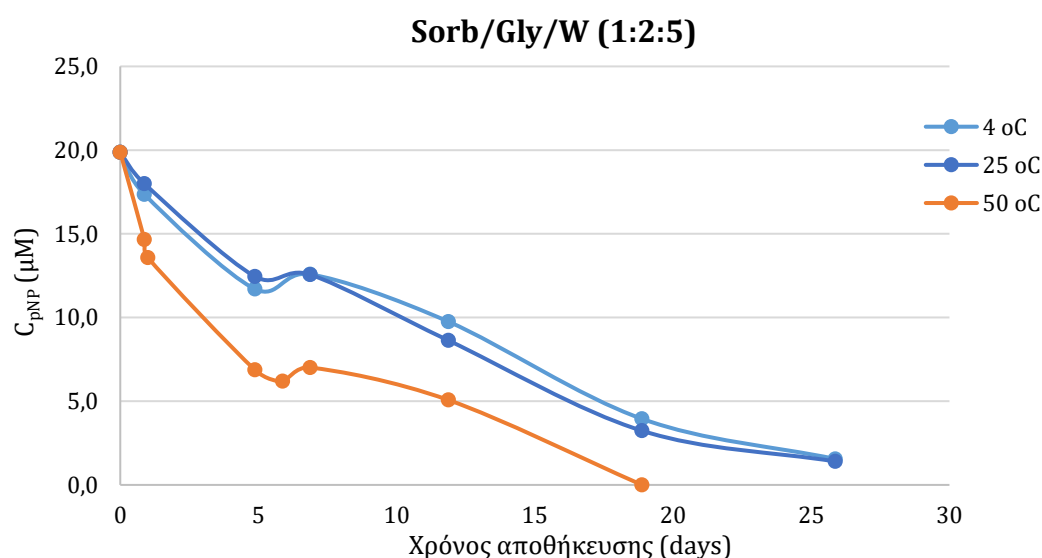
- **Σύγκριση αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs σε διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25, 50 °C**

Από την ανάλυση των παραπάνω διαγραμμάτων (Σχήματα 4-6) συνοψίζονται τα ακόλουθα αποτελέσματα. Η μέγιστη ενεργότητα της λιπάσης επιτυγχάνεται στο NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5). Οι μέγιστοι χρόνοι αποθήκευσης εντός του συστήματος Sorb/Gly/W, όπου διατηρείται η καλύτερη ενεργότητα έναντι των υπόλοιπων NaDESs, είναι οι 15 ημέρες για θερμοκρασίες 4°C και 25°C και οι 5 ημέρες παραμονής για την θερμοκρασία των 50°C. Άρα, το NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) προσδίδει μεγάλες τιμές ενεργότητας, όμως προϋποθέτει την άμεση εκμετάλλευσή της κατά τις πρώτες ημέρες παραμονής της λιπάσης στο σύστημα, εξαιτίας της σταδιακής μείωσής της με αποτέλεσμα από έναν χρόνο αποθήκευσης και έπειτα η χρήση να είναι μη αποδοτική.

Αντίθετα, τα NaDESs Ur/Sorb/Gly/W και Ur/Sorb/W είναι ιδιαίτερα σταθερά συστήματα όσον αφορά την διατήρηση της ενεργότητας της λιπάσης. Κατορθώνουν την προστασία της λιπάσης ακόμη και για 55 ημέρες αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4, 25°C με ελάχιστη μείωση της ενεργότητας σε σχέση με τις αρχικές τιμές. Ακόμη, δεν επηρεάζονται από την μεταβολή της θερμοκρασίας, μιας και η ενεργότητα είναι σταθερή σε όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες αποθήκευσης. Μεταξύ των δύο NaDESs, το Ur/Sorb/Gly/W υπερέχει σε μικρό βαθμό, διότι παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα της λιπάσης στις υψηλές θερμοκρασίες και για μεγάλους χρόνους αποθήκευσης, ενώ παρουσιάζει και αρκετά χαμηλότερο ιξώδες γεγονός που διευκολύνει την χρήση του. Οπότε, το NaDES Ur/Sorb/Gly/W είναι η καλύτερη επιλογή για διατήρηση της ενεργότητας της λιπάσης σε σταθερά επίπεδα για εκτεταμένα χρονικά διαστήματα και μεγάλο εύρος θερμοκρασιών. Παρόλα αυτά, σημειώνεται ότι η ενεργότητά του ενζύμου

σε αυτό είναι μικρότερη κατά τους αρχικούς χρόνους αποθήκευσης, συγκριτικά με το NaDES Sorb/Gly/W.

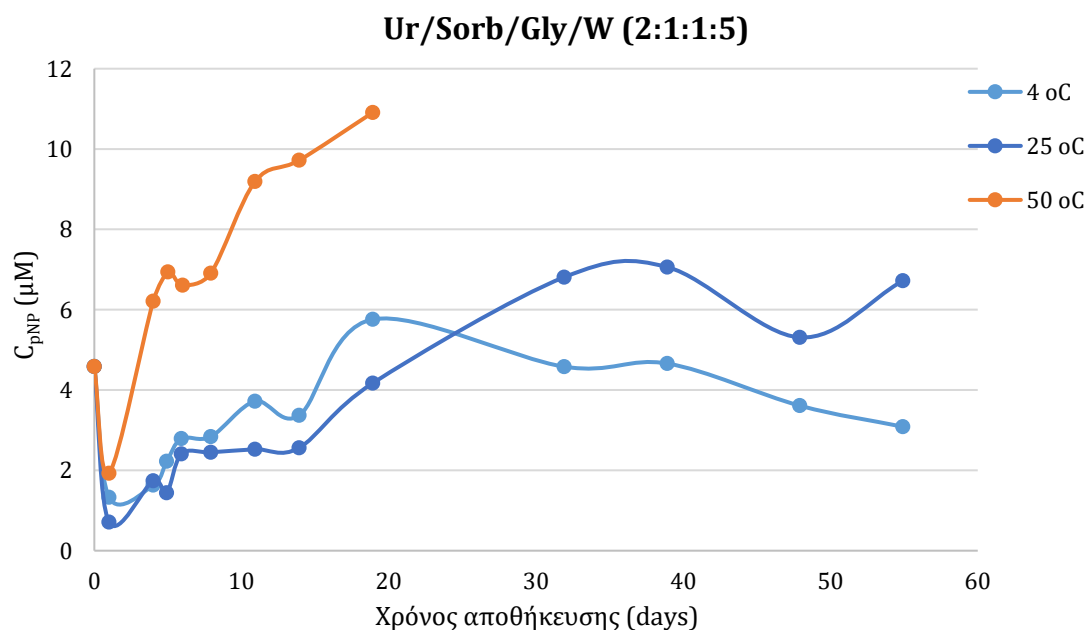
Συνολικά, τα πιο ενδιαφέροντα NaDESs που μελετήθηκαν είναι τα Sorb/Gly/W (1:2:5) και Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5). Το NaDES Sorb/Gly/W υπερέρχει στην υψηλή ενεργότητα της λιπάσης κατά τις πρώτες ημέρες αποθήκευσης της σε αυτό, ενώ το NaDES Ur/Sorb/Gly/W αναδεικνύεται διότι διατηρεί σταθερή και σε ικανοποιητικά επίπεδα την ενεργότητα της λιπάσης σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης. Για τα δύο NaDESs που αναφέρονται, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα διαγράμματα παραγόμενης συγκέντρωσης pNP συναρτήσει του χρόνου παραμονής της λιπάσης στα NaDESs για τις θερμοκρασίες αποθήκευσης 4, 25 και 50°C.



**Σχήμα 7:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDESs Sorb/Gly/W (1:2:5) σε θερμοκρασίες 4, 25, 50°C.

Από το παραπάνω Σχήμα 7 προκύπτει ότι για το NaDESs Sorb/Gly/W η ενεργότητα της περιεχόμενης λιπάσης μειώνεται με παραπλήσιο ρυθμό και οι τιμές της είναι αρκετά κοντινές, για τις περιπτώσεις αποθήκευσης σε θερμοκρασίες 4°C και 25°C. Η αποθήκευση σε θερμοκρασία 4°C δίνει ελάχιστα πιο αυξημένη ενεργότητα λιπάσης σε μεγάλους χρόνους παραμονής άνω των 10 ημερών, οπότε η μείωση της θερμοκρασίας έχει θετικό αντίκτυπο στην διατήρηση του ενζύμου εντός του NaDES. Στην θερμοκρασία αποθήκευσης των 50°C η ενεργότητα του ενζύμου μειώνεται με σαφέστατα μεγαλύτερο ρυθμό σε σχέση με τις δύο χαμηλότερες θερμοκρασίες και οδηγείται σε μηδενικά επίπεδα έπειτα από 19 ημέρες παραμονής της λιπάσης στο NaDES. Αντίθετα, στις θερμοκρασίες 4°C και 25°C η ενεργότητα της λιπάσης έπειτα από 26 ημέρες παραμονής είναι στο 7% της αρχικής τιμής της αποδεικνύοντας την χρησιμότητα αποθήκευσης του συστήματος σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Με βάση το διάγραμμα τελικά επιλέγονται οι 25°C ως βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης του συστήματος NaDESs Sorb/Gly/W με λιπάση, αφού τα αποτελέσματα ενεργότητας είναι παραπλήσια με τα αντίστοιχα στους 4°C και επιπλέον στους

25°C δεν απαιτείται υψηλή ενεργειακή κατανάλωση για διατήρηση της θερμοκρασίας σε σταθερά επίπεδα.



**Σχήμα 8:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός του NaDESs Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5) σε θερμοκρασίες 4, 25, 50°C

Από το παραπάνω Σχήμα 8 προκύπτει ότι για το NaDES Ur/Sorb/Gly/W τα δείγματα που διατηρούνται στους 4°C και 25°C, στους αρχικούς χρόνους αποθήκευσης μέχρι 25 ημέρες έχουν παραπλήσιες τιμές συγκέντρωσης pNP, άρα και ενεργότητας λιπάσης. Έπειτα, μέχρι το πέρας των μετρήσεων παρατηρείται ότι σε παρατεταμένους χρόνους αποθήκευσης τα δείγματα που διατηρούνται στους 25°C έχουν αρκετά μεγαλύτερη ενεργότητα σε σχέση με τα αντίστοιχα στους 4°C. Για την περίπτωση αποθήκευσης στους 50°C η ενεργότητα σε όλους τους χρόνους μέτρησης είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με τις χαμηλότερες θερμοκρασίες παραμονής του συστήματος μέχρι τον χρόνο των 20 ημερών. Μετά τις 20 ημέρες τα δείγματα των 50°C δεν είναι δυνατόν να μετρηθούν λόγω θολώματος που επηρεάζει τις τιμές απορρόφησης, όμως με βάση τα αποτελέσματα και την τάση στις δύο προηγούμενες θερμοκρασίες αναμένεται πιθανότατα σταθεροποίηση της τιμής της παραγόμενης pNP περίπου στα 10 μM. Στο NaDES Ur/Sorb/Gly/W η αύξηση της θερμοκρασίας δεν φαίνεται να επηρεάζει την σταθερότητα της λιπάσης σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης, όμως επηρεάζει θετικά την ενεργότητά της, δηλαδή αύξηση της θερμοκρασίας αποθήκευσης αυξάνει την δραστηριότητα του ενζύμου, φαινόμενο που αντιτίθεται στα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το NaDES Sorb/Gly/W (Σχήμα 7). Δεδομένου ότι στο NaDES Ur/Sorb/Gly/W η λιπάση είναι ιδιαίτερα σταθερή ως προς τον χρόνο αποθήκευσης σε οποιαδήποτε θερμοκρασία, η πιθανότερη εξήγηση για την υψηλότερη ενεργότητα σε μεγαλύτερη θερμοκρασία αποθήκευσης είναι η ευνοϊκότερη διαμόρφωση που λαμβάνει η λιπάση κατά την αποθήκευσή της σε υψηλότερη θερμοκρασία που της επιτρέπει την ευκολότερη κατάλυση της αντίδρασης παραγωγής της νιτροφαινόλης (pNP).



### 3.4 Μελέτη ενεργότητας λιπάσης σε ευτηκτογέλες

Η συγκέντρωση της νιτροφαινόλης που παράγεται κατά την αντίδραση σχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών, μιας και η αντίδραση είναι ενζυμικά καταλυόμενη. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης/παραμονής της λιπάσης στις ευτηκτογέλες και έτσι κατασκευάζονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης νιτροφαινόλης (pNP) που παράγεται σε 60 min αντίδρασης συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών. Το πείραμα πραγματοποιείται σε δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης των ευτηκτογελών (4, 25°C) για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των συστημάτων σε διαφορετικές συνθήκες και την αντίστοιχη συγκριτική αποτίμησή τους. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στα ακόλουθα διαγράμματα που περιλαμβάνουν το σύνολο των μετρούμενων δειγμάτων ευτηκτογελών για κάθε μία από τις θερμοκρασίες αποθήκευσης των συστημάτων. Συμπεριλαμβάνονται και οι αντίστοιχοι πίνακες με τα δεδομένα συγκέντρωσης της παραγόμενης pNP συναρτήσει του χρόνου παραμονής της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών.

Επιπλέον, για την μέτρηση της ενεργότητας των ευτηκτογελών τα μετρούμενα δείγματα που αντιδρούν για 60 min, παρουσιάζουν ακριβώς τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις λιπάσης και υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινολεστέρα με τα αντίστοιχα μετρούμενα δείγματα από την μελέτη ενεργότητας της λιπάσης στα NaDESs. Οπότε τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ενεργότητας λιπάσης σε ευτηκτογέλες είναι άμεσα συγκρίσιμα με την μελέτη ενεργότητας της λιπάσης στα NaDESs, μιας και τα αντιδρώντα συστήματα είναι ίδια.

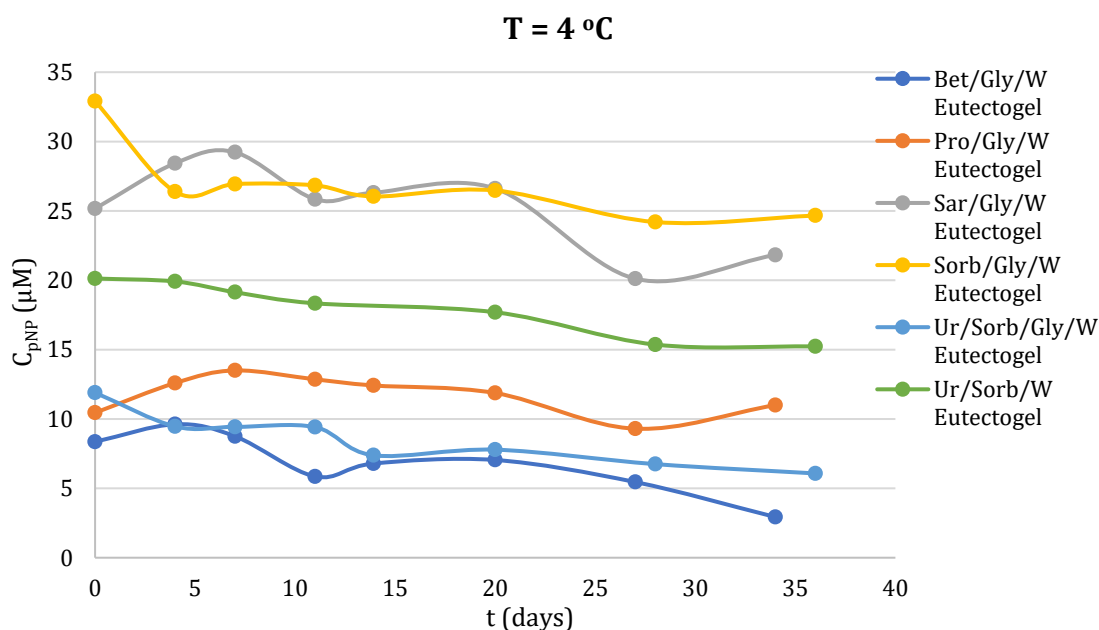
- **Αποθήκευση λιπάσης σε ευτηκτογέλες στους 4 °C**

**Πίνακας 19:** Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες σε θερμοκρασία 4 °C.

Θερμοκρασία αποθήκευσης λιπάσης σε ευτηκτογέλες - T = 4 °C

t (days)	Ευτηκτογέλη με NaDES Bet/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Pro/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Sar/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5)	Ευτηκτογέλη με NaDES Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	Ευτηκτογέλη με NaDES Ur/Sorb/W (1:1:3)
0	8,36	10,45	25,16	32,91	11,90	20,13
4	9,62	12,59	28,43	26,39	9,46	19,91
7	8,75	13,50	29,22	26,94	9,43	19,14
11	5,85	12,86	25,84	26,84	9,41	18,34
14	6,79	12,42	26,31	26,04	7,38	18,10
20	7,04	11,87	26,61	26,47	7,79	17,69
27	5,45	9,30	20,11	24,20	6,75	15,36
34	2,93	11,00	21,82	24,67	6,07	15,23

Από τα δεδομένα του Πίνακα 19 παρατηρείται μια σχετικά σταθερή συγκέντρωση παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP) από την ενζυμική αντίδραση σε όλη την πάροδο του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες με μια μικρή μείωση σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης άνω των 20 ημερών, οπότε η ενεργότητα της λιπάσης είναι αρκετά σταθερή στα συστήματα των ευτηκτογελών. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 19 τοποθετούνται σε διάγραμμα συγκέντρωσης της παραγόμενης pNP συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης των ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 4°C, το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.



**Σχήμα 9:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 4°C.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 9 για την αποθήκευση των ευτηκτογελών στους 4°C, αρχικά παρατηρείται ότι οι ευτηκτογέλες που περιέχουν τα NaDESs Bet/Gly/W και Ur/Sorb/Gly/W δίνουν παρόμοια αποτελέσματα μετρήσεων και έχουν την μικρότερη συγκέντρωση παραγόμενης pNP και συνεπώς την μικρότερη ενεργότητα λιπάσης σε σχέση με τις υπόλοιπες ευτηκτογέλες. Η ικανότητα διατήρησης της ενεργότητας της λιπάσης κρίνεται ικανοποιητική μιας και έπειτα από 20 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα έχει μειωθεί κατά περίπου 25% σε σχέση με την αρχική της τιμή. Άρα, παρόλο που η λιπάση στο εσωτερικό των ευτηκτογελών αυτών διατηρείται για μεγάλο χρόνο, η ενεργότητα που προκύπτει κατά την αντίδραση είναι χαμηλή και έτσι δεν αποτελούν τις καλύτερες επιλογές για χρήση σε καταλυόμενες από λιπάση αντιδράσεις.

Η ευτηκτογέλη που περιέχει το NaDES Pro/Gly/W είναι ιδιαίτερα σταθερή ως προς την ενεργότητα της λιπάσης που εγκλείεται στο σύστημα, αφού η ενεργότητα διατηρείται αναλλοίωτη στις 34 ημέρες αποθήκευσης της λιπάσης στην ευτηκτογέλη. Συνολικά το σύστημα διατηρεί την ενεργότητα της λιπάσης με επιτυχία, αλλά η τιμή της ενεργότητας δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, οπότε η παραγωγή προϊόντος σε μια καταλυτική αντίδραση αναμένεται να είναι περιορισμένη. Παρόμοια είναι και η περίπτωση ευτηκτογέλης με Ur/Sorb/W στην

οποία η ενεργότητα κυμαίνεται σε μέτριες τιμές συγκριτικά με τις υπόλοιπες ευτηκτογέλες και η διατηρησιμότητα του ενζύμου είναι υψηλή, μιας και σε διάστημα 36 ημερών αποθήκευσης χάνεται μόνο το 25% της αρχικής ενεργότητας του συστήματος.

Οι δύο καλύτερες ευτηκτογέλες είναι αυτές που συντίθενται με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W. Στην περίπτωση της ευτηκτογέλης με Sorb/Gly/W στις πρώτες 3 ημέρες αποθήκευσης, η ενεργότητά της είναι η βέλτιστη μεταξύ των μελετούμενων ευτηκτογελών, ενώ ακολουθεί μια μικρή μείωση της τάξης του 20% συγκριτικά με την αρχική τιμή ενεργότητας μέχρι την 5<sup>η</sup> ημέρα. Από το σημείο αυτό η ενεργότητα διατηρείται σταθερή ακόμη και για μεγάλους χρόνους παραμονής 36 ημερών. Συνεπώς, η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W συνδυάζει την υψηλή σταθερότητα του ενζύμου στο σύστημα με την ταυτόχρονη επίτευξη υψηλής συγκέντρωσης παραγόμενης pNP, δηλαδή μεγάλης ενεργότητας της λιπάσης. Αντίστοιχα, η ευτηκτογέλη με το NaDES Sar/Gly/W διατηρεί το ένζυμο σταθερό μέχρι τις 20 ημέρες παραμονής του στο σύστημα και κατόπιν ακολουθεί μια μείωση της ενεργότητας κατά 20% σε σχέση με την αρχική τιμή σε χρόνο αποθήκευσης 27 ημερών. Και σε αυτή την περίπτωση ευτηκτογέλης με Sar/Gly/W, η τιμή της ενεργότητας είναι υψηλή, σε παρόμοια επίπεδα με την ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W, ενώ στο εύρος από 3 μέχρι 20 ημέρες αποθήκευσης δίνει λίγο καλύτερη ενεργότητα. Συνολικά και οι δύο ευτηκτογέλες είναι ιδιαίτερα ικανές στην προστασία και διατήρηση της λιπάσης καθώς και την επίτευξη υψηλών τιμών ενεργότητας του συστήματος. Η περίπτωση της ευτηκτογέλης με Sorb/Gly/W φαίνεται να πλεονεκτεί στην διατήρηση της ενεργότητας της λιπάσης σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης.

- **Αποθήκευση λιπάσης σε ευτηκτογέλες στους 25 °C**

**Πίνακας 20:** Συγκεντρώσεις της παραγόμενης νιτροφαινόλης από την ενζυμική αντίδραση σε διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες σε θερμοκρασία 25 °C.

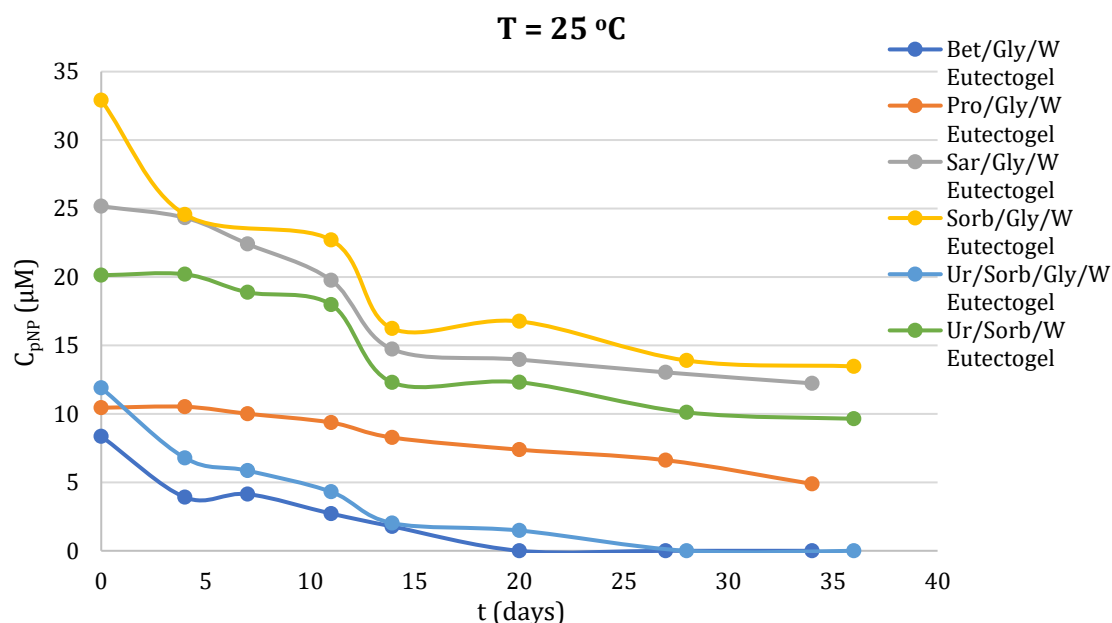
Θερμοκρασία αποθήκευσης λιπάσης σε ευτηκτογέλες - **T = 25 °C**

t (days)	Ευτηκτογέλη με NaDES Bet/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Pro/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Sar/Gly/W (1:2:4)	Ευτηκτογέλη με NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5)	Ευτηκτογέλη με NaDES Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5)	Ευτηκτογέλη με NaDES Ur/Sorb/W (1:1:3)
0	8,36	10,45	25,16	32,91	11,90	20,13
4	3,91	10,52	24,33	24,57	6,78	20,20
7	4,14	10,01	22,41	23,61	5,85	18,88
11	2,72	9,37	19,76	22,70	4,31	17,98
14	1,78	8,27	14,73	16,24	2,02	12,30
20	0,00	7,39	13,97	16,76	1,48	12,31
27	0,00	6,62	13,03	13,90	0,00	10,11
34	0,00	4,89	12,23	13,47	0,00	9,65

Από τα δεδομένα του Πίνακα 20 παρατηρείται μια σχετικά σταθερή συγκέντρωση παραγόμενης νιτροφαινόλης (pNP) από την ενζυμική αντίδραση κατά τις 5 πρώτες ημέρες του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης σε ευτηκτογέλες

στους 25°C, που συνοδεύεται από σταδιακή μείωση με αργό ρυθμό σε μεγαλύτερους χρόνους αποθήκευσης. Συνεπώς, η ενεργότητα της λιπάσης είναι αρκετά σταθερή στα συστήματα των ευτηκτογελών σε μικρούς χρόνους αποθήκευσης και κατόπιν υποβαθμίζεται, αφού σε πολλές περιπτώσεις η ενεργότητα στις 27 ημέρες έχει μειωθεί κατά 50% από την αρχική της τιμή.

Τα αποτελέσματα εισάγονται σε διάγραμμα συγκέντρωσης της παραγόμενης pNP συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης των ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 25°C, το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.



**Σχήμα 10:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των διάφορων ευτηκτογελών σε θερμοκρασία 25°C.

Από το διάγραμμα του Σχήματος 10 για την αποθήκευση των ευτηκτογελών στους 25°C, παρατηρείται ότι οι ευτηκτογέλες που περιέχουν τα NaDESs Bet/Gly/W και Ur/Sorb/Gly/W δίνουν παρόμοια αποτελέσματα και έχουν την μικρότερη συγκέντρωση παραγόμενης pNP και συνεπώς την μικρότερη ενεργότητα λιπάσης συγκριτικά με τις άλλες ευτηκτογέλες. Η διατήρηση της ενεργότητας της λιπάσης ακολουθεί μια φθίνουσα πορεία σε σχέση με τον χρόνο αποθήκευσης μιας και έπειτα από 20 ημέρες αποθήκευσης η ενεργότητα έχει μειωθεί κατά περίπου 90% σε σχέση με την αρχική της τιμή, ενώ η τιμή για την ευτηκτογέλη με Bet/Gly/W είναι μηδενική μετά τις 20 ημέρες. Στην περίπτωση των αντίστοιχων ευτηκτογελών στην θερμοκρασία αποθήκευσης των 4°C η αντίστοιχη μείωση είναι μόλις 25% της αρχικής ενεργότητας, συνεπώς, η υψηλότερη θερμοκρασία επηρεάζει καθοριστικά την διατηρησιμότητα της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών, υποβαθμίζοντάς την.

Η ευτηκτογέλη που περιέχει το NaDES Pro/Gly/W δεν παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα όσον αφορά την ενεργότητα της λιπάσης που εγκλείεται στο σύστημα, αφού η ενεργότητα διατηρείται κατά 50% έπειτα από 35 ημέρες αποθήκευσης της λιπάσης στην ευτηκτογέλη. Συνολικά, το σύστημα διατηρεί την ενεργότητα της λιπάσης, αλλά η τιμή της ενεργότητας δεν είναι ιδιαίτερα

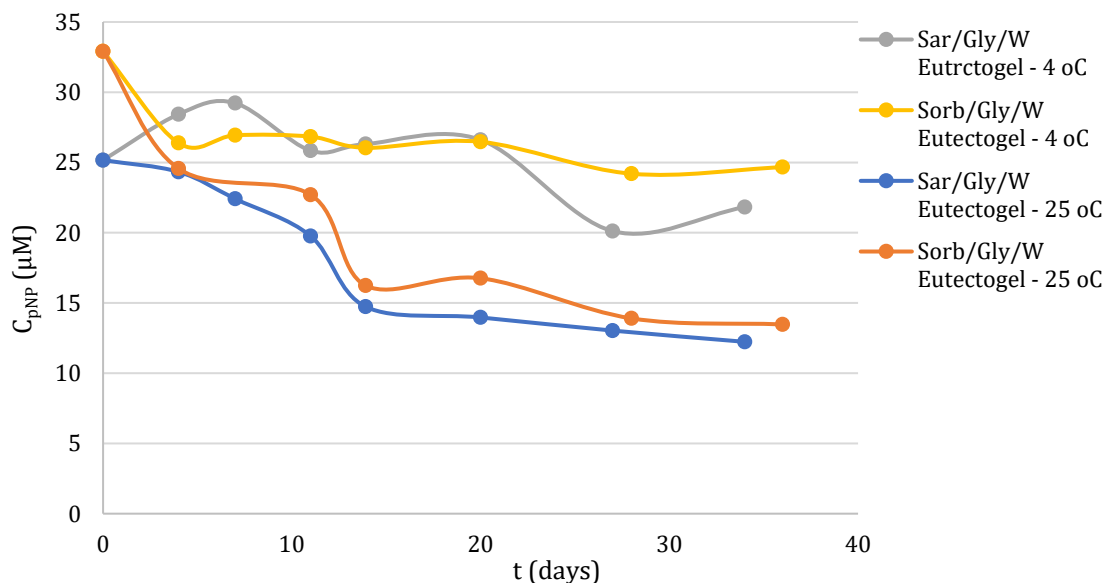
ικανοποιητική έναντι άλλων συστημάτων ευτηκτογελών, οπότε η παραγωγή προϊόντος σε μια καταλυτική αντίδραση αναμένεται να είναι περιορισμένη. Στην περίπτωση της ευτηκτογέλης με Ur/Sorb/W, η ενεργότητα κυμαίνεται σε ενδιάμεσες τιμές συγκριτικά με τις υπόλοιπες ευτηκτογέλες και η διατηρησιμότητα του ενζύμου είναι μέτρια, μιας και σε διάστημα 36 ημερών αποθήκευσης διατηρείται το 50% της αρχικής ενεργότητας του συστήματος.

Οι βέλτιστες ευτηκτογέλες είναι αυτές που συντίθενται με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W. Όσον αφορά την ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W στις πρώτες 5 ημέρες αποθήκευσης, η ενεργότητά της είναι η βέλτιστη μεταξύ των μελετούμενων ευτηκτογελών, ενώ συνολικά μέχρι την 36<sup>η</sup> ημέρα αποθήκευσης της λιπάσης στην ευτηκτογέλη υφίσταται μείωση της ενεργότητας της τάξης του 59%. Η ευτηκτογέλη με το NaDES Sar/Gly/W χαρακτηρίζεται από μέτρια σταθερότητα λιπάσης και συνολικά παρατηρείται μια μείωση της ενεργότητας κατά 50% σε σχέση με την αρχική τιμή σε χρόνο αποθήκευσης 36 ημερών. Σε αυτή την περίπτωση ευτηκτογέλης με Sar/Gly/W η τιμή της ενεργότητας είναι υψηλή, σε παρόμοια επίπεδα με την ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W μέχρι τις 15 πρώτες ημέρες, ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους υπερέχει πιο έντονα η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W. Τελικά, και οι δύο ευτηκτογέλες είναι ιδιαίτερα ικανές για την επίτευξη υψηλών τιμών ενεργότητας του συστήματος της λιπάσης σε ευτηκτογέλη.

Σημειώνεται ότι, σε όλες τις περιπτώσεις των ευτηκτογελών παρατηρείται ότι η ενεργότητα της λιπάσης κατά την αποθήκευση των γελών στους 25°C μειώνεται με ταχύτερο ρυθμό, από την αντίστοιχη ελάττωση ενεργότητας στους 4°C όπου υπάρχει μεγαλύτερη σταθερότητα.

- **Σύγκριση αποθήκευσης λιπάσης σε ευτηκτογέλες σε διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25 °C**

Για τις δύο βέλτιστες ευτηκτογέλες με λιπάση που προέκυψαν από τα πειράματα, δηλαδή τις ευτηκτογέλες με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W, μελετάται η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσής τους στην παραγωγή pNP και συνεπώς στην ενεργότητα της λιπάσης, αλλά και στην διατηρησιμότητα του ενζύμου στο σύστημα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο ακόλουθο γράφημα.

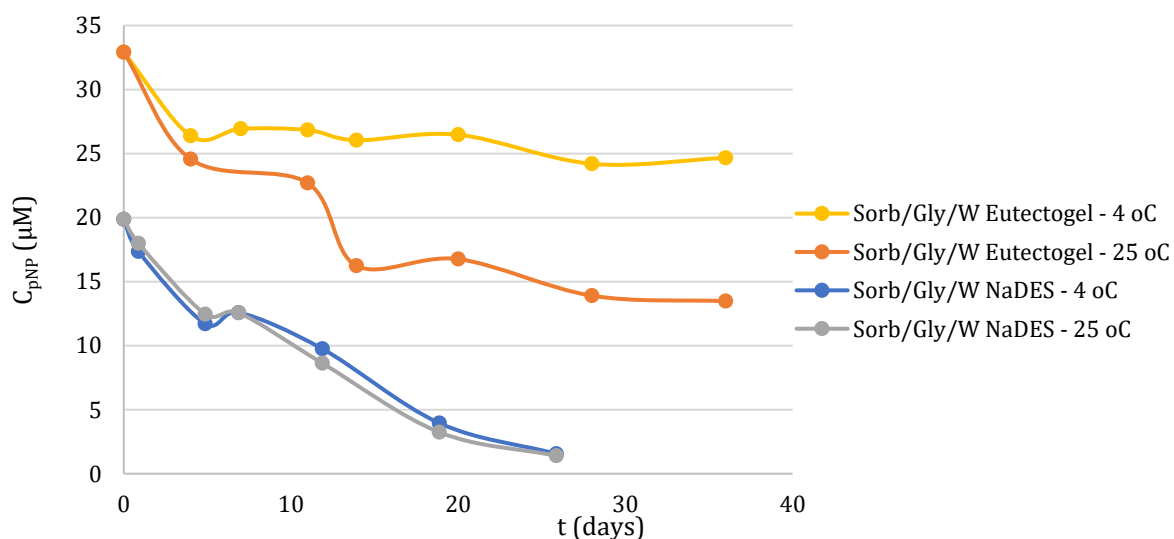


**Σχήμα 11:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W σε θερμοκρασίες 4, 25°C.

Από το Σχήμα 11, παρατηρείται ότι στις περιπτώσεις και των δύο ευτηκτογελών ο ρυθμός μείωσης της συγκέντρωσης της παραγόμενης pNP, άρα και της ενεργότητας της λιπάσης είναι μεγαλύτερος στην θερμοκρασία των 25°C, έναντι των 4°C. Κατά την αποθήκευση στους 4°C η ενεργότητα της λιπάσης διατηρείται σε αρκετά υψηλά επίπεδα για τουλάχιστον 20 ημέρες σε τιμές παραπλήσιες με την αρχική και για τις δύο ευτηκτογέλες. Κατά την αποθήκευση στους 25°C, η ενεργότητα μειώνεται σε ποσοστό 50-60%, έναντι της αντίστοιχης μείωσης 20% στην θερμοκρασία των 4°C. Συμπερασματικά, είναι σκόπιμη η αποθήκευση των ευτηκτογελών με περιεχόμενη λιπάση σε χαμηλές θερμοκρασίες για να επιτευχθεί μεγαλύτερη σταθερότητα του ενζύμου και να μπορεί να αξιοποιηθεί ακόμη και έπειτα από εκτεταμένους χρόνους παραμονής.

- **Σύγκριση αποθήκευσης λιπάσης σε NaDESs και σε ευτηκτογέλες, σε διαφορετικές θερμοκρασίες 4, 25 °C**

Με βάση την ανάλυση που προηγείται, οι ευτηκτογέλες καθώς και τα διαλύματα NaDESs με λιπάση εμφανίζουν τα καλύτερα αποτελέσματα με την χρήση του βαθέως ευτηκτικού διαλύτη Sorb/Gly/W. Για την σύγκριση της διατηρησιμότητας και της ενεργότητας της λιπάσης εντός ευτηκτογέλης με Sorb/Gly/W, καθώς και σε διάλυμα NaDES Sorb/Gly/W κατασκευάζεται το ακόλουθο διάγραμμα για θερμοκρασίες αποθήκευσης 4 και 25°C.



**Σχήμα 12:** Διάγραμμα παραγόμενης pNP από την ενζυμική αντίδραση συναρτήσει του χρόνου αποθήκευσης της λιπάσης εντός των ευτηκτογελών με NaDES Sorb/Gly/W, καθώς και εντός διαλύματος λιπάσης Sorb/Gly/W σε θερμοκρασίες 4, 25°C.

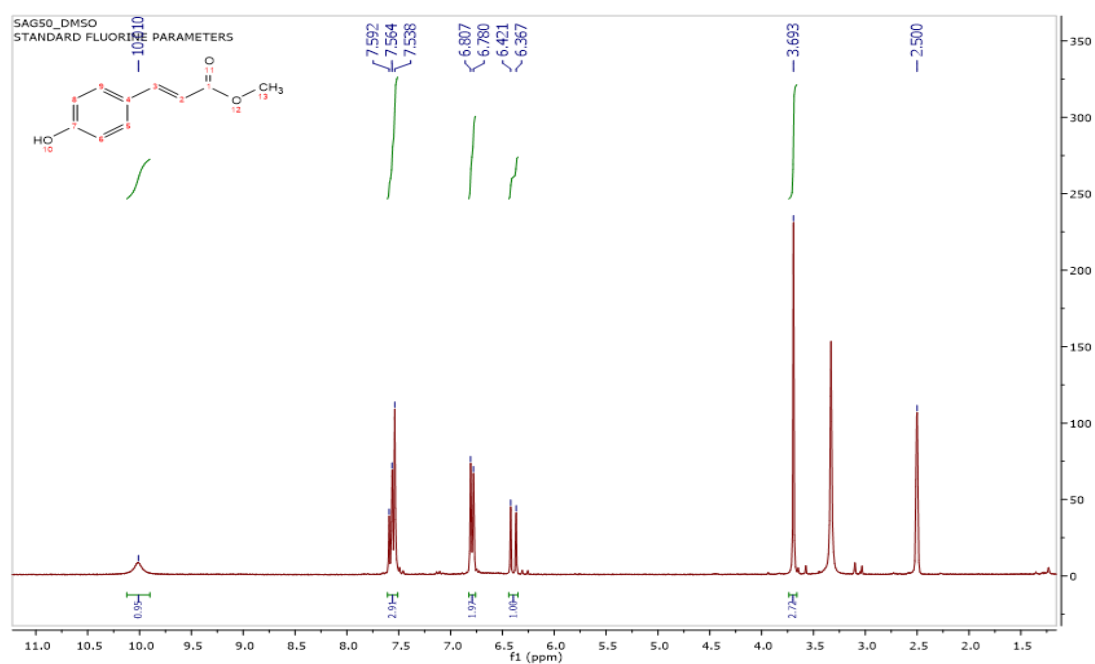
Όσον αφορά τις τιμές της ενεργότητας των δύο συστημάτων παρατηρείται ότι το σύστημα λιπάσης σε ευτηκτογέλη έχει μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας από τον χρόνο αποθήκευσης  $t=0$  και για όλη την διάρκεια παραμονής της λιπάσης στο σύστημα, έναντι της λιπάσης σε NaDES Sorb/Gly/W που παρουσιάζει μικρότερες τιμές ενεργότητας. Η διαφορά στις τιμές ενεργότητας κυμαίνεται περίπου σε ποσοστά άνω του 40 % μεταξύ των δύο επιλογών, αναδεικνύοντας την ανωτερότητα των ευτηκτογελών ως φορείς λιπάσης με υψηλές τιμές ενεργότητας.

Σχετικά με την διατήρηση της ενεργότητας και την σταθερότητα της λιπάσης, προκύπτει ότι η ευτηκτογέλη συνιστά ένα πιο σταθερό σύστημα για την αποθήκευση της λιπάσης που εμφανίζει μικρή μείωση της ενεργότητάς της σε αρκετά μεγάλους χρόνους παραμονής. Ειδικότερα σε συνδυασμό με την επιλογή χαμηλών θερμοκρασιών διατήρησης η σταθερότητα είναι ακόμη πιο επιτυχημένη. Ενδεικτικά στους 4°C η λιπάση εντός της ευτηκτογέλης έχει χάσει το 25 % της αρχικής ενεργότητάς της σε 36 ημέρες αποθήκευσης. Το αντίστοιχο ποσοστό σε θερμοκρασία αποθήκευσης 25°C είναι 59 %. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της λιπάσης εντός NaDESs η ενεργότητα του συστήματος μειώνεται με σχεδόν σταθερό ρυθμό με την πάροδο του χρόνου και με μεγαλύτερο ρυθμό συγκριτικά με την ευτηκτογέλη. Η μείωση της ενεργότητας έπειτα από 20 ημέρες παραμονής της λιπάσης στο NaDES είναι 93 % σε σχέση με την αρχική τιμή ανεξαρτήτως της θερμοκρασίας αποθήκευσης μιας και τα αποτελέσματα είναι ίδια. Συνεπώς, η ευτηκτογέλη είναι προτιμότερη για την επίτευξη μεγάλης διατηρησιμότητας του ενζύμου.

### 3.5 Εφαρμογή των καταλυτικών συστημάτων σε αντίδραση υδρόλυσης/μετεστεροποίησης εστέρα

#### 3.5.1 Ταυτοποίηση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (NMR)

Για την ταυτοποίηση της σύνθεσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα γίνεται λήψη φάσματος της ένωσης με  $^1\text{H}$  NMR (Varian Gemini 300) το οποίο παρουσιάζεται παρακάτω.



**Εικόνα 17:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του παραγόμενου p-κουμαρικού μεθυλεστέρα

Από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR παρατηρείται μία ευρεία απλή κορυφή στα 10 ppm, η οποία ολοκληρώνει για 1 πρωτόνιο και αποδίδεται στο πρωτόνιο του υδροξυλίου (-OH). Στο εύρος από 6 – 8 ppm εμφανίζονται 3 κορυφές που ολοκληρώνουν συνολικά για 6 πρωτόνια (4 πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου και 2 πρωτόνια από τον trans διπλό δεσμό). Ειδικότερα στα 7.5 ppm διακρίνεται πολλαπλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια (2 από τον αρωματικό δακτύλιο και 1 από τον trans διπλό δεσμό), στα 6.79 ppm εντοπίζεται 1 διπλή κορυφή με  $J=8.1$  Hz, που ολοκληρώνει για 2 πρωτόνια που αντιστοιχούν σε πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου και στα 6.40 ppm παρατηρείται 1 διπλή κορυφή με  $J=16.2$  Hz που ολοκληρώνει για 1 πρωτόνιο με και αποδίδεται στο πρωτόνιο του άνθρακα του διπλού δεσμού. Στα 3.69 ppm εμφανίζεται μια απλή κορυφή που ολοκληρώνει για 3 πρωτόνια και αποδίδεται στα πρωτόνια του οξυγονομένου άνθρακα του μεθυλίου. Με την κορυφή στα 3.69 ppm επιβεβαιώνεται η σύνθεση του μεθυλεστέρα, ενώ από τις υπόλοιπες ταυτοποιείται η δομή του κουμαρικού.

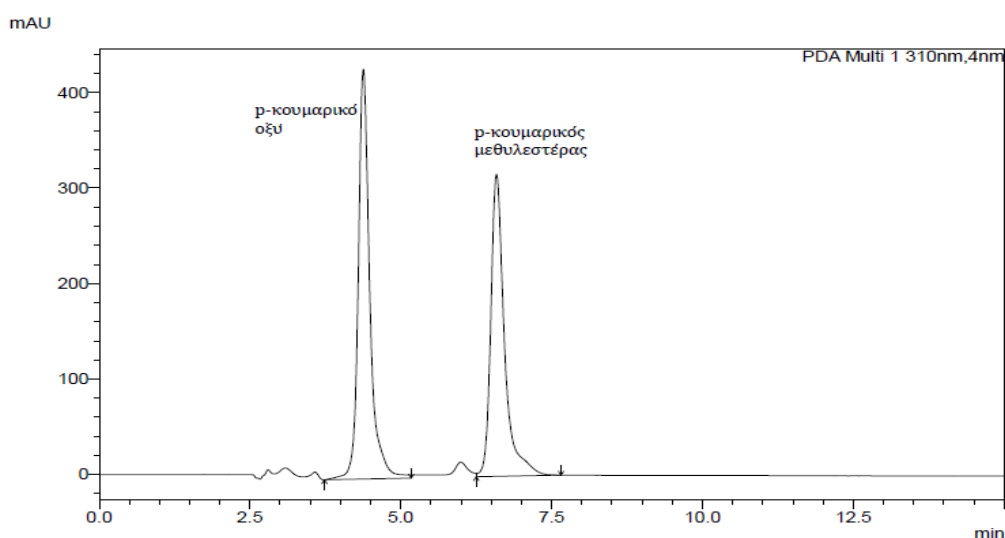


### 3.5.2 Καμπύλη αναφοράς μέσω HPLC

Έχοντας παρασκευάσει τον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα αναπτύσσεται η μέθοδος ποσοτικοποίησής του. Επιπλέον, η ίδια μέθοδος χρησιμοποιείται και για το p-κουμαρικό οξύ επιτρέποντας την παρατήρηση της πορείας των αντιδράσεων υδρόλυσης και μετεστεροποίησης που ακολουθούν. Για τον άμεσο προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ενώσεων p-κουμαρικό οξύ και p-κουμαρικός μεθυλεστέρας σχηματίζονται οι αντίστοιχες καμπύλες αναφοράς μέσω HPLC. Η χρωματογραφία HPLC πραγματοποιείται σε στήλη C-18 αντίστροφης φάσης με κινητή φάση νερού/μεθανόλης σε αναλογία 60:40 %v/v και ροή 1 ml/min. Το δείγμα που λαμβάνεται και εισάγεται στην στήλη είναι 10  $\mu$ L, ενώ ο χρόνος μέτρησης ορίζεται στα 15 min.

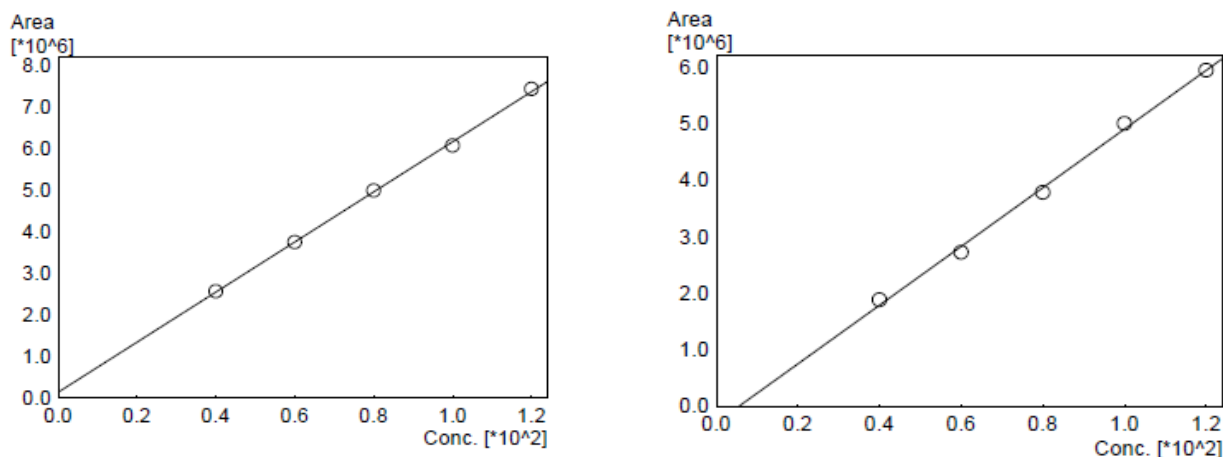
Αρχικά, παρουσιάζεται ενδεικτικά το χρωματογράφημα του μίγματος των ενώσεων p-κουμαρικό οξύ και p-κουμαρικός μεθυλεστέρας με συγκεντρώσεις 100 mg/L για κάθε συστατικό. Το μήκος κύματος που επιλέγεται για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων είναι τα 310 nm, τιμή στην οποία το p-κουμαρικό οξύ και ο p-κουμαρικός μεθυλεστέρας εμφανίζουν την μέγιστη απορρόφησή τους.

Από το ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 13), παρατηρείται ότι έκλυση του p-κουμαρικού οξέος γίνεται σε χρόνο 4.38 min (κορυφή 1), ενώ η έκλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα εμφανίζεται στα 6.59 min (κορυφή 2). Ο μικρότερος χρόνος κατακράτησης για το p-κουμαρικό οξύ αποδίδεται στην αυξημένη πολικότητά του και έτσι δεν εμφανίζει συγγένεια με την στατική φάση που είναι λιπόφιλη, οπότε και δεν κατακρατείται από αυτή. Αντίθετα, ο p-κουμαρικός μεθυλεστέρας είναι πιο λιπόφιλος και έχει μεγαλύτερη συγγένεια με την στήλη με αποτέλεσμα να εκλούεται σε μεταγενέστερο χρόνο. Με τον τρόπο αυτό γίνεται διάκριση μεταξύ των ενώσεων μέσω της χρωματογραφίας. Η συγκέντρωση των ενώσεων προκύπτει από το εμβαδόν της κορυφής που εμφανίζει η κάθε ένωση κατά την έκλυσή της και μεταφράζεται σε συγκέντρωση μέσω του σχηματισμού καμπύλης αναφοράς με πρότυπα διαλύματα.



**Σχήμα 13:** Χρωματογράφημα διαλύματος p-κουμαρικού οξέος και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με συγκέντρωση 100 mg/L για κάθε ένωση. Η κορυφή σε χρόνο 4.4 min αντιστοιχεί στο p-κουμαρικό οξύ και σε χρόνο 6.6 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα

Ακολουθώντας τη διαδικασία, που αναλύθηκε στην Παράγραφο 2.9.5 του πειραματικού μέρους, η βαθμονομημένη καμπύλη (calibration curve) είναι αποτέλεσμα πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων 120, 100, 80 και 60, 40 ppm του p-κουμαρικού οξέος και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα. Η βαθμονομημένη καμπύλη των δύο ενώσεων στις διαφορετικές συγκεντρώσεις απεικονίζεται στο Σχήμα 14.



**Σχήμα 14:** Καμπύλη αναφοράς p-κουμαρικού οξέος (αριστερά) και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (δεξιά), Area[\*10<sup>6</sup>] το εμβαδό της κορυφής που προκύπτει και Conc.[\*10<sup>2</sup>] η συγκέντρωση της ένωσης που μετράται εκφρασμένη σε mg/L (ppm)

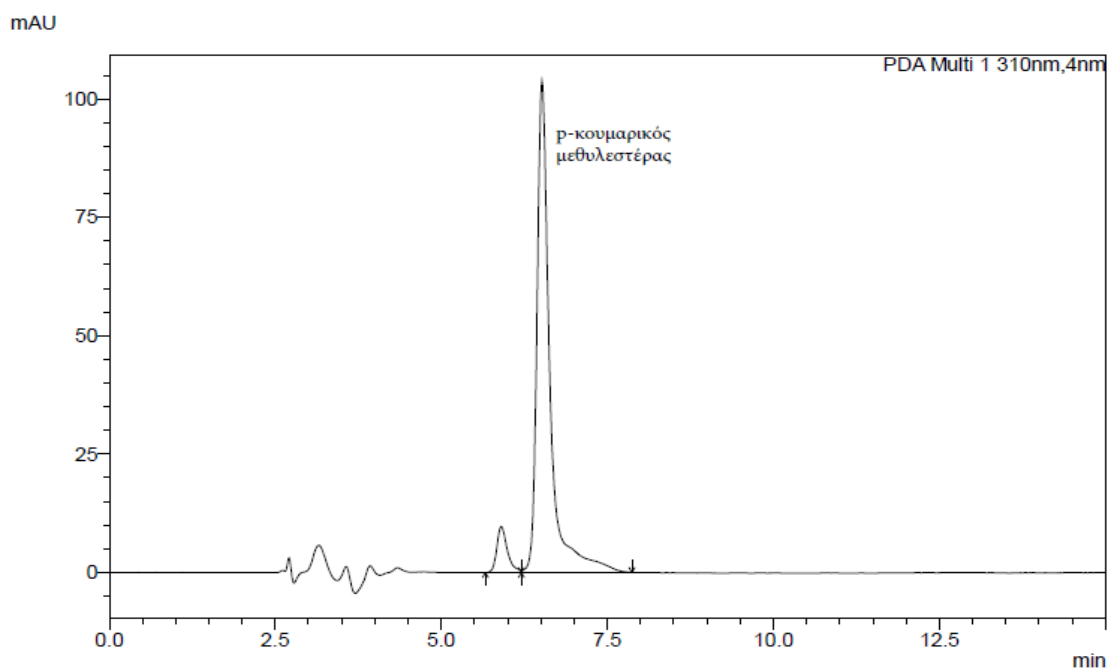
Από το Σχήμα 14 προκύπτει ότι η καμπύλη αναφοράς για το p-κουμαρικό οξύ είναι:  $\text{Area} = 60471.6 \cdot C + 124035$ , όπου Area η επιφάνεια που περικλείει η κορυφή που αντιστοιχεί στο p-κουμαρικό οξύ και C [mg/L] η συγκέντρωση του p-κουμαρικού οξέος. Αντίστοιχα η καμπύλη αναφοράς για τον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα είναι:  $\text{Area} = 51935.0 \cdot C - 291669$ , όπου Area η επιφάνεια που περικλείει η κορυφή που αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα και C [mg/L] η συγκέντρωση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα. Και οι δύο καμπύλες αναφοράς έχουν υψηλό συντελεστή γραμμικής προσαρμογής,  $R^2 = 0.9995$  για την καμπύλη του p-κουμαρικού οξέος και  $R^2 = 0.9983$  για την καμπύλη του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, οπότε και θεωρούνται ιδιαίτερα αξιόπιστες.

### 3.5.3 Αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με λιπάση

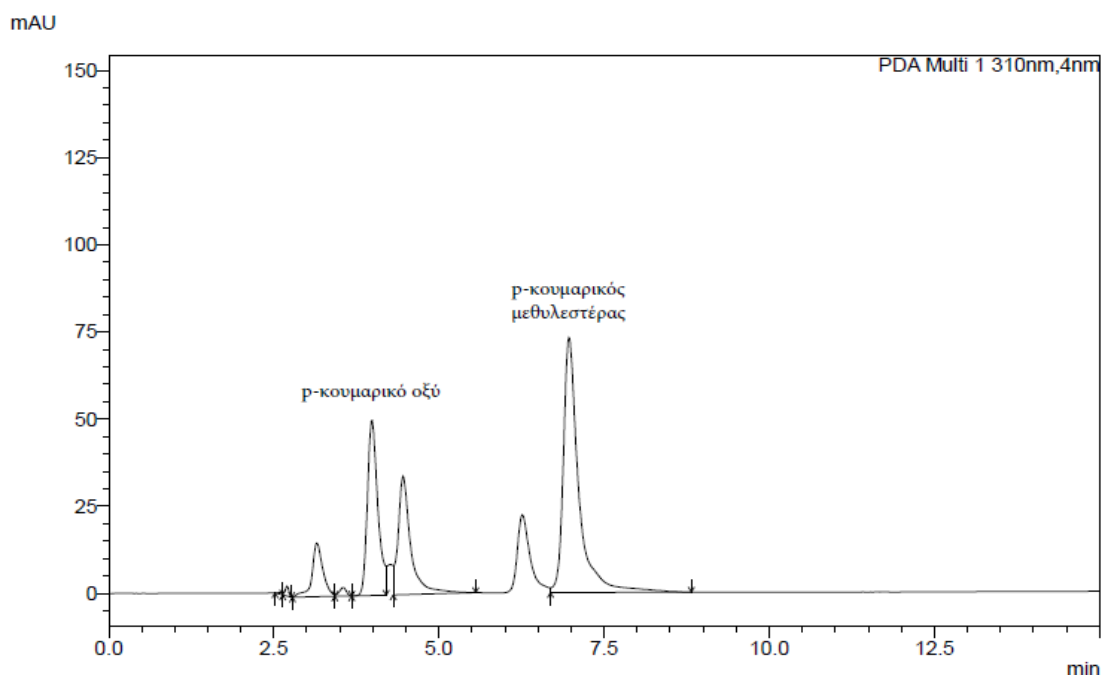
Από τα δείγματα που λαμβάνονται από την αντίδραση κατά τις πρώτες ώρες δεν παρουσιάζεται συγκέντρωση παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος κατά την μέτρησή τους σε HPLC. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός στη μικρή ταχύτητα της αντίδρασης και αφετέρου στην διαλυτότητα του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο σύστημα κατά τις αρχικές ώρες αντίδρασης. Παρατηρείται ότι ο εστέρας χρειάζεται αρκετό χρόνο, άνω των 5 ωρών για να διαλυτοποιηθεί πλήρως στο σύστημα του NaDES, φαινόμενο που παρατηρείται τόσο οπτικά (αδιάλυτο στερεό), όσο και μέσω της μέτρησης σε HPLC κατά την οποία η μετρούμενη

συγκέντρωση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα αυξάνεται κατά τις πρώτες ώρες εξαιτίας της σταδιακής διαλυτοποίησής του εντός του NaDES. Παρόλα αυτά σε μεταγενέστερους χρόνους η αντίδραση πραγματοποιείται και παράγεται σταδιακά p-κουμαρικό οξύ.

Τα ακόλουθα χρωματογράφημα αντιστοιχούν σε χρόνους αντίδρασης 5 ωρών και 5 ημερών και αποδεικνύουν την παραγωγή του p-κουμαρικού οξέος.



**Σχήμα 15:** Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε NaDES για  $t = 5$  h, η κορυφή στα 6.52 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα



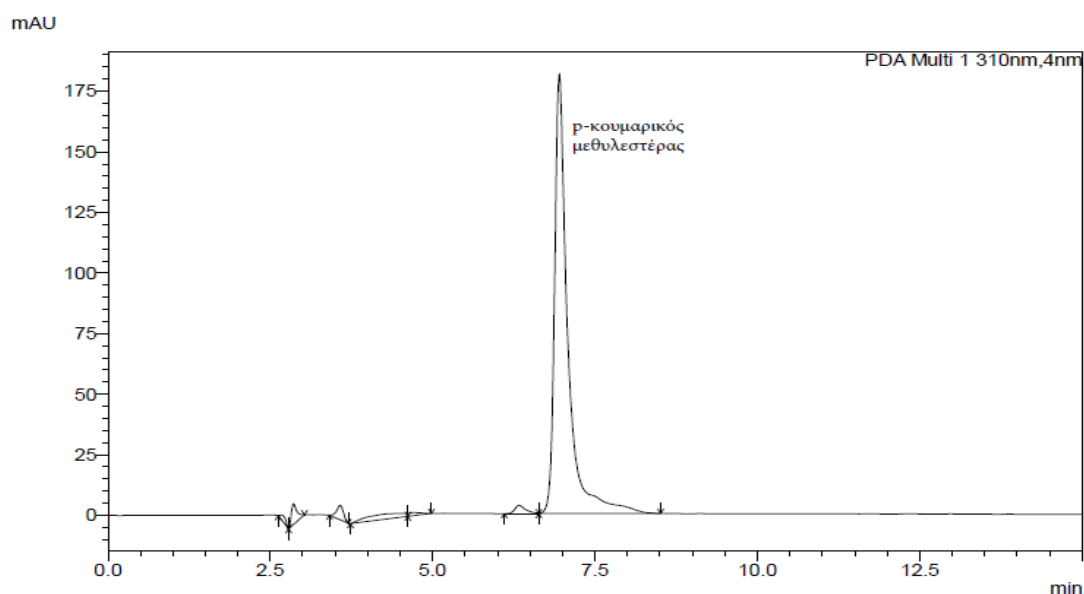
**Σχήμα 16:** Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (1) σε NaDES για  $t = 5$  days, η κορυφή στα 3.985 min αποδίδεται στο p-κουμαρικό οξύ (2) και στα 6.97 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα (1)

Από τα Σχήματα 15, 16 προκύπτει ότι στις 5 h αντίδρασης δεν έχει παραχθεί το επιθυμητό προϊόν, ενώ στις 5 ημέρες παρατηρείται πρόοδος της αντίδρασης και η μετρούμενη συγκέντρωση του παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος (χρόνος έκλουσης 4 min) είναι 7.155 mg/L στο μετρούμενο δείγμα. Επιπλέον, η συγκέντρωση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα μειώνεται από 58.1 mg/L στις 5 h σε 28.5 mg/L στις 5 ημέρες οπότε επιβεβαιώνεται η πραγματοποίηση της αντίδρασης.

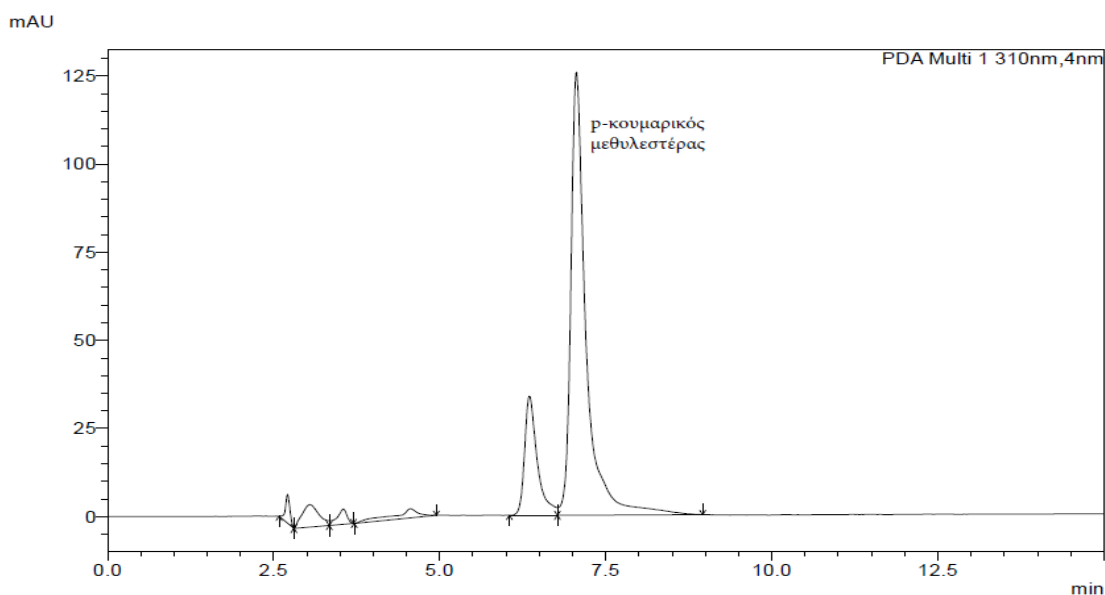
Συνολικά, παρατηρείται ότι η αντίδραση πραγματοποιείται σε περιβάλλον NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) με παρουσία λιπάσης, όμως η απόδοση και η ταχύτητα της αντίδρασης φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλές (8% σε 5 ημέρες αντίδρασης), με αποτέλεσμα η διεργασία να μην είναι ιδιαίτερα αποδοτική. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στην εμπλοκή του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα και την συμμετοχή του στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου του NaDES με αποτέλεσμα να μην είναι άμεσα διαθέσιμος για την αντίδραση υδρόλυσης. Η παρατήρηση αυτή αναφέρεται και στην βιβλιογραφία, όπου κατά την αντίδραση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε σύστημα NaDES χλωριούχος χολίνη/ουρία 1:2 η απόδοση ήταν μόλις 2% έπειτα από 3 ημέρες αντίδρασης.<sup>75</sup>

### 3.5.4 Υδρόλυση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) με λιπάση

Από τα δείγματα που λαμβάνονται από την αντίδραση κατά τις πρώτες ώρες δεν παρουσιάζεται συγκέντρωση παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος κατά την μέτρησή τους σε HPLC. Επιπλέον, ακόμη και έπειτα από 5 ημέρες αντίδρασης δεν εμφανίζεται συγκέντρωση παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αντίδραση σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) δεν πραγματοποιείται. Η τάση αυτή φαίνεται στα ακόλουθα χρωματογραφήματα.



**Σχήμα 17:** Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για  $t = 3$  h, όπου η κορυφή στα 6.951 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα



**Σχήμα 18:** Χρωματογράφημα αντίδρασης υδρόλυσης p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για  $t = 5$  days, όπου η κορυφή στα 7.057 min αντιστοιχεί στον p-κουμαρικό μεθυλεστέρα

Από τα Σχήματα 17, 18 παρατηρείται ότι στον χρόνο έκλουσης περίπου 4.4 min που αντιστοιχεί στο p-κουμαρικό οξύ δεν εμφανίζεται κορυφή ούτε έπειτα από 5 ημέρες αντίδρασης, οπότε η αντίδραση υδρόλυσης δεν πραγματοποιείται. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να οφείλεται τόσο στην χαμηλή διαθεσιμότητα του υποστρώματος, όσο και στην χαμηλή ενεργότητα του ενζύμου εντός του ρυθμιστικού διαλύματος.

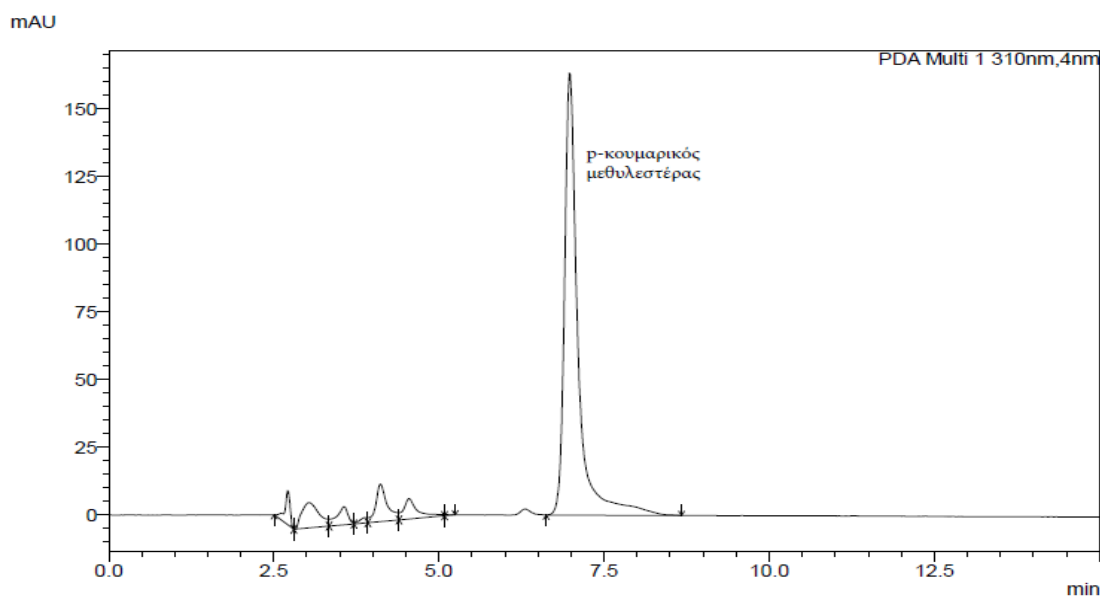
### 3.5.5 Αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES με n-οκτανόλη παρουσία λιπάσης

Η αλκοόλυση των εστέρων, δηλαδή η αντίδρασή τους με αλκοόλες προς σχηματισμό νέων εστέρων (μετεστεροποίηση) ανήκει στις αντιδράσεις πυρηνόφιλης ακυλο-υποκατάστασης, όπως και η υδρόλυση, και μπορεί να καταλύεται από το ένζυμο λιπάση.

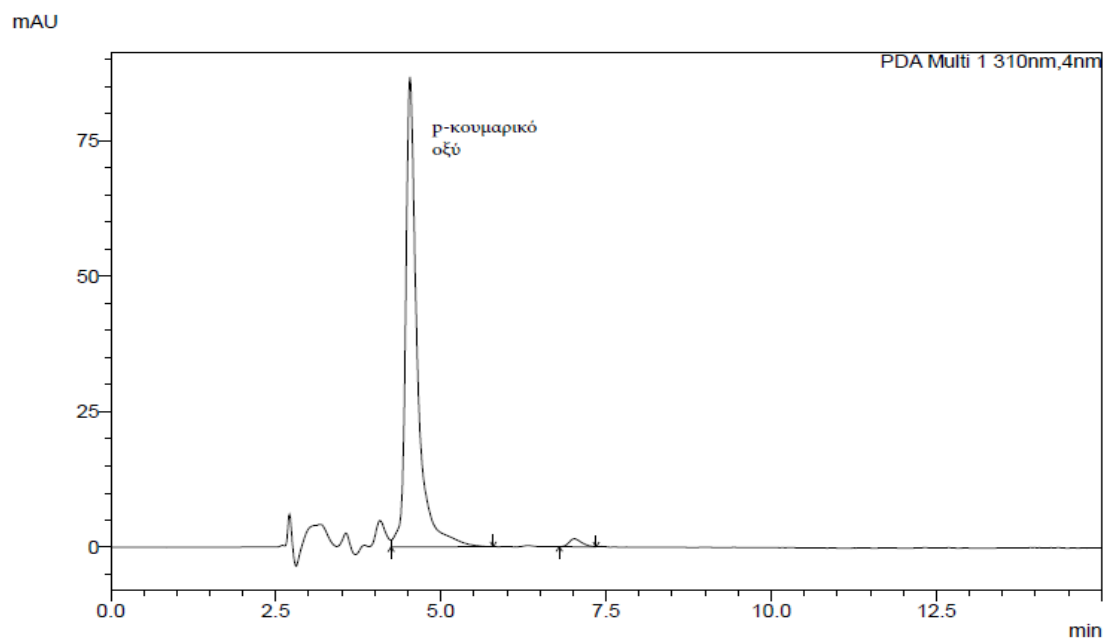
Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα της λιπάσης σε περιβάλλον NaDES να καταλύει την μετεστεροποίηση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**) προς τον p-κουμαρικό οκτυλεστέρα (**3**), αναμίχθηκαν ο εστέρας (**1**) και η 1-οκτανόλη σε γραμμομοριακή αναλογία 1:6 με 10mg λιπάσης σε 1mL NaDES Sorb/Gly/W. Παρατηρήθηκε ότι ο εστέρας **1** διαλυτοποιήθηκε άμεσα στο σύστημα, σε αντίθεση με την περίπτωση της αντίδρασης υδρόλυσης, όπου η διαλυτοποίηση διήρκησε πάνω από 5 ώρες.

Κατά τις αρχικές μετρήσεις μέσω HPLC για τις πρώτες 4 ώρες αντίδρασης δεν παρατηρείται αλλαγή στην ποσότητα του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**). Έπειτα από 2 ημέρες αντίδρασης, η ποσότητα όλου του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα έχει εξαντληθεί και στο χρωματογράφημα εμφανίζεται μια κορυφή

στα  $t=4.5\text{min}$ , η οποία αντιστοιχεί στο *p*-κουμαρικό οξύ (**2**), η ποσότητα του οποίου υπολογίζεται σε  $15.8\text{ mg/L}$  (απόδοση 24%) (Σχήμα 19, σχήμα 20).



**Σχήμα 19:** Χρωματογράφημα αντίδρασης αλκοόλυσης του *p*-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**) με 1-οκτανόλη σε NaDES για  $t = 1\text{ h}$ , όπου η κορυφή στα  $6.981\text{ min}$  αντιστοιχεί στον *p*-κουμαρικό μεθυλεστέρα



**Σχήμα 20:** Χρωματογράφημα αντίδρασης αλκοόλυσης του *p*-κουμαρικού μεθυλεστέρα (**1**) με 1-οκτανόλη σε NaDES για  $t = 2\text{ days}$ , όπου η κορυφή στα  $4.532\text{ min}$  αντιστοιχεί στο *p*-κουμαρικό οξύ

Το αποτέλεσμα αυτό είναι αξιόλογο δεδομένου ότι στην αντίδραση δεν έχει προστεθεί ποσότητα νερού εκτός από αυτή που περιέχεται στο NaDES. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία της 1-οκτανόλης, η οποία είναι λιπόφιλη και βοήθησε στη διαλυτοποίηση του *p*-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο σύστημα.

#### 4. Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διπλωματική εργασία συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν διάφορα συστήματα NaDESs με συστατικά εμπνευσμένα από ωσμωλύτες που συναντώνται σε κύτταρα έμβιων οργανισμών, όπως γλυκερόλη, σορβιτόλη και ουρία. Οι φυσικοί βαθέως ευτηκτικοί διαλύτες που συντέθηκαν χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά ως προς τρεις ιδιότητες τους, το pH, την πολικότητα και το ιξώδες, καθώς παίζουν μεγάλο ρόλο στην λειτουργία τους ως διαλυτικά μέσα. Στην συνέχεια, οι NaDESs χρησιμοποιήθηκαν για αποθήκευση λιπάσης στο εσωτερικό τους και στην συνέχεια για πρώτη φορά για την κατασκευή ευτηκτογελών με πολυσακχαρίτη το αλγινικό νάτριο στις οποίες εγκλείεται ποσότητα λιπάσης. Επιπλέον, γίνεται έλεγχος της ενεργότητας της λιπάσης εντός των συστημάτων NaDESs και εντός των ευτηκτογελών.

Τα NaDESs που συντίθενται είναι τα Bet/Gly/W (1:2:4), Pro/Gly/W (1:2:4), Sar/Gly/W (1:2:4), Sorb/Gly/W (1:2:5), Bet/Sorb/W (1:1:4), Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5), Ur/Sorb/W (1:1:3) και χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση της λιπάσης και την σύνθεση των ευτηκτογελών. Το εύρος του pH των παραπάνω NaDESs είναι 4.2 - 7.6 οπότε μελετάται ένα σημαντικό εύρος. Οι μετρούμενες τιμές του δείκτη μοριακής μετάβασης ( $E_{NR}$ ) είναι μεταξύ 47.97 και 49.72 kcal/mol με ορισμένα NaDESs να έχουν πολικότητα παραπλήσια με του νερού. Τέλος, το ιξώδες των NaDESs κυμαίνεται από 30 έως 400 mPa·s και επηρεάζεται από τα συστατικά και τις αναλογίες που χρησιμοποιούνται σε κάθε περίπτωση.

Όσον αφορά την αποθήκευση λιπάσης σε NaDESs, τα πιο ενδιαφέροντα που μελετήθηκαν είναι τα Sorb/Gly/W (1:2:5) και Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5). Το NaDES Sorb/Gly/W υπερέρχει στην υψηλή ενεργότητα της λιπάσης κατά τις πρώτες ημέρες αποθήκευσής της σε αυτό, ενώ το NaDES Ur/Sorb/Gly/W αναδεικνύεται, διότι διατηρεί σταθερή και σε ικανοποιητικά επίπεδα την ενεργότητα της λιπάσης σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης (55 ημέρες). Σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης επιλέγονται οι 25°C ως βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης του συστήματος NaDES Sorb/Gly/W με λιπάση, αφού τα αποτελέσματα ενεργότητας είναι παραπλήσια με τα αντίστοιχα στους 4°C, οπότε για ενεργειακούς λόγους επιλέγονται οι 25°C. Για το NaDES Ur/Sorb/Gly/W η λιπάση είναι ιδιαίτερα σταθερή ως προς τον χρόνο αποθήκευσης σε οποιαδήποτε θερμοκρασία, ενώ η πιθανότερη εξήγηση για την υψηλότερη ενεργότητα σε μεγαλύτερη θερμοκρασία αποθήκευσης είναι η ευνοϊκότερη διαμόρφωση που λαμβάνει η λιπάση κατά την αποθήκευσή της σε υψηλότερη θερμοκρασία.

Σχετικά με την αποθήκευση λιπάσης σε ευτηκτογέλες, οι δύο βέλτιστες ευτηκτογέλες που προέκυψαν από τα πειράματα, είναι οι ευτηκτογέλες αλγινικού με NaDES Sorb/Gly/W και Sar/Gly/W, οι οποίες έχουν μεγάλη σταθερότητα και οδηγούν σε υψηλές τιμές ενεργότητας της λιπάσης. Κατά την αποθήκευση στους 4°C η ενεργότητα της λιπάσης διατηρείται σε αρκετά υψηλά επίπεδα για τουλάχιστον 20 ημέρες, σε τιμές παραπλήσιες με την αρχική και για τις δύο ευτηκτογέλες, συνεπώς η χαμηλότερη θερμοκρασία ευνοεί το σύστημα λιπάσης σε ευτηκτογέλη. Ακόμη, η υψηλότερη θερμοκρασία 25°C οδηγεί σε υπερδιπλάσια μείωση της ενεργότητας (50-60%) των δύο βέλτιστων ευτηκτογελών, έναντι της

αντίστοιχης μείωσης (20%) στην θερμοκρασία των 4°C, σε 35 ημέρες αποθήκευσης. Σημειώνεται ότι η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W υπερέχει ελαφρώς όσον αφορά την ενεργότητα σε μεγάλους χρόνους αποθήκευσης.

Για την σύγκριση της αποθήκευσης της λιπάσης σε συστήματα NaDESs και σε ευτηκτογέλες επιλέγεται το βέλτιστο NaDES Sorb/Gly/W και η αντίστοιχη ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W. Από τις τιμές ενεργότητας των δύο συστημάτων παρατηρείται ότι το σύστημα λιπάσης σε ευτηκτογέλη έχει μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας, πάνω από 40%, σε όλη την διάρκεια της αποθήκευσης, έναντι της λιπάσης σε NaDES Sorb/Gly/W. Σχετικά με την διατήρηση της ενεργότητας και την σταθερότητα της λιπάσης, προκύπτει ότι η ευτηκτογέλη συνιστά ένα πιο σταθερό σύστημα για την αποθήκευση της λιπάσης που εμφανίζει μικρή μείωση της ενεργότητάς της σε αρκετά μεγάλους χρόνους παραμονής. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της λιπάσης εντός NaDESs η ενεργότητα του συστήματος μειώνεται με σχεδόν γραμμικό τρόπο με την πάροδο του χρόνου και με μεγαλύτερο ρυθμό συγκριτικά με την ευτηκτογέλη. Η μείωση της ενεργότητας έπειτα από 20 ημέρες παραμονής της λιπάσης στο NaDES είναι 93 % σε σχέση με την αρχική τιμή.

Συνολικά, η ευτηκτογέλη με Sorb/Gly/W αποτελεί την καλύτερη επιλογή σχετικά με την διατήρηση της λιπάσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα, καθώς και την επίτευξη υψηλής ενεργότητας σε αντιδράσεις καταλυόμενες από την λιπάση.

Επιπλέον, γίνεται εφαρμογή των καταλυτικών συστημάτων λιπάσης σε αντιδράσεις υδρόλυσης και μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα. Αρχικά, πραγματοποιείται η αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον NaDES Sorb/Gly/W (1:2:5) με λιπάση κατά την οποία η απόδοση και η ταχύτητα της αντίδρασης φαίνεται να είναι αρκετά χαμηλές (8% σε 5 ημέρες αντίδρασης), με αποτέλεσμα η διεργασία να μην είναι ιδιαίτερα αποδοτική. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται στη μικρή διαλυτότητα του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο NaDES όπως επίσης και στην πιθανή συμμετοχή του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Η αντίστοιχη αντίδραση υδρόλυσης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος με λιπάση δεν είναι εφικτή, αφού ακόμη και έπειτα από 5 ημέρες αντίδρασης δεν εμφανίζεται συγκέντρωση παραγόμενου p-κουμαρικού οξέος, γεγονός που αποδεικνύει ότι η αντίδραση σε περιβάλλον ρυθμιστικού διαλύματος δεν πραγματοποιείται και η επιλογή του συστήματος NaDES ως διαλύτη είναι η καλύτερη επιλογή.

Τέλος, δοκιμάζεται η αντίδραση μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα με 1-οκτανόλη σε περιβάλλον NaDES με λιπάση, κατά την οποία έπειτα από 2 ημέρες αντίδρασης η ποσότητα όλου του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα έχει καταναλωθεί. Από την HPLC προσδιορίστηκε ότι ένα από τα προϊόντα της αντίδρασης είναι το p-κουμαρικό οξύ. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αξιολογικό δεδομένου ότι στην αντίδραση δεν έχει προστεθεί ποσότητα νερού εκτός από αυτή που περιέχεται στο NaDES. Αυτό οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία της 1-οκτανόλης, η οποία είναι λιπόφιλη και βοήθησε στη διαλυτοποίηση του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα στο σύστημα.



## 5. Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Η συνολική μελέτη που προηγήθηκε αναδεικνύει την χρησιμότητα των συστημάτων φυσικών βαθέως ευτηκτικών διαλυτών (NaDESs), που συντίθενται από φυσικούς ωσμωλύτες, στην αποθήκευση λιπάσης στο εσωτερικό τους διατηρώντας το ένζυμο αναλλοίωτο για μεγαλύτερο χρόνο και προσδίδοντας υψηλές τιμές ενεργότητας, έναντι ενός ρυθμιστικού διαλύματος. Επιπλέον, με τα NaDESs κατασκευάστηκαν ευτηκτογέλες αλγινικού με παρουσία λιπάσης στο εσωτερικό τους και μελετήθηκε η ενεργότητά τους μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα. Ωστόσο, για την πληρέστερη ολοκλήρωση της παρούσας έρευνας προτείνονται ορισμένες επιπλέον ιδέες.

Σε αρχικό στάδιο θα ήταν χρήσιμο να δοκιμαστούν και νέα NaDESs, που βασίζονται στις βέλτιστες επιλογές Sorb/Gly/W (1:2:5) και Ur/Sorb/Gly/W (2:1:1:5). Δηλαδή, προτείνεται η σύνθεση NaDESs βασισμένων στα συστατικά ουρία, σορβιτόλη, γλυκερόλη, νερό τροποποιώντας τις αναλογίες μεταξύ τους. Μέσω της μελέτης της ενεργότητας της λιπάσης σε αυτά, πιθανότατα θα προκύψει κάποιο βελτιωμένο σύστημα, με αυξημένη ενεργότητα του ενζύμου και καλύτερες φυσικοχημικές ιδιότητες του NaDES, όπως το μειωμένο ιξώδες, η μεγαλύτερη πολικότητα και τιμή pH κοντά στο βέλτιστο λειτουργίας της λιπάσης.

Ακόμη, μια πρόταση αποτελεί η πραγματοποίηση των μετρήσεων ενεργότητας της λιπάσης εντός των NaDESs αλλά και εντός των ευτηκτογελών, χρησιμοποιώντας διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις ενζύμου και υποστρώματος παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα. Με τον τρόπο αυτό θα αναδειχθεί η εξάρτηση της ενεργότητας από την ποσότητα ενζύμου και από την αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος της αντίδρασης. Θα ήταν χρήσιμο να γίνει δοκιμή ενεργότητας και με χρήση διαφορετικών τύπων λιπασών με στόχο την εύρεση της βέλτιστης λιπάσης που δρα στον μέγιστο βαθμό εντός των NaDESs. Συμπληρωματικά, προτείνεται η μέτρηση της ενεργότητας της λιπάσης χρησιμοποιώντας και κάποιο εναλλακτικό υπόστρωμα (π.χ. 4-Nitrophenyl acetate, 4-Nitrophenyl butyrate) που εμφανίζει μικρότερη λιποφιλία από το μελετούμενο υπόστρωμα παλμιτικού p-νιτροφαινυλεστέρα. Ακόμη, μπορούν να γίνουν μετρήσεις και σε διαφορετικά pH για την οριοθέτηση του βέλτιστου εύρους λειτουργίας για κάθε περίπτωση.

Σχετικά με τις αντιδράσεις υδρόλυσης και μετεστεροποίησης του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα, η μελέτη τους είναι σε αρκετά πρώιμο στάδιο και είναι σκόπιμη η τροποποίηση των αρχικών ποσοτήτων ενζύμου και p-κουμαρικού μεθυλεστέρα καθώς και η δοκιμή διαφορετικών αναλογιών μεταξύ των αντιδρώντων και του χρησιμοποιούμενου διαλύτη NaDES. Επιπλέον, η προσθήκη μικρής ποσότητας νερού στο σύστημα σε ελεύθερη μορφή ή εντός της δομής του NaDES μπορεί να συμβάλει θετικά στην αύξηση της μετατροπής του p-κουμαρικού μεθυλεστέρα σε προϊόντα. Προτείνεται και η δοκιμή διαφορετικών διαλυτών NaDESs κυρίως χαμηλού ιξώδους για καλύτερη συμπεριφορά ως διαλύτες, καθώς και επιλογή διαφορετικών θερμοκρασιών αντίδρασης για βελτίωση του ρυθμού της. Τέλος, σημαντική είναι και η μελέτη των αντιδράσεων αυτών χρησιμοποιώντας ως καταλύτη τα συστήματα ευτηκτογέλης-λιπάσης.

## Βιβλιογραφία

1. Yavari Maroufi L., Rashidi M., Tabibiazar M., Mohammadi M., Pezeshki A., Ghorbani M. (2021). Recent Advances of Macromolecular Hydrogels for Enzyme Immobilization in the Food Products. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 12(2), 309-318.
2. Zaitsev Y. S., Savina A. A., Zaitsev S. I. (2019). Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 272, 102016.
3. Pirozzi, D., Latte, A., Sannino, F. (2023). Immobilization of Lipases on Chitosan Hydrogels Improves Their Stability in the Presence of the Products of Triglyceride Oxidation. *Gels*, 9, 776.
4. Sharma R., Chisti Y., Banerjee C. U. (2001). Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.
5. Ito T., Kikuta H., Nagamori E., Honda H., Ogino H., Ishikawa H., Kobayashi T. (2001). Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J Biosci Bioeng*, 91, 245 – 250.
6. Chisti Y., Flickinger MC., Drew SW. (1999). Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation*, 5, 2446 – 62.
7. Sugihara A., Tani T., Tominaga Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *J Biochem*, 6, 109-211.
8. Chartrain M., Katz L., Marcin C., Thien M., Smith S., Fisher F., Goklen K., Salmon P., Brix T., Price K., Greasham R. (1993). Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microb Technol*, 15, 575 – 580.
9. Hiol A., Jonzo MD., Rugani N., Druet D., Sarda L., Comeau LC. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol*, 26, 421 – 430.
10. Shehata M., Unlu A., Sezerman U., Timucin E. (2020). Lipase and Water in a Deep Eutectic Solvent: Molecular Dynamics and Experimental Studies of the Effects of Water-In-Deep Eutectic Solvents on Lipase Stability. *J. Phys. Chem. B*, 124, 8801–8810.
11. Martinelle M., Holmquist M., Hult K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim Biophys Acta*, 1258, 272 – 276.
12. Bjorkling F., Frykman H., Godtfredsen SE., Kirk O. (1992). Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidation. *Tetrahedron*, 48(22), 4587–92.
13. Kapoor M., Gupta MN. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem*, 47(4), 555–69.
14. Brzozowski A. M., Derewenda U., Derewenda Z. S., Dodson G. G., Lawson D. M., Turkenburg J. P., Bjorkling F., Høge-Jensen B., Patkar S. A., Thim L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature*, 351, 491–494.

15. Losada-Garcia N., Berenguer-Murcia A., Cazorla-Amorós D., Palomo J. (2019). Efficient Production of Multi-Layer Graphene from Graphite Flakes in Water by Lipase-Graphene Sheets Conjugation. *Nanomaterials*, 9, 1344.
16. Jaeger KE., Reetz TM. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 16, 96 – 403.
17. Undurraga D., Markovits A., Erazo S. (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. *Process Biochem*, 36, 933 – 939.
18. Berglund P., Hutt K. (2000). Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN, editor. *Stereoselective biocatalysis*. New York: Marcel Dekker, p. 633-657.
19. Arroyo M., Sinisterra JV. (1995). Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett*, 17, 525 – 30.
20. Chen HP., Hsiao KF., Wu SH., Wang KT. (1995). Regioselectivity enhancement by partial purification of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*, 17, 305 – 308.
21. Lam L., Ilies M.A. (2022). Evaluation of the Impact of Esterases and Lipases from the Circulatory System against Substrates of Different Lipophilicity. *Int. J. Mol. Sci*, 23, 1262.
22. Xiang J., Liu X., Yuan G., Zhang R., Zhou Q., Xie T., Shen Y. (2021). Nanomedicine from amphiphilized prodrugs: Concept and clinical translation. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 179.
23. Lee Y., Thompson D.H. (2017). Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol*, 9, e1450.
24. Ahmed W., Orasanu G., Nehra V., Asatryan L., Rade D.J., Ziouzenkova O., Plutzky J. (2006). High-density lipoprotein hydrolysis by endothelial lipase activates PPARalpha: A candidate mechanism for high-density lipoprotein-mediated repression of leukocyte adhesion. *Circ. Res.*, 98, 490–498.
25. Carrin ME., Crapiste GH. (2008). Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmiticstearic acid mixture. *J Food Eng*, 84(2), 243–249.
26. Pérez M.M., Gonçalves E.C.S., Vici A.C., Salgado J.C.S., de Moraes Polizeli, M.d.L.T. (2019). Fungal Lipases: Versatile Tools for White Biotechnology. In: Yadav A., Mishra S., Singh S., Gupta A. (eds) *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Fungal Biology*. Springer, Cham.
27. Anastas P. T. and Warner J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, I. Horvath and P. T. Anastas, Chem. Rev., 2007, 107, 2167.
28. Anastas P., Eghbali N. (2009). *Green Chemistry: Principles and Practice. Chemical Society Reviews, Royal Society of Chemistry*, 39, p. 301-312.
29. S. Murai. (1999). Activation of Unreactive Bonds and Organic Synthesis, *Topics in Organometallic Chemistry*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, vol. 3.
30. R. B. Silverman. (2002). *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, Academic Press, New York.
31. Rajan M., Prabhavathy A., Ramesh U. (2015). Natural Deep Eutectic Solvent Extraction Media for *Zingiber officinale* Roscoe: The Study of Chemical

- Compositions, Antioxidants and Antimicrobial Activities. *The Natural Products Journal*, 5 (1), 3-13.
32. Koutsoukos S., Tsiaka T., Tzani A., Zoumpoulakis P., Detsi A. (2019). Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production*, 241, 118384.
  33. Panic M., Mia Radovic M., Izabela Maros I., Tusek A., Bubalo M, Redovnikovic I. (2021). Development of environmentally friendly lipase-catalysed kinetic resolution of (R, S)-1-phenylethyl acetate using aqueous natural deep eutectic solvents. *Process Biochemistry*, 102, 1–9.
  34. Abbott P. A. et al. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.*, 70–71.
  35. Laguerre M., Lavaud A. (2016). The rise of deep eutectics from nature to cosmetics. *Naturex*, 45-47.
  36. Bubalo C. M., Andreou T., Panić M., Radović M., Radoševića K., Redovnikovića I. (2023). Natural multi-osmolyte cocktails form deep eutectic systems of unprecedented complexity: Discovery, affordances and perspectives. *Green Chemistry*, 25, 3398.
  37. Jiake Wang, Shangzhong Zhang, Zhongzheng Ma, Lifeng Yan. (2021). Deep eutectic solvents eutectogels: progress and challenges. *Green Chemical Engineering*, 2, 359–367.
  38. Matthew J. Panzer. (2022). Holding it together: noncovalent cross-linking strategies for ionogels and eutectogels. *Mater. Adv.*, 3, 7709.
  39. Chaoxi Zeng, Haiyang Zhao, Zheng Wan, Qian Xiao, Huiping Xia, Shiyin Guoab. (2020). Highly biodegradable, thermostable eutectogels prepared by gelation of natural deep eutectic solvents using xanthan gum: preparation and characterization. *RSC Adv.*, 10, 28376.
  40. Elgharbawy A. A., Hayyan A., Hayyan M., Rashid S. N., Nor M. R. M., Zulkifli M. Y., Alias Y., Mirghania M. E. S. (2018). Shedding Light on Lipase Stability in Natural Deep Eutectic Solvents. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 32, (3), 359–370.
  41. Yang Z. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents and Their Applications in Biotechnology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 168, 31-59.
  42. You Tian, Da-Wen Sun, Liang Xu, Tian-Hao Fan, Zhiwei Zhu. (2022). Bio-inspired eutectogels enabled by binary natural deep eutectic solvents (NADESs): Interfacial anti-frosting, freezing-tolerance, and mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 128, 107568.
  43. Yancey P. H., Burg M. B. (1990). Counteracting effects of urea and betaine in mammalian cells in culture. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol*, 258.
  44. Yancey, P. H. (2004). Compatible and counteracting solutes: protecting cells from the Dead Sea to the deep sea. *Sci. Prog.*, 87, 1–24.
  45. Costanz, J. P., Lee R. E. (2005). Cryoprotection by urea in a terrestrially hibernating frog. *J. Exp. Biol.*, 208, 4079–4089.
  46. Choi Y. H. et al. (2011). Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol.*, 156, 1701–1705.

47. Zhang Q., De Oliveira Vigier K., Royer S., Jérôme F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), p. 7108.
48. El Achkar T., Greige-Gerges H., Fourmentin S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397-3408.
49. O. S. Hammond, D. T. Bowron, K. J. Edler. (2017). The Effect of Water upon Deep Eutectic Solvent Nanostructure: An Unusual Transition from Ionic Mixture to Aqueous Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 9782–9785.
50. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp GJ., Verpoorte R., Choi YH. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta*, 766, 61–68.
51. El Achkar T., Greige-Gerges H., Fourmentin S. (2021). Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397-3408.
52. Wang X., Wu Y., Li J., Wang A., Li G., Ren X., et al. (2020). Ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of echinacoside and oleuropein from *Syringa pubescens* Turcz. *Industrial Crops & Products*, 151, 112442.
53. Degam G. (2017). Deep Eutectic Solvents Synthesis, Characterization and Applications in Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Theses and Dissertations*, 1156.
54. Vanda H., Dai Y., Wilson E. G., Verpoorte R., Choi Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 628-638.
55. Vanda H., Verpoorte R., Klinkhamer P. G., Choi Y. H. (2019). Natural deep eutectic solvents: From their discovery to their applications. *Deep Eutectic Solvents: Synthesis, Properties, and Applications*, 61-81.
56. Gomez FJV., Espino M., Fernández M., Raba J., Silva MF. (2016) Enhanced electrochemical detection of quercetin by natural deep eutectic solvents. *Anal. Chim. Acta*, 936, 91–96.
57. Durand E., Lecomte J., Villeneuve P. (2013). Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 379–385.
58. Liu Y., Friesen J. B., McAlpine J. B., Lankin D. C., Chen S. N., Pauli G. F. (2018). Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. *Journal of natural products*, 81(3), 679-690.
59. Paiva A., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063–1071.
60. Shakeri F., Ariaeenejad S., Ghollasi M., Motamedi E. (2022). Synthesis of two novel bio-based hydrogels using sodium alginate and chitosan and their proficiency in physical immobilization of enzymes. *Scientific Reports*, 12, 2072.
61. Meyer J., Meyer L.E., Kara S. (2021). Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. *Engineering in life sciences*, 22, 165-177.

62. Wolf M., Tambourgib E. B., Paulino A.T. (2021). Stability of  $\beta$ -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. *Colloids and Surfaces A*, 609, 125679.
63. Durand E., Lecomte J., Baréa B., Dubreucq E., Lortie R., Villeneuve P. (2013). Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chem.*, 15, 2275–2282.
64. Dawes CS., Konig H., Lin CC. (2017). Enzyme-immobilized hydrogels to create hypoxia for in vitro cancer cell culture. *J. Biotechnol.*, 248, 25-34.
65. Rajdeo K., Harini T., Lavanya K., Fadnavis NW. (2016). Immobilization of pectinase on reusable polymer support for clarification of apple juice. *Food Bioproc Tech*, 99, 12-9.
66. Pereira RM., Andrade GS., de Castro HF., Nogueira Campos MG. (2017). Performance of chitosan/glycerol phosphate hydrogel as a support for lipase immobilization. *Mater Res*, 20, (Suppl2):190-201.
67. Motamedi E. et al. (2021). Upgrading the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by immobilization of metagenome-derived novel halotolerant cellulase on the carboxymethyl cellulose-based hydrogel. *Cellulose*, 8, 3485–3503.
68. Imam T. H., Hill K., Reid A., Mix S., Marr C. P., Marr C. A. (2023). Supramolecular Ionic Liquid Gels for Enzyme Entrapment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 11 (18), 6829-6837.
69. Farooq M.Q., Abbasi N.M., Anderson J.L. (2020). Deep eutectic solvents in separations: Methods of preparation, polarity, and applications and capillary electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 1633, 461613.
70. Liang X., Zhu Y., Qi B., Li S., Luo J., Wan Y. (2021). Structure-property-performance relationships of lactic acid-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond acceptors for corn stover pretreatment. *Bioresour. Technol.*, 336, 125312.
71. Μαυρομούστακος Θ., Ματσούκας Ι. (2006). Αρχές και Εφαρμογές Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία Τροφίμων και Ποτών, Εκδόσεις Γιάννης Β. Παρισιάνος. 16-20.
72. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2007). Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η έκδοση., Εκδόσεις Κωσταράκη, 569-603.
73. Yogesh Kumar, Sayed Md Mumtaz, Mustaq Ahmad. (2018). HPLC: Principle and Maintenance with Application. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development*, 2 (5), 1618-1626.
74. Hyperlink: What is HPLC (High Performance Liquid Chromatography): SHIMADZU (Shimadzu Corporation)
75. Durand E., Lecomte J., Baréa B., Dubreucq E., Lortie R., Villeneuve P. (2013). Evaluation of deep eutectic solvent-water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chem.*, 15, 2275–2282.