



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ IV
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ενζυμική Εστεροποίηση Κυτταρινούχων Υποστρωμάτων
σε Μη Συμβατικά Συστήματα**

Διπλωματική Διατριβή

Ζαραφέτα Δήμητρα

Επιβλέπων Καθηγητής: Φραγκίσκος Κολίσης

ΑΘΗΝΑ 2009

Στους γονείς μου,

για την υποστήριξη και την αγάπη τους...

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, είτε με τη βοήθεια τους ,είτε με την υποστήριξή τους.

Ευχαριστώ τους καθηγητές μου, τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, καθώς και όλους όσους δουλέψαμε μαζί τους τελευταίους 14 μήνες, για την προθυμία τους να βοηθήσουν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της Γεωπονικής Σχολής, κύριο Παππά και κύριο Ταραντίλη για τη σημαντική βοήθεια τους στο αναλυτικό κομμάτι του FTIR.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ, στον υποψήφιο διδάκτορα, «δάσκαλο» και φίλο , Σταύρο Γκρέμο, για τη συνεχή βοήθεια του και υποστήριξή του.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	4
Περίληψη.....	5
1.Θεωρητικό μέρος	
1.1 Η Κυτταρίνη και τα παράγωγά της γενικά.....	6
1.2 Δομή και ιδιότητες.....	9
1.3 Οι εστέρες κυτταρίνης και οι εφαρμογές τους.....	11
1.4 Ένζυμα και μηχανισμοί.....	16
1.5 Μη συμβατική βιοκατάλυση.....	27
1.5.1 Οι λιπάσες σε μη συμβατικά συστήματα.....	29
1.5.3 Ιοντικά υγρά.....	32
1.5.3.1 Μηχανισμός διάλυσης κυτταρίνης σε ιοντικό υγρό.....	39
2. Πειραματικό Μέρος	
2.1 Υλικά.....	40
2.1.1 Ένζυμα.....	40
2.1.2 Υποστρώματα.....	41
2.1.3 Λιπαρά.....	42
2.1.4 Οργανικοί διαλύτες.....	43
2.1.5 Ιοντικά υγρά.....	43
2.1.6 Λοιπά αντιδραστήρια.....	43
2.2 Όργανα.....	44
2.3 Μέθοδοι.....	46
2.3.1 Επεξεργασία κυτταρίνης με ιοντικά υγρά.....	46
2.3.2 GC & UV.....	47
2.3.3 FTIR.....	47
2.3.4 Χημική υδρόλυση εστέρων.....	50
2.4 Ενζυμικές Αντιδράσεις	51
2.5 Πειραματικά Αποτελέσματα.....	66
2.6 Σχόλια και Συμπεράσματα.....	84
2.7 Προτάσεις για το Μέλλον.....	86
3. Βιβλιογραφία.....	87

Περίληψη

Η κυτταρίνη είναι ένα πολυμερές της γλυκόζης που βρίσκεται σε αφθονία στη φύση, είναι εύκολα διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες και διατίθεται σε χαμηλό κόστος. Παρόλα αυτά, λόγω της χημικής της δομής και της στερεοχημικής της διαμόρφωσης (μεγάλου μήκους αλυσίδες ισχυρά συνδεδεμένες μεταξύ του με δεσμούς υδρογόνου) είναι δύσκολο να επεξεργαστεί ενζυμικά. Για το λόγο αυτό στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, ως κυτταρινούχο υπόστρωμα της ενζυμικής εστεροποίησης χρησιμοποιήθηκαν αρχικά παράγωγα της κυτταρίνης [όπως η καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose ή CMC), η αίθυλοκυτταρίνη (ethyl-cellulose), η μέθυλο-κυτταρίνη (methyl-cellulose)] και στη συνέχεια η καθαρή κυτταρίνη, προσπαθώντας, με τρόπους που αναπτύσσονται παρακάτω, να εξαλειφθεί αυτή η δυσκολία.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν, σε υδατικό περιβάλλον (στο φυσικό τους δηλαδή περιβάλλον) καταλύουν την αντίδραση της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών (με εξαίρεση τη λιπάση από *aspergillus niger* η οποία συνθέτει). Έτσι, για να επιτευχθεί η εστεροποίηση των κυτταρινούχων υποστρωμάτων, (την αντίστροφη δηλαδή διαδικασία της υδρόλυσης τους) χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο βιοκατάλυσης συστήματα από τα οποία απουσίαζε το νερό. Με τον τρόπο αυτό μετατοπίστηκε θερμοδυναμικά η θέση της χημικής ισορροπίας περνώντας από την υδρόλυση στη σύνθεση.

Στόχος αυτής της προσπάθειας ήταν η παραγωγή εστέρων κυτταρίνης οι οποίοι βρίσκουν εφαρμογή κυρίως στο χώρο της φαρμακοβιομηχανίας και συγκεκριμένα σε συστήματα «ελεγχόμενης αποδέσμευσης» (drug delivery), καθώς και σε άλλες εφαρμογές ως βιοδιασπώμενα θερμοπλαστικά.

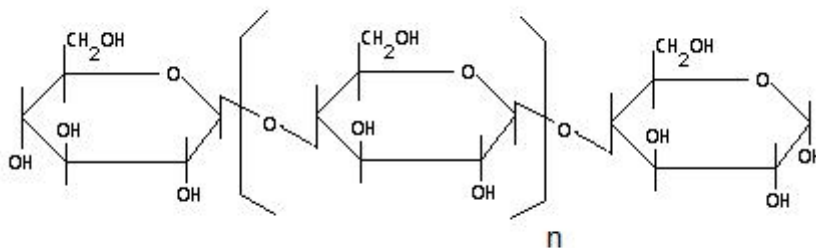
Στη διπλωματική αυτή εργασία επιτεύχθηκε η παραγωγή οξικού, προπιονικού, λαυρικού, εξανοϊκού και στεατικού εστέρα κυτταρίνης (με ποσοστά εστεροποίησης (από 1% έως 9%). Ωστόσο, τα ποσοστά εστεροποίησης μπορούν να βελτιστοποιηθούν με περαιτέρω μελέτη προς αυτή την κατεύθυνση.

Γενικά πρόκειται για μια καινοτόμα μελέτη, πάνε σε νέες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται συνδυαστικά, όπως αυτή των ιοντικών υγρών και της μη συμβατικής βιοκατάλυσης. Παράλληλα πρόκειται για μια «πράσινη» τεχνολογία σύνθεσης καινοτόμων βιολικών.

1.Θεωρητικό Μέρος

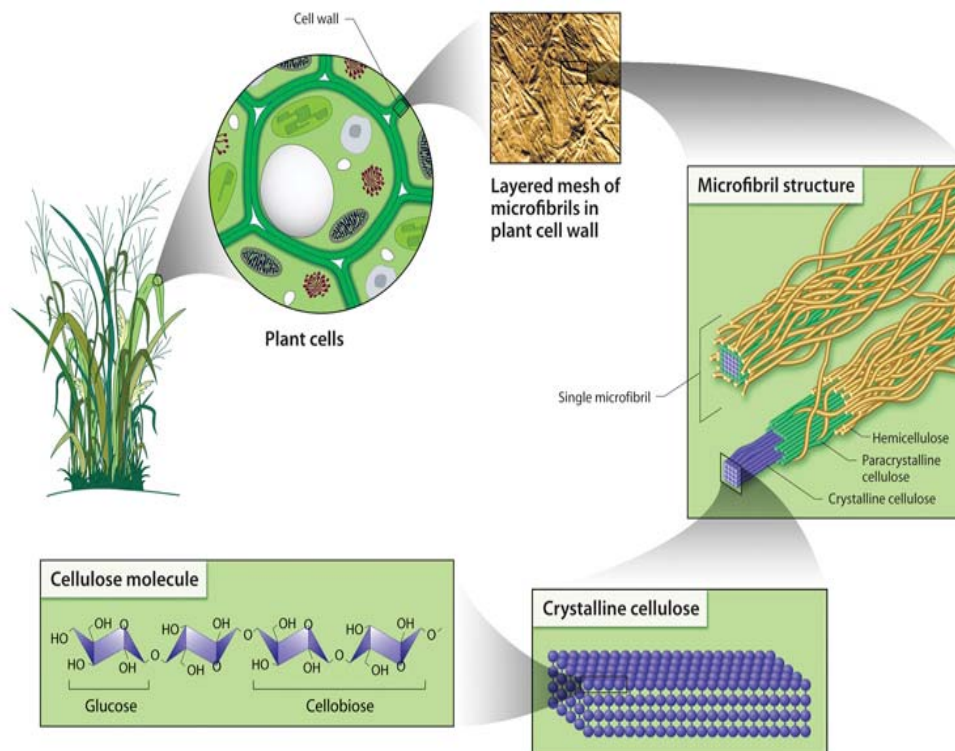
1.1 Η ΚΥΤΤΑΡΙΝΗ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΗΣ

Η κυτταρίνη είναι μια οργανική ένωση με χημικό τύπο $(C_6H_{10}O_5)_n$ και αποτελεί ένα γραμμικό πολυμερές μονάδων D-γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με $\beta(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς (Σχήμα 1). Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των μορίων της κυτταρίνης ποικίλει από μερικές εκατοντάδες έως και κάποιες χιλιάδες. [2],[3]



Σχήμα 1. Η δομή της κυτταρίνης

Η κυτταρίνη είναι το δομικό συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των πράσινων φυτών και πολλών μορφών αλγών. (Σχήμα 2) Πολλά είδη βακτηρίων επίσης την εκκρίνουν για να σχηματίσουν βιοφίλμ. Η κυτταρίνη είναι η πιο κοινή οργανική ένωση στη γη. Περίπου το 33% της φυτικής βιομάζας είναι κυτταρίνη. (η μέση περιεκτικότητα του βαμβακιού σε κυτταρίνη είναι 90% και του ξύλου 50%). [4]



Σχήμα 2. Ο ρόλος της κυτταρίνης στη φύση

Μερικά ζώα, ειδικά τα μηρυκαστικά και οι τερμίτες, μπορούν να αφομοιώσουν την κυτταρίνη με τη βοήθεια των συμβιωτικών μικροοργανισμών που ζουν στο έντερό τους. Η κυτταρίνη δεν είναι μεταβολίσιμη από τον άνθρωπο και αναφέρεται συχνά ως "διαιτητική ίνα".

ΙΣΤΟΡΙΑ

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

ΕΜΠΟΡΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

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

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

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

Η κυτταρίνη χρησιμοποιείται για να κάνει υδατοδιαλυτές συγκολλητικές ουσίες όπως η μεθυλική και η καρβόξυμεθύλο-κυτταρίνη που χρησιμοποιούνται στη συρραφή ταπετσαριών. Η μικροκρυσταλλική κυτταρίνη και η κονιοποιημένη κυτταρίνη χρησιμοποιούνται ως ανενεργά πληρωτικά υλικά σε φαρμακευτικές ταμπλέτες [7] και ως σταθεροποιητές στα επεξεργασμένα τρόφιμα.

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

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

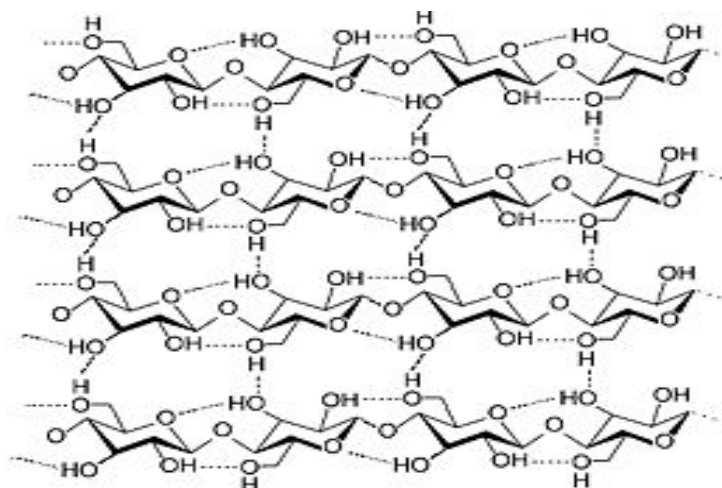
Τέλος, η μετατροπή της κυτταρίνης σε βιοκαύσιμα όπως η κυτταρινική αιθανόλη είναι υπό έρευνα ως εναλλακτική πηγή καυσίμων.

1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

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

Η κυτταρίνη αποτελείται από μονάδες D-γλυκόζης, οι οποίες συνδέονται με β(1→4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αυτός ο τύπος γλυκοζιτικού δεσμού είναι που διαφοροποιεί σε σχέση με άλλους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και το γλυκογόνο που έχουν α(1→4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Τα υδροξύλια της κυτταρίνης αναπτύσσουν δεσμούς υδρογόνου με άτομα οξυγόνου που βρίσκονται στην ίδια ή σε μια γειτονική αλυσίδα, κρατώντας τις αλυσίδες σταθερά μαζί δίπλα-δίπλα διαμορφώνοντας μικροϊνίδια με μεγάλη αντοχή σε εφελκυσμό (Σχήμα 3). Αυτή η ισχυρή σύνδεση είναι σημαντική στα κυτταρικά τοιχώματα, όπου τα μικροϊνίδια παγιδεύονται σε μια μήτρα υδατανθράκων (ημικυτταρίνη, λιγνίνη), παρέχοντας ακαμψία στα κύτταρα των φυτών.

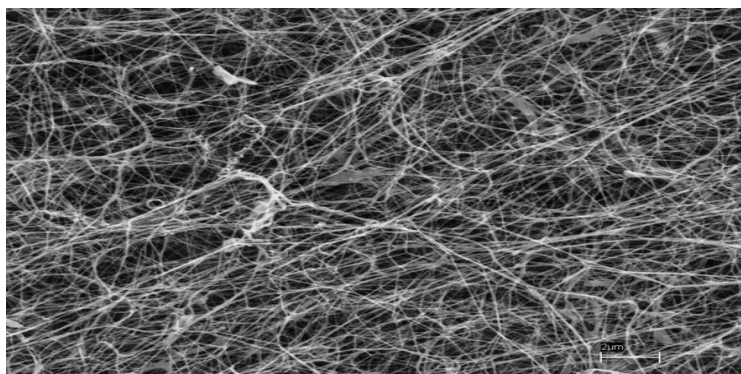


Σχήμα 3. Πλέγμα αλυσίδων κυτταρίνης, στο οποίο απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια της κυτταρίνης

Σε σύγκριση με το άμυλο, η κυτταρίνη είναι ακόμη πιο κρυσταλλική. Το άμυλο αν και μετατρέπεται από κρυσταλλικό σε άμορφο όταν θερμαίνεται στους 60-70 °C

σε υδατικό περιβάλλον, η κυτταρίνη απαιτεί θερμοκρασία 320 °C και πίεση 25 MPa για να γίνει άμορφη στο ίδιο μέσο. [9]

Διάφορες δομές της κυτταρίνης είναι γνωστές, σε σχέση με τη θέση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις αλυσίδες. Η φυσική κυτταρίνη είναι η κυτταρίνη I, με δομές τις I_α και I_β. Η κυτταρίνη που παράγεται από βακτήρια και άλγη (σχήμα 4) περιέχει κυρίως τον τύπο I_α ενώ η κυτταρίνη των ανώτερων φυτών αποτελείται κυρίως από τον τύπο I_β. Η κυτταρίνη στις αναγεννημένες ίνες κυτταρίνης είναι η κυτταρίνη II. Η μετατροπή της κυτταρίνης I στην κυτταρίνη II δεν είναι αντιστρεπτή, με την κυτταρίνη I είναι μετασταθής και η κυτταρίνη II είναι σταθερή. Με διάφορες χημικές επεξεργασίες είναι δυνατό να παραχθούν οι δομές της κυτταρίνης III και της κυτταρίνης IV.[10]



Σχήμα 4: Μικροβιακή κυτταρίνη

Πολλές ιδιότητες της κυτταρίνης εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας της ή το βαθμό πολυμερισμού της, δηλ. τον αριθμό των μονάδων γλυκόζης που συνιστούν ένα πολυμερές μόριο. Η κυτταρίνη από πολτό ξύλου έχει χαρακτηριστικά μήκη αλυσίδων μεταξύ 300 και 1700 μονάδων. Το βαμβάκι και άλλες ίνες φυτών όπως και οι βακτηριακές κυτταρίνες έχουν μήκη αλυσίδων τα οποία κυμαίνονται από 800 ως 10.000 μονάδες. [6] Τα μόρια με πολύ μικρό μήκος αλυσίδας τα οποία προέρχονται από την αποικοδόμηση της κυτταρίνης είναι γνωστά σαν κυτταρινοδεξτρίνες. Σε αντίθεση με την μακριάς αλυσίδας κυτταρίνη, οι κυτταρινοδεξτρίνες είναι διαλυτές στο νερό και σε κάποιους οργανικούς διαλύτες.

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

Τα θηλαστικά δεν έχουν τη δυνατότητα να αποικοδομήσουν άμεσα την κυτταρίνη. Μερικά μηρυκαστικά όπως οι αγελάδες και τα πρόβατα περιέχουν ορισμένα συμβιωτικά αναερόβια βακτηρία (όπως τα *cellulomonas*) στη χλωρίδα του εντερικού τους τοιχώματος, και αυτά τα βακτηρία παράγουν ένζυμα για να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη. Τα προϊόντα της αποικοδόμησης χρησιμοποιούνται στη συνέχεια από τα θηλαστικά. Ομοίως, οι κατώτεροι τερμίτες περιέχουν πρωτόζωα που παράγουν τέτοια ένζυμα. Οι ανώτεροι τερμίτες χρησιμοποιούν βακτήρια για την ίδια δουλειά. Οι μύκητες, που στη φύση είναι αρμόδιοι για την ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών, είναι επίσης ικανοί να αποικοδομήσουν την κυτταρίνη.

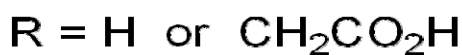
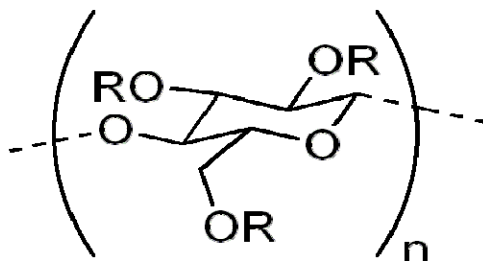
Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς στην κυτταρίνη είναι οι γλυκοζιτικές υδρολάσες (*glycoside hydrolases*) συμπεριλαμβανομένων των ένδο- και έξω- κυτταρινασών. Αυτά τα είδη των ενζύμων παράγονται και εκκρίνονται συνήθως συνδυαστικά, σαν μία ομάδα ενζύμων και πολλές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

1.3 ΕΣΤΕΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥΣ

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

➤ **καρβόξυμέθυλο κυτταρίνη(Carboxymethyl cellulose) ή εν συντομία CMC**

Η CMC είναι όπως αναφέρθηκε ένα παράγωγο της κυτταρίνης με καρβοξυλομάδες (-CH₂-COOH) προσδεδεμένες σε μερικές υδροξυλ- ομάδες των μονομερών της, τα οποία αποτελούν το «σκελετό» της ένωσης (σχήμα 5).

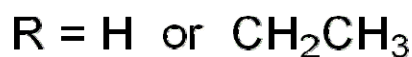
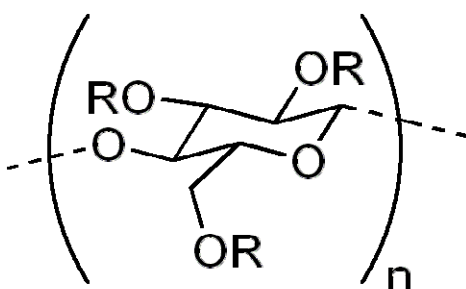


Σχήμα 5: Μονομερές της CMC

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

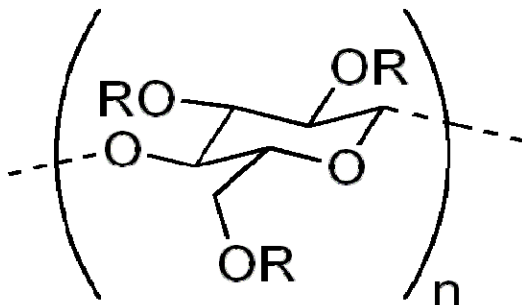
Άλλα παράγωγα είναι:

➤ Η **αιθυλοκυτταρίνη (Ethyl cellulose)**, είναι παράγωγο της κυτταρίνης στην οποία μερικές από τις υδροξυλομάδες των μονομερών της γλυκόζης, έχουν αντικατασταθεί με αίθυλ-αίθερ-ομάδες



Σχήμα 6 : Μονομερές της αίθυλοκυτταρίνης

➤ Η **μεθυλοκυτταρίνη (Methylcellulose)** είναι παράγωγο της κυτταρίνης στην οποία μερικές από τις υδροξυλομάδες των μονομερών της γλυκόζης, έχουν αντικατασταθεί με μέθυλ-ομάδες .



Σχήμα 7: Μονομερές της μέθυλοκυτταρίνης

- Η υδρόξυπρόπυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl cellulose)
- Η καρβόξυμέθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose)
- Η υδρόξυπρόπυλο-μέθυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl methyl cellulose) που χρησιμοποιείται ως τροποποιητής ιξώδους, παράγοντας πήξης, αφριστικός και συνδετικός παράγοντας.
- Η υδρόξυαιθύλο-μέθυλο κυτταρίνη (Hydroxyethyl methyl cellulose), που χρησιμοποιείται στην παραγωγή λεπτών ταινιών κυτταρίνης.

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

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

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

Όλοι οι εμπορικοί εστέρες της κυτταρίνης παράγονται με αντιδράσεις ετερογενών φάσεων. Σε αυτές τις αντιδράσεις δύο φάσεων η κυτταρίνη παραμένει αδιάλυτη, σε αιώρηση, με αποτέλεσμα να αντιδρά σταδιακά ξεκινώντας από τις άμορφες περιοχές και συνεχίζοντας στις πιο κρυσταλλικές. Οι διεργασίες αυτές όμως περιορίζονται στο σχηματισμό εστέρων με μικρής αλυσίδας λιπαρά οξέα, τεσσάρων ανθράκων ή λιγότερα. Όμως οι εστέρες της κυτταρίνης εμφανίζουν θερμοπλαστικές ιδιότητες όταν η αλυσίδα του λιπαρού αποτελείται από έξι ή περισσότερους άνθρακες. Αναφορικά τέτοιοι εστέρες είναι δυνατόν να παραχθούν με ετερογενή συστήματα αντιδράσεων χρησιμοποιώντας χλωρίδια οξέων και πυριδίνη.

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

Είναι φανερό ότι μια ενζυμική διεργασία παραγωγής εστέρων της κυτταρίνης θα εμφάνιζε ιδιαίτερα πλεονεκτήματα έναντι των μεθόδων κλασσικής χημείας, αφού τα προϊόντα θα προέρχονται από συστήματα με μη τοξικούς καταλύτες. Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκε η δυνατότητα ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης και παραγώγων αυτής.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΣΤΕΡΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Οι εστέρες κυτταρίνης είναι σημαντικά εμπορικά πολυμερή για σχεδόν έναν αιώνα. Η περιβαλλοντική επίδραση των πολυμερών που χρησιμοποιούμε στην καθημερινή μας ζωή υπόκειται σε συνεχή έρευνα, στην προσπάθεια τα πολυμερή υλικά που χρησιμοποιούμε να είναι βιοδιασπώμενα και ανακυκλώσιμα.[20],[21] Σίγουρα οι επιδράσεις που έχουν στην υγεία τα

πολυμερή υλικά ελκύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, με την ενδοκρινή διάσπαση να αποτελεί μια σημαντική ανησυχία.[22] Η έρευνα των πολυμερών υλικών του εμπορίου που είναι αποτέλεσμα αυτών των κοινωνικών ανησυχιών έχει αυξήσει σημαντικά το ενδιαφέρον στα μη τοξικά ανανεώσιμα και βιοαποικοδομήσιμη υλικά όπως είναι εστέρες κυτταρίνης. Στη συνέχεια θα αναφερθούν εκείνες οι περιοχές εφαρμογών των εστέρων κυτταρίνης που ερευνώνται τα τελευταία 20 χρόνια με σημαντική πρόοδο.

ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗΣ

Υλικά όπως μέταλλο, πλαστικό, ξύλο, ρουχισμός, χαρτί και δέρμα χρησιμοποιούνται κυρίως για προστασία ή διακόσμηση σε βιομηχανικές και αρχιτεκτονικές εφαρμογές. Τα παλαιότερα είδη επιστρωμάτων εφαρμόζονταν χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Οι οργανικοί και ανόργανοι εστέρες κυτταρίνης έχουν παίξει σημαντικό ρόλο σε αυτές τις εφαρμογές. Οι εστέρες κυτταρίνης που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές επιστρωμάτων περιλαμβάνουν την οξική κυτταρίνη (cellulose acetate), την οξική προπιονική κυτταρίνη (cellulose acetate propionate), την οξική βουτυρική κυτταρίνη (cellulose acetate butyrate), και η νιτροκυτταρίνη (nitrocellulose). Στο συγκεκριμένο κομμάτι θα εστιάσουμε στους οργανικούς εστέρες κυτταρίνης.[20]

Οι εστέρες κυτταρίνης έχουν παίξει σημαντικό ρόλο ως επικαλυπτικές ουσίες για πάνω από 50 χρόνια. Όταν χρησιμοποιούνται ως πρόσθετες ουσίες, ρητίνες ή φιλμ, οι εστέρες κυτταρίνης παρέχουν ένα αριθμό πλεονεκτημάτων συμπεριλαμβάνοντας βελτιωμένη ροή και αξιοσημείωτη αντοχή.[23,24] Διαφορετικές εφαρμογές επιστρωμάτων απαιτούν διαφορετικές ιδιότητες. Δομικά, φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά μπορούν να ελεγχθούν με χειρισμό της δομής των πολυμερών συμπεριλαμβάνοντας το βαθμό υποκατάστασης, την περιεκτικότητα σε υδροξύλιο και το μήκος της αλυσίδας. Η οξική βουτυρική κυτταρίνη είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο στη βιομηχανία επιστρωμάτων. Καθώς στην οξική βουτυρική κυτταρίνη αυξάνεται η περιεκτικότητα σε βούτυλο- ομάδες, η ελαστικότητα, και η διαλυτότητα, αυξάνονται, ενώ η χημική αντίσταση και η σκληρότητα μειώνονται. Καθώς το μοριακό βάρος του εστέρα αυξάνεται, η συμβατότητα και η διαλυτότητα μειώνονται, η ανθεκτικότητα και το σημείο τήξης αυξάνονται, και η σκληρότητα και η πυκνότητα μένουν ανεπηρέαστες. Η περιεκτικότητα σε υδροξύλια επιδρά στην αντίσταση σε υγρασία και σκληρότητα, τα οποία μειώνονται και τα δύο με αυξανόμενη περιεκτικότητα σε υδροξύλια.[24]

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

μεταλλική εμφάνιση αρκετών αυτοκινήτων επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας επιστρώματα τα οποία περιέχουν προσανατολισμένες μεταλλικές νιφάδες.

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

ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΑΠΟΔΕΣΜΕΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (DRUG DELIVERY)

Η ταχεία ανάπτυξη της τεχνολογίας ελεγχόμενης αποδέσμευσης φαρμάκων κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δεκαετιών έχει ως στόχο τη ασφάλεια των φαρμακευτικών σκευασμάτων και αλλά και την επίτευξη του μέγιστου δυνατού οφέλους από τις δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Οι εστέρες κυτταρίνης έχουν δεχτεί τραβήξει την προσοχή της βιομηχανίας φαρμάκων προς αυτή την κατεύθυνση.

1.4 ENZYMA ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ

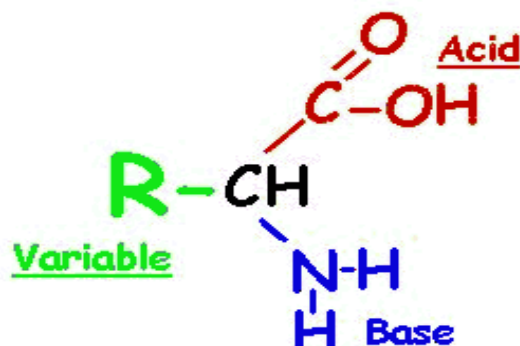
Τα ένζυμα αποτελούν μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών και είναι βασικά συστατικά των ζωντανών κυττάρων. Τα κύρια χαρακτηριστικά τους γνωρίσματα είναι δύο :

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

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

Οι πρωτεΐνες (άρα και τα ένζυμα) αποτελούν βιοπολυμερή των οποίων τα μονομερή είναι τα αμινοξέα. Ένα αμινοξύ περιέχει δυο χαρακτηριστικές λειτουργικές ομάδες, τη βασική αμινομάδα ($-NH_2$) και την όξινη καρβοξυλομάδα

(-COOH). Τα αμινοξέα που απαντούν στις πρωτεΐνες είναι είκοσι. Και τα είκοσι είναι α-αμινοξέα, δηλαδή η αμινομάδα είναι υποκαταστάτης του α-άνθρακα ως προς το καρβονύλιο. Ένα τέτοιο αμινοξύ έχει την ακόλουθη δομή (Σχήμα 8).



Όπου : R η πλευρική αλυσίδα (R group)

NH₂ η αμινομάδα

COOH η καρβοξυλομάδα

Σχήμα 8. Η δομή ενός αμινοξέα

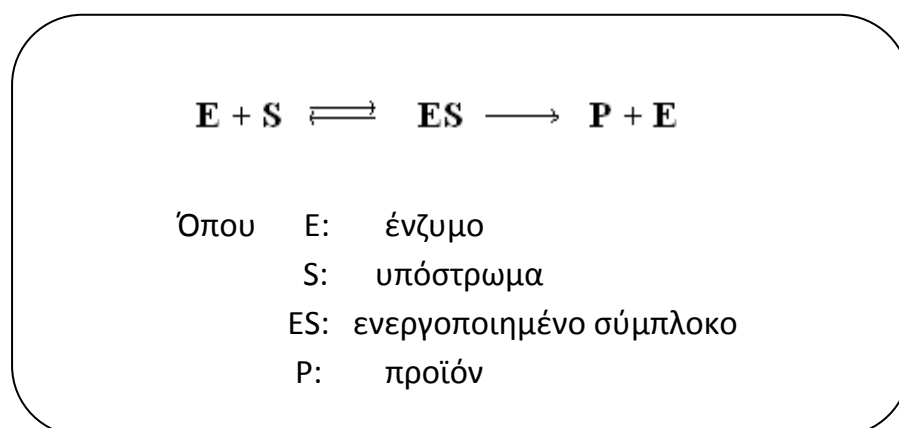
Προφανώς το μοναδικό τμήμα που δεν παραμένει σταθερό αλλά μεταβάλλεται από το ένα αμινοξύ στο άλλο, είναι η πλευρική αλυσίδα. Αν εξαιρέσουμε τη περίπτωση όπου η πλευρική αλυσίδα είναι το υδρογόνο (γλυκίνη), τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα παρουσιάζουν οπτική ενεργότητα, απαντώνται δηλαδή σε δύο εναντιομερείς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

Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες έχουν πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και σε ορισμένες περιπτώσεις και τεταρτοταγή δομή. Για να διατηρούν την καταλυτική τους δράση θα πρέπει να έχουν την ανάλογη τριτοταγή δομή τους (με την προϋπόθεση ότι φυσικά διατηρούν και τις κατώτερης τάξης δομές). Θα πρέπει δηλαδή να έχουν την κατάλληλη τρισδιάστατη διαμόρφωση στο χώρο. Αυτή η υπεύθυνη για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης δομή, οφείλεται στους ακόλουθους παράγοντες:

- 1) Στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των ουδέτερων R groups. Λόγω αυτών των απώσεων, τα R groups προσανατολίζονται προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης μακριά από το νερό.
- 2) Στις υδρόφιλες φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες (π.χ. $-\text{CH}_2\text{OH}$) που προσανατολίζονται προς το εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης, προς το νερό.
- 3) Στις ομάδες NH_3^+ και COO^- που μπορεί να βρίσκονται στο εσωτερικό ή εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης και σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμό άλατος.

Η βιολογική δράση μίας πρωτεΐνης σχετίζεται άμεσα με τη δευτεροταγή, την τριτοταγή και τη τεταρτοταγή δομή της. Οι δομές αυτές, όπως είδαμε, οφείλονται σε δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς άλατος, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κ.α.. Έκθεση της πρωτεΐνης σε υψηλές θερμοκρασίες ($> 50^\circ\text{C}$), σε ευρείες μεταβολές του pH, σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (π.χ. αλκοόλη), σε μηχανική επεξεργασία και σε άλλους παρεμφερείς παράγοντες, προκαλεί αλλοίωση στις αλληλεπιδράσεις που σταθεροποιούν τις ανώτερες βαθμίδες δομής των πρωτεϊνών. Έτσι αυτές χάνουν τη δραστηριότητά τους. Το φαινόμενο αυτό καλείται *μετουσίωση* (denaturation).[25]

Σε μία αντίδραση η οποία καταλύεται από ένα ένζυμο, τα αντιδρώντα αναφέρονται ως υπόστρωμα (substrate). Το ένζυμο λοιπόν, συνδέεται με το υπόστρωμα και δημιουργείται το *ενεργοποιημένο σύμπλοκο* (enzyme-substrate complex). Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα μία σειρά χημικών μεταβολών στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο και τελικά προκύπτει το προϊόν και απελευθερώνεται το ένζυμο ανέπαφο.[26] (σχήμα 9)



Σχήμα 9: ενζυμική αντίδραση

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

Δεδομένου του μεγαλύτερου μεγέθους του ενζύμου ($M_B = 12000-40000$) από το αντίστοιχο υπόστρωμα, το τελευταίο προσδένεται σε μία συγκεκριμένη θέση του ενζύμου η οποία καλείται «ενεργός θέση» (active site). Οι ομάδες της ενεργού θέσεως με τις οποίες συνδέεται το υπόστρωμα για να σχηματιστεί το ενεργοποιημένο σύμπλοκο, λέγονται «προσδένουσες ομάδες» (binding groups). Επίσης, στην ενεργό θέση του ενζύμου υπάρχουν και κάποιες ομάδες οι οποίες συμμετέχουν στη σχάση και το σχηματισμό χημικών δεσμών, μετά τη πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτές οι ομάδες καλούνται «καταλυτικές ομάδες» (catalytic groups).[25]

Το σημείο κλειδί στην κατανόηση της καταλυτικής δράσης των ενζύμων είναι το εξής. Καθώς το υπόστρωμα συνδέεται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι καταλυτικές ομάδες επιφέρουν τέτοια χημική μεταβολή στο υπόστρωμα, ώστε η μετατροπή του σε προϊόν να διεξάγεται μέσω ενός μηχανισμού διαφορετικού από αυτόν που θα ακολουθούσαν απουσία του βιοκαταλύτη. Ο νέος αυτός μηχανισμός συνδυάζεται με την ελάττωση των ενεργειακών απαιτήσεων του συστήματος. Δηλαδή μειώνεται η ενέργεια ενεργοποίησης. Αυτό οφείλεται είτε στην ανακατανομή της εσωτερικής ενέργειας (internal energy) των αντιδρώντων μορίων, είτε στην διάσπαση ή ιοντοποίηση μορίων, ιόντων και ριζών, από την επίδραση των καταλυτικών ομάδων του ενζύμου (catalytic groups). Έτσι, στις ενζυμικές αντιδράσεις τα προϊόντα δημιουργούνται μετά από έναν αριθμό επιμέρους αντιδράσεων που όλες τους έχουν μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης από την αρχική. Όπως και να έχει, η αντίδραση ακολουθεί πλέον ένα νέο μηχανισμό. Διεξάγεται δηλαδή μέσω ενός καινούριου δρόμου αντίδρασης.

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

- οξειδοαναγωγάσες ή οξειδοορεδουκτάσες (καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής)
- τρανσφεράσες (καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς μιας ομάδας από ένα υπόστρωμα σ' ένα άλλο)
- υδρολάσες (καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης)

- λυάσες (καταλύουν αντιδράσεις αποβολής ενός μικρού μορίου από κάποιο υπόστρωμα)
- ισομεράσες (καταλύουν αντιδράσεις ισομερείωσης)
- λιγάσες ή συνθετάσες (καταλύουν αντιδράσεις σύνδεσης μορίων)

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

ΔΟΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ

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

ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ

- Πρωτοταγής δομή

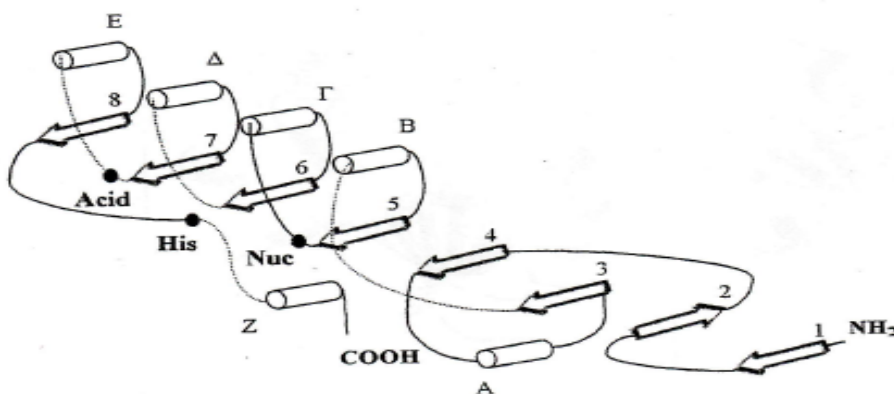
Λόγω της ικανότητας των λιπασών να αποικοδομούν αδιάλυτα υποστρώματα θα μπορούσε να αναμένεται ότι η μοριακή τους διάταξη θα εμφάνιζε κάποιες ιδιαιτερότητες. Όμως η πρωτοταγής δομή των λιπασών δεν παρουσιάζει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με τη φυσικοχημική κατάσταση των υποστρωμάτων τους.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

Παρόλη τη μικρή ομολογία της αλληλουχίας των διαφόρων λιπασών, μπορούμε να κατατάξουμε τις λιπάσες σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με την αλληλουχία τους. Η οικογένεια των λιπασών από θηλαστικά (mammalian lipase gene family) αποτελείται από τρεις τύπους λιπασών, τις λιποπρωτεϊνικές λιπάσες (LPL), τις ηπατικές λιπάσες (HL) και τις παγκρεατικές (PL). Οι μικροβιακές λιπάσες

ομαδοποιούνται σε τέσσερις οικογένειες: της *Candida cylindracea*, του *Pseudomonas*, του *Staphylococcus* και του *Mucor*. [28]

➤ Δευτεροταγής και τριτοταγής δομή

Παρά τη μικρή ομοιότητα στην αλληλουχία, η τρισδιάστατη δομή (3D) των λιπασών φαίνεται να ακολουθεί μια καθορισμένη αρχιτεκτονική. Η δομή τους αποτελείται από παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που συνδέονται με α-έλικες (Σχήμα 10). Αυτή η διαμόρφωση είναι μοναδική για τις λιπάσες αλλά συναντάται επίσης και στην εστεράση (acetylcholine), στην καρβοξυπεπτιδάση II, στην υδρολάση της δι-ενολακτόνης και στη δι-εχαλογενάση και είναι γνωστή με το όνομα διαμόρφωση α/β-υδρολάσης. Σε όλα αυτά τα ένζυμα ο καταλυτικός μηχανισμός είναι συγκρίσιμος με αυτόν της σερίνης-πρωτεάσης, η οποία αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα και μια οξυανική σπή. Η καταλυτική τριάδα της σερίνης-πρωτεάσης αποτελείται από μια πυρηνόφιλη σερίνη, μια ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό οξύ, ενώ η οξυανική σπή συνήθως συνίσταται από δύο αμιδιά. Η δομική της διαμόρφωσης α/β-υδρολάσης είναι αυστηρή, δεδομένου ότι η αλληλουχία αυτών των πρωτεϊνών ποικίλει. Επίσης η ταυτότητα, αλλά όχι η λειτουργία, των δύο αμινοξέων της καταλυτικής τριάδας μπορεί να αλλάξει και να παραμείνει μόνο η ιστιδίνη. Όμως η εμφάνιση των μελών της καταλυτικής τριάδας στην αλληλουχία διατηρείται. Το πυρηνόφιλο μπορεί να είναι μια σερίνη ή μια κυστεΐνη, ή ένα ασπαρτικό οξύ, ενώ το οξύ συνήθως είναι το ασπαρτικό και σπανιότερα το γλουταμινικό. Επίσης η διαμόρφωση του βρόχου, που περιλαμβάνει τα καταλυτικά αμινοξέα, διατηρείται σταθερή. [29]



Σχήμα 10. Διαμόρφωση της α/β-υδρολάσης. Η διαμόρφωση αποτελείται από κεντρικές β-πτυχωτές (1-8) συνδεδεμένες με α-έλικες (A-Z). Οι θέσεις των τριών καταλυτικών αμινοξέων, ενός οξέος, μιας βάσης και του πυρηνόφιλου παρουσιάζονται ως κλειστοί κύκλοι [37]

➤ Το πεπτιδικό κάλυμμα και η ενεργοποίηση διεπιφάνειας

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

Αναφορικά με το αν ανοίγει ή όχι το πεπτιδικό κάλυμμα υπάρχουν δύο κατηγορίες λιπασών: αυτές με το προσχηματισμένο ενεργό κέντρο και αυτές που το ενεργό κέντρο σχηματίζεται κατά τη διαδικασία ενεργοποίησης του ενζύμου. Ένα παράδειγμα της τελευταίας κατηγορίας είναι η RML. Σε αυτή την περίπτωση η ενεργοποίηση της λιπάσης δεν πραγματοποιείται μόνο με την μετακίνηση του καλύμματος αλλά και της σερίνης 82, η οποία δεν είναι μέρος της καταλυτικής τριάδας ή του καλύμματος. Μόνο όταν η RML βρίσκεται στη ενεργοποιημένη (ανοικτή) διαμόρφωση το υδροξύλιο και η κύρια νιτρική αλυσίδα της σερίνης 82 βρίσκονται στη σωστή θέση για να αντιδράσουν με την οξυανική οπή και να συνεχιστεί η κατάλυση. Ανάλογες αλλαγές στη διαμόρφωση παρουσιάζονται και στην παγκρεατική λιπάση. Σε αυτή 9 αμινοξέα δημιουργούν ένα βρόγχο και δημιουργούν την οξυανική οπή.[31]

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

Το πεπτιδικό κάλυμμα στη διαμόρφωση ορισμένων λιπασών δεν είναι κλειστό απουσία υποστρώματος ή παρεμποδιστή [33]. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ένα μοντέλο το οποίο θεωρεί ότι η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια μεταξύ της ανοικτής και της κλειστής διαμόρφωσης είναι σημαντικά μικρή με αποτέλεσμα να διατηρείται ένα ποσοστό της λιπάσης στην ανοικτή διαμόρφωση

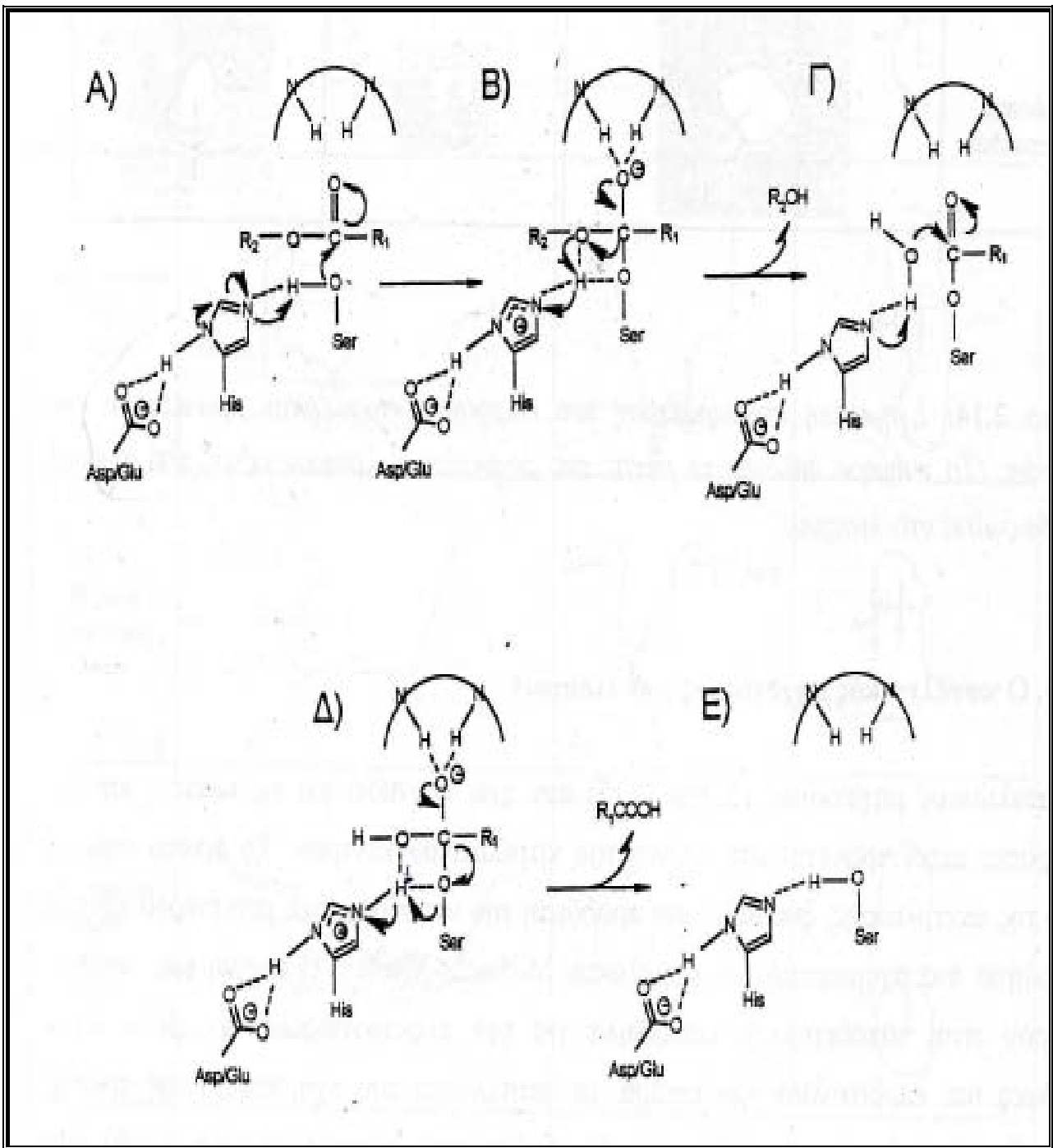
σε υδατικά διαλύματα.[34]. Επίσης έχει προταθεί ότι η ανοικτή και η κλειστή διαμόρφωση των περισσότερων λιπασών βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία.[35] Όταν μια λιπάση, η οποία βρίσκεται στην ανοικτή διαμόρφωση, δένεται στη διεπιφάνεια, η διαμόρφωση της σταθεροποιείται και το ένζυμο είναι ενεργοποιημένο. Έτσι, ίσως θα ήταν πιο σωστό να μιλάμε για διεπιφανειακή σταθεροποίηση παρά για διεπιφανειακή ενεργοποίηση. Το χρονικό διάστημα που η λιπάση διατηρείται στην ανοικτή διαμόρφωση, απουσία κατάλληλου υποστρώματος, ποικίλει ανάλογα με τη λιπάση και εξαρτάται από το μέγεθος της αλυσίδας του πεπτιδικού καλύμματος.

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

➤ Ο καταλυτικός μηχανισμός των λιπασών

Ο καταλυτικός μηχανισμός (Σχήμα 9) που έχει προταθεί για τις λιπάσες και τις εστεράσες επικεντρώνεται στη σερίνη του καταλυτικού κέντρου. Το πρώτο στάδιο, αυτό της ακετυλίωσης, ξεκινά με την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο και οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου Michaelis-Menten. Η σερίνη του ενεργού κέντρου είναι τοποθετημένη κατάλληλα για τη ηλεκτρονιόφιλη προσβολή στον άνθρακα του καρβονυλίου του εστέρα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της πρώτης τετραεδρικής ενδιάμεσης κατάστασης. Η ιστιδίνη του ενεργού κέντρου βοηθά την ηλεκτρονιόφιλη προσβολή ενεργώντας ως δέκτης του πρωτονίου από τη σερίνη. Το τρίτο αμινοξύ του ενεργού κέντρου, το ασπαρτικό (ή γλουταμινικό) οξύ, σταθεροποιεί τη θετικά φορτισμένη ιστιδίνη με δεσμούς υδρογόνου. Το αρνητικά φορτισμένο οξυγόνο του καρβονυλίου σταθεροποιείται από την οξυανική οπή, η οποία συνήθως αποτελείται από άτομα αζώτου δύο ή τριών κύριων αλυσίδων. Στη συνέχεια το ενδιάμεσο σύμπλεγμα σπάει σχηματίζεται το ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο με την απομάκρυνση της αλκοόλης, η οποία δρα ως δέκτης πρωτονίου από την ιστιδίνη.

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

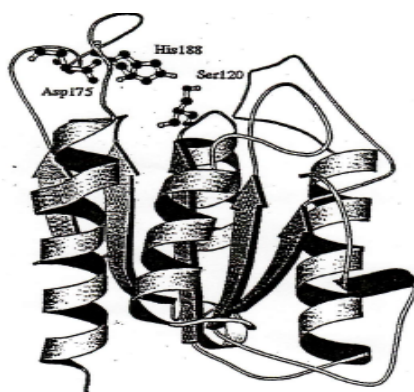


Σχήμα 11. Καταλυτικός μηχανισμός των υδρολασών σε αντιδράσεις υδρόλυσης εστέρων. (Α) Michaelis-Menten σύμπλοκο, (Β) Πρώτο μεταβατικό στάδιο, (Γ) Ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο, (Δ) Δεύτερο μεταβατικό στάδιο, (Ε) Ελεύθερο ένζυμο

*Ο καταλυτικός μηχανισμών του ενζύμου εστεράση είναι όμοιος με αυτόν των λιπασών. Η μόνη διαφορά εστιάζεται στο ότι στην εστεράση απουσιάζει το πεπτιδικό κάλυμμα (lid).

ΚΟΥΤΙΝΑΣΗ ΑΠΟ FUSARIUM SOLANI PISI

Η κουτινάση είναι ένα υδρολυτικό ένζυμο που παράγεται από παθογόνους μύκητες των φυτών και αποικοδομεί το φλοιό των φυτών. Το κύριο συστατικό του φλοιού των φυτών είναι η κουτίνη, ένα αδιάλυτο στο νερό βιοπολυμερές που αποτελείται κυρίως από επόξυ- και υδρόξυ-λιπαρά οξέα.[38]. Βέβαια η κουτινάση μπορεί να καταλύσει αντιδράσεις με ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, από μικρής αλυσίδας νιτροφαινυλοεστέρες ως μακριάς αλυσίδας τριγλυκερίδια.[38]. Το γεγονός ότι η κουτινάση μπορεί να υδρολύσει υδατοδιαλυτούς και μη εστέρες την κάνει να θεωρείται ένα μοναδικό ένζυμο, που «χτίζει μια γέφυρα» μεταξύ των λιπασών και των εστερασών. Η απουσία της διεπιφανειακής ενεργοποίησης προβλημάτιζε τους ερευνητές για πολλά χρόνια μέχρι το 1992 όταν δημοσιεύτηκε η διαμόρφωση των κρυστάλλων της.[39]. Το μοντέλο της φαίνεται στο (Σχήμα 12) φανερώνοντας τη διαμόρφωση α/β -υδρολάσης με πέντε κεντρικά και παράλληλα πτυχωτά φύλλα, που περικλείονται από πέντε α -έλικες. Οι ενδιάμεσοι βρόχοι είναι μικροί σχετικά με αυτούς άλλων λιπασών. Το ενεργό της κέντρο αποτελείται από τρία αμινοξέα, Ser-His-Asp. Μια σημαντική παρατήρηση που ξεχωρίζει την κουτινάση από τις υπόλοιπες λιπάσες είναι ότι η σερίνη του ενεργού κέντρου βρίσκεται σε μια σχισμή μεταξύ δύο υδρόφοβων βρόχων (80-90 και 180-190) και είναι προσπελάσιμη στο υπόστρωμα.



Σχήμα 2. Σχηματική παρουσίαση της κουτινάσης από *Fusarium solani*. Τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, Ser 120, His 188 και Asp 175 έχουν τονιστεί (διαμόρφωση ball and sticks).

Οι υδρόφοβοι βρόχοι που περιβάλλουν το ενεργό κέντρο είναι πιθανά υπεύθυνοι για την ικανότητα του ενζύμου να συνδέεται σε διεπιφάνειες νερού-λιπιδίου. Επίσης έχει προταθεί ότι το εύκολα προσπελάσιμο ενεργό κέντρο της κουτινάσης είναι υπεύθυνο για τη δραστηριότητα που εμφανίζει το ένζυμο σε υδατοδιαλυτούς εστέρες που έχει ως αποτέλεσμα την απουσία διεπιφανειακής

ενεργοποίησης[39]. Μελέτες με NMR έδειξαν ότι η οξυανική τρύπα στη κουτινάση σχηματίζεται κατά το δέσιμο του υποστρώματος με το ένζυμο όπως και στις περισσότερες λιπάσες[40], αντίθετα με ότι είχε προταθεί μετά από κρυσταλλογραφική μελέτη της όπου εκεί είχε θεωρηθεί ότι η οξυανική τρύπα είναι προσχηματισμένη[41].

1.5 ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

Τα τελευταία χρόνια η χρήση της βιοκαταλυτικών συστημάτων στην οργανική σύνθεση είναι όλο και συχνότερη και ειδικά σε συνάρτηση με τις κλασικές συμβατικές χημικές μεθόδους [8]. Τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή χημο-, τοπο- και εναντιο-εκλεκτικότητα, γεγονός που τα καθιστά ιδανικούς καταλύτες για τη φαρμακευτική βιομηχανία όπου υπάρχει ανάγκη για τη παρασκευή καθαρών χειρόμορφων ενώσεων. Τα προϊόντα που παράγονται ενζυμικά, θεωρούνται φυσικά. Ακόμα, οι ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις πραγματοποιούνται συνήθως κάτω από ήπιες συνθήκες, όπως θερμοκρασίες περί του 30°C, και pH ουδέτερο ή σχεδόν ουδέτερο. Επίσης οι βιοκαταλυτικές εφαρμογές είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Είναι λιγότερο επικίνδυνες λόγω αποφυγής της χρήσης τοξικών ουσιών ή επιβλαβών μετάλλων, δεν ρυπαίνουν το περιβάλλον και είναι ενεργειακά συμφέρουσες συγκρινόμενες με τις παραδοσιακές χημικές τεχνικές.

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

Το φυσικό περιβάλλον των ενζύμων είναι τα ζωντανά κύτταρα. Μικροβιακά, φυτικά και ζωικά. Στο εσωτερικό των κυττάρων η ουσία που υπάρχει σε σχετική αφθονία, ή αλλιώς το περιβάλλον, είναι το νερό (κυτταρόπλασμα). Έτσι είναι εύλογο το ότι τα ένζυμα είναι κατασκευασμένα να λειτουργούν σε υδατικά μέσα. Δεν μας εκπλήσσει το γεγονός ότι σε βιολογικό-βιοτεχνολογικό επίπεδο χρησιμοποιούνται ένζυμα *in vitro* για να καταλύσουν αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε υδατικό περιβάλλον. Όμως τη τελευταία εικοσαετία -και ειδικά τα τελευταία χρόνια- διάφορα ένζυμα έχουν φανεί να λειτουργούν και σε συστήματα μη υδατικά, τα λεγόμενα μη συμβατικά συστήματα[42].

Τα μέσα τα οποία καλούνται μη συμβατικά είναι εκείνα τα οποία κυρίως περιέχουν οργανικά συστατικά (διαλύτες, υποστρώματα, προϊόντα...), υπερκρίσιμα ρευστά [43], ιοντικά υγρά ή και κάποιο αέριο μέσο αντίδρασης [44]. Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των συστημάτων είναι πως η περιεκτικότητά τους σε νερό είναι μειωμένη σε σύγκριση με τα 'συμβατικά' μέσα.

Γιατί όμως χρησιμοποιούνται μη συμβατικά μέσα;

Τα περισσότερα ένζυμα μπορούν να καταλύσουν μία αντίδραση και προς τις δυο κατευθύνσεις. Είναι καταλύτες και ως τέτοιοι δεν ελέγχουν προς ποια πλευρά θα κινηθεί μια αντίδραση. Αυτό ελέγχεται από τις συνθήκες του αντιδρώντος συστήματος και από τη θέση της χημικής ισορροπίας. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ένζυμα στα μη συμβατικά συστήματα που εξετάζουμε είναι οι υδρολάσες. Στο νερό καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης, αλλά παρουσία οργανικού διαλύτη και απουσία νερού για παράδειγμα, η χημική ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της σύνθεσης [44]. Εδώ πρέπει να τονιστεί ότι οι συνθήκες είναι εκείνες που μετατοπίζουν την ισορροπία της αντίδρασης και «επιβάλλουν» τη σύνθεση. Το ένζυμο απλά 'υπακούει' και εφόσον μπορεί, καταλύει αντιδράσεις σύνθεσης.

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

Το βασικό ερώτημα στην ενζυμική κατάλυση σε οργανικά μέσα είναι το γιατί τα ένζυμα παραμένουν ενεργά. Αρχικά αυτή η θέση φαίνεται άτοπη καθώς οι υδρόφοβες και υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις στις οποίες στηρίζεται η τριτοταγής δομή των ενζύμων, απουσιάζουν. Όμως αυτό τελικά δεν έχει σαν αποτέλεσμα τη μετουσίωση τους. Πράγματι το οργανικό περιβάλλον έχει τη τάση να τους προκαλεί μετουσίωση των ενζύμων με το ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας τους, αλλά για να γίνει αυτό θα πρέπει το ένζυμο να παρουσιάζει και υψηλή ευκαμψία (flexibility). Αυτή η ευκαμψία υφίσταται παρουσία μεγάλης ποσότητας νερού, το οποίο δρα ως μοριακός λιπαντής. Έτσι σε οργανικούς διαλύτες τα μόρια των ενζύμων είναι άκαμπτα και κατά συνέπεια πολύ σταθερά [42]. Μάλιστα όσο περισσότερο μη πολικός είναι ο διαλύτης τόσο πιο δραστικά

είναι τα ένζυμα. Αντίθετα αν ο διαλύτης είναι αρκετά πολικός, τότε τα ένζυμα καθίστανται πρακτικά ανενεργά. Αυτό συμβαίνει γιατί το πολικό μόριο του διαλύτη μπορεί να δεσμεύσει μόρια νερού, προσδεδεμένα επιλεκτικά σε ειδικές θέσεις του ενζύμου και να το απογυμνώσει από αυτά[45]. Τα προσδεδεμένα αυτά μόρια νερού ή αλλιώς το "bound water" όπως αναφέρεται είναι μόρια νερού ισχυρά συνδεδεμένα με συγκεκριμένες θέσεις επάνω στην επιφάνεια του ενζύμου. Αυτή η μικροποσότητα νερού είναι καθοριστική για τη μορφή και τη δραστικότητα του ενζύμου. Το ένζυμο λοιπόν, αρκεί να είναι συνδεδεμένο με την απαιτούμενη μικροποσότητα νερού και να έχει την απαραίτητη ακαμψία ώστε να παραμένει ενεργό στο φαινομενικά 'εχθρικό' περιβάλλον του οργανικού διαλύτη.

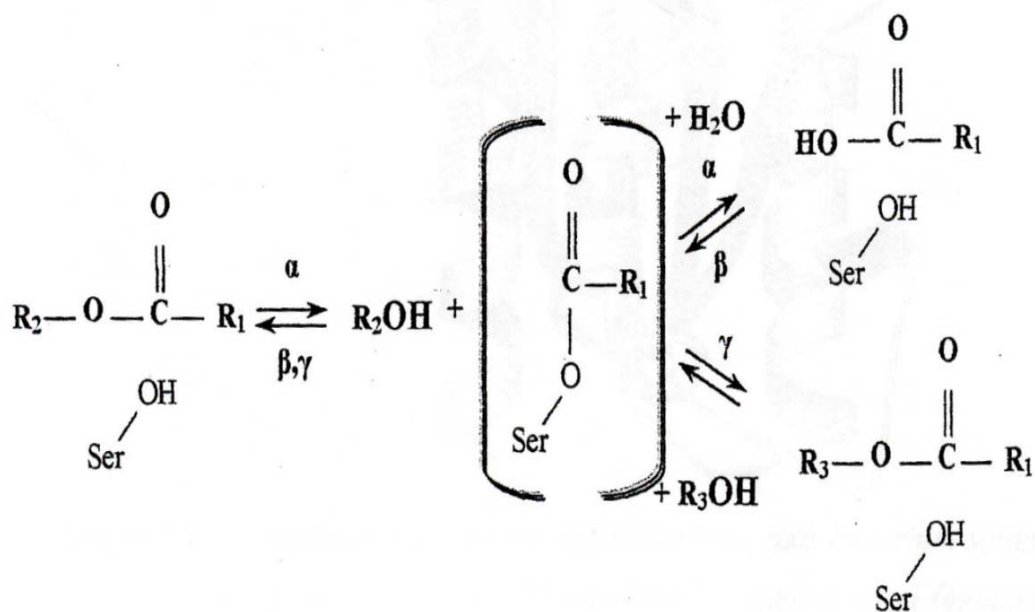
Από τα μη συμβατικά συστήματα αυτά με τα οποία θα ασχοληθούμε είναι εκείνα που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες και ιοντικά υγρά.

1.5.1 ΛΙΠΑΣΕΣ ΣΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

Όπως είδαμε, ενώ σε υδατικό περιβάλλον η υδρόλυση των εστερικών δεσμών πραγματοποιείται με υψηλές αποδόσεις, σε μη υδατικά μέσα λαμβάνει χώρα η αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή η εστεροποίηση. Το έντονο ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τις λιπάσες επικεντρώνεται σε αυτή τη συνθετική τους ικανότητα σε συνδυασμό πάντοτε με το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων. Έτσι οι λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα είναι δυνατό να συνθέσουν ένα ευρύ φάσμα προϊόντων που ενδιαφέρουν τη φαρμακοβιομηχανία και άλλες βιομηχανίες που παράγουν προϊόντα υψηλής αξίας (εστέρες κυτταρίνης) Οι αντιδράσεις που μπορούν να καταλυθούν από λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα παρουσιάζονται στο (Σχήμα 13).

Το πρώτο στάδιο, σε όλες αυτές τις αντιδράσεις, είναι ο σχηματισμός του άκυλο-ενζύμου ενδιάμεσου με τον άκυλο-δότη. Στις περιπτώσεις της υδρόλυσης και της μετεστεροποίησης (transesterification) (Σχήμα 13. α, γ), ο δότης είναι ένας εστέρας και στην περίπτωση της εστεροποίησης (Σχήμα 13.β) ο δότης είναι ένα καρβοξυλικό οξύ. Στο δεύτερο στάδιο το ενδιάμεσο αντιδρά με τον ακυλο-δέκτη, ο οποίος για την αντίδραση της υδρόλυσης είναι νερό (Σχήμα 13.α) και μία αλκοόλη για τις αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης (Σχήμα 13.β, γ). Είναι φανερό ότι η παρουσία του ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσου είναι απαραίτητο για την πορεία της αντίδρασης. Δηλαδή, κάθε ακυλο-δότης που ταιριάζει στο ενεργό κέντρο και μπορεί να σχηματίσει το ενδιάμεσο με τη λιπάση μπορεί να τροποποιηθεί από το ένζυμο. Οι λιπάσες είναι δυνατό να σχηματίσουν τέτοιου είδους ενδιάμεσα όχι μόνο με λιπαρά οξέα και εστέρες, αλλά και με

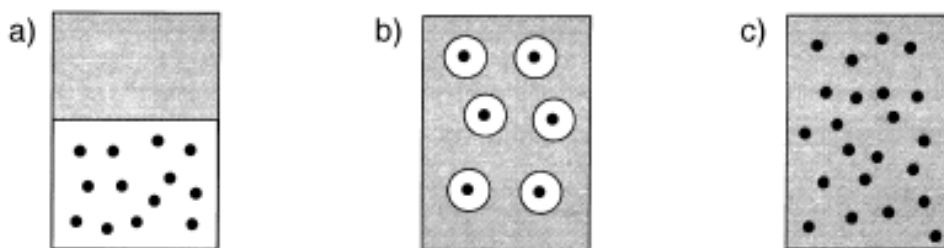
θειοεστέρες και ενεργοποιημένες αμίνες. Μόλις το ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσο σχηματιστεί μπορεί να αντιδράσει με κάθε ακυλο-δέκτη, όπως νερό, αλκοόλες, πρωτοταγείς αμίνες και αμμωνία με την προϋπόθεση βέβαια ότι ο δέκτης είναι ικανός να φτάσει την ακυλο-ομάδα.[49]



Σχήμα 13. Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες σε μη-συμβατικά μέσα α) υδρόλυση εστέρα, β) σύνθεση εστέρα και γ) μετεστεροποίηση

1.5.2 ΟΡΓΑΝΙΚΟΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Τα μέσα βιοκατάλυσης που βασίζονται σε οργανικούς διαλύτες και που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι μίγματα νερού και υδατοδιαλυτού οργανικού διαλύτη, διφασικά συστήματα αποτελούμενα από νερό και οργανικό διαλύτη μη αναμίξιμο με αυτό, αντίστροφα μικκύλια και μικρογαλακτώματα ή και σχεδόν άνυδροι οργανικοί διαλύτες [46]. Οι βασικότεροι τύποι αυτών των μέσων παρίστανται στο ακόλουθο σχήμα (Σχήμα 14).



Σχήμα 34. Βασικότεροι τύποι συστημάτων με οργανικούς διαλύτες

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

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

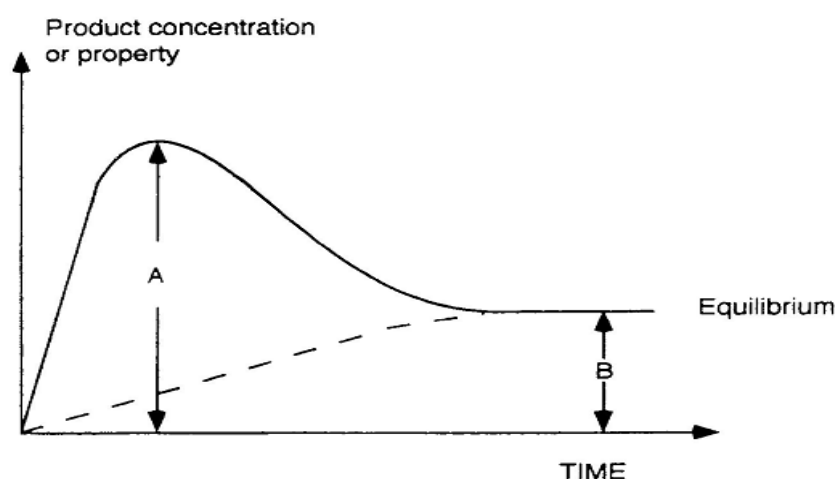
Στα συστήματα με τους άνυδρους οργανικούς διαλύτες (c), το λυοφιλιωμένο ένζυμο βρίσκεται ως εναιώρημα σε αυτούς και μόνο μικροποσότητες νερού (<5% v/v) είναι παρούσες, για να διατηρηθεί η δράση του βιοκαταλύτη [46].

Κλείνοντας είναι σκόπιμο να αναφέρουμε λίγα λόγια σχετικά με τη θερμοδυναμική και κινητική προσέγγιση μίας αντίδρασης σε τέτοια συστήματα. Καταρχήν, από τη στιγμή που έχουμε μία συγκεκριμένη αντίδραση, δηλαδή συγκεκριμένα αντιδρώντα και προϊόντα, η θερμοδυναμική θα καθορίσει το αν η αντίδραση αυτή είναι εφικτή ή όχι [47]. Αυτό ποσοτικά ελέγχεται από τη τιμή της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας ΔG της αντίδρασης. Αν είναι αρνητική η δράση είναι αυθόρμητη και μπορεί να πραγματοποιηθεί. Αν όμως είναι θετική τότε η αντίδραση δεν είναι αυθόρμητη και δεν μπορεί να γίνει, ούτε με τη παρουσία καταλύτη. Ο τελευταίος δύναται να επηρεάσει μόνο την κινητική της αντίδρασης εφόσον αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί [48]. Στη συνέχεια και εφόσον η αντίδραση είναι πραγματοποιήσιμη, η φύση των αντιδρώντων και των προϊόντων, η θερμοκρασία, η πίεση, το pH αν υπάρχει νερό, η ύπαρξη άλλων ουσιών και γενικότερα οι συνθήκες που περιγράφουν το σύστημα, καθορίζουν και επηρεάζουν τη κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας της δράσης. Δηλαδή με αυτά τα δεδομένα μπορούμε να υπολογίσουμε το τι θα συμβεί όταν η αντίδραση έρθει σε ισορροπία. Κάτι που θεωρητικά γίνεται σε άπειρο χρόνο.

Αυτή είναι η θερμοδυναμική θεώρηση και είναι χαρακτηριστικό το ότι δεν εμπλέκονται καθόλου τα ένζυμα.

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

Τα παραπάνω γίνονται καλύτερα κατανοητά στο ακόλουθο σχήμα (σχήμα15)



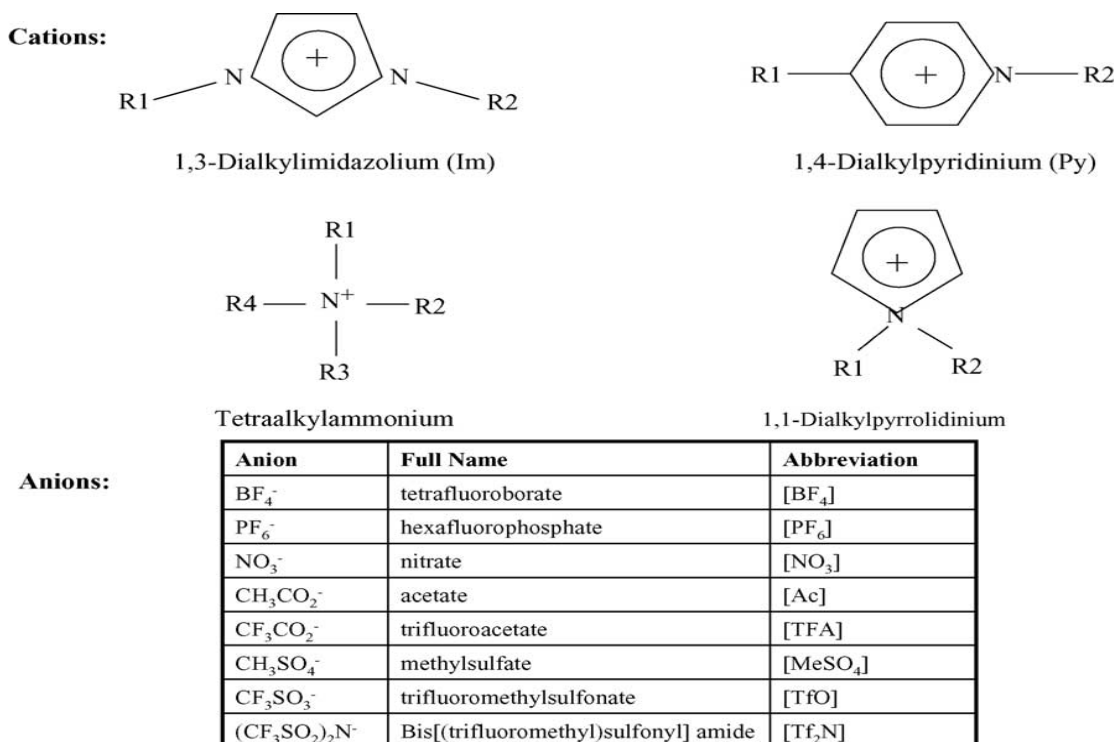
Σχήμα 15. Η συγκέντρωση του προϊόντος μιας ενζυμικής δράσης, σε συνάρτηση με το χρόνο. Στη θέση A έχουμε κινητικό έλεγχο της αντίδρασης, ενώ στη θέση B έχουμε θερμοδυναμικό έλεγχο

1.5.3 ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Τα τελευταία χρόνια ένα νέο, πολύ ελκυστικό ,μη συμβατικό μέσο βιοκατάλυσης έχει προκύψει. Τα ιοντικά υγρά. Λόγω της αμελητέας τάσης ατμών που τα χαρακτηρίζει έχουν ευρέως αναγνωριστεί ως «πράσινοι διαλύτες» (Green solvents). Η χρήση ιοντικών υγρών ως μη συμβατικά μέσα βιοκατάλυσης ,με κάποιες φορές αξιοσημείωτα αποτελέσματα, έχει προξενήσει μεγάλο ενδιαφέρον. Τις τελευταίες δεκαετίες τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο ως αντικαταστάτες των «παραδοσιακών» οργανικών διαλυτών ως μέσα χημικών αντιδράσεων. Παρακάτω αναλύονται τα χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών , η επίδρασή τους στην ενζυμική δράση με παράλληλο σεβασμό στην ενζυμική δραστηριότητα ,σταθερότητα και εκλεκτικότητα, και οι εφαρμογές τους στη βιοκατάλυση.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

Τα ιοντικά υγρά είναι οργανικά άλατα που βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε συνήθεις θερμοκρασίες. Σε αντίθεση με τους «παραδοσιακούς» διαλύτες που μπορούν να αναφέρονται και ως μοριακά υγρά, τα ιοντικά υγρά αποτελούνται από ιόντα. (σχήμα 16)



Σχήμα 16: δομή κοινών ιοντικών υγρών

Οι μοναδικές τους ιδιότητες όπως η σταθερότητα τους, η μη εφλεκτικότητα τους και η εξαιρετική χημική και θερμική τους σταθερότητα, τα έχει χρήσει μια περιβαλλοντικά ελκυστική εναλλακτική λύση στους οργανικούς διαλύτες. Τα ιοντικά υγρά έχουν χαμηλά σημεία τήξης (<100° C) και παραμένουν σε υγρή κατάσταση μέσα σε ένα ευρύ θερμοκρασιακό φάσμα (< 300° C). Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών είναι η υψηλή τους πολικότητα. Στην ομαλοποιημένη κλίμακα πολικότητας (E_T^N) με η πολικότητα των κοινών ιοντικών υγρών κυμαίνεται στο 0,6 με 0,7 και συμπίπτει με αυτή των κατώτερων αλκοολών. Ένας συσχετισμός μεταξύ της μείωσης τόσο του μήκους της αλυσίδας όσο και των άκυκλ-υποκαταστατών στον βενζολικό δακτύλιο με το

μεγέθους του κατιόντος και του ανιόντος με αύξηση της πολικότητας μπορεί να παρατηρηθεί.

Οι τιμές της πολικότητας των ιοντικών υγρών είναι κάποιες φορές ευαίσθητες στη θερμοκρασία και την παρουσία νερού. Λόγω της υψηλής πολικότητας τους τα ιοντικά υγρά αποτελούν ιδανικό μέσο αντίδρασης για χημικές και βιοχημικές αντιδράσεις αφού έχουν την ικανότητα να διαλύουν ένα ευρύ φάσμα διαφορετικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένων πολικών, μη πολικών, οργανικών, ανόργανων και πολυμερών ουσιών [50].

Παρά την υψηλή τους πολικότητα, τα περισσότερα ιοντικά υγρά είναι υδρόφοβα και μπορούν να διαλύσουν έως και 1% νερό, με την παρουσία του νερού όμως να επηρεάζει τις φυσικές τους ιδιότητες. Παρόλα αυτά, η διαλυτότητα του νερού στα ιοντικά υγρά διαφέρει απρόβλεπτα. Για παράδειγμα, παρότι τα $\text{BMIm}][\text{BF}_4]$, $\text{BMIm}][\text{PF}_6]$, και $\text{BMIm}][\text{Tf}_2\text{N}]$ είναι παρόμοια στην κλίμακα πολικότητας Reichardt's, το πρώτο είναι εντελώς αναμίξιμο με το νερό ενώ τα δύο τελευταία μόνο ελάχιστα διαλυτά σε αυτό (0.13%, v/v, και 1.4%, v/v αντίστοιχα). Τα ιοντικά υγρά είναι γενικά μη αναμίξιμα με πολλούς οργανικούς διαλύτες ειδικά όταν οι τελευταίοι είναι μη πολικοί (όπως το εξάνιο) ενώ μερικά μπορεί να είναι αναμίξιμα με πολικούς διαλύτες όπως το διχλωρομεθάνιο. Η μη αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών τόσο με το νερό όσο και με τους οργανικούς διαλύτες τα έχει κάνει ικανά να χρησιμοποιούνται σε διφασικά συστήματα.

Σε σύγκριση με τους κοινούς οργανικούς διαλύτες τα ιοντικά υγρά είναι πολύ πιο ιξώδη (35-500 cP ιξώδες για τα κοινά ιοντικά υγρά έναντι 0,6 του τολουενίου και 0,9 cP του νερού στους 25° C). Το ιξώδες αυτό των ιοντικών υγρών αντιπροσωπεύει την τάση τους να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου και τη «δύναμη» των αλληλεπιδράσεων van derWaals, που μπορεί να μειωθεί αυξάνοντας τη θερμοκρασία ή προσθέτοντας κάποιους οργανικούς συν-διαλύτες. Όπως είναι αναμενόμενο, ένα ιοντικό υγρό με μεγαλύτερη άλκυλ-αλυσίδα στο κατιόν του και ένα μεγαλύτερο ανιόν παρουσιάζει και μεγαλύτερο ιξώδες.

Ένα προφανές πλεονέκτημα της χρήσης ιοντικών υγρών αντί κοινών οργανικών διαλυτών είναι ότι οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών, συμπεριλαμβανομένης της πολικότητας, της υδροφοβικότητας, του ιξώδους και της αναμιξιμότητας τους με διαλύτες, μπορούν να ρυθμιστούν επιλεκτικά αλλάζοντας το ανιόν, το κατιόν και τους υποκαταστάτες. Κάτι τέτοιο είναι σημαντικό γιατί «χειριζόμενος» τις ιδιότητες του διαλύτη μπορεί κάποιος να «σχεδιάσει» ένα ιοντικό υγρό για συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης όπως για παράδειγμα να αυξήσει τη διαλυτότητα του υποστρώματος, να τροποποιήσει την εκλεκτικότητα του ενζύμου ή να αυξήσει το ρυθμό της αντίδρασης.[50]

ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Ενώ ενεργά, τα ένζυμα συνήθως δε διαλύονται στα ιοντικά υγρά αλλά παραμένουν ακινητοποιημένα όπως όταν βρίσκονται σε οργανικούς διαλύτες. Πολλοί ερευνητές έχουν αναφέρει ότι όταν βρίσκονται σε ιοντικά υγρά πολλά ένζυμα είναι ικανά να εκτελέσουν καταλυτικές δράσεις που γενικά είναι συγκρίσιμες ή ακόμα καλύτερες από εκείνες που παρατηρούνται στους οργανικούς διαλύτες (πίνακας 1). Μετά από έρευνες βρέθηκε ότι το ιοντικό υγρό μπορεί να λειτουργήσει ως ένα μικροπεριβάλλον σταθεροποίησης του ενζύμου.

Πίνακας 1: Παραδείγματα χρήσης ενζύμων σε ιοντικά υγρά

Biocatalyst	Reaction	Ionic liquid
Lipase	Transesterification Alcoholysis, ammoniolysis, perhydrolysis Kinetic resolution of chiral alcohols Resolution of amino acid ester Kinetic resolution of P-chiral hydroxymethanephosphinates Esterification of carbohydrates Synthesis of polyesters	[BMIm]PF6 [BMIm][PF6],[BMIm][BF4] [BMIm][Tf2N] [EPy][BF4], [EMIm][BF4] [BMIm][PF6] [MOEMIm][BF4] [BMIm][PF6]
Alcohol dehydrogenase	Enantioselective reduction of 2-octanone	[BMIm][Tf2N]
Thermolysin	Synthesis of Z-aspartame	[BMIm][PF6]
α -Chymotrypsin	Transesterification	[EMIm][Tf2N], [MTOA][Tf2N]
Esterase	Transesterification	[BMIm][PF6]
Subtilisin	Resolution of amino acid ester	[EPy][TFA]-H ₂ O (15:85, v/v)
β -Galactosidase	Synthesis of N-acetyllactosamine	[MMIm][MeSO ₄]-H ² O (25:75, v/v)
Peroxidase	Oxidation of guaiacol	[BMIm][PF6]
Laccase	Oxidation of anthracene	[BMIm][PF6]
Formate dehydrogenase	Regeneration of NADH	[MMIm][MeSO ₄]-H ₂ O (25:75, v/v)
Baker's yeast	Enantioselective reduction of ketones	[BMIm][PF6]-H ₂ O (10:1)
Lactobacillus kefir cells	Asymmetric reduction of 4-chloroacetophenone to (R)-1-(4-chlorophenyl)ethanol	[BMIm][PF6], [BMIm][Tf2N], [OMA][Tf2N]

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

1. Υδροφοβικότητα

Στους οργανικούς διαλύτες, ο πιο δημοφιλής χαρακτηρισμός τους, και αυτός που θεωρείται καθοριστικός για την ενζυμική ενεργότητα είναι ο $\log P$.

Έτσι οι διαλύτες με υψηλό $\log P$ όπως το εξάνιο ($\log P = 3,5$) είναι πιο υδρόφοβοι και κατά συνέπεια πιο κατάλληλοι για ενζυμικές αντιδράσεις από ότι εκείνοι με χαμηλότερο $\log P$ όπως η αιθανόλη ($\log P = 0,24$). Παρόλα αυτά πολλές εξαιρέσεις έχουν αναφερθεί σε αυτόν τον κανόνα. Μέχρι τώρα τα ιοντικά υγρά δεν «κρίνονται» με τη λογική του $\log P$. Το $\log P$ δε λειτουργεί ως χρήσιμη παράμετρος για τον καθορισμό της ενζυμικής δράσης στα ιοντικά υγρά. Από την άλλη, κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι το ιοντικό υγρό συμμετέχει στην κλίμακα οκτανόλης-νερού ως ένα ζευγάρι ιόντων, και έτσι η $\log P$ τιμή του μπορεί να εξαρτάται όχι μόνο από τη συγκέντρωση του κατιόντος αλλά και από εκείνη του ανιόντος και την έκταση της ιοντικής ένωσης και στις δύο φάσεις. Δυστυχώς είναι ακόμα ασαφές εάν κάποιος από αυτούς τους παράγοντες μπορεί να σχετιστεί με την ενζυμική δραστηριότητα.

2. Ιξώδες

Το ιξώδες του μέσου αντίδρασης μπορεί να καθορίσει την ενζυμική δραστηριότητα επηρεάζοντας τα φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Έτσι ένας χαμηλότερος ρυθμός αντιδράσεις θα αναμενόταν από ένα ιοντικό υγρό με υψηλό ιξώδες. Πράγματι, όταν η χυμοτριψίνη εξετάστηκε σε δύο ιοντικά υγρά [EMIm][Tf2N] και [MTOA][Tf2N] με ιξώδες 34 και 574 cP αντίστοιχα, μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου παρατηρήθηκε με την αύξηση του ιξώδους του μέσου αντίδρασης.

3. Πολικότητα

Μελέτες πάνω σε αντιδράσεις σε ιοντικά υγρά δεν δείχνουν συσχέτιση μεταξύ του ρυθμού αντίδρασης και της πολικότητας του διαλύτη όπως για παράδειγμα στην αντίδραση μετεστεροποίησης καταλυόμενη από *Candida rugosa* λιπάση ή την αντίδραση ακετυλίωσης της γλυκόζης καταλυόμενη από *C. Antarctica B* λιπάση και άλλες. Είναι δύσκολο να εξηγηθεί το παραπάνω φαινόμενο, γιατί δηλαδή η πολικότητα των ιοντικών υγρών επηρεάζει διαφορετικά κάθε φορά το ρυθμό της αντίδρασης. Κατά την κατανόηση μας, η ενζυμική δραστηριότητα

μπορεί να επηρεάζεται περισσότερο από το ιξώδες και λιγότερο από την πολικότητα του ιοντικού υγρού.

Αρχικά η πολικότητα κυμαίνεται σε ένα σχετικά στενό πλαίσιο (0,6–0,7) σε σύγκριση με το ιξώδες που κινείται σε πολύ πιο ευρύ φάσμα (35–500 cP).

Επίσης, φαίνεται να υπάρχει συσχετισμός μεταξύ πολικότητας και ιξώδους των ιοντικών υγρών. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως ένα ιοντικό υγρό με μικρότερες άλκυλ-αλυσίδες στο κατιόν του και μικρότερο μέγεθος ανιόντος αναμένεται να έχει μικρότερο ιξώδες και υψηλότερη πολικότητα. Αυτό υποδηλώνει ότι μια μικρή μείωση της πολικότητας των ιοντικών υγρών μπορεί να αντιστοιχεί σε μια μεγάλη αύξηση του ιξώδους.

Έτσι η παραπάνω διαπίστωση για μεγαλύτερους ρυθμούς αντίδρασης στα περισσότερα πολικά ιοντικά υγρά μπορεί να εξηγηθεί με την επίδραση του ιξώδους.

Επίσης, οι ρυθμοί αντίδρασης συγκρίνονται συνήθως σε διαφορετικά ιοντικά υγρά με την ίδια ποσότητα νερού στο αντιδρών σύστημα. Υπό αυτές τις συνθήκες, ο διαλύτης με τη μεγαλύτερη πολικότητα θα έχει λιγότερο νερό συνδεδεμένο με το ένζυμο και περισσότερο να παραμένει στο διαλύτη. Το πρώτο οδηγεί σε χαμηλότερο ρυθμό αντίδρασης ενώ το δεύτερο σε μείωση του ιξώδους και βελτίωση της κινητικότητας του πρωτεϊνικού μορίου. Ανάλογα με το ποιος παράγοντας παίζει πιο σημαντικό ρόλο για το ένζυμο, ο ρυθμός της αντίδρασης θα αυξάνεται ή θα μειώνεται αντίστοιχα.

Τέλος, παράλληλα με την πολικότητα και το ιξώδες, και κάποιες άλλες ιδιότητες όπως η διαλυτότητα των υποστρωμάτων και των προϊόντων και κυρίως οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις μπορεί να ευθύνονται για την ενζυμική δραστηριότητα στα ιοντικά υγρά. Περιέργως, παρά την υψηλή τους πολικότητα, τα ιοντικά υγρά δεν απενεργοποιούν τα ένζυμα όπως οι πολικοί οργανικοί διαλύτες. Αυτή η σημαντική ιδιότητα επιτρέπει στα ιοντικά υγρά να ανοίξουν νέες προοπτικές στη μη συμβατική βιοκατάλυση με πολικά και υδρόφιλα υποστρώματα.

3. Η Επίδραση του Νερού

Στα οργανικά μέσα, είναι ήδη γνωστό ότι η ποσότητα νερού που συνδέεται με το ένζυμο (bound water) παρά η συνολική ποσότητα στο αντιδρών σύστημα είναι ο καθοριστικός παράγοντας των ιδιοτήτων του ενζύμου (δραστηριότητα, σταθερότητα) και η θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού (a_w) θεωρείται μια παράμετρος ποσοτικοποίησης της ενυδάτωσης του ενζύμου. Έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές ενεργότητες νερού ($a_w = 0,11, 0,33$) το ένζυμο είναι περισσότερο ενεργό στα ιοντικά υγρά παρά σε οργανικούς διαλύτες

4. Επίδραση pH και υπολειμμάτων

Η επίδραση του pH στις ενζυμικές δράσεις που λαμβάνουν χώρα σε ιοντικά υγρά δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί.

Η πιθανότερη αιτία παρεμπόδισης της ενζυμικής αντίδρασης σε κάποια ιοντικά υγρά, είναι η παρουσία ιόντων αργύρου ή οξικών υπολειμμάτων. Γι'αυτό συνήθως προτείνεται μια διαδικασία καθαρισμού που περιλαμβάνει τη χρήση αλάτων αργύρου με φιλτράρισμα μέσω silica gel, και πλύσεις με ανθρακικό νάτριο. Μετά από αυτή τη διεργασία παρατηρήθηκε ότι οι αντιδράσεις που καταλύονταν από λιπάσες και δεν είχαν πραγματοποιηθεί, πραγματοποιήθηκαν και μάλιστα με ρυθμούς υψηλότερους από ότι σε οργανικούς διαλύτες. Βέβαια πρέπει να σημειωθεί ότι η επίδραση τυχών υπολειμμάτων διαφέρει ανάλογα με τα ένζυμα και τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται.

5. Απενεργοποίηση ενζύμων

τα ένζυμα που παρουσιάζουν καταλυτική δράση στα ιοντικά υγρά δε διαλύονται σε αυτά. Εκείνα που διαλύονται συνήθως απενεργοποιούνται. Η απενεργοποίηση προκαλείται από την στρέβλωση της πρωτεϊνικής δομής (μετουσίωση) που συνήθως είναι αντιστρεπτή. Η μετουσίωση αυτή οφείλεται στην ιοντική φύση των ιοντικών υγρών. το ανιόν ή το κατιόν του ιοντικού υγρού μπορεί να αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλάζοντας τη δομή του.

ENZYMΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΣΤΑ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Όταν το ένζυμο δεν απενεργοποιείται μέσα στο ιοντικό υγρό, τότε μπορούμε να πούμε ότι του προσφέρει μια σταθερότητα, λειτουργώντας ως μέσο ακινητοποίησης. Έχει παρατηρηθεί ακόμα, ότι κάποια ένζυμα, όχι μόνο είναι «ανεκτικά» απέναντι σε ιοντικά υγρά αλλά μπορεί και να ενεργοποιηθούν από αυτά. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι στήριξη που προσφέρει το ιοντικό υγρό στο ένζυμο του προσδίδει υψηλή αντοχή στην αύξηση της θερμοκρασίας, αφού δεν επιτρέπει τη μετουσίωση του λόγω της ακαμψίας που του προσφέρει.

ΣΤΕΡΕΟΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Η εστεροποίηση των υδρογονανθράκων που καταλύεται από λιπάση, παρουσιάζει πλεονεκτήματα όταν πραγματοποιείται σε ιοντικά υγρά σε σύγκριση με τους οργανικούς διαλύτες, λόγω της αυξημένης στερεοεκλεκτικότητας [50].

Συμπερασματικά, βλέπουμε ότι όταν τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται ως διαλύτες στην ενζυμική βιοκατάλυση μπορεί να γίνει επιλογή των ιδιοτήτων τους, με επιλεκτικό συνδυασμό των ανιόντων και κατιόντων που τα αποτελούν. Παρόλα αυτά παραμένουν ακόμα πρακτικές δυσκολίες, όπως η απομόνωση των προϊόντων από το ιοντικό υγρό μετά το τέλος της αντίδρασης

1.5.3.1 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΙΑΛΥΣΗΣ ΤΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΟ ΥΓΡΟ

Η διάλυση της κυτταρίνης στο ιοντικό υγρό BMIMCl μπορεί να αποδοθεί στη φύση του ογκώδους κατιόντος του ημιδαζολίου και τη σχετικά μεγάλη ηλεκτραρνητικότητα και το μικρό μέγεθος του χλωριόντος. Το BMIMCl παρουσιάζει υψηλή βασικότητα απέναντι στους δεσμούς υδρογόνου, και το ανιόν παίζει σημαντικό ρόλο στη διάλυση της κυτταρίνης. Το ιόν χλωρίου «προσβάλλει» τις ελεύθερες καρβοξυλομάδες και αποπρωτονιώνει την κυτταρίνη. Το κατιόν ημιδαζολίου με το πλούσιο σε ηλεκτρόνια αρωματικό π σύστημα, αλληλεπιδρά με τα άτομα οξυγόνου των υδρόξυομάδων μέσω μη δεσμικών ή π ηλεκτρονίων, και παράλληλα αποτρέπει την εσωτερική διασύνδεση (crosslinking) των μορίων της κυτταρίνης.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά

Παρακάτω παρατίθενται ομαδοποιημένα όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στις ενζυμικές αντιδράσεις.

2.1.1 Ένζυμα

- **Lipase from *Candida Antarctica* (powder) - CALB (ελεύθερη λιπάση)**
Λιπάση με ειδική ενεργότητα 3.8 U/mg . Προϊόν της εταιρίας Fluka

- **Lipase acrylic resin from *Candida Antarctica* (immobilized) - i-CALB (ακίνητοποιημένη λιπάση)**
Ακίνητοποιημένη λιπάση με ειδική ενεργότητα 1.8 U/mg . Προϊόν της εταιρίας Sigma

- **Lipase from *Aspergillus niger* (ελεύθερη λιπάση)**
Λιπάση με ειδική ενεργότητα 3 U/mg . Προϊόν της εταιρίας Fluka

- **Cutinase *F.Solani* (immobilized)– i-cutinase (ακίνητοποιημένη κουτινάση)**
Ακίνητοποιημένη κουτινάση με ειδική ενεργότητα 1.4 U/mg. Προϊόν του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας

- **Esterase, immobilized on Eupergit from hog liver – i-esterase (ακίνητοποιημένη εστεράση)**
Ακίνητοποιημένη εστεράση με ειδική ενεργότητα 0.8 U/mg . Προϊόν της εταιρίας Fluka

2.1.2 Κυτταρινούχα Υποστρώματα

- **Carboxymethyl Cellulose(Low viscosity) -CMC**: καρβόξυμέθυλο κυτταρίνη
Προϊόν της εταιρίας Sigma-Aldrich, με βαθμό υποκατάστασης 40% και M_r : 29.000
- **Cellulose Microcristalline – AVICEL** : μικροκρυσταλλική κυτταρίνη
Προϊόν της Macherey-Nager με M_r :160000
- **Methyl cellulose : μέθυλο-κυτταρίνη**
Προϊόν της εταιρείας Sigma με βαθμό υποκατάστασης 35% και M_r :14000
- **Ethyl cellulose : αίθυλο-κυτταρίνη**
Προϊόν της εταιρείας Aldrich με βαθμό υποκατάστασης 48% και M_r :17000



Σχήμα 17 : Παράγωγα κυτταρίνης του εμπορίου

2.1.3 Λιπαρά υποστρώματα

- **Vinyl laurate : βινιλεστέρας του λαυρικού οξέος**
Προϊόν της εταιρίας Fluka, καθαρότητας >99%
- **Vinyl propionate : βινιλεστέρας του προπιονικού οξέος**
Προϊόν της εταιρίας Sigma, καθαρότητας 98% και $d=0.919$
- **Vinyl stearate : βινιλεστέρας του στεατικού οξέος**
Προϊόν της εταιρίας Aldrich, καθαρότητας >99%
- **Vinyl acetate : Βινιλεστέρας του οξικού οξέος**
Προϊόν της εταιρίας Fluka, καθαρότητας >99%

2.1.4 Οργανικοί διαλύτες

- **Ακετονιτρίλιο– Acetonitrile HPLC gradient grade**
Προϊόν της εταιρίας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%
- **Μεθανόλη– Methanol HPLC grade**
Προϊόν της εταιρίας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%
- **Αιθανόλη– Ethanol absolute**
Προϊόν της Panreac καθαρότητας 100%
- **Αιθανόλη 96%– Ethanol 96%**
Προϊόν της Panreac καθαρότητας 96%
- **Εξανόλη - 1-hexanol**
Προϊόν της εταιρείας Merch
- **Εξάνιο – Hexane Analytical reagent grade**
Προϊόν της εταιρίας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%

- **Δεκάνιο - Decane**
Προϊόν της εταιρίας Fluka, καθαρότητας >95%
- **Οξικός Αιθυλεστέρας - Ethyl acetate**
Προϊόν της εταιρίας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%
- **Ισοοκτάνιο - 2,2,4 Trimethylpentane (isooctane)**
Προϊόν της εταιρίας Sigma-Aldrich, καθαρότητας 99,8%
- **T- βουτανόλη – 2 methyl-2-propanol (T-boutanol)**
Προϊόν της εταιρίας Panreac

2.1.5 Ιοντικά Υγρά:

- **BMIM-Cl (1-butyl-3 methylimidazolium chloride)**
Προϊόν της εταιρείας Fluka
- **BMIM-PF6 (1-butyl-3-methylimidazolium hexafluoro-phosphate)**
Προϊόν της εταιρείας Fluka

2.1.6 Λοιπά αντιδραστήρια

Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (citrate/phosphate), χρησιμοποιήθηκαν απιονισμένο νερό και

- **citric acid 1-hydrate extra pure**, της εταιρίας Riedel-de Haen, καθαρότητας 99.5%
- **dibasic sodium phosphate**, της Riedel-de Haen, καθαρότητας 98.5%.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν:

- **CaCl₂ (Calcium Chloride Anhydrous)**
Προϊόν της εταιρείας Mallinkrod chemical
- **AOT (Bis (2-ethylexyl) sulfosuccinate sodium salt)**
Προϊόν της εταιρείας Sigma-Aldrich
- **Οξικό οξύ – acetic acid glacial**
Προϊόν της εταιρείας Panreac

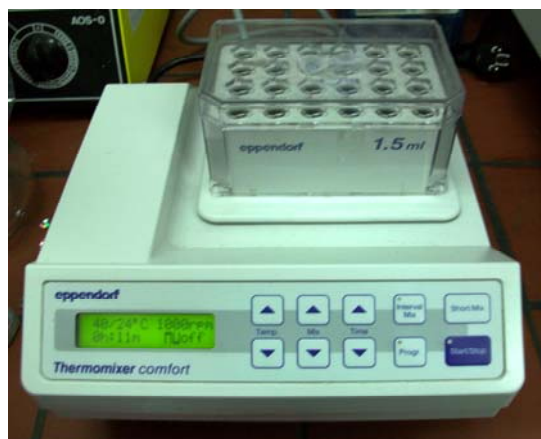
2.2 ΟΡΓΑΝΑ

- Επωαστήρας με ανάδευση (orbital incubator), ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-500rpm). Αναφερόμενο στο εξής ως **thermoshaker**.



Εικόνα 18: thermoshaker

- Μικρός επωαστήρας (για ependorfs) με ανάδευση ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-1400rpm). Αναφερόμενο στο εξής ως **thermomixer**.



Εικόνα 18 : thermomixer

- Φασματόμετρο υπεράυθρου (**FT-IR**) Nicolet Magna 560



Εικόνα 19 : FTIR

- Αέριος χρωματογράφος (**GC**) Shimadzu



Εικόνα 20 : GC

- Φασματοφωτόμετρο UV (Hitachi)
- Φούρνος ξήρασης
- Πρέσα για χάπια
- pH-μετρο
- αναλυτικός ζυγός
- πρέσα για χάπια
- φίλτρα διήθησης (NYLON MEMBRANE FILTERS 0,45 μm της εταιρείας Whatman)

2.3 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.3.1 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ AVICEL ΜΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Η επεξεργασία της καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) στις αντιδράσεις που αυτή χρησιμοποιήθηκε έγινε ως εξής:

- Ζυγίζονται 1,10 g ιοντικού υγρού (BMIM-Cl) και 0,05 g κυτταρίνης AVICEL (5% του ιοντικού w/w)
- Μεταφέρονται οι ποσότητες σε γυάλινο δοχείο (των 25 ml) με πώμα μαζί με ένα μαγνητικό στικ.
- Τοποθετείτε το δοχείο σε ελαιόλουτρο που βρίσκεται στους 120° C για 30 min με έντονη ανάδευση.



Εικόνα 21: Διάταξη επεξεργασίας AVICEL σε ιοντικό υγρό BMIMCl

Καθαρισμός (Απομάκρυνση Ιοντικού υγρού)

- Μετά το πέρας των 30 min προσθέτονται στο δοχείο (χωρίς αυτό να απομακρυνθεί από το ελαιόλουτρο) 13 ml ζεστό απιονισμένο νερό.
- Ακολουθεί ανάδευση για μερικά λεπτά
- Διηθείτε το περιεχόμενο του δοχείου υπό κενό χρησιμοποιώντας nylon φίλτρα , με ταυτόχρονη έκπλυση με θερμό απιονισμένο νερό
- Συλλέγεται η κυτταρίνη από το φίλτρο και τοποθετείτε σε γυάλινο δοχείο μαζί με θερμό απιονισμένο νερό, και αναδεύεται σε vortex για λίγα λεπτά.
- Επαναλαμβάνεται η διαδικασία της διήθησης υπό κενό ακόμα δύο φορές.

Η κυτταρίνη είναι έτοιμη για χρήση, απαλλαγμένη από το ιοντικό υγρό (ο τελικός έλεγχος γινόταν με τη βοήθεια του FTIR).

2.3.2 GC και UV

Για να επιβεβαιωθεί ότι οι καθαρισμοί ήταν επιτυχείς, τα δείγματά μας ελέγχονται με GC και UV, παρατηρώντας αν υπάρχουν ή όχι κορυφές στα διαγράμματα που εμφανίζονταν κάθε φορά, που να συμπίπτουν με εκείνες των διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. Όταν δεν υπήρχαν κορυφές σήμαινε ότι οι καθαρισμοί ολοκληρώθηκαν με επιτυχία. Με το GC ελέγχθηκαν τα δείγματα που περιέχουν ελεύθερα λιπαρά οξέα, ενώ με το UV τα δείγματα που περιέχουν βινυλεστέρα λιπαρού οξέως.

2.3.3 ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ FT-IR

ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (IR) ΚΑΙ FT-IR

Η φασματομετρία υπέρυθρου (IR=Infared) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ποιοτικής και ποσοτικής σύστασης ενός δείγματος, για τον προσδιορισμό της δομής και του προσανατολισμού μορίων και την ταυτοποίηση μιας αέριας, υγρής ή στερεής ουσίας.

Η υπέρυθρη φασματομετρία χαρακτηρίζεται από τα εξής σημεία:

- ❖ Έχει μεγάλη εκλεκτικότητα, γι' αυτό και το φάσμα της ένωσης χαρακτηρίζεται ως δακτυλικό αποτύπωμα (fingerprint) της.

- ❖ Είναι ποσοτική και μη καταστροφική τεχνική ανάλυσης, ακόμα και των θερμικά ευαίσθητων ενώσεων
- ❖ Έχει τη δυνατότητα ανάλυσης μεγάλου εύρους συγκεντρώσεων (0,1-100%)
- ❖ Το δείγμα μπορεί να είναι αέριο, υγρό ή στερεό

Η υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος εκτείνεται από την περιοχή του ορατού (800 nm) μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων (1000 μm) και υποδιαιρείται στις περιοχές του:

-Εγγύς IR (near IR): 0,8-2,5 μm ($12500-4000\text{ cm}^{-1}$)

-Μέσου IR (middle IR): 2,5-25 μm ($4000-400\text{ cm}^{-1}$)

-Άπω IR (far IR): 25-1000 μm ($400-10\text{ cm}^{-1}$)

Η κύρια περιοχή που παρουσιάζει ενδιαφέρον για αναλυτικούς σκοπούς είναι το μέσο IR ($4000-400$ κυματαριθμούς, cm^{-1}), αφού εκεί κυρίως παρατηρούνται οι βασικές μεταβολές στη δόνηση των μορίων λόγω απορρόφησης ακτινοβολίας.

Πρέπει να αναφερθεί ότι ως κυματαριθμός ορίζεται το αντίστροφο του μήκους κύματος ($1/\lambda$), όπου το λ μετριέται σε cm.

Υπάρχουν τρία είδη φασματομέτρων IR:

- Τα συμβατικά IR με χρήση μονοχρωμάτορα (dispersive spectrometers)
- T-IR (Fourier Transformed Infrared)
- Φασματομέτρα IR ειδικού τύπου

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε FT-IR φασματομέτρο. Για να κατανοηθεί η λειτουργία ενός **συμβατικού φασματομέτρου IR**, γίνεται μια σύντομη αναφορά στις λειτουργικές του μονάδες:

- Την *πηγή ακτινοβολίας*,
- Τη *θέση του δείγματος*, είτε αυτό είναι υγρό, αέριο ή στερεό,
- Το *μονοχρωμάτορα*, όπου είναι η μονάδα που διαχωρίζει την πολυχρωματική ακτινοβολία σε μονοχρωματική. Ο μονοχρωμάτορας πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχει μόνο στους συμβατικούς φασματογράφους IR,

- Τον *ανιχνευτή*, ο οποίος απορροφά την ενέργεια φωτονίων, τη μετατρέπει σε θερμότητα και μετράται η αλλαγή της θερμοκρασίας
- και τέλος το *καταγραφικό*, το οποίο συνήθως είναι ένας υπολογιστής ο οποίος δέχεται το σήμα του ανιχνευτή και με το κατάλληλο λογισμικό το μετατρέπει σε φάσμα IR.

Όσον αφορά στο **φασματόμετρο FT-IR**, τα φασματόμετρα αυτού του τύπου είναι απλής δέσμης που δεν έχουν μονοχρωμάτορα φράγματος, αλλά χρησιμοποιούν ένα *συμβολόμετρο* τύπου Michelson, που τοποθετείται μεταξύ της πηγής και του δείγματος.

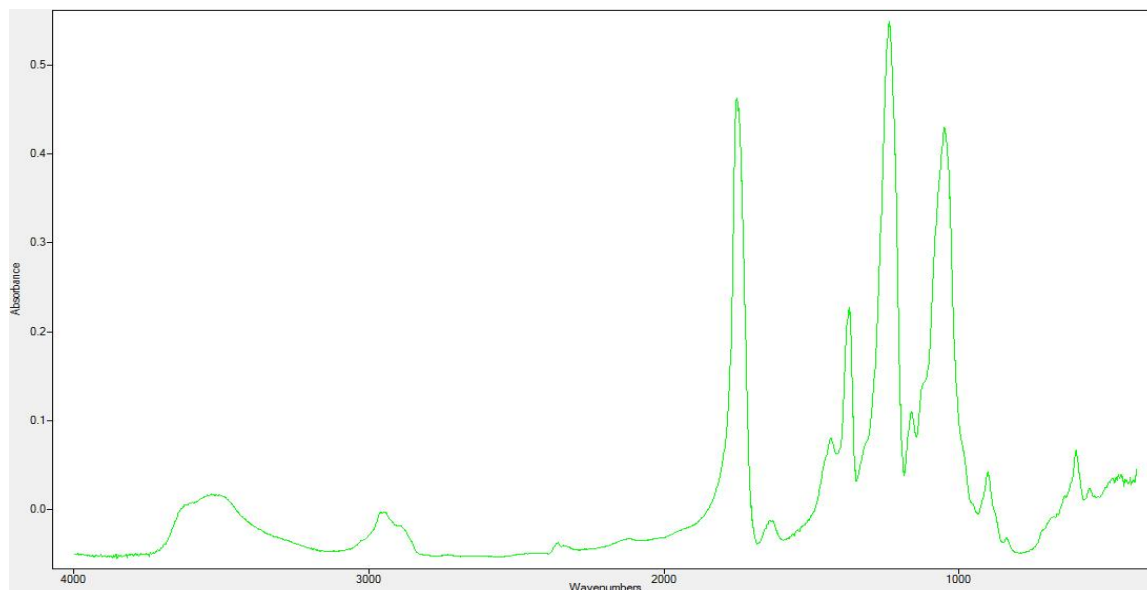
Στα φασματόμετρα αυτού του τύπου η ακτινοβολία από την πηγή προσπίπτει σε ένα διαχωριστή δέσμης που αποτελείται από ένα φιλμ γερμανίου σε υπόστρωμα KBr, διαπερατό στο μέσο IR. Λόγω της ημιδιαπερατότητά του, δημιουργούνται δύο δέσμες, από τις οποίες η μία προσκρούει (ανακλάται) σ'ένα σταθερό κάτοπτρο και η άλλη ανακλάται σ'ένα κινητό κάτοπτρο, του οποίου μεταβάλλεται η απόσταση κατά λίγα mm από το διαχωριστή δέσμης. Οι δύο αυτές δέσμες ενώνονται κατόπιν, διαπερνούν το δείγμα και προσκρούουν μαζί στον ανιχνευτή. Η διαφοροποίηση του φασματόμετρου FT-IR, όπως αναφέρθηκε, έγκειται στη χρήση του συμβολόμετρου. Το συμβολόμετρο Michelson περιέχει ένα κινητό κάτοπτρο το οποίο έχει τη μοναδική ιδιότητα σε κάθε σημείο του να δίνει πληροφορίες ταυτόχρονα για όλες τις επιμέρους IR συχνότητες. Το σήμα που εξέρχεται καταγράφεται ως συμβολόγραμμα και μετατρέπεται σε συμβατικό IR με χρήση του μαθηματικού μετασχηματισμού Fourier.

Για τις ανάγκες της εν λόγω εργασίας χρησιμοποιήθηκε συσκευή FT-IR της εταιρείας Nicolet, μοντέλο: Magna-IR 560, με ειδική συσκευή για λήψη στερεού δείγματος (FT-IR DRIFT).

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΜΕ FT-IR

Αφού ολοκληρωθεί ο καθαρισμός και η ξήρανση των προϊόντων, τα τελευταία FTIR. Για να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις στο FTIR τα στερεά δείγματα αναμινύονται πρώτα με KBr (10mg δείγματος + 100mg KBr) και στη συνέχεια τα προκύπτοντα μίγματα αφού κονιορτοποιηθούν, μορφοποιούνται σε παστίλιες με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας. Στο τέλος κάθε παστίλια τοποθετείται σε ειδικό δειγματοφορέα του FTIR και πραγματοποιείται η αντίστοιχη μέτρηση. Συγκρίνουμε το προκύπτον φάσμα με το αντίστοιχο του

τυφλού δείγματος και ελέγχουμε εάν στο πρώτο εμφανίζεται κορυφή εστέρων που βρίσκεται στο διάστημα κυματαριθμών από 1720 έως 1750 (Σχήμα 22).



Σχήμα22. Φάσμα από FT-IR στο οποίο αποτυπώνονται οι κορυφές των εστέρων

2.3.4 ΧΗΜΙΚΗ ΥΔΡΟΛΥΣΗ ΕΣΤΕΡΩΝ

Για να προσδιοριστεί ο μέσος βαθμός εστεροποίησης κάθε κυτταρινούχου προϊόντος (εστέρας κυτταρίνης) , το τελευταίο κατεργάζεται με αλκαλικό διάλυμα έτσι ώστε να υδρολυθούν πλήρως οι εστερικοί δεσμοί. Στη συνέχεια, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που προκύπτουν μετρώνται μέσω αέριας χρωματογραφίας (GC). Ειδικότερα η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την αλκαλική υδρόλυση των εστέρων κυτταρίνης,μ είναι η ακόλουθη.

Σε 5 ml αιθανόλης 96% προατήθενται 1 g εστέρα κυτταρίνης και 30 ml υδατικού διαλύματος NaOH 0,5 M. Το διάλυμα αφήνεται για 3 ημέρες και στη συνέχεια διηθείται. Το διήθημα (στο οποίο περιέχονται τα υδρολύματα) μετράται στο GC.

2.4 ENZYMIKES ANΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

Παρακάτω εμφανίζονται ομαδοποιημένες οι αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν.

Να σημειωθεί ότι για κάθε αντίδραση παρασκευαζόταν αντίστοιχη τυφλή αντίδραση, στην οποία το ένζυμο ήταν απενεργοποιημένο.

Επίσης μετά το τέλος των καθαρισμών, το υλικό που συλλεγόταν, τοποθετούνταν για ξήρανση στους 40° C για τουλάχιστον 20 h.



Αντιδράσεις με CMC

A1. Αντίδραση CMC (H₂O) + εξανόλη + λιπάση (από *Aspergillus niger*)

Σε 10 ml buffer pH 7 (citrate/phosphate) διαλύονται 0,3 g CMC

Σε ένα erendorff τοποθετούνται:

1. -0,5 ml από το διάλυμα της CMC
2. -0,5 ml εξανόλη
3. -6 mg ενζύμου (λιπάση από *aspegilus niger*)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000 rpm

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ A1 : Η πάνω φάση (εξανόλη) τοποθετείται σε falcon και προστίθενται 3 ml αιθανόλη absolute έτσι ώστε να καταβυθιστεί ο πολυσακχαρίτης.

Γίνεται ανάδευση σε vortex για λίγα λεπτά και στη συνέχεια φυγοκέντρωση για 30 min. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται προσθέτοντας αυτή τη φορά 1 ml αιθανόλης absolute. Γίνεται ξανά διήθηση υπό κενό.

Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθείται και για τον καθαρισμό της κάτω φάσης, αντικαθιστώντας την αιθανόλη absolute με αιθανόλη 96%.

2. Αντίδραση CMC (H₂O) + ισοοκτάνιο+AOT+vinyl laurate+ λιπάση (*aspegilus niger*) **ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΑ ΜΙΚΥΛΙΑ**

Σε 10 ml buffer pH 7 (citrate/phosphate) προστίθενται 0,3 g CMC

Σε σφαιρική φιάλη (των 50 ml) προσθέτονται:

4. -180 λ από το διάλυμα της CMC
5. -10 ml ισοοκτάνιο
6. -0,223 g AOT
7. -4,5 mg ενζύμου (λιπάση από *aspegilus niger*)
8. -2 ml vinyl laurate

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός A2: στη φιάλη της αντίδρασης προσθέτεται διάλυμα ανθρακικού νατρίου (ίσου όγκου με τη αντίδραση) για να σπάσουν τα αντίστροφα μικκύλια και να προκύψουν δύο φάσεις.Ακολουθεί καθαρισμός όμοια με τον καθαρισμό A1.

A3. Αντίδραση CMC (H₂O) + δεκάνιο + vinyl stearate+ λιπάση (CALB)

Παρασκευάζεται διάλυμα 1% CMC σε buffer pH 7 (citrate/phosphate).

Σε σφαιρική φιάλη (των 25 ml) τοποθετούνται:

9. -5 ml από το διάλυμα της CMC
10. -5 ml δεκάνιο
11. -300 mg vinyl stearate
12. -200 mg ενζύμου (λιπάση CALB)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση: 700 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 44 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ A3 : όμοια με τον καθαρισμό A1 (όπου υπήρχε εξανόλη ,τώρα υπάρχει δεκάνιο)

A4. Αντίδραση CMC (H₂O) + δεκάνιο + vinyl stearate+ λιπάση (CALB)

Παρασκευάζεται διάλυμα 1% CMC σε buffer pH 7 (citrate/phosphate)
Σε σφαιρική φιάλη (των 25 ml) τοποθετούνται:

13. -5 ml από το διάλυμα της CMC
14. -5 ml δεκάνιο
15. -300 mg vinyl stearate
16. -300 mg ενζύμου (λιπάση από *aspegilus niger*)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C
Ταχύτητα ανάδευση:700 rpm (thermomixer)
Διάρκεια αντίδρασης: 44 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ A4: όμοια με καθαρισμό A3.

A5. Αντίδραση CMC (H₂O) + δεκάνιο + vinyl propionate+ λιπάση (από *Aspegilus niger*)

Παρασκευάζεται διάλυμα 3% CMC σε buffer pH 7 (citrate/phosphate)
Σε σφαιρική φιάλη (των 25 ml) τοποθετούνται:

17. -5 ml από το διάλυμα της CMC
18. -750 λ vinyl propionate
19. -30 mg ενζύμου (λιπάση από *aspegilus niger*)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C
Ταχύτητα ανάδευση:240 rpm (thermoshaker)
Διάρκεια αντίδρασης: 121 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ A5: Το περιεχόμενο των erendorf των δειγματοληψιών (500λ)μεταφέρεται το σε μικρό falcon. Προσθέτονται 5 ml αιθανόλης 96% και παρατηρείται καταβύθιση της CMC. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20 min και αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Στο ίζημα που απομένει προσθέτεται 1 ml

αιθανόλης και αναδεύεται για λίγα λεπτά στο vortex. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται 3 φορές, με ενδιάμεσες διηθήσεις υπό κενό.

A6. CMC(H₂O) + εξανόλη + λιπάση (i CALB)

Σε 10 ml H₂O διαλύονται 0,15g CMC.

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται:

20. -4 ml από το παραπάνω διάλυμα CMC

21. -4 ml εξανόλη

22. -10 mg ένζυμο (i CALB)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 250 rpm (thermoshaker)

Διάρκεια αντίδρασης: 121 h (δειγματοληψία κάθε 24 h)

Καθαρισμός A6: όμοια με A5

A7. CMC(H₂O) + εξανόλη + λιπάση (i CALB)

Σε 10 ml H₂O διαλύονται 0,15g CMC.

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται:

23. -5 ml από το παραπάνω διάλυμα CMC

24. -5 ml εξανόλη

25. -12 mg ένζυμο (i CALB)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση: 250 rpm (thermoshaker)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h (δειγματοληψία κάθε 24 h)

Καθαρισμός A7: όμοια με καθαρισμό A5

A8. CMC(H₂O) + εξανόλη + λιπάση (i CALB)

Σε 25 ml H₂O διαλύονται 0,375 g CMC.

Σε σφαιρική φιάλη τοποθετούνται:

26. -10 ml από το παραπάνω διάλυμα CMC

27. -10 ml εξανόλη

28. -24 mg ένζυμο (i CALB)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση: 250 rpm (thermoshaker)

Διάρκεια αντίδρασης: 96 h (δειγματοληψία κάθε 24 h)

Καθαρισμός A8: Το περιεχόμενο των erendorf των δειγματοληψιών (1 ml) μεταφέρεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες και προσθέτονται 5ml αιθανόλη 96%. Αναδεύεται σε vortex και φυγοκεντρείται για 20 min. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται 5 φορές.

A9. CMC (H₂O) + vinyl propionate + λιπάση (από *Aspegilus niger*)

Σε 10 ml buffer pH 7 (citrate/phosphate) διαλύεται 0,3 g CMC .

σε erendorf τοποθετούνται:

29. -1 ml διαλύματος CMC

30. -150 λ vinyl propionate

31. -6 mg ένζυμο (λιπάση από *Aspegilus niger*)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός A9: μεταφέρεται το περιεχόμενο του erendorf σε μικρό falcon και προσθέτονται 5 ml αιθανόλη 96%. Αναδεύεται για λίγα λεπτά στο vortex για να καταβυθιστεί η CMC και φυγοκεντρείται για 20 min. Μετά τη φυγοκέντρηση

αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και προσθέεται ξανά 1 ml αιθανόλη 96% με επανάληψη της διαδικασίας.

A10. CMC (H₂O) + vinyl laurate + λιπάση (από *aspegilus niger*)

Παρασκευάζεται διάλυμα 3% CMC σε buffer pH 7 (phosphate/citrate)

σε ένα erendorff τοποθετούνται:

32. -1 ml του παραπάνω διαλύματος CMC

33. -150 μ l vinyl laurate

34. -6 mg ενζύμου (λιπάση από *aspegilus niger*)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση:1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός A10: όμοια με καθαρισμό A9

A11. CMC (H₂O) + εξανόλη + λιπάση (i CALB)

Παρασκευάζεται διάλυμα 3% CMC σε buffer pH 7 (phosphate/citrate)

Σε ένα erendorff τοποθετούνται:

35. -0,5 ml του παραπάνω διαλύματος CMC

36. -0,5 ml εξανόλη

37. -2,5 mg ενζύμου (λιπάση i CALB)

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση:1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός A11: όμοια με καθαρισμό A1

B

Αντιδράσεις με αίθυλο-κυτταρίνη (Ethyl- cellulose)

B1. αίθυλο-κυτταρίνη + Αιθανόλη + vinyl laurate + i CALB

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

-1 ml διαλύματος (40 mg ethyl cellulose σε 5 ml αιθανόλης)

- 100 λ vinyl laurate

- 5 mg iCALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση:900 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός B1: στο erendorf της αντίδρασης προσθέτονται 4 ml απιονισμένο νερό για να καταβυθιστεί ο πολυσακχαρίτης. Αποχύνεται η υπερκείμενη φάση και ακολουθούν καθαρισμοί με 2 ml μεθανόλη για δύο φορές. Ακολουθούν ακόμα δύο καθαρισμοί με 2 ml εξανίου. Ενδιάμεσα των καθαρισμών γίνεται διήθηση υπό κενό.

B2. αίθυλο-κυτταρίνη + ethyl-acetate + vinyl laurate + i CALB

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

-1 ml διαλύματος (40 mg ethyl cellulose σε 5 ml ethyl-acetate)

- 100 λ vinyl laurate

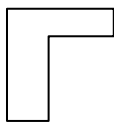
- 5 mg iCALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση:900 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

B2: όμοια με καθαρισμό B1.



Αντιδράσεις με μέθυλο-κυτταρίνη (methyl-cellulose)

Γ1. Μέθυλο-κυτταρίνη (σε H₂O)+ vinyl laurate + i CALB

σε ένα erendorf τοποθετούνται:

38. -1 ml διαλύματος (40 mg methyl-cellulose σε 5 ml νερό)

39. -100 λ vinyl laurate

40. -5 mg ενζύμου λιπάση i CALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 45° C

Ταχύτητα ανάδευση:900 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός Γ1: Στο erendorf της αντίδρασης προσθέτονται 4 ml αιθανόλη 96% για να καταβυθιστεί ο πολυσακχαρίτης. Αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και ακολουθεί καθαρισμός με προσθήκη 2 ml μεθανόλη για δύο φορές και 2 ml εξάνιο για άλλες δυο φορές. Ενδιάμεσα των καθαρισμών γίνεται διήθηση υπό κενό.



Αντιδράσεις με AVICEL σε BMIMCl

Στις αντιδράσεις αυτές τα ιοντικά υγρά υπάρχουν στην αντίδραση σε όλη τη διάρκεια της.

Δ1. AVICEL σε BMIM-Cl + BMIM-PF6 + vinyl-laurate+ iCALB

Γίνεται επεξεργασία της AVICEL με BMIMCl (βλέπε μεθόδους) .Χωρίς να απομακρυνθεί το ιοντικό υγρό,το υλικό τοποθετείται στους 4° C για 20 h.

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

41. - 0,1 g από το υλικό (AVICEL και BMIMCl)

42. -0,5 ml BMIMPF6

43. -8,5 mg i CALB

44. -150 λ vinyl laurate

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση:1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 72 h

Καθαρισμός Δ1: στο erendorf με το υλικό προσθέτονται 0,5 ml θερμού απιονισμένου νερού, και τοποθετείται για λίγα λεπτά στο thermomixer. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και ταυτόχρονες εκπλύσεις με θερμό νερό. Επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία αντικαθιστώντας το νερό με εξάνιο

Δ2. AVICEL σε BMIM-Cl και BMIM-PF6 + vinyl-laurate+ iCALB

Γίνεται επεξεργασία της AVICEL με BMIMCl (βλέπε μεθόδους) . Χωρίς να απομακρυνθεί το ιοντικό υγρό, το τελικό τοποθετείται στους 4° C για 20 h

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

45. -0,5 ml BIMIM-PF6

46. -15 mg i CALB

47. -150 λ vinyl laurate

Θερμοκρασία αντίδρασης: 40° C

Ταχύτητα ανάδευση:1000 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 72 h

Καθαρισμός Δ2: όμοια με Δ1

Δ3. AVICEL σε BMIM-Cl και BMIM-PF6 + vinyl-laurate+ iCALB

Γίνεται επεξεργασία της AVICEL με BMIMCl (βλέπε μεθόδους) . Χωρίς να απομακρυνθεί το ιοντικό υγρό, το υλικό τοποθετείται στους 4° C για 20 h.

Σε ένα erendorff τοποθετούνται:

48. -0,1 g AVICEL σε BMIMCl

49. -0,5 ml BMIM-PF6

50. -8,5 mg i CALB

51. -150 λ vinyl laurate

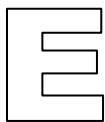
Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:1400 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 45 h

Καθαρισμός Δ2: στο erendorff με το υλικό προσθέεται 1 ml θερμού απιονισμένου νερού, και τοποθετείται για λίγα λεπτά στο thermomixer. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και ταυτόχρονες εκπλύσεις με θερμό νερό. Συλλέγεται το υλικό από το φίλτρο και το τοποθετείται για ξήρανση σε φούρνο για λίγα λεπτά. Μεταφέρεται σε erendorff ,προσθέεται 1 ml καυτό νερό και αναδεύεται για λίγα λεπτά στο vortex. Διηθείται υπό κενό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα 3 φορές.

Ακολουθούν εκπλύσεις με εξάνιο. Στο erendorff προσθέεται 1,5 ml εξάνιο και αναδεύεται στο thermomixer στους 50° C για 20 min. Διηθείται υπό κενό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές.



Αντιδράσεις με AVICEL (επεξεργασμένη σε BMIM-Cl)

Η κυτταρίνη που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την ομάδα αντιδράσεων είχε επεξεργαστεί σε ιοντικό υγρό BMIM-Cl (βλέπε μεθόδους) και στη συνέχεια καθαρίστηκε και ξηράνθηκε πριν χρησιμοποιηθεί (AVICEL*).

E1. AVICEL* + vinyl laurate + BMIMPF6 + CALB

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

52. -620 λ ιοντικού υγρού BMIM-PF6

53. -100 λ vinyl laurate

54. -8 mg AVICEL*

55. -10 mg ενζύμου CALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1400 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E1: μετά από φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Στη κάτω φάση (κυτταρίνη) προσθέτονται 500 λ απιονισμένο νερό και αναδεύεται στο vortex για λίγα λεπτά. Διηθείται υπό κενό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται ακόμα 2 φορές

E2. AVICEL* + T-boutanol + vinyl laurate + i CALB

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

56. -840 λ T-boutanol

57. -160 λ vinyl laurate

58. -8 mg AVICEL*

59. -6 mg i CALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:1400 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E2: προσθέεται στο erendorf της αντίδρασης 1 ml ethyl-acetate και αναδεύεται στο vortex για λίγα λεπτά. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία ακόμα μια φορά και ακολουθούν εκπλύσεις με 1 ml εξάνιο και 1 ml μεθανόλη. Ενδιάμεσα των καθαρισμών γίνεται διήθηση υπό κενό.

E3. AVICEL* + vinyl propionate + esterase [SOLVENT FREE αντίδραση]

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

60. -1 ml vinyl propionate

61. -8 mg AVICEL*

-13 mg εστεράση

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:1400 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E3: όμοια με E2

E4. AVICEL* + vinyl propionate + H₂O + λιπάση (από *aspegilus niger*)

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

62. -840 λ H₂O

63. -160 λ vinyl propionate

64. -8 mg AVICEL*

65. -10 mg εστεράση

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:1400 rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E4: μετά από φυγοκέντρηση αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό. Στο erendorf με την κυτταρίνη προστίθενται 500 λ αιθανόλη 96% και γίνεται ανάδευση σε vortex για λίγα λεπτά. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και επανάληψη της διαδικασίας για ακόμα 2 φορές.

E5. AVICEL* + vinyl laurate + BMIM-PF6 + iCALB

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

66. -100 λ vinyl laurate

67. -100 mg AVICEL*

68. -400 λ BMIM-PF6

69. -100 mg i CALB

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:400 rpm (thermoshaker)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E5: στο erendorf της αντίδρασης προστίθεται 1 ml θερμό νερό και γίνεται ανάδευση για λίγα λεπτά στο vortex. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και επανάληψη της διαδικασίας για άλλες 2 φορές. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με άλλους 3 καθαρισμούς, αντικαθιστώντας το θερμό νερό με εξάνιο.

E6. AVICEL* + vinyl propionate + esterase [SOLVENT FREE αντίδραση]

Σε ένα erendorf τοποθετούνται

70. -500 λ vinyl propionate

71. -13 mg esterase

72. -10 mg AVICEL*

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση:400 rpm (thermoshaker)

Διάρκεια αντίδρασης: 48 h

Καθαρισμός E6: στο erendorf της αντίδρασης προστίθεται 1 ml ethyl acetate και γίνεται ανάδευση για λίγα λεπτά στο vortex. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Ακολουθούν άλλοι 3 καθαρισμοί, αντικαθιστώντας το ethyl acetate με εξάνιο.

E7. AVICEL* + vinyl propionate + esterase [SOLVENT FREE αντίδραση]

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

73. -1 ml vinyl propionate

74. -1 mg AVICEL*

75. -1 mg esterase

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 72 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ E7: με φυγοκέντρηση διαχωρίζεται η υγρή φάση από τη στερεή. Η υγρή φάση μεταφέρεται σε ένα μικρό falcon και προστίθενται 3 ml ethyl-acetate. Δεν παρατηρείται καταβύθιση.

Στη στερεή φάση που έχει παραμείνει στο erendorf προστίθενται 1,5 ml απιονισμένο νερό και ακολουθεί ανάδευση για λίγα λεπτά στο vortex. Γίνεται διήθηση υπό κενό συμπληρώνοντας νερό για να απομακρυνθεί το ένζυμο. Συλλέγεται το υλικό και το τοποθετείται σε erendorf προσθέτοντας 1,5 ml εξάνιο με ακόλουθη ανάδευση. Γίνεται ξανά διήθηση (με καινούργιο φίλτρο) προσθέτοντας 3 ml εξάνιο. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται με εξάνιο αρχικά και στη συνέχεια με μεθανόλη.

* Το διήθημα συλλέγεται και τοποθετείται για εξάτμιση υπό κενό. Αυτό γίνεται γιατί σε περίπτωση που έχει σχηματιστεί προϊόν μπορεί να έχει διαλυθεί στο εξάνιο.

E8. AVICEL* + vinyl laurate + esterase [SOLVENT FREE]

Σε ένα erendorf τοποθετούνται:

76. -500 λ vinyl laurate

77. -10 mg AVICEL

78. -13 mg esterase

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 72 h

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ E8: όμοια με E7

E9. AVICEL + vinyl laurate + iCALB [SOLVENT FREE αντίδραση]

Σε erendorf τοποθετούνται:

79. -500 λ vinyl laurate

80. -13 mg iCALB

81. -10 mg AVICEL

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 96 h

Καθαρισμός E9: όμοια με E7

E10. AVICEL* + vinyl laurate + coutinase [SOLVENT FREE αντίδραση]

Σε erendorf προσθέτουμε

82. -500 λ vinyl laurate

83. -13 mg coutinase

84. -10 mg AVICEL*

Θερμοκρασία αντίδρασης: 50° C

Ταχύτητα ανάδευση: 1000rpm (thermomixer)

Διάρκεια αντίδρασης: 96 h

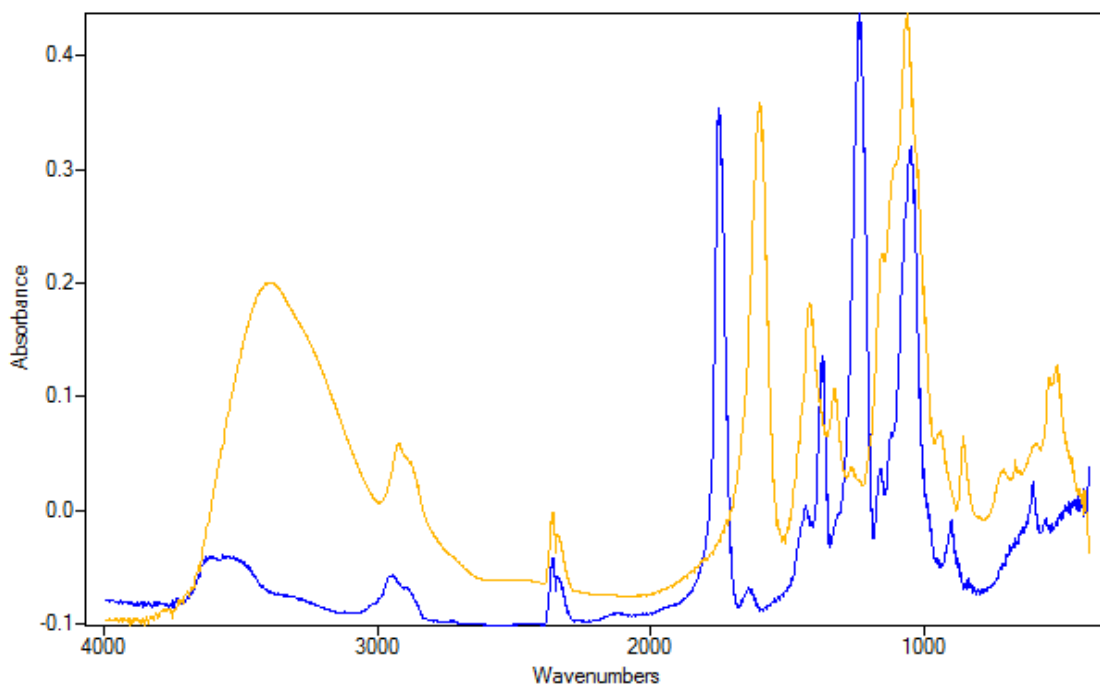
Καθαρισμός E10: όμοια με E7

2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- Τα ποσοστά εστεροποίησης πιστοποιήθηκαν με FTIR και χημική υδρόλυση (βλέπε μεθόδους)
- Τα προϊόντα πιστοποιήθηκαν με FTIR και στη συνέχεια με NMR
- Ως ποσοστό εστεροποίησης ορίζεται ως το ποσοστό των ελεύθερων υδροξυλομάδων της κυτταρίνης που εστεροποιήθηκε.



Αντίδραση A1



Φάσμα 1: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

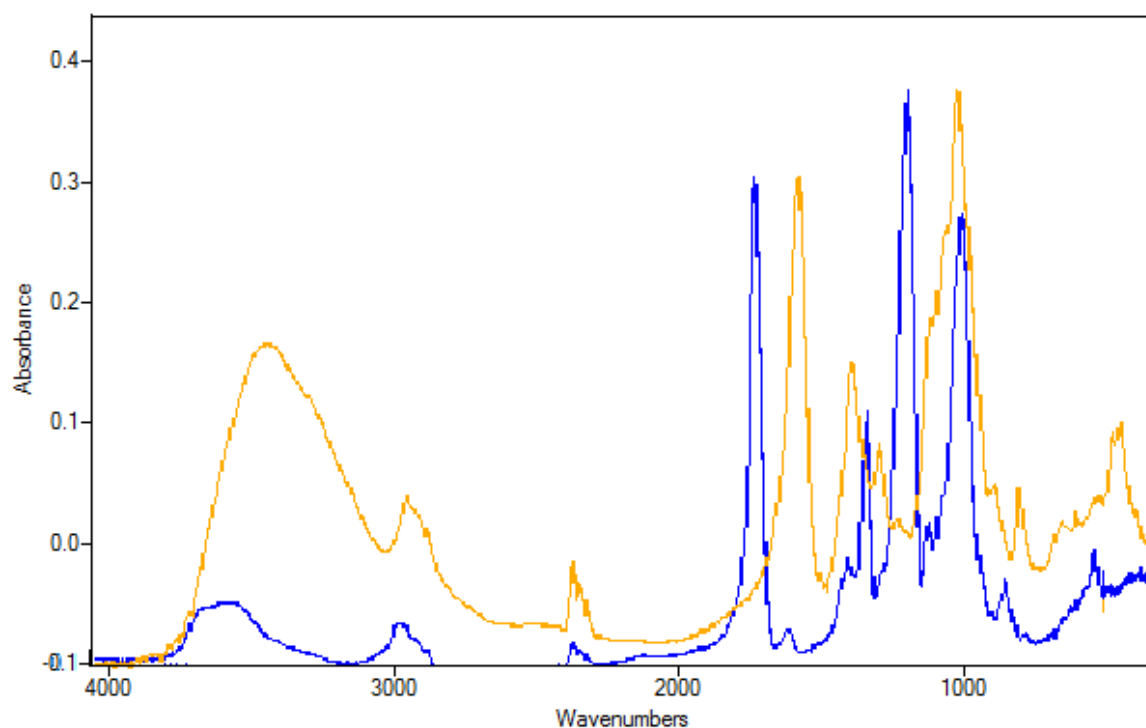
Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
-----------	--------	--------------------------	--

A1	Εξανοϊκός εστέρας κυτταρίνης	4	1754
-----------	------------------------------	---	------

Αντίδραση A2

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A2	Χ	0	Χ

Αντίδραση A3

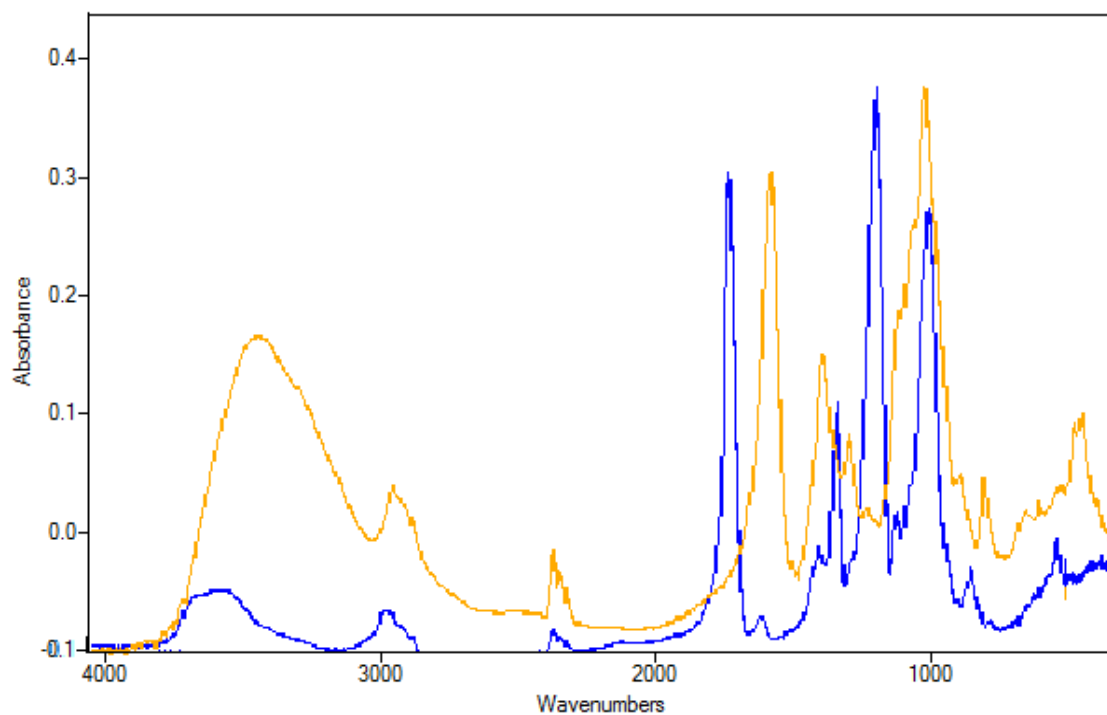


Φάσμα 2: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)

A3	Στεατικός εστέρας κυτταρίνης	1	1755
-----------	------------------------------	---	------

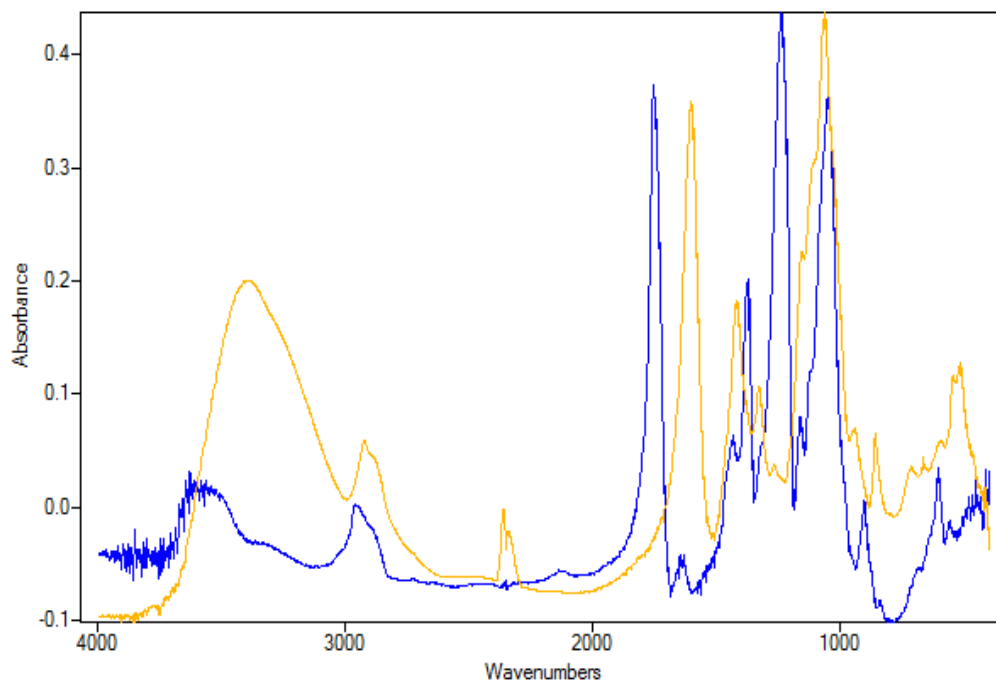
Αντίδραση A4



Φάσμα 3: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A4	Στεατικός εστέρας κυτταρίνης	1	1755

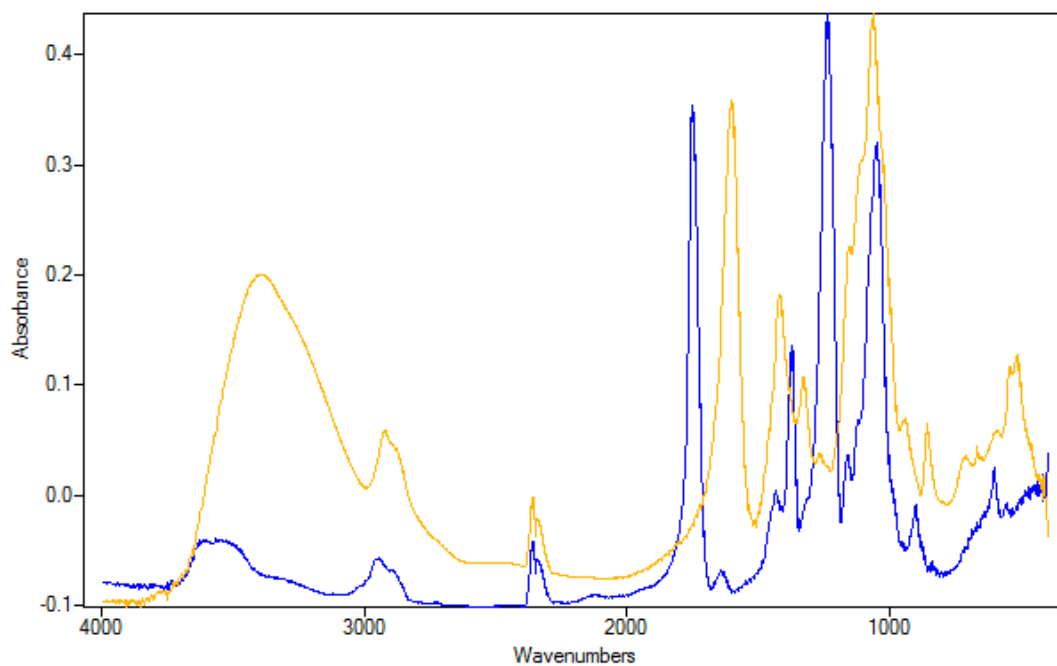
Αντίδραση A5



Φάσμα 4: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A5	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	1	1757

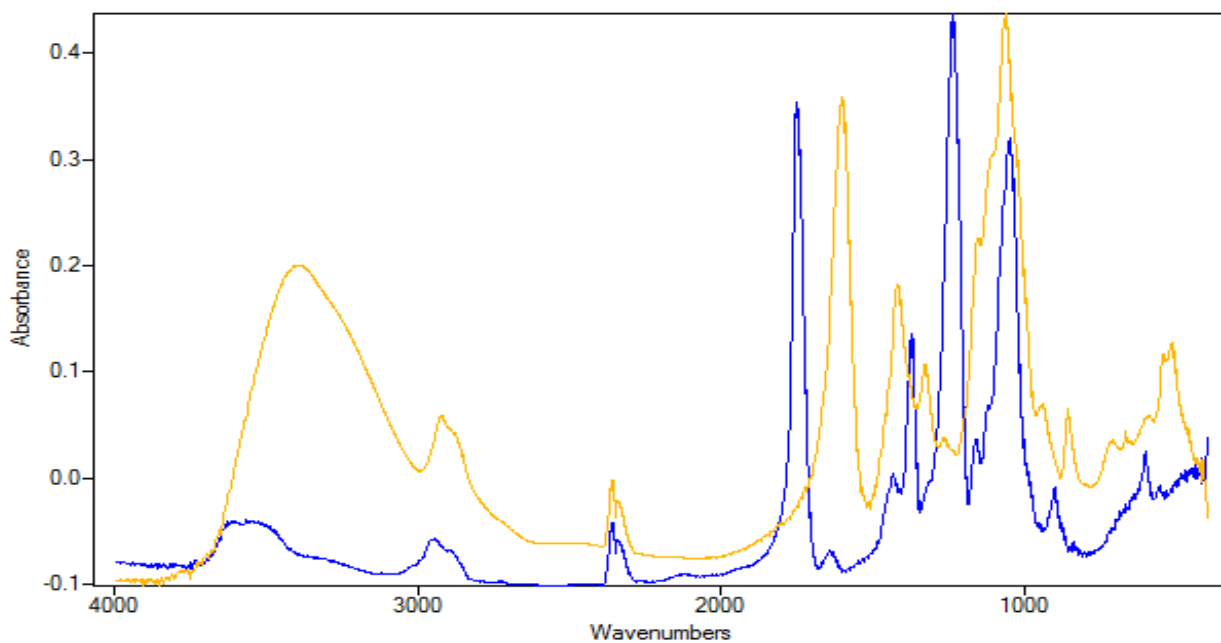
Αντίδραση A6



Φάσμα 5: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A6	Εξανοϊκός εστέρας κυτταρίνης	4	1754

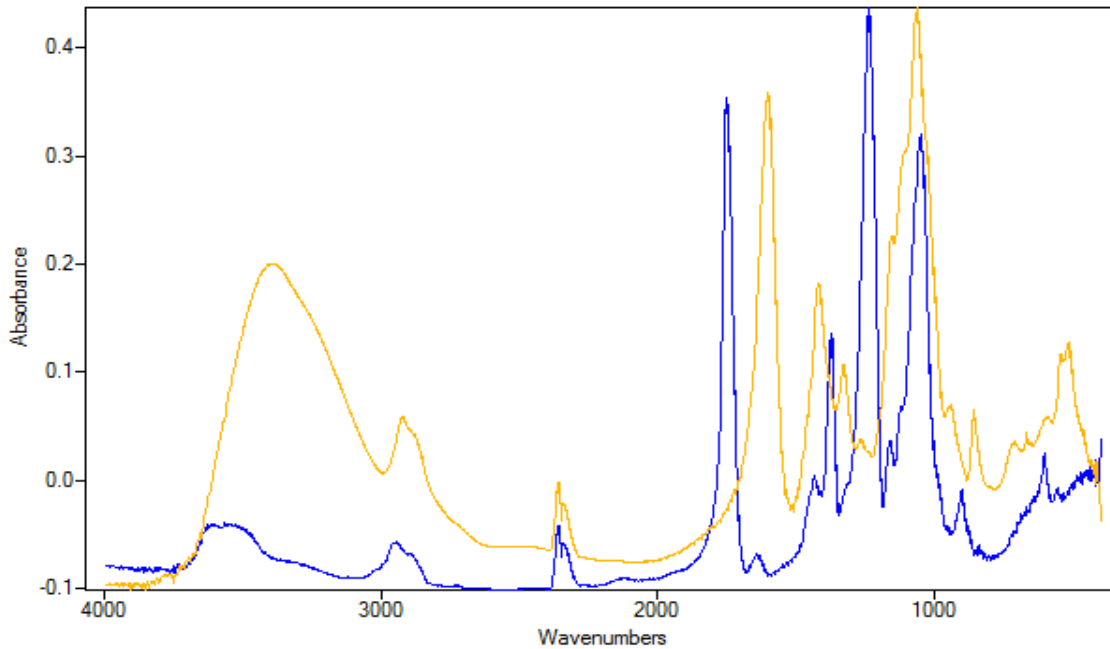
Αντίδραση A7



Φάσμα 6: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A7	Εξανοϊκός εστέρας κυτταρίνης	4	1754

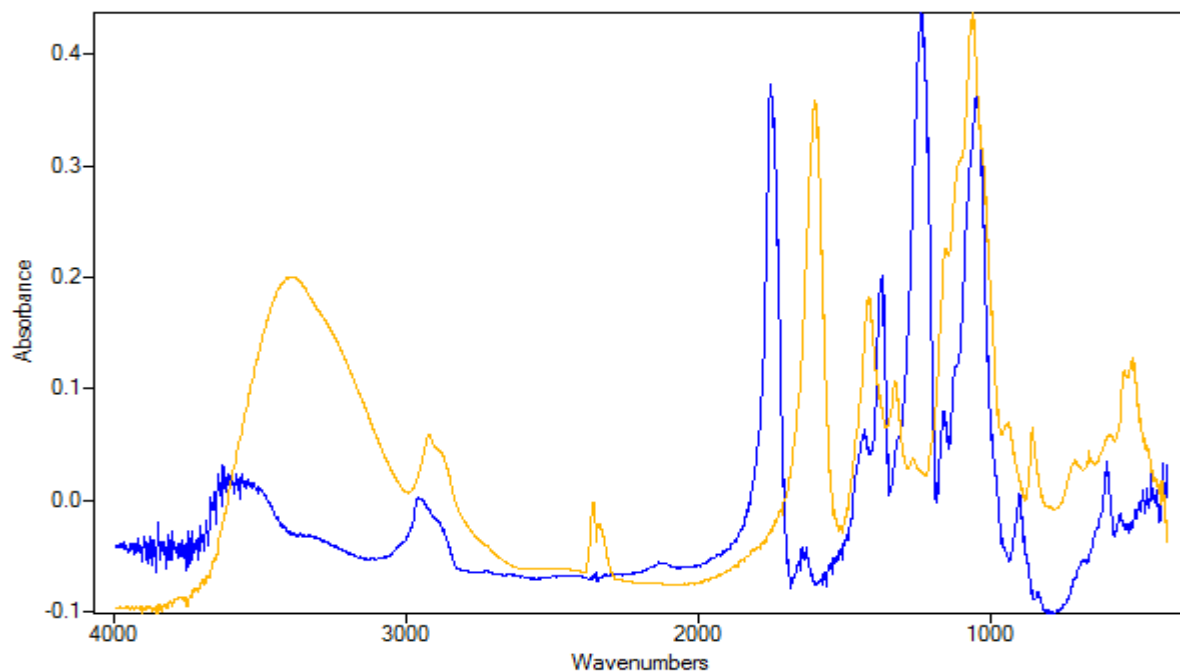
Αντίδραση A8



Φάσμα 7: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A8	Εξανοϊκός εστέρας κυτταρίνης	4	1754

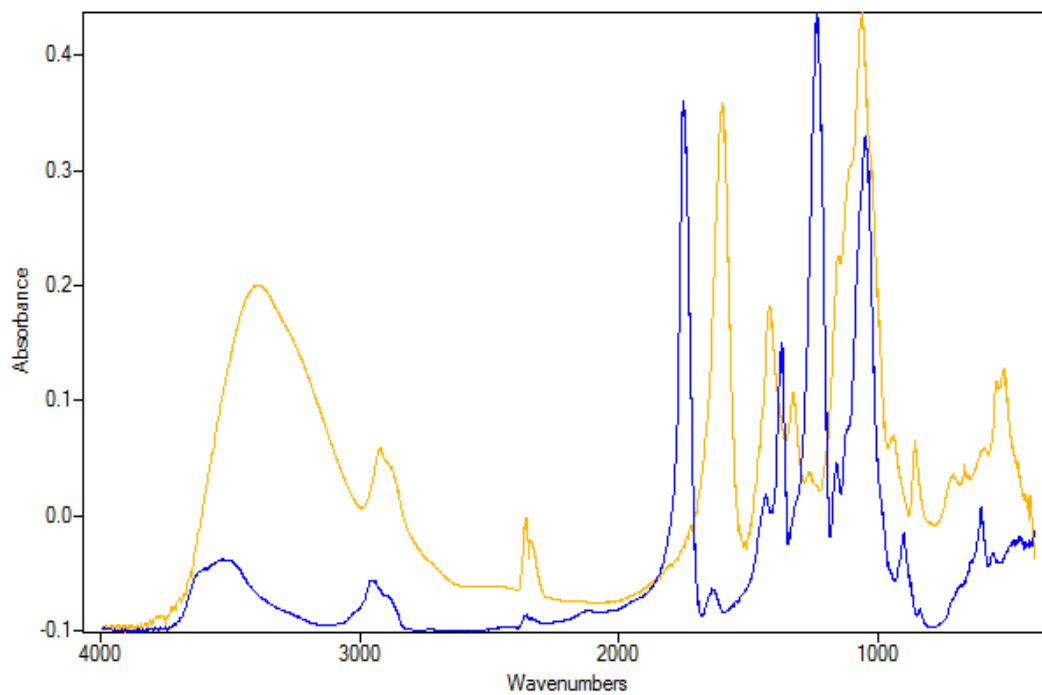
Αντίδραση A9



Φάσμα 8: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A9	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	1	1757

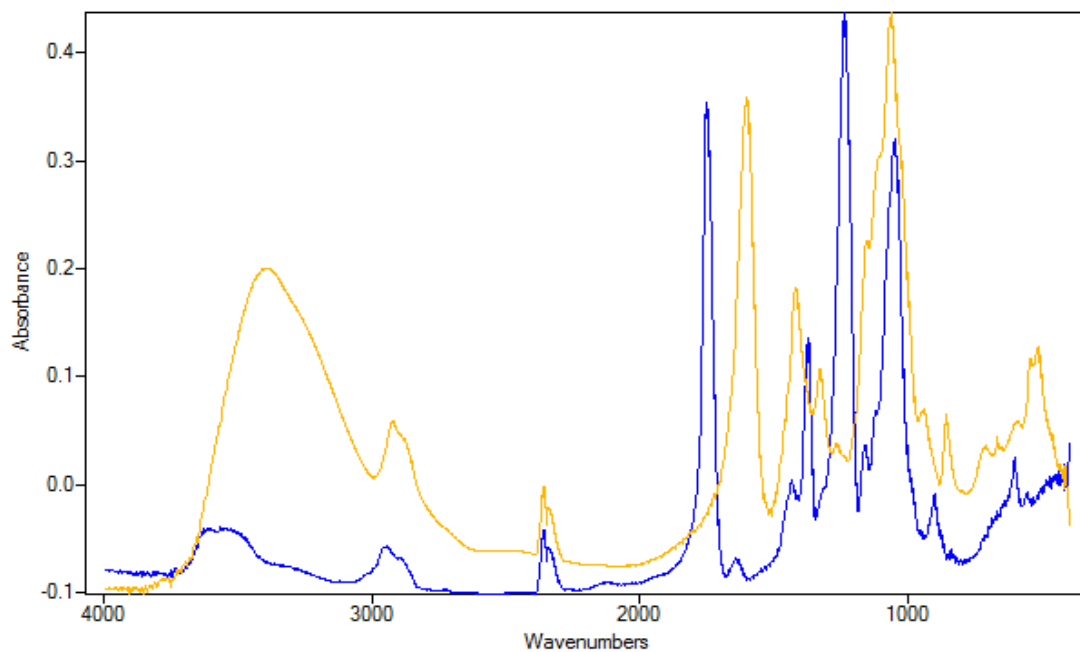
Αντίδραση A10



Φάσμα 9: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A10	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	2	1753

Αντίδραση A11

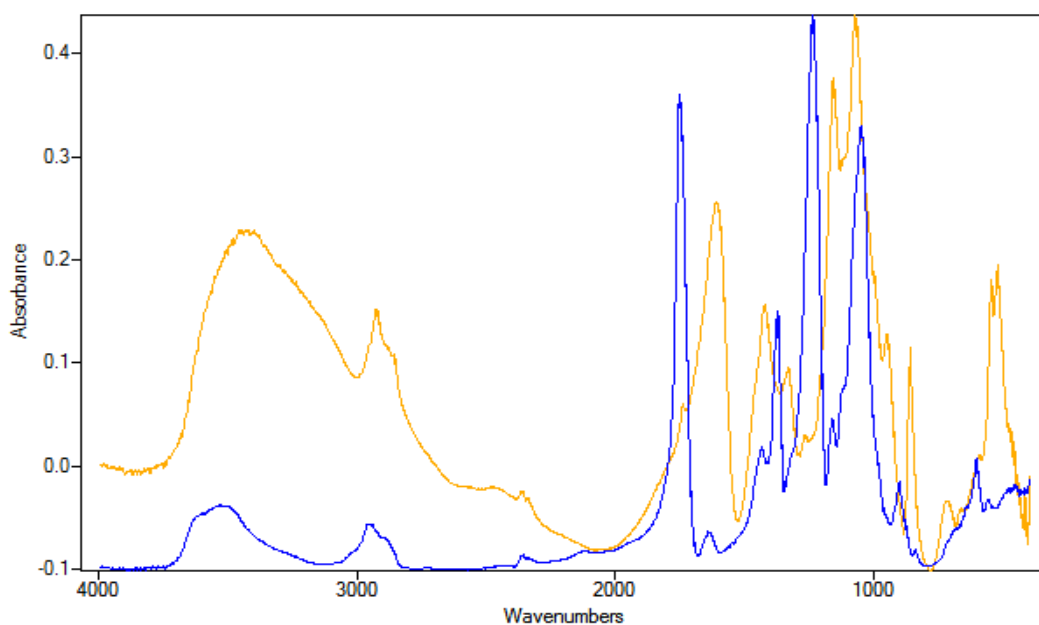


Φάσμα 10: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ CMC (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
A11	Εξανοϊκός εστέρας κυτταρίνης	4	1754

B

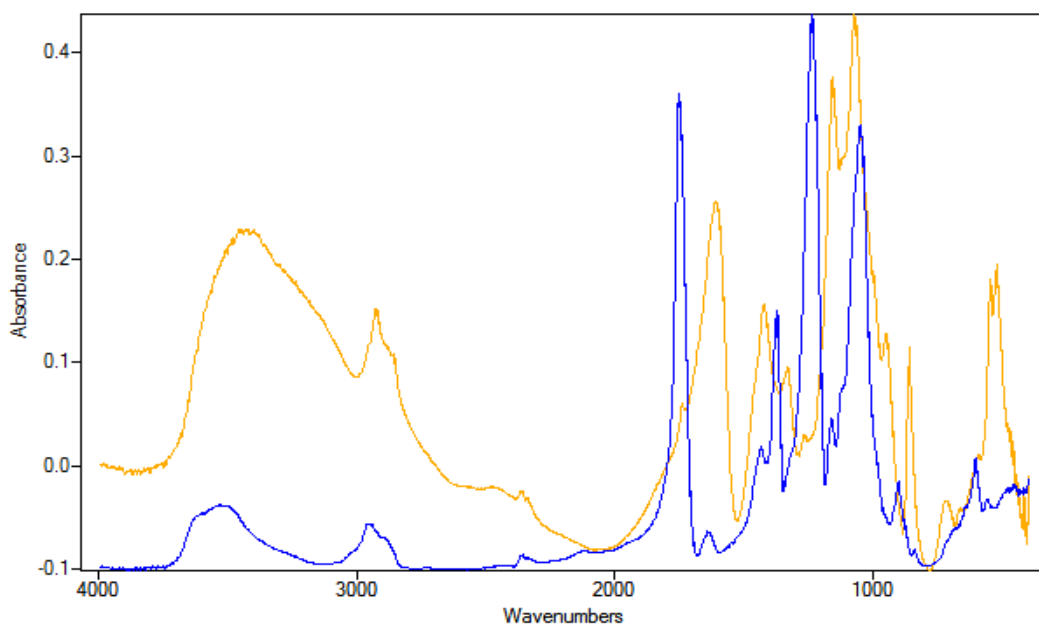
Αντίδραση B1



Φάσμα 11: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ αίθυλοκυτταρίνη (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

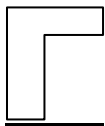
Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
B1	Λαυρικός εστέρας κυτταρίνης	3	1753

Αντίδραση B2



Φάσμα 12: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ αίθυλοκυτταρίνη (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
B2	Λαυρικός εστέρας κυτταρίνης	3	1753



Αντίδραση Γ1

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Γ1	X	0	X



Αντίδραση Δ1

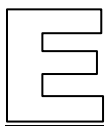
Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Δ1	X	0	X

Αντίδραση Δ2

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Δ2	X	0	X

Αντίδραση Δ3

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Δ3	X	0	X



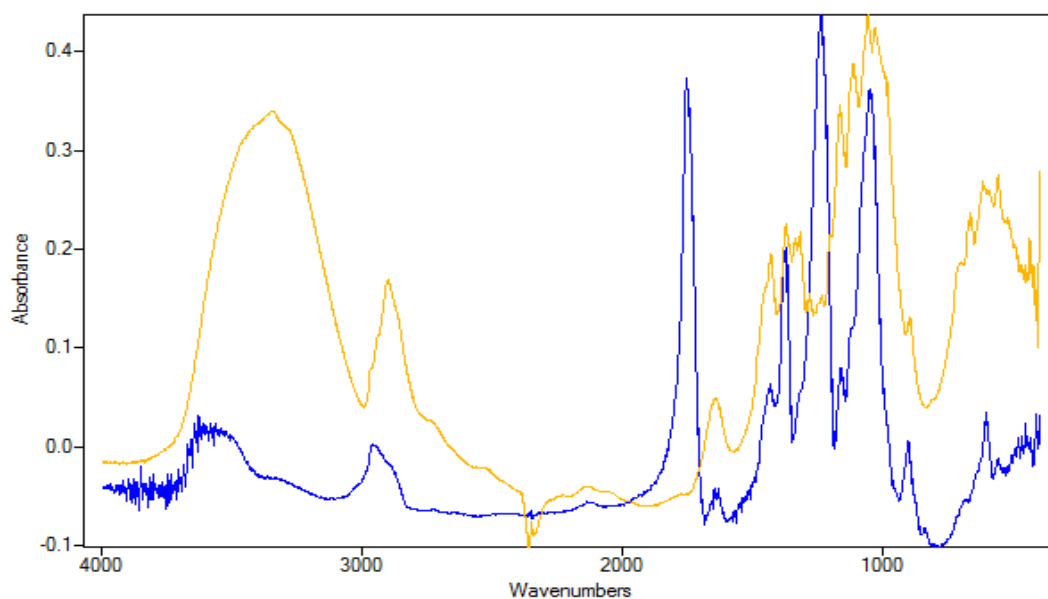
Αντίδραση Ε1

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Ε1	X	0	X

Αντίδραση Ε2

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Ε2	X	0	X

Αντίδραση Ε3



Φάσμα 13: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ AVICEL (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
Ε3	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	8	1757

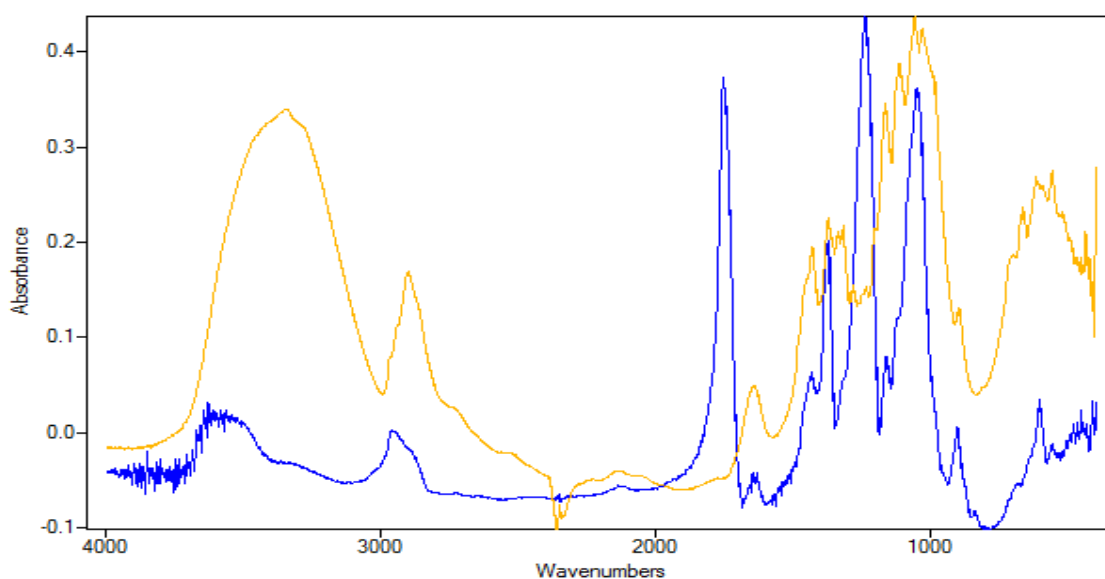
Αντίδραση E4

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E4	X	0	X

Αντίδραση E5

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E5	X	0	X

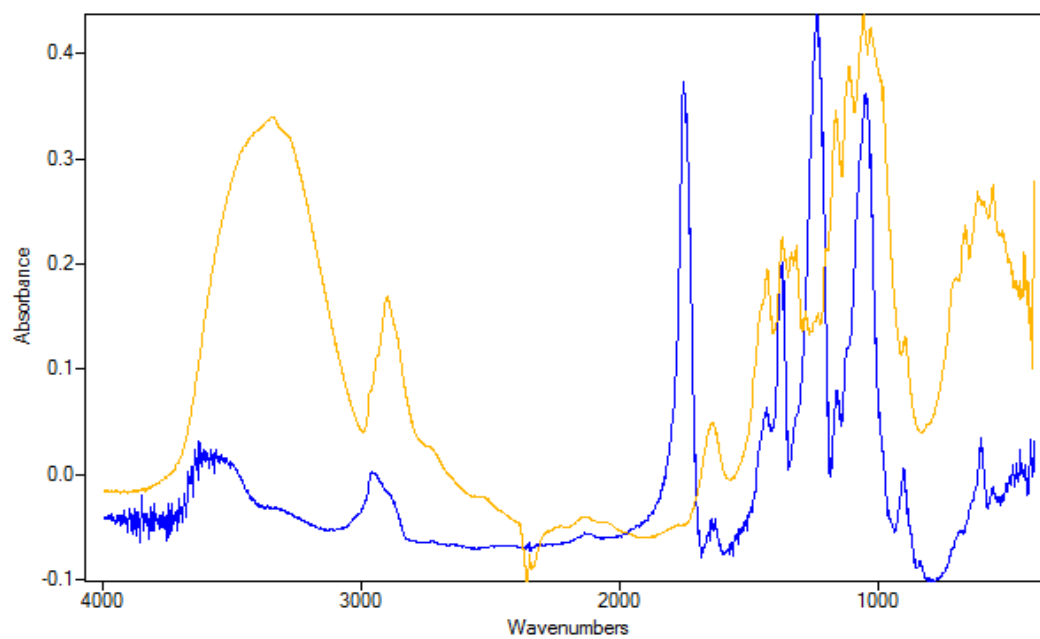
Αντίδραση E6



Φάσμα 14: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ AVICEL (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E6	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	8	1757

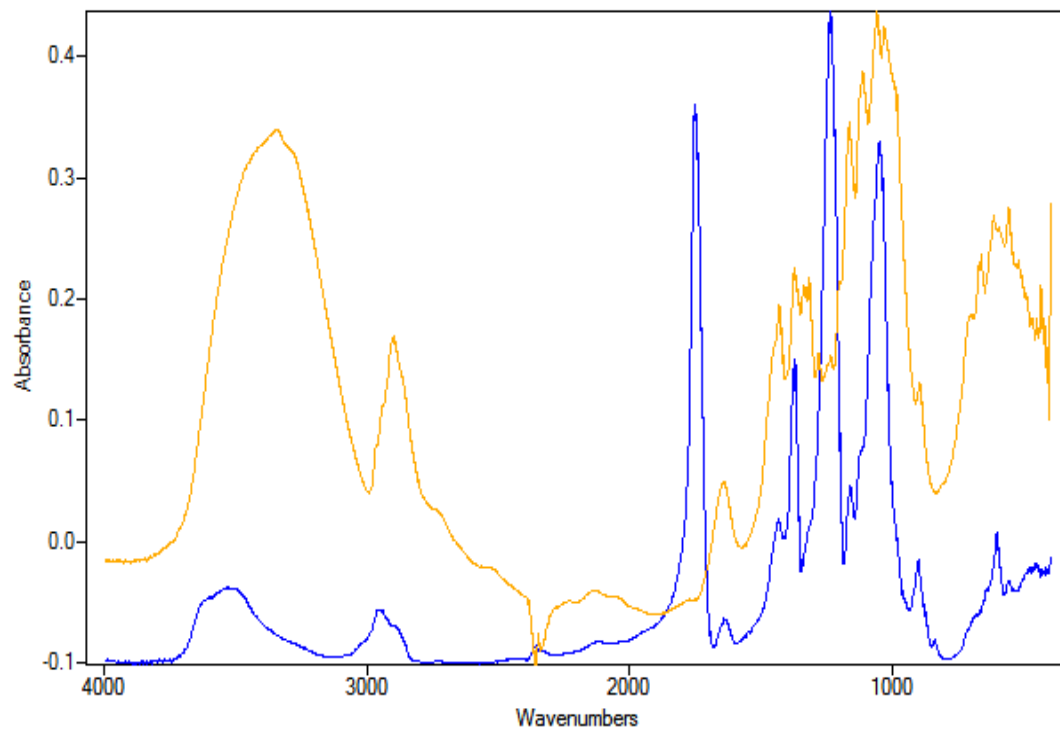
Αντίδραση E7



Φάσμα 15: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ AVICEL (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E7	Προπιονικός εστέρας κυτταρίνης	3	1757

Αντίδραση Ε8



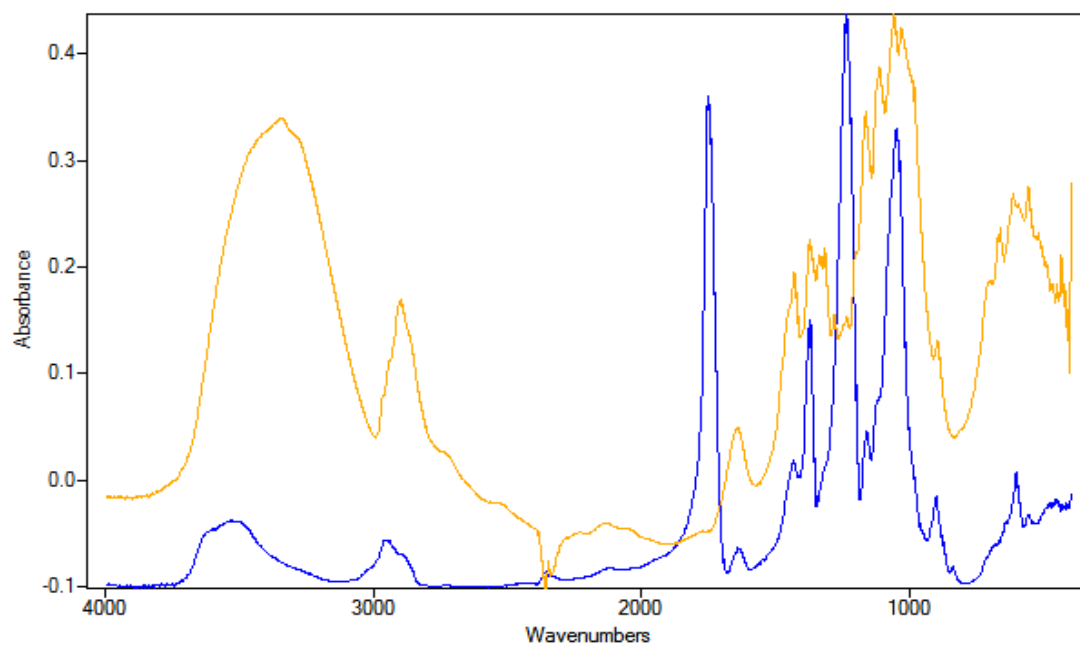
Φάσμα 16: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ AVICEL (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E8	Λαυρικός εστέρας κυτταρίνης	5	1753

Αντίδραση Ε9

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E9	X	0	X

Αντίδραση E10



Φάσμα 17: ■ εστέρας κυτταρίνης (προϊόν), ■ AVICEL (κυτταρινούχο υπόστρωμα)

Αντίδραση	Προϊόν	Ποσοστό Εστεροποίησης(%)	Κυμματαριθμός Κορυφής Εστέρα (cm ⁻¹)
E10	Λαυρικός εστέρας κυτταρίνης	7	1753

2.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

❖ Από τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν , επιτεύχθηκε η παραγωγή εστέρων κυτταρίνης , και πιο συγκεκριμένα η παραγωγή:

1. Οξικού εστέρα κυτταρίνης (cellulose acetate) με ποσοστό εστεροποίησης 9%
2. Προπιονικού εστέρα κυτταρίνης (cellulose propionate) με ποσοστό εστεροποίησης 2% έως 8%
3. Εξανοϊκού εστέρα κυτταρίνης (hexanoate cellulose) με ποσοστό εστεροποίησης 4%
4. Λαυρικού εστέρας κυτταρίνης (cellulose laurate) με ποσοστό εστεροποίησης 3% έως 7%
5. Στεατικού εστέρας κυτταρίνης (cellulose stearate) με ποσοστό εστεροποίησης 1%

❖ Οι αντιδράσεις που έγιναν, χρησιμοποιώντας ως κυτταρινούχο υπόστρωμα την καρβόξυ-μέθυλ-κυτταρίνη (CMC) , βασίστηκαν τόσο στον καρβοξυλικό όσο και στον αλκοολικό της χαρακτήρα .

Έτσι, στις αντιδράσεις οι οποίες βασίστηκαν στον καρβοξυλικό χαρακτήρα της CMC, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε αλκοόλη (εξανόλη) , ενώ στις αντιδράσεις που βασίστηκαν στον αλκοολικό χαρακτήρα της CMC, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε βίνυλ-εστέρας ώστε να επιτευχθεί εστεροποίηση.

❖ Στις αντιδράσεις όπου υπήρχε νερό, χρησιμοποιήθηκε ως ένζυμο λιπάση από *aspergillus niger*, η οποία σε αντίθεση με τα υπόλοιπα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία, σε υδατικό περιβάλλον συνθέτει εστερικούς δεσμούς αντί αν τους υδρολύει[51].

❖ Οι σχετικά χαμηλές αποδόσεις στις αντιδράσεις με CMC και ethyl cellulose , οφείλονται στις στερεοχημικές παρεμποδίσεις, που δημιουργούν οι ομάδες-υποκαταστάτες (καρβόξυμέθυλ ομάδα και αιθυλαιθέρας)

❖ Σημαντικό είναι το γεγονός ότι επιτεύχθηκε η διάλυση καθαρής κυτταρίνης (AVICEL) σε ιοντικό υγρό (BMIMCl) σε σχετικά ήπια θερμοκρασία σε

αντίθεση με τις κλασσικές χημικές μεθόδους. Παράλληλα , η κατεργασία αυτή αποτελεί μια «πράσινη» διεργασία, αφού το ιοντικό υγρό μπορεί εύκολα να αναγεννηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί, καθώς επίσης έχει και μηδαμινή πτητικότητα.

❖ Στις αντιδράσεις όπου η κυτταρίνη (AVICEL) χρησιμοποιήθηκε χωρίς να απομακρυνθεί το ιοντικό υγρό (BMIMCl) δεν είχαμε παραγωγή προϊόντος. Αυτό είναι αποτέλεσμα της μετουσίωσης του ενζύμου όταν αυτό έρχεται σε επαφή με το ιόν χλωρίου του ιοντικού υγρού. Απόδειξη αυτού του συμπεράσματος είναι το ότι όταν η κυτταρίνη επεξεργάστηκε με το ίδιο ιοντικό υγρό, άλλα στη συνέχεια αυτό απομακρύνθηκε, οι αντιδράσεις ήταν επιτυχείς.

❖ Η εστεροποίηση της καθαρής κυτταρίνης επιτεύχθηκε μόνο στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα κουτινάση και εστεράση και όχι λιπάση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα δύο πρώτα ένζυμα δε διαθέτουν πεπτιδικό κάλυμμα (lid) ενώ η λιπάση έχει. Η ύπαρξη του πεπτιδικού καλύμματος προσδίδει στο ένζυμο έναν υδρόφοβο χαρακτήρα.

❖ Τα χαμηλά ποσοστά εστεροποίησης στις αντιδράσεις όπου χρησιμοποιήθηκε κυτταρίνη που επεξεργάστηκε σε ιοντικό υγρό, πιθανότητα οφείλονται στο ότι δε διαλυόταν η συνολική μάζα της κυτταρίνης στον εκάστοτε βινυλεστέρα λιπαρού οξέος, και έτσι η εστεροποίηση γινόταν επιφανειακά.

2.7 ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η ενζυμική παραγωγή εστέρων κυτταρίνης σε μη συμβατικά συστήματα. Στόχος ήταν η επίτευξη της αντίδρασης εστεροποίησης της κυτταρίνης μέσω δοκιμών σε διαφορετικά αντιδρώντα συστήματα.

Το επόμενο βήμα είναι η βελτιστοποίηση των αντιδράσεων που έδωσαν προϊόν ως προς τις βασικές παραμέτρους τους που επηρεάζουν την κινητική και την απόδοση τους (συγκέντρωση αντιδρώντων, θερμοκρασία, χρόνος αντίδρασης κλπ) .

Παράλληλα σκόπιμη είναι η περαιτέρω μελέτη όσον αφορά τη χρήση των ιοντικών υγρών, τόσο σαν μέσο επεξεργασίας της κυτταρίνης, όσο και ως μέσο αντίδρασης . Τα ιοντικά υγρά αποτελούν μια νέα τεχνολογία που χρησιμοποιείται στη μη συμβατική βιοκατάλυση ως «πράσινοι διαλύτες» λόγω της μηδαμινής τους πτητικότητας και της ικανότητας τους να αναγεννώνται και να επαναχρησιμοποιούνται. Μέσω της ικανότητας επιλογής του ανιόντος και του κατιόντος που αποτελούν το ιοντικό υγρό , μπορούν να προσδοθούν σε αυτό οι επιθυμητές ιδιότητες για κάθε είδος αντίδρασης. Αυτή η νέα τεχνολογία προσφέρει νέο έδαφος για περαιτέρω μελέτη και έρευνα.

Παράλληλα η μελέτη των θερμομηχανικών ιδιοτήτων των εστέρων κυτταρίνης βρίσκεται σε εξέλιξη, ώστε να αποσαφηνιστούν οι δυνατότητες τους και οι πιθανές εφαρμογές τους .

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Y. Nishiyama, P. Langan, H. Chanzy (2002). "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction". *J. Am. Chem. Soc* **124** (31): 9074–9082. doi:[10.1021/ja0257319](https://doi.org/10.1021/ja0257319).
- [2] Crawford, R. L. (1981). *Lignin biodegradation and transformation*. New York: John Wiley and Sons. ISBN [0-471-05743-6](https://www.isbn-international.org/product/0-471-05743-6).
- [3] Updegraff DM (1969). "Semimicro determination of cellulose in biological materials". *Analytical Biochemistry* **32**: 420–424. doi:[10.1016/S0003-2697\(69\)80009-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(69)80009-6).
- [4] Cellulose. (2008). In [Encyclopædia Britannica](https://www.britannica.com/). Retrieved January 11, 2008, from Encyclopædia Britannica Online.
- [5] Young, Raymond (1986). *Cellulose structure modification and hydrolysis*. New York: Wiley. ISBN [0471827614](https://www.isbn-international.org/product/0-471-82761-4).
- [6] Klemm, Dieter; Brigitte Heublein, Hans-Peter Fink, Andreas Bohn (2005). "Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material". *ChemInform* **36** (36). doi:[10.1002/chin.200536238](https://doi.org/10.1002/chin.200536238).
- [7] Weiner, Myra L.; Lois A. Kotkoskie (1999). *Excipient Toxicity and Safety*. pp. 210. ISBN [0824782100](https://www.isbn-international.org/product/0-8247-8210-0), 9780824782108.
- [8] Holt-Gimenez, Eric 2007. Biofuels: Myths of the Agrofuels Transition. *Backgrounder*. Institute for Food and Development Policy, Oakland, CA. 13:2
- [9] Shigeru Deguchi, Kaoru Tsujii and Koki Horikoshi, *Cooking cellulose in hot and compressed water* Chem. Commun., 2006, 3293 - 3295, doi:10.1039/b605812d
- [10] Serge Pérez and William Mackie, Structure and morphology of cellulose by, CERMAV-CNRS, 2001. Chapter IV.
- [11] Stenius, Per (2000) "1" *Forest Products Chemistry* Papermaking Science and Technology **3** Finland: Fapet OYp. 35 ISBN 952-5216-03-9
- [12] Kimura, Laosinchai, Itoh, Cui, Linder, Brown, *Plant Cell*, 1999, 11, **2075-2085**
- [13] Taylor, Howells, Huttly, Vickers, Turner, *PNAS*, 2003, 100, 1450-1455

- [14] Peng, Kawagoe, Hogan, Delmer, "Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants", *Science*, 2002, 295, 147-150. PMID 11778054
- [15] David G. Barkalow, Roy L. Whistler, "Cellulose", in AccessScience@McGraw-Hill, DOI 10.1036/1097-8542.118200. Retrieved 11 January 2008.
- [16] http://www.interiordezine.com/index.cfm/Interior_Design_Finishes/Fibres_artificial
- [17] Peter John Turnbull Morris, "The American Synthetic Rubber Research Program", Pennsylvania Press, ISBN 0-8122-8207-8, Full Text Online, page 258
- [18] Kroschwitz J. I. 1990. Encyl. Polym. Sci. & Eng. John Wiley, New York.
- [19] Bandrup J., Immergut E.H. 1989. Polymer handbook, John Wiley, New York.
- [20] Kevin J. Edgar, Charles M. Buchanan, John S. Debenham, Paul A. Rundquist, Brian D. Seiler, Michael C. Shelton, Debra Tindall, "Advances in cellulose ester performance and application", *Prog. Polym. Sci.* 26 (2001) 1605-1688
- [21] Collins T. *Science* 2001;291:48-9
- [22] Kaiser J. *Science* 2000;290:695-7
- [23] Eastman Chemical Company Publication E-146M, August 1995
- [24] Eastman Chemical Company Publication E-101F, September 1995
- [25] Όλγα Μαρκοπούλου, 'Εισαγωγή στα Βιοχημικά Συστήματα', Αθήνα, 1990
- [26] Shuler M., Kargi F., 'Μηχανική Βιοδιεργασιών-βασικές έννοιες', πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2005
- [27] Krishna S.H., 'Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media', *Biotechnol Adv.* 20.239-67,2002
- [28] Schmid R. D., Verger R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem.Int. Ed.* 37: 1608-1633
- [29] Derewenda Z. S.1994. Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.* 45: 1-52

- [30] Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G. Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Høge-Jensen B., Nørskov L., Thim L., and Menge U. 1990. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol. *Nature*. 343: 767-770.
- [31] van Tibeurgh H., Egloff M. P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C. 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 362: 814-820
- [32] Norin M. Haeffner F., Achour A. Norin T., Hult K. 1994. Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehi*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*. *Protein Sci.* 3: 1493-1503
- [33] Grochulski P., Li Y., Schrag J. D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M. 1993. Insight into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.* 268: 12843-12847
- [34] Rubin B. 1994. Grease pit chemistry exposed. A clutch of recent lipase structures lift the lid on the mechanism of interfacial activation and the determinants of lipase substrate specificity. *Nature Struct. Biol.* 1: 568-572
- [35] Kempner E. S. 1993. Movable lobes and flexible loops in proteins. Structural Lobes that control biochemical activity. *FEBS Lett.* 326:4-10.
- [36] Debeer A.M.T.H. J. 1992. Mechanism of activation of lipolytic enzymes. PhD thesis Utrecht University, The Netherlands
- [37] Ollis D. L., Chean E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5:197-211
- [38] Kolattukudy P.E. 1984. Lipases. Elsevier, Amsterdam
- [39] Martinez C., de Geus P., Lauwereys M., Matthyssens G., Cambillau C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with catalytic serine accessible to solvent. *Nature*. 356: 615-618
- [40] Prompers J. J., Groenewegen A., Schaick R. C., Pepermans H. A. M., Hilbers C.W. 1997 ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of *Fusarium solani pisi* cutinase and preliminary features of the structure in solution. *Protein. Sci.* 6, 2375-2384

- [41] Martinez C., Nicolas A., van Tilbeurgh H., Egloff M. P. Cudrey C. Verger R., Cambillau C. 1994. Cutinase, a lipolytic enzyme with a performed oxyanion hole. *Biochemistry*. 33: 83-89
- [42] Alexander M. Klibanov, 'Improving enzymes by using them in organic solvents', *Nature*, 409, 241-246, 2001
- [43] Tsitsimpikou C., Stamatis H., Sereti V., Daflos H. & Kolisis F.N., 'Acylation of Glucose Catalysed by Lipases in Supercritical Carbom Dioxide', *J.Chem.Technol.Biotechnol*, 1998, 71, 309-314
- [44] Straathof A., Adlercreutz P., 'Applied Biocatalysis', second edition, harwood academic publishers, 2000
- [45] Jakubowski D., 'Enzyme catalysis in organic solvents',
- [46] Carrea G., Riva S., 'Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents', *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, 39, 2226-2254
- [47] Dimitrios Tassios, 'Εφαρμοσμένη θερμοδυναμική Χημικής Μηχανικής', Πανεπιστημιακές εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 2001
- [48] Φανή Ρουμπάνη-Καλατζοπούλου, 'Χημική Κινητική και Κατάλυση', εκδόσεις Ε.Μ.Π., Αθήνα, 1998
- [49] De Zoete M. C., van Rantwijk F., Sheldon R. A. 1994. Lipase-catalysed transformations with unnatural acyl acceptors. *Cat. Today* 22: 563-590
- [50] Zhen Yang, Wubin Pan, Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis, *Enzyme and microbial technology* 37 (2005) 19-28
- [51] Kuin Yang, Ya-Jane Wang, lipase-catalyzed transesterification in aqueous medium under thermodynamic and kinetic control using carboxymethyl cellulose acetylation as the model reaction, *Enzyme and microbial technology*, 35 (2004) 223-231