



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΙV  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΜΕΤΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΙΚΗΣ  
ΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΤΗΣ  
ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ  
ΜΑΚΡΥΔΑΚΗ ΕΛΛΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2010**



## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Θεωρητικό μέρος.....	6
1.Κυτταρίνη.....	7
1.1.Ιστορία.....	7
1.2 πηγές.....	7
1.3 Προϊόντα και χρήσεις.....	9
1.4 Μοριακή δομή .....	10
1.6 Αποικοδόμηση κυτταρίνης.....	11
1.7 Παράγωγα κυτταρίνης .....	12
2. Εστέρες κυτταρίνης.....	13
2.1 Χρήσεις εστέρων κυτταρίνης.....	15
3 Οξική Κυτταρίνη.....	16
3.1 Οξική ίνα.....	18
3.2Παραγωγή Οξικής Κυτταρίνης.....	19
3.3 Ιδιότητες και χρήσεις .....	21
3.4. Αποικοδόμηση Οξικής κυτταρίνης.....	22
4. Ένζυμα και μη συμβατική Βιοκατάλυση.....	23
4.1 Βασικές αρχές ενζυμολογίας.....	23
4.2Κατηγορίες ενζύμων.....	26

4.3 Λιπάση.....	27
4.3.1 Δομή Λιπάσης.....	28
4.3.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπάσης.....	32
4.4 Κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα.....	33
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
1.Υλικά.....	39
2.Όργανα.....	40
3.Μέθοδοι.....	40
4.Καθαρισμός και απομόνωση του προϊόντος των αντιδράσεων.....	49
5.Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με FT-IR.....	49
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	50
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ.....	64
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

## Περίληψη

Η καθαρή κυτταρίνη είναι ένα οργανικό πολυμερές της γλυκόζης, σε μεγάλη αφθονία στη φύση και χαμηλό κόστος. Το μεγάλο μείονεκτημά της είναι ότι λόγω της στερεοχημικής της δομής είναι δύσκολο να επεξεργαστεί ενζυμικά. Για το λόγο αυτό για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε παράγωγο κυτταρίνης και συγκεκριμένα η οξική κυτταρίνη (cellulose acetate).

Στόχος είναι η πραγματοποίηση πειραμάτων για την εύρεση των βέλτιστων (optimum) συνθηκών στις οποίες επιτυγχάνεται μετεστεροποίηση της οξικής κυτταρίνης.

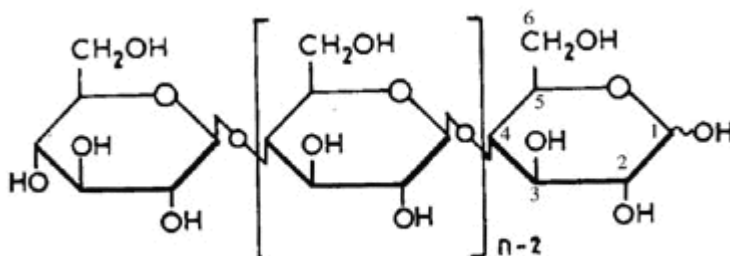
Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν (λιπάσες) σε υδατικό περιβάλλον (στο φυσικό τους δηλαδή περιβάλλον) καταλύουν την αντίδραση της υδρόλυσης των εστερικών δεσμών. Έτσι, για να επιτύχουμε την εστεροποίηση των κυτταρινούχων υποστρωμάτων, (την αντίστροφη δηλαδή διαδικασία της υδρόλυσης τους) χρησιμοποιήσαμε ως μέσο βιοκατάλυσης

συστήματα από τα οποία απουσίαζε το νερό. Με τον τρόπο αυτό μετατοπίσαμε θερμοδυναμικά τη θέση της χημικής ισορροπίας περνώντας από την υδρόλυση στη σύνθεση.

## **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.Κυτταρίνη

Η κυτταρίνη είναι ένα οργανικό πολυμερές της D- γλυκόζης με χημικό τύπο  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Είναι γραμμικό μόριο με τις δομικές μονάδες να συνδέονται μεταξύ τους με  $\beta(1\rightarrow4)$ γλυκοζιτικούς δεσμούς. Ο μέσος βαθμός πολυμερισμού των μορίων της κυτταρίνης ποικίλει από μερικές εκατοντάδες έως και κάποιες χιλιάδες.



Σχήμα 1. Η δομή της κυτταρίνης

### 1.1.Ιστορία

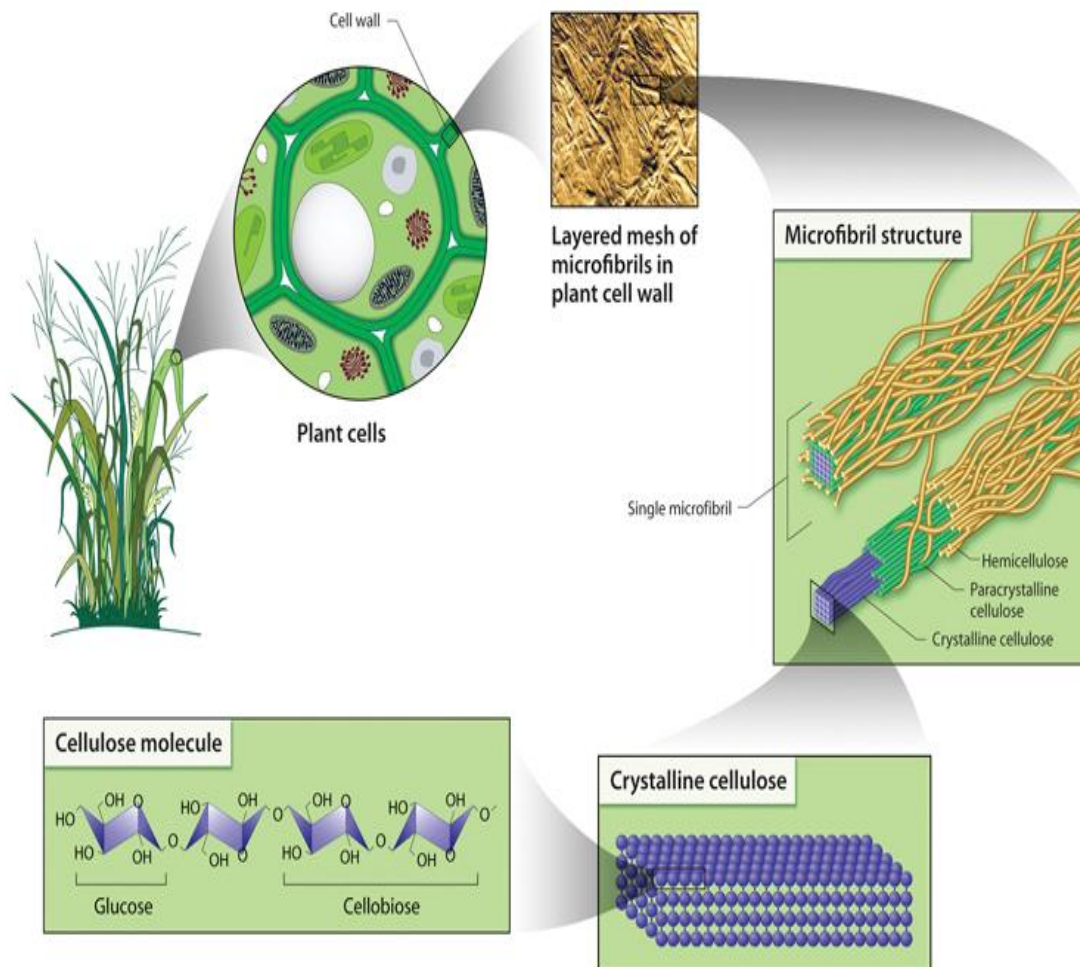
Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος ανακαλύφθηκε το 1838 από τον Anselme Payen Γάλλο χημικό.[2][5].Ασχολούμενος με ξύλο ανακάλυψε μια ουσία που θύμιζε άμυλο.Καθώς την βρήκε στα κυτταρικά τοιχώματα-cell walls- την ονόμασε κυτταρίνη-cellulose. Χρησιμοποιήθηκε για να παραγάγει το πρώτο επιτυχημένο 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.

### 1.2 πηγές

Η κυτταρίνη είναι η πιο κοινή οργανική ένωση στη γη.Βρίσκεται σε αφθονία στη φύση αφού αποτελεί συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών.Επιπλέον υπάρχει στο ξύλο(σε ποσοστό 50%),στο βαμβάκι



(90%) και παράγεται και από αρκετά βακτήρια για να σχηματίσουν βιοφίλμ(33%.Τέλος την παράγουν και πολλά είδη αλγών.[4]



Σχήμα 2. Ο ρόλος της κυτταρίνης στη φύση

Με βάση την προέλευση και τη δομή της χωρίζεται στις εξής κατηγορίες: Η φυσική κυτταρίνη είναι η κυτταρίνη I, με δομές τις  $I_{\alpha}$  και  $I_{\beta}$ . Η κυτταρίνη που παράγεται από βακτήρια και άλγη περιέχει κυρίως τον τύπο  $I_{\alpha}$  ενώ η κυτταρίνη των ανώτερων φυτών αποτελείται κυρίως από  $I_{\beta}$ . Η κυτταρίνη

στις αναγεννημένες ίνες κυτταρίνης, είδος το οποίο αναλύεται στη συνέχεια, είναι η κυτταρίνη II. Η μετατροπή της κυτταρίνης I στην κυτταρίνη II δεν είναι αντιστρεπτή, υποστηρίζοντας ότι η κυτταρίνη I είναι μετασταθής και η κυτταρίνη II είναι σταθερή. Με τις διάφορες χημικές επεξεργασίες είναι δυνατό να παραχθούν οι δομές της κυτταρίνης III και της κυτταρίνης IV.[10]

### 1.3 Προϊόντα και χρήσεις

Τα κυριότερα προϊόντα των οποίων βασικό συστατικό είναι η κυτταρίνη είναι τα είδη γραφικής ύλης όπως χαρτί και χαρτόνι.

Μερικά ζώα, ειδικά τα μηρυκαστικά και οι τερμίτες, μπορούν να αφομοιώσουν την κυτταρίνη με τη βοήθεια των συμβιωτικών μικροοργανισμών που ζουν στα έντερά τους. Η κυτταρίνη δεν είναι εύπεπτη από τους ανθρώπους και αναφέρεται συχνά ως "διαιτητική ίνα".

Η κυτταρίνη αποτελεί το βασικό συστατικό σε πολλά υφάσματα τα οποία έχουν κατασκευαστεί από βαμβάκι. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν και τα υφάσματα που έχουν κατασκευαστεί από τεχνητό μετάξι. Το τεχνητό μετάξι αποτελεί μια σημαντική ίνα με ίδια χημική δομή με την κυτταρίνη το οποίο παράγεται χημικά από την βισκόζη, ένα ιξώδες διάλυμα της κυτταρίνης.

Όμοια με το τεχνητό μετάξι παράγεται και το σελοφάν, μια λεπτή διάφανη μεμβράνη, και ονομάζονται μαζί "αναγεννημένες ίνες κυτταρίνης" (regenerated cellulose fibers)

Η ζαχαροπλαστική είναι ένας ακόμα τομέας που χρησιμοποιείται η κυτταρίνη αφού βρίσκει εφαρμογή ως πυκνωτικό μέσο γαλακτωματοποιητής και σταθεροποιητής.

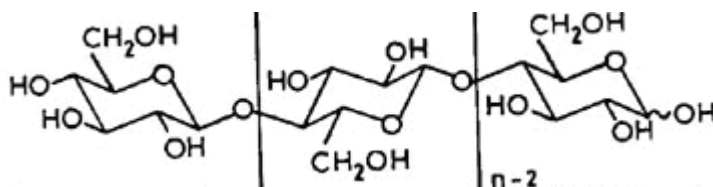
Η κυτταρίνη είναι η πρώτη ύλη για την κατασκευή της νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose), ενός νιτρικού άλατος που χρησιμοποιήθηκε ως βασικό υλικό για τον κελουλοΐτη ο οποίος με τη σειρά του χρησιμοποιήθηκε ως φωτογραφικό φιλμ και φιλμ για ταινίες μέχρι τα μέσα της δεκαετίας του '30.

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 -κλίνη από αδρανές υλικό.

Τέλος μία από τις σημαντικότερες χρήσεις της κυτταρίνης είναι η μετατροπή της σε παράγωγα όπως η κυτταρινική αιθανόλη (Cellulosic ethanol), το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο. Ωστόσο είναι σε αρχικό στάδιο αφού πρέπει να λυθούν προβλήματα όπως η μαζική παραγωγή της.

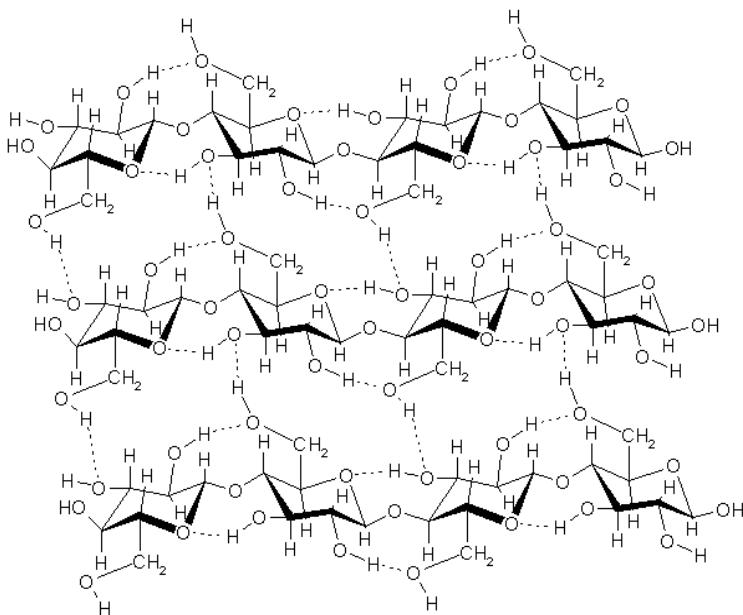
## 1.4 Μοριακή δομή

Η κυτταρίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές της D-γλυκόζης ενωμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς και συγκεκριμένα  $\beta$ -(1  $\rightarrow$ 4). Αυτός ο τύπος γλυκοζιτικού δεσμού είναι που διαφοροποιεί σε σχέση με άλλους πολυσακχαρίτες όπως το άμυλο και το γλυκογόνο που έχουν  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η  $\beta$ - γλυκοζιτικοί είναι αυτοί που σταθεροποιούν τη δομή ανάκλιντρο-ισημερινή διαμόρφωση (Σχήμα 2), ελαχιστοποιώντας έτσι την ευελιξία του μορίου.



Σχήμα 3: ισημερινή διαμόρφωση

Η κυτταρίνη αποτελείται από πολλές ευθείες αλυσίδες (σχήμα 3) ενωμένες μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Οι πολλαπλές ομάδες υδροξυλίου στα υπολείμματα γλυκόζης από μια αλυσίδα διαμορφώνουν τους δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια οξυγόνου 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 δύναμη είναι σημαντική στα κυτταρικά τοιχώματα, όπου τα μικροϊνίδια παγιδεύονται σε μια μήτρα υδατανθράκων (ημικυτταρίνη, λιγνίνη), παρέχοντας ακαμψία στα κύτταρα των φυτών.



Σχήμα 4: πλέγμα αλυσίδων κυτταρίνης, στο οποίο απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα μόρια της κυτταρίνης

Η δομή της αυτή, σε σύγκριση και με το άμυλο, της δίνει μία πολύ μεγάλη κρυσταλλικότητα, ιδιότητα που καθιστά την επεξεργασία της πολύ δύσκολη.

## 1.5 Ιδιότητες

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.

Η κυτταρίνη που προέρχεται από τα φυτά είναι συνήθως αναμεμιγμένη με ημικυτταρίνη, λιγνίνη, πηκτίνη και άλλες ουσίες, ενώ η μικροβιακή κυτταρίνη είναι αρκετά πιο καθαρή, έχει πολύ υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό και αποτελείται από μακριές αλυσίδες.

Όπως αναφέραμε, η δομή της καθιστά την επεξεργασία της πολύ δύσκολη και κατά συνέπεια είναι και αδιάλυτη στα περισσότερα μέσα. Μερικές περιπτώσεις φαίνονται παρακάτω.

Πολλές ιδιότητες της κυτταρίνης εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας της ή το βαθμό πολυμερισμού. 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.

## **1.6 Αποικοδόμηση κυτταρίνης**

Η αποικοδόμηση της κυτταρίνης στα μονομερή της, τις μονάδες γλυκόζης, ονομάζεται κυτταρινόλυση. Είναι μια διεργασία υδρόλυσης που μπορεί να έχει και σαν ενδιάμεσο προϊόν κυτταρινοδεξτρίνες.

Η σύνδεση των μορίων της κυτταρίνης μεταξύ τους είναι τόσο ισχυρή που δυσκολεύει πολύ την αποικοδόμησή της από τους οργανισμούς σε σχέση με τους άλλους πολυσακχαρίτες. Τα περισσότερα θηλαστικά δεν έχουν τη δυνατότητα να τη διασπάσουν. Εξαιρέση αποτελούν μερικά μυρικαστικά ζώα, τα οποία έχουν στο πεπτικό τους σύστημα βακτήρια που αποικοδομούν την κυτταρίνη, όπως επίσης τερμίτες και μύκητες που λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο. Τα προϊόντα αυτής της αποικοδόμησης χρησιμοποιούνται από τους ανώτερους οργανισμούς.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για να διασπάσουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς στην κυτταρίνη είναι οι γλυκοζιτικές υδρολάσες (glycoside hydrolases) συμπεριλαμβανομένων των ενδο- και εξω- 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.

## 1.7 Παράγωγα κυτταρίνης

Η δυσκολία επεξεργασίας της καθαρής κυτταρίνης μας οδηγεί στη χρήση παράγωγων κυτταρίνης.

Τα παράγωγα κυτταρίνης προκύπτουν από υποκατάσταση των ελεύθερων υδροξυλίων της καθαρής κυτταρίνης.

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. Σε γενικές γραμμές τα κυτταρινούχα πολυμερή είναι ανανεώσιμες ουσίες.

Χαρακτηριστικά παράγωγα είναι η καρβοξυμέθυλο κυτταρίνη(CMC),η οξική κυτταρίνη,η μεθυλοκυτταρίνη (Methylcellulose),η υδροξυπροπυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl cellulose)η καρβοξυμεθυλο κυτταρίνη (Carboxymethyl cellulose),η υδροξυπροπυλο μεθυλο κυτταρίνη (Hydroxypropyl methyl cellulose),η υδροξυαιθυλο μεθυλο κυτταρίνη (Hydroxyethyl methyl cellulose)κ.α.

## 2. Εστέρες κυτταρίνης

Η κυτταρίνη λόγω των ισχυρών δεσμών που συγκρατούν το πλέγμα των αλυσίδων και την καθιστούν άρα άκαμπτη,είναι εξαιρετικά δύσκολο να επεξεργαστεί,δηλαδή να διαλυθεί και να χρησιμοποιηθεί ως χημική πρώτη ύλη.Για το λόγο αυτό ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποκτούν οι εστέρες κυτταρίνης. Οι εστέρες κυτταρίνης προέρχονται από τη χημική μετατροπή της κυτταρίνης κατά τη διάρκεια ετερογενών διεργασιών.Συγκεκριμένα είναι η αντίδραση της κυτταρίνης με οργανικά οξέα,χλωρίδια οξέων κ.α. 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.

Οι εστέρες κυτταρίνης που έχουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι οι εστέρες που έχουν προκύψει από αντίδραση της καθαρής κυτταρίνης με λιπαρά οξέα, των οποίων ο αριθμός των ανθράκων-C-ξεπερνάει τους έξι. Τότε οι εστέρες αποκτούν θερμοπλαστικές ιδιότητες και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι τόσο στο εμπόριο όσο και στην φαρμακευτική ως επικαλύπτες φαρμάκων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εστέρων είναι η προπιονική κυτταρίνη (cellulose propionate), λαυρική κυτταρίνη (cellulose laurate) και η οξική κυτταρίνη (cellulose acetate). Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα τους είναι μη τοξικοί, ανανεώσιμοι και βιοδιασπώμενοι. 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-διμεθυλο-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, C<sub>12</sub> έως C<sub>20</sub>.

Η δυσκολίες που προκύπτουν κατά τη χημική επεξεργασία της κυτταρίνης μας οδηγεί στην ανάγκη εύρεσης μεθόδων με περισσότερα πλεονεκτήματα. Σε αυτές ανήκει η ενζυμική επεξεργασία της κυτταρίνης με στόχο τη δημιουργία εστερικών αλυσίδων. Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα ενζυμικής εστεροποίησης της κυτταρίνης και οι συνθήκες στις οποίες επιτυγχάνεται αύξηση της εστερικής αλυσίδας, το οποίο είναι και ο βασικός μας στόχος. Ανάμεσα στους παράγοντες οι οποίοι μελετήθηκαν είναι η θερμοκρασία, οι συγκεντώσεις των υποστρωμάτων και το είδος του ενζύμου.

Χαρακτηριστικά αναφέρουμε ότι μεταξύ των εστέρων είναι η οξική κυτταρίνη και η τριοξική κυτταρίνη, οι οποίες σχηματίζουν λεπτά στρώματα και ίνες δημιουργώντας υλικά τα οποία βρίσκουν ποικίλες χρήσεις. Φιλμ, ίνες και θερμοπλαστικά είναι μερικά ενδεικτικά προϊόντα που προέρχονται από την οξική κυτταρίνη. Ο ανόργανος εστέρας της νιτροκυτταρίνης επίσης είχε στο παρελθόν ορισμένες σημαντικές εφαρμογές ως υλικό.

Χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως εκρηκτική ύλη και ήταν πρόδρομη ένωση για τη παρασκευή διαφόρων φιλμ.

## 2.1 Χρήσεις εστέρων κυτταρίνης

Οι εστέρες κυτταρίνης είναι σημαντικά εμπορικά πολυμερή για σχεδόν έναν αιώνα. Προσπάθειες γίνονται για να αυξηθεί η απόδοση τους και να βελτιωθούν οι ιδιότητες τους με στόχο να χρησιμοποιούνται και εμπορικά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η δημιουργία ινών, μεμβρανών, πλαστικών όπως επίσης βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική ως επικαλυπτές φαρμάκων.

Ειδικότερα οι οργανικοί και ανόργανοι εστέρες κυτταρίνης έχουν παίξει για καιρό σημαντικό ρόλο σε εφαρμογές επιστρωμάτων.

Υλικά όπως μέταλλο, πλαστικό, ξύλο, ρουχισμός, χαρτί και δέρμα χρησιμοποιούνται κυρίως για προστασία ή διακόσμηση σε βιομηχανικές και αρχιτεκτονικές εφαρμογές. Τα παλαιότερα είδη επιστρωμάτων εφαρμόστηκαν σε υποστρώματα χρησιμοποιώντας οργανικούς διαλύτες. Οι οργανικοί και ανόργανοι εστέρες κυτταρίνης έχουν παίξει για καιρό σημαντικό ρόλο σε εφαρμογές επιστρωμάτων. 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 βουτυλο ομάδες, η ελαστικότητα, η διαλυτότητα, η ανεκτικότητα σε υδρογονάνθρακα και η συμβατότητα 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 συμβατότητα, η διαλυτότητα, και το μέγιστο μη πτητικό περιεχόμενο μειώνονται καθώς το μοριακό βάρος του εστέρα αυξάνεται. Η περιεκτικότητα σε υδροξύλιο επιδρά στην αντίσταση σε υγρασία και σκληρότητα, τα οποία μειώνονται και τα δύο με αυξανόμενη περιεκτικότητα σε υδροξύλιο. Η ανοχή των διαλυμάτων οξικής βουτυρικής κυτταρίνης σε προστιθέμενο νερό ή αιθανόλη, η σκληρότητα και η δραστηριότητα με ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια αυξάνονται με την περιεκτικότητα σε υδροξύλιο.[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. Αυτά είναι παραδείγματα κλειδιά από τις νέες τεχνολογίες επιστρωμάτων με μειωμένα επίπεδα εκπομπών από πτητικές οργανικές ενώσεις.[20]

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)

Τέλος σημαντική είναι η χρήση των εστέρων κυτταρίνης στον τομέα της φαρμακευτικής και συγκεκριμένα στην προσπάθεια αποδέσμευσης, στο μεγαλύτερο ποσοστό της, της δραστικής ουσίας των φαρμάκων. Από τις ίδιες

αυτές αρχές μπορούν να ωφεληθούν οι αγροτικές εφαρμογές και οι εφαρμογές ελέγχου παρασίτων.

### **3.Οξική κυτταρίνη(cellulose acetate)**

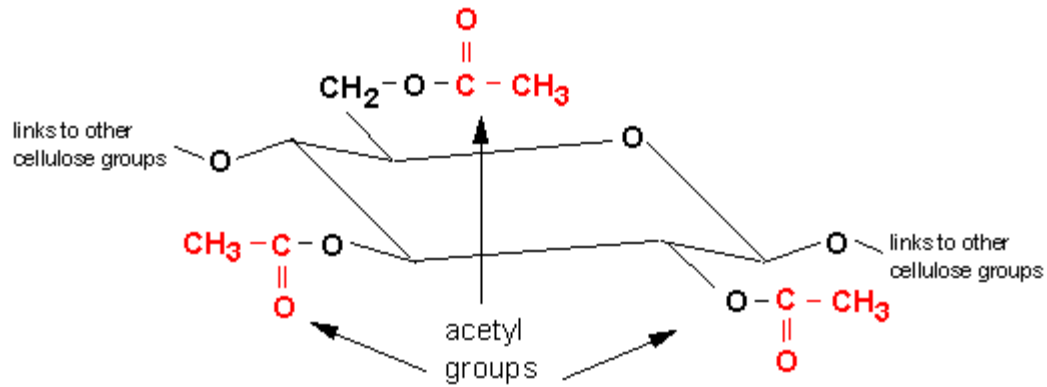
Η δυσκολία επεξεργασίας της κυτταρίνης μας οδήγησε στους πιο εύχρηστους για μας εστέρες κυτταρίνης.Όπως αναφέρθηκε,όσο μεγαλύτερη είναι η εστερική αλυσίδα τόσο πιο χρήσιμα πολυμερή και θερμοπλαστικά υλικά έχουμε.Για τους λόγους αυτούς στην εργασία αυτή χρησιμοποιούμε την οξική κυτταρίνη,έναν έστερα κυτταρίνης και σαν στόχο θέτουμε να τη μετεστεροποιήσουμε,να επιτύχουμε πιο συγκεκριμένα άυξηση της εστερικής αλυσίδας.

Η Οξική κυτταρίνη παρασκευάστηκε για πρώτη φορά από τον Paul Schutzenberger το 1865 κατά τη θέρμανση βαμβακιού και άνυδρου οξικού και είναι ο οξικός εστέρας της κυτταρίνης.

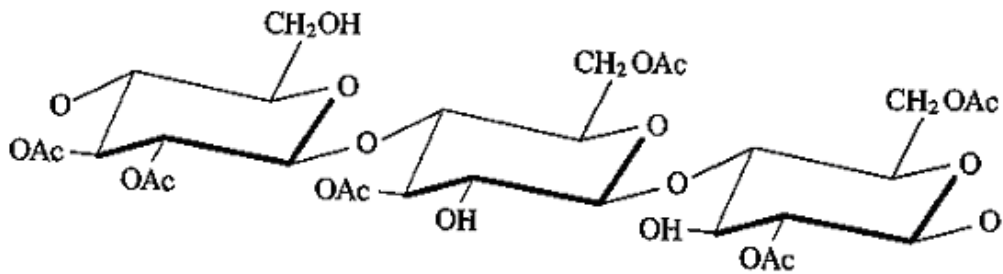
Χρειάστηκαν άλλα 29 χρόνια προτού ο Charles Cross και Edward Bevan πάρουν δίπλωμα ευρεσιτεχνίας για την κατασκευή της.

Είναι το προϊόν της αντίδραση των ελεύθερων υδροξυλομάδων της κυτταρίνης με ανυδρό οξικό και ως καταλύτη της αντίδρασης το θειικό οξύ (σχήμα 5)και καταλήγουμε στη γνωστή δομή της που φαίνεται στο σχήμα 6.

Μια έννοια που μας ενδιαφέρει πολύ και θα μας απασχολήσει και παρακάτω είναι η οξική ίνα. Ο επίσημος ορισμός για την οξική ίνα είναι “Μία κατασκευασμένη ίνα στη οποία η ουσία για το σχηματισμό της ίνας είναι η οξική κυτταρίνη. Όταν περισσότεροι από 92 τοις εκατό των ομάδων υδροξυλίου είναι ακετυλιωμένοι, ο όρος τριοξική μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γενική περιγραφή της ίνας”.



Σχήμα 5: Παρασκευή οξικής κυτταρίνης



Σχήμα 6: δομή οξικής κυτταρίνης

### 3.1 Οξική Ίνα

Η ίνα οξικής κυτταρίνης είναι μια από στις πιο πρώιμες συνθετικές ίνες και βασίζεται στην κυτταρίνη από πολύ βαμβακιού ή ξύλου. Αυτές οι «κυτταρινικές ίνες» θεωρούνται ως φτηνές πετρο-βασισμένες ίνες (νάιλον και πολυεστέρας) και έχουν εκτοπίσει στις αναγεννημένες ίνες πολτού καθαρής κυτταρίνης (pure cellulose).

Εφευρέθηκε από δύο Ελβετούς αδελφούς, στις γιατρούς Camille και Henri Dreyfus, οι οποίοι πρώτοι ξεκίνησαν τη χημική έρευνα σε ένα υπόστεγο

πίσω από το σπίτι του πατέρα στις στη Βασιλεία, στην Ελβετία. Το 1905, ο Camille και ο Henri ανέπτυξαν μια εμπορική διαδικασία για να κατασκευάσουν την οξική κυτταρίνη. Οι αδελφοί Dreyfus εστίασαν αρχικά στην ταινία οξικής κυτταρίνης, η οποία έπειτα χρησιμοποιήθηκε ευρέως στα κυτταρινούχα πλαστικά και στα φιλμ. Μέχρι το 1913, οι μελέτες και τα πειράματα των Camille και Henri είχαν παράγει άριστα εργαστηριακά δείγματα του συνεχούς νήματος των οξικών ινών. Το 1924, η πρώτη εμπορική ίνα οξικής κυτταρίνης εμφανίστηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες. Οι εμπορικές φίρμες για την οξική κυτταρίνη είναι Acele, Avisco, σελανέζη, Chromsprun και Estron.[16]

### **3.1.1 Ιδιότητες ινών οξικής κυτταρίνης**

Η ίνα οξικής κυτταρίνης είναι μια σύνθετη ίνα που έχει χαμηλό κόστος αλλά και καλές μηχανικές ιδιότητες. Οι ιδιότητες αυτές την έχουν προαγάγει ως την “όμορφη ίνα”. [16] Η οξική χρησιμοποιείται στα υφάσματα όπως τα σατέν, τα μπροκάρ και τον ταφτά για να τονίσει τη λαμπρότητα, το σώμα και την ομορφιά

### **3.2 Παρασκευή οξικής κυτταρίνης**

Η οξική κυτταρίνη προέρχεται άμεσα από επεξεργασία ξυλοπολτού ή βαμβακιού, προϊόντα που αποτελούν ανανεώσιμες πηγές ενέργειας και άρα είναι άμεσα βιοδιασπώμενο.

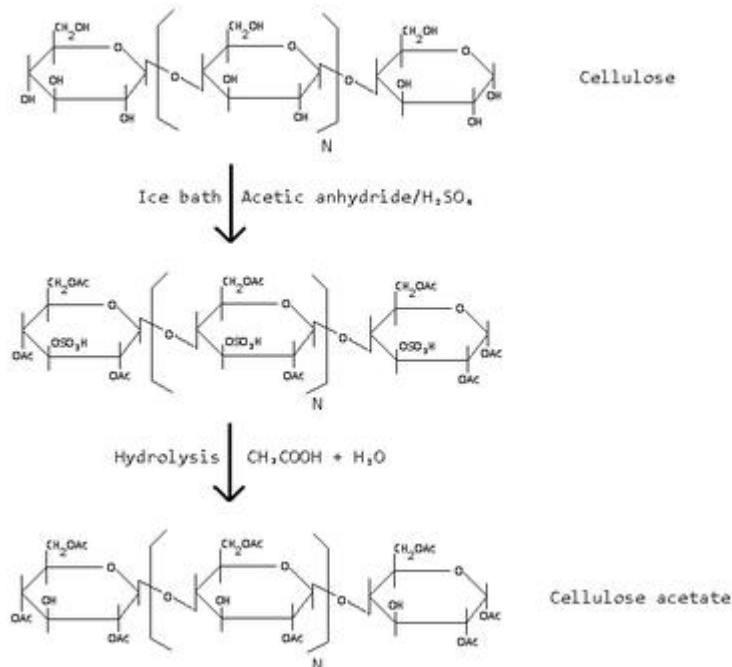
Η οξική κυτταρίνη παράγεται με ακυλίωση της κυτταρίνης με τον κατάλληλο καταλύτη, μία ετερογενή διεργασία. Τέτοια διεργασία φαίνεται στο Σχήμα 6, με θειικό οξύ ως καταλύτη και υδρόλυση του ενδιάμεσου προϊόντος για παραγωγή οξικής κυτταρίνης.

Συγκεκριμένα η οξική κυτταρίνη προέρχεται από την κυτταρίνη με ανακατασκευή του ξύλινου πολτού σε μία καθαρισμένη χνουδωτή άσπρη κυτταρίνη. (Σχήμα 7 ) Προκειμένου να αποκτηθεί ένα καλό προϊόν χρησιμοποιούνται ειδικές ιδιότητες των πολτών –διαλυόμενοι πολτοί. Η κυτταρίνη, στη συνέχεια αντιδρά με το οξικό οξύ και τον οξικό ανυδρίτη παρουσία του θειικού οξέος. Στη συνέχεια τίθεται μια ελεγχόμενη, μερική

υδρόλυση για να απομακρύνει το θειικό και ένας ικανοποιητικός αριθμός οξικών ομάδων για να δώσει στο προϊόν τις επιθυμητές ιδιότητες. Η μονάδα ανυδρογλυκόζης είναι η θεμελιώδης δομή επανάληψης της κυτταρίνης και έχει τρεις ομάδες υδροξυλίου που μπορούν να αντιδράσουν για να σχηματίσουν οξικούς εστέρες. Η πιο κοινή μορφή της ίνας οξικής κυτταρίνης έχει μία οξική ομάδα με περίπου δύο από κάθε τρία υδροξύλια. Αυτή η δισοξική κυτταρίνη είναι γνωστή ως δευτεροβάθμια οξική, ή απλά ως “οξική”. Ωστόσο αν βρεθούν οι κατάλληλοι διαλύτες της κυτταρίνης η διεργασία γίνεται ομογενής. Τέτοια παραδείγματα είναι η διάλυση της κυτταρίνης σε dimethylacetamide–lithium chloride, διαλύτης ο οποίος δεν αντιδρά με τις ελεύθερες υδροξυ-ομάδες αφήνοντας τις ελεύθερες για εστεροποίηση.

Μία άλλη μέθοδος είναι να χρησιμοποιήσουμε ως διαλύτη dinitrogen tetroxide in dimethylformamide (DMF), να έχουμε ως ενδιάμεσο προϊόν το νιτρικό εστέρα κυτταρίνης και στη συνέχεια τη μετεστεροποίηση του σε οξική κυτταρίνη.

Ένας άλλος κοινός τρόπος είναι με άμεση υδρόλυση της cellulose triacetate.



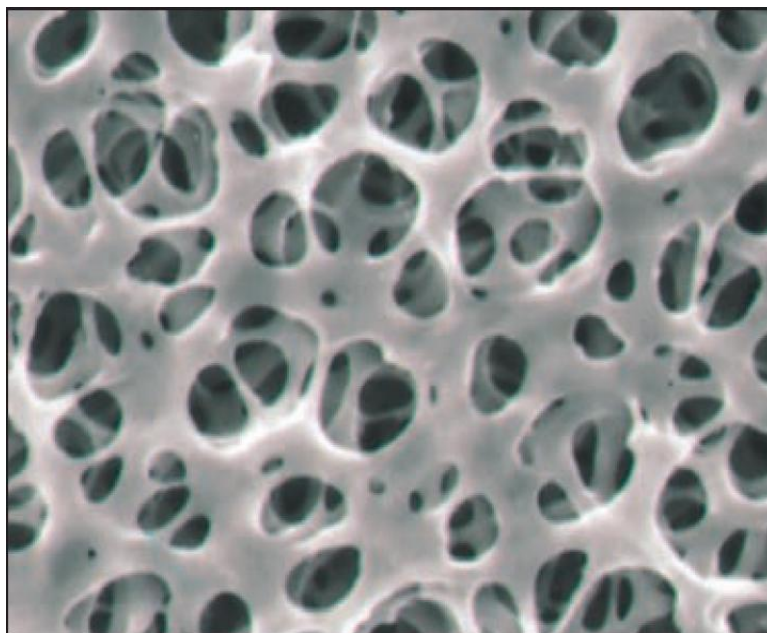
Σχήμα 7: παραγωγή οξικής κυτταρίνης με ακυλίωση καθαρής κυτταρίνης

### 3.3 Ιδιότητες και χρήσεις

Η οξική κυτταρίνη είναι από τους πιο διαδεδομένους οργανικούς εστέρες καθώς είναι πολύ εύχρηστη και εφαρμόζεται ευρέως σε εμπορικά προϊόντα.Σ αυτό συμβάλλει η δυνατότητα διάλυσης της σε λιγότερο ακριβούς και λιγότερο τοξικούς διαλύτες,ενισχύοντας έτσι τον οικολογικό της ρόλο.

Μετεστεροποιώντας την,αυξάνοντας την αλυσίδα των εστέρων,αποκτά θερμοπλαστικές ιδιότητες και την καθιστά έτσι ένα πολύ εμπορικό πολυμερές.Μερικές από αυτές τις ιδιότητες είναι η διαπερατότητα,καλή αντοχή και η κυριώτερη είναι η δυνατότητα βιοδιάσπασης της καθώς προέρχεται από φυσικά υλικά,την κυτταρίνη.

Χαρακτηριστικές χρήσεις της είναι στην κλωστοϋφαντουργία, και σε φίλτρα.



Σχήμα 8:μεγέθυνση φίλτρου οξικής κυτταρίνης

Χρησιμοποιείται επίσης για την κατασκευή συνθετικών ινών όπως το συνθετικό μετάξι και ο ταφτάς.

Μία διαφορετική και πολύ γνωστή χρήση της είναι ως φιλμ και μαγνητική ταινία στη βιομηχανία του κινηματογράφου και στη φωτογραφία, τη δεκαετία του '30. Συγκεκριμένα, η ταινία οξικής κυτταρίνης εισήχθη το 1934 για να αντικαταστήσει το απόθεμα ταινιών νιτρικής κυτταρίνης που χρησιμοποιούντουσαν ως τότε. Από τη δεκαετία του '80, οι ταινίες οξικής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν στη φωτογραφία. Μάλιστα τα αντίστοιχα προϊόντα αναφέρονται μερικές φορές κάτω από βάση του εμπορικού ονόματος της Kodak "ESTAR Base"). Η ταινία οξικής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκε επίσης ως βάση για τη μαγνητική ταινία, πριν από την εμφάνιση της ταινίας πολυεστέρα. Όταν όμως εκτίθεται στη θερμότητα, την υγρασία ή τα οξέα, η ταινία οξικής κυτταρίνης μεταπίπτει σε μία εκφυλισμένη μορφή που δεν μπορεί χρησιμοποιηθεί πια, καθώς απελευθερώνεται οξικό οξύ δημιουργώντας και μια χαρακτηριστική όξινη μυρωδιά. Αυτή η ευαισθησία της στην υγρασία, και η μικρή αντοχή της στην υψηλή θερμοκρασία οδήγησε στην αντικατάστασή της από άλλους εστέρες κυτταρίνης.

Επίσης τα φιλμ οξικής κυτταρίνης χρησιμοποιήθηκαν από την εταιρεία IBM για τη παρασκευή μαγνητικών ταινιών για τους ηλεκτρονικούς υπολογιστές.

Η οξική κυτταρίνη όπως αναφέραμε αποτελεί τον πιο σημαντικό οργανικό εστέρα λόγω της ευρείας του εφαρμογής σε ίνες και πλαστικά υλικά. Ως περιοριστικός παράγοντας δρα η ασυμβατότητά της με τις συνθετικές ρητίνες

### **3.4.Αποικοδόμηση οξικής κυτταρίνης**

Η αποικοδόμηση της οξικής κυτταρίνης μπορεί να γίνει είτε φυσικά(βιοδιασπώμενη) είτε με υδρόλυση.

Φυσικά γίνεται με την διάσπαση του πολυμερούς λόγω της υγρασίας, της υψηλής θερμοκρασίας, του νερού, διάφορων χημικών ή την ανάπτυξη μυκήτων.

Η υδρόλυση συνίσταται στη σχάση των γλυκοζιτικών δεσμών, οι οποίοι συγκρατούν τα μόρια της γλυκόζης, με την ταυτόχρονη αφαίρεση μορίων νερού. Το πολυμερές χάνει έτσι τη συνεκτικότητά του και διασπάται.

## 4. Ένζυμα και μη συμβατική βιοκατάλυση

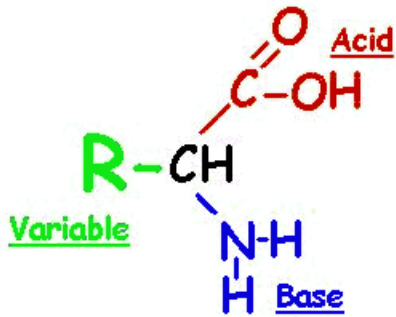
### 4.1 Βασικές αρχές ενζυμολογίας

Τα ένζυμα είναι μια ειδική κατηγορία πρωτεϊνών και συναντώνται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα. Λειτουργούν ως βιοκαταλύτες αφού καταλύουν τις βιολογικές δράσεις που συμβαίνουν στον οργανισμό και ταυτόχρονα παρουσιάζουν εξειδικευμένη καταλυτική δράση.

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

Όπως αναφέραμε τα ένζυμα είναι μία κατηγορία των πρωτεϊνών. 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 (20). 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 9).





Σχήμα 9. Η δομή ενός αμινοξέος

Όπου : R η πλευρική αλυσίδα ( R group)

NH<sub>2</sub> η αμινομάδα

COOH η καρβοξυλομάδα

Το μόνο το οποίο αλλάζει από αμινοξύ σε αμινοξύ είναι η πλευρική ομάδα R. Αν εξαιρέσουμε τη περίπτωση όπου η πλευρική αλυσίδα είναι το υδρογόνο (γλυκίνη), τα υπόλοιπα 19 αμινοξέα παρουσιάζουν οπτική ενεργότητα, απαντούν δηλαδή με δύο εναντιομερείς μορφές. Όμως στις βιολογικές δράσεις συμμετέχει μόνο ο ένας αντίποδας, ο L.

Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες έχουν πρωτοταγή(η αλληλουχία των αμινοξέων στην ευθεία πεπτιδική αλυσίδα),δευτεροταγή(τον προσανατολισμό επιμέρους τμημάτων στο χώρο),την τριτοταγή(το πως περιελίσσεται συνολικά στο χώρο) και σε ορισμένες περιπτώσεις και τεταρτοταγή δομή(τον τρόπο που πολλά μόρια πρωτεΐνης συνδέονται).'

Στην ύπαρξη και στη διατήρηση της τριτοταγούς δομής,οφείλουν την καταλυτική τους δράση τα ένζυμα.(με την προϋπόθεση ότι φυσικά διατηρούν και τις κατώτερης τάξης δομές). Θα πρέπει δηλαδή να έχουν την κατάλληλη τριδιάστατη διαμόρφωση στο χώρο. Αυτή η υπεύθυνη για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης δομή, οφείλεται στους ακόλουθους παράγοντες:

- Στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των ουδέτερων R groups. Λόγω αυτών των απώσεων, τα R groups πάνε προς το εσωτερικό της πρωτεΐνης μακριά από το νερό.

- Στις υδρόφιλες φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες (π.χ.  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ) που προσανατολίζονται προς το εξωτερικό μέρος της πρωτεΐνης, προς το νερό.
- Στις ομάδες  $\text{NH}_3^+$  και  $\text{COO}^-$  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]

Η αντίδραση η οποία λαμβάνει χώρα μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος(αντιδρών)είναι:



Όπου E: ένζυμο  
 S: υπόστρωμα  
 ES: ενεργοποιημένο σύμπλοκο  
 P: προϊόν

Το ένζυμο , 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.

Η θέση στο υπόστρωμα, στην οποία συνδέεται το ένζυμο λέγεται «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 λαμβάνουν συμμετοχή στη σχάση και το σχηματισμό χημικών δεσμών, μετά τη πρόσδεση του υποστρώματος. Αυτές οι ομάδες καλούνται «καταλυτικές» (catalytic groups). [26]

Με την παρουσία του ενζύμου, ως βιοκαταλύτη, πετυχαίνεται η μετατροπή του προϊόντος, μέσω νέων οδών απ'ότι απουσία του, με μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις. Αυτό σημαίνει ότι μειώνεται η ενέργεια ενεργοποίησης καθώς ανακατανέμεται η εσωτερικής ενέργειας (internal energy) των αντιδρώντων μορίων, είτε γιατί ιοντοποιούνται ή διασπώνται 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.

## 4.2 κατηγορίες ενζύμων

Τα ένζυμα, ανάλογα με το είδος των αντιδράσεων που καταλύουν, διακρίνονται στις εξής κατηγορίες [27]

- οξειδοαναγωγάσες ή οξειδοοξειδοκτάσες (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.

### 4.3.Λιπάση

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 των τριγλυκεριδίων και ιδιαίτερα εκείνων που περιέχουν λιπαρά οξέα μεγάλου μοριακού βάρους, σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Οι λιπάσες γενικά καταλύουν ένα μεγάλο αριθμό εστέρων των λιπαρών οξέων εμφανίζοντας ιδιαίτερα μια μεγάλη εξειδίκευση για ,πγλυκεριδικά υποστρώματα. Οι λιπάσες κατατάσσονται σε τρεις γενικές κατηγορίες αναλόγως της εξειδίκευσης τους .

Έτσι έχουμε

- 1) τις μη εξειδικευμένες λιπάσες, που καταλύουν την ολική υδρόλυση των τριγλυκεριδίων προς γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα,

παράγοντας όμως και μια σειρά ενδιάμεσων προϊόντων, όπως δι- και μόνο- γλυκερίδια.

- 2) τις λιπάσες που καταλύουν τους εστερικούς δεσμούς σε θέσεις 1,3 της γλυκερόλης δίνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, 1,2(2,3)-δι-γλυκερίδια και 2-μονογλυκερίδια, τα οποία όμως μετατρέπονται, λόγω χημικής αστάθειας, σε 1,3 δικλυκερίδια και 1(3) μονογλυκερίδια που με τη σειρά τους υδρολύονται προς μόνο ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη.
- 3) τις λιπάσες που καταλύουν εστερικούς δεσμούς ορισμένων μόνο λιπαρών οξέων ή αλκοολών.

Οι αντιδράσεις αυτές είναι αντιστρεπτές, επιτρέποντας τη σύνθεση γλυκεριδίων από λιπαρά οξέα και γλυκερόλη, όπως θα δούμε και στη συνέχεια.

### 4.3.1 Δομή Λιπάσης

#### 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-).

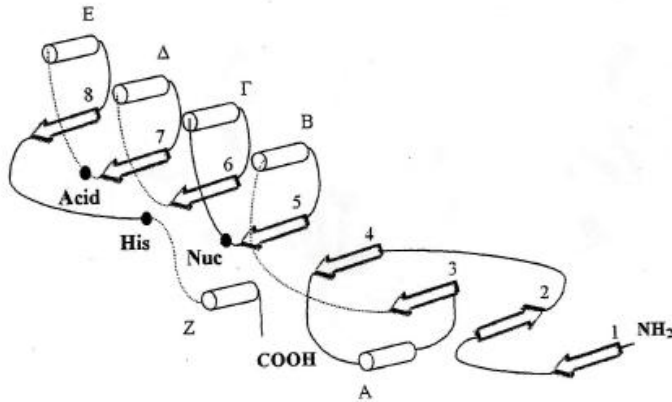
Παρόλη τη μικρή ομολογία της αλληλουχίας των διαφόρων λιπασών, μπορούμε να κατατάξουμε τις λιπάσες σε διάφορες οικογένειες ανάλογα με

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, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8. 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 οπή. Η καταλυτική τριάδα της σερίνης-πρωτεάσης αποτελείται από μια πυρηνόφιλη σερίνη, μια ιστιδίνη και ένα ασπαρτικό οξύ, ενώ η οξυανική τρύπα συνήθως συνίσταται από δύο αμίδια.

Η δομική και μηχανιστική διατήρηση 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 όπως: N-τελικό → πυρηνόφιλο → οξύ → ιστιδίνη. 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  $\alpha/\beta$ -υδρολάσης. Η διαμόρφωση αποτελείται από κεντρικές  $\beta$ -πτυχωτές (1-8) συνδεδεμένες με  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 τρύπα 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 τρύπα.[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 παρούσα 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.



### 4.3.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπάσης

Ο καταλυτικός μηχανισμός 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 τρύπα, 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.

## 4.4 Κατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα

Όπως αναφέραμε πιο πάνω η αντίδραση υδρόλυσης την οποία καταλύει η λιπάση είναι αντιστρεπτή σε διαφορετικό-μη συμβατικό περιβάλλον.

Η λιπάση,όπως και όλα τα ένζυμα,είναι παράγωγο ζωντανών κυττάρων και το φυσικό της περιβάλλον αποτελεί το νερό.Συνεπώς,σε όλες τις πειραματικές διεργασίες τα ένζυμα τοποθετούνται σε υδατικό περιβάλλον.

Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχει βρεθεί ότι πολλά ένζυμα είναι ικανά να καταλύσουν και την αντίστροφη αντίδραση από αυτή που καταλύουν σε συμβατικές συνθήκες.Αυτό οφείλεται στην καταλυτική τους φύση καθώς δεν ελέγχει την πορεία της αντίδρασης. Αυτό ελέγχεται από τις συνθήκες του αντιδρώντος συστήματος και από τη θέση της χημικής ισορροπίας.Στην περίπτωση μας αντί για τη λύση εστερικών δεσμών πετυχαίνουμε τη σύνθεση εστέρων.Συγκεκριμένα στο νερό καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης, αλλά παρουσία οργανικού διαλύτη για παράδειγμα, η χημική ισορροπία της αντίδρασης μετατοπίζεται προς την αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της σύνθεσης.Εδώ να τονιστεί ότι το μόνο που αλλάζει μεταξύ των δύο συστημάτων είναι το περιβάλλον,το οποίο είναι και το υπεύθυνο της πορείας της αντίδρασης.

Λέγοντας μη συμβατικά μέσα [42] εννοούμε τα μέσα αυτά τα οποία κυρίως περιέχουν οργανικά συστατικά (διαλύτες, υποστρώματα, προϊόντα...), υπερκρίσιμα ρευστά, ιοντικά υγρά ή και κάποιο αέριο μέσο αντίδρασης. Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των συστημάτων είναι πως η περιεκτικότητα τους σε νερό είναι μειωμένη σε σύγκριση με τα 'συμβατικά' μέσα.

Οι λόγοι που μας οδηγούν στην επιλογή μη συμβατικών μέσων,ποικίλλουν. Για αρχή τα περισσότερα αντιδρώντα των αντιδράσεων οργανικής σύνθεσης που χρειάζονται 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.

Τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή χημο-, τοπο- και εναντιοεκλεκτικότητα, 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.

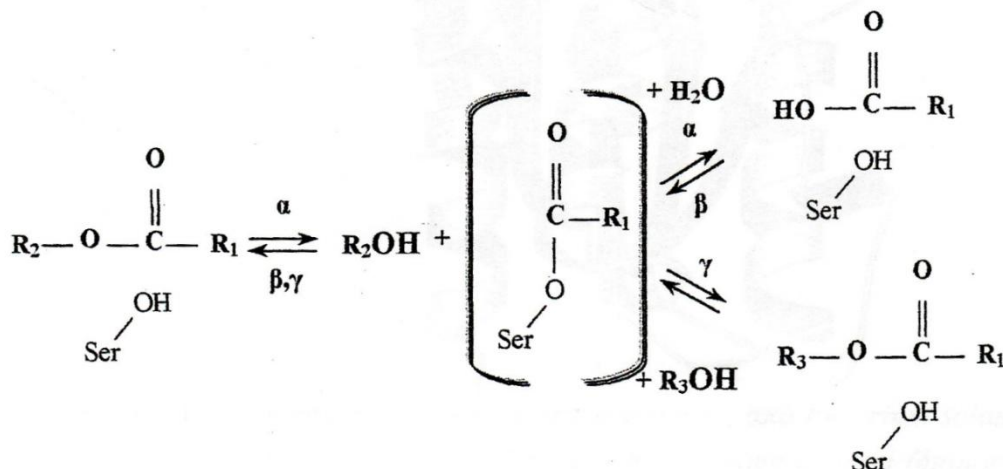
Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω για την επεξεργασία της κυτταρίνης είναι προτιμότερο αντί με χημικούς τρόπους, να την επεξεργαστούμε ενζυμικά.

Το πιο σημαντικό ερώτημα είναι κατά πόσο το ένζυμο παραμένει ενεργό σε ένα μη συμβατικό μέσο. Οι οργανικοί διαλύτες έχουν την τάση να προκαλούν το ξεδίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του ενζύμου. Ωστόσο, λόγω της απουσίας του νερού, το ένζυμο είναι άκαμπτο, ο οργανικός διαλύτης δεν προσβάλλει την πολυπεπτιδική αλυσίδα και κατά συνέπεια δεν μετουσιώνεται. Έτσι λοιπόν παρά το γεγονός ότι απουσιάζουν οι υδρόφιλοι και υδρόφοβοι δεσμοί που το συγκρατούν λόγω απουσίας του νερού, το ένζυμο δεν χάνει την ενεργότητά του. Μάλιστα έσει βρεθεί ότι 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. ]. 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 δραστηριότητα 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.

Ανακεφαλαιώνοντας, τοποθετώντας τη λιπάση σε υδατικό περιβάλλον πετυχαίνουμε υδρόλυση των εστερικών δεσμών ενώ σε μη υδατικά λαμβάνει χώρα η αντίστροφη αντίδραση, δηλαδή η εστεροποίηση[44].

Το έντονο ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τις λιπάσες επικεντρώνεται σε αυτή τη συνθετική τους ικανότητα σε συνδυασμό πάντοτε με το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων που είναι δυνατό να αναγνωρίσουν ως υποστρώματα και την εκλεκτικότητα τους. 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 προστιθέμενης αξίας.

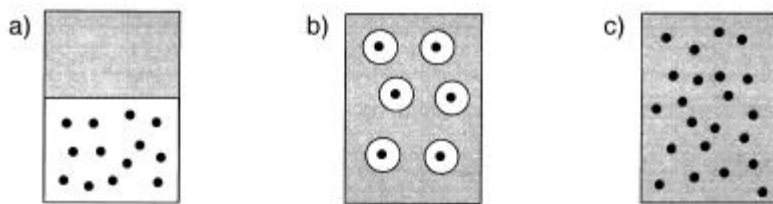
Οι αντιδράσεις που μπορούν να καταλυθούν από λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα παρουσιάζονται στο Σχήμα 11. Το πρώτο στάδιο, σε όλες αυτές τις αντιδράσεις, είναι ο σχηματισμός του ακυλο-ένζυμο ενδιάμεσου με τον ακυλο-δότη. Στις περιπτώσεις της υδρόλυσης και της μετεστεροποίησης (transesterification) (Σχήμα 11. 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 11.α ) και μία αλκοόλη για τις αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης (Σχήμα 11.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.



**Σχήμα 1. Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες σε μη-συμβατικά μέσα**  
**α) υδρόλυση εστέρα, β) σύνθεση εστέρα και γ) μετεστεροποίηση**

Για να πετύχουμε λοιπόν μετεστεροποίηση της οξικής κυτταρίνης, το αντικείμενο της εργασίας αυτής, προτιμάται μη συμβατικό σύστημα. Αυτό γιατί σε υδατικό περιβάλλον γη διεξαγωγή των αντιδράσεων διαεστεροποίησης παρουσιάζει πολλά διαδικαστικά προβλήματα που έχουν σχέση με την ετερογένεια του αντιδρώντος μείγματος (υποστρώματα λιποδιαλυτά και ένζυμο υδατοδιαλυτό). Πρέπει λοιπόν η ενεργότητα το νερού να είναι πολύ περιορισμένη. Η λύση είναι η διεξαγωγή της αντίδρασης με ετερογενή κατάλυση χρησιμοποιώντας το ένζυμο υπό στερεή μορφή (έχοντας εξασφαλίσει την κατάλληλη διαμόρφωση) μέσα σ' έναν οργανικό διαλύτη όπου βρίσκεται το υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή αν και δίνει αποτελέσματα παρουσιάζει ορισμένες βασικές αδυναμίες παραλαβής των προϊόντων, αλλά και μελέτης της δομής και της δράσης του ενζύμου κατά την κατάλυση.

Οι διαλύτες λοιπόν που θα μας απασχολήσουν είναι οι οργανικοί. Ειδικότερα 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. Άλλες περιπτώσεις είναι αντίστροφα μικκύλια και μικρογαλακτώματα ή και σχεδόν άνυδροι οργανικοί διαλύτες. Οι βασικότεροι τύποι αυτών των μέσων παρίστανται στο ακόλουθο σχήμα



**Σχήμα. 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.

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## 1.ΥΛΙΚΑ

Ένζυμα:

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήσαμε ήταν τα εξής:

Lipase from *Candida Antarctica* immobilized on acrylic resin , της εταιρείας Sigma.

lipase *Candida Cylindracea*, εταιρείας Fluka.

Υποστρώματα

Οξική κυτταρίνη

Προϊόν της εταιρείας Fluka, με Mr ~29.000 και βαθμό εστεροποίησης 40%

Λιπαρά:

Vinyl-propionate με καθαρότητα 98% της εταιρείας Aldrich

Vinyl-palmitate με καθαρότητα 95% της εταιρείας Aldrich

Vinyl-laurate με καθαρότητα >99.0%(GC) της εταιρείας Fluka

### Οργανικοί Διαλύτες:

Ακετονιτρίλιο (CH<sub>3</sub>CN)

Προϊόν της εταιρείας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%

Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH)

Προϊόν της εταιρείας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%

Εξάνιο (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>)

Προϊόν της εταιρείας Fisher Scientific, καθαρότητας 100%



## **2.ΟΡΓΑΝΑ:**

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Επωαστήρας με ανάδευση (orbital incubator), ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας και ανάδευσης (0-1000rpm)

Φασματόμετρο υπερύθρου (FT-IR)

Πρέσα για παστίλιες

Αναλυτικός ζυγός

Φυγόκεντρος

Συσκευή διήθησης

Ξηραντήρας 40ο C

Vortex

## **3.ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **3.1.Αντιδράσεις**

#### **A)**

Στις αντιδράσεις αυτής της κατηγορίας η ποσότητα του υποστρώματος και του ενζύμου παραμένει σταθερή και αλλάζουν οι ποσότητες των λιπαρών οξέων. Τα λιπαρά που χρησιμοποιούνται είναι ο προπιονικός βινυλεστέρας, ο δωδεκανοϊκός βινυλεστέρας και ο δεκαεξανοϊκός βινυλεστέρας. Οι ποσότητες που δοκιμάστηκαν είναι 100 μl, 300μl, 500 μl. Σε όλες τις αντιδράσεις αυτές το υπόστρωμα είναι κοινό και παρασκευάζεται ως εξής:

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN). Προσθέτουμε 200 mg οξικής κυτταρίνης (cellulose acetate) και αναδεύουμε σε vortex, μέχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Α**)

A-1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα (vinyl propionate) και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-4)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα (vinyl laurate) και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-5)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-6)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-7)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα( vinyl palmitate) και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-8)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

A-9)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα errendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.  
Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

**B)**

Στις αντιδράσεις αυτής της κατηγορίας,οι ποσότητες των λιπαρών οξέων και του υποστρώματος παραμένουν σταθερές και αλλάζει η ποσότητα του ενζύμου.

Τα λιπαρά που χρησιμοποιούνται είναι ο προπιονικός βινυλεστέρας,ο δωδεκανοϊκός βινυλεστέρας και ο δεκαεξανοϊκός βινυλεστέρας.Οι ποσότητες που δοκιμάστηκαν είναι 100 μl, 300 μl, 500 μl.

Σε όλες τις αντιδράσεις αυτές το υπόστρωμα είναι κοινό και παρασκευάζεται ως εξής:

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 200 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Α**)

B-1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 5 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 20 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 30 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-4)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 5 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-5)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 20 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-6)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 30 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-7)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 5 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-8)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 300 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 20 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

B-9)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 100 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 30 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα errendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.

Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

Γ)

Στις αντιδράσεις αυτής της κατηγορίας η ποσότητα του ενζύμου και των λιπαρών οξέων παραμένει σταθερή και αλλάζουν οι ποσότητες του υποστρώματος.

Γi)

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 50 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδεύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Α**).

1)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

2)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

3)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα errendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.

Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

Γii)

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 150 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδεύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Β**).

1)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Β** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

2)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Β** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

3)

Σε errendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Β** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα erpendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.  
Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

Γiii)

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 300 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Γ**).

1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Γ** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Γ** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Γ** και προσθέτουμε 100 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα erpendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.  
Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

Δ)

Στις αντιδράσεις της κατηγορίας αυτής,οι ποσότητες όλων παραμένουν σταθερές και αλλάζει το είδος του ενζύμου.

Σε όλες τις αντιδράσεις αυτές το υπόστρωμα είναι κοινό και παρασκευάζεται ως εξής:

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 200 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδεύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Α**)

1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ενζύμου *Candida Cylindracea*.

2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ενζύμου *Candida Cylindracea*.

3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ενζύμου *Candida Cylindracea*.

Στεγανοποιούμε τα erpendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.

Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 40 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

**E)**

Στις αντιδράσεις της κατηγορίας αυτής,οι ποσότητες όπως και το είδος του υποστρώματος,των λιπαρών οξέων και του ενζύμου παραμάνουν σταθερές και αλλάζουμε τη θερμοκρασία της αντίδρασης.

Σε Falcon τοποθετούμε 10 ml ακετονιτρίλιο (ACN).Προσθέτουμε 200 mg οξικής κυτταρίνης(cellulose acetate) και αναδεύουμε σε vortex,μεχρι να διαλυθεί τελείως (**διάλυμα Α**)



Ei)

1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα erpendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.

Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 30 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

Eii)

1)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl προπιονικού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

2)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

3)

Σε erpendorf τοποθετούμε 1000 μl από **διάλυμα Α** και προσθέτουμε 500 μl δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα και 10 U ακινητοποιημένου ενζύμου *Candida Antarctica*.

Στεγανοποιούμε τα erpendorf όλων των αντιδράσεων με ταινία parafilm.

Τις αντιδράσεις τις τοποθετούμε σε αναδευτήρα στους 50 °C με ανάδευση στα 1000rpm,για 48 ώρες.

#### **4.Καθαρισμός και απομόνωση του προϊόντος των αντιδράσεων**

Με σκοπό να απομακρύνουμε το λιπαρό υπόστρωμα από τα δείγματά μας και να παραλάβουμε καθαρή την κυτταρίνη, κάναμε εκπλύσεις με διάφορους διαλύτες. Η διαδικασία των εκπλύσεων για όλες τις αντιδράσεις περιλάμβανε τα εξής βήματα:

Τοποθέτηση των δειγμάτων σε μεγάλα falkon (50 ml), προσθήκη νερού (5 ml) ώστε να γίνει η καταβύθιση της κυτταρίνης.

Φυγοκέντρηση για 20 min σε 3500 rpm

Απομάκρυνση του νερού και των λιπαρών με διήθηση υπό κενό

Παραλαβή του στερεού και προσθήκη 3 ml μεθανόλης.

Φυγοκέντρηση για 10 min σε 3500 rpm

Απόχυση της μεθανόλης

Παραλαβή του στερεού και προσθήκη 3 ml μεθανόλης.

Φυγοκέντρηση για 10 min σε 3500 rpm

Απόχυση της μεθανόλης

Παραλαβή του στερεού και προσθήκη 3 ml εξανίου

Φυγοκέντρηση για 10 min σε 3500 rpm

Απόχυση του εξανίου

Τοποθέτηση των Falcon με το στερεό σε φούρνο 40 °C για 24 ώρες

#### **5.Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση με FT-IR**

Αφού ολοκληρωθεί η ξήρανση, τα στερεά δείγματα αναμιγνύονται με KBr (10mg δείγματος + 100mg KBr).

Γίνεται κονιορτοποίηση και μορφοποίηση σε παστίλιες με τη βοήθεια μηχανικής πρέσας.

Η κάθε παστίλια τοποθετείται στον ειδικό δειγματοφορέα του FT-IR (φασματομετρία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier).

Τις νέες εστερομάδες που δημιουργούνται μπορούμε να τις παρατηρήσουμε από την οθόνη του υπολογιστή ο οποίος είναι συνδεδεμένος με το φασματόμετρο.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

## Αποτελέσματα

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων γίνεται ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των προϊόντων με FT-IR. Η κορυφή των εστέρων στο φάσμα που λαμβάνουμε βρίσκεται στο διάστημα από τα  $1720\text{ cm}^{-1}$  στα  $1750\text{ cm}^{-1}$ . Ωστόσο επειδή η οξική κυτταρίνη περιέχει ήδη εστέρα, τον οξικό, η κορυφή που εμφανίζεται αντιστοιχεί και σε μικτό εστέρα, στον οξικό και στον καινούριο. Για την ανάλυση της κορυφής αυτής στις δύο επιμέρους που αντιστοιχούν στους διαφορετικούς εστέρες χρησιμοποιούμε τη μέθοδο deconvolution.

Επίσης χρειάζεται να γνωρίζουμε τα εξής:

- Επί τοις εκατό(%) συνολικό ποσοστό εστέρα: το ποσοστό των ολικών υδροξυλίων (OH) του αρχικού μορίου της κυτταρίνης που είναι εστεροποιημένα.
- Επί τοις εκατό (%) ποσοστό του επιμέρους εστέρα (π.χ. οξικός, λαυρικός βινυλεστέρας...) είναι το ποσοστό του συνολικού εστέρα που αποτελείται από αυτόν.

Σύμφωνα και με τα παραπάνω, προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα των αντιδράσεων που αναφέρθηκαν.

Ποσότητα Προπιονικού βινυλεστέρα(μl)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Προπιονικός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
100	42	62	38
300	49	65	35
500	52	67	33

Πίνακας 1: Αποτελέσματα αντιδράσεων A1,A2,A3

Ποσότητα δωδεκανοϊκού βινυλεστέρα(μl)	%εστεροποίηση	%ποσοστό δωδεκανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
100	47	72	28
300	51	75	25
500	61	79	21

Πίνακας 2: Αποτελέσματα αντιδράσεων A4,A5,A6

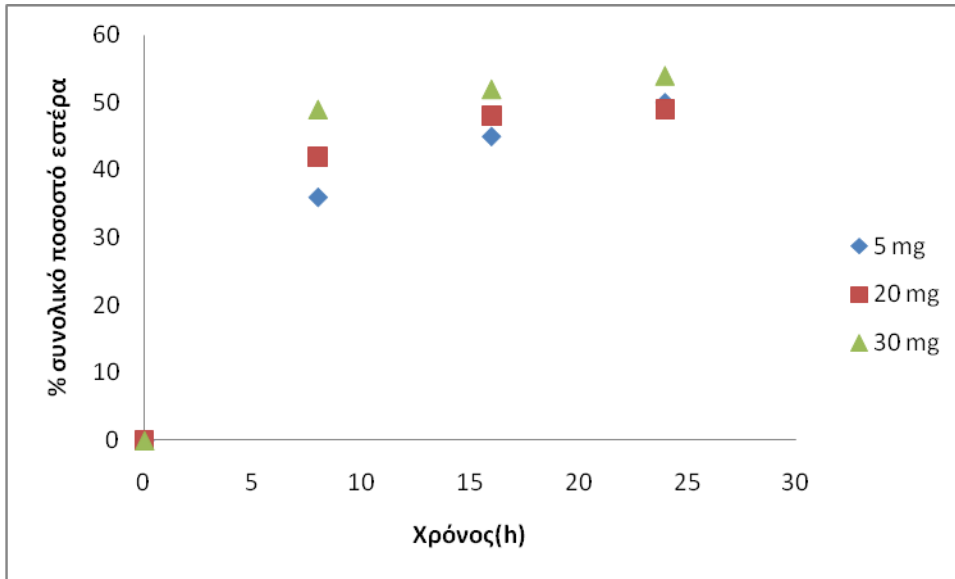
Ποσότητα Δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα(μl)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δεκαεξανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
100	40	10	90
300	40	12	88
500	41	13	87

Πίνακας 3:Αποτελέσματα αντιδράσεων A7,A8,A9

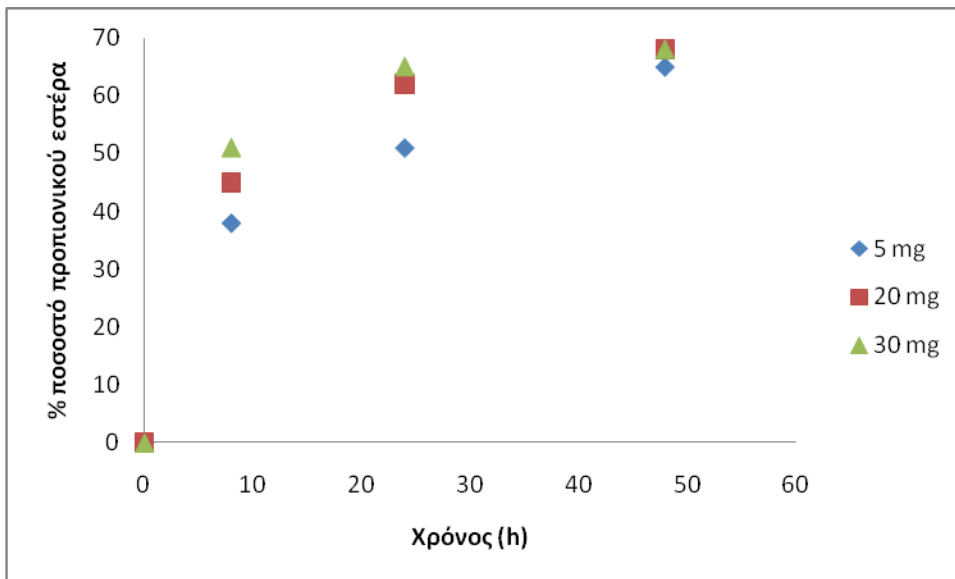
Ποσότητα <i>Candida Antarctica</i> (U)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Προπιονικός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
5	50	65	35
20	49	68	32
30	54	68	32

Πίνακας 4:Αποτελέσματα αντιδράσεων B1,B2,B3

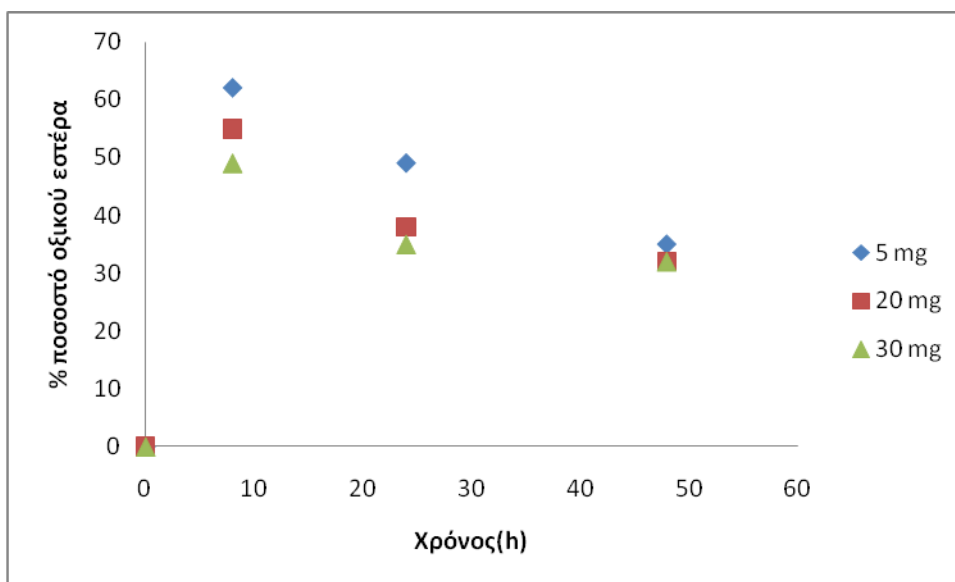
Οι δειγματοληψίες των αντιδράσεων αυτών έγιναν σε χρόνους 0 , 8 , 24 , 48 ωρών και προέκυψαν τα διαγράμματα:



Σχήμα 12: % Συνολικό ποσοστό εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B1,B2,B3



Σχήμα 13: % ποσοστό προπιονικού εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B1,B2,B3



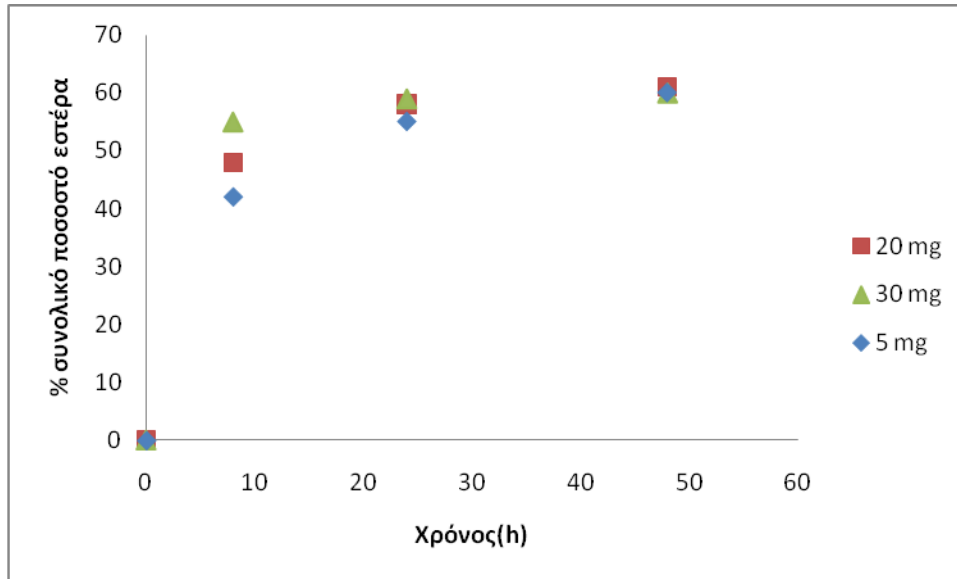
Σχήμα 14: % Ποσοστό οξικού εστέρα- χρόνος αντιδράσεων B1,B2,B3

Ποσότητα <i>Candida Antarctica</i> (U)	%εστεροποίηση	%ποσοστό δωδεκανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
5	60	78	22
20	61	79	21
30	60	81	19

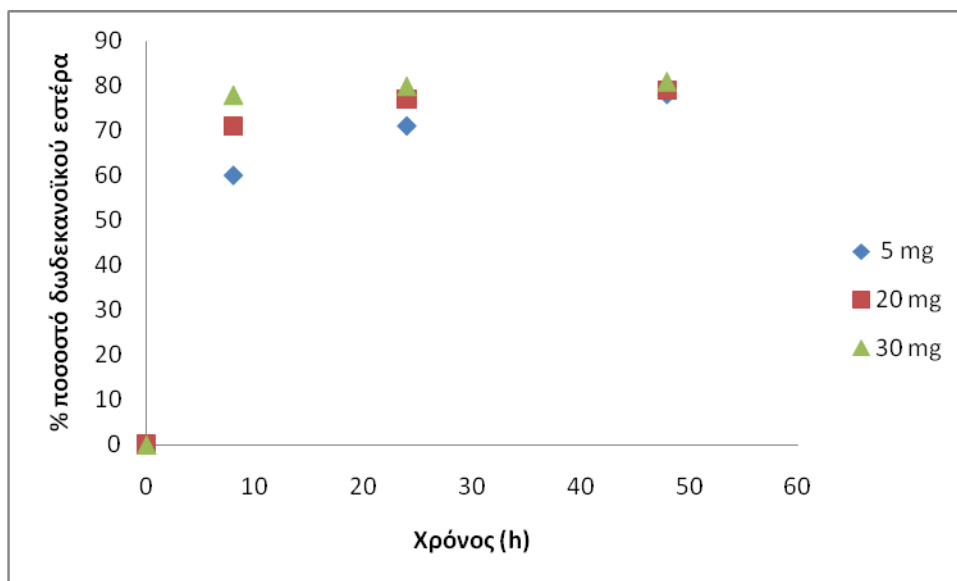
Πίνακας 5: Αποτελέσματα αντιδράσεων B4,B5,B6



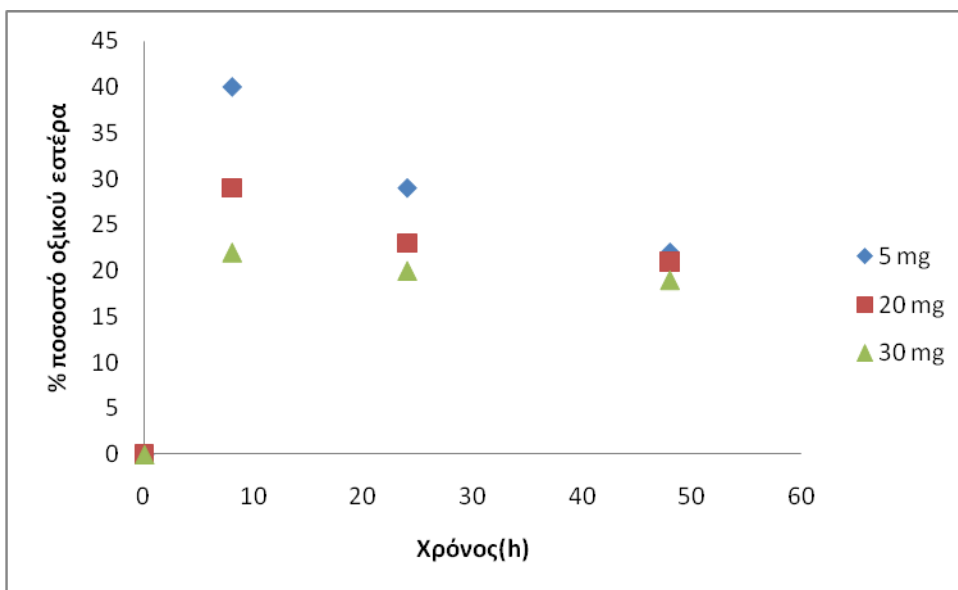
Τα διαγράμματα που προκύπτουν για τις 0, 8, 24, 48 ώρες είναι:



Σχήμα 15: % Συνολικό ποσοστό εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B4,B5,B6



Σχήμα 16: % Ποσοστό λαυρικού εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B4,B5,B6

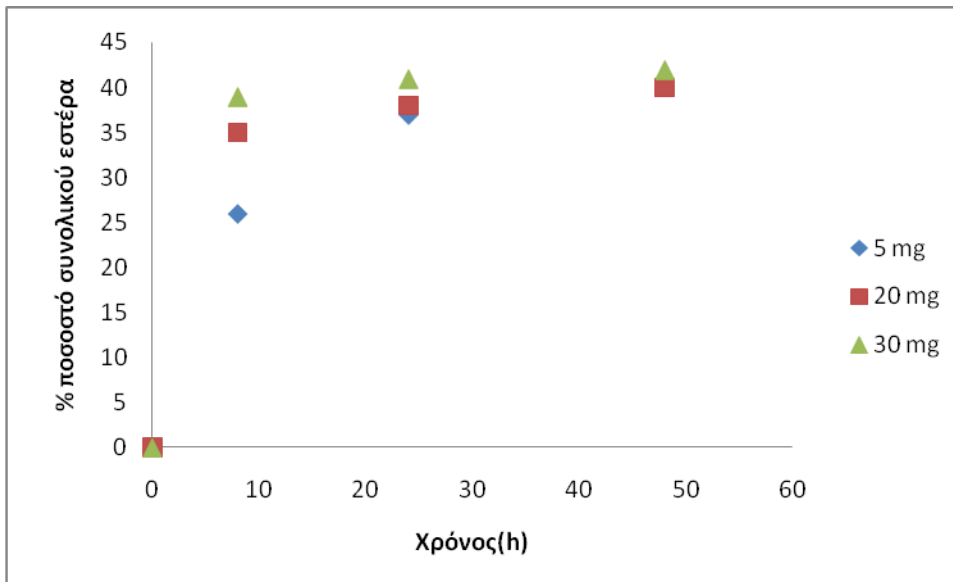


Σχήμα 17: % Ποσοστό οξικού εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B4,B5,B6

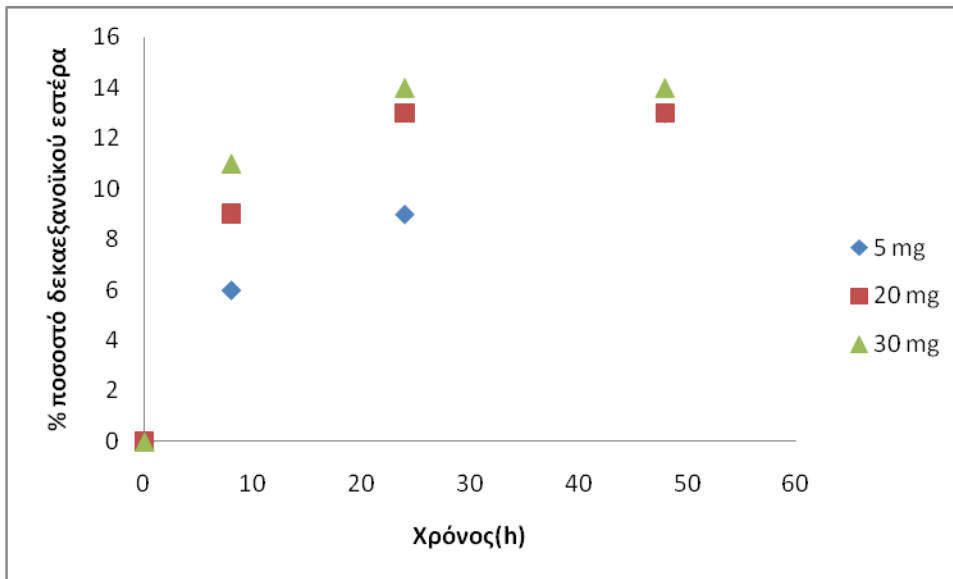
Ποσότητα <i>Candida Antarctica</i> (U)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δεκαεξανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
5	41	13	87
20	40	13	87
30	42	14	86

Πίνακας 6: Αποτελέσματα αντιδράσεων B7,B8,B9

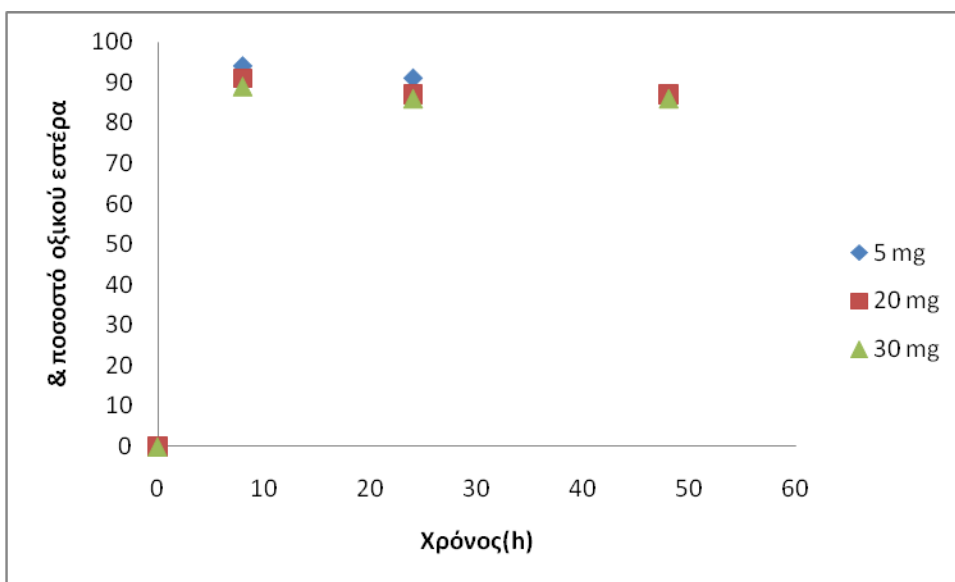
Τα διαγράμματα που προκύπτουν για τις 0, 8, 24, 48 ώρες είναι:



Σχήμα 18: % Συνολικό ποσοστό εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B7,B8,B9



Σχήμα 19: % Ποσοστό δεκαεξανοϊκού εστέρα-χρόνος αντιδράσεων B7,B8,B9



Σχήμα 20: % Ποσοστό οξικού εστέρα- χρόνος αντιδράσεων B7,B8,B9

Συγκέντρωση Οξικής κυτταρίνης (mg)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Προπιονικός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
50	61	81	19
150	54	70	30
300	42	49	51

Πίνακας 7: Αποτελέσματα αντιδράσεων 1,2,3 κατηγορίας Γ-i

Συγκέντρωση Οξικής κυτταρίνης (mg)	%εστεροποίηση	%ποσοστό δωδεκανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
50	67	85	15
150	64	78	22
300	42	70	30

Πίνακας 8: Αποτελέσματα αντιδράσεων 1,2,3 κατηγορίας Γ ii

Συγκέντρωση Οξικής κυτταρίνης (mg)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δεκανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
50	52	17	83
150	48	15	85
300	40	9	91

Πίνακας 9 : Αποτελέσματα αντιδράσεων 1,2,3, κατηγορίας Γ iii

Είδος ενζύμου	%εστεροποίηση	%ποσοστό Προπιονικός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
<i>Candida Cylindracea</i>	41	60	40
<i>Candida Antarctica</i>	52	67	33

Πίνακας 10:αποτελέσματα αντίδρασης Δ-1

Είδος ενζύμου	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δωδεκανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
<i>Candida Cylindracea</i>	40	77	23
<i>Candida Antarctica</i>	61	79	21

Πίνακας 11:αποτελέσματα αντίδρασης Δ-2.

Είδος ενζύμου	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δεκαεξανοϊκός εστέρας	%ποσοστό οξικός εστέρας
<i>Candida Cylindracea</i>	40	12	88
<i>Candida Antarctica</i>	41	13	87

Πίνακας 12:αποτελέσματα αντίδρασης Δ-3.

Θερμοκρασία (°C)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Προπιονικός εστέρας	% ποσοστό οξικός εστέρας
30	41	51	49
40	52	67	33
50	55	78	22

Πίνακας 13:αποτελέσματα αντιδράσεων 1-Ei & 1-Eii

Θερμοκρασία (°C)	%εστεροποίηση	%ποσοστό δωδεκανοϊκός εστέρας	% ποσοστό οξικός εστέρας
30	44	61	39
40	61	79	21
50	68	81	19

Πίνακας 14:αποτελέσματα αντιδράσεων 2-Ei & 2-Eii

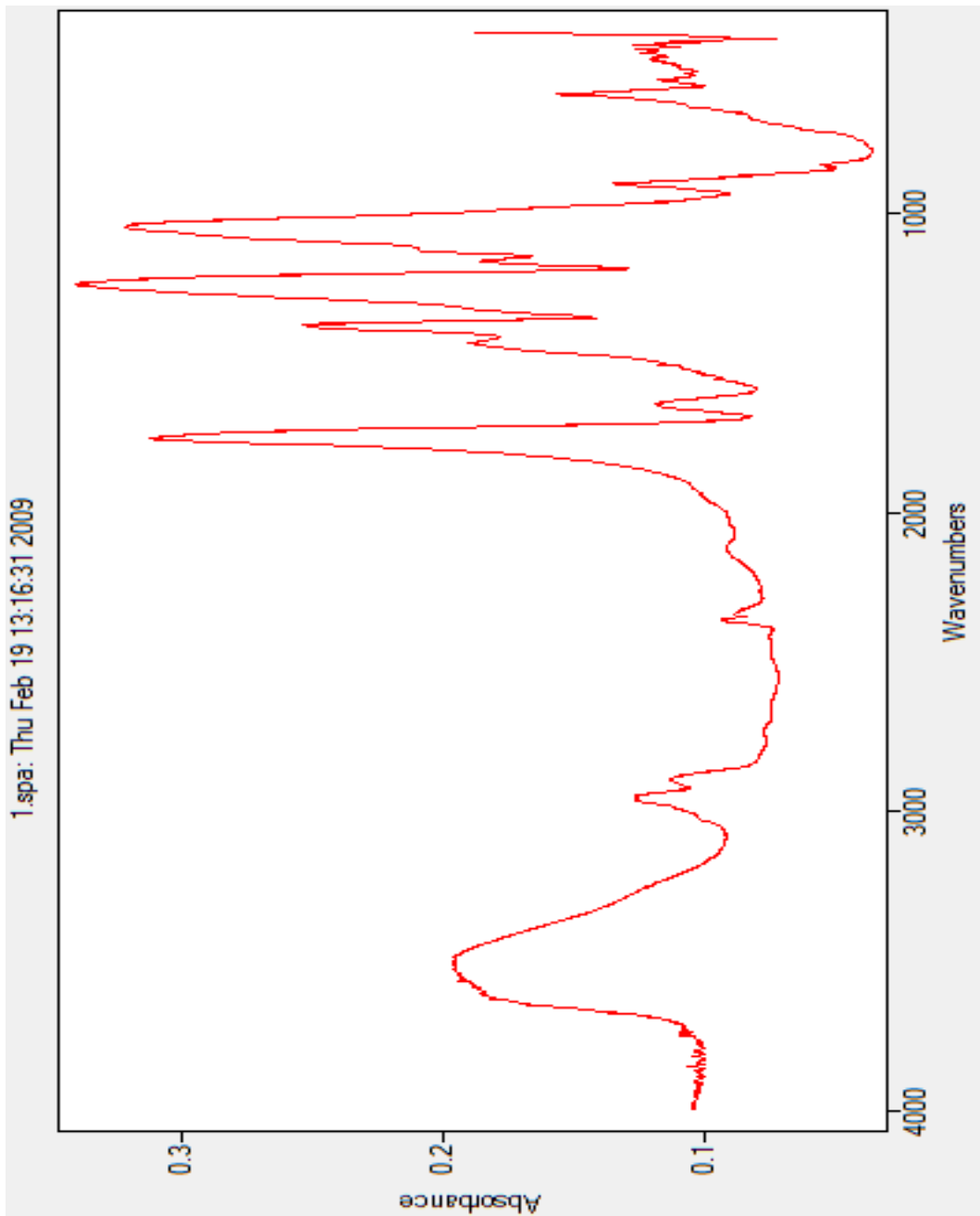
Θερμοκρασία (°C)	%εστεροποίηση	%ποσοστό Δεκαεξανοϊκός εστέρας	% ποσοστό οξικός εστέρας
30	40	8	92
40	41	13	87
50	45	19	81

Πίνακας 15:αποτελέσματα αντιδράσεων 3-Ei & 3-Eii

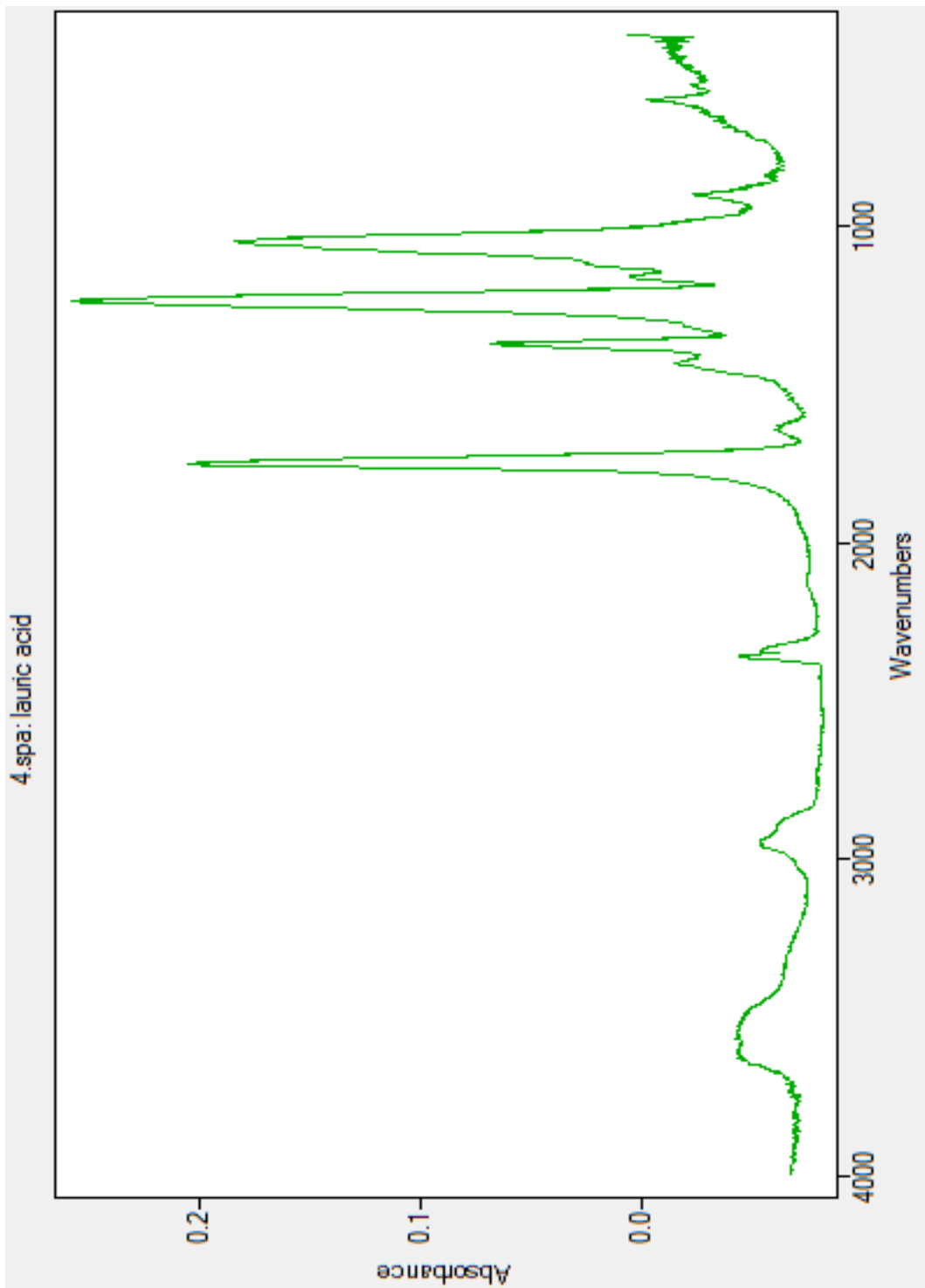


## **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑ-ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ**

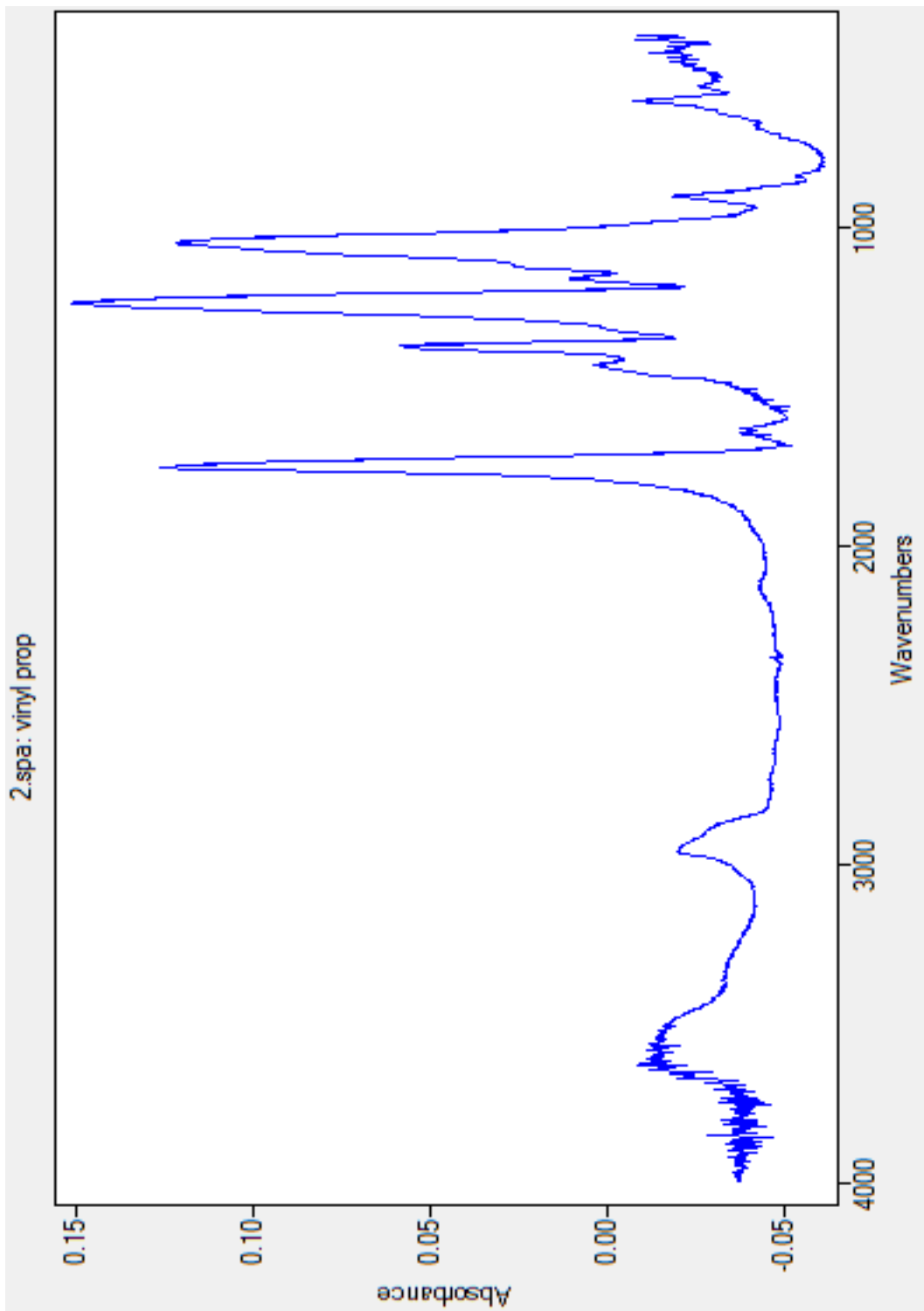
Τα αποτελέσματα της ανάλυσης με FT-IR χρησιμοποιήθηκαν για την παρακολούθηση της εξέλιξης μετεστεροποίησης της οξικής κυτταρίνης. Στη συνέχεια ακολουθούν τρία τυπικά φάσματα FT-IR στα οποία φαίνονται οι κορυφές των μεικτών εστέρων οξικής-προπιονικής, οξικής-δωδεκανοϊκής, οξικής-δεκαεξανοϊκής κυτταρίνης αντίστοιχα.



Σχήμα 21:φάσμα FT-IR των μεικτών εστέρων του οξικού και του προπιονικού οξέος.Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στα  $1738\text{ cm}^{-1}$



Σχήμα 22:φάσμα FT-IR των μεικτών εστέρων του οξικού και του δωδεκανοϊκού οξέος.Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στα  $1755\text{ cm}^{-1}$



Σχήμα 23:φάσμα FT-IR των μεικτών εστέρων του οξικού και του δεκαεξανοϊκού οξέος.Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στα  $1764\text{ cm}^{-1}$

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα όλων των αντιδράσεων και συγκεκριμένα το συνολικό ποσοστό εστέρα παρατηρούμε ότι σε όλες επετεύχθη ενζυμική εστεροποίηση/μετεστεροποίηση της οξικής κυτταρίνης σε περιβάλλον οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο). Οι αντιδράσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές περιπτώσεις μη συμβατικής βιοκατάλυσης και καταλύονται από την ακινητοποιημένη λιπάση *Candida Antarctica* και την ελεύθερη λιπάση *Candida Cylindracea*.

Ειδικότερα, παρατηρήσαμε ότι η απόδοση της εστεροποίησης μεγιστοποιείται με λιπαρό υπόστρωμα το δωδεκανοϊκό βινυλεστέρα(61%). Η απόδοση αυτή είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του προπιονικού(52%) και με τη σειρά της μεγαλύτερη από του δεκαεξανοϊκού(41%).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Deconvolution για τις αντιδράσεις μετεστεροποίησης και εξετάζοντας το κάθε είδος βινυλεστέρα ξεχωριστά, ο δωδεκανοϊκός βινυλεστέρας έχει μεγαλύτερο σχετικό ποσοτό εστεροποίησης(79%) ως προς τον οξικό εστέρα(21%). Όμοια για τον προπιονικό βινυλεστέρα, το σχετικό ποσοστό μετεστεροποίησης(67%) είναι μεγαλύτερο σε σχέση με τον οξικό εστέρα(33%). Στην περίπτωση του δεκαεξανοϊκού βινυλεστέρα όμως, το σχετικό ποσοστό του(13%) είναι μεγαλύτερο από αυτό του οξικού εστέρα(87%).

Με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις φαίνεται πως το ένζυμο *Candida Antarctica* ευνοεί τη μετεστεροποίηση με το προπιονικό οξύ και το λαυρικό οξύ σε σχέση με το οξικό. Αντίθετα δεν ευνοεί τη μετεστεροποίηση σε την περίπτωση του δεκαεξανοϊκού οξέος. Αυτό οφείλεται στη μειωμένη διαλυτότητα του τελευταίου στο ακετονιτρίλιο.

Δοκιμάζοντας διαφορετικές ποσότητες βινυλεστέρων(100 μl, 300 μl, 500 μl) παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της ποσότητας, αυξάνεται το ποσοστό εστεροποίησης καθώς και το σχετικό ποσοστό του καινούργιου εστέρα σε σχέση με τον αρχικό(οξικός). Η παρατήρηση αυτή ισχύει μόνο για τον προπιονικό και το δωδεκανοϊκό βινυλεστέρα. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται ο δεκαεξανοϊκός βινυλεστέρας δεν παρατηρείται απευθείας μετασχηματισμός καινούργιου εστέρα αλλά μόνο μετεστεροποίηση, η οποία με τη σειρά της δεν έχει μεγάλη έκταση(~10%).

Όσον αφορά στη συγκέντρωση του ενζύμου στο αντιδρών σύστημα, παρατηρήσαμε ότι αυξανόμενης αυτής και για τους τρεις βινυλεστέρες, αυξάνεται ανάλογα και η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης μετεστεροποίησης.

Αυξομειώνοντας την ποσότητα της οξικής κυτταρίνης καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η αύξησή της οδηγεί στη μείωση του ποσοστού εστεροποίησης. Αυτό συμβαίνει διότι με αύξηση της συγκέντρωσης του βιοπολυμερούς, αυξάνεται το ιξώδες του αντιδρώντος μίγματος και κατά συνέπεια αυξάνεται ο περιορισμός στη διάχυση των υποστρωμάτων προς το ένζυμο.

Για τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν (30 °C, 40 °C, 50 °C), διαπιστώθηκε ότι με αύξησή της, αυξάνεται αναλογικά και το ποσοστό εστεροποίησης-μετεστεροποίησης της αντίδρασης. Σε θερμοκρασίες άνω των 60 °C, δεν αναμένεται κάτι αντίστοιχο, καθώς εμφανίζονται φαινόμενα μετουσίωσης.

Τέλος, στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως βιοκαταλύτης η ελεύθερη *Candida cylindracea*, δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καθόλου απευθείας σχηματισμός εστέρα παρά μόνο μετεστεροποίηση. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην εκλεκτικότητα του ενζύμου αλλά κυρίως στη μειωμένη σταθερότητά του σε μη συμβατικά συστήματα σε σχέση με την ακινητοποιημένη *Candida Antarctica*, η οποία επέφερε σημαντικά αποτελέσματα.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



1. Y. Nishiyama, P. Langan, H. Chanzy (2002). "Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I $\beta$  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.
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*. Retrieved January 11, 2008, from Encyclopædia Britannica Online.
5. Young, Raymond (1986). *Cellulose structure modification and hydrolysis*. New York: Wiley. ISBN 0471827614.
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, 9780824782108.
8. Holt-Gimenez, Eric 2007. Biofuels: Myths of the Agrofuels Transition. *Backgrounder*. Institute for Food and Development Policy, Oakland, CA. 13:2
9. *Cooking cellulose in hot and compressed water* Shigeru Deguchi, Kaoru Tsujii and Koki Horikoshi *Chem. Commun.*, **2006**, 3293 - 3295, doi:[10.1039/b605812d](https://doi.org/10.1039/b605812d)

10. Structure and morphology of cellulose by Serge Pérez and William Mackie, CERMAV-CNRS, 2001. Chapter IV.
11. Stenius, Per (2000) "1" *Forest Products Chemistry* Papermaking Science and Technology 3 Finland: Fapet OY p. 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](http://www.interiordezine.com/index.cfm/Interior_Design_Finishes/Fibres_artificial)
17. <sup>^</sup> [a b c d e f](#) 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. *Encycl. 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. Deveer A.M.TH. 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  $\alpha/\beta$  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  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  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. Klivanov, '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', <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/catalysis/olcatorgsol>  
v
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