



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ ΣΕ ΜΗ  
ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ  
ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕ ΣΤΟΧΟ ΤΗΝ ΑΝΑΒΑΘΜΙΣΗ  
ΤΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΟΥΣ**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ Α. ΤΖΙΑΛΛΑ**  
**ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009**



*Η παρούσα  
διδακτορική διατριβή  
αφιερώνεται  
στην οικογένεια μου  
και στον Γιώργο*



## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

|                                                 |                       |
|-------------------------------------------------|-----------------------|
| κ. Χαράλαμπος Σταμάτης<br>(Επιβλέπων Καθηγητής) | Αναπληρωτής Καθηγητής |
| κ. Φραγκίσκος Κολίσης                           | Καθηγητής             |
| κ. Δημήτριος Γουρνής                            | Αναπληρωτής Καθηγητής |

## **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

|                          |                         |
|--------------------------|-------------------------|
| κ. Χαράλαμπος Σταμάτης   | Αναπληρωτής Καθηγητής   |
| κ. Φραγκίσκος Κολίσης    | Καθηγητής               |
| κ. Δημήτριος Γουρνής     | Αναπληρωτής Καθηγητής   |
| κ. Γεώργιος Πηλίδης      | Καθηγητής               |
| κ. Θεώνη Τράγκα          | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια |
| κ. Άννα- Ειρήνη Κούκκου  | Αναπληρώτρια Καθηγήτρια |
| κ. Γεώργιος Παπαδόπουλος | Καθηγητής               |



---

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

---

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ακολούθησε τη φιλοσοφία της δια βίου παιδείας και ήταν αποκύημα μακράς ερευνητικής προσπάθειας και προβληματισμού. Πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ) 2003 (03-ED167), το οποίο συγχρηματοδοτείται κατά 75% από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) και κατά 25% από το Ελληνικό Δημόσιο στο πλαίσιο του Γ΄ Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης και εντάσσεται στο επιχειρησιακό πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα». Πριν την παρουσίαση του συνολικού έργου που διεξήχθη στα πλαίσια της παρούσης διδακτορικής διατριβής, κρίθηκε απαραίτητη η αναφορά στο πρόσωπο ορισμένων ανθρώπων, οι οποίοι συνεργάστηκαν και πρόσφεραν τη βοήθειά τους υποστηρίζοντας τη διεξαγωγή της έρευνας με διάφορους τρόπους. Η συμβολή τους ήταν σημαντική καθ'όλη τη διάρκεια της δύσκολης αυτής προσπάθειας, γι αυτό και είναι υποχρέωσή μου να τους απευθύνω τις πιο θερμές ευχαριστίες.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταμάτη Χαράλαμπο, όχι απλώς για την ευκαιρία εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής, αλλά κυρίως γιατί με τον τρόπο του με οδήγησε σε ένα συναρπαστικό ερευνητικό χώρο, όπως είναι αυτός της 'Εφαρμοσμένης Βιοκατάλυσης'. Η επιστημονική του καθοδήγηση και η ηθική και υλική βοήθεια που μου παρείχε, αποτέλεσαν σημαντικό οδηγό στην επίτευξη ενός δύσκολου στόχου, όπως η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου αλλά και για την αντιμετώπιση των πάσης φύσεως ζητημάτων που ανέκυψαν στις διάφορες φάσεις της παρούσας διατριβής. Θεωρώ ότι στο διάστημα αυτό αναπτύχθηκε μεταξύ μας ένας ιδιαίτερος κώδικας επικοινωνίας και συνεργασίας από τον οποίο έχω αποκομίσει σημαντικά εφόδια.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω το μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γουρνή Δημήτριο (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) για την ουσιαστική συνεργασία και για το χρόνο που πάντα έβρισκε να μου αφιερώσει, παρά το ιδιαίτερα επιφορτισμένο πρόγραμμά του. Η φιλοξενία του στο εργαστήριο «Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών» ήταν άψογη. Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στο τρίτο μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής Καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση (Εθνικό Μετσόβειο

Πολυτεχνείο) για την συνεργασία του. Επίσης ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Καλογερή Εμμανουήλ για τη συνεργασία του. Οι επιστημονικές συμβουλές του, η καθοδήγηση του κατά την διεκπεραίωση πειραμάτων, η προθυμία του να βοηθήσει σε οποιαδήποτε πρόβλημα προέκυπτε, συνέβαλλαν ουσιαστικά στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Ali A. Taha για την βοήθεια του τόσο κατά την διεκπεραίωση των πειραμάτων όσο και για τις συζητήσεις που είχαμε γύρω από τις αξίες της ζωής. Όλες αυτές οι συζητήσεις με έκαναν να εκτιμήσω τα μικρά πράγματα της ζωής και να δώσω σε όλα τα προβλήματα που προέκυπταν τις πραγματικές τους διαστάσεις. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα και του εύχομαι ολόψυχα καλή τύχη.

Ευχαριστώ τα μέλη του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας τον Δρ. Κωνσταντίνο Κονιδάρη για την ουσιαστική του βοήθεια κατά την διεκπεραίωση πειραμάτων και τις πολύτιμες συμβουλές του, την Δρ. Αγγελική Πολύδερα και την Δρ. Ανθή Χατζηκυριακίδου για την υπέροχη συνεργασία και τις δημιουργικές ώρες που περάσαμε μαζί. Επίσης ευχαριστώ τους υποψήφιους Διδάκτορες του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Ιωάννη Παυλίδη, Μαρία Κατσούρα, για την συνεργασία και την βοήθεια τους, καθώς και τον υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών Αποστόλη Ενωτιάδη, για την βοήθεια του κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο «Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών».

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. κ. Σαννάκη Ιωάννη (Ερευνητή του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος) για την παραχώρηση χρήσης του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) από το Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, καθώς και για τις πολύτιμες παρατηρήσεις του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διατριβής. Θερμές ευχαριστίες ανήκουν στο Δρ. Γιαννόπουλο Θωμά (μέλος ΕΤΕΠ), στο Δρ. Ντάντο Άγγελο, στο Δρ. Αλίμπερτη Δημήτριο και στον υποψήφιο Διδάκτορα Ιωάννη Ζαρκάδα για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια συγγραφής της παρούσας διατριβής. Επίσης ευχαριστώ το Δίκτυο Εργαστηρίων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παροχή του οργάνου περίθλασης ακτίνων – Χ και τον κ. Ν. Κουρκουμέλη για τις μετρήσεις που έκανε στο παραπάνω όργανο. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Καθηγήτρια Petra Rudolf για την παροχή του οργάνου της φωτοηλεκτρονικής φασματοσκοπίας ακτίνων-Χ (XPS) στο Πανεπιστήμιο του Γκρόνινγκεν στην Ολλανδίας, καθώς και την Δρ. Marcella Felicissimo για την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ακόμη ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Πομώνη για την παροχή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) και τον Δρ.

Αλέξανδρο Κατσουλίδη για τις μετρήσεις που έκανε στο παραπάνω όργανο. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Λουτράρη Ελένη (Νοσοκομείο Ευαγγελισμός, Κλινική Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθήνας) και την υποψήφια διδάκτορα της Ιατρικής Σχολής Αθηνών Σοφία Μαγκούτα για την άψογη συνεργασία τους.

Επίσης οφείλω να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στους φίλους μου Άννα και Βασίλη για τη συνεχή ενθάρρυνση που μου παρείχαν στη διεξαγωγή της ερευνητικής μου δραστηριότητας. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον σύντροφο μου Γιώργο για την ηθική υποστήριξη, την υπομονή του και την ενθάρρυνση που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια κατά τη διάρκεια δύσκολων στιγμών. Η βοήθεια του ήταν καθοριστικής σημασίας.

Στο σημείο αυτό νοιώθω ακόμη την ανάγκη να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τον πατέρα μου Αλέξανδρο και την μητέρα μου Βασιλική, για τα εφόδια που μου έχουν δώσει όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και τα αδέρφια μου, Χαράλαμπο και Σπυρίδων, για την αγάπη και την υποστήριξη τους. Η διακριτική τους υποστήριξη σε κάθε μου επιλογή και προσπάθεια αποτελεί τη σημαντικότερη βοήθεια για εμένα, που δίχως αυτή δεν θα ήταν εφικτή η ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ιωάννινα, Σεπτέμβριος 2009

Αικατερίνη Α. Τζιάλλα



---

## ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

---

**Τμήματα της παρούσης διατριβής αποτέλεσαν αντικείμενο δημοσιεύσεων στα κάτωθι:**

**α) Διεθνή επιστημονικά περιοδικά**

1. **A. A. Tzialla**, E. Kalogeris, D. Gournis, Y. Sanakis and H. Stamatis, (2008), Enhanced catalytic performance and stability of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in surfactant free ternary water-organic solvent systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 51(1-2):24-35.
2. E. Serefoglou, K. Litina, D. Gournis, E. Kalogeris, **A. A. Tzialla**, I.V. Pavlidis, H. Stamatis, E. Maccallini, M. Lubomska, P. Rudolf, (2008), Smectite clays as solid supports for immobilization of  $\beta$ -glucosidase: Synthesis, Characterization and Biochemical properties, *Chemistry of Materials*, 12:4106-4115.
3. **A. A. Tzialla**, A. A. Taha, E. Kalogeris and H. Stamatis, (2009), Improving the catalytic performance of fungal laccases in monoterpene-based reaction systems, *Biotechnology Letters*, 31(9):1451-1456.
4. **A. A. Tzialla**, E. Kalogeris, A. Enotiadis, A. A. Taha, D. Gournis and H. Stamatis. Effective immobilization of *C. antarctica* lipase B in organic-modified clays: Application for the epoxidation of terpenes, article in press, *Materials Science and Engineering B*.
5. **A. A. Tzialla**, I. V. Pavlidis, M. Felicissimo, P. Rudolf, D. Gournis and H. Stamatis. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of  $\alpha$ -pinene, article in press, *Bioresource Technology*.

**β) Κεφάλαια σε διεθνείς εκδόσεις**

1. **A. A. Tzialla**, A. Enotiadis, I. V. Pavlidis, D. Gournis and H. Stamatis. Immobilization of enzymes on nanostructured material. *Enzymatic Polymerizations*, Wiley publication. *Under preparation*.

**γ) Πρακτικά συνεδρίων**

1. **A. A. Tzialla**, E. Kalogeris, H. Stamatis. "Biocatalytic oxidations in surfactant free microemulsions: The case of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*." **58<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**, 9-11, Νοεμβρίου, 2006, Πάτρα, πρακτικά σελ. 223.
2. **A. A. Tzialla**, M. V. Roupaka, V. Manti, Ali A. Taha, C. Konidaris, E. Kalogeris, I. Sanakis, D. Gournis and H. Stamatis. "Enzymatic selective oxidations of bioactive

compounds in essential oils-based media.” **2<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο του Ελληνικού Φόρουμ Λιπιδίων : Λίπη, Έλαια, Λιπίδια: Παρόν και Μέλλον**, 7-8, Ιουνίου, 2007, Αθήνα, πρακτικά σελ. Π-24.

**3. A. A. Τζιάλλα**, Ε. Διακάκη, Α. Νικολάκη, Ε. Καλογερός, Ali. A. Taha, Δ. Γουρνής, Χ. Σταμάτης. “Υβριδικοί βιοκαταλύτες μέσω της ακινητοποίησης της λιπάσης Β από *Candida antarctica* σε φυλλόμορφους αργίλους”. **3<sup>ο</sup> Συμπόσιο Πορωδών Υλικών**, 1-2 Νοεμβρίου, 2007, Θεσσαλονίκη, πρακτικά σελ. 86-87.

**4. A. A. Tzialla**, E. Diakaki, A. Nikolaki, E. Kalogeris, D. Gournis, A. A. Taha and H. Stamatis. “Enhanced catalytic performance and stability of immobilized *C. antarctica* lipase B in synthetic nanoclays”. **59<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας**, 7-9, Δεκεμβρίου, 2007, Αθήνα, πρακτικά σελ 293.

**5. A.A. Tzialla**, I. Pavlidis, E. Kalogeris, A.A. Taha, D. Gournis, H. Stamatis. “Lipolytic enzymes with improved activity and stability upon immobilization on synthetic nanoclays”. **2<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Βιοκατάλυσης σε μη συμβατικά συστήματα**, 12-15 Ιουνίου, 2008, Μόσχα, Ρωσία, πρακτικά σελ. 50.

**6. A.A. Tzialla**, A.A. Taha, I.V. Pavlidis, E. Kalogeris, D. Gournis, H. Stamatis. “Biocatalytic preparation of biologically active derivatives from mastic oil using immobilized lipases in synthetic nanoclays”. **5<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο «Νανοεπιστήμες και Νανοτεχνολογίες»**, 14-16 Ιουλίου, 2008, Θεσσαλονίκη, πρακτικά σελ 164.

**7. A. A. Tzialla**, S. Magkouta, A. A. Taha, H. Loutrari, E. Kalogeris, D. Gournis, C. Roussos, F.N. Kolisis, H. Stamatis. “Biocatalytic preparation of mastic oil derivatives with anti-angiogenic properties using fungal laccases and lipases in low-water media.” **6<sup>th</sup> Euro Fed Lipid Congress**. 7-10, September, 2008, Athens, Book of abstract pp 493

**8. M.X. Κατσούρα**, Α.Κ. Πολύδερα, Δ. Κογιάννου, **A. A. Τζιάλλα**, Λ.Τσιρώνης, Α.Δ. Τσελέπης, Χ. Σταμάτης. “Χρήση των ιοντικών υγρών ως μέσα για την βιοκαταλυτική σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών με βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση” **6<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Ελευθέρων Ριζών και Οξειδωτικού Στρες**. 18-21 Σεπτεμβρίου 2008, Πράμαντα Ιωαννίνων, πρακτικά σελ 91.

**9. A. A. Tzialla**, A. Sofiadou, and H. Stamatis. “Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in green media” **3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο του Ελληνικού Φόρουμ Λιπιδίων: Σύγχρονες τάσεις στον τομέα των λιπιδίων**, 15-16, Ιουνίου, 2009, Αθήνα, πρακτικά σελ. Π-3.

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ - ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΙ

|                          |                                                          |                 |                                                        |
|--------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------|
| ABTS                     | 2,2-Δις αζινο-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) | MCD             | Μονοχλωροδιμεδόνη                                      |
| AOT                      | Δις-(2-αιθυλεξυλο) σουλφοηλεκτρικό νάτριο                | ORKUN           | Οργανόφιλος κουνίπια                                   |
| BcL                      | Λακκάση από <i>Botrytis cinerea</i>                      | ORLAP           | Οργανόφιλος λαπονίτης                                  |
| [bmim][BF <sub>4</sub> ] | 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο         | ORSWy-2         | Οργανόφιλος SWy-2                                      |
| CaLB                     | Λιπάση Β από <i>Candida antarctica</i>                   | pNP             | p-νιτροφαινόλη                                         |
| CPO                      | Χλωροϋπεροξειδάση από <i>Caldariomyces fumago</i>        | pNPG            | p-νιτροφαινυλογλυκοκυρανοζίδιο                         |
| $\Delta H_{cal}$         | Ενθαλπία                                                 | SDS             | Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου               |
| DCD                      | Διχλωροδιμεδόνη                                          | SEM             | Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης                        |
| DSC                      | Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης                          | SYR             | Συρινγκαλνταζίνη                                       |
| DTA                      | Διαφορική θερμική ανάλυση                                | SWy-2           | Μοντομοριλόνιτης                                       |
| EPR                      | Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός                  | <i>t</i> -BHP   | Τριτοταγές βουτυλο υπεροξείδιο του υδρογόνου           |
| FTIR                     | Φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου                             | $T_d$           | Θερμοκρασία μετουσίωσης                                |
| GC                       | Αέριος χρωματογράφος                                     | TEMPO           | Ρίζα του N-οξειδίου της 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνης |
| GC-MS                    | Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας   | TGA             | Θερμοβαρυτομετρική ανάλυση                             |
| HBT                      | Υδροξυβενζοτριαζόλη                                      | ThL             | Λακκάση από <i>Trametes hirsuta</i>                    |
| HPLC                     | Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης                         | TvL             | Λακκάση από <i>Trametes versicolor</i>                 |
| HPMC                     | Υδροξυ προπυλο μέθυλο κυτταρίνη                          | UHP             | Σύμπλοκο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ουρία           |
| $K_{cat}$                | Αριθμός μετατροπής του ενζύμου                           | $V_{max}$       | Μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης                        |
| $K_d$                    | Σταθερά απενεργοποίησης                                  | $V_{max}^{app}$ | Φαινομενική μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης            |
| $K_m$                    | Σταθερά Michaelis-Menten                                 | $w_o$           | Βαθμός ενυδάτωσης του συστήματος                       |
| $K_m^{app}$              | Φαινομενική σταθερά Michaelis-Menten                     | XPS             | Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X                |
| KUN                      | Κουνίπια                                                 | XRD             | Περίθλαση ακτίνων-X                                    |
| LAP                      | Λαπονίτης                                                |                 |                                                        |
| LMS                      | Σύστημα λακκάση-διαμεσολαβητή                            |                 |                                                        |



---

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

---

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Εισαγωγή.....                                                                            | 1         |
| <b>A. Θεωρητικό μέρος</b>                                                                |           |
| <b>1. Λευκή Βιοτεχνολογία.....</b>                                                       | <b>7</b>  |
| 1.1 Γενικά.....                                                                          | 7         |
| 1.2 Η εφαρμοσμένη βιοκατάλυση στη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων.....                    | 9         |
| 1.3 Βιομηχανικές εφαρμογές ενζύμων.....                                                  | 13        |
| <b>2. Μαστιγέλαιο .....</b>                                                              | <b>17</b> |
| 2.1 Μαστιγέλαιο.....                                                                     | 17        |
| 2.1.1 Γενικά.....                                                                        | 17        |
| 2.1.2 Χημική σύσταση μαστιγελαίου.....                                                   | 17        |
| 2.1.3 Ιδιότητες και χρήσεις μαστιγελαίου.....                                            | 20        |
| 2.2 Τερπένια.....                                                                        | 21        |
| 2.2.1 Μονοτερπένια .....                                                                 | 23        |
| 2.2.2 Εποξειδια μονοτερπενίων .....                                                      | 26        |
| 2.2.3 Βιολογική δράση μονοτερπενίων και οξυγονωμένων παραγώγων τους.....                 | 27        |
| <b>3. Εφαρμοσμένη Βιοκατάλυση σε μη Συμβατικά Μέσα.....</b>                              | <b>31</b> |
| 3.1 Γενικά.....                                                                          | 31        |
| 3.2. Ιστορική Αναδρομή.....                                                              | 31        |
| 3.3 Κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων.....                                             | 35        |
| 3.3.1 Οργανικοί Διαλύτες.....                                                            | 36        |
| 3.3.2 Υπερκρίσιμα Ρευστά.....                                                            | 38        |
| 3.3.3 Αέρια Μέσα.....                                                                    | 38        |
| 3.3.4 Ιοντικά Υγρά .....                                                                 | 38        |
| 3.3.5 Συστήματα δίχως διαλύτη.....                                                       | 40        |
| 3.3.6 Μικρογαλακτώματα.....                                                              | 41        |
| 3.3.6.1 Μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη παρουσία επιφανειοενεργών μορίων..... | 41        |
| 3.3.6.1.1 Μικρογαλακτώματα AOT/ ισοοκτανίου/ νερού.....                                  | 43        |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.6.1.2 Ένζυμα σε αντίστροφα μικκύλια .....                             | 46        |
| 3.3.6.3 Μικρογαλακτώματα απουσία επιφανειοενεργών μορίων.....             | 50        |
| <b>4. Οξειδοαναγωγικά και Υδρολυτικά Ένζυμα σε μη Συμβατικά Μέσα.....</b> | <b>53</b> |
| 4.1 Γενικά.....                                                           | 53        |
| 4.2 Υπεροξειδάσες.....                                                    | 53        |
| 4.2.1 Χλωροϋπεροξειδάση.....                                              | 56        |
| 4.2.1.1 Γενικά.....                                                       | 56        |
| 4.2.1.2 Δομή Χωροϋπεροξειδάσης .....                                      | 56        |
| 4.2.1.3 Οξειδωτική Αλογόνωση .....                                        | 59        |
| 4.2.1.4 Εφαρμογές χλωροϋπεροξειδάσης σε μη συμβατικά μέσα.....            | 60        |
| 4.3 Οξειδάσες .....                                                       | 62        |
| 4.3.1 Λακκάσες.....                                                       | 62        |
| 4.3.2 Δομή και ενεργό κέντρο λακκασών.....                                | 64        |
| 4.3.3 Βιολογικές λειτουργίες και βιομηχανικές εφαρμογές λακκασών.....     | 67        |
| 4.3.4 Το σύστημα λακκάση-διαμεσολαβητή (LMS) .....                        | 69        |
| 4.3.5 Λακκάση από <i>Trametes versicolor</i> .....                        | 72        |
| 4.3.6 Λακκάση από <i>Trametes hirsuta</i> .....                           | 74        |
| 4.3.7 Λακκάση από <i>Botrytis cinerea</i> .....                           | 76        |
| 4.4 Λιπάσες.....                                                          | 76        |
| 4.4.1 Δομή λιπασών .....                                                  | 79        |
| 4.4.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών.....                                 | 81        |
| 4.4.3 Αντιδράσεις λιπασών.....                                            | 82        |
| 4.4.4 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές λιπασών.....                            | 84        |
| 4.4.5 Εφαρμογή λιπασών στην χημειο-ενζυμική σύνθεση εποξειδίων.....       | 86        |
| 4.4.6 Λιπάση B από <i>Candida antarctica</i> .....                        | 88        |
| <b>5. Ακίνητοποίηση- Φυλλόμορφοι Άργιλοι.....</b>                         | <b>91</b> |
| 5.1 Γενικά.....                                                           | 91        |
| 5.2 Επίδραση ακίνητοποίησης στα καταλυτικά χαρακτηριστικά .....           | 92        |
| 5.3 Μέθοδοι ακίνητοποίησης .....                                          | 94        |
| 5.3.1 Προσρόφηση (adsorption) .....                                       | 95        |
| 5.3.2 Ενθυλάκωση (encapsulation) .....                                    | 97        |
| 5.3.3. Παγίδευση (entrapment) .....                                       | 98        |
| 5.3.4 Διασταυρούμενη ή διαμοριακή σύνδεση (cross-linking) .....           | 99        |
| 5.3.5 Ομοιοπολική σύνδεση (covalent bonding) .....                        | 99        |

|                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------|-----|
| 5.4 Φυλλόμορφοι άργιλοι.....                              | 102 |
| 5.4.1 Εισαγωγή.....                                       | 102 |
| 5.4.2 Σχηματισμός φυλλόμορφων αργίλων .....               | 102 |
| 5.4.3 Ισόμορφη αντικατάσταση.....                         | 103 |
| 5.4.4 Ικανότητα διόγκωσης των αργίλων.....                | 104 |
| 5.4.5 Υποστυλωμένοι άργιλοι.....                          | 105 |
| 5.4.6 Είδη υποστυλωτών.....                               | 105 |
| 5.4.7 Ακινητοποίηση ενζύμων σε φυλλόμορφους αργίλους..... | 107 |
| 5.5 Πηκτώματα Μικρογαλακτωμάτων.....                      | 112 |

## **B. Πειραματικό μέρος**

|                                                                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>                                                                                                               | <b>117</b> |
| 6.1 Υλικά.....                                                                                                                                 | 117        |
| 6.1.1 Ένζυμα.....                                                                                                                              | 117        |
| 6.1.2 Αντιδραστήρια.....                                                                                                                       | 118        |
| 6.1.2.1 Υποστρώματα.....                                                                                                                       | 118        |
| 6.1.2.2 Επιφανειοενεργές ουσίες.....                                                                                                           | 119        |
| 6.1.2.3 Φορείς ακινητοποίησης.....                                                                                                             | 119        |
| 6.1.2.4 Οργανικοί διαλύτες.....                                                                                                                | 120        |
| 6.1.2.5 Άλλα υλικά και αντιδραστήρια.....                                                                                                      | 120        |
| 6.2 Όργανα.....                                                                                                                                | 120        |
| 6.3 Μέθοδοι.....                                                                                                                               | 122        |
| 6.3.1 Παραγωγή λακασσών από τους μύκητες <i>Botrytis cinerea</i> και <i>Trametas hirsuta</i> .....                                             | 122        |
| 6.3.1.1 Προετοιμασία υλικού εμβολιασμού .....                                                                                                  | 122        |
| 6.3.1.2 Προετοιμασία θρεπτικού υλικού παραγωγής λακκάσης.....                                                                                  | 123        |
| 6.3.1.3 Ζύμωση .....                                                                                                                           | 123        |
| 6.3.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού πρωτεΐνης.....                                                                                                     | 124        |
| 6.3.2.1 Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο.....                                                                                                      | 124        |
| 6.3.2.2 Χρωματογραφία πηκτής ή μοριακής διήθησης.....                                                                                          | 124        |
| 6.3.2.3 Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.....                                                                                                   | 125        |
| 6.3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE).....                                                                | 125        |
| 6.3.2.5. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....                                                                                    | 127        |
| 6.3.3 Πρωτόκολλα καθαρισμού αργίλων / Οργανοτροποποίησης αργίλων / Ακινητοποίησης ενζύμων σε φυλλόμορφους αργίλους και σε οργανοπηκτώματα..... | 127        |
| 6.3.3.1 Πρωτόκολλο καθαρισμού αργίλων.....                                                                                                     | 127        |

|                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.3.3.2 Πρωτόκολλο οργανοτροποποίησης αργίλων.....                                                      | 128        |
| 6.3.3.3 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης λιπάσης Β από <i>Candida antarctica</i> .....                         | 129        |
| 6.3.3.4 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης β-γλυκοσιδάσης.....                                                   | 130        |
| 6.3.3.5 Ακινητοποίηση λακκάσης σε οργανοπηκτώματα.....                                                  | 130        |
| 6.3.4 Παρασκευή μέσων διεξαγωγής ενζυμικών αντιδράσεων.....                                             | 130        |
| 6.3.4.1 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο με επιφανειοενεργό.....                              | 130        |
| 6.3.4.2 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό .....                                         | 131        |
| 6.3.4.2.1 Μετρήσεις αγωγιμότητας σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.....                         | 132        |
| 6.3.4.3 Παρασκευή μονοφασικών συστημάτων με αναμίξιμους διαλύτες με το νερό.....                        | 133        |
| 6.3.5. Ενζυμικές αντιδράσεις .....                                                                      | 133        |
| 6.3.5.1 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηρότητας ενζύμων.....                                                | 133        |
| 6.3.5.1.1 Μέτρηση δραστηρότητας χλωροϋπεροξειδάσης.....                                                 | 133        |
| 6.3.5.1.2 Μέτρηση δραστηρότητας β-γλυκοσιδάσης.....                                                     | 135        |
| 6.3.5.1.3 Μέτρηση δραστηρότητας λακκασών .....                                                          | 136        |
| 6.3.5.1.4 Μέτρηση δραστηρότητας ακινητοποιημένης CaLB σε αργίλους (οργανικά τροποποιημένους ή μη) ..... | 139        |
| 6.3.5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού σταθερότητας των ενζύμων.....                                             | 140        |
| 6.3.5.2.1 Προσδιορισμός της σταθερότητας της χλωροϋπεροξειδάσης.....                                    | 140        |
| 6.3.5.2.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας των TvL, ThL, BcL .....                                        | 141        |
| 6.3.5.2.3 Προσδιορισμός της σταθερότητας ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB .....                            | 142        |
| 6.3.5.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων οξειδοαναγωγασών .....                                       | 143        |
| 6.3.5.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων χλωροϋπεροξειδάσης.....                                    | 143        |
| 6.3.5.3.2 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων των TvL, ThL, BcL.....                                     | 144        |
| 6.3.5.4 Αναλυτικές μέθοδοι.....                                                                         | 145        |
| 6.3.5.5 Τεχνικές χαρακτηρισμού της δομής των ενζύμων εγκλωβισμένα σε τριαδικά συστήματα....             | 146        |
| 6.3.5.5.1 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) .....                                                   | 146        |
| 6.3.5.5.2 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR) .....                                           | 148        |
| 6.3.5.6 Τεχνικές χαρακτηρισμού της δομής των υλικών.....                                                | 150        |
| 6.3.5.6.1 Περίθλαση ακτίνων-X (XRD).....                                                                | 151        |
| 6.3.5.6.2 Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS) .....                                           | 151        |
| 6.3.5.6.3 Φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR) .....                                                     | 153        |
| 6.3.5.6.4 Θερμική Ανάλυση (TGA/DTA) .....                                                               | 156        |
| 6.3.5.6.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM) .....                                                   | 157        |
| <b>7.Αποτελέσματα .....</b>                                                                             | <b>159</b> |
| 7.1 Παραγωγή λακκασών από τους μύκητες <i>Trametes hirsuta</i> και <i>Botrytis cinerea</i> .....        | 159        |

|                                                                                                                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.1.1 Επίδραση του θεραπευτικού υποστρώματος στην παραγωγή λακκασών.....                                                                                        | 159 |
| 7.1.2 Επίδραση του ενεργοποιητή στην παραγωγή λακκάσης.....                                                                                                     | 161 |
| 7.2 Καθαρισμός λακκασών από τους μύκητες <i>T. hirsuta</i> και <i>B. cinerea</i> .....                                                                          | 163 |
| 7.3 Βιοχημικές ιδιότητες παραγόμενων λακκασών.....                                                                                                              | 165 |
| 7.3.1 Προσδιορισμός βέλτιστου pH και θερμοκρασίας σε υδατικό διάλυμα.....                                                                                       | 165 |
| 7.3.2 Προσδιορισμός σταθερότητας σε υδατικό διάλυμα.....                                                                                                        | 167 |
| 7.4 Κατασκευή διαγραμμάτων φάσης τριαδικών συστημάτων χωρίς επιφανειοενεργό.....                                                                                | 168 |
| 7.5 Μελέτες δραστηριότητας οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.....                                                              | 173 |
| 7.5.1 Δραστηριότητα ενζύμων σε μικρογαλακτώματα.....                                                                                                            | 173 |
| 7.5.1.1 Αντίδραση χλωρίωσης του MCD που καταλύεται από την CPO σε τριαδικά συστήματα- Επίδραση οξειδωτικού φορέα.....                                           | 173 |
| 7.5.1.2 Αντίδραση εποξείδωσης του στυρενίου από την CPO σε τριαδικά συστήματα.....                                                                              | 177 |
| 7.5.1.3 Οξείδωση ABTS από τις TvL, ThL και BcL.....                                                                                                             | 180 |
| 7.5.1.4 Οξείδωση συρινγκαλνταζίνης από την TvL.....                                                                                                             | 184 |
| 7.5.2 Κινητικές μελέτες οξειδοαναγωγικών ενζύμων.....                                                                                                           | 185 |
| 7.5.2.1 Κινητικές μελέτες χλωροϋπεροξειδάσης σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα .....                                                                             | 185 |
| 7.5.2.2 Κινητικές μελέτες λακκασών σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα .....                                                                                       | 188 |
| 7.5.3 Σταθερότητα οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα.....                                                                                       | 190 |
| 7.5.3.1 Σταθερότητα CPO σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα.....                                                                                                   | 190 |
| 7.5.3.2 Σταθερότητα των TvL, ThL και BcL σε μη συμβατικά συστήματα.....                                                                                         | 194 |
| 7.5.4 Μελέτη της θερμοσταθερότητας των ενζύμων σε τριαδικά συστήματα με τη χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.....                                     | 198 |
| 7.5.4.1 Μελέτη θερμοσταθερότητας της CPO σε τριαδικά συστήματα.....                                                                                             | 198 |
| 7.5.4.2 Μελέτη θερμοσταθερότητας της TvL σε τριαδικά συστήματα.....                                                                                             | 200 |
| 7.5.5 Μελέτη του μικροπεριβάλλοντος της αίμης της CPO σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό με την τεχνική του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού..... | 202 |
| 7.5.6 Εφαρμογή οξειδοαναγωγικών ενζύμων στην οξείδωση τερπενίων.....                                                                                            | 204 |
| 7.5.6.1 Οξείδωση υδρόφοβων υποστρωμάτων από την CPO σε τριαδικά συστήματα.....                                                                                  | 205 |
| 7.5.6.2 Οξείδωση τερπενίων και μαστιχελαίου από τις TvL, ThL και BcL.....                                                                                       | 210 |
| 7.5.6.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του διαμεσολαβητή (HBT) .....                                                                                               | 213 |
| 7.5.6.2.2 Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών.....                                                                                                       | 215 |
| 7.6 Λακκάσες σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων .....                                                                                                         | 221 |
| 7.6.1 Αντίδραση οξείδωσης SYR από ακινητοποιημένη TvL σε HPMC.....                                                                                              | 217 |
| 7.6.2 Κινητικές μελέτες ακινητοποιημένης TvL σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC κατά την οξείδωση της SYR.....                      | 225 |

|                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.6.3 Σταθερότητα ακινητοποιημένης TvL σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.....                      | 228        |
| 7.6.4 Εφαρμογή ακινητοποιημένης TvL στην οξειδωση τερπενίων.....                                           | 230        |
| 7.6.4.1 Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών στην καταλυτική δράση της κινητοποιημένης λακκάσης..... | 233        |
| 7.7 Ακινητοποίηση λιπάσης B από <i>Candida antarctica</i> σε φυλλόμορφους αργίλους.....                    | 236        |
| 7.7.1 Δομικός χαρακτηρισμός βιοκαταλυτών.....                                                              | 239        |
| 7.7.1.1 Χαρακτηρισμός με περίθλαση ακτίνων-X (XRD) .....                                                   | 240        |
| 7.7.1.2 Χαρακτηρισμός με φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS) .....                               | 243        |
| 7.7.1.3 Χαρακτηρισμός με θερμική ανάλυση (TGA/DTA) .....                                                   | 247        |
| 7.7.1.4 Χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR) .....                                         | 250        |
| 7.7.1.5 Χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) .....                                       | 254        |
| 7.7.2 Καταλυτικά χαρακτηριστικά δραστηριότητα ακινητοποιημένης CaLB.....                                   | 255        |
| 7.7.2.1 Δραστηριότητα ακινητοποιημένης CaLB .....                                                          | 255        |
| 7.7.2.2 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη.....                                                      | 256        |
| 7.7.2.3 Μελέτη θερμοσταθερότητας τη ακινητοποιημένης CaLB.....                                             | 258        |
| 7.7.3 Χημειοενζυμική εποξείδωση τερπενίων και μαστιγελαίου.....                                            | 259        |
| 7.7.3.1 Επίδραση της φύσης και του ρυθμού προσθήκης του οξειδωτικού φορέα.....                             | 261        |
| 7.7.3.2 Επίδραση της συγκέντρωσης του UHP.....                                                             | 263        |
| 7.7.3.3 Επίδραση του φορέα ακινητοποίησης.....                                                             | 269        |
| 7.7.3.4 Επίδραση του ποσοστού φόρτωσης .....                                                               | 271        |
| 7.7.3.5 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη .....                                                     | 272        |
| 7.7.3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας.....                                                                     | 273        |
| 7.7.3.7 Επίδραση του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και του UHP στη σταθερότητα της λιπάσης.....            | 274        |
| 7.7.3.8 Επαναλαμβανόμενη χρήση ακινητοποιημένης λιπάσης.....                                               | 277        |
| 7.7.3.9 Τροποποίηση μαστιγελαίου.....                                                                      | 279        |
| <b>8. Συμπεράσματα .....</b>                                                                               | <b>285</b> |
| <b>9. Περίληψη .....</b>                                                                                   | <b>301</b> |
| Abstract.....                                                                                              | 305        |
| <b>10. Βιβλιογραφία.....</b>                                                                               | <b>307</b> |
| <b>11. Παράρτημα.....</b>                                                                                  | <b>351</b> |

---

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Κυρίαρχη θέση τόσο σε επίπεδο βασικής διεπιστημονικής έρευνας όσο και σε επίπεδο βιομηχανικών εφαρμογών κατέχει σήμερα η «λευκή» βιοτεχνολογία, καθώς με τη χρήση βιολογικών συστημάτων ως καταλύτες είναι δυνατή η μετατροπή και γενικότερα η επίτευξη βιομετατροπών με ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον, απλών υποστρωμάτων σε προϊόντα υψηλής αξίας. Τα βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούνται στην «λευκή» βιοτεχνολογία, κυρίως βακτήρια, μύκητες και ζύμες πετυχαίνουν την ταχύτερη πραγματοποίηση των μεταβολικών τους αντιδράσεων χάρη στα ένζυμα που παράγουν. Η «λευκή» βιοτεχνολογία βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στις ιδιότητες των ενζύμων (αυξημένη δραστηριότητα, εκλεκτικότητα) με αποτέλεσμα να είναι ένα πολύτιμο εργαλείο για την πραγματοποίηση πολλών αντιδράσεων με έναν πιο φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο.

Η εφαρμογή της ενζυμικής κατάλυσης για τη μετατροπή απλών υποστρωμάτων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας καθώς επίσης και στην οργανική σύνθεση ήταν περιορισμένη λόγω της συμβατικής σκέψης, ότι η δράση των ενζύμων εκφράζεται αποκλειστικά σε υδατικό περιβάλλον. Η συμβατική αυτή σκέψη έχει πλέον καταρριφθεί μετά την πρωτοποριακή εργασία του Klibanov σχετικά με τις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων σε περιβάλλον με ελάχιστη ή καθόλου υδατική φάση [Klibanov, 1986, 1990, 1997, 2001]. Η εφαρμογή των λεγόμενων μη συμβατικών συστημάτων στην ενζυμική κατάλυση επέτρεψε την επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων με τη συμμετοχή και υδρόφοβων υποστρωμάτων (φυσικών ή συνθετικών) διευρύνοντας έτσι το φάσμα εφαρμογής των βιοκαταλυτικών συστημάτων, ενώ παράλληλα είναι δυνατόν να μετατοπιστεί η θέση της ισορροπίας της αντίδρασης (στις οποίες ένα από τα υποστρώματα είναι το νερό) προς την κατεύθυνση της σύνθεσης. Τα πλεονεκτήματα αυτά, έθεσαν επιτακτική πλέον την ανάγκη αναζήτησης συστημάτων των οποίων η περιεκτικότητα τους σε νερό θα ήταν περιορισμένη ενώ θα εξασφάλιζαν τη συνύρπαξη ενζύμου και οργανικού διαλύτη δίχως το ένζυμο να χάνει τις καταλυτικές του ικανότητες. Τα συστήματα αυτά είναι γνωστά και ως μη συμβατικά μέσα.

Στην εργασία αυτή εξετάστηκε η ικανότητα οξειδοαναγωγικών αλλά και υδρολυτικών ενζύμων να καταλύουν την εκλεκτική τροποποίηση ενώσεων φυτικής προέλευσης προς παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία σε μη συμβατικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης βιοκαταλυτικών διεργασιών για την τροποποίηση των

βασικών συστατικών του μαστιχέλαιου. Προς την κατεύθυνση αυτή αρχικά διερευνήθηκε η δυνατότητα τόσο ελεύθερων όσο και ακινητοποιημένων οξειδοαναγωγικών ενζύμων όπως π.χ. της χλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago* (CPO) και των λακασσών από τους μύκητες *Trametes versicolor* (TvL), *Trametes hirsuta* (ThL), *Botrytis cinerea* (BcL), όσο και των υδρολυτικών ενζύμων όπως π.χ. της λιπάσης B από *Candida antarctica* (CaLB), να διατηρούν τις καταλυτικές τους ικανότητες σε διάφορα μη συμβατικά συστήματα, καταλύοντας αντιδράσεις οξείδωσης που μπορούν να βρουν εφαρμογή στην τροποποίηση του μαστιχέλαιου και των συστατικών του. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι παράγοντες που επιδρούν στη γενικότερη συμπεριφορά των ενζύμων με απώτερο στόχο τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης τους για την επίτευξη της εκλεκτικής τροποποίησης των βασικών μονοτερπενίων του μαστιχέλαιου προς τα αντίστοιχα οξυγονωμένα παράγωγα τους, τα οποία έχουν αποδεδειγμένη βιολογική δράση [Koutsoudaki *et al.*, 2005].

Η παρούσα εργασία διαρθρώνεται σε τέσσερις βασικές ενότητες οι οποίες περιλαμβάνουν: το θεωρητικό μέρος, τα υλικά και τις μεθόδους, τα αποτελέσματα των πειραμάτων και τέλος τα συνοπτικά συμπεράσματα που προέκυψαν. Στην πρώτη ενότητα (θεωρητικό μέρος) γίνεται αναφορά στα πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν τη «λευκή» βιοτεχνολογία. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στα βασικά συστατικά και τις βιολογικές ιδιότητες του μαστιχέλαιου. Ακολουθεί εκτενέστατη αναφορά στην χρήση των διαφόρων κατηγοριών των μη συμβατικών συστημάτων καθώς και τα αντίστοιχα πλεονεκτήματα που πηγάζουν από την εφαρμογή των συστημάτων αυτών στην ενζυμική βιοκατάλυση. Επίσης αναφέρονται τα βασικά χαρακτηριστικά της δομής και του μηχανισμού δράσης των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τέλος γίνεται αναφορά στις βασικές μεθόδους ακινητοποίησης των ενζύμων με έμφαση την ακινητοποίηση σε αργιλοπυριτικά ορυκτά. Στη δεύτερη ενότητα (υλικά και μέθοδοι) αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Παράλληλα αναφέρονται οι τεχνικές προσδιορισμού των ιδιοτήτων των εγκλωβισμένων ενζύμων σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό (EPR, DSC). Επίσης παρουσιάζονται οι συνθήκες παραγωγής λακκάσης από τους μύκητες *T. hirsuta*, *B. cinerea* καθώς και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για το μερικό καθαρισμό του παραγόμενου ενζύμου. Τέλος παρουσιάζονται οι τεχνικές ανάλυσης χαρακτηρισμού τόσο των υλικών ακινητοποίησης (SEM, XRD, XPS, DTA/TGA, FTIR) όσο και της δευτεροταγούς δομής των ακινητοποιημένων ενζύμων (φασματοσκοπία FT-IR). Στην τρίτη ενότητα παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της διατριβής που αφορούν:

α) τη δυνατότητα παράγωγης λακκάσης από τους μικροοργανισμούς *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) και *B. cinerea* (DSMZ 877) καθώς και ο μερικός καθαρισμός του παραγόμενου ενζύμου.

β) στην παρασκευή τριαδικών συστημάτων χωρίς επιφανειοενεργό, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συστήματα για την επίτευξη ενζυμικών αντιδράσεων που στοχεύουν στην τροποποίηση των συστατικών του μαστιχέλαιου.

γ) στη δυνατότητα δράσης των CPO, TvL, ThL, BcL σε διάφορα μη συμβατικά συστήματα. Παράλληλα προσδιορίζονται οι παράγοντες (θερμοκρασία, % περιεκτικότητα σε νερό) που επιδρούν στην δράση των ενζύμων σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό με τη χρήση υδρόφοβων ή υδρόφιλων υποστρωμάτων. Τέλος παρουσιάζεται η εφαρμογή των παραπάνω ενζύμων στα διάφορα μη συμβατικά συστήματα για την ενζυμικά καταλυόμενη οξείδωση τερπενολών και μονοτερπενίων του μαστιχέλαιου.

δ) στη δυνατότητα ακινητοποίησης TvL σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC και στην εφαρμογή του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη σε διάφορα μη συμβατικά συστήματα για την τροποποίηση τόσο του μαστιχέλαιου όσο και των βασικών συστατικών του με τη χρήση διάφορων διαμεσολαβητών.

και ε) τη δυνατότητα ακινητοποίησης λιπάσης σε διάφορους αργίλους καθώς και στα αντίστοιχα οργανοτροποποιημένα παράγωγα τους. Οι ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με περίθλαση ακτίνων-X (XRD), φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS), θερμική ανάλυση (DTA/TGA), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) καθώς και με φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR), με την οποία μελετήθηκε η διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής του ακινητοποιημένου ενζύμου. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι παράγοντες (π.χ. ποσοστό φόρτωσης ενζύμου, φύση του φορέα ακινητοποίησης, θερμοκρασία, πολικότητα διαλύτη) που επιδρούν στα καταλυτικά χαρακτηριστικά του ακινητοποιημένου ενζύμου σε οργανικά μέσα κατά την επίτευξη αντιδράσεων μετεστεροποίησης. Επιπλέον η ακινητοποιημένη CaLB εφαρμόστηκε για την βιοκαταλυτική τροποποίηση του μαστιχέλαιου και των βασικών συστατικών του, μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης των τερπενίων. Οι παράγοντες που επιδρούν στην δράση του ενζύμου κατά την εποξείδωση των τερπενίων (ποσοστό φόρτωσης ενζύμου, φορέας ακινητοποίησης, θερμοκρασία, πολικότητα διαλύτη, φύση και συγκέντρωση οξειδωτικού φορέα κλπ) μελετήθηκαν διεξοδικά. Τέλος στην τέταρτη ενότητα αναπτύσσονται τα συμπεράσματα των πειραμάτων, συνδέονται μεταξύ τους και γίνεται συσχέτιση με τα μέχρι σήμερα γνωστά βιβλιογραφικά δεδομένα.



Θεωρητικό  
Μέρος



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΛΕΥΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

---

### 1.1 Γενικά

Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, γνωστή επίσης και ως «λευκή» βιοτεχνολογία (white biotechnology), αφορά στην εφαρμογή των εργαλείων της φύσης για την παραγωγή χημικών, υλικών και καυσίμων με βάση βιολογικές πρώτες ύλες που απαντώνται στη φύση [Carrez, 2006]. Πιο συγκεκριμένα είναι η σύγχρονη χρήση και εφαρμογή της βιοτεχνολογίας στη βιώσιμη ανάπτυξη, στην παραγωγή βιοχημικών μορίων και βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές ενέργειας με την χρήση ζωντανών / νεκρών κυττάρων (από ζύμες, μύκητες, βακτήρια, φυτά) ή και ενζύμων [Montero, 2007]. Σε βιομετατροπές με αντίδραση ενός σταδίου συνήθως χρησιμοποιούνται ένζυμα. Σε διεργασίες όμως που αποτελούνται από περισσότερες από μία αντιδράσεις, προτιμάται η χρήση ολόκληρων κυττάρων [Carrez, 2006].

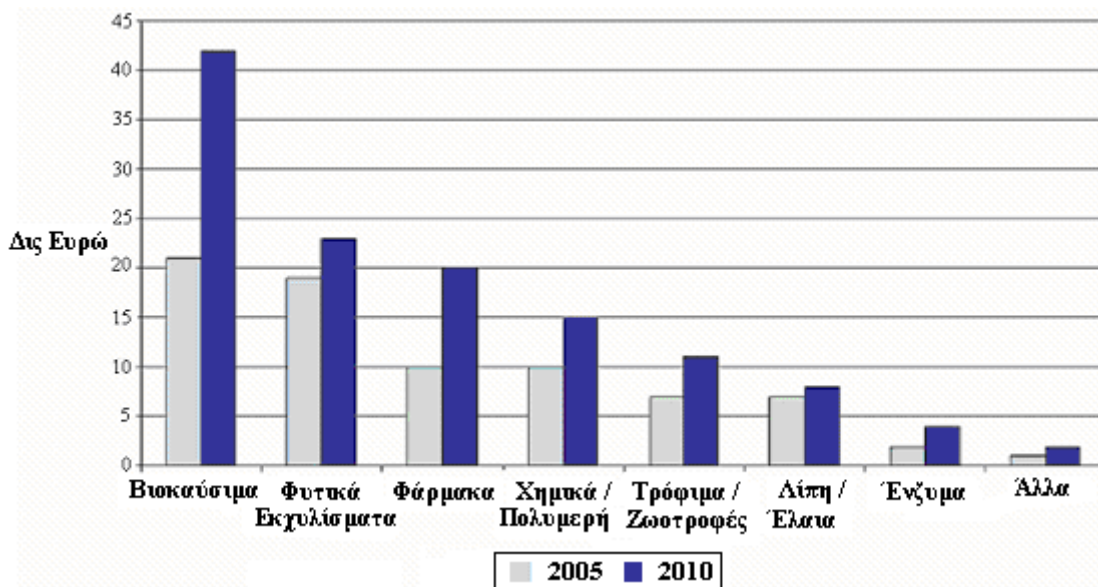
Γενικά η «λευκή» βιοτεχνολογία διαφοροποιείται από την κόκκινη, μπλε και πράσινη βιοτεχνολογία. Ως «πράσινη βιοτεχνολογία» χαρακτηρίζονται οι εφαρμογές της στον αγροτικό τομέα [Dove, 1998], ως «κόκκινη βιοτεχνολογία» χαρακτηρίζονται οι εφαρμογές της στην υγεία και την ιατρική, στην προσπάθεια καταπολέμησης και πρόληψης των ασθενειών του ανθρώπου [Allgaier, 2006] και ως «μπλέ βιοτεχνολογία» χαρακτηρίζονται οι εφαρμογές της στο περιβάλλον [Volckaert *et al.*, 2008]. Βέβαια τα όρια μεταξύ λευκής, πράσινης, κόκκινης και μπλε βιοτεχνολογίας δεν είναι απολύτως καθορισμένα.

Η βιομηχανική (ή «λευκή») βιοτεχνολογία προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων καθώς επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές με παράλληλο οικονομικό όφελος. Επίσης με την χρήση της μειώνεται η παραγωγή αποβλήτων και η εκπομπή του CO<sub>2</sub>, ενώ αυξάνεται το ποσοστό παραγωγής και η καθαρότητα των παραγόμενων ενώσεων [Lee and Jang, 2006]. Γενικά μέσω της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας δημιουργήθηκαν οι συνθήκες για νέους τρόπους βελτίωσης των περιβαλλοντικών επιδόσεων των βιομηχανικών διαδικασιών σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων και των παραδοσιακών βιομηχανικών κλάδων, όπως η χημική βιομηχανία, η κλωστοϋφαντουργία, η βυρσοδεψία και η βιομηχανία χαρτιού, καθώς και σε υψηλής αξίας τομείς όπως τον τομέα των φαρμακευτικών ειδών [Kircher, 2006]. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα της «λευκής» βιοτεχνολογίας.

**Πίνακας 1.1.** Πλεονεκτήματα «λευκής» βιοτεχνολογίας .

| <b>Πλεονεκτήματα «λευκής» βιοτεχνολογίας</b>                             | <b>Μειονεκτήματα συμβατικών μεθόδων</b>                |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Χρήση κυττάρων /ενζύμων                                                  | Χρήση τοξικών καταλυτών                                |
| Ήπιες συνθήκες εφαρμογής                                                 | Εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών                           |
| Αυξημένη εκλεκτικότητα                                                   | Μειωμένη εκλεκτικότητα                                 |
| Δυνατότητα αντιδράσεων τόσο σε υδατικά όσο και σε μη συμβατικά συστήματα | Διεξαγωγή αντιδράσεων σε τοξικούς διαλύτες             |
| Παραγωγή καθαρότερων προϊόντων                                           | Παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων                    |
| Χαμηλή εκπομπή CO <sub>2</sub>                                           | Υψηλή εκπομπή CO <sub>2</sub>                          |
| Περιορισμένη χρήση πρώτων υλών και ενέργειας                             | Αυξημένη χρήση και εξάντληση πρώτων υλών και ενέργειας |
| Παραγωγή ανακυκλώσιμων και βιοαποδομήσιμων αποβλήτων                     | Παραγωγή τοξικών μη βιοαποδομήσιμων αποβλήτων          |

Η «λευκή» βιοτεχνολογία αναφορικά με την χημική βιομηχανία και την φαρμακοβιομηχανία έχει εφαρμοστεί σε ποσοστό 15% επί του συνόλου της αγοράς [Lee and Jang, 2006]. Αυτό συμβαίνει διότι η «λευκή» βιοτεχνολογία προσφέρει δυνατότητες για μείωση της κατανάλωσης των πρώτων υλών και της ενέργειας, καθώς και για περιορισμό της ρύπανσης [Kircher, 2006; Soetaert and Vandamme, 2006]. Πράγματι τα τελευταία χρόνια έχουν δημοσιευτεί αρκετές ερευνητικές εργασίες πάνω στη χρήση ενζύμων ή κυττάρων για την παραγωγή βιοντίζελ [Kim *et al.*, 2007; Kim and Lee, 2008; McNeff *et al.*, 2008] δεδομένου την ανάγκη για παραγωγή ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές με χαμηλό κόστος. Η βιοδιεργασία είναι απλή, καθώς αφορά την μετατροπή φυτικών ελαίων σε μεθυλ- ή άλλους μικρού μήκους εστέρες αλκοολών με μία μόνο αντίδραση μετεστεροποίησης με τη χρήση λιπασών. Σημαντική είναι όμως και η επιρροή της στον τομέα των φαρμάκων και των τροφίμων [Patel, 2002; Rastal, 2007] λόγω των πράσινων διεργασιών που εφαρμόζονται [Riva, 2006]. Στο Σχήμα 1.1 παρουσιάζεται η επιρροή της «λευκής» βιοτεχνολογίας σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς με βάση τα αναμενόμενα αποτελέσματα μέχρι το 2010. [McKinsey, 2006].



**Σχήμα 1.1** Κύριες βιομηχανικές εφαρμογές της «λευκής» βιοτεχνολογίας. Η επιρροή της στους διάφορους κλάδους εκφράζεται σε δισεκατομμύρια ευρώ.

## 1.2 Η εφαρμοσμένη βιοκατάλυση στη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων

Μέχρι σήμερα, η κλασική χημική μεθοδολογία που αφορά στην παρασκευή προϊόντων υψηλής αξίας όπως για παράδειγμα των παραγώγων των φυσικών προϊόντων συχνά δεν καλύπτεται από τους κανονισμούς τροφίμων, φαρμάκων της Ε.Ε., καθώς προϋποθέτει τη χρήση τοξικών καταλυτών και διαλυτών αλλά και την εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών. Όπως είναι φυσικό η χημική τροποποίηση τέτοιων ενώσεων δεν μπορεί να εφαρμοστεί στη βιομηχανία τροφίμων ή φαρμάκων. Η εφαρμογή κλασικών χημικών μεθόδων χαρακτηρίζεται συχνά από μειωμένη εκλεκτικότητα γεγονός που οδηγεί στην εμφάνιση ανεπιθύμητων παραπροϊόντων καθώς και στην απώλεια της βιολογικής δράσης του τελικού προϊόντος. Σε αντίθεση με την κλασική προσέγγιση, η ανάπτυξη των βιοκαταλυτικών μεθόδων αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, που μπορεί να ικανοποιήσει τα κριτήρια της Ε.Ε. για την ασφάλεια και την ποιότητα των διεργασιών και των προϊόντων, την προστασία της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος [Thomas *et al.*, 2002; Huisman and Gray, 2002]. Σήμερα η χρήση των ενζύμων σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, με αποτέλεσμα αρκετές περιπτώσεις οι ενζυμικές βιομετατροπές να είναι ο προτεινόμενος τρόπος παραγωγής προϊόντων υψηλής αξίας [Bommarius and Riebel, 2004; Planes, 2008]. Παρόλα αυτά όμως η χρήση των ενζύμων περιλαμβάνει και κάποιους

περιορισμούς. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται τα πλεονεκτημάτων και τα μειονεκτήματα χρήσης των ενζύμων.

**Πίνακας 1.2.** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης ενζύμων [Rozzell, 1999; Bornscheuer and Kazlauskas, 1999; Loughlin, 2000; Klibanov, 2001; Aehle, 2004; Bommarius and Riebel, 2004; Illanes, 2008]

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                      | Μειονεκτήματα                                                                                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Δρουν κατά από ήπιες συνθήκες (pH: 5-8 και σε θερμοκρασίες γύρω στους 20-40°C ) σε υδατικά διαλύματα                                                                                                                                               | Χαμηλή σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας                                                                          |
| Δυνατότητα δράσης σε μη συμβατικά συστήματα<br>Αυξημένοι καταλυτικοί ρυθμοί (επιταχύνουν τις αντιδράσεις κατά $10^5$ - $10^{12}$ )                                                                                                                 | Μειωμένη σταθερότητα όταν απομακρυνθούν από την φυσικής τους πηγή<br>Μεγάλος χρόνος ανάπτυξης νέων βιοκαταλυτών                  |
| Υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα                                                                                                                                                                                                                         | Χαμηλή ειδική ενεργότητα                                                                                                         |
| Υψηλή τόπο- και στέρεο- εκλεκτικότητα (διακρίνουν συγκεκριμένα τμήματα στα μόρια των υποστρωμάτων ή χειρόμορφες ενώσεις αντίστοιχα).<br>Δεν αλλοιώνουν τα τελικά προϊόντα ή την ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων σωμάτων μιας αντίδρασης | Η καταλυτική τους δράση (αρκετές φορές) επηρεάζεται από την παρουσία συνενζύμου<br>Αναστολή από το ίδιο το υπόστρωμα ή το προϊόν |
| Είναι φιλικοί προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομίσιμοι                                                                                                                                                                                            | Έχουν υψηλό κόστος παραγωγής                                                                                                     |

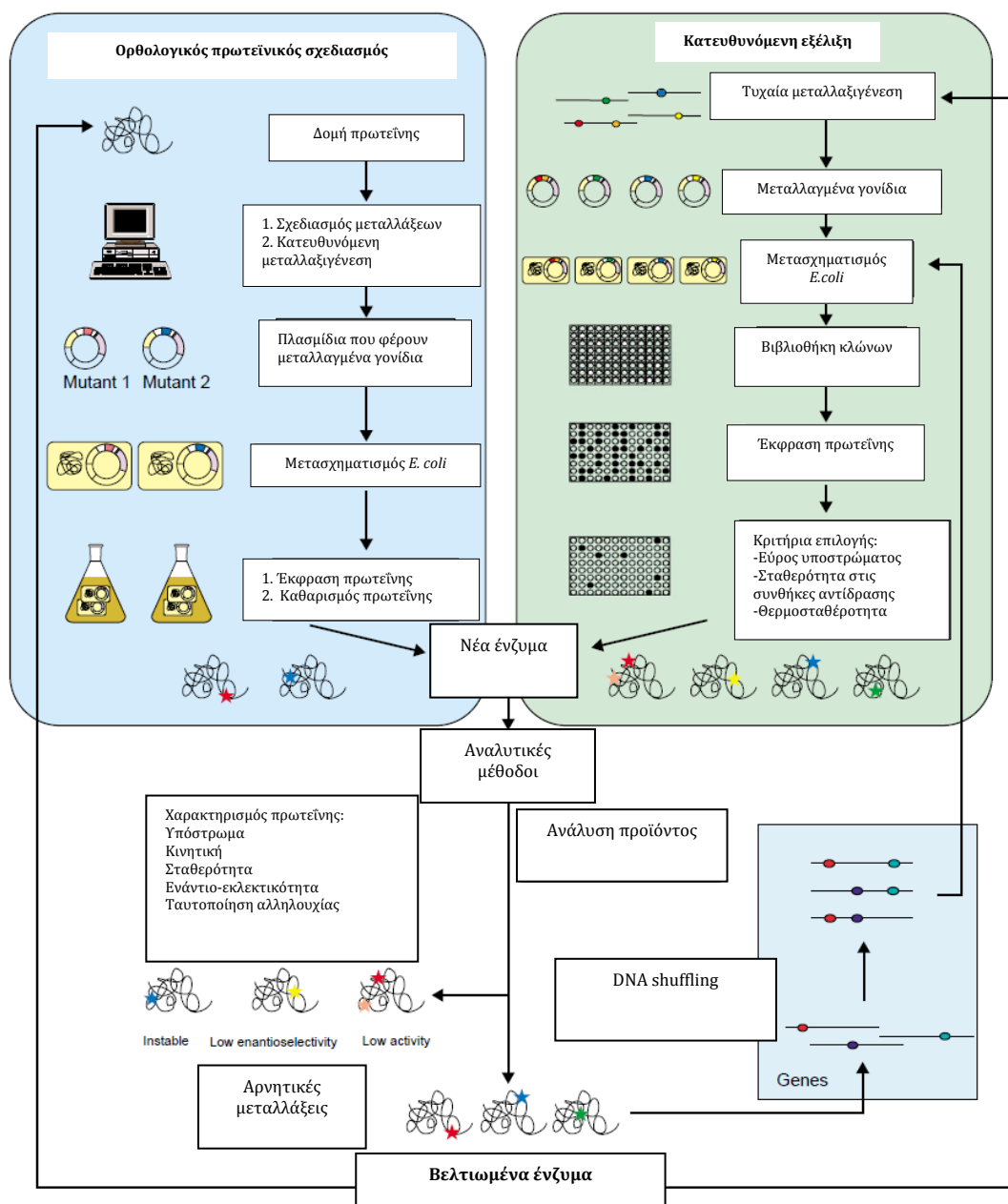
Στην ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών μεθόδων, πέντε βασικοί άξονες της ενζυμικής τεχνολογίας έδωσαν ώθηση στην ταχεία ανάπτυξη και ταυτόχρονα επιτυχία των βιοκαταλυτικών διεργασιών [Koeller and Wong, 2001; Khosla and Harbury 2001; Arnold, 2001] για τη σύνθεση ή τροποποίηση φυσικών προϊόντων, φαρμάκων και αργοχημικών [Schmid *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002; Bruggink *et al.*, 2003]. Οι τεχνολογίες αυτές έκαναν πραγματικότητα το σχεδιασμό νέων ενζύμων και έδωσαν τη δυνατότητα βελτίωσης πλήθους ιδιοτήτων τους με στόχο την πιο αποτελεσματική χρήση τους. Πιο συγκεκριμένα επέτρεψαν τη βελτίωση των ενζυμικών ιδιοτήτων, όπως εξειδίκευση προς το υπόστρωμα, θερμοσταθερότητα, σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες και άλλες καταλυτικές ιδιότητες [Petrone and Arnold, 2000; Bornscheuer and Pohl, 2001, Eijssink *et al.*, 2004, 2005; Bae *et al.*, 2008; Bannen *et al.*, 2008]. Στον Πίνακα 1.3. που ακολουθεί, παρατίθενται οι βασικοί άξονες της ενζυμικής τεχνολογίας.

**Πίνακας 1.3.** Βασικοί άξονες της ενζυμικής τεχνολογίας [Krishna, 2002].

| Τεχνολογίες                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| ► Η ανάπτυξη τεχνικών ανασυνδιασμένου DNA για την παραγωγή ενζύμων σε μεγάλη κλίμακα.      |
| ► Οι βελτιστοποιημένες μέθοδοι διαλογής για τους νέους βιοκαταλύτες                        |
| ► Οι μέθοδοι ακινητοποίησης των ενζύμων                                                    |
| ► Η ταχεία ανάπτυξη τεχνικών κάθετης επεξεργασίας για την απομόνωση ενδοκυτταρικών ενζύμων |
| ► Η βιοκατάλυση σε μη συμβατικά συστήματα                                                  |

Με βάση τις τεχνολογίες αυτές οι ενζυμικές βιοδιεργασίες έχουν αρχίσει να έχουν ευρεία βιομηχανική εφαρμογή, καθώς πάνω από τα 3000 ένζυμα που είναι γνωστά, εκατοντάδες είναι εμπορικά διαθέσιμα. Βεβαία μεγάλη είναι η ερευνητική προσπάθεια που επιτελείται για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που σχετίζονται με την αύξηση της σταθερότητας, τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, τον έλεγχο της δραστηριότητας και της εκλεκτικότητας των ενζύμων στις συνθήκες της εκάστοτε διεργασίας. Πιο συγκεκριμένα, τα προβλήματα αυτά έχουν επιλυθεί με πολλές διαφορετικές μεθόδους: 1) ακινητοποίηση σε στερεούς φορείς [Abian *et al.*, 2001; Mateo *et al.*, 2005; Kim J., *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2006], 2) διασύνδεση ενζυμικών κρυστάλλων [Roy and Abraham 2006], 3) δημιουργία συσσωματωμάτων των ενζύμων [Illanes *et al.*, 2006], 4) εφαρμογή τεχνικών της πρωτεϊνικής μηχανικής όπως η τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και η *in vitro* κατευθυνόμενη εξέλιξη [Bardy *et al.*, 2005; Sylvestre *et al.*, 2006; Leisola and Turunen, 2007].

Γενικά η κατευθυνόμενη εξέλιξη αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο όχι μόνο για τη δημιουργία βελτιωμένων ενζύμων αλλά και τη διεύρυνση της γνώσης σχετικά με τις αρχές που διέπουν το μηχανισμό δράσης τους. Σε αντίθεση με τον ορθολογικό πρωτεϊνικό σχεδιασμό, η κατευθυνόμενη εξέλιξη δεν απαιτεί τη γνώση της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου και πληροφοριών που συσχετίζουν τη δομή και την αλληλουχία του με το μηχανισμό δράσης του (Σχήμα 1.2).



**Σχήμα 1.2.** Σύγκριση του πρωτεϊνικού σχεδιασμού και της *in vitro* κατευθυνόμενης εξέλιξης. Σύμφωνα με τον πρωτεϊνικό σχεδιασμό, οι μεταλλάξεις σχεδιάζονται βάσει της πρωτεϊνικής δομής του ενζύμου και εισάγονται στο πρωτεϊνικό μόριο έπειτα από SDM. Η κατευθυνόμενη εξέλιξη αρχίζει με την προετοιμασία των βιβλιοθηκών μεταλλαγμένων γονιδίων που προήλθαν από τυχαία μεταλλαξιογένεση και στη συνέχεια σάρωση της βιβλιοθήκης για εντοπισμό κλώνων με βελτιωμένες ή νέες ιδιότητες. Και οι δύο προσεγγίσεις εφαρμοσμένης πρωτεϊνικής μηχανικής μπορούν να επαναληφθούν ή να συνδυαστούν έως ότου δημιουργηθούν οι βιοκαταλύτες με τις επιθυμητές ιδιότητες [Bornscheuer and Pohl, 2001].

### 1.3 Βιομηχανικές Εφαρμογές Ένζύμων

Η βιομηχανία ενζύμων, που είναι το αποτέλεσμα της ταχείας ανάπτυξης της μοντέρνας βιοτεχνολογίας, παράγει ένζυμα για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Τα ένζυμα μπορεί να είναι ζωικής, φυτικής ή μικροβιακής προέλευσης. Όπως ειπώθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, φυσικοί ή ανασυνδυασμένοι μικροοργανισμοί παράγουν ένα μεγάλο αριθμό χρήσιμων ενζύμων με ποικιλία στην εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα, την ταχύτητα της αντίδρασης, την θερμοκρασιακή σταθερότητα και το βέλτιστο pH [Krishna, 2002 ]

Με βάση την αντίδραση που καταλύουν, διακρίνονται σε έξι κατηγορίες, σύμφωνα την IUB (International Union of Biochemistry), οι οποίες είναι: EC.1 Οξειδοαναγωγάσες, EC.2 τρανσφεράσες, EC.3 υδρολάσες, EC.4 λυάσες, EC.5 ισομεράσες και EC.6 λιγάσες (το ακρωνύμιο EC είναι τα αρχικά της Enzyme Commission). Από όλα τα ένζυμα, οι υδρολάσες είναι οι πλέον πολυχρησιμοποιημένες στη βιομηχανία για βιομετατροπές. Εκτιμάται ότι περίπου το 80% των βιομηχανικά χρησιμοποιημένων ενζύμων είναι υδρολάσες [Krishna, 2002].

Γενικά με την ανάπτυξη της τεχνολογίας ανασυνδυασμένου DNA [Farinas *et al.*, 2001; Wiseman *et al.*, 2001; Liu Z., *et al.*, 2006; Ran and Frost, 2007, Kelly *et al.*, 2009] και της γενετικής μηχανικής [Maeda *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2009; Atwood and Rehm, 2009], η δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα των ενζύμων γίνεται σήμερα εφικτή γεγονός που διευρύνει την εφαρμογή των ενζύμων σε πλήθος βιομηχανικών διαδικασιών. Εκτιμάται ότι πάνω από 400 εταιρείες σε όλο τον κόσμο παράγουν ένζυμα που βρίσκουν εφαρμογή στην βιομηχανία. Η εκτιμώμενη αξία των εφαρμογών των βιομηχανικών ενζύμων στην παγκόσμια αγορά έχει αυξηθεί από το 1 δισεκατομμύριο \$ το 1995 στο 1.5 δισεκατομμύριο \$ το 2000 [Kirk *et al.*, 2002], στα 2.3 δισεκατομμύρια \$ το 2007, ενώ εκτιμάται να φθάσουν τα 2.7 δισεκατομμύρια \$ μέχρι το 2012. Οι βιομηχανίες απορρυπαντικών (37%), η κλωστοϋφαντουργεία (12%), η βιομηχανία αμύλου (11%), τα αρτοποιεία (8%), οι ζωοτροφές (6%) είναι οι κύριες βιομηχανίες, οι οποίες χρησιμοποιούν το 75% των διαθέσιμων ενζύμων στην βιομηχανία [Kirk *et al.*, 2002].

Γενικά η αποτελεσματικότητα των ενζύμων, ως καταλύτες προσέλκυσε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και οδήγησε στην ενσωμάτωσή τους σε διαδικασίες υψηλής τεχνολογίας. Στον Πίνακα 1.4 παρουσιάζονται οι κυριότερες εφαρμογές των βιομηχανικών ενζύμων σε ένα ευρύ φάσμα τομέων της βιομηχανίας.

**Πίνακας 1.4.** Ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς [Kirk *et al.*, 2002].

| Βιομηχανία                                        | Τύπος Ενζύμου                     | Εφαρμογή                                                         |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| Απορρυπαντικά                                     | Πρωτεάση                          | Αφαίρεση λεκέ πρωτεΐνης                                          |
|                                                   | Αμυλάση                           | Αφαίρεση λεκέ αμύλου                                             |
|                                                   | Λιπάση                            | Αφαίρεση λεκέ λιπιδίου                                           |
|                                                   | Κυτταρινάση                       | Καθαρισμός, τόνωση χρώματος                                      |
| Άμυλο και Καύσιμα                                 | Αμυλάση                           | Ρευστοποίηση και σακχαροποίηση αμύλου                            |
|                                                   | Αμυλογλυκοσιδάση                  | Σακχαροποίηση αμύλου                                             |
|                                                   | Ξυλανάση                          | Μείωση ιξώδους                                                   |
|                                                   | Ισομεράση Γλυκόζης                | Μετατροπή γλυκόζης σε φρουκτόζη                                  |
| Τρόφιμα<br>(Συμπεριλαμβανομένου<br>γαλακτοκομικά) | Πρωτεάση                          | Πήξη γάλακτος                                                    |
|                                                   | Λιπάση                            | Ανάπτυξη γεύσης σε τυριά                                         |
|                                                   | Λακτάση                           | Απομάκρυνση λακτόζης (γάλα)                                      |
|                                                   | Πηκτινάση                         | Επεξεργασία προϊόντων με βάση τα φρούτα                          |
| Αρτοποιία                                         | Αμυλάση                           | Όγκο στο ψωμί                                                    |
|                                                   | Ξυλανάση                          | Προσαρμοστικότητα ζύμης                                          |
|                                                   | Λιπάση                            | Προσαρμοστικότητα και σταθερότητα ζύμης                          |
|                                                   | Πρωτεάση                          | Μπισκότα                                                         |
| Ζωοτροφές                                         | Φυτάση                            | Ευπεψία (τροφής) -απελευθέρωση φωσφόρου                          |
|                                                   | Ξυλανάση                          | Ευπεψία (τροφής)                                                 |
|                                                   | $\beta$ -Γλουκανάση               | Ευπεψία (τροφής)                                                 |
| Ροφήματα                                          | Αμυλάση                           | Επεξεργασία χυμών                                                |
|                                                   | Λακκάση                           | Γεύση (Μπύρα), Λεύκανση (χυμούς)                                 |
|                                                   | <i>Acetolactate decarboxylase</i> | Ωρίμανση (Μπύρα)                                                 |
| Κλωστοϋφαντουργία                                 | Καταλάση                          | Τερματισμός λεύκανσης                                            |
|                                                   | Λακκάση                           | Λεύκανση                                                         |
|                                                   | Υπεροξειδάση                      | Αφαίρεση υπολείμματος βαφής                                      |
| Πολτός και Χαρτί                                  | Λιπάση                            | Έλεγχος πίσσας, έλεγχος επιμόλυνσης                              |
|                                                   | Ξυλανάση                          | Ενίσχυση λεύκανσης                                               |
| Λίπη και Έλαια                                    | Λιπάση                            | Μετεστεροποίηση                                                  |
|                                                   | Φωσφολιπάση                       | Παραγωγή λεκιθίνης                                               |
| Οργανική σύνθεση                                  | Λιπάση                            | Διαχωρισμός χειρόμορφων οργανικών ενώσεων                        |
|                                                   | Νιτριλάση                         | Σύνθεση οπτικών (ενεργών)/ καθαρών προϊόντων                     |
| Προσωπική φροντίδα                                | Αμυλογλυκοσιδάση                  | Αντιμικροβιακές ιδιότητες (σε συνδυασμό με την γλυκόζη οξειδάση) |
|                                                   | Γλυκόζη οξειδάση                  | Λεύκανση, αντιμικροβιακές ιδιότητες                              |
|                                                   | Υπεροξειδάση                      | Αντιμικροβιακές ιδιότητες                                        |

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο είναι το ενδιαφέρον για την τροποποίηση πρόδρομων ενώσεων σε παράγωγα με αυξημένη βιολογική δράση που βρίσκουν εφαρμογή σε τρόφιμα [Chen W., *et al.*, 2009], φαρμακευτικά σκευάσματα [Ahmad *et al.*, 2009], χημικά [Straathof *et al.*, 2002] και καλλυντικά [Flachsmann *et al.*, 2008]. Η τάση αυτή, ερμηνεύεται από το γεγονός ότι τα παράγωγα αυτά έχουν σοβαρή επιρροή στην ανθρώπινη υγεία αλλά και ευρεία

εμπορική εφαρμογή [Smith, 2009]. Για το λόγο αυτό, προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση παραγωγής των επιθυμητών προϊόντων, με το ελάχιστο δυνατό κόστος, πρέπει να αναπτυχθούν όπως έχει ειπωθεί και προηγουμένως: 1) καλύτεροι βιολογικοί καταλύτες για συγκεκριμένες λειτουργίες, 2) φιλικότερα μέσα για την δράση του καταλυτή, καθώς και 3) κατάλληλοι φορείς για την ακινητοποίηση των ενζύμων [Zhao *et al.*, 2002; Turner, 2003; Mateo *et al.*, 2007]. Στον Πίνακα 1.5 παρουσιάζονται πρόσφατες εφαρμογές ενζυμικών ή μικροβιακών αντιδράσεων σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς.

**Πίνακας 1.5.** Εφαρμογές ενζύμων για την παραγωγή ενώσεων υψηλής αξίας.

| Τομέας     | Ένζυμο /                                               | Προϊόν                         | Εφαρμογή                  | Βιβλιογραφική                       |
|------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Εφαρμογής  | μικροοργανισμός                                        |                                |                           | αναφορά                             |
| Τρόφιμα    | <i>Aspergillus niger</i>                               | Βερμπενόλη                     | Πρόσθετο αρώματος         | Vidya and Agrawal, 2004             |
|            | <i>Picea abies</i> Cells                               | Βερμπενόλη και Βερμπενόνη      | Πρόσθετο αρώματος         | Vanek <i>et al.</i> , 2005          |
|            | <i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33622             | Γαλακτικό οξύ                  | Συντηρητικό               | John <i>et al.</i> , 2007           |
|            | <i>Penicillium chrysogenum</i>                         | Κεφαλοσπορίνη                  | Αντιβιοτικό               | Harris <i>et al.</i> , 2009         |
| Φάρμακα    | <i>Xanthomonas citri</i>                               | Κεφαλεξίνη                     | Αντιβιοτικό               | Choi <i>et al.</i> , 2004           |
|            | <i>Escherichia coli</i>                                | β-λακτάμη                      | Αντιβιοτικό               | Rodriguez-Bano <i>et al.</i> , 2009 |
|            | <i>Candida antarctica</i>                              | Λιπόφιλα παράγωγα φλαβονοειδών | Αντιοξειδωτική δράση      | Katsoura <i>et al.</i> , 2006       |
| Καλλυντικά | Κύτταρα από <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050        | Λακτοσπορίνη                   | Αντιμικροβιακές ιδιότητες | Riazi <i>et al.</i> , 2009          |
|            | <i>bacterium Zymomonas mobilis</i>                     | Σορβιτόλη                      | Σε κρέμες                 | Silveira and Jonas, 2002            |
|            | <i>Amycolatopsis orientalis</i> ssp. <i>orientalis</i> | Πολυλακτικό οξύ                | Πλαστικά                  | Li <i>et al.</i> , 2008             |
| Χημικά     | <i>Candida antarctica</i>                              | ακρυλικό οξύ                   | Πολυμερή                  | Tsukamoto <i>et al.</i> , 2008      |

Σήμερα στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας, πολλές κλασικές χημικές μέθοδοι, λόγω της δυσκολίας σύνθεσης οπτικώς ενεργών ενώσεων έχουν αντικατασταθεί από βιοκαταλυτικές, [Gotor, 2002; Patel, 2002], λόγω ότι τα ένζυμα είναι στερεοεκλεκτικοί και τοπο-εξειδικευμένοι καταλύτες, επιτρέποντας τον έλεγχο των προϊόντων και την αύξηση της

απόδοσης, αφού παράγονται λιγότερα παραπροϊόντα [Patel, 2002]. Γενικά η σύνθεση ενός σύγχρονου φαρμακευτικού ενεργού συστατικού είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει συχνά 10 ή περισσότερα συνθετικά βήματα. Σε πολλές περιπτώσεις μόνο ένα από αυτά τα βήματα θα είναι βιοκαταλυτικό, αν και συχνά αυτό θα είναι το βασικό βήμα που εισάγει τη χειρομορφία στην ένωση.

Επίσης η βιομηχανία τροφίμων διαρκώς αναζητεί τεχνολογίες αιχμής, προκειμένου να εκπληρώσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών για ασφαλή και υψηλής θρεπτικής αξίας προϊόντα. Συνεχώς αυξανόμενο είναι και το ενδιαφέρον για την εισαγωγή ενώσεων φυτικής προέλευσης στα τρόφιμα, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην πρόληψη ασθενειών [Balan *et al.*, 2005, 2007]. Ειδικότερα, τα τερπένια και τα φλαβονοειδή, τα οποία απαντώνται σε όλα σχεδόν τα φυτά, αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών σκευασμάτων καθώς έχουν αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες [Andrikopoulos *et al.*, 2003; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Katsoura *et al.*, 2006]. Η βιομετατροπή φυτικών ενώσεων με την χρήση ήπιων βιοδιεργασιών αυξάνει την βιολογική αξία των παραγόμενων προϊόντων [Krings *et al.*, 2008; Krügener *et al.*, 2009], καθώς αποφεύγεται η χρήση τοξικών χημικών καταλυτών. Συμπερασματικά, η «λευκή» βιοτεχνολογία ως τρέχουσα τεχνολογία αιχμής, επιτρέπει την χρήση πράσινων διεργασιών σε όλους σχεδόν τους βιομηχανικούς τομείς για την παραγωγή ενώσεων υψηλής βιολογικής ή τεχνολογικής αξίας, [Fessner and Jones, 2001; Bommarius and Riebel, 2004].

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΑΣΤΙΧΕΛΑΙΟ

---

### 2.1 Μαστιχέλαιο

#### 2.1.1 Γενικά

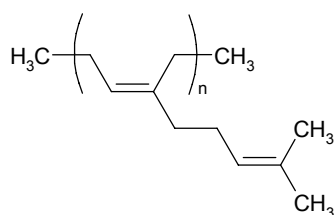
Η μαστίχα Χίου είναι ελαιορητινούχος ουσία, η οποία παράγεται από το αιθαλές δενδρύλλιο *Pistacia lentiscus* var. *Chia* [Browicz, 1987]. Το γένος *Pistacia* της οικογένειας *Anacardiaceae* περιλαμβάνει τρία φυτικά γένη: *Pistacia terebinthus* L., *Pistacia vera* L. και *Pistacia lentiscus*, ποικιλία του οποίου είναι ο μαστιχοφόρος σχίνος *Pistacia lentiscus* var. *Chia* που δημιουργήθηκε φυσικά και καλλιεργείται συστηματικά στην ονομαστή περιοχή των Μαστιχοχωρίων της Χίου, ενώ η ποικιλία *Pistacia vera* L. καλλιεργείται συστηματικά στην Τουρκία [Davis, 1967]. Η ρητίνη του μαστιχόδενδρου επικράτησε ως *μαστίχα* σε όλο σχεδόν τον κόσμο [Perikos, 1993].

Για την παραλαβή της ελαιορητίνης γίνονται εντομές ή τσιμπήματα στον φλοιό του κορμού και των χονδρών κλάδων του μαστιχοφόρου σχοίνου. Η ελαιορητίνη εκρέει από τις πληγές σε μικρές σταγόνες, που στερεοποιούνται στον αέρα. Είναι ουσία εύθρυπτη, υπόλευκη και έχει ευχάριστο χρώμα. Η πρώτη ποιότητα προέρχεται από τις σταγόνες που στερεοποιούνται και συλλέγονται πάνω στις εντομές των κορμών, ενώ η κατώτερη ποιότητα από αυτές που πέφτουν στο έδαφος. Κατά μέσο όρο, ένα ανεπτυγμένο δενδρύλλιο μαστιχοφόρου σχίνου δίνει 300-400 gr ελαιορητίνης το χρόνο. Η μαστίχα Χίου θεωρείται μοναδικό ελληνικό προϊόν, προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π) αναγνωρισμένο από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

#### 2.1.2 Χημική σύσταση μαστιχελαίου

Γενικά, η ελαιορητίνη της μαστίχα Χίου είναι μείγμα ποικίλης σύνθεσης χημικών ουσιών (η βιοσύνθεση των οποίων απαιτεί μεγάλα ποσά ηλιακής ενεργείας που εξασφαλίζονται επειδή ακριβώς το φυτό είναι εγκατεστημένο στο Μεσογειακό οικοσύστημα) και αποτελείται από δυο μέρη: το πτητικό (μαστιχέλαιο) και το μη πτητικό (κολοφώνιο). Πιο συγκεκριμένα το κολοφώνιο, αποτελεί το πολυμερές τμήμα, που απομονώθηκε από τη μαστίχα με διάλυση σε διχλωρομεθάνιο και καθίζηση με μεθανόλη, και βρέθηκε πως στην

ουσία αποτελείται από *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκένιο [Van den Berg *et al.*, 1998]. Στο Σχήμα 2.1 φαίνεται η μοριακή δομή του *cis*-1,4-πολύ-β-μυρκένιο.



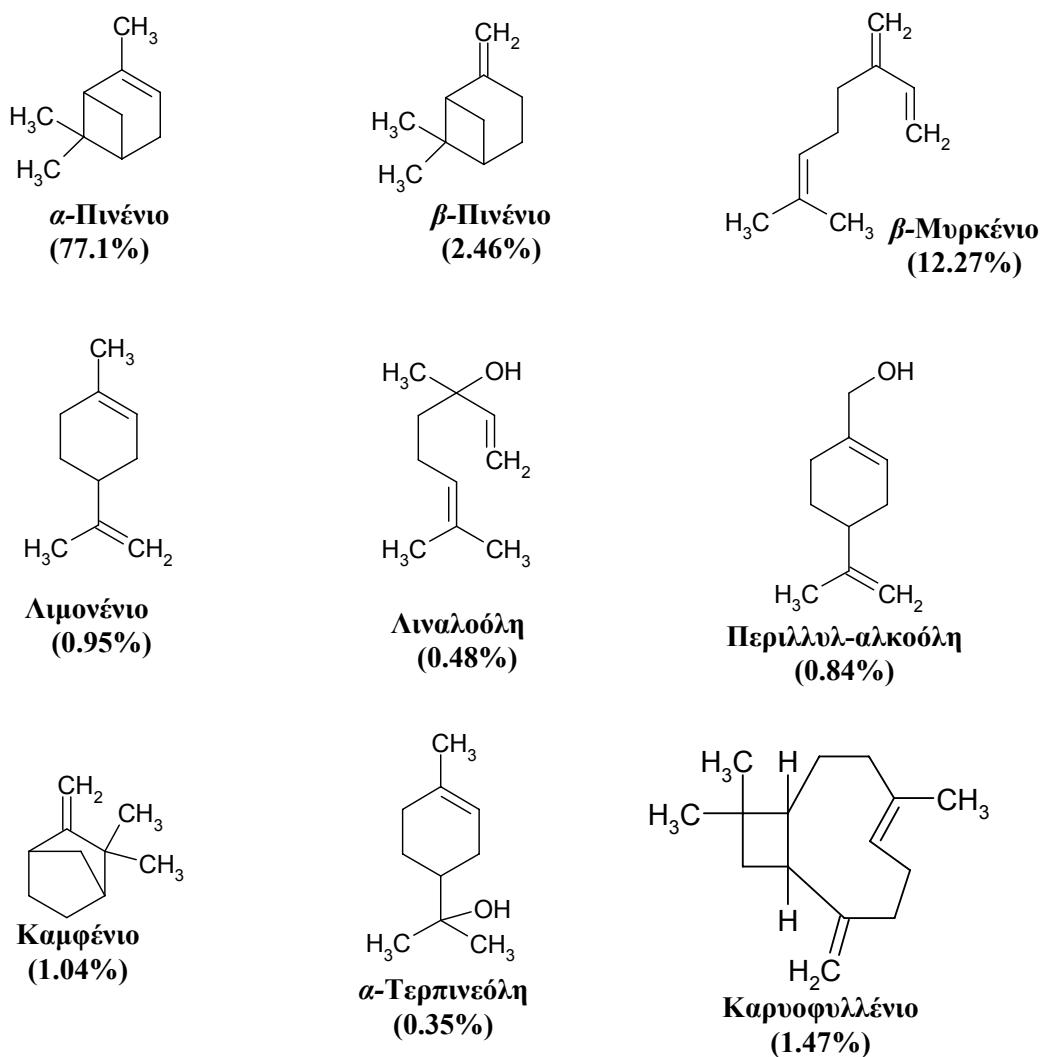
**Σχήμα 2.1** *Cis*-1,4-πολύ-β-μυρκένιο, βασικό συστατικό της μαστίχας Χίου

Το μαστιγέλαιο, απαντάται σε ποσοστό μόλις 2% και αποτελείται κατά βάση από μονοτερπένια. Η σύσταση του μαστιγελαίου παρατίθεται στον Πίνακα 2.1 [Papageorgiou *et al.*, 1991].

**Πίνακας 2.1** Σύσταση του μαστιγελαίου [Papageorgiou *et al.*, 1991]

| Συστατικό                   | Συγκέντρωση (%) |
|-----------------------------|-----------------|
| 2-Εννεανόνη                 | 0.03            |
| 6-Μεθυλ-5-επτεν-2-όνη       | 0.01            |
| <i>trans</i> -Καρβεόλη      | 0.04            |
| $\alpha$ -Κοπαένιο          | 0.01            |
| Ανθόλη                      | 0.23            |
| $\alpha$ -Πινένιο           | 77.1            |
| $\alpha$ -Τερπινεόλη        | 0.35            |
| $\beta$ -Μυρκένιο           | 12.27           |
| $\beta$ -Πινένιο            | 2.46            |
| $\gamma$ -Τερπινένιο        | 0.08            |
| Δεκαϋδρο- <i>p</i> -κυμένιο | 0.01            |
| $\delta$ -Καντινένη         | 0.01            |
| Καμφένιο                    | 1.04            |
| Καρνοφυλλένιο               | 1.47            |
| Λιμονένιο                   | 0.95            |
| Λιναλοόλη                   | 0.48            |
| Μεθυλοευγενόλη              | 0.02            |
| Μεθυλοισοευγενόλη           | 0.25            |
| Μυρτενάλη                   | 0.13            |
| Μυρτενόλη                   | 0.09            |
| ο-Κρεσόλομεθυλ-αιθέρας      | 0.44            |
| Οξικό βορνύλιο              | 0.18            |
| Περυλλέν                    | 0.34            |
| Περυλλυλοαλκοόλη            | 0.84            |
| <i>p</i> -Κυμένιο           | 0.13            |
| Τερπινολένιο                | 0.05            |
| Απροσδιόριστο               | 0.99            |
| Σύνολο                      | 100.00          |

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές η σύσταση του αιθέριου ελαίου που προέρχεται από την ρητίνη του μαστιχοφόρου σχίνου *Pistacia lentiscus* var. *Chia*, που καλλιεργείται συστηματικά στην Ελλάδα στο νησί Χίος αποτελείται από  $\alpha$ -πινένιο (66.5%),  $\beta$ -μυρκένιο (8.4 %),  $\beta$ -πινένιο (3.3%), λιναλόλη (2.8%), *trans*-καρυοφυλλένιο (2.0%), λιμονένιο (1.3%) και *o*-κρεσολομεθύλιο (1.1%) [Magiatis *et al.*, 1999]. Παρατηρείται ότι η σύσταση του μαστιχελαίου ανάλογα με την βιβλιογραφική αναφορά [Parageorgiou *et al.*, 1991; Magiatis *et al.*, 1999] παρουσιάζει διακύμανση στην περιεκτικότητα των συστατικών του. Η διακύμανση αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι η σύσταση του μαστιχελαίου κατά τη στιγμή της εκροής του από το δένδρο είναι διαφορετική από αυτή που παρατηρείται μετά από τρεις ημέρες από τη συλλογή του. Οπότε δείγματα μαστιχελαίου διαφορετικής χρονικής στιγμής περιέχουν και διαφορετική σύσταση. Οι κυριότερες δομές των συστατικών του μαστιχελαίου φαίνονται στο Σχήμα 2.2 που ακολουθεί.



**Σχήμα 2.2.** Κυριότερες δομές συστατικών του μαστιχελαίου

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι το αιθέριο έλαιο που προέρχεται από το μαστιχοφόρο σχίνο *Pistacia lentiscus* και καλλιεργείται στο δυτικό τμήμα της Τουρκίας αποτελείται από β-πινένιο (39.0%), α-πινένιο (22.0%), α-υαλαγκένιο (4.0%), λιμονένιο (3.8%), εννεανάλη (3.5%), βορνεόλη (3.0%) και βερμπενόνη (2.0%) [Kordali *et al.*, 2003]. Η διαφορά που παρατηρείται στην επί τοις εκατό σύσταση του μαστιχελαίου από το μαστιχοφόρο σχίνο *Pistacia lentiscus* που καλλιεργείται στην Τουρκία σε σχέση με αυτό που καλλιεργείται στην Χίο, αποδίδεται στην διαφορετική γεωγραφική κατανομή που λαμβάνει χώρα η καλλιέργεια του δενδρυλλίου, καθώς επικρατούν διαφορετικές κλιματικές συνθήκες. Η διαφορά αυτή είναι που ενίσχυσε την ονομασία της μαστίχας Χίου σε μοναδικό ελληνικό προϊόν, προστατευόμενης ονομασίας προέλευσης (Π.Ο.Π) αναγνωρισμένο από την Ευρωπαϊκή Ένωση.

### 2.1.3 Ιδιότητες και Χρήσεις Μαστιχελαίου

Γενικά η Μαστίχα Χίου και πιο συγκεκριμένα το μαστιχέλαιο ήταν γνωστά από την αρχαιότητα, τόσο για το μοναδικό άρωμα, όσο και για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες [Palevitch and Yaniv, 2000; Janakat and Al-Merie, 2002; Ljubuncic *et al.*, 2005]. Σήμερα η βιολογική δράση της μαστίχας Χίου και του αιθέριου ελαίου της, έχουν εκτιμηθεί σε έρευνες *in vitro* σχετικές με την ικανότητα πρόληψης αρκετών ασθενειών. Πολυάριθμες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τόσο η ρητίνη όσο και το αιθέριο έλαιο επιδεικνύουν αντιμικροβιακές ιδιότητες σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων και παθογόνων μυκήτων [Tassou and Nychas, 1995; Lauk *et al.*, 1996; Huwez *et al.*, 1999; Magiatis *et al.*, 1999; Marone *et al.*, 2001; Kordali *et al.*, 2003; Daifas *et al.*, 2004; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Benhammou *et al.*, 2008], αντιοξειδωτική δραστηριότητα [Andrikopoulos *et al.*, 2003; Barra *et al.*, 2007; Benhammou *et al.*, 2008], η οποία πιθανώς να οφείλεται στις φαινολικές ενώσεις που περιέχει [Kaliora *et al.*, 2004], ηπατοπροστατευτική δράση [Janakat and Al-Merie, 2002; Triantafyllou *et al.*, 2007] καθώς και δράση ενάντια στη γαστραλγία και στη δυσπεψία [Al-Said *et al.*, 1986].

Ειδικότερα, το μαστιχέλαιο που εκχυλίζεται από την ρητίνη του μαστιχοφόρου σχίνου *Pistacia lentiscus* var. *Chia*, έχει παρατηρηθεί να έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες [Grassmann *et al.*, 2000; Digrak *et al.*, 2001; Janakat and Al-Merie, 2002]. Πράγματι, λόγω της ισχυρής αντιφλεγμονώδους δράσης του, δρα επουλωτικά λύοντας τις φλεγμονές συγκεκριμένων οργάνων ξεκινώντας από περιοδοντίτιδες, οισοφαγίτιδες, γαστρίτιδες, δωδεκαδακτυλικό έλκος μέχρι τις κολίτιδες και τις αιμορροΐδες.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες του μαστιχελαιίου, είναι η αντικαρκινική και η αντιαγγειογενετική δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Προς την κατεύθυνση αυτή, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το μαστιχέλαιο ήταν ικανό να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κύτταρων και την επιβίωση των K562 λευκαιμιακών κύτταρων στον άνθρωπο [Loutrari *et al.*, 2006]. Επίσης σε μελέτη της δράσης εκχυλίσματος μαστίχας σε καρκινικά κύτταρα εντέρου (κόλον) ανθρώπου HCT116, βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επάγει την απόπτωση μέσα από μονοπάτια κασπασών [Balan *et al.*, 2005, 2007]. Η δράση της στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων διαπιστώθηκε και στην κυτταρική σειρά μη ορμονοεξαρτώμενου καρκίνου του προστάτη PC-3 όπου σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Η δράση αυτή βρέθηκε ότι σχετίζεται με την παρεμπόδιση της ενεργοποίησης του γενικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ και της έκφρασης της κυκλίνης D1 και της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt [He *et al.*, 2006]. Τέλος, πρόσφατα διαπιστώθηκε η έντονη δράση του μαστιχελαιίου έναντι του καρκίνου του ήπατος [Doi *et al.*, 2009].

Επίσης οι σύγχρονες τάσεις στην κοσμετολογία «επιβάλλουν» την επιστροφή στις αγνές, φυτικές πρώτες ύλες. Γι' αυτό όλο και περισσότερα καλλυντικά δημιουργούνται με βάση το αιθέριο έλαιο της ρητίνης της μαστίχας Χίου [Doukas *et al.*, 2003]. Γενικά το μαστιχέλαιο, χρησιμοποιείται σε σκευάσματα που προορίζονται για την ενίσχυση της τριχοφυΐας και την προστασία από ερεθισμούς του τριχωτού της κεφαλής. Επιπλέον, οι εταιρείες καλλυντικών και αρωμάτων χρησιμοποιούν το μαστιχέλαιο στην παρασκευή αρωμάτων και κρεμών προσώπου, καθώς αποκαθιστά τις δομές κολλαγόνου και την ελαστικότητα του δέρματος, μειώνοντας έτσι το χρόνο γήρανσης του. Τέλος σε πρόσφατες έρευνες βρέθηκε ότι το μαστιχέλαιο μπορεί να καταπολεμήσει τον ερεθισμό του δέρματος που προέρχεται από απολέπιση ή αποτρίχωση [Protopapa *et al.*, 2001].

## **2.2 Τερπένια**

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, το αιθέριο έλαιο της ρητίνης της μαστίχας Χίου αποτελείται από διάφορα μονοτερπένια, με κυριότερα συστατικά το  $\alpha$ -πινένιο (77.1%) και το  $\beta$ -μυρκένιο (12.27%) [Papageorgiou *et al.*, 1991]. Η αντιμικροβιακή και η αντικαρκινική του δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στα διάφορα μονοτερπένια που περιέχει, όπως είναι το  $\alpha$ -πινένιο,  $\beta$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο, βερμπενόνη,  $\alpha$ -τερπινεόλη, και περιλλυλ-αλκοόλη. Λόγω ότι

η βιολογική δράση του μαστιχελαίου οφείλεται στην συνεργιστική δράση των τερπενίων και των οξυγονωμένων παραγώγων που περιέχει, στην ενότητα αυτή θα αναλυθεί η φύση και οι βασικές ιδιότητες των ενεργών αυτών ενώσεων.

Γενικά ο όρος ‘τερπένια’ (terpenes), αντιπροσωπεύει μια οικογένεια ενώσεων με γενικό τύπο  $C_{10}H_{16}$ , τα οποία απαντώνται στην φύση, στις πτητικές ενώσεις των αιθέριων ελαίων φυτικής προέλευσης. Βασική δομική μονάδα των τερπενίων είναι το ισοπρένιο ( $C_5H_8$ ), ενώ υποδιαιρούνται με βάση τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που περιέχουν. Έτσι τα μέλη της ομάδας με δέκα άτομα άνθρακα ( $C_{10}$ ) είναι γνωστά ως μονοτερπένια και ακολούθως με δεκαπέντε άτομα άνθρακα ( $C_{15}$ ) σεσκιτερπένια, με είκοσι άτομα άνθρακα ( $C_{20}$ ) διτερπένια, με εικοσιπέντε άτομα άνθρακα ( $C_{25}$ ) σεστετερπένια κλπ.

Τα τερπένια είναι φυσικά προϊόντα που προέρχονται από τα φυτά και τα οποία έχουν θεραπευτικές ιδιότητες και έντονη βιολογική δράση. Πολυάριθμες επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η συστηματική κατανάλωση φυτικών προϊόντων σχετίζεται με σχετική μείωση στην εμφάνιση καρκίνου [Graham *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2001; Tsuda *et al.*, 2004; Cragg and Newman, 2006; Gordaliza, 2007; Gomez-Flores *et al.*, 2009]. Πράγματι, η περιλλυλ-αλκοόλη που είναι ένα από τα πιο πολυμελετημένα μονοτερπένια έχει αποδειχθεί να είναι αναστολέας στην αγγειογένεση [Loutrari *et al.*, 2004] και να εμποδίζει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα [Bardon *et al.*, 2002]. Επίσης βρέθηκε να έχει χημείο-προστατευτικές ιδιότητες κατά της δερματικής και πνευμονικής καρκινογένεσης [Belanger, 1998]. Παράλληλα τα τερπένια λόγω των αντιμικροβιακών τους ιδιοτήτων [Koutsoudaki *et al.*, 2005] και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι αποτελούν «φυσικά» εντομοκτόνα, χρησιμοποιούνται στο στάδιο της αποθήκευσης προϊόντων αγροκαλλιέργειας. Επίσης χρησιμοποιούνται ως δομικοί λίθοι για την παραγωγή πολλών προϊόντων υψηλής βιολογικής αξίας [van Beilen *et al.*, 2005] και ως αρωματικές και χρωστικές ουσίες [Vidya and Agrawal, 2004; Vanek *et al.*, 2005].

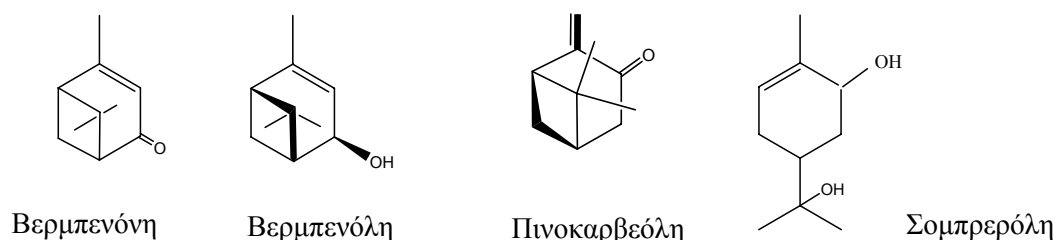
Τα τερπένια παράγονται μέσω της βιοσυνθετικής οδού του μεβαλονικού με πρόδρομο μόριο το ακέτυλο συνένζυμο Α. Γενικά η βιοσυνθετική οδός του μεβαλονικού (το οποίο αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο μεταβολίτη) οδηγεί στη σύνθεση της βασικής μονάδας με τα πέντε άτομα άνθρακα μέσω της σταδιακής συμπύκνωσης τριών μορίων ακέτυλο-συνένζυμο Α. Τα τελικά προϊόντα της οδού αυτής, το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο και το ισομερές του πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο αποτελούν τις ενεργοποιημένες πρόδρομες μορφές μορίων οι οποίες συνδυαζόμενες παράγουν τα διάφορα μόρια των τερπενίων [Glidewell, 1991].

## 2.2.1 Μονοτερπένια

Τα μονοτερπένια, όπως και άλλα τερπενοειδή, έχουν βιολογική δράση, ενώ έχουν αναγνωριστεί ως ουσίες με αντικαρκινικές ιδιότητες [Adams *et al.*, 2003]. Πρόκειται για ενώσεις με 10 άτομα άνθρακα και διακλαδισμένη αλυσίδα. Έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί περισσότεροι από 400 μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες, ενώ πρόκειται για ενώσεις οι οποίες απαντώνται όχι μόνο ως γραμμικοί (γερανιόλη, κιτρονελόλη) αλλά και ως κυκλικοί υδρογονάνθρακες (μενθόλη, καμφορά,  $\alpha$ -/ $\beta$ -πινένιο). Χρησιμοποιούνται κυρίως: α) ως δομικοί λίθοι για την παραγωγή ενώσεων υψηλής βιολογικής αξίας, β) ως πρόσθετα γεύσης και αρώματος στην βιομηχανία τροφίμων, γ) ως ενισχυτικά αρώματος στα καλλυντικά και δ) ως φυσικά εντομοαπωθητικά φιλικά προς το περιβάλλον [Kobilinsky *et al.*, 2007; Trytek *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008].

### $\alpha$ -Πινένιο

Το  $\alpha$ -πινένιο είναι μια φθηνή οργανική ένωση που ανήκει στην γενική κατηγορία των μονοτερπενίων. Απαντάται κυρίως στα αιθέρια έλαια αρκετών ειδών κωνοφόρων και αειθαλών δένδρων. Η σύνθεση του  $\alpha$ -πινενίου γίνεται από την πυροφωσφορική γερανιόλη μέσω της πυροφωσφορικής νερόλης. Είναι το κυριότερο συστατικό του μαστιχελαιού σε ποσοστό περίπου 77.1% (σε αρχικό κλάσμα που έχει συλλεχθεί αμέσως μετά την απόσταξη του αιθέριου ελαίου). Ορισμένες από τις ενώσεις που έχουν ταυτοποιηθεί ως προϊόντα αυτοοξειδωσης του  $\alpha$ -πινενίου είναι: η βερμπενόνη, η βερμπενόλη, η πινοκαρβεόλη και η σομπρερόλη. Η δομή τους φαίνεται στο Σχήμα 2.3.



**Σχήμα 2.3.** Κυριότερες δομές προϊόντων οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου

Η τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου προς διάφορα οξυγονωμένα παράγωγα του αναμένεται να αυξήσει το πεδίο εφαρμογής του λόγω της υψηλής βιολογικής δράσης των παραγώγων του [Koutsoudaki *et al.*, 2005] και της ευρείας χρήσης των εποξειδίων στην οργανική σύνθεση

[Skouridou *et al.*, 2003b,c]. Επίσης το  $\alpha$ -πινένιο αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο στην παραγωγή χημικών όπως συστατικών του αεροζόλ [Ma *et al.*, 2008], αμινοδιολών [Szakonyi *et al.*, 2008], πρωτοταγών, δευτεροταγών και τριτοταγών  $\gamma$ -άμινο-αλκοολών [Szakonyi *et al.*, 2006],  $\beta$ -λακτάμης [Szakonyi *et al.*, 2000], δικαρβοξυλικού οξέος όπως του *cis*-πινικού οξέος [Jenkin *et al.*, 2000]. Τέλος το  $\alpha$ -πινένιο βρέθηκε να προκαλεί οξειδωτικό στρες στις ρίζες των φυτών [Singh *et al.*, 2006].

### **Λιμονένιο**

Το λιμονένιο (η χημική ονομασία του οποίου είναι το 1-μεθυλ-4-(προπ-1'-εν-2'-υλ)κυκλοεξένιο) είναι ένα χειρόμορφο μόριο και αποτελείται από δύο εναντιομερή: *D*-λιμονένιο ((+)-λιμονένιο) (*R*-εναντιομερές), *L*-λιμονένιο (*S*-εναντιομερές), τα οποία τροποποιούνται εύκολα σε προϊόντα υψηλής αξίας όπως αυτό της περιλλυλ-αλκοόλης και της  $\alpha$ -τερπινεόλης [Speelmans *et al.*, 1998] (Σχήμα 2.2). Γενικά είναι μία μη πολική ένωση η οποία δεν διαλύεται στο νερό, ενώ παρουσιάζει μεγάλη σταθερότητα σε όξινες συνθήκες pH μέχρι και 3.5 [Adams *et al.*, 2003]. Στο μαστιχέλαιο απαντάται σε ποσοστό 0.95%. Χαρακτηρίζεται από έντονη αντιμυκητιακή αλλά και αντικαρκινική δράση [Lu *et al.*, 2004], ενώ αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο στην παραγωγή οργανικών συστατικών του αεροζόλ [Walser *et al.*, 2008], του  $\pi$ -κυμενίου το οποίο είναι μια σημαντική ενδιάμεση δομική ένωση στην παραγωγή χημικών [Martin-Luengo *et al.*, 2008]. Επίσης το λιμονένιο έχει προταθεί ως φιλικός προς το περιβάλλον οργανικός διαλύτης που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία ως καθαριστικό και απορρυπαντικό, αντικαθιστώντας τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες και τους χλωροφθοράνθρακες. Στα προϊόντα αυτά το ποσοστό του λιμονενίου κυμαίνεται μεταξύ λίγων ποσοστιαίων μονάδων έως 100% [Kiefer *et al.*, 1994]. εναντιομερή του λιμονενίου

### **Περιλλυλ-αλκοόλη**

Η περιλλυλ-αλκοόλη είναι μία κυκλική πρωτοταγής μονοτερπενόλη, υδροξυλιωμένος μεταβολίτης του λιμονενίου, το οποίο είναι το κύριο μονοτερπένιο του αιθέριου ελαίου που προέρχεται από τη φλούδα του πορτοκαλιού. Η αντίστοιχη αλδεϋδης της είναι η περιλλ-αλδεϋδη. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες κλινικές μελέτες που αφορούν τη δράση της περιλλυλ-αλκοόλης κατά κακοήθων όγκων [Lebedeva *et al.*, 2008].

## ***β- Μυρκένιο***

Είναι ένα μονοτερπένιο το οποίο απαντάται φυσικά σε διάφορα αιθέρια έλαια και χρησιμοποιείται κυρίως στην βιομηχανία παραγωγής αρωμάτων [Steflitsch and Steflitsch, 2008]. Το άρωμα του είναι τόσο έντονο που πολλές φορές χρησιμοποιείται απευθείας. Επίσης αποτελεί σημαντικό ενδιάμεσο δομικό λίθο για την παραγωγή ενώσεων [Glidewell, 1991; Akutagawa, 1992] που χρησιμοποιούνται ως προσθετό γεύσης ή αρώματος όπως η γερανιόλη, νερόλη, λιναλοόλη, μενθόλη, κιτράλη, κιτρονερόλη και κιτρονεράλη [Serra *et al.*, 2005].

## ***Νερόλη***

Η νερόλη είναι ένα φυσικό μονοτερπένιο που απαντάται σε διάφορα αιθέρια έλαια και αποτελεί το *cis* ισομερές της γερανιόλης. Η αντίστοιχη αλδεϋδης της είναι η νεράλη. Η κιτράλη είναι το μίγμα γερανιάλης (*trans*-κιτράλη) και νεράλης (*cis*-κιτράλη) και είναι βασικό συστατικό πολλών αιθέριων ελαίων.

## ***Γερανιόλη***

Η γερανιόλη είναι ένα φυσικό αντοξειδωτικό το οποίο απαντάται σε μικρές ποσότητες σε διάφορα αιθέρια ελαία. Χρησιμοποιείται κυρίως στην βιομηχανία αρωμάτων αλλά και ως πρόσθετο γεύσης. Στον τομέα της ιατρικής έχει χρησιμοποιηθεί στην καταπολέμηση του καρκίνου σε ανθρώπινο οργανισμό [Carnesecchi *et al.*, 2002]. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενζυμική τροποποίηση της γερανιόλης οδηγεί στον σχηματισμό της αντίστοιχης αλδεϋδης, την γερανιάλη [Kiljunen and Kanerva, 2000].

## ***Λιναλοόλη***

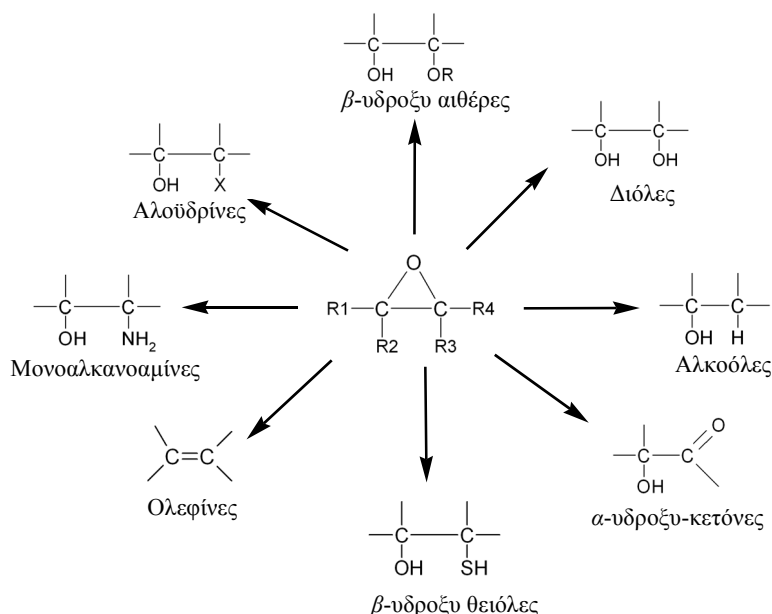
Η λιναλοόλη είναι μια αλκοόλη η οποία ανήκει στην γενική κατηγορία των τερπενίων. Απαντάται σε πολλά αιθέρια έλαια ενώ στο μαστιχέλαιο βρίσκεται σε ποσοστό 0.48%. Χρησιμοποιείται κυρίως στην παρασκευή καλλυντικών ως πρόσθετο αρώματος.

### 2.2.2 Εποξειδία Μονοτερπενίων

Όπως ειπώθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, η ενζυμική τροποποίηση των μονοτερπενίων (π.χ του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου) προς τα αντίστοιχα εποξειδία αναμένεται να αυξήσει το πεδίο εφαρμογής τους λόγω της ευρείας χρήσης των εποξειδίων στην οργανική σύνθεση. Η σημασία των εποξειδίων στην οργανική σύνθεση προκύπτει από την παρουσία του εποξειδικού δακτυλίου σε πολλά φυσικά προϊόντα αλλά και κυρίως από το γεγονός πως η σχάση του δακτυλίου αυτού οδηγεί σε νέα προϊόντα, συχνά με τη δημιουργία νέων δεσμών άνθρακα-άνθρακα [de Vries and Janssen, 2003]. Λόγω της σπουδαιότητάς τους, έχει παρατηρηθεί μεγάλη πρόοδος στην εκλεκτική σύνθεση των εποξειδίων. Το 1980, ανακαλύφθηκε η Katsuki-Sharpless καταλυτική ασύμμετρη εποξειδωση αλλυλικών αλκοολών, στην οποία ένας καταλυτής για πρώτη φορά επέδειξε τόσο υψηλή εκλεκτικότητα. Επίσης η ασύμμετρη κατάλυση εποξειδωσης ολεφινών μέσω της χρήσης συμπλόκου Mn-σαλενίου [Jacobsen, 1993] καθώς και χειρόμορφης κετόνης [Frohn and Shi, 2000] ως οξειδωτικοί φορείς ήταν μέθοδοι που εδραιώθηκαν στην οργανική σύνθεση. Στις αρχές της δεκαετίας του 90, μελετήθηκε η εμπλοκή ενζυμικών συστημάτων για την επίτευξη του παραπάνω στόχου. Έτσι πρώτος ο Bjorkling και οι συνεργάτες [Bjorkling *et al.*, 1990, 1992], επιχείρησαν την σύνθεση εποξειδίου, μέσω της ενδιάμεσης ενζυμικής σύνθεσης υπεροξυ-καρβοξυλικού οξέος, η οποία περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενο κεφάλαιο.

Λόγω της διαδραστικότητας του εποξειδικού δακτυλίου, τα εποξειδία είναι χρήσιμες ενδιάμεσες ενώσεις για την παραγωγή υψηλής αξίας χημικών όπως π.χ. φαρμακευτικά προϊόντα [de Vries and Janssen, 2003]. Τα ρακεμικά μείγματα εποξειδίων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή ενεργών εποξειδίων σε καθαρή εναντιομερική μορφή μέσω χημικών [Jacobsen, 2000] και βιοκαταλυτικών διεργασιών [Bjorkling *et al.*, 1990, 1992]. Τα εποξειδία είναι σημαντικά ενδιάμεσα για την παραγωγή περαιτέρω παραγώγων επειδή ενεργούν δραστικά με πυρηνόφιλα άτομα άνθρακα, αζώτου, οξυγόνου, θείου ή και αλογόνα [de Vries and Janssen, 2003]. Μια από τις μεγαλύτερες χρήσεις των εποξειδίων έγκειται στην παραγωγή εποξυ-ρητινών. Όλες οι παραγόμενες ρητίνες περιέχουν τον χαρακτηριστικό τριμελές δακτύλιο των οξιρανίων [Chiang and Hsieh, 2008]. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι αρκετά εποξειδία έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι παθογόνων μικροοργανισμών [Hu *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2007]. Επιπλέον η παραγωγή εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου είναι σημαντική καθώς αποτελεί ενδιάμεσο δομικό λίθο για την παραγωγή κορεσμένων αλκοολών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία αρωμάτων. Γενικά τα

προϊόντα που μπορούν να παραχθούν, εάν χρησιμοποιηθούν εποξειδία ως δομικοί λίθοι απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 2.4).



**Σχήμα 2.4** Προϊόντα εποξειδίων

### 2.2.3 Βιολογική δράση μονοτερπενίων και οξυγονωμένων παραγώγων τους

Είναι γνωστό ότι η φύση υπήρξε η κυριότερη πηγή φαρμάκων για πάρα πολλούς αιώνες [Crowell, 1999; Balunas and Kinghorn, 2005; Lin *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2008; Salminen *et al.*, 2008]. Πράγματι η χρήση φυτικών και άλλων φυσικών προϊόντων για θεραπευτικούς σκοπούς χρονολογείται από τις αρχές της ανθρωπότητας [Cragg, 1997]. Σήμερα περισσότερο από το 25% των φαρμάκων που διατίθενται στην αγορά είναι φυσικά προϊόντα ή προέρχονταν από φυσικά προϊόντα. Τα αιθέρια έλαια, που ανήκουν στην κατηγορία των φυτικών προϊόντων, είναι ένα μίγμα πολυάριθμων μορίων, των οποίων η βιολογική τους δράση είναι αποτέλεσμα είτε της συνεργιστικής δράσης των μορίων τους είτε της βιολογικής δράσης των κύριων ενώσεων τους [Bakkali *et al.*, 2008]. Γενικά, τα κύρια συστατικά βρέθηκε να αντανακλούν σημαντικά στα βιοφυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των αιθέριων ελαίων από τα οποία προέρχονται [Ipek *et al.*, 2005]. Παρόλα αυτά είναι πιθανόν η δραστηριότητα των κύριων συστατικών να ρυθμίζεται και από άλλα δευτερεύοντα μόρια [Franzios *et al.*, 1997; Santana-Rios *et al.*, 2001; Hoet *et al.*, 2006]. Κατά αυτό τον τρόπο η βιολογική δράση του μαστιγελαίου μπορεί να αποδοθεί στις βιοενεργές του ενώσεις.

Ένας από τους σημαντικότερους λόγους για τους οποίους το μαστιχέλαιο και τα βασικά του συστατικά παρουσιάζουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον, παρά την τεράστια πρόοδο που έχει συντελεστεί στη χημική σύνθεση νέων φαρμάκων, είναι ότι αναστέλλουν την αγγειογένεση, μία διαδικασία σημαντική για την ανάπτυξη και τη μετάσταση των καρκινικών όγκων, και επάγουν επιλεκτική απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα αφήνοντας ανεπηρέαστα τα υγιή κύτταρα [Loutrari *et al.*, 2004, 2006]. Γενικά η αντικαρκινική επίδραση των περιεχόμενων μονοτερπενίων επιτυγχάνεται με μικρή ή και καθόλου τοξικότητα [Elson and Yu 1994; Crowell, 1994a,b] όχι μόνο στο να εμποδίσουν τον σχηματισμό ή και την εξέλιξη του καρκίνου, αλλά και την υποτροπίαση ήδη υπάρχουσων κακοήθων όγκων.

Πιο συγκεκριμένα το λιμονένιο και η περιλλύλ αλκοόλη έχουν αποδεδειγμένη χημειοπροστατευτική δράση έναντι πολλών καρκινικών τύπων. Το λιμονένιο έχει ένα ευρύ φάσμα αντικαρκινικών ιδιοτήτων [Elson and Yu, 1994, Crowell, 1994a,b; Lu *et al.*, 2004; Berchtold *et al.*, 2005]. Διαπιστώθηκε ότι όταν χορηγείται σε καθαρή μορφή ή ως έλαιο στη φλούδα του πορτοκαλιού (95% λιμονένιο) αναστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου στο μαστό των τρωκτικών, στο δέρμα, στο συκώτι, στο στομάχι και στα πνευμόνια [Elegbede *et al.*, 1986; Dietrich and Swenberg 1991; Gould *et al.*, 1994; Uedo *et al.*, 1999].

Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες κλινικές μελέτες που αφορούν τη δράση της περιλλύλ-αλκοόλης κατά κακοήθων όγκων, χωρίς όμως να διευκρινίζεται σε ποιό εναντιομερές της αλκοόλης οφείλεται η παρατηρούμενη δράση. Η περιλλυλ-αλκοόλη βρέθηκε να έχει χημειοθεραπευτική δράση κατά μαστικών όγκων σε αρουραίους [Jung and Row, 1998] και ότι προκαλεί απόπτωση σε PC12 κύτταρα [Boon *et al.*, 2000]. Επίσης πρόσφατα, ανακαλύφθηκε να έχει σημαντική χημειοπροστατευτική επίδραση στον παγκρεατικό καρκίνο [Lebedeva *et al.*, 2008]. Εκτός όμως από την αντικαρκινική δράση η περιλλύλ-αλκοόλη, ενεργεί και ως αγγειογεννητικός αναστολέας [Loutrari *et al.*, 2004].

Επίσης η γερανιόλη σε κανονικές συνθήκες έχει αντικαρκινικές ιδιότητες έναντι της λευχαιμίας, του ηπατώματος και του μελανώματος στα ποντίκια [Shoff *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1995]. Μελέτες έδειξαν ότι η γερανιόλη μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων στο πάγκρεας χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα χολιστερόλης στο αίμα [Burke *et al.*, 1997] αλλά και την αναστολή ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του κολικού κατά την θεραπεία με 5-φθοριοουρακίλη [Carnesecchi *et al.*, 2001, 2002]. Επιπροσθέτως, η καρβεόλη [Crowell *et al.*, 1991] και η μενθόλη [Russin *et al.*, 1989] έχουν αποδεδειγμένη χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου του μαστού στα ποντίκια όταν αυτά τρέφονταν μονό με 10% της συνολικής τους διατροφής με τα συγκεκριμένα μονοτερπένια

στα πρώτα στάδια του καρκίνου. Σε πρόσφατες μελέτες, ερευνήθηκε η αντικαρκινική δυνατότητα της κιτράλης (μίγμα γερανιάλης και νεράλης), η οποία διαπιστώθηκε να έχει σημαντική επίδραση κατά την απόπτωση [Dudai *et al.*, 2005; De Martino *et al.*, 2008].

Η λιναλοόλη εκτός από την μέτρια αναστολή που ασκεί στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [Ravizza *et al.*, 2008] αποδείχθηκε να έχει αντιφλεγμονώδης [Peana *et al.*, 2002], αλλά και αντιοξειδωτική δράση [Hussain *et al.*, 2008]. Τέλος το  $\beta$ -μυρκένιο παρατηρήθηκε να έχει ανασταλτικές ιδιότητες σε μικροσωμικά ένζυμα που σχετίζονται με την ενεργοποίηση γενεοτοξικών ουσιών [De-Oliveira *et al.*, 1997]. Επίσης ένα μεγάλο πλήθος μονοτερπενίων είναι υπεύθυνα για αντιβακτηριακές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα η βερμπενόνη, η  $\alpha$ -τερπινεόλη και η λιναλόλη είναι υπεύθυνες για την αντιβακτηριακή δράση του μαστιγελαίου [Koutsoudaki *et al.*, 2005]. Επίσης η *cis*-βερμπενόλη σε πρόσφατες μελέτες βρέθηκε να επιδεικνύει μεγάλη νευροπροστατευτική δράση [Chang *et al.*, 2007].

Συνοψίζοντας, τα μονοτερπένια (π.χ *d*-λιμονένιο, γερανιόλη,  $\beta$ -μυρκένιο) και τα οξυγονωμένα παράγωγα τους (π.χ περιλλύλ αλκοόλη, λιναλοόλη, κιτράλη, βερμπενόνη, βερμπενόλη,  $\alpha$ -τερπινεόλη) έχουν αποδεδειγμένα έντονη βιολογική δράση. Έτσι με τη χρήση της βιοτεχνολογίας για την βιομετατροπή των άφθονων-φθηνών μονοτερπενίων σε οξυγονωμένα παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία, μπορεί κανείς να ισχυριστεί ότι η φύση ασκεί μια δυναμική επιρροή στο σχεδιασμό μοντέρνων φαρμάκων.



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

---

### 3.1 Γενικά

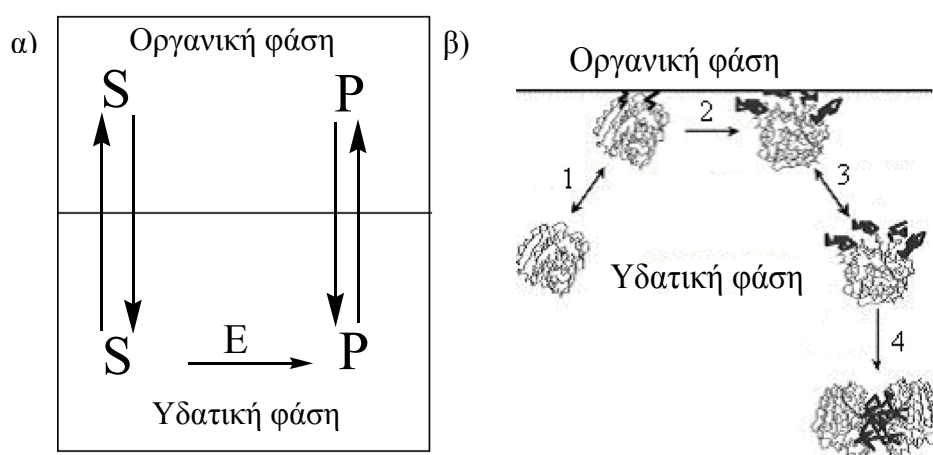
Ιστορικά η ενζυμική κατάλυση έχει εφαρμοστεί μόνο σε υδατικά συστήματα, καθώς το νερό είναι το φυσικό περιβάλλον στο οποίο τα ένζυμα εκφράζουν τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Είναι γνωστό ότι η προσθήκη πολικών οργανικών διαλυτών (ακετόνη, αιθανόλη, διοξάνιο κλπ), σε ένα υδατικό ενζυμικό διάλυμα, οδηγεί συχνά σε αποδιάταξη της πρωτεϊνικής δομής και κατά συνέπεια σε απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Με βάση την παρατήρηση αυτή, είχε διαμορφωθεί η αντίληψη ότι και οι μη πολικοί οργανικοί διαλύτες οδηγούν σε αδρανοποίηση των ενζύμων και θα πρέπει να αποφεύγονται, ως μη συμβατοί, σε ένα βιοκαταλυτικό σύστημα αντίδρασης. Η συμβατική αυτή σκέψη έχει πλέον καταρριφθεί μετά την πρωτοποριακή εργασία του Klibanov σχετικά με τις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων σε περιβάλλον με ελάχιστη ή καθόλου υδατική φάση [Klibanov *et al.*, 1977; Klibanov, 1986, 1990, 1997, 2001]. Τα συστήματα αυτά ονομάζονται **μη συμβατικά ή μη υδατοσυμβατά**. Με τον όρο μη συμβατικά σύστημα αναφερόμαστε σε συστήματα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό στα οποία τα ένζυμα ή τα κύτταρα διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες [Krieger *et al.*, 2004; Halling, 2004; Bommarius and Riebel 2004; Illanes, 2008].

### 3.2 Ιστορική Αναδρομή

Τα πρώτα πειράματα που τοποθετούσαν τα ένζυμα σε συστήματα διαφορετικά από τα υδατικά σημειώνονται στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα [Hill, 1898; Kastle and Loevenhart, 1900]. Αρχικά επιχειρήθηκε η προσθήκη μικρών ποσοτήτων πολικών διαλυτών που αναμιγνύονται με το νερό, όπως αιθανόλη ή ακετόνη σε υδατικά ενζυμικά συστήματα, ούτως ώστε να διασφαλιστεί ότι σε ένα περιβάλλον με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό το ένζυμο θα διατηρούσε την καταλυτική του δραστηριότητα.

Στη συνέχεια ακολούθησαν τα διφασικά υγρά συστήματα (που αφορούν υδατικά ενζυμικά συστήματα μαζί με οργανικούς διαλύτες που δεν αναμιγνύονται με το νερό, όπως ισοοκτάνιο ή επτάνιο), στα οποία τα υποστρώματα από την οργανική φάση διαχέονταν στην υδατική, τροποποιούνταν ενζυμικά και τελικώς τα προϊόντα εκχυλίζονταν στην οργανική

φάση [Barberis *et al.*, 2002; Bordusa, 2002]. Στο Σχήμα 3.1.α. παρουσιάζεται μια ενζυμική αντίδραση σε διφασικό σύστημα. Τα πλεονεκτήματα των διφασικών συστημάτων έγκειται στον εύκολο τρόπο παρασκευής τους, την εύκολη ανάκτηση τόσο των προϊόντων της αντίδρασης όσο και του βιοκαταλύτη, αλλά και στον περιορισμό της αναστολής της ενζυμικής δράσης από το προϊόν ή το υποστρώμα και την μετατόπιση της χημικής ισορροπίας [Khmelnitsky *et al.*, 1988a]. Γενικά κατά την εκχύλιση των προϊόντων στην οργανική φάση, η διεπιφάνεια των δύο φάσεων θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα μεταφοράς μάζας, αλλά και η πιθανότητα αδρανοποίησης του βιοκαταλύτη [Cassells and Halling, 1990; Feliu *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 2001; Betancor *et al.*, 2004; Baldascini and Janssen, 2005]. Στο Σχήμα 3.1.β παρουσιάζονται οι πιθανοί μηχανισμοί αδρανοποίησης του βιοκαταλύτη κατά την επαφή του με την διεπιφάνεια.



**Σχήμα 3.1.** α) Σχηματική παρουσίαση ενζυμικής αντίδρασης σε διφασικό σύστημα. S= υποστρώμα, P= προϊόν, E= ένζυμο, β) Προτεινόμενος μηχανισμός αδρανοποίησης του ενζύμου στην διεπιφάνεια νερού οργανικού διαλύτη. Βήμα 1: αντιστρεπτή προσρόφηση του ενζύμου στην διεπιφάνεια και πιθανή αποδιάταξη της δομής του, Βήμα 2: περαιτέρω αποδιάταξη της δομής του ενζύμου, Βήμα 3: απομάκρυνση μορίων από την δομή του ενζύμου, Βήμα 4: μη αντιστρεπτή συσσωμάτωση και καθίζηση του απενεργοποιημένου πρωτεϊνικού μορίου.

Σημαντικό περιορισμό στα συστήματα αυτά όμως αποτελεί και η εμφάνιση περιορισμών κατά τη μεταφορά του υποστρώματος από την οργανική φάση στην υδατική (όπου εντοπίζεται το ένζυμο). Με την εφαρμογή των «ψεύδο-διφασικών» συστημάτων όπως

είναι τα μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη ή αντίστροφα μικκύλια, τα οποία σταθεροποιούνται με την παρουσία επιφανειοενεργών μορίων, το πρόβλημα του περιορισμού της μεταφοράς του υποστρώματος στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου μειώθηκε [Martinek *et al.*, 1986; Luisi *et al.*, 1988; Tuena de Gomez-Puyou and Gomez-Puyou, 1998]. Έτσι μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, υπήρχε η αντίληψη ότι αφού τα ένζυμα μετουσιώνονται σε μίγματα υδατικών-οργανικών διαλυτών, το ίδιο θα ισχύει και σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες. Βέβαια η υπόθεση αυτή έχει αποδειχτεί ότι δεν ισχύει. Ο λόγος για αυτή την περίεργη συμπεριφορά των ενζύμων, είναι ότι υπό απουσία νερού τα ένζυμα είναι πολύ άκαμπτα με αποτέλεσμα να μην επιτρέπεται το ξεδίπλωμα των αλυσίδων του πρωτεϊνικού μορίου και έτσι να αποφεύγεται η μετουσίωση του. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πολλά ένζυμα σε κρυσταλλική μορφή ή ως λυοφιλιωμένη σκόνη [Klibanov, 2001; Rajan and Abraham, 2008] ή ακινητοποιημένα σε στερεούς φορείς [Hudson *et al.*, 2005; Secundo and Carrea, 2005] να διατηρούν τη δομή τους ακόμα και σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες.

Στην περαιτέρω έρευνα διαπιστώθηκε ότι σημαντικό ρόλο διαδραμάτισε και η περιεκτικότητα του νερού στο μέσο της αντίδρασης. Γενικά, η βέλτιστη ποσότητα νερού βρίσκεται συχνά σε ένα στενό εύρος, το οποίο εξαρτάται από το είδος του ενζύμου. Η α-χυμοθρυψίνη χρειάζεται μόνο 50 μόρια νερού ανά ενζυμικό μόριο προκειμένου να παραμείνει καταλυτικά ενεργή [Zaks and Klibanov, 1986]. Το υπάρχον νερό σε ένα βιολογικό σύστημα μπορεί να διαχωριστεί σε δύο διακριτές κατηγορίες: α) τη πλειονότητα (>98%) η οποία λειτουργεί σαν ο κύριος διαλύτης και β) την μειονότητα στην οποία ένα πολύ μικρό μέρος του νερού είναι, «προσδεμένο» με την επιφάνεια του μορίου του ενζύμου. Το τελευταίο είναι που παίζει κρίσιμο ρόλο στην ενζυμική δομή [Halling, 2004]. Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η ποσότητα του νερού που είναι παρούσα σε ένα μίγμα αντίδρασης χρησιμοποιείται ο θερμοδυναμικός όρος της «ενεργότητας του νερού» ( $a_w$ ). Η θερμοδυναμική ιδιότητα του νερού δίνεται από τη σχέση :

$$a_w = \frac{p}{p_o} \quad (3.1)$$

Με  $p$  : πίεση ατμών του νερού στο διάλυμα, και  $p_o$  : πίεση ατμών του καθαρού νερού.

Η «ενεργότητα νερού» είναι εξ ορισμού ίδια σε όλες τις φάσεις ενός πολυφασικού συστήματος και από σύμβαση παίρνει την τιμή 1 για το καθαρό νερό. Υπολογίζεται από το λόγο της μερικής πίεσης των ατμών του νερού του συστήματος προς αυτή του καθαρού νερού στην ίδια θερμοκρασία. Γενικά η «ενεργότητα νερού» καθορίζει την ποσότητα του νερού που συνδέεται με το ένζυμο, επηρεάζοντας σημαντικά την ευελιξία της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση και την καταλυτική ενεργότητα του ενζύμου [Adlercreutz, 2000]. Επιπλέον η

«ενεργότητα νερού» επηρεάζει όχι μόνο την ταχύτητα της αντίδρασης [Harper *et al.*, 2001] αλλά την ενάντιο-εκλεκτικότητα [Wehtje *et al.*, 1997; Persson *et al.*, 2002] και τη θέση ισορροπίας της αντίδρασης. Για το λόγο αυτό ο έλεγχος της  $a_w$  αποτελεί συνήθη τακτική κατά την διεξαγωγή των ενζυμικών αντιδράσεων. Πιο συγκεκριμένα σε πολλές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης εστεροποίησης σχηματίζεται νερό, με αποτέλεσμα η φυσική ποσότητα του νερού να αυξάνει κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Αν το επίπεδο του νερού είναι πολύ υψηλό η απόδοση της αντίδρασης και η ταχύτητα της θα μειωθεί αφού η αντίστροφη αντίδραση, η υδρόλυση θα ευνοείται [Ma *et al.*, 2002]. Για τους παραπάνω λόγους η «ενεργότητα νερού» πρέπει να ελέγχεται και να διατηρείται σταθερή κατά την διάρκεια των ενζυμικών αντιδράσεων [Zacharis *et al.*, 1997; Fontes *et al.*, 2003]. Η παρουσία της οργανικής φάσης στο βιοκαταλυτικό σύστημα συνοδεύεται από μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1.

**Πίνακας 3.1.** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα [Loughlin, 2000; Bommarius and Broering, 2005; Illanes, 2008].

| <b>Πλεονεκτήματα</b>                                                                                              | <b>Μειονεκτήματα</b>                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Αυξημένη διαλυτότητα μη πολικών υποστρωμάτων και προϊόντων                                                        | Απενεργοποίηση από τους οργανικούς διαλύτες                     |
| Ευκολία ανάκτησης προϊόντων από πτητικούς διαλύτες                                                                | Μειωμένη καταλυτική ενεργότητα                                  |
| Μετατόπιση της ισορροπίας έτσι ώστε να ευνοείται η σύνθεση και όχι η υδρόλυση                                     | Απενεργοποίηση σε υψηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος ή προϊόντος |
| Αυξημένες αποδόσεις                                                                                               | Αύξηση της πολυπλοκότητας του συστήματος                        |
| Αυξημένη θερμική σταθερότητα                                                                                      |                                                                 |
| Καταστολή αντιδράσεων που εξαρτώνται από το νερό                                                                  |                                                                 |
| Εξάλειψη κινδύνου μικροβιακής μόλυνσης                                                                            |                                                                 |
| Δυνατότητα περιορισμού παράπλευρων αντιδράσεων όσο και του περιορισμού της αναστολής από το υπόστρωμα ή το προϊόν |                                                                 |
| Εύκολη ανάκτηση του βιοκαταλύτη από το μίγμα της αντίδρασης και δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του                |                                                                 |
| Αυξημένη διαλυτότητα αερίων υποστρωμάτων στους οργανικούς διαλύτες σε σχέση με τα υδατικά διαλύματα               |                                                                 |

Παρόλα αυτά η χρήση των μη συμβατικών συστημάτων παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα. Το σημαντικότερο πρόβλημα είναι η απενεργοποίηση των ενζύμων από τους οργανικούς διαλύτες και η μειωμένη ενεργότητα την οποία επιδεικνύουν σε αυτά τα συστήματα, όπως παρουσιάζεται και στον Πίνακα 3.1. Οι πρόσφατες εξελίξεις όμως στην χρήση ενζύμων σε συστήματα που περιέχουν ίχνη νερού, ώθησαν την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας με την εφαρμογή ενζυμικών διεργασιών σε μη συμβατικά μέσα [Bommarius and Riebel, 2004; Mikolasch and Schauer, 2009]. Στον Πίνακα 3.2 περιγράφονται χαρακτηριστικά παραδείγματα ενζυμικών αντιδράσεων σε μη υδατοσυμβατά μέσα.

**Πίνακας 3.2.** Ενδεικτικά παραδείγματα εφαρμογής ενζυμικών διεργασιών σε μη συμβατικά μέσα

| Εφαρμογές                                     | Βιβλιογραφική Αναφορά                                                                       |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων υψηλής αξίας | Pollard and Woodley, 2007; Tao <i>et al.</i> , 2007; Patel, 2008; Ran <i>et al.</i> , 2009  |
| Σύνθεση αρωματικών ενώσεων                    | Schrader <i>et al.</i> , 2004; Serra <i>et al.</i> , 2005                                   |
| Τροποποίηση φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών | Mellou <i>et al.</i> , 2005; Katsoura <i>et al.</i> , 2006; Theodosiou <i>et al.</i> , 2008 |
| Τροποποίηση μονοτερπενίων                     | Skouridou <i>et al.</i> , 2003a,b,c                                                         |
| Τροποποίηση λιπιδίων και ελαίων               | Brenda <i>et al.</i> , 2007; Ciftci <i>et al.</i> , 2009                                    |
| Πρόσθετα τροφίμων                             | Aravindan <i>et al.</i> , 2007; Wang S., <i>et al.</i> , 2009                               |
| Χειρόμορφη σύνθεση                            | Benz <i>et al.</i> , 2007; Caramyshev <i>et al.</i> , 2007                                  |
| Σύνθεση πεπτιδίων                             | Chaiwut <i>et al.</i> , 2007; Guzman <i>et al.</i> , 2007                                   |
| Παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών         | Susheel <i>et al.</i> , 2003; Tanino <i>et al.</i> , 2009                                   |
| Παραγωγή βιοντίζελ                            | Dizge <i>et al.</i> , 2009; Szczesna Antczak <i>et al.</i> , 2009                           |
| Βιοαποικοδόμηση αποβλήτων                     | Cho <i>et al.</i> , 2009; Ergul <i>et al.</i> , 2009                                        |

### 3.3 Κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων

Τα μη συμβατικά μέσα όπως έχει ήδη ειπωθεί είναι συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, στα οποία τα ένζυμα διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες

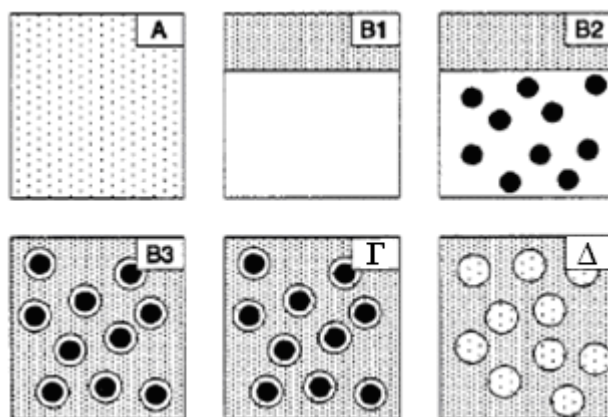
[Yang, 2005; Knez, 2009], και διακρίνονται σε έξι κατηγορίες, οι οποίες παρατίθενται στον Πίνακα 3.3.

**Πίνακας 3.3** Κατηγορίες μη συμβατικών συστημάτων

| <b>Μη συμβατικά Μέσα</b>                         |
|--------------------------------------------------|
| Οργανικοί διαλύτες (Organic Solvents)            |
| Υπερκρίσιμα Ρευστά (Supercritical Fluids)        |
| Αέρια Μέσα (Gaseous Media)                       |
| Ιοντικά Υγρά (Ionic Liquid)                      |
| Μικρογαλακτώματα (Microemulsions)                |
| Συστήματα χωρίς Διαλύτη (Solvent – Free Systems) |

### 3.3.1 Οργανικοί Διαλύτες

Τα συστήματα αντίδρασης που αποτελούνται από οργανικούς διαλύτες αποτελούν τα συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μη συμβατικά μέσα για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων [Sereti *et al.*, 2000; Liu B., *et al.*, 2008]. Μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κύριες κατηγορίες όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2.



**Σχήμα 3.2.** Σχηματική απεικόνιση των τεσσάρων κατηγοριών των οργανικών διαλυτών ως μέσα αντίδρασης: (Α): ομογενές μίγμα νερού με πολικό διαλύτη που αναμιγνύεται με το νερό, (Β1): διφασικό σύστημα νερού με μη πολικό διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το νερό, (Β2): διφασικό σύστημα νερού με μη πολικό διαλύτη, (●) ακινητοποιημένο ένζυμο, (Β3): διφασικό σύστημα,  $a_w = 1$ , υψηλής περιεκτικότητας σε πολικό διαλύτη, (◐) ακινητοποιημένο ένζυμο που περιβάλλεται από μόρια νερού, (Γ): Σχεδόν άνυδρος διαλύτης,  $a_w \ll 1$ , (◑) ακινητοποιημένο ένζυμο που περιβάλλεται από μόρια νερού, (Δ): (○) ένζυμο εγκλωβισμένο σε μικρογαλακτώμα που περιέχει νερό, οργανικό διαλύτη και επιφανειοενεργό μόριο [Vermue and Tramper, 1995].

Η ευρεία εφαρμογή τους στην βιοκατάλυση έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 3.1 [Carrea and Riva 2000; Klibanov 2001; Castro and Knubovets, 2003; Kreiner and Parker, 2005]. Παρόλα αυτά η χρήση των οργανικών διαλυτών συνοδεύεται και από μειονεκτήματα. Το κυριότερο μειονέκτημα είναι η χαμηλή ενζυμική ενεργότητα που παρουσιάζουν τα ένζυμα στα συστήματα αυτά [Castillo *et al.*, 2006]. Μερικές από τις αιτίες της παρατηρούμενης χαμηλής ενζυμικής ενεργότητας, είναι οι περιορισμοί στη διάχυση, οι αλλαγές στη διαμόρφωση των ενζύμων [Griebenow *et al.*, 2001], η παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου, η ανεπιθύμητη ενεργειακή κατάσταση κατά τη διαλυτοποίηση των υποστρωμάτων, η αποσταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης, μειωμένη χωροδιαταξιακή ευκινησία και η μη βέλτιστη τιμή pH [Klibanov 1997; Guo and Clark, 2001].

Για το λόγο αυτό σπουδαίο ρόλο παίζει η φύση του διαλύτη, η οποία επηρεάζει την εξέλιξη της αντίδρασης σε μεγάλο βαθμό. Ο διαλύτης μπορεί να έχει επιπτώσεις στη δραστηριότητα και τη σταθερότητα του ενζύμου καθώς και στη μέγιστη απόδοση της αντίδρασης [Serebryakova *et al.*, 2009]. Γενικά οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων εκφράζεται η επίδραση των διαλυτών δεν είναι γνωστοί, αλλά είναι σαφές ότι η πολικότητα των διαλυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Συχνά ως δείκτης για την επίδραση των διαλυτών σε ενζυμικά συστήματα χρησιμοποιείται η τιμή  $\log P$ , η οποία ορίζεται ως ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής του διαλύτη σε διφασικό σύστημα οκτανόλης-1 / νερού [Laane *et al.*, 1987].

Έχει διαπιστωθεί σαφέστατη εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας από τον παράγοντα  $\log P$  για κάθε διαλύτη [Yadav and Lathi, 2004, 2005; Hazarika *et al.*, 2002; Lue *et al.*, 2005; Hirakawa *et al.*, 2005]. Έτσι, στους υδρόφιλους διαλύτες με τιμή  $\log P$  μικρότερη του 2, η καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων είναι σημαντικά περιορισμένη, καθώς οι υδρόφιλοι διαλύτες έχουν την τάση να δεσμεύουν νερό από τα μόρια των ενζύμων, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργή τους διαμόρφωση [Mattiasson and Adlercreutz, 1991; Yadav and Lathi, 2004]. Στους διαλύτες με τιμές  $\log P$  μεταξύ 2 και 4 η ενζυμική δραστηριότητα ποικίλει ενώ είναι πολύ αυξημένη στους μη πολικούς διαλύτες με τιμή  $\log P$  μεγαλύτερη από 4 [Laane *et al.*, 1987]. Η αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων στους υδρόφοβους (μη πολικούς) διαλύτες, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι διαλύτες αυτοί δεν διαταράσσουν το υδατικό στρώμα που περιβάλλει το βιοκαταλυτικό μόριο και το οποίο θεωρείται απαραίτητο για τη διατήρηση της καταλυτικής του διαμόρφωσης.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι σε πολλές εφαρμογές είναι απαραίτητη η χρήση διαλυτών από την τελευταία κατηγορία ( $\log P < 2$ ), ιδιαίτερα σε περιπτώσεις όπου θα πρέπει να αυξηθεί η διαλυτότητα κάποιων υποστρωμάτων στο σύστημα. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να γίνει ένας συγκερασμός της επίδρασης του διαλύτη στη σταθερότητα του ενζύμου και τη διαλυτότητα των υποστρωμάτων.

### **3.3.2 Υπερκρίσιμα Ρευστά**

Η αυξημένη ζήτηση για καθαρές τεχνολογικές διαδικασίες στην βιομηχανία, οδήγησε στην πραγματοποίηση βιομετατροπών σε φιλικά προς το περιβάλλον, μη εύφλεκτα, υπερκρίσιμα ρευστά (supercritical liquids – sc) [Habulin *et al.*, 2007a; Knez *et al.*, 2009]. Ένα υπερκρίσιμο ρευστό έχει ιδιότητες μεταξύ της αέριας και της υγρής φάσης. Τα υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το διοξείδιο του άνθρακα (sc-CO<sub>2</sub>), το sc-αιθάνιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες για λιπόφιλες οργανικές ενώσεις [Karmee *et al.*, 2007; Bogel-Lukasik *et al.*, 2008]. Σημαντικό πλεονέκτημα της εφαρμογής των υπερκρίσιμων ρευστών ως μέσο για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, αποτελεί το γεγονός ότι η ταχύτητα διάχυσης των υποστρωμάτων στο μέσο αυτό γίνεται χωρίς περιορισμούς ενώ η ανάκτηση του προϊόντος είναι εύκολη.

### **3.3.3 Αέρια Μέσα**

Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει υποστρώματα τα οποία είναι αέρια ενώ ο βιοκαταλύτης είναι ένα στερεό ενζυμικό παρασκεύασμα. Η βιοκαταλυτική αυτή διεργασία εξελίσσεται μέσω της προσρόφησης των αέριων υποστρωμάτων στη στερεή επιφάνεια όπου βρίσκεται ακινητοποιημένος ο βιοκαταλύτης [Perez *et al.*, 2007].

### **3.3.4 Ιοντικά Υγρά**

Τα ιοντικά υγρά είναι ενώσεις, οι οποίες αποτελούνται από ιόντα, βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου και ανήκουν στην κατηγορία των λεγόμενων «πράσινων διαλυτών» υψηλής τεχνολογίας [Park and Kazlauskas, 2003; Van Rantwijk and Sheldon, 2007; Tavares *et al.*, 2008; De Diego *et al.*, 2009]. Μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κύριες κατηγορίες: 1) τα κατιοντικά είδη που είναι ασύμμετρα άλατα αμμωνίου ή

φωσφόρου ή αρωματικοί ετεροκυκλικοί δακτύλιοι και 2) τα ανιονικά είδη τα οποία είναι ανόργανα και περιλαμβάνουν τις ομάδες  $[\text{PF}_6]^-$ ,  $[\text{BF}_4]^-$ ,  $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ ,  $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$ ,  $[\text{N}(\text{C}_2\text{F}_5\text{SO}_2)_2]^-$ ,  $[\text{N}(\text{FSO}_2)_2]^-$ ,  $[\text{C}(\text{CF}_3\text{SO}_2)_3]^-$ ,  $[\text{CF}_3\text{CO}_2]^-$ ,  $[\text{MeSO}_3]^-$ . Οι ιδιότητες των ιοντικών υγρών εξαρτώνται κυρίως από το είδος του ανιόντος, κατιόντος και των υπόλοιπων υποκατάστατων που χρησιμοποιούνται για την σύνθεσή τους, και συνεπώς μπορούν να τροποποιηθούν ανάλογα με τη φύση της επιθυμητής αντίδρασης [Kaar *et al.*, 2003; Welton, 2004; Jain *et al.*, 2005]. Η ευρεία εφαρμογή τους έγκειται στο γεγονός ότι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα κατά την χρήση τους. Τα πλεονεκτήματα αυτά φαίνονται συνοπτικά στον Πίνακα 3.4.

**Πίνακας 3.4** Πλεονεκτήματα χρήσης ιοντικών υγρών [Park and Kazlauskas, 2003; Van Rantwijk and Sheldon, 2007; De Diego *et al.*, 2009].

| Πλεονεκτήματα ιοντικών υγρών                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι λιγότερο τοξικοί από τους οργανικούς διαλύτες</li> <li>▪ Αυξάνουν την ταχύτητα πολλών αντιδράσεων</li> <li>▪ Ορισμένα ιοντικά υγρά δεν είναι αναμίξιμα με το νερό και με οργανικούς διαλύτες. Έτσι επιτρέπεται η εκλεκτική εκχύλιση των αντιδρώντων και των προϊόντων από το σύστημα της αντίδρασης καθώς και η επαναχρησιμοποίησή τους.</li> <li>▪ Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό διφασικών συστημάτων</li> <li>▪ Περιορίζουν την εμφάνιση παραπροϊόντων</li> <li>▪ Μικρή τάση ατμών</li> <li>▪ Μεγάλη θερμική σταθερότητα</li> <li>▪ Οι ιδιότητές τους μπορούν να τροποποιηθούν αλλάζοντας τα ανιόντα ή την ομάδα του κατιόντος</li> <li>▪ Δεν είναι εύφλεκτα</li> </ul> |

Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων, τα ιοντικά υγρά αποτελούν ελκυστικά μέσα για την εφαρμογή τους σε διάφορες βιοδιεργασίες [Ha *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008]. Οι καταλύτες μπορεί να είναι ένζυμα αλλά και ολόκληρα κύτταρα αφού τα ιοντικά υγρά δεν προκαλούν βλάβες στις μεμβράνες τους εν αντιθέσει με τους οργανικούς διαλύτες [Park and Kazlauskas, 2003]. Γενικά οι λιπάσες και οι πρωτεάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερη εναντιοεκλεκτικότητα και στερεοεκλεκτικότητα σε ιοντικά υγρά παρά σε οργανικούς

διαλύτες [Durand *et al.*, 2007; Zhang D.-H., *et al.*, 2008]. Στον Πίνακα 3.5 παρουσιάζονται ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε ιοντικά υγρά.

**Πίνακα 3.5.** Εφαρμογές ενζύμων σε ιοντικά υγρά.

| Βιοκαταλύτης | Αντίδραση                         | Ιοντικό Υγρό                                                                                                                                                             | Βιβλιογραφική Αναφορά                 |
|--------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Υπεροξειδάση | Οξειδωση γουαϊακόλης              | [bmim][PF <sub>6</sub> ]                                                                                                                                                 | Laszlo and Compton, 2002              |
| Λακκάση      | Οξειδωση ανθρακενίου              | [bmim][PF <sub>6</sub> ]                                                                                                                                                 | Hinckley <i>et al.</i> , 2002         |
|              | Οξειδωση ABTS                     | [emim][MDEGSO <sub>4</sub> ]<br>[emim] [EtSO <sub>4</sub> ]<br>[emim] [MeSO <sub>3</sub> ]                                                                               | Tavares <i>et al.</i> , 2008          |
| Εστεράση     | Μετεστεροποίηση                   | [bmim][PF <sub>6</sub> ]                                                                                                                                                 | Persson <i>et al.</i> , 2003          |
| Λιπάση       | Σύνθεση πολυεστέρων               | [bmim][PF <sub>6</sub> ]                                                                                                                                                 | Kaar <i>et al.</i> , 2003             |
|              | Σύνθεση παραγώγων<br>φλαβονοειδών | [bmim][PF <sub>6</sub> ]<br>[bmim][PF <sub>4</sub> ]                                                                                                                     | Katsoura <i>et al.</i> , 2006         |
|              | Πολυμερισμός β-<br>λακτιδίου      | [C <sub>4</sub> mim][BF <sub>4</sub> ]<br>[C <sub>4</sub> mim][PF <sub>6</sub> ]<br>[C <sub>4</sub> mim][NTf <sub>2</sub> ]<br>[C <sub>4</sub> mim][N(CN) <sub>2</sub> ] | Yoshizawa-Fujita <i>et al.</i> , 2008 |
|              | Σύνθεση εστέρων                   | [bmim][PF <sub>6</sub> ]<br>[omim][PF <sub>6</sub> ]<br>[bmim][PF <sub>4</sub> ]<br>[hmim][BF <sub>4</sub> ]<br>[omim][BF <sub>4</sub> ]<br>[bmim][MS]<br>[CPMA][MS]     | De Diego <i>et al.</i> , 2009         |

### 3.3.5 Συστήματα δίχως διαλύτη

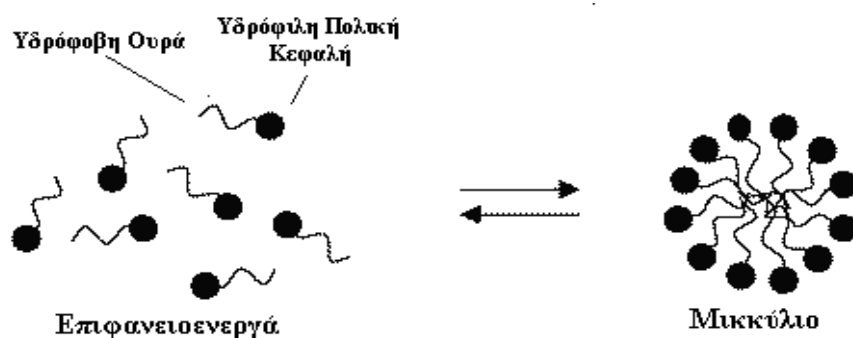
Στα συστήματα αυτά ο ίδιος ο οργανικός διαλύτης μπορεί να αντικατασταθεί από το υπόστρωμα και έτσι το ίδιο το υπόστρωμα να αποτελέσει το μέσο της αντίδρασης [Langermann *et al.*, 2007; Kumari *et al.*, 2009]. Η χρήση των συστημάτων χωρίς διαλύτη οδηγεί σε πάρα πολλά πλεονεκτήματα καθώς ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο ανάφλεξης των διαλυτών, ενώ παράλληλα μειώνεται η επιβάρυνση προς το περιβάλλον.

### 3.3.6 Μικρογαλακτώματα

#### 3.3.6.1 Μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη παρουσία επιφανειοενεργών μορίων

Σαν μικρογαλακτώματα μπορούμε να ορίσουμε τα συστήματα νερού ελαίου (υδρόφοβου διαλύτη) και επιφανειακά ενεργών ουσιών που σχηματίζουν ένα υγρό διάλυμα, οπτικά ισότροπο και θερμοδυναμικά σταθερό [Martinek *et al.*, 1986; Luisi *et al.*, 1988]. Τα συστήματα αυτά είναι γνωστά και ως «ψευδο-διφασικά» συστήματα καθώς η υδατική φάση είναι διεσπαρμένη στην οργανική φάση του συστήματος. Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη των συστημάτων αυτών έχει πάρει μεγάλη έκταση [Tonova and Lazarova, 2008; Wilk *et al.*, 2009]. Το κύριο χαρακτηριστικό των μορίων που επιτρέπουν την δημιουργία τέτοιων «διαλυμάτων» (λεπτότατες διασπορές νερού μέσα σε έλαιο ή ελαίου μέσα σε νερό) είναι ο αμφίφιλος χαρακτήρας τους που τους προσδίδει μια συγγένεια τόσο με υδατικά περιβάλλοντα, όσο και με λιπιδικά [Luisi *et al.*, 1988; Zhang Y., *et al.*, 2008].

Οι επιφανειοενεργές ή τασιενεργές ενώσεις είναι μόρια με αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας. Μια πολική περιοχή που ονομάζεται και πολική κεφαλή και μια μη πολική περιοχή αποτελούμενη από μια ή περισσότερες αλκυλικές ομάδες που ονομάζεται και υδρόφιλη περιοχή όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3. Γενικά οι επιφανειοενεργές ουσίες διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες, ανάλογα με το αν η πολική κεφαλή έχει φορτίο ή όχι σε ιοντικά και σε μη ιοντικά επιφανειοενεργά



**Σχήμα 3.3.** Σχηματική απεικόνιση της θερμοδυναμικής ισορροπία μεταξύ μονομερών επιφανειοενεργού και μικκυλίου.

Τα ιοντικά επιφανειοενεργά διακρίνονται σε ανιονικά όταν η πολική κεφαλή είναι αρνητικά φορτισμένη (π.χ. δις-(2-αιθυλεξυλο)σουλφοηλεκτρικό νάτριο (AOT) ) σε κατιονικά

όταν η πολική κεφαλή είναι θετικά φορτισμένη (βρωμιούχο δεκαεξυλτριμεθυλαμμώνιο (CTAB)) και σε αμφοτερικά όταν συνυπάρχουν στην πολική κεφαλή θετικά και αρνητικά φορτία (πχ φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη)).

Όταν τα επιφανειοενεργά μόρια βρεθούν στο νερό σε συγκεντρώσεις πάνω από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration-CMC) [Carvalho and Cabral, 2000; Santos *et al.*, 2009], στην οποία οι διαλυτόφοβες περιοχές των μορίων συσπειρώνονται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγουν την ανεπιθύμητη επαφή με τον διαλύτη, τότε σχηματίζουν συναθροίσματα γνωστά με την ορολογία μικκύλια. Σε ένα μικκύλιο, οι υδρόφοβες ουρές συναθροίζονται στο εσωτερικό προκειμένου να περιορίσουν την επαφή με το νερό, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές παραμένουν στην εξωτερική επιφάνεια προκειμένου να αυξήσουν την επαφή τους με το νερό (Σχήμα 3.4).

Το ίδιο μπορεί να συμβεί όταν αναμιχθεί νερό και ένας μη πολικός οργανικός διαλύτης με τη βοήθεια ενός επιφανειοενεργού μορίου. Στην περίπτωση αυτή τα επιφανειοενεργά λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα, μπορούν να εντοπιστούν μεταξύ των μορίων του νερού και των μορίων του μη πολικού οργανικού διαλύτη έχοντας στραμμένες τις πολικές κεφαλές προς το νερό και τις υδρόφοβες ουρές προς το μη πολικό οργανικό διαλύτη [Danielsson and Lindman, 1982].

Γενικά η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού και του νερού είναι δυο σημαντικοί παράγοντες που προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες στο σύστημα [Martinek *et al.*, 1986; Carvalho and Cabral, 2000]. Ο βαθμός ενυδάτωσης ( $w_o$ ) δίνεται από τον γραμμομοριακό λόγο του νερού στο σύστημα προς αυτό του επιφανειοενεργού.

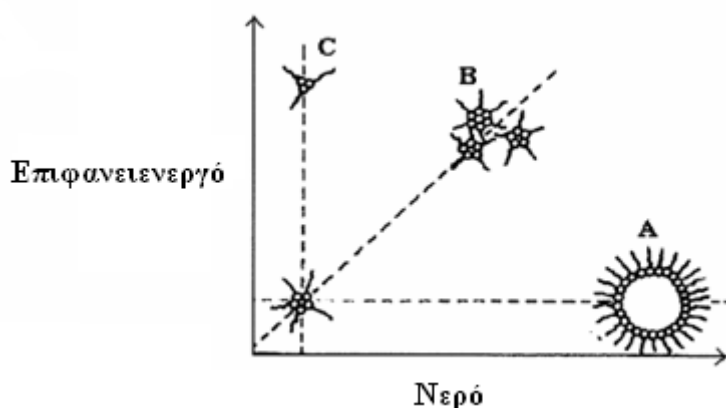
$$w_o = \frac{[H_2O]}{[EEO]} \quad (3.2)$$

$[H_2O]$ : γραμμομοριακός λόγος νερού

$[EEO]$ : γραμμομοριακός λόγος επιφανειοενεργού

Η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης στα αντίστροφα μικκύλια παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4. Διαπιστώνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού και ταυτόχρονη διατήρηση της ποσότητας του νερού παρατηρείται μείωση του μεγέθους του μικκυλίου και αύξηση του αριθμού των μικκυλίων. Αντίθετα, με αύξηση της συγκέντρωσης του νερού με ταυτόχρονη διατήρηση σταθερής συγκέντρωσης επιφανειοενεργού παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των μικκυλίων και μείωση του αριθμού τους. Άρα όσο

πιο μεγάλο είναι το  $w_o$ , τόσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος του μικκυλίου. Για το σύστημα AOT/ισοοκτάνιο/νερό βρέθηκε με πειράματα σκέδασης του φωτός ότι η διάμετρος των αντίστροφων μικκυλίων μπορεί να λαμβάνει τιμές έως και 300Å για  $w_o = 60$  στους 25 °C, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε μια σχετική ομοιομορφία στο μέγεθος των αντίστροφων μικκυλίων [Zulauf and Eicke, 1979].



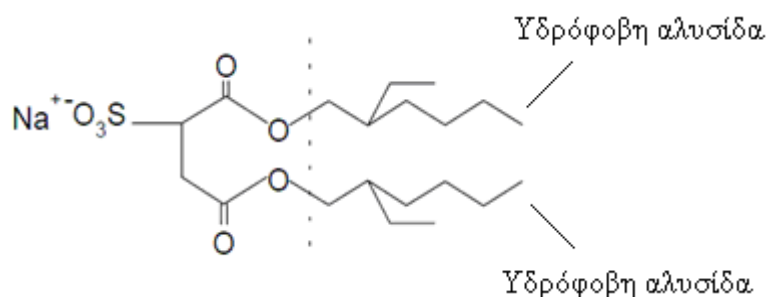
**Σχήμα 3.4.** Επίδραση του νερού και του επιφανειοενεργού στο σύστημα αντίστροφων μικκυλίων [Carvalho and Cabral, 2000].

Γενικά, η βέλτιστη τιμή του βαθμού ενυδάτωσης ( $w_o$ ) επηρεάζεται από τους εξής παράγοντες: α) από το μέγεθος του μικκυλίου, β) από τη συγκέντρωση του ενζύμου (σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμου απαιτείται μεγαλύτερη τιμή  $w_o$ ), γ) από το είδος της αντίδρασης (π.χ. οι συνθετικές αντιδράσεις και οι αντιδράσεις υδρόλυσης των λιπασών απαιτούν διαφορετικές ποσότητες νερού), δ) από τη διαλυτότητα του υποστρώματος στην υδατική φάση (π.χ. τα υδρόφιλα υποστρώματα απαιτούν μεγαλύτερες τιμές  $w_o$ ), ε) από τη συγκέντρωση του επιφανειοενεργού, η οποία πρέπει να λαμβάνεται υπόψη καθώς αλληλεπιδρά με το ένζυμο (δρα ως αποδιατακτικός παράγοντας) [Carvalho and Cabral, 2000].

#### **3.3.6.1.1 Μικρογαλακτώματα AOT/ισοοκτάνιου/νερού**

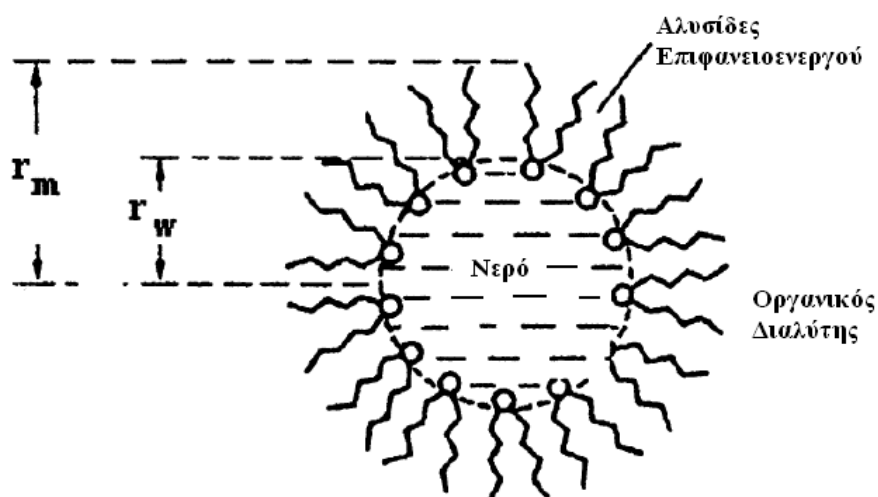
Το ανιονικό επιφανειοενεργό δις-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νάτριο γνωστό με την ονομασία Aerosol-OT ή αλλιώς AOT έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο ή αντίστροφα μικκύλια [Zulauf and Eicke, 1979] σε διαφόρους οργανικούς διαλύτες όπως πχ επτάνιο, ισοοκτάνιο. Λόγω της ιδιαίτερης δομής του, είναι δύσκολο να

διαχωριστούν οι υδρόφοβες ουρές από την υδρόφιλη περιοχή, λόγω ότι οι εστερικές ομάδες ( $\text{COO}^-$ ) παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την αλληλοεπίδραση του μορίου του AOT με μόρια νερού. Για το λόγο αυτό έχει οριστεί ως υδρόφιλη περιοχή η ομάδα  $-\text{SO}_3\text{Na}$  και οι κοντινές εστερικές ομάδες [Yuan *et al.*, 2002]. Στο Σχήμα 3.5 φαίνονται οι δύο διπλές υδρόφοβες αλυσίδες του AOT, οι οποίες διαχωρίζονται με διακεκομμένη γραμμή από την υδρόφιλη περιοχή.



**Σχήμα 3.5.** Δομή της υδρόφιλης κεφαλής και των υδρόφοβων ουρών του AOT.

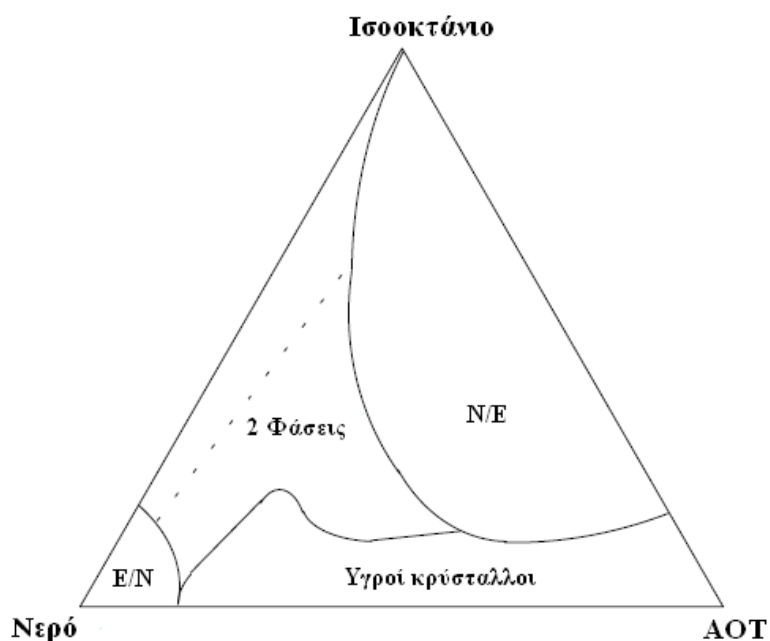
Στο γεγονός ότι το AOT έχει δύο υδρόφοβες ουρές οφείλεται και η ικανότητα του να σχηματίζει αντίστροφα μικκύλια σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση [Mitchel and Ninham, 1981]. Στο Σχήμα 3.6 απεικονίζεται ένα σχηματικό διάγραμμα των αντίστροφων μικκυλίων που σχηματίζονται σε ένα τριαδικό σύστημα που περιέχει AOT/ οργανικό διαλύτη/ νερό.



**Σχήμα 3.6.** Σχηματικό διάγραμμα αντίστροφων μικκυλίων με AOT/ οργανικό διαλύτη/ νερό. Με  $r_w$  συμβολίζεται η ακτίνα του υδάτινου θύλακα και με  $r_m$  η ακτίνα του μικκυλίου [Carvalho and Cabral, 2000].

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 3.6, τα αντίστροφα μικκύλια που σχηματίζονται στο τριαδικό σύστημα AOT / οργανικό διαλύτη / νερό, έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν στο εσωτερικό τους σημαντικές ποσότητες νερού, οδηγώντας στο σχηματισμό μικροσταγονιδίων που συχνά ονομάζονται θύλακες νερού [Luisi and Magid, 1986; Carvalho and Cabral, 2000; Mehta *et al.*, 2009]. Κάθε πολική κεφαλή του AOT έχει βρεθεί να δεσμεύει περίπου 10-12 μόρια νερού ενώ η διάμετρος των ενυδατωμένων μικκυλίων κυμαίνεται από 15-100 Å [Kotlarchyk *et al.*, 1988]. Επίσης οι ιδιότητες του νερού στο εσωτερικό των αντίστροφων μικκυλίων βρέθηκε να διαφέρουν σημαντικά σε σχέση με το κύριο όγκο του νερού (bulk water) [Wong *et al.*, 1976; Keh and Valeur, 1981].

Γενικά τα μικρογαλακτώματα AOT / ισοοκτανίου / νερού έχουν μελετηθεί εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες [Zulauf and Eicke, 1979; Wennerstrom, 2007]. Στο Σχήμα 3.7 απεικονίζεται το τριγωνικό διάγραμμα φάσεων του συστήματος AOT / Ισοοκτάνιο / νερό, όπου διακρίνονται οι διάφορες φάσεις του συστήματος που σχηματίζονται για ορισμένη αναλογία των συστατικών του. Όπως φαίνεται από το τριγωνικό διάγραμμα, τα μόρια του AOT ευνοούν τον σχηματισμό μικρογαλακτώματος νερού σε έλαιο έναντι του μικρογαλακτώματος ελαίου σε νερό.



**Σχήμα 3.7.** Τριγωνικό διάγραμμα AOT / Ισοοκτάνιο / Νερό (συμβολισμοί N/E: μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο, E/N: μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό) [Tamamushi and Watanabe, 1980].

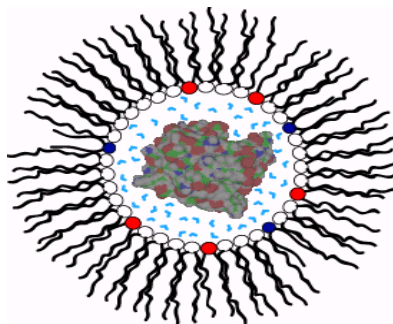
Πιο συγκεκριμένα στο τριγωνικό διάγραμμα διακρίνεται η περιοχή του διαγράμματος φάσεων που αντιστοιχεί σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (N/E), ενώ παράλληλα διακρίνονται οι περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν σε μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό (E/N) και σε περιοχές που συναντάμε δύο φάσεις (μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο με νερό και σε μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό με έλαιο) [Yuan *et al.*, 2002]. Τέλος διακρίνονται περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν σε συστήματα των οποίων η δομή πλησιάζει αυτή των υγρών κρυστάλλων [Auffret, 2008].

Η χαρακτηριστική ικανότητα του επιφανειοενεργού AOT να σχηματίζει αντίστροφα μικκύλια χωρίς παρουσία συνεπιφανειοενεργού και μάλιστα για ένα ευρύ φάσμα των συγκεντρώσεων των συστατικών του συστήματος AOT / ισοοκτάνιο / νερό, έχει καταστήσει το σύστημα αυτό σύστημα αναφοράς, το οποίο βρίσκει εφαρμογές σε ευρύ φάσμα τεχνολογιών όπως στην παρασκευή μικροαντιδραστήρων για την σύνθεση νέων νανοϋλικών [Pileni, 1993; Andre, 2001] και για την κατάλυση αντιδράσεων από ένζυμα όπως αναπτύσσεται στην παράγραφο 3.3.6.1.2 που ακολουθεί.

#### **3.3.6.1.2 Ένζυμα σε αντίστροφα μικκύλια**

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο έχουν την δυνατότητα να εγκλωβίσουν στον υδάτινο θύλακα τους ένζυμα, αποφεύγοντας την επαφή με τον οργανικό διαλύτη που αποτελεί την εξωτερική συνεχή φάση [Martinek *et al.*, 1986; Luisi and Magid 1986; Luisi *et al.*, 1988, Stamatis *et al.*, 1996, 1999b; Carvalho and Cabral, 2000; Anarbaev *et al.*, 2009]. Εκτός από ένζυμα και άλλα βιομόρια έχουν εγκλωβιστεί σε αντίστροφα μικκύλια όπως μεγάλα βιοπολυμερή π.χ. DNA [Goto *et al.*, 2004], όργανα κυττάρων πχ μιτοχόνδρια [Hochkoeppler and Luisi, 1989], αλλά και ολόκληρα κύτταρα [Cinelli *et al.*, 2006]. Γενικά η εισαγωγή του όρου «ένζυμο σε αντίστροφα μικκύλια» πραγματοποιήθηκε από τον Wells κάποια χρόνια αργότερα [Misiorowski and Wells, 1974].

Ο πολικός πυρήνας των μικκυλίων έχει την ικανότητα να περικλείει σημαντική ποσότητα νερού, η οποία εξαρτάται από τις ιδιότητες του συστήματος [Carvalho and Cabral, 2000]. Όταν τα ένζυμα μικροκαψυλιώνονται, συνήθως εντοπίζονται στην εσωτερική υδατική φάση παρ'όλο που ο βαθμός της αλληλεπίδρασης με το επιφανειοενεργό ποικίλλει, κυρίως στη περίπτωση των λιπασών [Dasgupta *et al.*, 2005; Moniruzzaman *et al.*, 2006]. Στο Σχήμα 3.8 απεικονίζεται το ένζυμο έγκλειστο σε αντίστροφο μικκύλιο.



**Σχήμα 3.8.** Σχηματική απεικόνιση ενζύμου έγκλειστου σε αντίστροφο μικκύλιο.

Η τοποθέτηση αυτή των ενζύμων θεωρείται ότι τα προστατεύει από τις δυσμενείς επιδράσεις των οργανικών διαλυτών [Orlich and Schomacker, 2002]. Οι δυνάμεις που συντελούν στο σχηματισμό των δομών αυτών περιλαμβάνουν υδροφοβικούς δεσμούς van der Waals, ηλεκτροστατικούς και δεσμούς υδρογόνου. Συνεπώς, η ρευστότητα των μικκυλίων είναι μόνιμη, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν ομοιοπολικοί δεσμοί [Carvalho and Cabral, 2000].

Γενικότερα τα ένζυμα επιδεικνύουν υψηλή καταλυτική δράση σε αντίστροφα μικκύλια που σχηματίζονται με ανιονικά επιφανειοενεργά μόρια όπως το αεροζόλ OT (AOT) [Rees *et al.*, 1995; Carvalho and Cabral, 2000; Oldfield *et al.*, 2005]. Σε αντίθεση τα κατιονικά επιφανειοενεργά μόρια λόγω του θετικού τους φορτίου αναστέλλουν την δράση του ενζύμου λόγω αλληλοεπίδρασης τους με το ενεργό κέντρο του ενζύμου [Fletcher *et al.*, 1985; Martinek *et al.*, 1989]. Στις δύο τελευταίες δεκαετίες, αναφέρθηκε η χρήση της λεκιθίνης, ενός φυσικού επιφανειοενεργού μορίου, για την δημιουργία αντίστροφων μικκυλίων [Shinoda *et al.*, 1991; Kahlweit *et al.*, 1995; Avramiotis *et al.*, 1997; Papadimitriou *et al.*, 2008].

Τα ένζυμα ενθυλακώνονται στα αντίστροφα μικκύλια με τρεις κυρίως τρόπους: α) με «ένεση», β) με μεταφορά φάσης και γ) με διαλυτοποίηση [Matzke *et al.*, 1992; Carvalho and Cabral, 2000].

Η πρώτη διαδικασία, γνωστή ως «μέθοδος ένεσης» [Martinek *et al.*, 1977] είναι αυτή που χρησιμοποιείται περισσότερο τα τελευταία χρόνια [Motlekar and Bhagwat, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Moniruzzaman *et al.*, 2008]. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, μια μικρή ποσότητα πρωτεϊνικού διαλύματος προστίθεται σε ένα διάλυμα επιφανειοενεργού σε οργανικό διαλύτη (άνυδρο ή ελαφρώς ενυδατωμένο). Το διάλυμα που προκύπτει αναμειγνύεται ισχυρά μέχρι να γίνει διαυγές. Αυτή η διαδικασία είναι πολύ απλή αλλά και αποτελεσματική.

Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στο φαινόμενο της ακαριαίας μεταφοράς της πρωτεΐνης σε ένα διφασικό σύστημα που αποτελείται από περίπου ίσες ποσότητες υδατικού διαλύματος και διαλύματος επιφανειοενεργού/οργανικού διαλύτη (μικκυλιακό σύστημα). Η μεταφορά της πρωτεΐνης λαβαίνει χώρα χωρίς ή με πολύ ελαφριά ανάδευση και απαιτεί πολύ χρόνο (από αρκετά λεπτά έως αρκετές μέρες), το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μετουσίωση της πρωτεΐνης. Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση, την εκχύλιση και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, DNA καθώς και άλλων βιομορίων [Su and Chiang, 2003; Noh *et al.*, 2005; Mazzola *et al.*, 2008; Imm and Kim, 2009].

Η τρίτη μέθοδος περιλαμβάνει την αρχική εισαγωγή της απαιτούμενης ποσότητας νερού στο διάλυμα του επιφανειοενεργού σε οργανικό διαλύτη, ούτως ώστε να επιτευχθεί ο απαιτούμενος βαθμός ενυδάτωσης ( $w_0$ ) του επιφανειοενεργού. Έπειτα μια λυοφιλιωμένη πρωτεΐνη μπορεί να διαλυτοποιηθεί με έντονη ανάδευση στο διάλυμα που προκύπτει [Sawada and Ueda, 2001]. Ένα από τα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η παρατεταμένη επαφή μεταξύ του ενζυμικού μορίου και του οργανικού διαλύτη/επιφανειοενεργού που μπορεί να οδηγήσει σε μερική μετουσίωση του πρώτου. Η πραγματοποίηση ενζυμικής κατάλυσης σε αντίστροφα μικκύλια συνοδεύεται από πλήθος πλεονεκτημάτων [Stamatis *et al.*, 1993; Stamatis *et al.*, 1995; Stamatis *et al.*, 1999b; Carvalho and Cabral, 2000] με αποτέλεσμα οι εφαρμογές των ενζύμων στα μέσα αυτά να έχουν αυξηθεί. Στον Πίνακα 3.6 παρουσιάζονται ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε αντίστροφα μικκύλια.

**Πίνακα 3.6.** Εφαρμογές ενζύμων σε αντίστροφα μικκύλια.

| Ένζυμο                                            | Επιφανειοενεργό                                                                                                                                                                    | Εφαρμογή                         | Βιβλιογραφία                            |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------|
| DNA πολυμέραση β                                  | <u>Ιοντικά:</u><br>SDS <sup>1</sup> (ανιονικό)<br>CTAB <sup>2</sup> (κατιονικό)<br><u>Μη ιοντικά:</u><br>Brij 30 <sup>3</sup><br>Brij 58 <sup>4</sup><br>Triton X-100 <sup>5</sup> | Έλεγχος Ενζυμικής Δράσης         | Anarbaev <i>et al.</i> , 2009           |
| Οξειδάση                                          | <u>Ιοντικό:</u><br>DTAB <sup>6</sup> (κατιονικό)                                                                                                                                   | Μέθοδος Καθαρισμού Ενζύμου       | Imm and Kim, 2009                       |
| Υπεροξειδάση λιγνίνης                             | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT <sup>7</sup> (ανιονικό)<br><u>Μη ιοντικό:</u><br>Triton X-100                                                                                               | Οξείδωση βερατρόλης              | Zhang Y., <i>et al.</i> , 2008          |
| Υπεροξειδάση αγριοραφανιδίων                      | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT (ανιονικό)                                                                                                                                                  | Οξείδωση δισφαινόλης Α           | Hong-Mei and Nicell, 2008               |
| Λιπάση από <i>Chromobacterium viscosum</i>        | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT (ανιονικό)                                                                                                                                                  | Σύνθεση και υδρόλυση εστέρων     | Moniruzzaman <i>et al.</i> , 2006, 2007 |
| Λακκάση                                           | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT (ανιονικό)                                                                                                                                                  | Οξείδωση του 1,2-διαμινοβενζόλιο | Liu Z.H., <i>et al.</i> , 2006          |
| Χλωροϋπεροξειδάση από <i>Caldariomyces fumago</i> | <u>Ιοντικό:</u><br>CTAC <sup>8</sup> (κατιονικό)                                                                                                                                   | Αντίδραση Χλωρίωση               | Chen <i>et al.</i> , 2006               |
| Θρυψίνη                                           | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT (ανιονικό)                                                                                                                                                  | Σύνθεση και υδρόλυση πεπτιδίων   | Stupishina <i>et al.</i> , 2005         |
| β-γλυκοσιδάση                                     | <u>Ιοντικό:</u><br>AOT (ανιονικό)                                                                                                                                                  | Σύνθεση Αλκυλογλυκοζιτών         | Kouptsova <i>et al.</i> , 2001          |

<sup>1</sup>SDS: Δωδεκυλοθειικό νάτριο<sup>2</sup>CTAB: Βρωμιούχο κετυλτριμεθυλαμμώνιο<sup>3</sup>Brij 30: Πολυοξαιθυλένο 4 του λαουρικού αιθέρα<sup>4</sup>Brij 58: Πολυοξαιθυλένο 20 κέτυλο αιθέρας<sup>5</sup>Triton X-100: Τετρααιθυλενογλυκολδωδεκυλαιθέρας<sup>6</sup>DTAB: Βρωμιούχο δωδεκατριμεθυλαμμώνιο<sup>7</sup>AOT: Δις-(2-αιθυλεξυλο)σουλφοηλεκτικό νάτριο<sup>8</sup>CTAC: Χλωριούχο κετυλτριμεθυλαμμώνιο

### 3.3.6.3 Μικρογαλακτώματα απουσία επιφανειοενεργών μορίων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ένα σημαντικό πρόβλημα που πηγάζει από την χρήση των μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται παρουσία κάποιου επιφανειοενεργού μορίου είναι η πιθανή μετουσίωση της πρωτεΐνης αλλά και η δυσκολία ανάκτησης και επαναχρησιμοποίηση του βιομορίου καθώς και ο διαχωρισμός των προϊόντων λόγω του επιφανειοενεργού. Προκειμένου να συγκεραστούν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που προέρχονται από την χρήση των μικρογαλακτωμάτων, αναπτύχθηκαν συστήματα τέτοια ώστε το μικρογαλάκτωμα να σχηματίζεται απουσία του επιφανειοενεργού. Τα τριαδικά αυτά συστήματα είναι γνωστά ως μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειοενεργό (surfactant less microemulsions) και σχηματίζονται από έναν μη πολικό υδρογονάνθρακα, μία αλκοόλη με μικρή αλυσίδα και νερό.

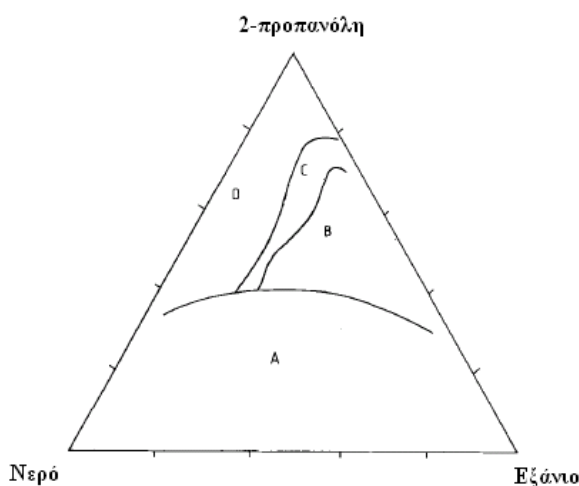
Ιστορικά η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των συστημάτων αυτών ξεκίνησε από τον Keiser [Keiser *et al.*, 1979], ο οποίος μελέτησε την επίδραση του χλωριούχου νατρίου στα όρια φάσεων του διαγράμματος φάσεων για το σύστημα εξάνιο, 2-προπανόλη, νερό [Smith *et al.*, 1977]. Τρία χρόνια αργότερα ακολούθησε η μελέτη των ιδιοτήτων ενός αντίστοιχου τριαδικού συστήματος του τολουολίου, 2-προπανόλης, νερού από τους Lund και Holt [Lund and Holt, 1980]. Πρωτοπόρος στην δημιουργία τέτοιων συστημάτων για την διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων ήταν ο Khmelnitsky και οι συνεργάτες του, οι οποίοι δημιούργησαν τριαδικά συστήματα με εξάνιο, ισοπροπυλική αλκοόλη και νερό [Khmelnitsky *et al.*, 1987; Khmelnitsky *et al.*, 1988b].

Γενικά τα τριαδικά συστήματα είναι θερμοδυναμικώς σταθερά, ισότροπα και αποτελούνται από μικροσταγονίδια νερού διεσπαρμένα στον οργανικό διαλύτη, μέσα στα οποία βρίσκεται το ένζυμο. Τα μικροσταγονίδια νερού σταθεροποιούνται από τα μόρια αλκοόλης του τριαδικού συστήματος, τα οποία απορροφώνται στην επιφάνεια τους προσδίδοντας τους σφαιρική συμμετρία. Τα συστήματα αυτά αποτελούν κατάλληλο μέσο για την διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων [Khmelnitsky *et al.*, 1986; Zoumpantioti *et al.*, 2006a]. Πολλά ένζυμα, περιλαμβανομένης της θρυψίνης [Khmelnitsky *et al.*, 1986; Khmelnitsky *et al.*, 1987], της χυμοθρυψίνης [Khmelnitsky *et al.*, 1986], της λακκάσης [Khmelnitsky *et al.*, 1988b], της πολυφαινολοξειδάσης [Vulfson *et al.*, 1991], της εστεράσης από *Fusarium oxysporum* FAE-I [Topakas *et al.*, 1993], της χλωροϋπεροξειδάσης [Fedorak *et al.*, 1993], της εστεράσης [Topakas *et al.*, 2005], της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* ή από *Candida antarctica* [Zoumpantioti *et al.*, 2006a] έχουν επιδείξει βελτιωμένη δραστηριότητα και

σταθερότητα όταν τοποθετούνται σε μικρογαλακτώματα απουσία επιφανειοενεργού που σχηματίζονται από εξάνιο ή τολουόλιο, ισοπροπανόλη ή 1-βουτανόλη και νερό.

Η διατήρηση της καταλυτικής δραστηρότητας των ενζύμων συμβαίνει διότι τα ενζυμικά μόρια εγκλωβίζονται μέσα στους υδατινούς θύλακες των μικρογαλακτωμάτων, αποφεύγοντας έτσι την ανεπιθύμητη επαφή με την συνεχή οργανική φάση που προκαλεί την μετουσίωση της πρωτεΐνης [Khmelnitsky *et al.*, 1988b].

Ένα σύστημα αποτελούμενο από τρία συστατικά μπορεί να παρασταθεί από ένα τριγωνικό διάγραμμα φάσεων. Το τριγωνικό διάγραμμα φάσεων του συστήματος εξάνιο, 2-προπανόλη, νερό απεικονίζεται από το ισόπλευρο τρίγωνο του Σχήματος 3.9. Κάθε κορυφή του ισόπλευρου τριγώνου αντιστοιχεί σε καθαρά συστατικά όπως είναι το νερό, το εξάνιο (μη πολικός διαλύτης) και η 2-προπανόλη (αλκοόλη). Κάθε πλευρά αντιστοιχεί σε μίγμα των δύο εκ των τριών συστατικών, ενώ κάθε σημείο στο εσωτερικό του τριγώνου αντιστοιχεί σε μίγμα νερού, αλκοόλης και μη πολικού διαλύτη ορισμένης αναλογίας.



**Σχήμα 3.9.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεων για το τριαδικό σύστημα απουσία επιφανειοενεργού που αποτελείται από εξάνιο, 2-προπανόλη, νερό. Συμβολισμοί: Α. πολυφασική περιοχή, Β. μονοφασική περιοχή, πλούσια σε υδατικά μικροσταγονίδια διεσπαρμένα στον οργανικό διαλύτη, Δ. μονοφασική περιοχή στην δεν ανιχνεύονται καθόλου μικροδομές, C. μονοφασική περιοχή ενδιάμεσης κατάστασης μεταξύ περιοχής Β και Δ.

Οι Smith και Barden [Smith and Barden, 1982] κατά την διάρκεια της έρευνας τους σε μικρογαλακτώματα απουσία επιφανειοενεργού, έκαναν εκτεταμένες δομικές μελέτες για τις διάφορες συστάσεις των μικρογαλακτωμάτων αυτών. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η μονοφασική περιοχή του διαγράμματος φάσεων αποτελείται από τρεις υποπεριοχές.

Πιο συγκεκριμένα η περιοχή A αντιστοιχεί σε ασταθή συστήματα τα οποία γρήγορα τείνουν να διαχωριστούν σε δυο φάσεις. Διαλύματα τα οποία αντιστοιχούν στις περιοχές B, C, D είναι σταθερά και οπτικά διαυγή. Πιο αναλυτικά στην περιοχή D ανιχνεύονται κανονικά τριαδικά συστήματα εξανίου, 2-προπανόλης και νερού, ενώ δεν ανιχνεύονται καθόλου μικροδομές. Η περιοχή B αντιστοιχεί σε μικρογαλακτώματα που αποτελούνται από υδατικά μικροσταγονίδια διεσπαρμένα στην πλούσια σε εξάνιο εξωτερική φάση. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με NMR από τον Keiser και τους συνεργάτες του το 1979 [Keiser *et al.*, 1979]. Τέλος η περιοχή C αποτελεί ενδιάμεσο μεταξύ της περιοχής B και D και αντιστοιχεί σε διαλύματα στα οποία εμφανίζονται συσσωματώματα με δεσμούς υδρογόνου νερού και 2-προπανόλης διεσπαρμένα στο πλούσιο σε εξάνιο μέσο [Khmelnitsky *et al.*, 1988b].

Η χρήση των τριαδικών συστημάτων για την διεκπεραίωση ενζυμικών αντιδράσεων παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα αλλά και κάποιους περιορισμούς. Πιο συγκεκριμένα η χρήση των μέσων αυτών μπορεί να παρεμποδιστεί λόγω ότι έχουν μικρή διαλυτότητα πρωτεΐνης, συνήθως 1μM. Αυτό ίσως είναι ένα πρόβλημα για τα ένζυμα με χαμηλή δραστικότητα [Khmelnitsky *et al.*, 1988b]. Επιπλέον για να διατηρήσει ένα ένζυμο την καταλυτική δραστικότητα χρειάζεται τουλάχιστον 2% (v/v) νερού. Μέσω αυτού προσδίδεται προστασία στον βιοκαταλύτη [Zoumpanioti *et al.*, 2006a].

Από τα πλεονεκτήματα χρήσης τους στην ενζυμική κατάλυση τα πιο σημαντικά είναι τα εξής:

- Διαυγή μονοφασικά συστήματα, ικανά να μετρηθεί η ενζυμική αντίδραση με φασματοφωτομετρικές μεθόδους.
- Δυνατότητα ενζυμικής μετατροπής υδρόφιλων αλλά και υδρόφοβων ενώσεων.
- Εύκολος διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης, (δεν υπάρχει ανάγκη διαχωρισμού του επιφανειοενεργού από τα προϊόντα)

Με βάση τα παραπάνω καθίσταται σαφές ότι η χρήση των συγκεκριμένων συστημάτων εξουδετερώνει πολλά από τα προβλήματα που αναδύονταν από την χρήση μικρογαλακτωμάτων με επιφανειοενεργό. Στην συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν μικρογαλακτώματα από όλες τις περιοχές της μονοφασικής περιοχής του διαγράμματος φάσης.

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΑ ΚΑΙ ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΑ ENZYMATA ΣΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΜΕΣΑ

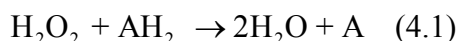
---

### 4.1 Γενικά

Στην παρούσα εργασία με σκοπό την εκλεκτική τροποποίηση του μαστιγελαίου και των βασικών συστατικών του χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα που ανήκουν στη γενική κατηγορία των οξειδοαναγωγασών και των υδρολασών. Πιο συγκεκριμένα από την κατηγορία των οξειδοαναγωγασών χρησιμοποιήθηκε μια υπεροξειδάση: η χλωροϋπεροξειδάση από το μύκητα *Caldariomyces fumago* (CPO) και τρεις οξειδάσες: λακκάσες από τους μύκητες *Trametes versicolor* (TvL), *Trametes hirsuta* (ThL) και *Botrytis cinerea* (BcL). Από την κατηγορία των υδρολασών χρησιμοποιήθηκε η λιπάση B από *Candida antarctica* (CaLB). Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση βασικών συστατικών του μαστιγελαίου σε παράγωγα με αυξημένη βιολογική δράση.

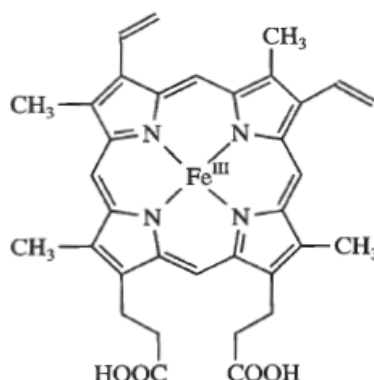
### 4.2 Υπεροξειδάσεις

Οι υπεροξειδάσεις είναι ένζυμα που μπορούν και χρησιμοποιούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), ως οξειδωτικό, δηλαδή ως δέκτη ηλεκτρονίων στις αντιδράσεις αφυδρογόνωσης διαφόρων υποστρωμάτων [Hamid and Khalil-ur-Rehman, 2009], σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



Οι υπεροξειδάσες έχουν απομονωθεί από πλήθος οργανισμών όπως π.χ. ζώα, μικροβιακά κύτταρα και φυτά όπου και παίζουν σημαντικό ρόλο. Πιο συγκεκριμένα στα φυτά οι υπεροξειδάσες συμμετέχουν στην βιοσύνθεση της λιγνίνης [Wakamatsu and Jakahama, 1993] και στο μηχανισμό άμυνας κατά τη φυσική φθορά ή από μολυσμένους ιστούς [Biles and Martyn, 1993]. Η μεγάλη πλειοψηφία των ενζύμων αυτών περιέχει πρωτοπορφυρίνη IX (αίμη) ως προσθετική ομάδα [Hamid and Khalil-ur-Rehman, 2009] είναι συνήθως εξωκυτταρικά και το όνομα τους μπορεί να προέλθει από το υπόστρωμα του οποίου την μετατροπή καταλύουν (π.χ. βρώμο-, χλώρο-, υπεροξειδάση του κυτοχρώματος C και του μαγγανίου) ή από την πηγή των οργανισμών από τα οποία προέρχονται (π.χ. μυελοϋπεροξειδάση) [Adam *et al.*, 1999].

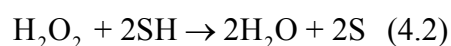
Με βάση την εξειδίκευση του ενεργού κέντρου, οι υπεροξειδάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες: 1) υπεροξειδάσες που περιέχουν ένα μέλος των πορφυρινών, όπως π.χ. η αίμη (οι οποίες φέρουν ένα μόριο σίδηρο-πρωτοπορφυρίνης IX στο ενεργό τους κέντρο), 2) υπεροξειδάσες που περιέχουν βανάδιο, σελήνιο, μαγγάνιο και 3) υπεροξειδάσες που δεν περιέχουν μέταλλο αλλά οργανικά μόρια στο ενεργό τους κέντρο, όπως φλαβίνη [Adam *et al.*, 1999; Burton, 2003; Wever *et al.*, 2006]. Στο Σχήμα 4.1 απεικονίζεται το μόριο της σίδηρο-πρωτοπορφυρίνης IX στο ενεργό κέντρο των αίμο-υπεροξειδασών.



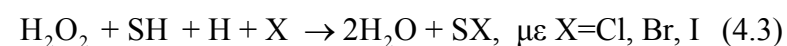
**Σχήμα 4.1** Σιδηρική πρωτοπορφυρίνη IX ως προσθετική ομάδα στο ενεργό κέντρο των υπεροξειδασών [Adam *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2009].

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από τις υπεροξειδάσες μπορούν να ομαδοποιηθούν σε τέσσερις κατηγορίες [Littlechild, 1999; Colonna *et al.*, 1999; Renirie *et al.*, 2003]:

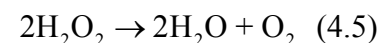
1. Οξειδωτική αφυδρογόνωση



2. Οξειδωτική αλογόνωση



3. Διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου



4. Αντίδραση μεταφοράς οξυγόνου



Οι υπεροξειδάσες μπορούν να εφαρμοστούν σε ένα ευρύ φάσμα βιοκαταλυτικών διεργασιών με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον [Hamid and Khalil-ur-Rehman, 2009]. Οι περισσότερες εφαρμογές τους αφορούν την επεξεργασία φαινολικών λυμάτων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου [Mantha *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006]. Επιπλέον χρησιμοποιούνται στην παρασκευή αισθητήρων για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και οργανικών υπεροξειδίων [Jia J.B., *et al.*, 2002], για την αποχρωματοποίηση συνθετικών βαφών [Yang *et al.*, 2003], για την παραγωγή πολυμερών [Sakharov *et al.*, 2003], για την εξουδετέρωση οσμών από χοιροστάσια [Govere *et al.*, 2007], για την παραγωγή βιοκαυσίμων [Weng *et al.*, 2008; Ramavicius and Ramanaviciene, 2009] και σε αναλυτικές και διαγνωστικές μεθόδους [Agostini *et al.*, 2002]. Γενικά οι υπεροξειδάσες, μπορούν να προσαρμοστούν με μεγάλη ευελιξία στην βιομετατροπή διαφορετικών υποστρωμάτων. Στον Πίνακα 4.1 παρουσιάζεται η βιολογική δράση των πιο σημαντικών υπεροξειδασών. Η εφαρμογή των υπεροξειδασών στην εκλεκτική οξείδωση οργανικών ενώσεων έχει αναφερθεί λεπτομερώς για την χλωροϋπεροξειδάση και την αλογονοϋπεροξειδάση [Adam *et al.*, 1999; van de Velde *et al.*, 2001a].

**Πίνακας 4.1** Βιολογική δράση σημαντικών υπεροξειδασών.

| Υπεροξειδάσες                      | E.C. N <sup>ο</sup> | Προέλευση                                      | Βιολογική δράση                                                         |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Χλωροϋπεροξειδάση                  | 1.11.1.10           | Μύκητας<br><i>Caldariomyces fumago</i>         | Βιοσύνθεση<br>καλνταρομυκίνης                                           |
| Υπεροξειδάση του<br>κυτοχρώματος C | 1.11.1.5            | Ζύμη <i>Saccharomyces cerevisie</i>            | Αναγωγή H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> και<br>οξείδωση<br>κυτοχρώματος C |
| Υπεροξειδάση<br>αγριοραφανίδων     | 1.11.1.7            | Ρίζα από <i>Amoracia rusticana</i>             | Βιοσύνθεση ορμονών<br>του φυτού                                         |
| Λακτοϋπεροξειδάση                  | 1.11.1.7            | Αγελαδινό γάλα                                 | Αντιμικροβιακή<br>δράση                                                 |
| Υπεροξειδάση της<br>λιγνίνης       | 1.11.1.14           | Μύκητας<br><i>Phanerochaete chrysosporium</i>  | Αποικοδόμηση<br>λιγνίνης                                                |
| Μυελοϋπεροξειδάση                  | 1.11.1.7            | Ανθρώπινα λευκά<br>αιμοσφαίρια<br>(leucocytes) | Αντιμικροβιακή<br>δράση                                                 |
| Κατάλαση                           | 1.11.1.6            | Συκώτι βοδιού                                  | Αποτοξίνωση απο<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                        |

## 4.2.1 Χλωροϋπεροξειδάση

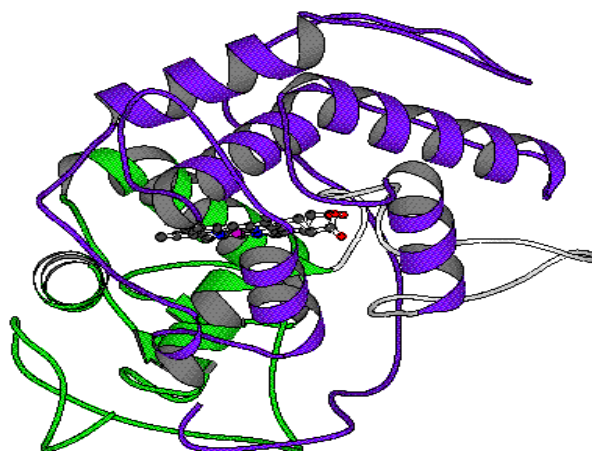
### 4.2.1.1 Γενικά

Η χλωροϋπεροξειδάση (C.P.O 1.11.1.10) από το θαλάσσιο μύκητα *Caldariomyces fumago* είναι ένα ένζυμο που ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1960 [Shaw and Hager, 1961] και έχει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών από την σύνθεση καθαρών ενώσεων [Adam *et al.*, 1999; van Deurzen *et al.*, 1997 a,b,c; van Rantwijk and Sheldon 2000; Kiljunen and Kanerva 2000; Burton, 2003] έως την εφαρμογή του σε περιβαλλοντικές διεργασίες [Longoria *et al.*, 2008]. Η CPO καταλύει όχι μόνο τις τυπικές αντιδράσεις των υπεροξειδασών, αλλά αντιδράσεις καταλασών και μονοξυγονασών, ενώ είναι σχεδόν μοναδική στην κατάλυση αντιδράσεων αλογόνωσης (εκτός από την αντίδραση με φθόριο), παρουσία ιόντων χαλιδίου και  $H_2O_2$  [Toti *et al.*, 2006; Osborne *et al.*, 2006; Murphy, 2007; Aburto *et al.*, 2005]. Άλλες αντιδράσεις που καταλύονται από την χλωροϋπεροξειδάση είναι η εναντιοεκλεκτική σουλφοξειδωση [Spreti *et al.*, 2004; Chiappe *et al.*, 2006; Kohlmann and Lutz, 2006], η εποξειδωση [Zaks and Dodds 1995; Manoj *et al.*, 2000; Santhanam and Dordick 2002; Zhu and Wang 2005; Park and Clark, 2006b], η υδροξυλίωση αρωματικών ενώσεων [Zaks and Dodds, 1995], καθώς επίσης και η οξειδωση διενίων [Bougioukou and Smonou, 2002; Sanfilippo and Nicolosi, 2002], τερπενίων [Kaup *et al.*, 2007; Aguila *et al.*, 2008], αλκοολών [Kiljunen and Kanerva, 2000], και ινδόλης [Jung *et al.*, 2008; Jung and Hartmann, 2008; Bai *et al.*, 2009; Lichteneker and Schmid, 2009]. Το ευρύ φάσμα των υποστρωμάτων που καταλύονται από τη χλωροϋπεροξειδάση, συμβάλει στην σύνθεση ενώσεων υψηλής προστιθέμενης αξίας [Sanfilippo and Nicolosi, 2002; Kaup *et al.*, 2007].

### 4.2.1.2 Δομή Χωροϋπεροξειδάσης

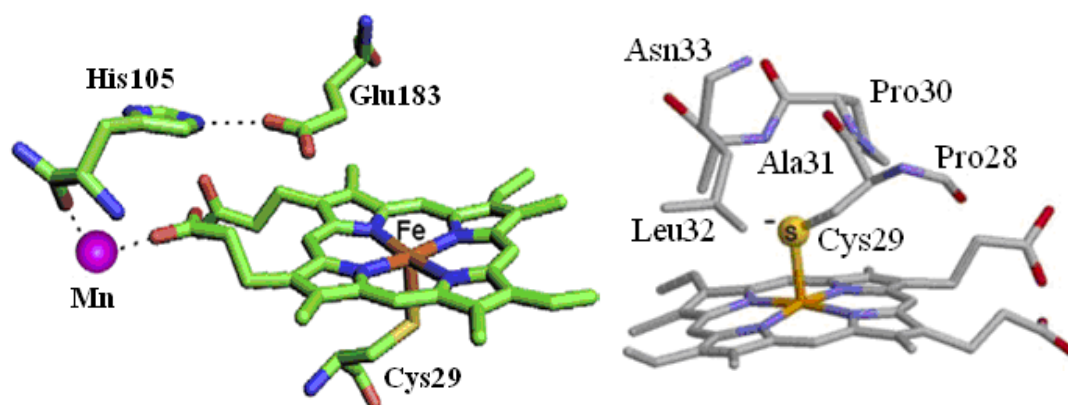
Λόγω των πολλαπλών καταλυτικών της ικανοτήτων, η χλωροϋπεροξειδάση έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον για την κατανόηση των δομικών ιδιοτήτων της [Hollenberg *et al.*, 1980; Rutter and Hager, 1982; Rutter *et al.*, 1984; Sono and Dawson, 1984; Sono *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1995; Conesa *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003]. Η CPO έχει μοριακό βάρος 42 kDa [Grisham, 1991; Morris and Hager, 1996] και διαστάσεις 5.3 nm x 5.5 nm x 3.1 nm [Sundaramoorthy *et al.*, 1995]. Βασικό χαρακτηριστικό της δομής της είναι ότι έχει μία σιδηρο-πρωτοπορφυρίνη IX (iron protoporphyrin IX moiety), ως προσθετική ομάδα, η οποία βρίσκεται ανάμεσα από τα δύο κύρια μέρη της  $\alpha$ -έλικας της πρωτεΐνης [Colonna *et al.*, 1999;

Kim S.H., *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008; Renirie *et al.*, 2009]. Στο Σχήμα 4.2 απεικονίζονται οι  $\alpha$ -έλικες και ο δακτύλιος της αίμης.



**Σχήμα 4.2.** Σχηματική απεικόνιση  $\alpha$ -ελικών και δακτυλίου αίμης της χλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago*. Το πράσινο χρώμα αντιστοιχεί στην N τελική περιοχή ενώ το μπλέ στην C τελική περιοχή των  $\alpha$ -ελικών [Littlechild, 1999].

Η τριτοταγής δομή της CPO αποτελείται από οχτώ  $\alpha$ -έλικες. Η ομάδα της αίμης- $\beta$  βρίσκεται ανάμεσα σε δύο  $\alpha$ -έλικες [Littlechild, 1999] από τις οποίες η μια είναι N-τελική και η άλλη είναι C-τελική αλυσίδα [Conesa *et al.*, 2001]. Γενικά η χλωροϋπεροξειδάση στο ενεργό της κέντρο, περιέχει ένα κυστεϊνικό σουλφιδρίλιο ως πέμπτο αξονικό υποκατάστατη της αίμης στη θέση του υποκατάστατη του ιμιαζολίου. Ο πέμπτος αξονικός δεσμός του καταλυτικού ενεργού σιδήρου, είναι ανάλογος με αυτού του κυτοχρώματος P450, όμως αντί για ιστιδίνη έχει κυστεΐνη (Cys29) και το άτομο του σιδήρου είναι πιο πολύ εκτεθειμένο από κάθε άλλη γνωστή υπεροξειδάση. [Sundaramoorthy *et al.*, 1995, 1998]. Για το λόγο αυτό πολλές από τις φασματοσκοπικές και χημικές ιδιότητες είναι παρόμοιες με αυτές του κυτοχρώματος P450 [Sono *et al.*, 1984; Sono *et al.*, 1985; Kiljunen and Kanerva, 2000; Jung *et al.*, 2008]. Επιπλέον στο περιβάλλον της αίμης υπάρχει μια ακραία ιστιδίνη (His105) και δύο κατάλοιπα ασπαραγίνης (Asp 106) και αργινίνης (Arg26) [Santhanam and Dordick, 2002; Spreti *et al.*, 2004]. Στο Σχήμα 4.3 απεικονίζεται το κέντρο της αίμης.



**Σχήμα 4.3.** Σχηματική απεικόνιση του κέντρου της αίμης της χλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago* [Jung *et al.*, 2008; Renirie *et al.*, 2009;].

Η είσοδος των υποστρωμάτων στο  $\text{Fe}^{4+}=\text{O}$  γίνεται από μια σχισμή πάνω από την αίμη. Η συγκεκριμένη είσοδος περιβάλλεται από υδρόφοβα κατάλοιπα: Phe103, Phe186, Val182 τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο [Conesa *et al.*, 2002].

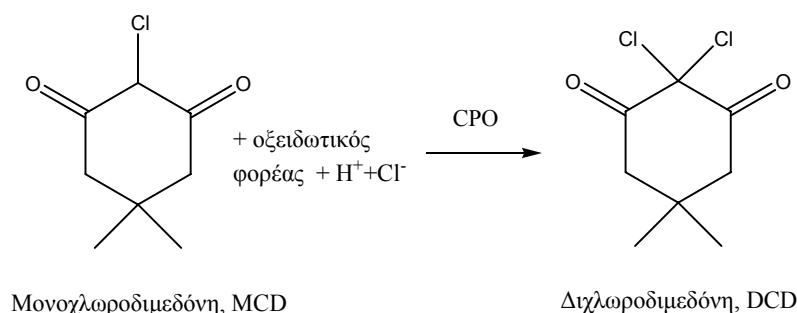
Το κέντρο της αίμης έχει μελετηθεί εκτενώς με διάφορες τεχνικές όπως με φασματοσκοπία ENDOR (electron nuclear double resonance) [Kim, S.H., *et al.*, 2006], με φασματοσκοπία IR [Jung *et al.*, 2008], με φασματοσκοπία Raman [Stone *et al.*, 2006], με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωϊσμού (CD) [Sono *et al.*, 1985; Yi *et al.*, 2003; Liu and Wang, 2007], με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [Sundaramoorthy *et al.*, 1995], με φθορισμομετρία [Liu and Wang, 2007] και με την βοήθεια του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) [Hollenberg *et al.*, 1980; Dawson and Sono 1987; Debrunner *et al.*, 1996].

Η κρυσταλλική δομή της χλωροϋπεροξειδάσης αποκαλύπτει την ύπαρξη ενός μορίου νερού τοποθετημένο σε απόσταση 3.4 Å από το σίδηρο [Sundaramoorthy *et al.*, 1995]. Επιπλέον η σύγκριση της κρυσταλλικής δομής της CPO [Sundaramoorthy *et al.*, 1995] με άλλες γνωστές αιμο-υπεροξειδάσες όπως αυτού του κυτοχρώματος P450 [Poulos *et al.*, 1980], της υπεροξειδάσης της λιγνίνης [Poulos *et al.*, 1993], της υπεροξειδάσης από *Coprinus cinereus* [Petersen *et al.*, 1994], της υπεροξειδάσης από αραχίς (peanut peroxidase) [Schuller *et al.*, 1996] και του ισοενζύμου C της υπεροξειδάσης αγριοραφανίδων [Gajhede *et al.*, 1997], αποκάλυψε δραματικές αλλαγές στην δομή της χλωροϋπεροξειδάσης με τις άλλες παραδοσιακές υπεροξειδάσες. Για παράδειγμα όπως προαναφέρθηκε η χλωροϋπεροξειδάση

έχει κυστεΐνη (Cys29) αντί για ιστιδίνη στο ενεργό της κέντρο σε σχέση με το κυτόχρωμα P450 [Sundaramoorthy *et al.*, 1995]. Επίσης το γλουταμινικό οξύ (Glu 183) που είναι τοποθετημένο στην περιφερειακή πλευρά της προσθετικής ομάδας της αίμης, παίζει το ρόλο του καταλύτη για να διευκολύνει την αντίδραση μεταξύ της υπεροξειδάσης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά τον σχηματισμό της μορφής I ( $\text{Fe}^{\text{IV}}$ ). Σε αντίθετη περίπτωση, για τις περισσότερες αιμο-υπεροξειδάσες η λειτουργία αυτή επιτελείται από μια ιστιδίνη [Yi *et al.*, 2003].

#### 4.2.1.3 Οξειδωτική Αλογόνωση

Η χλωροϋπεροξειδάση μπορεί να καταλύσει διάφορες βιομετατροπές χρησιμοποιώντας παρόμοιο μηχανισμό με αυτού του κυτοχρώματος P450, όπου η οξείδωση του υποστρώματος πραγματοποιείται μέσω ενός μιας ενδιάμεσης κατιοντικής ρίζας της οξοπορφυρίνης  $\text{Fe}^{\text{IV}}$ , η οποία δημιουργείται με την αλληλοεπίδραση του ενζύμου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου [Colonna *et al.*, 1999]. Η κύρια διαφορά μεταξύ χλωροϋπεροξειδάσης και κυτοχρώματος P450 είναι ότι το δεύτερο χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο ως υπόστρωμα και συνένζυμο NAD(P)H το οποίο πρέπει να αναγεννηθεί κατά την διάρκεια της βιοκαταλυτικής διεργασίας, κάτι το οποίο περιορίζει την βιομηχανική του εφαρμογή [Colonna *et al.*, 1999; van Rantwijk and Sheldon, 2000]. Μια από τις πιο σημαντικές αντιδράσεις που καταλύονται από την χλωροϋπεροξειδάση είναι η οξειδωτική αλογόνωση [Hager *et al.*, 1966; Thomas and Hager, 1969; Thomas *et al.*, 1970]. Ο μηχανισμός αντιδράσεων τέτοιου τύπου έγκειται στο γεγονός ότι η χλωροϋπεροξειδάση χρησιμοποιεί ιόντα αλογόνου και υπεροξειδίου του υδρογόνου για την αντίδραση αλογόνωσης. Η αλογόνωση του άνθρακα γίνεται σε βενζυλικό ή αλλυλικό δεσμό C-H χωρίς όμως ιδιαίτερη εκλεκτικότητα καθώς υπάρχει μόνο μια βιβλιογραφική αναφορά που να αναφέρει την τόπο- και στερεοεκλεκτικότητα της χλωροϋπεροξειδάσης σε αντίδραση αλογόνωσης [Liu and Wong, 1992]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλογόνωσης είναι η αντίδραση χλωρίωσης της μονοχλωροδιμεδόνης (MCD) σε διχλωροδιμεδόνη (DCD) [Aburto *et al.*, 2005; Toti *et al.*, 2005, 2006; Bai *et al.*, 2009]. Στο Σχήμα 4.4 παρουσιάζεται η αντίδραση χλωρίωσης της μονοχλωροδιμεδόνης από την χλωροϋπεροξειδάση παρουσία ιόντων χλωρίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου.



**Σχήμα 4.4.** Αντίδραση χλωρίωσης της μονοχλωροδιμεδόνης σε διχλωροδιμεδόνη από την χλωροϋπεροξειδάση (CPO) παρουσία ιόντων χλωρίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Το ένζυμο μπορεί να καταλύσει την αλογόνωση πλήθος υποστρωμάτων όπως αρωματικές ενώσεις, [Aburto *et al.*, 2005], φλαβόνες και φλαβανόνες [Yairakdee and Robertson, 2001], φαινολικά οξέα [Yamada *et al.*, 1985] καθώς και αλκένια [Aoun and Baboulene, 1998]. Οι αντιδράσεις χλωρίωσης θεωρούνται πολύ σημαντικές από οικολογικής απόψεως, καθώς συμμετέχουν στη βιοαποκατάσταση του εδάφους [Bello-Ramirez *et al.*, 2000; Niedan *et al.*, 2000; Casey, 2002; Ortiz-Bermudez *et al.*, 2003; Reina *et al.*, 2004].

#### 4.2.1.4 Εφαρμογές χλωροϋπεροξειδάσης σε μη συμβατικά μέσα

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα που πηγάζουν από την χρήση των υπεροξειδασών υπάρχουν κάποια σημαντικά μειονεκτήματα που καθιστά την χρήση τους προβληματική. Η εφαρμογή της CPO σε διάφορες βιομετατροπές βιομηχανικού ενδιαφέροντος έχει εμποδιστεί: α) από το υψηλό κόστος της, β) από την δυσκολία ανάκτησης της μετά την αντίδραση, γ) από την χαμηλή σταθερότητα της ακόμη και σε ήπιες θερμοκρασίες, δ) λόγω της χαμηλής διαλυτότητας των οργανικών υποστρωμάτων σε υδατικά μέσα, και ε) από την απενεργοποίηση της σε υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου [Spreti *et al.*, 2004; Park and Clark 2006a; Chiappe *et al.*, 2006; Zhi *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008].

Για το λόγο αυτό σε πολλές εργασίες μελετάται η βελτίωση των καταλυτικών ιδιοτήτων της CPO με την προσθήκη διαφόρων ουσιών όπως πολυσακχαρίτες π.χ. χιτοζάνη [Bai *et al.*, 2009], πολυμερών π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) [Spreti *et al.*, 2004; Zhi *et al.*, 2007] και πολυαιθυλενοϊμίνης (PEI) [Narayanan *et al.*, 2007], βιταμίνες π.χ. βιταμίνη E [van de Velde *et al.*, 2001a,b], αντιοξειδωτικές ενώσεις π.χ. φερουλικό οξύ, καφεϊκό οξύ, κατεχίνη [Grey *et al.*, 2008], επιφανειοενεργές ενώσεις π.χ. AOT [Zhi *et al.*, 2007], αλλά και με

τεχνικές όπως με τόπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξογέννεση [Rai *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2003] και κατευθυνόμενη εξέλιξη με τυχαία μεταλλαξογέννεση [van de Velde *et al.*, 2001a].

Επιπλέον, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου, επιχειρήθηκε η εισαγωγή του ενζύμου στο σύστημα της αντίδρασης (π.χ. σε διαλύματα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό ή και σε σχεδόν άνυδρα συστήματα) είτε σε λυοφιλιωμένη μορφή είτε ακινητοποιημένο σε κατάλληλο φορέα [Dai and Klibanov 1999; Bakker *et al.*, 2000; Manoj *et al.*, 2000; Ayala *et al.*, 2002; Santhanam and Dordick, 2002]. Γενικά μελετήθηκε η ακινητοποίηση της CPO σε διάφορους φορείς όπως σε νανοσωλήνες άνθρακα [Zhang H.-X., *et al.*, 2008], μεσοπορώδη υλικά [Terres *et al.*, 2008], μαγνητικά υλικά [Bayramoglu *et al.*, 2008], οργανογέλες πυριτίου [Petri *et al.*, 2004], ταλκ [Aoun and Baboulène, 1998], αφρό πολυουρεθάνης [Bakker *et al.*, 2000].

Επίσης η απενεργοποίηση της CPO από το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να επιβραδυνθεί σημαντικά με σταδιακή προσθήκη του  $H_2O_2$  [Colonna *et al.*, 1992; Seelbach *et al.*, 1997; van de Velde *et al.*, 2001a], με *in situ* παραγωγή του  $H_2O_2$  με χρήση γλυκόζης και οξειδάση της γλυκόζης [van de Velde *et al.*, 2000], με χρήση άλλων οξειδωτικών φορέων όπως του τριτοταγές βουτυλο υπεροξείδιο του υδρογόνου (t-BHP) [Manoj *et al.*, 2000; Park and Clark, 2006b] αλλά και με τεχνικές όπως με διασύνδεση ενζυμικών κρυστάλλων [Ayala *et al.*, 2002; Roberge *et al.*, 2009].

Με σκοπό να αυξηθεί η διαλυτότητα των υποστρωμάτων, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις βιομετατροπής με χλωροϋπεροξειδάση σε υδατικά διαλύματα οργανικών διαλυτών [Cooney and Hueter, 1974] καθώς επίσης και σε μακροετερογενή διφασικά συστήματα, όπως υγρά-υγρά συστήματα αποτελούμενα από οργανικούς διαλύτες (αδιάλυτους στο νερό) και από νερό. Παρόλα αυτά σε πολλές περιπτώσεις η καταλυτική δραστηριότητα και εκλεκτικότητα παραμένουν χαμηλές στα μέσα αυτά [van Deurzen *et al.*, 1997c; Loughlin and Hawkes, 2000].

Με επιτυχία τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε η κατάλυση αντιδράσεων από την CPO σε ιοντικά υγρά όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο 3.3.4 [Sanfilippo *et al.*, 2004; Chiappe *et al.*, 2006; Lichtenecker and Schmid, 2009; Boskin *et al.*, 2008]. Επίσης εναλλακτικά, μικροετερογενή συστήματα αντιδράσεων, όπως μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (π.χ. αντίστροφα μικκύλια) που σχηματίζονται από διάφορα επιφανειοενεργά μόρια σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες (όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.3.6), έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την μετατροπή υδρόφοβων υποστρωμάτων που καταλύονται από την CPO [Franssen *et al.*, 1988; Aoun and Baboulène 1998; Renirie *et al.*, 2009]. Σε αυτά τα

θερμοδυναμικώς σταθερά διαλύματα, τα ένζυμα είναι ενεργά για την βιομετατροπή τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων ενώσεων [Stamatis *et al.*, 1999b]. Η εφαρμογή σε μεγάλη κλίμακα των μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που περιέχουν ένζυμο μπορεί να παρεμποδιστεί από την αναγκαιότητα για διαχωρισμό του επιφανειοενεργού από το ένζυμο και από τα προϊόντα της αντίδρασης [Khmelnitsky *et al.*, 1988; Stamatis *et al.*, 1999b] όπως αυτά αναφέρονται στην παράγραφο 3.3.6.1.2. Στην παρούσα διατριβή προκειμένου να ξεπεραστούν οι δυσκολίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν τριαδικά συστήματα που αποτελούνται από ένα υδρογονάνθρακα, μια μικρής αλυσίδας αλκοόλη (π.χ. ισοπροπανόλη ή προπανόλη-1) και νερό [Vulfson *et al.*, 1991; Zoumpantioti *et al.*, 2006a] (όπως αυτά αναφέρονται στην παράγραφο 3.3.6.3) ως μέσα για την πραγματοποίηση αντιδράσεων καταλυόμενες από την CPO [Fedorak *et al.*, 1993].

### 4.3 Οξειδάσες

Οι οξειδάσες είναι ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ), ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Στις αντιδράσεις αυτές το οξυγόνο ανάγεται είτε σε νερό ( $H_2O$ ) είτε σε υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Υποκατηγορία των ενζύμων αυτών είναι οι φαινολάσες, που αφορά ένζυμα που περιέχουν άτομα χαλκού και καταλύουν την οξείδωση φαινολών. Στην υποκατηγορία αυτή ανήκουν οι λακκάσες.

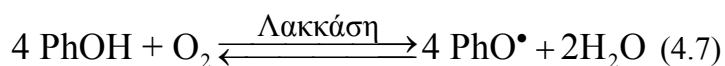
#### 4.3.1 Λακκάσες

Οι λακκάσες (EC1.10.3.2) είναι από τα λίγα ένζυμα που έχουν μελετηθεί από το 19<sup>ο</sup> αιώνα. Πρώτος ο Yoshida τις ανακάλυψε το 1883, σε Ιαπωνικά ρητινοφόρα δέντρα (*Rhus vernicifera*) [Gianfreda *et al.*, 1999] ενώ πρώτος τις χαρακτήρισε ως μέταλλο-οξειδάσες ο Bertrand το 1985 [Mayer and Staple, 2002]. Από τότε δραστηριότητα λακκάσης έχει παρατηρηθεί σε φυτά [Huttermann *et al.*, 2001], σε έντομα [Dittmer *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2001; Diamantidis *et al.*, 2001] και σε λίγα βακτήρια [Claus and Filip, 1997; Claus, 2003]. Παρόλα αυτά οι πιο βιοτεχνολογικά αξιοποιήσιμες λακκάσες προέρχονται από μύκητες. Οι λακκάσες που παράγονται από μύκητες είχαν ήδη ανακαλυφθεί κατά τη διάρκεια του 19<sup>ου</sup> αιώνα [Bertrand, 1896; Laborde, 1896]. Πάνω από 60 στελέχη μυκήτων που ανήκουν

στους Ασκομύκητες, Δευτερομύκητες και ιδιαίτερα στους Βασιδιομύκητες επέδειξαν δραστηριότητα λακκάσης.

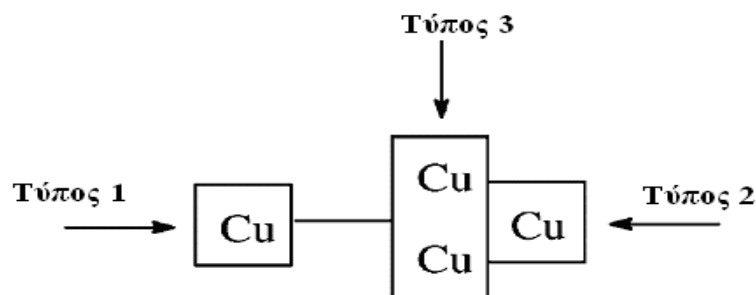
Οι λακάσες που προέρχονται από μύκητες απαντώνται συνήθως με διαφορετικές μορφές (ισοένζυμα) ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειας τους. Γενικά οι μύκητες μπορούν να παράγουν πληθώρα ισοενζύμων λακκάσης που διαφέρουν μεταξύ τους τόσο στην αλληλουχία των αμινοξέων όσο και στον τύπο των υδατανθρακικών καταλοίπων. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό του *Trametes versicolor*, που βρέθηκε ότι παράγει πέντε ισοένζυμα τα οποία διαφέρουν μόνο στο υδατανθρακικό περιεχόμενο [Bertrand *et al.*, 2002]. Οι περισσότερες λακκάσες είναι μονομερές πρωτεΐνες, αν και έχουν επίσης περιγραφεί λακκάσες που αποτελούνται από περισσότερες υπομονάδες [Yaver *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2003]. Παράδειγμα τέτοιων λακκάσων είναι η λακκάση από *Pleurotus pulmonatus* [Marques and Peralta, 2003], από *Rhizoctonia solani* [Wahleithner *et al.*, 1996], από τον βασιδιομύκητα I-62 [Mansur *et al.*, 1998] και από *Pleurotus sajor caju* [Solden and Dobson, 2001].

Γενικά οι λακκάσες, γνωστές και ως φαινολικές ή μπλε οξειδάσες [Yaropolov *et al.*, 1994], ανήκουν στην γενική κατηγορία των οξειδασών (υποκατηγορία των οξειδοαναγωγασών) που είναι μια από τις έξι υποκατηγορίες ενζύμων που ανάγουν το οξυγόνο σε νερό [Claus, 2004; Riva, 2006; Durao *et al.*, 2008]. Είναι πολυπυρηνικές γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από 520-550 αμινοξέα, έχουν μέσο μοριακό βάρος 60-70 kDa και υδατανθρακικό μέρος αντίστοιχο με το 10-20% της μοριακής τους μάζας. Η ομοιοπολική σύνδεση του τμήματος των υδατανθράκων του ενζύμου σχηματίζεται από μαννόζη, N-ακετυλογλυκοσαμίνη και γαλακτόζη [Gianfreda *et al.*, 1999]. Οξειδώνουν φαινολικά υποστρώματα [Burke and Cairney, 2002; Piontek *et al.*, 2002] πολυφαινόλες, αρωματικές αμίνες αλλά και πλήθος μη φαινολικών ενώσεων [Baldrian, 2006]. Η οξείδωση των υδροξυλικών ομάδων των φαινολικών υποστρωμάτων προς φαίνολ-ρίζες (οι οποίες με περαιτέρω μη ενζυμικές διεργασίες συντελούν στην αποικοδόμηση της λιγνίνης) [Widsten and Kandelbayer, 2008] γίνεται σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



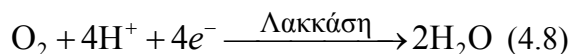
#### 4.3.2 Δομή και ενεργό κέντρο λακκάσων

Οι λακκάσες στο ενεργό τους κέντρο αποτελούνται από τέσσερα άτομα χαλκού, τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική τους δράση [Solomon *et al.*, 1996; Lindley, 2001; Stoj and Kosman, 2005; Durao *et al.*, 2008]. Ο όρος «μπλέ χαλκός» αναφέρεται στον χαλκό Τύπου 1 (T1), εξαιτίας του πράσινου μπλε χρώματος που παρουσιάζεται κατά την οξείδωση του [Solomon *et al.*, 1996]. Από τα τέσσερα άτομα χαλκού, τα τρία σχηματίζουν μεταξύ τους ένα σύμπλεγμα τριών ατόμων (το ένα άτομο χαλκού αντιστοιχεί στον Τύπο 2 (T2) και τα δυο άτομα χαλκού στον Τύπο 3 (T3)) και είναι τοποθετημένα κατά 12Å μακριά από τον χαλκό Τύπου 1. Στην θέση των τριών ατόμων χαλκού λαμβάνει χώρα η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό [Piontek *et al.*, 2002; Alcalde, 2007]. Στο Σχήμα 4.5 απεικονίζεται η σύνδεση των τεσσάρων ατόμων χαλκού στο ενεργό κέντρο της λακκάσης.

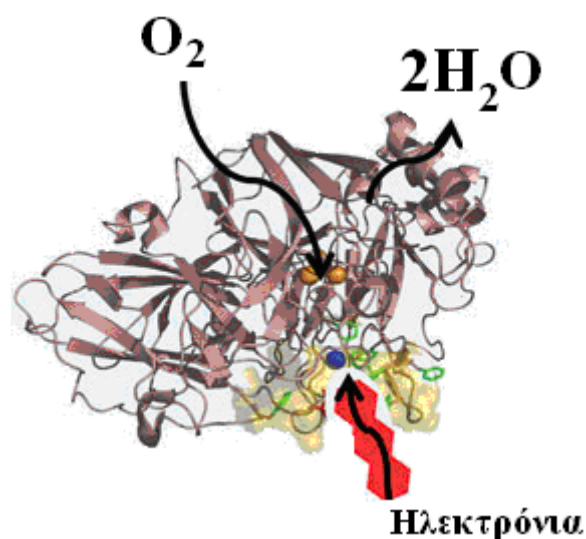


**Σχήμα 4.5.** Σχηματική απεικόνιση σύνδεσης των τεσσάρων ατόμων χαλκού του ενεργού κέντρου της λακκάσης [Duran *et al.*, 2002].

Υποτίθεται ότι οι λακκάσες λειτουργούν όπως οι μπαταρίες, δηλαδή αποθηκεύουν τα ηλεκτρόνια από τις τέσσερις ανεξάρτητες αντιδράσεις οξείδωσης των τεσσάρων μορίων του υποστρώματος, με σκοπό να αναχθεί το μοριακό οξυγόνο σε δυο μόρια νερού [Solomon *et al.*, 1996, 2001; Freire *et al.*, 2003; Blanford *et al.*, 2007; Ferraroni *et al.*, 2007], σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:

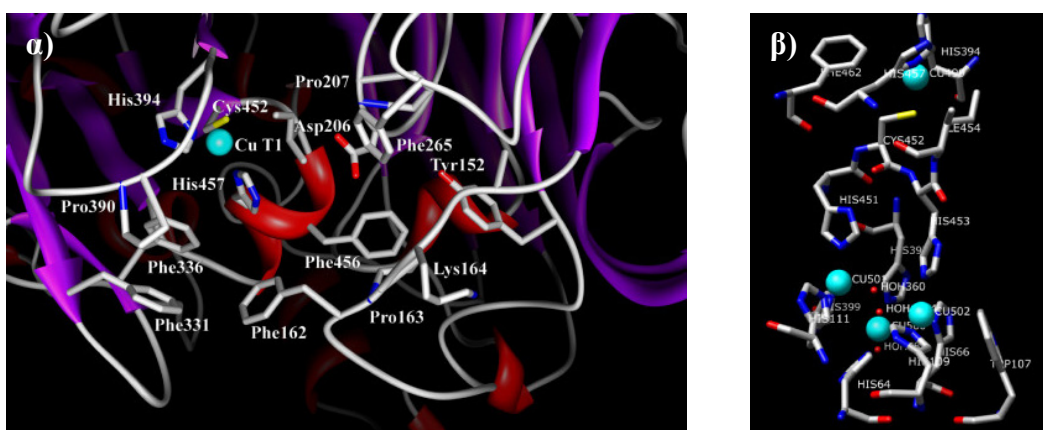


Σύμφωνα με τους Call και Mucke έχει προταθεί ότι ο χαλκός Τύπου 1 (T1) και ο χαλκός Τύπου 2 (T2) σχετίζονται με την σύλληψη και μεταφορά των ηλεκτρονίων ενώ ο χαλκός Τύπου 3 (T3) σχετίζεται με την δέσμευση του οξυγόνου [Call and Mucke, 1997]. Στο Σχήμα 4.6 παρουσιάζεται μια προσομοίωση της αντίδρασης αυτής.



**Σχήμα 4.6.** Δομή και ενεργό κέντρο λακκασών. Οι σφαίρες με κίτρινο χρώμα συμβολίζουν τον χαλκό Τύπου 2 (T2) και Τύπου 3 (T3), ενώ με μπλε το χαλκό Τύπου 1 (T1) [Blanford *et al.*, 2007].

Πιο αναλυτικά, στο ενεργό κέντρο των λακκασών υπάρχουν κυρίως κατάλοιπα ιστιδίνης (His457) αλλά και διάφορα αμινοξέα τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στις αλληλοεπιδράσεις του ενεργού κέντρου με τα διάφορα υποστρώματα κατά την οξειδωση τους. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται υδρόφοβα κατάλοιπα όπως Phe162, Phe265, Phe331, Phe 336, Phe 456 τα οποία βρίσκονται κοντά με άλλα υδρόφιλα κατάλοιπα όπως Asp206, Lys164, Tyr152, αλλά και με διάφορες προλίνες: Pro163, Pro207, Pro390. Η ποικιλία των αμινοξέων που εντοπίζονται στην περιοχή αυτή, εξηγεί το μεγάλο εύρος υποστρωμάτων που καταλύονται από τις λακκάσες [Ferraroni *et al.*, 2007]. Στο Σχήμα 4.7α παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο των λακκασών γύρω από την περιοχή του χαλκού Τύπου 1 (T1), ενώ στο Σχήμα 4.7β παρουσιάζονται τα αμινοξέα γύρω από τα τέσσερα άτομα χαλκού.



**Σχήμα 4.7.** Απεικόνιση χαρακτηριστικών αμινοξέων στο ενεργό κέντρο των λακκασών γύρω από την περιοχή α) του χαλκού Τύπου 1 (T1) και β) των τεσσάρων ατόμων χαλκού [Ferraroni *et al.*, 2007].

Πιο συγκεκριμένα, ο χαλκός Τύπου 1(T1) (γνωστός και ως παραμαγνητικός «μπλε» χαλκός με απορρόφηση στα 610 nm) συνδέεται τριγωνικά με δύο ιστιδίνες (His394 και His457) και μια κυστεΐνη (Cys452) ως διατηρημένα κατάλοιπα. Δυο υδρόφοβα κατάλοιπα (Ile454 και Phe462) που είναι σε απόσταση 3.5–3.6 Å από το ιόν του χαλκού Τύπου 1 θεωρείται ότι συνεισφέρουν στο υψηλό οξειδοαναγωγικό που εμφανίζει το συγκεκριμένο ένζυμο [Ferraroni *et al.*, 2007]. Ο χαλκός Τύπου 1 είναι το σημείο όπου λαβαίνει χώρα η οξείδωση του υποστρώματος. Γενικά κατά την καταλυτική διαδικασία τα ηλεκτρόνια που δεσμεύει ο χαλκός Τύπου 1(T1) από το υπόστρωμα που ανάγεται, μεταφέρονται στο σύμπλεγμα των χαλκών Τύπου 2 και 3. Η μεταφορά των ηλεκτρονίων γίνεται αρχικά μέσω της κυστεΐνης (Cys452), ενώ στη συνέχεια μοιράζονται μεταξύ της ιστιδίνης His451 και His453 και μεταφέρονται στα δύο άτομα χαλκού Τύπου 3(T3) αντίστοιχα [Reinhammar, 1997]. Ο χαλκός Τύπου 2 (γνωστός και ως παραμαγνητικός «μη-μπλέ» χαλκός), δεν εμφανίζει απορρόφηση στο ορατό φάσμα και η θέση του είναι κοντά στο χαλκό Τύπου 3 (διμερές σύμπλοκο ατόμων χαλκού, απορρόφηση στα 330 nm), ο οποίος αποτελείται από ένα διμερές πυρηνικό κέντρο [Ferraroni *et al.*, 2007].

Έχουν όμως απομονωθεί και μερικές λακκάσες που στερούνται τον χαλκό Τύπου 1, οι οποίες όμως παρουσιάζουν κάποια τυπικά χαρακτηριστικά των λακκασών [Min *et al.*, 2001; Mansur 2003; Pozdnyakova *et al.*, 2006a,b; Litthauer *et al.*, 2007] όπως σταθερότητα και βελτιωμένες οξειδωτικές ικανότητες. Αυτές οι λακκάσες καλούνται «κίτρινες» ή «λευκές» λακκάσες και πολλοί ερευνητές δεν τις θεωρούν ότι ανήκουν στην κατηγορία των λακκασών.

### 4.3.3 Βιολογικές λειτουργίες και βιομηχανικές εφαρμογές λακκασών

Παρ'όλο που οι λακκάσες είναι αντικείμενο μελέτης από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα, η χρήση τους ως βιοκαταλύτες σε οργανικές βιομετατροπές και συνθέσεις αγνοήθηκε στο παρελθόν ως αποτέλεσμα της χαμηλής διαθεσιμότητας τους. Η αναζήτηση όμως καινούργιων, αποτελεσματικών και ταυτόχρονα φιλικών ως προς το περιβάλλον καταλυτών έστρεψε το επιστημονικό ενδιαφέρον προς την χρήση των λακκασών λόγω ότι χρησιμοποιούν οξυγόνο και παράγουν νερό ως το μόνο παραπροϊόν [Mayer and Staples, 2002]. Η στροφή αυτή οφείλεται και στο γεγονός ότι οι λακκάσες που προέρχονται από μύκητες είναι σταθερές όταν αποθηκεύονται σε τιμές κοντά σε ουδέτερο pH ή σε θερμοκρασίες κάτω των 25°C [Xu *et al.*, 1996; Bonomo *et al.*, 2001; Kurniawati and Nicel, 2008], ενώ μπορούν να ασκούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες σε ένα ευρύ φάσμα pH και θερμοκρασιών [Call and Mucke, 1997; Xu *et al.*, 1996]. Πράγματι, την τελευταία δεκαετία έχουν δημοσιευθεί πλήθος ερευνών που επικεντρώνονται τόσο στο βιολογικό ρόλο των λακκασών όσο και στην χρήση τους σε πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών [Mayer and Staples, 2002; Riva, 2006; Mikolasch and Schauer, 2009].

Ο βιολογικός ρόλος των λακκασών είναι ευρύς [Mayer and Staples, 2002]. Μαζί με την υπεροξειδάση της λιγνίνης, την υπεροξειδάση του μαγγανίου, αποτελούν τα λεγόμενα λιγνολυτικά (lignolytic) ένζυμα [Leonowicz *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 2005], καθώς ο φυσιολογικός τους ρόλος σχετίζεται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης [Mikolasch and Schauer, 2009]. Πέρα από αυτό όμως έχει παρατηρηθεί δράση λακκασών κατά την ανακύκλωση του χούμους και των χουμικών οξέων [Baldrian, 2006], κατά την αποικοδόμηση του γαιάνθρακα [Hölker *et al.*, 2002b] και κατά την τοπική διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος στις μυκόρριζες (συμβίωση μυκήτων με τις ρίζες των φυτών) [Burke and Cairney, 2002].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι λακκάσες έχουν την ιδιότητα να δέχονται ως υποστρώματα ένα μεγάλο εύρος ενώσεων (φαινόλες, πολυφαινόλες, ανιλίνες, διαμίνες, οργανικές και ανόργανες ενώσεις μετάλλων και πλήθος άλλων) και αυτός είναι και ο κύριος λόγος για την εφαρμογή τους σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών [Xu, 2005; Riva, 2006].

Επιπλέον παρουσία μικρών μορίων, γνωστών και ως οξειδοαναγωγικών διαμεσολαβητών (redox mediator), οι λακκάσες βελτιώνουν την εξειδίκευση τους σε διάφορα υποστρώματα, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 4.3.4. Ο μηχανισμός των συγκεκριμένων

αντιδράσεων ακολουθεί την λογική ότι πρώτα το ένζυμο οξειδώνει τον διαμεσολαβητή και στη συνέχεια ο οξειδωμένος διαμεσολαβητής οξειδώνει το υπόστρωμα. Έτσι καθίσταται δυνατή η οξείδωση υποστρωμάτων που υπό άλλες συνθήκες δεν θα ήταν εφικτή. Βάση του παραπάνω μηχανισμού οι λακκάσες βρίσκουν εφαρμογή στην αποικοδόμηση ξενοβιοτικών [Duran and Esposito, 2000], σε διάφορες διαδικασίες λεύκανσης στην κλωστοϋφαντουργία [Guebitz *et al.*, 2006; Abadulla *et al.*, 2000; Kunamneni *et al.*, 2008b], στην οξείδωση οργανικών αποβλήτων [Lante *et al.*, 2000], στη μετατροπή φυσικών προϊόντων [Hosny and Rosazza, 2002; Mikolasch and Schauer, 2009], στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό φαινολών και των παραγωγών τους στο αίμα, στο κρασί, σε τσάι, σε χυμούς φρούτων και λάδι [Torrecilla *et al.*, 2007; Vianello *et al.*, 2004,2006; Zhang *et al.*, 2007], στην βελτίωση των ιδιοτήτων των τροφίμων και στην σταθεροποίηση ροφημάτων [Minussi *et al.*, 2002; Kunamneni *et al.*, 2008a], στην αρτοποιία [Figueroa-Espinoza and Rouau, 1998], στην οργανική σύνθεση [Kunamneni *et al.*, 2008c] και στην σύνθεση αγρο-βιοπολυμερών [Micard and Thibault, 1999]. Επίσης χρησιμοποιούνται κατά τον καθαρισμό έγχρωμων υδατικών αποβλήτων [Duran and Esposito, 2000], στην βιομετατροπή και αδρανοποίηση τοξικών αποβλήτων [Gianfreda *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2007], στην παραγωγή αιθανόλης [Larsson *et al.*, 2001], στην ανάλυση φαρμάκων [Bauer *et al.*, 1999].

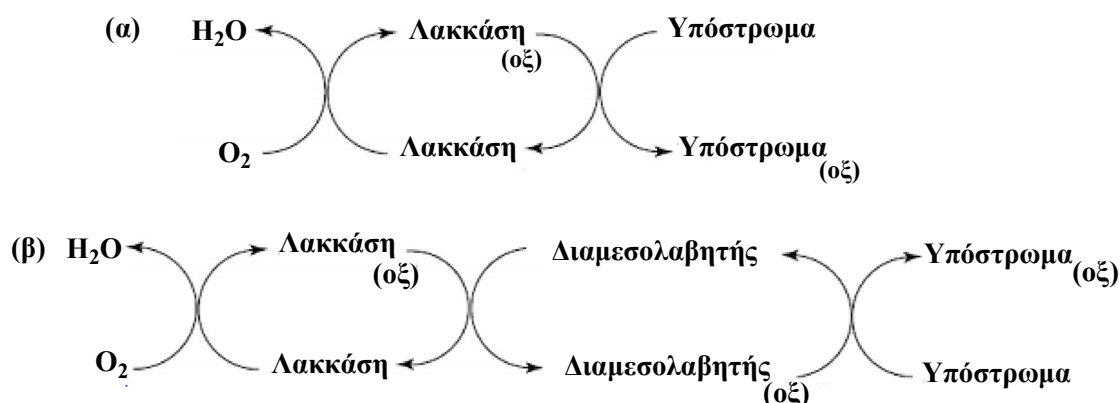
Η εφαρμογή κλασικών χημικών μεθόδων χαρακτηρίζεται συχνά από πλήθος μειονεκτημάτων όπως τοξικότητα αντιδρώντων, υψηλό κόστος αντιδραστηρίων, εμφάνιση ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, σύνθετη παραγωγική διαδικασία κλπ. Σε αντίθεση με την κλασική προσέγγιση, η χρήση των λακκασών αποτελεί μια εναλλακτική λύση για την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας [Riva, 2006]. Οι λακκάσες μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες στην συνθετική χημεία όπου και έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πολυμερών και φαρμακευτικών προϊόντων [Xu *et al.*, 1999, 2005]. Πράγματι, η εφαρμογή των λακκασών στην οργανική σύνθεση έχει αυξηθεί. Στον Πίνακα 4.2 παρουσιάζονται οι λακκάσες που χρησιμοποιούνται περισσότερο στην οργανική σύνθεση.

**Πίνακας 4.2.** Ενδεικτικά παραδείγματα χρήσης λακκασών στην οργανική σύνθεση [Kunamneni *et al.*, 2008c].

| Πηγή λακκάσης                  | Εφαρμογή                                                              | Βιβλιογραφική αναφορά                                          |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| <i>Colorious hirsutus</i>      | Σύνθεση χρωμάτων ινδαμίνης<br>Σύνθεση πολυαλινίνης                    | Baker <i>et al.</i> , 1996<br>Karamyshev <i>et al.</i> , 2003. |
| <i>Pycnoporus cinnabarinus</i> | Σύνθεση παραγώγων του 3-(3,4 διυδροξυφαινυλίου) του προπιονικού οξέος | Mikolasch <i>et al.</i> , 2002                                 |
| <i>Pycnoporus coccineus</i>    | Πολυμερισμός λειτουργικών πολυμερών                                   | Uyama and Kobayashi, 2002                                      |
| <i>Pyricularia oryzae</i>      | Οξειδωτική σύνδεση 3-μεθυλ 2-βενζοθειαλονινόνη και μεθοξυφαινολών     | Setti <i>et al.</i> , 1999                                     |
| <i>Trametes versicolor</i>     | Σύνθεση αρωματικών αλδευδών                                           | Fritz-Langhals and Kunath, 1998                                |
|                                | Πολυμερισμός ναφθόλης 1-naphthol                                      | Aktas <i>et al.</i> , 2001                                     |
|                                | Πολυμερισμός κατεχόλης                                                | Aktas and Tanyolaç, 2006                                       |
|                                | Διαμοριακή σύνδεση πρωτεϊνών                                          | Boumans <i>et al.</i> , 2006                                   |
|                                | Σύνθεση υποκατάστατων ιμιαζόλης και διμερισμός προϊόντων              | Schäfer <i>et al.</i> , 2001                                   |
| <i>Trametes villosa</i>        | Πολυμερισμός διφαινόλης A                                             | Uchida <i>et al.</i> , 2001                                    |
| <i>Trametes hirsuta</i>        | Ολιγομεροποίηση πρωτεϊνών                                             | Mattinen <i>et al.</i> , 2006                                  |
| <i>Trametes pubescens</i>      | Οξείδωση παραγώγων σακχάρου                                           | Marzorati <i>et al.</i> , 2005                                 |
|                                | Οξείδωση φυσικών γλυκοζιτών                                           | Baratto <i>et al.</i> , 2006                                   |
|                                | Σύνθεση Τοταρόλης (totarol)                                           | Ncanana <i>et al.</i> , 2007                                   |
| <i>Pyricularia oryzae</i>      | Διαμοριακή σύνδεση ανασυνδιασμένων πρωτεϊνών                          | Suderman <i>et al.</i> , 2006                                  |
| <i>Myceliophthora</i>          | Σύνθεση πολυ-(κατεχίνης)                                              | Kurisawa <i>et al.</i> , 2003                                  |

#### 4.3.4 Το σύστημα λακκάση-διαμεσολαβητή (LMS)

Γενικά η δράση και η αποτελεσματικότητα του συστήματος LMS εξαρτάται από την επιλογή του κατάλληλου διαμεσολαβητή [Kunamneni *et al.*, 2008c]. Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί με σκοπό την ανεύρεση καινούργιων μεσολαβητών [Bourbonnais *et al.*, 1997; Camarero *et al.*, 2005; d'Acunzo and Galli, 2003; Johannes and Majcherczyk, 2000] και την διερεύνηση των μηχανισμού οξείδωσης του LMS [Li *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000; Fernández-Sánchez *et al.*, 2002; Baiocco *et al.*, 2003]. Στο Σχήμα 4.8 φαίνεται ο μηχανισμός οξείδωσης διαφόρων υποστρωμάτων παρουσία ή όχι διαμεσολαβητών. Ο μηχανισμός των συγκεκριμένων αντιδράσεων ακολουθεί την λογική ότι το ένζυμο πρώτα οξειδώνει τον διαμεσολαβητή και στη συνέχεια ο οξειδωμένος διαμεσολαβητής οξειδώνει το υπόστρωμα.



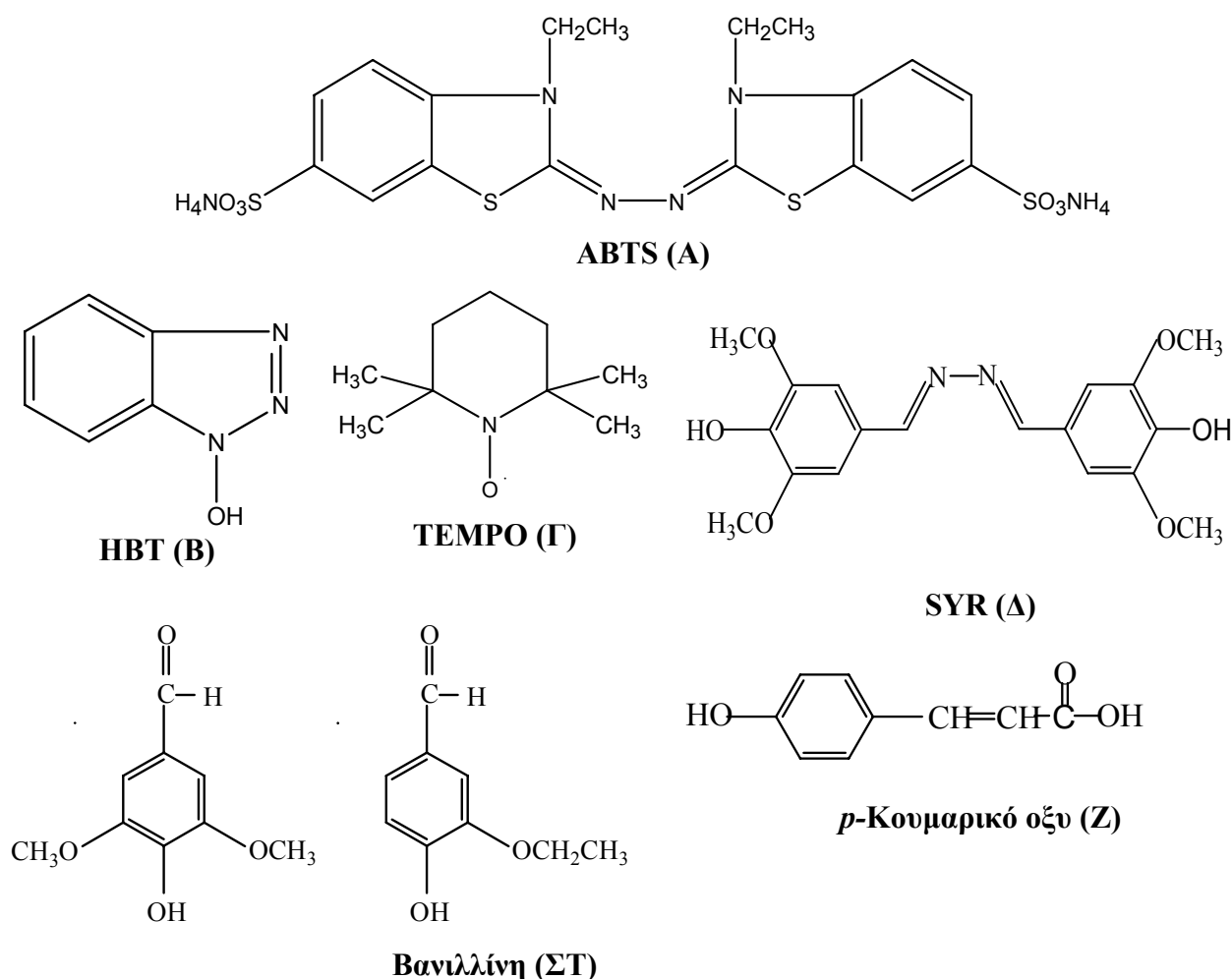
**Σχήμα 4.8.** Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού οξείδωσης των λακκασών (α) απουσία ή (β) παρουσία διαμεσολαβητή [Riva, 2006].

Το σύστημα LMS αυξάνει το εύρος των υποστρωμάτων που μπορούν να οξειδωθούν από τις λακκάσες, ακόμη και αυτών που έχουν υψηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό από τα συγκεκριμένα ένζυμα. Για παράδειγμα, η τιμή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού των λακκασών στο ενεργό κέντρο στην περιοχή κοντά στον χαλκό Τύπου 1(T1) είναι μεταξύ 475 με 790 mV, ενώ αυτή του συστήματος LMS είναι 1100 mV [Johannes and Majcherczyk, 2000; Fernandez-Sanchez *et al.*, 2002].

Η επιλογή ενός κατάλληλου διαμεσολαβητή αντικατοπτρίζει την επιλογή κλειδί για μια δεδομένη βιομετατροπή [Kunamneni *et al.*, 2008c] καθώς η χρήση διαφορετικών διαμεσολαβητών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά τελικά προϊόντα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η οξείδωση του προϊόντος λαμβάνει χώρα κάτω από διαφορετικούς μηχανισμούς, καθώς οι ρίζες του διαμεσολαβητή με βάση την χημική τους δομή και το εν δυνάμει οξειδοαναγωγικό τους επιτελούν διαφορετικά μονοπάτια οξείδωσης [d'Acunzo *et al.*, 2002, 2006; Baiocco *et al.*, 2003; Galli and Gentili, 2004]. Για το λόγο αυτό προκειμένου η οξείδωση να οδηγεί στα επιθυμητά προϊόντα έχουν περιγραφεί πάνω από 100 διαμεσολαβητές [Call, 1996].

Ως διαμεσολαβητές έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες ενώσεις [Galli and Gentili, 2004; Barreca *et al.*, 2004; Kunamneni *et al.*, 2008c]. Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες ενώσεις για το ρόλο του διαμεσολαβητή είναι το είναι το ABTS [Bourbonnais *et al.*, 1995; Osman *et al.*, 2007; Marjasvaara *et al.*, 2008], η 1-υδροξυβενζοτριάζολη (HBT) [Bourbonnais *et al.*, 1997; Kurniawati and Nicell, 2008], η 3,5-διμέθοξυ-4-υδροξυβενζαλδεϋδαζίνη (SYR) [Kawai *et al.*, 1989] και η ρίζα του Ν-οξειδίου της 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνης (TEMPO) [d'Acunzo *et*

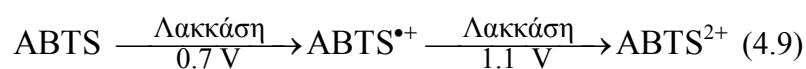
*al.*, 2002; Marjasvaara *et al.*, 2004; Arends *et al.*, 2006; Wells *et al.*, 2006]. Στο Σχήμα 4.9 απεικονίζονται δομές των κυριότερων διαμεσολαβητών.



#### Συρινγκαλδεΰδη (Ε)

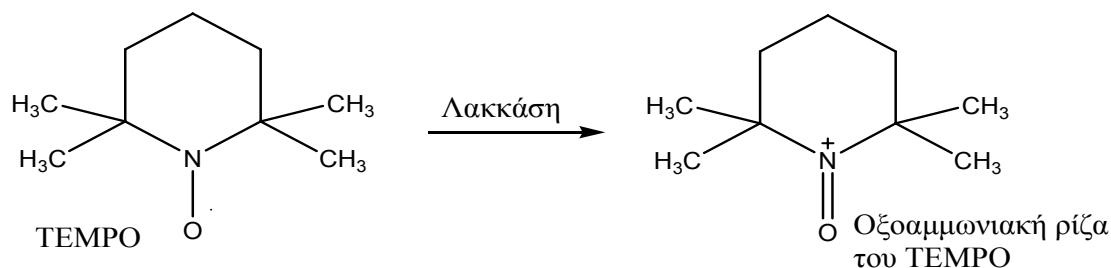
**Σχήμα 4.9.** Ενδεικτικές δομές κυριότερων συνθετικών (Α-Δ) και φυσικών (Ε-Ζ) διαμεσολαβητών.

Το ABTS, το HBT και το TEMPO ακολουθούν διαφορετικές οδούς οξείδωσης [Baiocco *et al.*, 2003; Fabbrini *et al.*, 2002]. Στην περίπτωση του ABTS γίνεται μεταφορά ηλεκτρονίων στο υπόστρωμα σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



Στην περίπτωση του HBT γίνεται μεταφορά ατόμων υδρογόνου σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:  $\text{HBT} > \text{N-OH} \xrightarrow[1.1 \text{ V}]{\text{Λακκάση}} \text{HBT} > \text{N-O}^{\bullet}$  (4.10)

Τέλος η αντίδραση οξείδωσης του TEMPO φαίνεται στο Σχήμα 4.10.



**Σχήμα 4.10.** Αντίδραση οξείδωσης του TEMPO με την χρήση λακκασών.

Παρά τα πλεονεκτήματα που σχετίζονται με τη χρήση του LMS, υπάρχουν και κάποια μειονεκτήματα στην χρήση των διαμεσολαβητών όπως: α) έχουν υψηλό κόστος, β) δημιουργούνται παραπροϊόντα και γ) οι ρίζες του διαμεσολαβητή μπορεί να αδρανοποιήσουν το ένζυμο [Kunamneni *et al.*, 2008c]. Τα τελευταία χρόνια, γίνεται προσπάθεια για την χρήση εναλλακτικών διαμεσολαβητών, που θα έχουν χαμηλό κόστος και θα είναι φιλικό προς το περιβάλλον. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί διαμεσολαβητές που παράγονται από μύκητες [Johannes and Majcherczyk, 2000]. Επίσης διάφορες φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από την αποικοδόμηση της λιγνίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως διαμεσολαβητές. Στο Σχήμα 4.9 παρουσιάζονται τόσο οι συνθετικοί όσο και οι φυσικά απαντώμενοι διαμεσολαβητές. Γενικά οι φυσικά απαντώμενοι διαμεσολαβητές έχουν χρησιμοποιηθεί σε ένα ευρύ φάσμα βιοκαταλυτικών διεργασιών με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον όπως στην αποχρωματοποίηση βαφών, στην αφαίρεση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων, στη λεύκανση χαρτιού και στην αφαίρεση πίσσας [Camarero *et al.*, 2005; Canas *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2007].

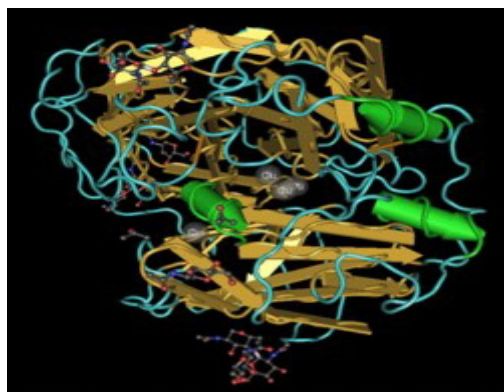
Μια σύγχρονη τάση στην διεθνή βιβλιογραφία είναι ο συνδυασμός δυο ή τριών διαμεσολαβητών για την κατάλυση διάφορων αντιδράσεων χωρίς όμως να έχει διευκρινιστεί ακόμη ο πλήρης μηχανισμός δράσης [Wong and Yu, 1999; Li *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2002; Pozdnyakova *et al.*, 2006c; Jeon *et al.*, 2008]. Η συνδυαστική δράση που υπάρχει μεταξύ των διαμεσολαβητών οδηγεί σε μεγαλύτερες αποδόσεις τελικού προϊόντος σε σχέση με την χρήση ενός διαμεσολαβητή. Παρόλα αυτά υπάρχει περιορισμένη γνώση σχετικά με την χρήση του μίγματος των διαμεσολαβητών σε σχέση με την βελτιωμένη δράση των λακκασών.

#### 4.3.5 Λακκάση από *Trametes versicolor*

Πολλές λακκάσες από διαφορετικές πηγές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ποικίλες βιομηχανικές εφαρμογές [Mayer and Staple, 2002; Kunamneni *et al.*, 2008a,b,c]. Ανάμεσά

τους, η λακκάση από τον μύκητα *Trametes versicolor* (γνωστός και ως *Coriolus versicolor* ή *Polyporous versicolor*), η οποία ανήκει στην κατηγορία των λακκασών με υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Η υψηλή τιμή του οξειδοαναγωγικού της (785 mV) [Call and Mucke, 1997], την συγκαταλέγει ανάμεσα στους πιο υποσχόμενους βιοκαταλύτες, καθώς τα υψηλά οξειδοαναγωγικά δυναμικά σχετίζονται με την υψηλή ενζυμική δραστηριότητα [Li *et al.*, 1999]. Το μέγεθος του πρωτεϊνικού μορίου έχει διαστάσεις 65 Å x 55 Å x 45 Å και μοριακό βάρος 70 kDa [Solomon *et al.*, 1996; Piontek *et al.*, 2002].

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, έχει μελετηθεί με φασματοσκοπικές μελέτες και με κρυσταλλογραφία ακτίνων X [Piontek *et al.*, 2002]. Στο Σχήμα 4.11 φαίνεται η δομή και το ενεργό κέντρο της λακκάσης από *Trametes versicolor* (TvL).



**Σχήμα 4.11.** Δομή και ενεργό κέντρο λακκάσης από *Trametes versicolor* [Piontek *et al.*, 2002].

Μέσω των μελετών αυτών αποδείχθηκε ότι η TvL αποτελείται από τέσσερα ιόντα χαλκού τα οποία και κατηγοριοποιούνται στους τρεις τύπους χαλκού που αναλύθηκαν στην παράγραφο 4.3.2. Ο χαλκός Τύπου 1(T1) στην συγκεκριμένη λακκάση βρίσκεται 6.5 Å από την επιφάνεια του ενζύμου [Piontek *et al.*, 2002].

Γενικά η TvL, καταλύει αρκετές αντιδράσεις μεταξύ των οποίων είναι η οξείδωση της λιγνίνης [Cole *et al.*, 2005;], φυσικών και συνθετικών φαινολικών ενώσεων [Canfora *et al.*, 2008], πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων [Johannes and Majcherczyk, 2000; Kang *et al.*, 2002; Keum and Li, 2004; Kulys *et al.*, 2003]. Τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε η οξείδωση των παραπάνω υποστρωμάτων σε διάφορα μέσα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [Bastos and Magan, 2009]. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η δράση της TvL σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (πχ αντίστροφα μικκύλια) που σχηματίζονται από διάφορα επιφανειοενεργά μόρια σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες (όπως αναφέρθηκε

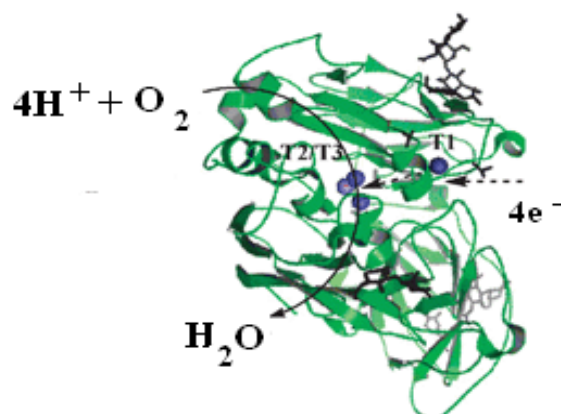
στην παράγραφο 3.3.6) [Michizoe *et al.*, 2005]. Πρόσφατα επιχειρήθηκε η χρήση λακκασών σε μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται από νερό σε ιοντικό υγρό, τα οποία σταθεροποιούνται παρουσία κάποιων επιφανειοενεργών μορίων [Zhou *et al.*, 2008]. Επίσης ελέγχθηκε η δράση της TvL σε μίγματα ιοντικών υγρών με νερό όπου και παρατηρήθηκε διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων του ενζύμου [Shiponvskov *et al.*, 2008].

Η αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου με σκοπό την διεύρυνση των εφαρμογών του, επιχειρήθηκε με την προσθήκη διαφόρων ουσιών όπως πολυμερών π.χ. πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) [Kim and Nicell, 2006], με την διασύνδεση ενζυμικών κρυστάλλων [Roy *et al.*, 2005; Roy and Abraham, 2006] και με την ακινητοποίηση του σε κατάλληλους φορείς. Προς την κατεύθυνση αυτή, μελετήθηκε η ακινητοποίηση της TvL σε διάφορους φορείς όπως σε νανοσωλήνες άνθρακα [Hrapovic *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009], σε αργίλους [Hu *et al.*, 2007; Akar *et al.*, 2009], σε μαγνητικά μεσοπορώδη πυριτικά σφαιρίδια [Zhu *et al.*, 2007], σε αλγινικά σφαιρίδια [Dominguez *et al.*, 2007], σε τροποποιημένη κυτταρίνη [Al-Adhami *et al.*, 2002].

#### **4.3.6 Λακκάση από *Trametes hirsuta***

Το γένος *Trametes* είναι ένα από τα πιο ικανά στελέχη μυκήτων για την παραγωγή λακκάσης [Tong *et al.*, 2007]. Ο βασιδιομύκητας *Trametes hirsuta*, είναι ένας μύκητας λευκής αποσύνθεσης (White-Rot Fungus-WRF), του οποίου ο φυσιολογικός του ρόλος σχετίζεται με την αποικοδόμηση της λιγνίνης [Gronqvist *et al.*, 2006; Kundanga *et al.*, 2008]. Ο όρος «λευκή αποσύνθεση» αποδίδεται στο γεγονός ότι μετά την αποικοδόμηση της λιγνίνης απομένει εκτεθειμένη η λευκή κυτταρίνη στο ξύλο. Υπάρχουν πλήθος αναφορών για την παραγωγή της λακκάσης από τον συγκεκριμένο μύκητα [Couto *et al.*, 2004, Couto and Sanroman, 2005]. Η παραγόμενη λακκάση από *Trametes hirsuta* (ThL) έχει μοριακό βάρος 70 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 4.2, ενώ περιέχει 12% υδατάνθρακες [Shleev *et al.*, 2004]. Αποτελείται από τέσσερα άτομα χαλκού τα οποία και κατηγοριοποιούνται στους τρεις τύπους χαλκού που αναλύθηκαν στην παράγραφο 4.3.2. Σε πρόσφατες μελέτες κυκλικής βολταμετρίας, παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο παρουσιάζει δύο διακριτές περιοχές με διαφορετική τιμή οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Πιο συγκεκριμένα, μετρήθηκε μια υψηλή τιμή οξειδοαναγωγικού (800mV) που αντιστοιχεί στον χαλκό Τύπου 1 (T1) και μια χαμηλή τιμή (400mV) που αντιστοιχεί στο σύμπλεγμα των χαλκών Τύπου 2 (T2) και Τύπου 3 (T3) [Shleev *et al.*, 2006b]. Στο Σχήμα 4.12 παρουσιάζεται η δομή, αλλά και τα τέσσερα άτομα

χαλκού στο ενεργό κέντρο της ThL. Όπως φαίνεται και στο σχήμα το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.3.2.



**Σχήμα 4.12.** Δομή και ενεργό κέντρο λακκάσης από *Trametes hirsuta* [Coman *et al.*, 2008].

Η λακκάση από τον μύκητα *Trametes hirsuta*, καταλύει αρκετές αντιδράσεις μεταξύ των οποίων είναι η οξείδωση φυσικών φλαβονοειδών [Kim S., *et al.*, 2008], οξείδωση της λιγνίνης [Mocciutti *et al.*, 2008], οξείδωση ιόντων μαγγανίου [Gorbacheva *et al.*, 2009] κλπ. Η διεύρυνση των εφαρμογών του ενζύμου, επιχειρήθηκε με την ακινητοποίηση του σε διάφορους φορείς όπως σε κυτταρίνη [Vasil'eva *et al.*, 2009], σε νάυλον [Silva *et al.*, 2007], σε αλγινικά σφαιρίδια [Dominguez *et al.*, 2005]. Γενικά η προσαρμοστικότητα και η ευελιξία των λακκασών που προέρχονται από τον συγκεκριμένο μύκητα, τις καθιστά ικανούς βιοκαταλύτες σε αρκετές διεργασίες όπως στην κλωστοϋφαντουργία, στην επεξεργασία βιομηχανικών λημμάτων, βαφών και σε πλήθος άλλες εφαρμογές [Couto *et al.*, 2006]. Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται καποιες ενδεικτικές εφαρμογές της ThL

**Πίνακας 4.3** Ενδεικτικές εφαρμογές της λακκάσης από *Trametes hirsuta*

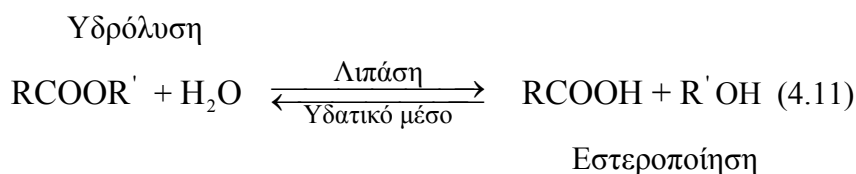
| Εφαρμογή                                                                                           | Βιβλιογραφική Αναφορά              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Αποχρωματοποίηση συνθετικών βαφών                                                                  | Couto <i>et al.</i> , 2006         |
| Απομάκρυνση χρωμάτων από βιομηχανικά απόβλητα                                                      | Couto <i>et al.</i> , 2009         |
| Επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων με σκοπό την απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων                     | Chiacchierini <i>et al.</i> , 2004 |
| Διάσπαση της ένωσης που προσδίδει το λουλακί χρώμα με σκοπό την βελτίωση του χρώματος στα υφάσματα | Campos <i>et al.</i> , 2001        |
| Στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση λιγνίνης                                             | Shleev <i>et al.</i> , 2006a       |

#### 4.3.7 Λακκάση από *Botrytis cinerea*

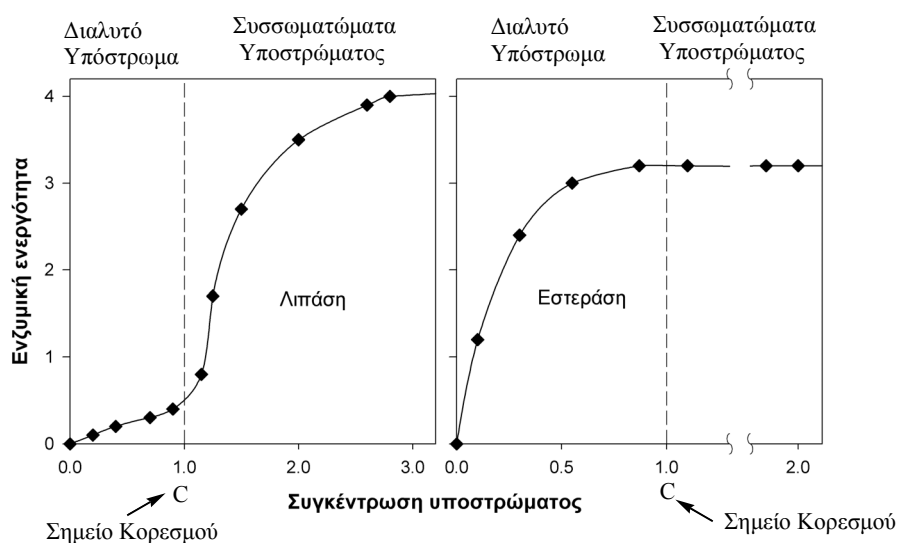
Ο *Botrytis cinerea*, είναι ένας φυτοπαθογεννητικός μύκητας που προσβάλλει τα άνθη, τα φρούτα, τα φύλλα και τους βλαστούς πάνω από 200 είδη φυτών [Cotoras and Silva, 2005]. Η παραγωγή λακκασών από διάφορα στελέχη του μύκητα *Botrytis cinerea* έχει μελετηθεί εκτενώς [Slomczynski *et al.*, 1995; Fortina *et al.*, 1996]. Η παραγόμενη λακκάση από τον μύκητα *Botrytis cinerea* (BcL) είναι μια μονομερής γλυκοπρωτεΐνη με μοριακό βάρος 74 kDa και ισοηλεκτρικό σημείο pI 4.0, ενώ περιέχει 49% υδατάνθρακες [Thurston, 1994; Slomczynski *et al.*, 1995]. Το συγκεκριμένο ένζυμο παρουσιάζει σχετικά υψηλή τιμή οξειδοαναγωγικού δυναμικού ( $780 \pm 20$  mV), που του επιτρέπει την οξείδωση μεγάλου εύρους υποστρωμάτων [Li *et al.*, 1999]. Έτσι η BcL καταλύει διάφορες αντιδράσεις μεταξύ των οποίων είναι η αποικοδόμηση της λιγνίνης [Kim, M-K., 2002] η βιομεταρτοπή του  $\alpha$ -πινενίου [Farooq *et al.*, 2002], της λιναλοόλης [Bock *et al.*, 1986], του οξειδίου του καρνοφυλενίου [Duran *et al.*, 1999], διαφόρων κλοβανών (clovanes) [Collado *et al.*, 1998], της τεστοστερόνης και διαφόρων στεροειδών [Huszcza and Dmochowska-Gadysz, 2003].

#### 4.4 Λιπάσες

Οι υδρολάσες διαιρούνται σε δυο κατηγορίες, στις εστεράσες (EC. 3.1.1.1, υδρολάσες καρβοξυλεστέρων) και στις λιπάσες (EC. 3.1.1.3, υδρολάσες των εστέρων των τριγλυκεριδίων). Οι λιπάσες απαντώνται σε ένα μεγάλο εύρος ζωντανών οργανισμών στο περιβάλλον [Jaeger *et al.*, 1994], όπου ο φυσιολογικός ρόλος τους σχετίζεται με την διαδικασία της πέψης (διάσπαση εστερικών δεσμών των τριγλυκεριδίων προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης) [Krishna and Karanth, 2002; Reis *et al.*, 2009]. Ανάλογα με την προέλευσή τους ποικίλουν όσον αφορά το μοριακού βάρος από 20 έως 60 kDa. Καταλύουν την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη ενώ όταν βρεθούν σε περιβάλλον με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό είναι δυνατό να καταλύσουν αντιδράσεις εστεροποίησης [Brockman *et al.*, 1988; Wong and Schotz, 2002] σύμφωνα με τη γενική αντίδραση:



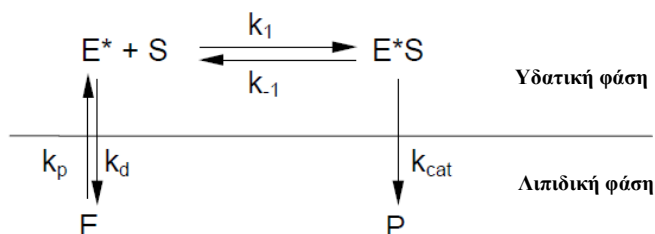
Οι λιπάσες θεωρούνταν ως μια ειδική κατηγορία των εστερασών, η οποία εμφανιζόταν ιδιαίτερα αποτελεσματική στην υδρόλυση υδρόφοβων μορίων που δεν διαλυτοποιούνται στο νερό και σχηματίζουν συσσωματώματα σε υδατικά συστήματα [Sandra and Desnuelle, 1958]. Διαχωρίζονται όμως από τις εστεράσες λόγω της ενεργοποίησής τους από τη μεσεπιφάνεια (interface), που σχηματίζεται μεταξύ μιας πολικής υδατικής φάσης και μια μη πολικής [Reis *et al.*, 2009]. Το 1958 οι Sarda και Desnuelle, διαχωρίσαν τις λιπάσες από τις εστεράσες βασιζόμενοι στο φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης [Sandra and Desnuelle, 1958]. Παρατήρησαν ότι η ενεργότητα των λιπασών είναι μειωμένη σε διαλύματα μικρής συγκέντρωσης υποστρώματος, αλλά αυξάνεται ιδιαίτερα όταν σχηματιστούν συσσωματώματα του υποστρώματος σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 4.13, η δράση τη εστεράσης ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten, ενώ η δράση της λιπάσης δεν επηρεάζεται από την συγκέντρωση του υποστρώματος.



**Σχήμα 4.13.** Ενζυμική ενεργότητα μιας παγκρεατικής λιπάσης και μιας ηπατικής εστεράσης συναρτημένης της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν το σημείο κορεσμού, δηλαδή την συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την οποία το διάλυμα είναι κορεσμένο σε αυτό [Hasan *et al.*, 2006].

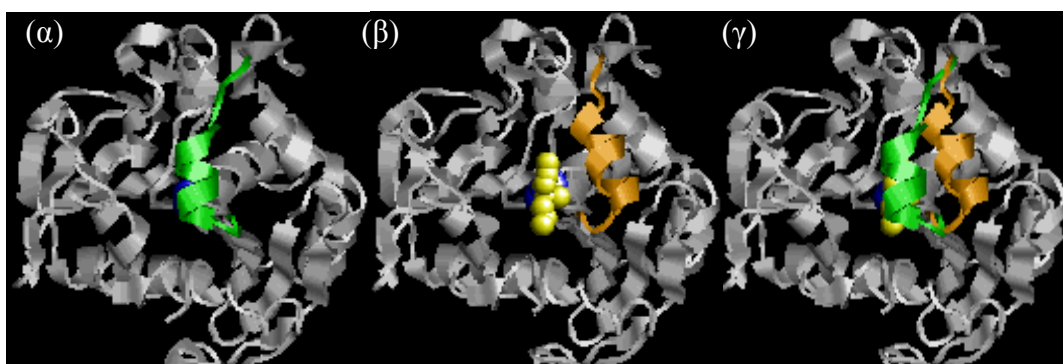
Ετσι με βάση το Σχήμα 4.13, διαπιστώνεται ότι η δραστηριότητα της λιπάσης αυξάνεται δραστικά (ενδιάμεση ενεργοποίηση) όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος φθάσει στο σημείο κορεσμού. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο η δράση της λιπάσης δεν

μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση Michaelis-Menten. Ένα πρότυπο της κινητικής μιας καταλυόμενης από λιπάση αντίδρασης παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.14 [Jaeger, 1994].



**Σχήμα 4.14.** Σχηματική αναπαράσταση αντίδρασης καταλυόμενης από λιπάση. E-Ένζυμο σε ανενεργή μορφή (κάλυμμα κλειστό), E\*-ένζυμο σε ενεργή μορφή (κάλυμμα ανοιχτό), S-υπόστρωμα, P-προϊόν, E\*S-σύμπλοκο ενεργού ενζύμου-υποστρώματος.

Η διεπιφανειακή ενεργοποίηση οφείλεται στο γεγονός ότι το ενεργό κέντρο των λιπασών, στη φυσική κατάσταση του ενζύμου, περιβάλλεται από ένα πολυπεπτιδικό κάλυμμα ή καπάκι δομής  $\alpha$ -έλικας (lid), με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο να μη μπορεί να προσεγγίσει το υπόστρωμα σε υδατικά μέσα κι έτσι το ένζυμο να είναι ανενεργό και απομονωμένο από τα μόρια του υποστρώματος [Desnuelle *et al.*, 1960]. Σε διεπιφάνειες τύπου «νερού/ελαίου» το καπάκι αλλάζει διαμόρφωση με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο του ενζύμου να είναι πιο προσπελάσιμο για το υπόστρωμα και να δημιουργείται μια υδρόφοβη περιοχή, η οποία διευκολύνει το δέσιμο του ενζύμου με το υδρόφοβο υπόστρωμα [Brady *et al.*, 1990; Winkler *et al.*, 1990; Jaeger *et al.*, 1994]. Στο Σχήμα 4.15 φαίνεται η μετατροπή της "κλειστής" διαμόρφωσης του ενζύμου σε "ανοικτή" καθώς και η σύγκριση των δύο καταστάσεων.

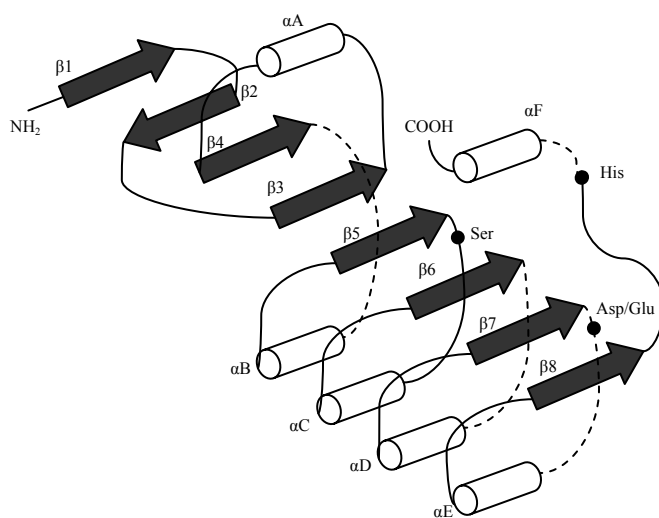


**Σχήμα 4.15.** Σχηματική απεικόνιση των βημάτων μετακίνησης του καλύμματος (lid) κατά την: (α) "κλειστή", (β) "ανοικτή" διαμόρφωση του ενζύμου, (γ) σύγκριση των δυο καταστάσεων [Derewenda *et al.*, 1992].

Διεπιφανειακή ενεργοποίηση δεν επιδεικνύουν όλες οι λιπάσες, λόγω της απουσίας «καπακιού», όπως για παράδειγμα η λιπάση από *Pseudomonas glumae* [Noble *et al.*, 1993], η λιπάση από *Bacillus subtilis* [Lesuisse *et al.*, 1993], η κουτινάση [Martinez *et al.*, 1992] και η λιπάση B από *Candida antarctica* [Uppenberg *et al.*, 1994; Martinelle *et al.*, 1995].

#### 4.4.1 Δομή λιπασών

Μελέτες ακτινών-X έδειξαν πως όλες οι λιπάσες, των οποίων οι τρισδιάστατες δομές είναι γνωστές, είναι μέλη μιας οικογένειας  $\alpha/\beta$  υδρολασών [Schrag and Cygler, 1997]. Η δομή των  $\alpha/\beta$  υδρολασών συνίσταται από ένα κεντρικό υδροφοβικό  $\beta$ -πτυχωτό φύλλο, έως 8 πτυχών ( $\beta 1$ - $\beta 8$ ) συνήθως, το οποίο βρίσκεται πακεταρισμένο μεταξύ δύο στρωμάτων αμφιφιλικών  $\alpha$ -ελίκων [Pleiss *et al.*, 1998]. Το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από τρία καταλυτικά αμινοξέα: μια σερίνη (Ser), μια ιστιδίνη (His) και ένα ασπαρτικό (Asp) ή γλουταμινικό (Glu) οξύ [Petersen *et al.*, 2001]. Η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται στο εσωτερικό μιας ιδιαίτερα συντηρημένης περιοχής Gly-X1-Ser-X2-Gly όπου Gly η γλυκίνη, Ser η σερίνη, X1 η ιστιδίνη και X2 το γλουταμινικό ή ασπαρτικό οξύ, σχηματίζοντας μία χαρακτηριστική  $\beta$ -στροφή, «πυρηνόφιλος αγκώνας» [Jaeger *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 2003; Akoh *et al.*, 2004]. Στο Σχήμα 4.16 απεικονίζεται η δομή των  $\alpha/\beta$  υδρολασών

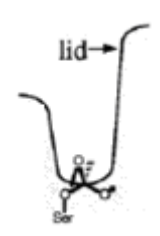
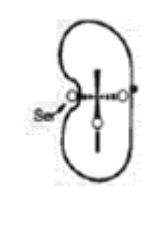
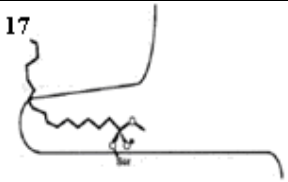
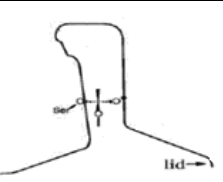
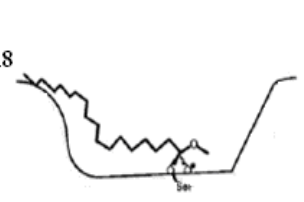
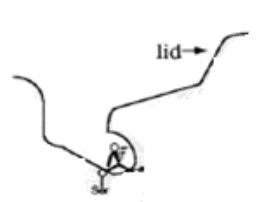
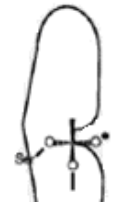


**Σχήμα 4.16.** Τύπος αναδίπλωσης  $\alpha/\beta$ -υδρολάσης. Οι  $\alpha$ -έλικες απεικονίζονται με κύλινδρους και τα  $\beta$ -φύλλα με τόξα. Οι θέσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου απεικονίζονται με κύκλους: το πυρηνόφιλο, δηλαδή η σερίνη, βρίσκεται μετά τον κλώνο  $\beta 5$ , το ασπαρτικό/γλουταμινικό μετά τον κλώνο  $\beta 7$  και η ιστιδίνη βρίσκεται μεταξύ του κλώνου  $\beta 8$  και της έλικας  $\alpha F$ .

Τα δομικά χαρακτηριστικά των ενεργών κέντρων των λιπασών είναι η παραπάνω καταλυτική τριάδα και η οξυανιονική οπή, η οποία σχηματίζεται από δύο αμίδια της βασικής αλυσίδας, από ένα κατάλοιπο του N-τελικού άκρου, και ένα κατάλοιπο της γειτονικής περιοχής της σερίνης προς το C-τελικό άκρο. Ανάλογα με τη γεωμετρία του ενεργού τους κέντρου, οι θέσεις πρόσδεσης των υποστρωμάτων τους μπορούν να διακριθούν σε τρεις υποκατηγορίες.

- Θέση δέσμευσης σαν ρωγμή (παρατηρείται στην λιπάση του *R.miehei*)
- Θέση δέσμευσης σαν χοάνη (παρατηρείται στην λιπάση B της *C. antarctica*)
- Θέση δέσμευσης σαν σήραγγα (παρατηρείται στην λιπάση της *C.rugosa*)

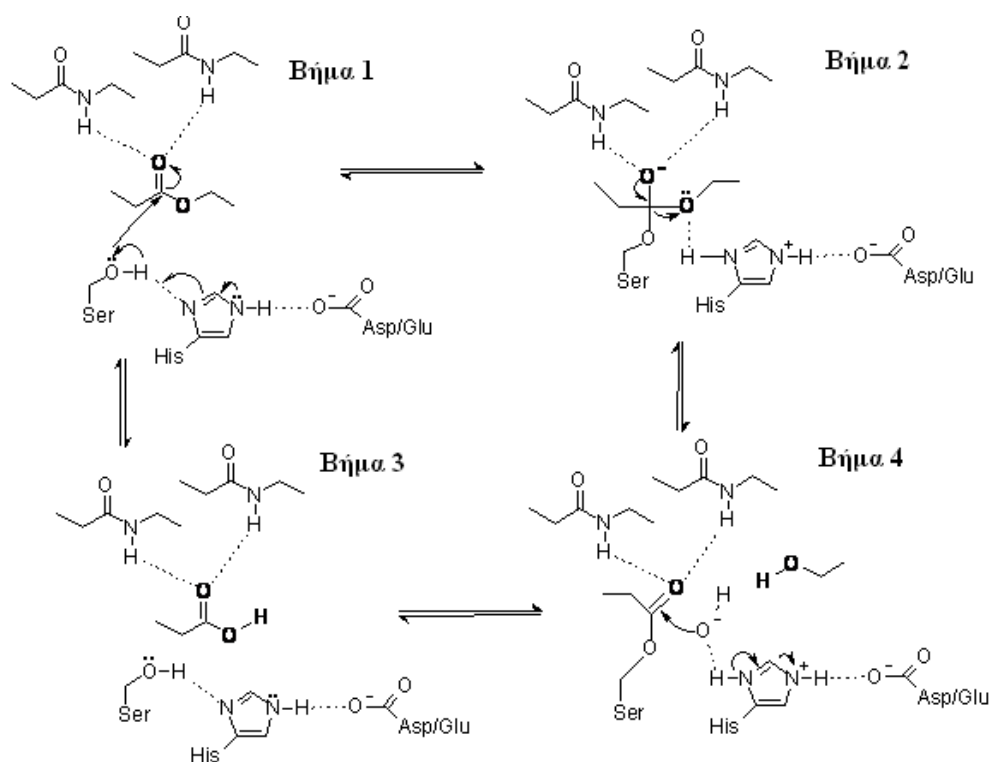
Οι δύο πρώτες κατηγορίες μπορούν να δεχτούν ογκώδη υποστρώματα ενώ η τρίτη κατηγορία λιπασών μπορεί να δεχτεί στο ενεργό της κέντρο, λιπαρά οξέα με μεγάλου μήκους αλυσίδες [Pleiss *et al.*, 1998; Krishna and Karanth, 2002]. Στο Σχήμα 4.17 παρουσιάζεται το ενεργό κέντρο των τριων προαναφερθεντων λιπασών.

| Όψη                                    | <br>Πλάγια όψη | <br>Εμπρόσθια όψη | <br>Κάτοψη |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Λιπάση B<br>από<br><i>C.antarctica</i> | <br>13        | <br>lid          | <br>lid   |
| Λιπάση από<br><i>C. rugosa</i>         | <br>17        | <br>lid          | <br>lid   |
| Λιπάση από<br><i>R. miehei</i>         | <br>18        | <br>lid          | <br>lid   |

**Σχήμα 4.17.** Σχηματική αναπαράσταση του ενεργού κέντρου των μικροβιακών λιπασών από *C. antarctica*, *R. miehei*, *C. rugosa*. Το νούμερο δηλώνει το μήκος του μεγαλύτερου λιπαρού οξέος που χωράει ακριβώς μέσα στο άνοιγμα.

#### 4.4.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών

Όλες οι  $\alpha/\beta$  υδρολάσες έχουν έναν βασικό, κοινό καταλυτικό μηχανισμό ο οποίος παρουσιάζεται στο Σχήμα 4.18 και περιλαμβάνει τα παρακάτω βασικά βήματα [Cygler *et al.*, 1993].



**Σχήμα 4.18.** Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών.

Αρχικά, η δέσμευση του υποστρώματος (εστέρας) στη λιπάση στηρίζεται σε μια πυρηνόφιλη προσβολή από το οξυγόνο του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης προς τον ενεργοποιημένο καρβονυλικό άνθρακα του εστέρα. Έτσι, δημιουργείται ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο στο οποίο τέσσερα άτομα είναι συνδεδεμένα στον καρβονυλικό άνθρακα σε τετραεδρική διάταξη [Norin *et al.*, 1994]. Η μεταβατική αυτή κατάσταση σταθεροποιείται από δεσμούς υδρογόνου, η απουσία των οποίων, λόγω στερεοδιάταξης του υποστρώματος, είναι δυνατό να προκαλέσει αστάθεια του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος [Pleiss *et al.*, 2000]. Στην περίπτωση αυτή η κατάλυση είτε πραγματοποιείται πολύ αργά είτε δεν πραγματοποιείται καθόλου. Μετά η πυρηνόφιλη προσβολή ενισχύεται από την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου, στην οποία μεταφέρεται ένα πρωτόνιο, από την υδροξυλομάδα της σερίνης. Η μετακίνηση αυτή οδηγεί σε σχάση του εστερικού δεσμού. Στο

στάδιο αυτό το αλκοολικό κατάλοιπο του εστέρα αποχωρεί και το οξικό του τμήμα ενώνεται ομοιοπολικά με τη σερίνη (ομοιοπολικό ενδιάμεσο). Στη συνέχεια η ιστιδίνη ενεργοποιεί ένα μόριο νερού (με απόσπαση ενός πρωτονίου) το οποίο υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο (απακυλίωση). Το ιόν υδροξυλίου (OH<sup>-</sup>) που προκύπτει προσβάλλει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο και σχηματίζεται πάλι ένα αρνητικά φορτισμένο μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο. Τέλος, η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της σερίνης και έτσι απελευθερώνεται η ακυλομάδα του εστέρα. Έτσι, το ένζυμο είναι και πάλι έτοιμο να δεχτεί ένα άλλο υπόστρωμά και να το υδρολύσει [Jaeger *et al.*, 1999] .

#### 4.4.3 Αντιδράσεις λιπασών

Γενικά η πορεία των αντιδράσεων που καταλύονται από μια λιπάση εξαρτάται από το μέσο στο οποίο πραγματοποιείται (υδατικό ή οργανικό) και οι αντιδράσεις αυτές μπορεί να είναι υδρόλυση αλλά και σύνθεση εστέρων μέσω εστεροποίησης και μετεστεροποίησης [Paiva *et al.*, 2000; Krishna and Karanth, 2002]. Οι αντιδράσεις μπορούν να ομαδοποιηθούν στις ακόλουθες κατηγορίες:

1. Υδρόλυση εστέρων (Υδατικό Περιβάλλον)



2. Σύνθεση εστέρων (Εστεροποίηση)



3. Μετεστεροποίηση (Μεταφορά ή Ανταλλαγή Ακυλίων)

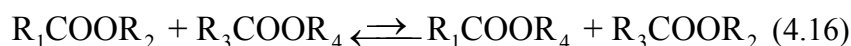
α. Οξέόλυση



β. Αλκοόλυση



γ. Διεστεροποίηση



δ. Αμινόλυση



Οπώς έχει αναφερθεί, οι λιπάσες από την φύση τους καταλύουν την διάσπαση εστερικών δεσμών μέσω αντιδράσεων υδρόλυσης [Bornscheuer *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004]. Η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό στο διάλυμα της αντίδρασης παίζει σημαντικό ρόλο για την ισορροπία της αντίδρασης καθώς σε μίγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό ευνοούνται οι αντιδράσεις σύνθεσης [Zaks and Klibanov, 1988b; Verma *et al.*, 2008]. Για το λόγο αυτό έχει μελετηθεί η πραγματοποίηση αντιδράσεων σύνθεσης σε μικροϋδατικά συστήματα, όπου υπάρχει χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [Gogoi *et al.*, 2008]. Προς την κατεύθυνση αυτή εξετάστηκαν διάφορα μέσα όπως οργανικοί διαλύτες, ιοντικά υγρά, υπερκρίσιμα ρευστά, μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται απουσία επιφανειοενεργών μορίων κλπ [Bjorkling *et al.*, 1990; De Diego *et al.*, 2005; Zoumpanioti *et al.*, 2006a; Katsoura *et al.*, 2007]. Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται ενδεικτικές εφαρμογές αντιδράσεων σύνθεσης σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό.

**Πίνακας 4.4.** Ενδεικτικά μέσα κατάλυσης αντιδράσεων σύνθεσης από τις λιπάσες

| Πηγή Λιπάσης                                            | Μέσο                                                   | Εφαρμογή                         | Βιβλιογραφική Αναφορά               |
|---------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Burkholderia cepacia</i>                             | Αντίστροφα<br>μικκύλια                                 | Σύνθεση εστέρων                  | Salumi <i>et al.</i> , 2008         |
| <i>Rhizomucor miehei</i> ή<br><i>Candida antarctica</i> | Τριαδικά συστήματα                                     | Εστεροποίηση<br>φαινολικών οξέων | Zoumpanioti <i>et al.</i> , 2006a   |
| <i>Candida antarctica</i>                               | Μίγματα τερπενίων                                      | Εστεροποίηση<br>περιλυλ-αλκοόλης | Skouridou <i>et al.</i> , 2003a     |
| <i>Candida antarctica</i>                               | Ιοντικό υγρό                                           | Σύνθεση αρωματικών<br>εστέρων    | De los Rios <i>et al.</i> , 2008    |
| <i>Candida antarctica</i>                               | Ιοντικό υγρό                                           | Παράγωγα<br>φλαβονοειδών         | Katsoura <i>et al.</i> , 2006       |
| <i>Candida antarctica</i>                               | Μίγμα υπερκρίσιμου<br>CO <sub>2</sub> / Ιοντικού υγρού | Εστεροποίηση<br>κιτρωνερόλης     | Habulin <i>et al.</i> , 2007b       |
| <i>Thermomyces</i><br><i>lanuginosus</i>                | Υπερκρίσιμο CO <sub>2</sub>                            | Εστεροποίηση<br>λιπαρών οξέων    | Shekarchizadeh <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Candida antarctica</i>                               | Οργανικοί διαλύτες                                     | Σύνθεση βιοντίζελ                | Zheng <i>et al.</i> , 2009          |

Με σκοπό να βελτιωθεί η δραστηριότητα αλλά και η σταθερότητα των λιπασών σε μέσα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, μελετήθηκε διεξοδικά η ακινητοποίηση τους σε

διάφορους οργανικούς / ανόργανους φορείς [Petkar *et al.*, 2006; Mahmood *et al.*, 2008; Lee, D-G., *et al.*, 2009]. Με την τεχνική αυτή ελέγχεται το μικροπεριβάλλον του βιοκαταλύτη και κατεπέκταση η καταλυτική του δράση. Στον Πίνακα 4.5 παρουσιάζονται οι κυριότεροι φορείς ακινητοποίησης των λιπασών τα τελευταία χρόνια.

**Πίνακας 4.5.** Ενδεικτικοί φορείς ακινητοποίησης λιπασών

| Πηγή Λιπάσης                                             | Φορέας                           | Αντίδραση       | Βιβλιογραφική Αναφορά             |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| <i>Candida rugosa</i>                                    | Μαγνητικά<br>νανοσωματίδια       | Εστεροποίηση    | Jiang <i>et al.</i> , 2009        |
| <i>Pseudomonas sp.</i>                                   | Αλγινικά σφαιρίδια               | Γλυκερόλυση     | Cheirsilp <i>et al.</i> , 2009    |
| <i>Candida antarctica</i>                                | Ρητίνες                          | Εστεροποίηση    | Vaidya <i>et al.</i> , 2008       |
| <i>Trichosporon capitatum</i>                            | Οργανογέλες<br>ζελατίνης         | Υδρόλυση        | Song <i>et al.</i> , 2008         |
| <i>Candida rugosa</i>                                    | Νανοσωλήνες<br>άνθρακα           | Μετεστεροποίηση | Shah <i>et al.</i> , 2007         |
| <i>Burkholderia cepacia</i><br><i>Candida antarctica</i> | Αργίλοι                          | Μετεστεροποίηση | Secundo <i>et al.</i> , 2008      |
| <i>Candida rugosa</i>                                    | Πολυουρεθάνη                     | Εστεροποίηση    | Pires-Cabral <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Penicillium expansum</i>                              | Κεραμικά υλικά                   | Υδρόλυση        | Huang and Cheng, 2008             |
| <i>Candida rugosa</i>                                    | Μεμβράνες<br>πολυακρυλονιτριλίου | Υδρόλυση        | Li and Wu, 2009                   |
| <i>Bacillus coagulans</i><br><i>BTS-3</i>                | Νάυλον                           | Υδρόλυση        | Pahujani <i>et al.</i> , 2008     |
| <i>Candida rugosa</i><br><i>Pseudomonas cepacia</i>      | Διοξειδιο του<br>ζirkονίου       | Εστεροποίηση    | Chen Y.Z., <i>et al.</i> , 2008   |
| <i>Rhizomucor miehei</i> ή<br><i>Candida antarctica</i>  | Οργανοπηκτώματα<br>κυτταρίνης    | Εστεροποίηση    | Zoumpanioti <i>et al.</i> , 2006a |

#### 4.4.4 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές λιπασών

Οι λιπάσες αποτελούν μια σημαντική ομάδα ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Η εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα συνεχώς αυξάνεται λόγω των πλεονεκτημάτων που πηγάζουν από την χρήση τους [Hasan *et al.*, 2006]. Στον Πίνακα 4.6 παρουσιάζονται τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των λιπασών.

**Πίνακας 4.6.** Πλεονεκτήματα της χρήσης των λιπασών [Paiva *et al.*, 2000; Jaeger and Eggert, 2002; Bornscheuer *et al* 2002; Hasan *et al* 2006]

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Υψηλή τόπο-, στέρεο- και ενάντιο-εκλεκτικότητα → ελαχιστοποίηση των παραπροϊόντων.</li> <li>• Υψηλή δραστηριότητα → ελαχιστοποίηση της ποσοτητας του ενζύμου</li> <li>• Ευρύ φάσμα εξειδίκευσης → τροποποίηση φυσικών αλλά και συνθετικών υποστρωμάτων</li> <li>• Δράση σε ήπιες θερμοκρασίες → χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις</li> <li>• Ενεργές σε μεγάλο φάσμα τιμών pH και θερμοκρασίας → διεύρυνση εφαρμογών τους</li> <li>• Δράση σε μη συμβατικά συστήματα → κατάλυση αντιδράσεων σύνθεσης</li> <li>• Υψηλή σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες → εφαρμογή σε βιομηχανικές διεργασίες</li> <li>• Δεν απαιτούν την παρουσία συμπαραγόντων → χαμηλό κόστος εφαρμογής</li> <li>• Σταθερότητα παρουσία σε επιφανειοενεργά μόρια → διεύρυνση εφαρμογών</li> <li>• Παράγονται εύκολα και οικονομικά σε μεγάλες ποσότητες → χαμηλό κόστος αγοράς</li> <li>• Κρυσταλλική δομή πολλών λιπασών είναι γνώστη → ορθολογικός σχεδιασμός των ιδιοτήτων</li> <li>• Εμπορικά διαθέσιμα → ευκολία εφαρμογής</li> </ul> |

Λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς όπως στην κλωστοϋφαντουργία, στην βιομηχανία τροφίμων, απορρυπαντικών, καλλυντικών, φαρμάκων, στην επεξεργασία δέρματος και χαρτιού καθώς και στην παραγωγή βιοντίζελ [Hasan *et al.*, 2006; Shah and Gupta, 2007]. Στον Πίνακα 4.7 παρουσιάζονται οι κυριότερες εφαρμογές των λιπασών.

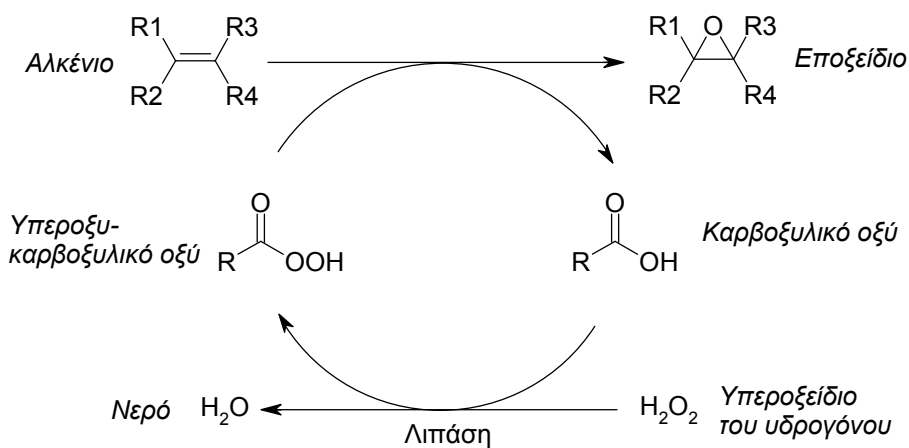
**Πίνακας 4.7.** Βιομηχανικές εφαρμογές λιπασών [Hasan *et al.*, 2006]

| Βιομηχανία                | Προϊόν ή εφαρμογή                       |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| Γαλακτοκομικά προϊόντα    | Ανάπτυξη παραγόντων βελτίωσης γεύσης    |
| Προϊόντα αρτοποιίας       | Αύξηση του όγκου το ψωμί                |
| Κλωστοϋφαντουργία         | Απομάκρυνη λιπαντικών ουσιών            |
| Βιομηχανία απορρυπαντικών | Απομάκρυνη λιπαρών λεκέδων              |
| Βιομηχανία χημικών        | Παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών   |
| Βιομηχανία φαρμάκων       | Βοηθητικά πέψης                         |
| Βιομηχανία καλλυντικών    | Γαλακτοματοποιητές, προϊόντα ενυδάτωσης |
| Βιομηχανία καυσίμων       | Παραγωγή βιοντίζελ                      |
| Βιομηχανία χαρτιού        | Στον έλεγχο του χρώματος                |
| Επεξεργασία αποβλήτων     | Απομάκρυνση υδρογονανθράκων             |
| Σύνθεση βιοαισθητήτων     | Ανίχνευση λιπιδίων                      |

#### 4.4.5 Εφαρμογή λιπασών στην χημειο-ενζυμική σύνθεση εποξειδίων

Η εισαγωγή ενζυμικών συστημάτων για την σύνθεση των εποξειδίων, οφείλεται στο γεγονός ότι τα ένζυμα καταλύουν με μεγάλη εξειδίκευση συγκεκριμένες αντιδράσεις, ελαχιστοποιώντας την εμφάνιση παραπροϊόντων και παράπλευρων ανεπιθύμητων αντιδράσεων. Προς τον σκοπό αυτό, ο Bjorkling και οι συνεργάτες του στις αρχές της δεκαετίας του 90, επιχείρησαν την χημειοενζυμική σύνθεση του εποξειδίου, μέσω της ενδιάμεσης ενζυμικής σύνθεσης υπεροξυ-καρβοξυλικού οξέος [Bjorkling *et al.*, 1990,1992].

Η συνολική σύνθεση χωρίζεται σε δυο αντιδράσεις. Η πρώτη αντίδραση είναι αποτέλεσμα ενζυμικής δράσης ενώ η δεύτερη είναι μια χημική αντίδραση που ακολουθεί την λογική της αντίδρασης Prilezhaev [Prilezhaev, 1909]. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της δράσης της ακινητοποιημένης λιπάσης και χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα το καρβοξυλικό οξύ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ και νερό. Ύστερα μέσω της αντίδρασης Prilezhaev το υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ αντιδρά με το αλκένιο, με αποτέλεσμα στην θέση του διπλού δεσμού του αλκενίου να εισάγεται ένα ηλεκτρονιόφιλο άτομο οξυγόνου και κατ'επέκταση να δημιουργείται το επιθυμητό εποξείδιο. Στο Σχήμα 4.19 απεικονίζεται ο μηχανισμός σύνθεσης εποξειδίων με την συγκεκριμένη μέθοδο.



**Σχήμα 4.19.** Χημειοενζυμική οξειδωση αλκενίου βάση των αναφορών Bjorkling *et al.*, 1990,1992, όπου R<sub>1</sub> = αλκύλιο, R<sub>2</sub>= αλκύλιο, R<sub>3</sub> = αλκύλιο, R<sub>4</sub>= H, αλκύλιο

Όπως γίνεται αντιληπτό, το μέσο της αντίδρασης έγκειται στο σύστημα υγρού-υγρού-στερεού. Πιο συγκεκριμένα αυτός ο τύπος μακροτερογενούς συστήματος χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολλαπλών φάσεων και συγκεκριμένα περιέχουν μια υδατική υγρή φάση, μια οργανική υγρή φάση και μια στερεή φάση. Η υδατική φάση παράγεται κατά τη διάρκεια της

ενζυμικής αντίδρασης και μπορεί να περιέχει είτε ένα διάλυμα πολικών αντιδρώντων είτε το πολικό υπόστρωμα μόνο. Η οργανική φάση μπορεί να περιέχει είτε ένα διάλυμα μη-πολικών υποστρωμάτων είτε μόνο το υπόστρωμα. Η στερεή φάση αποτελείται από το ακινητοποιημένο ένζυμο σε στερεό φορέα ή μικροπορώδη μεμβράνη. Κατ' επέκταση τα αντιδραστήρια της χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης μπορούν να ταξινομηθούν στις ακόλουθες τρεις φάσεις: α) στην υδατική, όπου διαλύονται υδρόφιλα αντιδραστήρια όπως π.χ. το υπεροξειδίο του υδρογόνου αλλά και τα προϊόντα της αντίδρασης όπως π.χ το νερό, β) στην οργανική φάση όπου διαλύονται τα υδρόφοβα αντιδραστήρια όπως π.χ το καρβοξυλικό οξύ, το αλκένιο και ο διαλύτης της αντίδρασης αλλά και τα προϊόντα της αντίδρασης όπως π.χ. το υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ και το εποξειδίο και τέλος γ) στην στερεά φάση που αφορά τον ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη. Τα συστήματα αυτά παρουσιάζουν δυο βασικά πλεονεκτήματα. Πρώτον, η ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη μπορεί να αναστείλει μια πιθανή αδρανοποίηση του ενζύμου και κατά δεύτερον η επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη είναι πιο εύκολη [Klibanov, 1986].

Η εναλλακτική αυτή μέθοδος για την σύνθεση εποξειδίων αποτέλεσε την αρχή έτσι ώστε από τις αρχές της δεκαετίας του 90 έως σήμερα να έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες πάνω στο αντικείμενο αυτό. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί και η εποξείδωση αλκενίων μέσω της οξειδωσης Baeyer-Villiger [Kramer *et al.*, 1994; Rusch gen Klaas and Warwel, 1999a,b Hilker *et al.*, 2001; Carboni-Oerlemans *et al.*, 2006;]. Επίσης πρόσφατα δημοσιεύτηκε η εφαρμογή της λιπάσης CaLB στην απευθείας εποξείδωση  $\alpha,\beta$ -ακόρεστων αλδευδών με την βοήθεια του υπεροξειδίου του υδρογόνου [Svedendahl *et al.*, 2008]. Αρχικά η χημειο-ενζυμική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά για την εποξείδωση των αλκενίων. Αργότερα, άλλες ερευνητικές ομάδες την χρησιμοποίησαν και για την εποξείδωση πλήθος διαφορετικών ενώσεων [Rusch gen. Klaas and Warwel, 1995; Rusch gen Klaas and Warwel, 1996; Hilker *et al.*, 2001; Orellana-Coca *et al.*, 2005a,b; Moreira *et al.*, 2005; Ankudey *et al.*, 2006; Tornval *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008].

Κατά τη μελέτη της χημειοενζυμικής εποξειδωσης των αλκενίων μελετήθηκαν αρκετοί παράγοντες όπως η επίδραση των οργανικών διαλυτών στην σύνθεση των εποξειδίων [Bjorkling *et al.*, 1990; Moreira *et al.*, 2005; Ankudey *et al.*, 2006; Yadav and Borkar, 2006; Moreira and Nascimento, 2007], η χρησιμοποίηση διαφορετικών πηγών λιπασών όπως π.χ *Mucor miehei*, *Humicola sp.*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas sp*, *Candida antarctica* (A+B) [Bjorkling *et al.*, 1990], το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του δότη αλκυλίου [Bjorkling *et al.*, 1990; Moreira and Nascimento, 2007; Rusch gen Klaas and Warwel, 1997],

η επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης [Skouridou *et al.*, 2003b,c; Vleck and Petrovic, 2006; Yadav and Borkar, 2006] καθώς και η επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης μετά την πρώτη σύνθεση του εποξειδίου [Skouridou *et al.*, 2003b; Yadav and Borkar, 2006; Ankudey *et al.*, 2006]. Επίσης μελετήθηκε τόσο η φύση και η συγκέντρωση του οξειδωτικού φορέα που χρησιμοποιήθηκε [Bjorkling *et al.*, 1990, 1992; Skouridou *et al.*, 2003b, Orellana-Coca *et al.*, 2005; Taliansky, 2005; Yadav and Borkar, 2006; Ankudey *et al.*, 2006; Tse *et al.*, 2006; Tufvesson *et al.*, 2008], όσο και ο ρυθμός προσθήκης του [Bjorkling *et al.*, 1992; Skouridou *et al.*, 2003b; Corellana-Coca *et al.*, 2005].

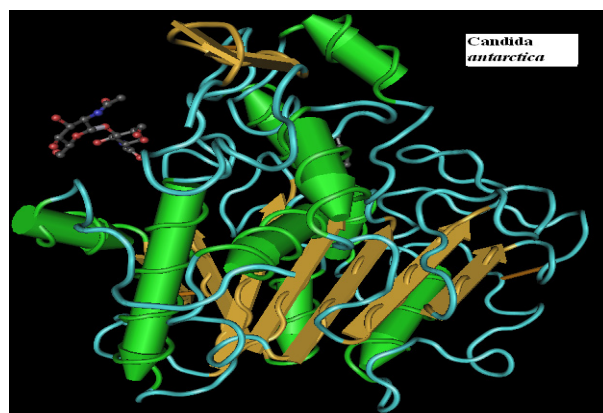
#### 4.4.6 Λιπάση B από *Candida antarctica*

Από τον βασιδιομύκητα *Candida antarctica* παράγονται δύο είδη λιπασών, που ονομάζονται A και B [Michiyo, 1988; Hoegh *et al.*, 1995]. Οι δύο αυτές λιπάσες διαφέρουν τόσο ως προς τη δομή όσο και ως προς τις ιδιότητες τους. Γενικά η λιπάση A είναι πιο θερμοανθεκτική και παρουσιάζει μεγάλη δραστηριότητα έναντι μεγάλων υποστρωμάτων (π.χ τριγλυκεριδίων) σε σύγκριση με την B. Αντίθετα η λιπάση B, παρουσιάζει ισχυρή δραστηριότητα έναντι μεγάλου εύρους εστέρων, αμιδίων και θειολών [Dominguez de Maria *et al.*, 2005].

Πιο συγκεκριμένα η λιπάση B από *Candida antarctica* (CaLB) αποτελείται από 317 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 33 kD, ισοηλεκτρικό σημείο 6.0 [Martinelle *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1998] και διαστάσεις 30 Å x 40 Å x 50 Å [Uppenberg *et al.*, 1994, 1995]. Η βέλτιστη τιμή pH για την CaLB είναι pH 7.0, με μία απότομη πτώση της δραστηριότητάς της σε τιμές κάτω από pH 6.0 και πάνω από pH 8.0. Γενικά, οι λιπάσες ενεργοποιούνται όταν έρθουν σε επαφή με μια διεπιφάνεια νερού-ελαίου, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 4.4. Αυτή η ενεργοποίηση όμως, δεν παρουσιάζεται στην CaLB [Martinelle *et al.*, 1995] και το ένζυμο μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα ενδιάμεσο λιπάσης και εστεράσης.

Η CaLB έχει τα χαρακτηριστικά της α/β υδρολάσης και παρουσιάζει την τυπική καταλυτική τριάδα Ser105- His224- Asp187 στο ενεργό της κέντρο. Η δομή της αποτελείται από έναν πυρήνα 8 (συνήθως παράλληλων) πτυχωτών επιφανειών (συμβολίζονται με τόξα) οι οποίες περιβάλλονται από α-έλικες (συμβολίζονται με κυλίνδρους). Σε ακραίες τιμές pH παρατηρείται σημαντική απώλεια των περιεχομένων α-ελίκων, γεγονός το οποίο μπορεί να ερμηνεύσει την απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου σε αυτές τις τιμές του pH. Το φαινόμενο αυτό εξηγείται με βάση τη σημασία της κατάστασης ιονισμού των καταλοίπων

ασπαρτικού και ιστιδίνης της καταλυτικής τριάδας [McCabe *et al.*, 2005]. Στο Σχήμα 4.20 παρουσιάζεται η τρισδιάστατη δομή της λιπάσης B από *Candida antarctica*



**Σχήμα 4.20.** Τρισδιάστατη δομή λιπάσης B από *Candida antarctica*

Κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων-X [Uppenberg *et al.*, 1994,1995], έδειξαν ότι στο ενεργό κέντρο εντοπίζεται επίσης μια κοιλότητα, η οποία ονομάζεται θυλάκιο στέρεο-ειδίκευσης (stereospecificity pocket), στην οποία οι δευτεροταγείς αλκοόλες πρέπει να προσανατολιστούν, με αποτέλεσμα η λιπάση CaLB να εμφανίζει υψηλή ενάντιο-εκλεκτικότητα σε εναντιομερείς δευτεροταγείς αλκοόλες. Στο Σχήμα 4.21 απεικονίζονται οι δυο διαφορετικοί μηχανισμοί πρόσδεσης των υποτρωμάτων. Όπως παρατηρείται η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος της CaLB αποτελείται από δύο τμήματα, το ένα δέχεται την ακυλομάδα του υποστρώματος και το άλλο το αλκοολικό του κατάλοιπο.



**Σχήμα 4.21.** Προτεινόμενοι μηχανισμοί πρόσδεσης των δευτεροταγών αλκοολών. Οι συμβολισμοί M και L αντιστοιχούν στην μεσαίου και μεγάλου μεγέθους υδροφοβική οπή [Ottosson *et al.*, 2002].

Πιο συγκεκριμένα πάνω και κάτω από την καταλυτική τριάδα υπάρχει μια υδροφοβική οπή (μια μεγάλου και μια μεσαίου μεγέθους, αντίστοιχα). Κατά την καταλυτική δράση του ενζύμου, το ακυλιωμένο τμήμα του υποστρώματος βρίσκεται στην μεγάλη υδροφοβική οπή ενώ το πυρηνόφιλο τμήμα εντοπίζεται στη μεσαίου μεγέθους οπή αλλά μπορεί σε κάποιες περιπτώσεις να επεκτείνεται στο διαλύτη και/ή στην μεγάλη υδροφοβική οπή. Το ενεργό κέντρο της λιπάσης είναι περιορισμένο σε μέγεθος (χοανοειδή περιοχή πρόσδεσης) και το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την πολύ καλή εναντιοεκλεκτικότητα που παρουσιάζει σε δευτεροταγείς αλκοόλες [Lutz, 2004] και σε άλλα πυρηνόφιλα υποστρώματα, όπως πρωτοταγείς αμίνες [Gotor-Fernandez *et al.*, 2006].

Οι λόγοι της ευρείας εφαρμογής της λιπάσης B είναι η μεγάλη τόπο- και έναντιο εκλεκτικότητα που επιδύκνει σε πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων [Kirk and Christensen, 2002], καθώς και η ικανότητά της να καταλύει αντιδράσεις σε μη υδατικά περιβάλλοντα σε συνδυασμό με την αντοχή της στην θερμική μετουσίωση [Bastida *et al.*, 1998; Aderson *et al.*, 1998; Cordova *et al.*, 1998; Degn *et al.*, 1999; McCabe *et al.*, 2005].

Παρά τις ιδιαίτερες ιδιότητες και την δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ως καταλύτης, μόνο λίγες αναφορές υπάρχουν σχετικά με τη χρήση αυτού του ενζύμου στη βιομηχανική βιοκατάλυση, λόγω της σχετικά υψηλής τιμής των εμπορικά διαθέσιμων παρασκευασμάτων της CaLB (Novozym της Novozymes A/S και Chirazyme της Roche Molecular Biochemicals). Στα παρασκευάσματα αυτά η CaLB είναι ακινητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη και βρίσκουν εφαρμογή σε βιομηχανικό επίπεδο στη σύνθεση χημικών ενώσεων υψηλής αξίας [Kirk and Christensen, 2002]. Παρόλα αυτά σε εργαστηριακή κλίμα η Novozym 435<sup>®</sup> βρίσκει εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα τεχνολογιών. Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται ενδεικτικές εφαρμογές της Novozym 435<sup>®</sup>.

**Πίνακας 4.8** Ενδεικτικές βιοκαταλυτικές εφαρμογές της Novozym 435<sup>®</sup>

| Εφαρμογή                        | Βιβλιογραφική αναφορά                |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Παραγωγή βιοντίζελ              | Rahman Talukder <i>et al.</i> , 2009 |
| Χημειο-ενζυμική σύνθεση ορμονών | Vaidyanathan <i>et al.</i> , 2007    |
| Χημειο-ενζυμική σύνθεση αμιδίων | Andrade and Silva, 2008              |
| Παραγωγή αρωματικών εστέρων     | Lubary <i>et al.</i> , 2009          |
| Σύνθεση τερπενικών εστέρων      | Yadav and Lathi, 2004                |
| Σύνθεση φαινολικών παραγώγων    | Katsoura <i>et al.</i> , 2006        |

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ- ΦΥΛΛΟΜΟΡΦΟΙ ΑΡΓΙΛΟΙ

---

### 5.1 Γενικά

Προκειμένου να βελτιωθεί η δράση αλλά και η σταθερότητα των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα, επιχειρήθηκε η ακινητοποίηση τους σε διάφορους φορείς. Ακινητοποίηση ή καθήλωση ονομάζεται η διαδικασία σύνδεσης ενός βιοκαταλύτη σε κάποιο αδιάλυτο υλικό-υπόστρωμα στήριξης, με τέτοιο τρόπο, ώστε ο βιοκαταλύτης να συνεχίσει να διατηρεί τις καταλυτικές του ιδιότητες και την σταθερότητα του, έτσι ώστε το βιοκαταλυτικό σύστημα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα [Bornscheuer, 2003; Polizzi *et al.*, 2007; Wang Z-G., *et al.*, 2009]. Οι βιοκαταλύτες που μπορούν να ακινητοποιηθούν είναι ελεύθερα ένζυμα, πολυενζυμικά συστήματα, ενεργά μικροβιακά κύτταρα, φυτικοί και ζωικοί οργανισμοί [Wang *et al.*, 2007; Osuna *et al.*, 2008]. Η ακινητοποίηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά αντιδρώντων, προϊόντων κλπ μεταξύ της βιοκαταλυτικής στερεάς φάσης και μιας κύριας υγρής φάσης. Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τόσο τα πλεονεκτήματα όσο και τα μειονεκτήματα των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών [Cao *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2007].

**Πίνακας 5.1** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της ακινητοποίησης

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>▪Αποφυγή επιμόλυνσης του προϊόντος με μόρια ή κύτταρα του βιοκαταλύτη</li><li>▪Εύκολος έλεγχος του μικροπεριβάλλοντος του βιοκαταλύτη</li><li>▪Επίτευξη πολυενζυμικών αντιδράσεων με διαμερισματοποίηση των διαφορετικών βιοκαταλυτών</li><li>▪Επίτευξη υψηλών συγκεντρώσεων του βιοκαταλύτη στο σύστημα της αντίδρασης</li><li>▪Αυξημένη σταθερότητα βιοκαταλύτη</li><li>▪Επίτευξη αντιδράσεων σε άνυδρα συστήματα</li><li>▪Έλεγχος της πορείας της αντίδρασης με απομάκρυνση του βιοκαταλύτη</li><li>▪Εύκολη ανάκτηση προϊόντων αντίδρασης</li><li>▪Οικονομικά συμφέρουσα τεχνική</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>▪Χρησιμοποιούνται μόνο σε υγρά υποστρώματα</li><li>▪Πρόβλημα διάχυσης του υποστρώματος στον ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη</li><li>▪Δεν είναι πάντα δυνατόν ο έλεγχος των θέσεων των βιοκαταλυτών στο φορέα ακινητοποίησης</li><li>▪Πολλές φορές η ακινητοποίηση επηρεάζει την καταλυτική δράση του βιοκαταλύτη</li><li>▪Προβλήματα χειρισμού του υλικού</li></ul> |

## 5.2 Επίδραση ακινητοποίησης στα καταλυτικά χαρακτηριστικά

Είναι γνωστό ότι οι ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων πολλές φορές διαφέρουν από αυτές των ελεύθερων [Wang *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2008]. Οι διαφορές αυτές καθορίζονται από: α) τη διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου στο χώρο, β) το υλικό στήριξης, γ) τη μέθοδο και δ) τις συνθήκες ακινητοποίησης. Η συνολική πορεία ακινητοποίησης μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην: α) κινητική συμπεριφορά του ενζύμου, β) στη βέλτιστη τιμή pH και θερμοκρασίας δράσης του, και γ) στην εξειδίκευσή του. Οι τεχνικές ακινητοποίησης μπορεί να είναι είτε φυσικές είτε χημικές, με τις φυσικές να ασκούν μικρότερη επίδραση στην καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου σε σχέση με τις χημικές, λόγω του ότι στην πρώτη περίπτωση το ένζυμο διατηρεί την αρχική του διαμόρφωση σε αρκετά μεγάλο βαθμό σε αντίθεση με τις χημικές μεθόδους, όπου επέρχεται σημαντική τροποποίηση αυτού. Γενικά η κατανόηση των αλλαγών που συμβαίνουν στο πρωτεϊνικό μόριο μετά την ακινητοποίηση του σε κατάλληλο φορέα, είναι καθοριστικής σημασίας, καθώς κατευθύνεται ανάλογα και το πεδίο της εφαρμογής του [Roach *et al.*, 2006; Asuri *et al.*, 2006]. Οι αλλαγές αυτές είναι δυνατόν να αποδοθούν στους παρακάτω παράγοντες:

1) Μεταβολές της δομής του ενζυμικού μορίου: Τα ένζυμα είναι ευαίσθητα στη θερμική αποικοδόμηση, είτε βρίσκονται σε διαλυτή μορφή είτε ακινητοποιημένα σε κάποιο υλικό στήριξης, λόγω των αλλαγών στην τριτοταγή δομή τους ή λόγω της οξειδωσης ορισμένων ομάδων σε υψηλές θερμοκρασίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις έχει αποδειχτεί, ότι η ταχύτητα απενεργοποίησης και αποικοδόμησης των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι μικρότερη από αυτήν των διαλυτών, λόγω της αυξανόμενης ακαμψίας του μορίου, η οποία παρέχει αυξανόμενη αντοχή στις αλλαγές της τριτοταγούς δομής κατά τη θέρμανση [Noinville *et al.*, 2002; Iafisco *et al.*, 2008; Chen, 2009]. Επίσης πολλές φορές παρατηρείται μειωμένη ειδική ενεργότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων, η οποία αποδίδεται στις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στην τριτοταγή δομή του ενζύμου. Για παράδειγμα, οι ομοιοπολικοί δεσμοί που δημιουργούνται μεταξύ του ενζύμου και του φορέα, μπορεί να «τεντώσουν» το ενζυμικό μόριο και κατ'επέκταση και την δομή του ενεργού του κέντρου. Ακόμη έχει παρατηρηθεί μετουσίωση του πρωτεϊνικού μορίου από τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την παγίδευση του βιομορίου σε πηκτή πολυμερούς [Ratledge and Kristiansen, 2001].

2) Στερεοχημικοί περιορισμοί: Κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων, είναι δυνατόν το ένζυμο να δεσμευτεί στο φορέα με τέτοιο τρόπο, ώστε το πρωτεϊνικό μόριο να βρίσκεται σε

μία ανενεργή διαμόρφωση χάνοντας ένα μέρος ή το σύνολο της καταλυτικής του ικανότητας, ή προκαλώντας μερική ή ολική δέσμευση του ενεργού κέντρου και μείωση της ικανότητας πρόσβασης από το υπόστρωμα. Το φαινόμενο αποδίδεται σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις, που προκαλούνται κατά την διαδικασία της ακινητοποίησης και από το είδος του υλικού στήριξης, με αποτέλεσμα το ένζυμο να μην έχει κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορούν τα μόρια του υποστρώματος να εντοπίσουν το ενεργό κέντρο [Illanes, 2008; Lee C.-H., *et al.*, 2009]. Η παρατηρούμενη μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα που διαπιστώνεται στην περίπτωση αυτή, μπορεί να βελτιωθεί με την επιλογή κατάλληλης μεθόδου ακινητοποίησης. Επίσης το ενεργό κέντρο του ενζύμου μπορεί να προστατευτεί από την επίδραση του φορέα ακινητοποίησης με την προσθήκη ενός υλικού που ονομάζεται ‘spacer’ λόγω ότι διατηρεί το ενζυμικό μόριο σε καθορισμένη απόσταση από τον φορέα ακινητοποίησης. Έτσι με την προσθήκη δι-λειτουργικών ενώσεων όπως π.χ. του 1,6 διαμινοεξανίου ως ‘spacer’, η ειδική ενεργότητα της ομοιοπολικά ακινητοποιημένης γλυκοαμυλάσης σε μεσοπορώδη πυριτικά υλικά αυξήθηκε κατά 10 φορές [Ratlidge and Kristiansen, 2001].

3) Περιορισμοί διάχυσης: Οι περιορισμοί διάχυσης κατά τη μεταφορά των προϊόντων ή των αντιδρώντων από ή προς το πρωτεϊνικό μόριο μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τις παρατηρούμενες κινητικές παραμέτρους [Illanes, 2008]. Γενικά όταν ένα ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό φορέα, λαμβάνουν χώρα φαινόμενα περιορισμού διάχυσης καθώς το υπόστρωμα πρέπει να διαχυθεί από τον διαλύτη της αντίδρασης στο ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου. Εάν το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε μη πορώδη υλικά, τότε υπάρχουν μόνο εξωτερικοί περιορισμοί διάχυσης που επιδρούν στην καταλυτικά ενεργή εξωτερική του επιφάνεια. Εάν όμως το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε πορώδη υλικά, τότε εκτός από πιθανούς εξωτερικούς περιορισμούς διάχυσης, λαμβάνουν χώρα και εσωτερικοί περιορισμοί διάχυσης του υποστρώματος (καθώς το υπόστρωμα θα πρέπει να διαχυθεί μέσω των πόρων για να φθάσει στο ένζυμο) αλλά και του προϊόντος προς το διάλυμα της αντίδρασης. Συνεπώς, μια σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος παρατηρείται μέσα στους πόρους, η οποία μειώνεται καθώς αυξάνεται η απόσταση του ακινητοποιημένου ενζύμου μέσα στο πορώδη υλικό στήριξης. Αντίστοιχα η συγκέντρωση του προϊόντος αυξάνεται σε περιοχές κοντά στο ενζυμικό μόριο, ενώ μειώνεται σε μακρινές αποστάσεις, με αποτέλεσμα να παρατηρείται μικρή συγκέντρωση του στο διάλυμα της αντίδρασης. Σε αντίθεση με τους εξωτερικούς περιορισμούς διάχυσης, οι εσωτερικοί περιορισμοί διάχυσης λαμβάνουν χώρα παράλληλα με την ενζυμική αντίδραση και θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος που συμβαίνει μέσα

στους πόρους, με αύξηση της απόστασης του ακινητοποιημένου ενζύμου μέσα στο υλικό στήριξης. Εν κατακλείδι η πορεία της αντίδρασης επηρεάζεται από την συγκέντρωση του υποστρώματος και από την απόσταση του ακινητοποιημένου ενζύμου από το διάλυμα της αντίδρασης [Ratlidge and Kristiansen, 2001].

4) Φαινόμενα κατανομής: Τα φαινόμενα κατανομής είναι αποτέλεσμα ανάπτυξης ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων και του φορέα, γεγονός που οδηγεί στην αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου [Illanes, 2008]. Πιο συγκεκριμένα όταν ο φορέας έχει κάποιο φορτίο ή έχει υδροφοβικό χαρακτήρα, η κινητική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου διαφέρει από αυτή του ελεύθερου, ακόμη και απουσίας των περιορισμών διάχυσης. Η διάφορα αυτή συνήθως αποδίδεται σε φαινόμενα κατανομής, τα οποία δημιουργούν διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρωμάτων, προϊόντων, ιόντων υδρογόνου, ιόντων υδροξυλίου κλπ στο μικροπεριβάλλον του ακινητοποιημένου ενζύμου και στο διάλυμα της αντίδρασης εξαιτίας των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των μορίων και του φορέα. Η κύρια αιτία των φαινομένων κατανομής οφείλεται σε μια μετατόπιση της βέλτιστης τιμής pH του ακινητοποιημένου ενζύμου σε πιο αλκαλικές ή όξινες τιμές pH, με αντίστοιχη εμφάνιση αρνητικών ή θετικών φορτίων. Με ανάλογο τρόπο, συμβαίνει η κατανομή των φορτισμένων ενώσεων π.χ. του υποστρώματος ή του προϊόντος, ανάμεσα στο φορτισμένο ενζυμικό μόριο και στο διάλυμα της αντίδρασης. Για παράδειγμα όταν σε μια αντίδραση καταλύεται ένα θετικά φορτισμένο υπόστρωμα, από ένα αρνητικά φορτισμένο ακινητοποιημένο ένζυμο, τότε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος αναμένεται να υπάρξουν στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου παρά στο διάλυμα της αντίδρασης. Επίσης στην περίπτωση αυτή παρατηρείται υψηλή ενζυμική δραστηριότητα, η οποία δεν θα λάμβανε χώρα εάν ως φορέας ακινητοποίησης ήταν ηλεκτρικά ουδέτερος. Παρόλα αυτά όταν στο σύστημα της αντίδρασης πραγματοποιούνται και άλλες αλλαγές εκτός από τα φαινόμενα κατανομής, τότε είναι πιθανόν να μην συμβαίνει μετατόπιση στην βέλτιστη τιμή του pH του ακινητοποιημένου ενζύμου [Ratlidge and Kristiansen, 2001].

### **5.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης**

Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την ακινητοποίηση βιολογικά ενεργών ουσιών (ένζυμων, αντιγόνων/αντισωμάτων, βακτηρίων, ιστών) βασίζονται σε φυσικές ή χημικές

μεθόδους ή σε συνδυασμούς αυτών [Polizzi *et al.*, 2007]. Στον Πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι φυσικές και οι χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης.

**Πίνακας 5.2.** Μέθοδοι ακινητοποίησης βιολογικά ενεργών ουσιών

| Φυσικές                                        | Χημικές                                              |
|------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Προσρόφηση σε μη υδατοδιαλυτό φορέα            | Διαμοριακή σύνδεση των ενζυμικών μορίων              |
| Παγίδευση σε μη υδατοδιαλυτές πηκτές πολυμερών | Ομοιοπολική σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα          |
| Ενθυλάκωση σε αδρανείς μεμβράνες               | Διαμοριακή σύνδεση μέσω διλειτουργικών υποκαταστατών |

### 5.3.1 Προσρόφηση (adsorption)

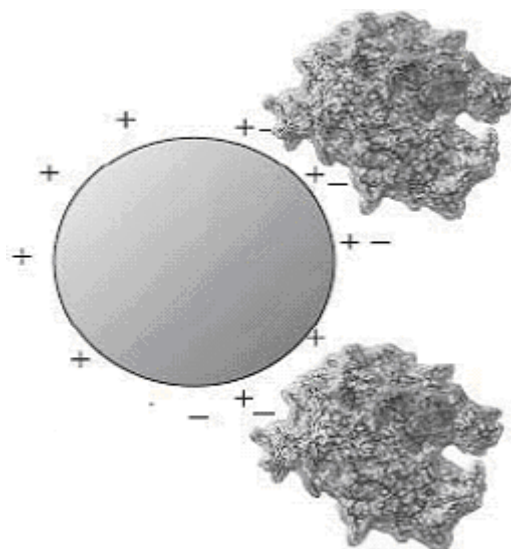
Η προσρόφηση των βιομορίων πάνω σε μη υδατοδιαλυτούς φορείς είναι η απλούστερη και η πιο οικονομική μέθοδος ακινητοποίησης. Η σύνδεση του ενζύμου με το μη υδατοδιαλυτό υλικό γίνεται μέσω ιοντικών, πολικών ή υδρόφοβων δεσμών ή δεσμών υδρογόνου ή μέσω αλληλεπιδράσεων van der Waals [Ratledge and Kristiansen, 2001; Illanes, 2008]. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται κατά την επαφή ενζυμικού υδατικού διαλύματος με το προσροφητικό μέσο για κάποια χρονική περίοδο, μετά την πάροδο της οποίας η περίσσεια του ενζύμου απομακρύνεται από το διάλυμα [Lee C.-H., *et al.*, 2009]. Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.3

**Πίνακας 5.3** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνικής προσρόφησης ενζύμων

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                   | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ήπιες συνθήκες (pH, θερμοκρασία)</li> <li>• Τα ένζυμα διατηρούν την φυσική τους διαμόρφωση και κατά συνέπεια τις καταλυτικές τους ιδιότητες</li> <li>• Εύκολη αναγέννηση του βιοκαταλύτη</li> <li>• Χαμηλό κόστος εφαρμογής</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Εύκολη απομάκρυνση του βιοκαταλύτη με αποτέλεσμα: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. τα προσροφημένα βιομόρια να μην χρησιμοποιούνται για μεγάλης κλίμακας διεργασίες</li> <li>2. χαμηλή παραγωγικότητα</li> <li>3. χαμηλή καθαρότητα τελικού προϊόντος</li> </ol> </li> </ul> |

Όσον αφορά το προσροφητικό υλικό, αυτό πρέπει να έχει: α) υψηλή προσροφητική χωρητικότητα, β) μεγάλη συγγένεια με το προσροφημένο βιομόριο και γ) να μην προσροφά τα προϊόντα αντίδρασης ή τους αναστολείς του ενζύμου. Από την άλλη μεριά το βιομόριο πρέπει να απορροφάται κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη προσρόφηση και κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διατηρεί το μεγαλύτερο ποσοστό της ενεργότητας του [Illanes, 2008].

Η προσρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια ενός υλικού είναι μία αντιστρεπτή διαδικασία, γι αυτό οι συνθήκες παρασκευής και λειτουργίας (pH, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, διαλύτης), πρέπει να διατηρούνται σταθερές. Αλλαγές των συνθηκών λειτουργίας μπορούν να προκαλέσουν την εκρόφηση του ενζύμου με αποτέλεσμα τη μείωση της ενζυμικής του δραστηριότητας [Illanes, 2008]. Στο Σχήμα 5.1 απεικονίζεται η προσρόφηση του ενζύμου σε μη υδατοδιαλυτό φορέα.

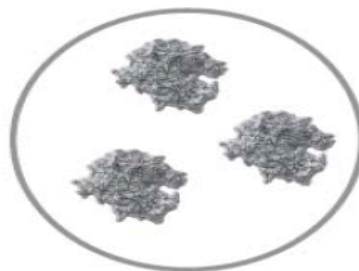


**Σχήμα 5.1:** Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου μέσω προσρόφησης [Platis *et al.*, 2005].

Διάφορα υλικά, όπως άργιλοι [Serefoglou *et al.*, 2008], διοξείδιο του τιτανίου [Mazzer *et al.*, 2008], νάυλον μεμβράνες [Nie and Zhu, 2007], πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), αλουμίνα [Reshmi *et al.*, 2006], κατιονικές και ανιονικές ιονανταλλακτικές ρητίνες (CM-cellulose, DEAE-Sephadex, Dowex 50) [Mamma *et al.*, 2009], κεραμικά υλικά [de Lathouder *et al.*, 2008], επιφάνεια νανοπόρων υλικών (π.χ χρυσός) [Qiu *et al.*, 2008], νανοσωλήνες άνθρακα [Liu F., *et al.*, 2008] έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ακινητοποίηση μεγάλου αριθμού ενζύμων.

### 5.3.2 Ενθυλάκωση (encapsulation)

Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται μία αδρανής ημιπερατή μεμβράνη με διάμετρο μικρότερη από 100μm για την ακινητοποίηση του βιομορίου [Wang *et al.*, 2009]. Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζεται η ακινητοποίησης ενζύμου μέσω ενθυλάκωσης



**Σχήμα 5.2:** Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου μέσω ενθυλάκωσης [Platis *et al.*, 2005].

Η ημιπερατή μεμβράνη εμποδίζει την έξοδο των μορίων του βιοκαταλυτη αλλά επιτρέπει την είσοδο των υποστρωμάτων και των προϊόντων [Darder *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2008]. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται συνήθως σε αυτή τη μέθοδο είναι: 1) οξικής κυταρρίνης (cellulose acetate), 2) πολυκαρβονικές (polycarbonate), 3) κολλαγόνο (collagen), 4) νανοσωματίδια  $\text{CaCO}_3$ . Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4.

**Πίνακας 5.4** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ενθυλάκωσης ενζύμων

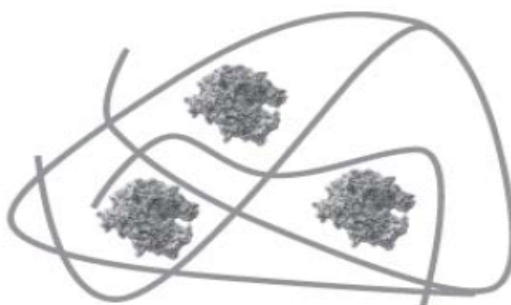
| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                               | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Δυνατότητα ακινητοποίησης διαφορετικών ενζύμων</li><li>• Σταθερότητα σε μεταβολές του pH, της θερμοκρασίας και της ιοντικής ισχύος</li><li>• Υψηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας</li><li>• Μεγάλη ειδική επιφάνεια</li><li>• Εύκολα εφαρμόσιμη</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Μειωμένη μηχανική σταθερότητα των καψυλλίων</li><li>• Απώλεια ενζυμικής δράσης λόγω επαφής με οργανικούς διαλύτες, χημικά</li></ul> |

Η τεχνική της ενθυλάκωσης βιομορίων βρίσκει εφαρμογή κατά τον εγκλωβισμό ενζύμων, κυττάρων, όργανα κυττάρων [Hochkoeppler and Luisi, 1989; Goto *et al.*, 2004; Cinelli *et al.*, 2006; Anarbaev *et al.*, 2009] σε αντίστροφα μικκύλια όπως περιγράφηκε στην

παράγραφο 3.3.6.1.2. Κατά τον σχηματισμό των αντίστροφων μικκυλίων το ένζυμο παραμένει διαλυτό στην υδατική μικροφάση ενώ τα μόρια των υποστρωμάτων και προϊόντων διαχέονται από και προς την οργανική φάση του συστήματος [Orlich and Schomacker, 2002; Dasgupta *et al.*, 2005; Moniruzzaman *et al.*, 2006].

### 5.3.3. Παγίδευση (entrapment)

Η παγίδευση ενός βιομορίου σε πηκτή πολυμερούς (gel) είναι μία άλλη φυσική μέθοδος ακινητοποίησης και συνίσταται στην παρασκευή πηκτής πολυμερούς από διάλυμα του μονομερούς, που συμπεριέχει το βιομόριο [Zoumprianoti *et al.*, 2006b; Sangeetha *et al.*, 2008; Illanes, 2008]. Στην περίπτωση αυτήν το βιομόριο παγιδεύεται μέσα στο τρισδιάστατο πλέγμα του πολυμερούς. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι το πολυακρυλαμίδιο, η πολυβινυλοαλκοόλη, ηλεκτροπολυμερισμένα υμένια (πολυπυρρόλιο) κ.α. [Illanes, 2008]. Στο Σχήμα 5.3 απεικονίζεται η ακινητοποίηση ενζύμου μέσω παγίδευσης, ενώ στον Πίνακα 5.5 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής.



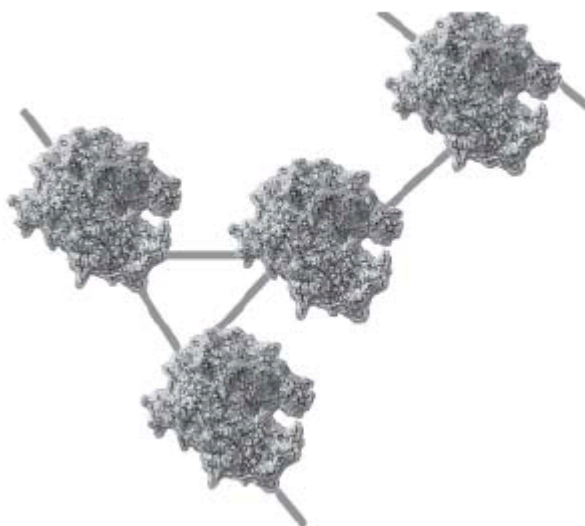
**Σχήμα 5.3:** Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με παγίδευση [Platis *et al.*, 2005].

**Πίνακας 5.5** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα παγίδευσης ενζύμων σε πηκτή πολυμερούς

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ήπια μέθοδος ακινητοποίησης (τα βιομόρια δε σχηματίζουν χημικούς δεσμούς με το υλικό ακινητοποίησης ή μεταξύ τους)</li> <li>• Κατάλληλη τεχνική για την ακινητοποίηση κυττάρων και μεγαλομοριακών συστημάτων</li> <li>• Εύκολα εφαρμόσιμη</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Απώλεια ενζυμικής ενεργότητας λόγω της δράσης ελευθέρων ριζών, οι οποίες δημιουργούνται κατά τον σχηματισμό των πολυμερών</li> <li>• Το μέγεθος των πόρων του φορέα μπορεί να επηρεάσει τη μεταφορά των προϊόντων ή των αντιδρώντων από ή προς το πρωτεϊνικό μόριο</li> </ul> |

### 5.3.4 Διασταυρούμενη ή διαμοριακή σύνδεση (cross-linking)

Η μέθοδος διαμοριακής σύνδεσης χρησιμοποιείται συχνά και πολλές φορές συνδυάζεται με τις μεθόδους προσρόφησης και παγίδευσης προκειμένου να περιοριστεί η εκρόφιση του ενζύμου από το υλικό ακινητοποίησης που συχνά παρατηρείται στις φυσικές μεθόδους ακινητοποίησης [Illanes, 2008]. Βεβαίως η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσια για την ακινητοποίηση ενζύμων σε διάφορα υλικά στήριξης. Η πιο διαδεδομένη χρήση της μεθόδου διαμοριακής σύνδεσης είναι στην παρασκευή ενζυμικών μεμβρανών, με διλειτουργικά αντιδραστήρια, τα οποία με το ένα άκρο τους δεσμεύουν το βιομόριο και με το άλλο μπορούν να συνδεθούν με την πηκτή πολυμερούς ή με άλλα βιομόρια ή με την επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου [Lee C.-H., *et al.*, 2009] (Σχήμα 5.4).



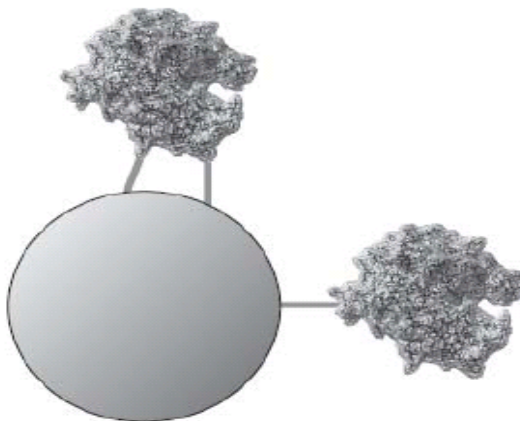
**Σχήμα 5.4:** Απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με διασταυρούμενη σύνδεση.

Τα πλεονεκτήματα της διαμοριακής σύνδεσης έγκειται στην απλότητα και στους ισχυρούς δεσμούς σύνδεσης του βιομορίου με το υλικό στήριξης, ενώ μειονέκτημα αποτελεί η ευαισθησία των βιομορίων στα αντιδραστήρια σύνδεσης. Ένα ευρέως διαδεδομένο διλειτουργικό αντιδραστήριο στην ακινητοποίηση ενζύμων είναι η γλουταραλεϋδη η οποία αντιδρά με την  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>- ομάδα της λυσίνης [Kiernan, 2000; Silva *et al.*, 2004].

### 5.3.5 Ομοιοπολική σύνδεση (covalent bonding)

Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών ανάμεσα στις λειτουργικές ομάδες των ενζύμων (π.χ. κατάλοιπα αμινοξέων) και των υλικών στήριξης [Cao

*et al.*, 2006]. Η πορεία ακινητοποίησης με την συγκεκριμένη τεχνική περιλαμβάνει αρχικά την ενεργοποίηση της επιφάνειας του υλικού στήριξης, ύστερα την ομοιοπολική σύνδεση του βιομορίου και τέλος την απομάκρυνση της μη ακινητοποιημένης ποσότητας του βιομορίου [Ratledge and Kristiansen, 2001; Guisan, 2006; Illanes, 2008]. Στο Σχήμα 5.5 απεικονίζεται η ακινητοποίηση ενζύμου μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης.



**Σχήμα 5.5:** Απεικόνιση της ακινητοποίησης ενζύμου με ομοιοπολική σύνδεση.

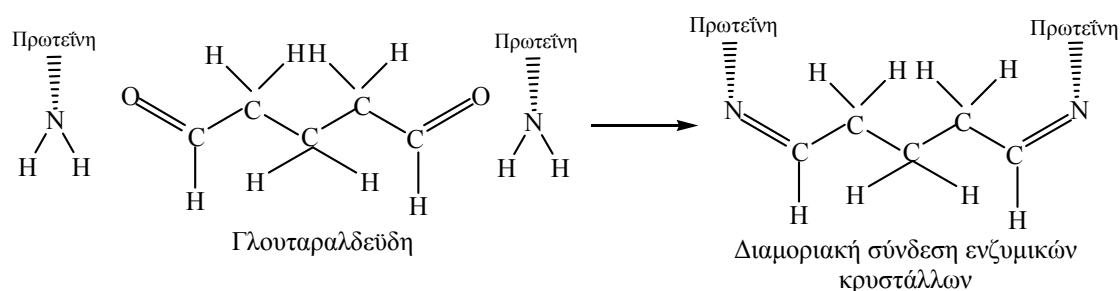
Οι ενεργές ομάδες των ενζύμων, που συμμετέχουν σε τέτοιες αντιδράσεις είναι η ομάδα της λυσίνης, το αμινο- και καρβοξυ-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας, η  $\beta$ - και  $\gamma$ -καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος, η υδροξυλική ομάδα της σερίνης και της θρεονίνης, η φαινολική ομάδα της τυροσίνης, η σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης, η ινδολική ομάδα της τρυπτοφάνης, η ιμιδαζολική ομάδα της ιστιδίνης και η γουανιδική ομάδα της αργινίνης [Illanes, 2008; Lee C.-H., *et al.*, 2009].

Αντίστοιχα τα υλικά στήριξης επιλέγονται ανάλογα με τη διαλυτότητά τους, το είδος των ενώσεων που φέρουν στην επιφάνεια τους, τη χωρητικότητα τους και το βαθμό διόγκωσής τους στον συγκεκριμένο διαλύτη. Τα πιο διαδεδομένα υλικά στήριξης είναι η πορώδης ύαλος, το νάυλον, διάφορα παράγωγα της κυτταρίνης, η αγαρόζη, το Sephadex, το πολυακρυλαμίδιο, το πολυστυρόλιο, οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων (γραφίτη, χρυσού, λευκόχρυσου), οξείδια μετάλλων ( $\text{TiO}_2$ ) κ.α.. Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.6.

**Πίνακας 5.6** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ακινητοποίησης ενζύμου με ομοιοπολική σύνδεση.

| Πλεονεκτήματα                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Μειονεκτήματα                                                                                                                                                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μη αντιστρεπτή διαδικασία, γι αυτό οι συνθήκες παρασκευής και λειτουργίας (pH, ιοντική ισχύς, θερμοκρασία, διαλύτης), δεν χρειάζεται να διατηρούνται σταθερές.</li> <li>• Τα ένζυμα διατηρούν την φυσική τους διαμόρφωση και κατά συνέπεια τις καταλυτικές τους ιδιότητες</li> <li>• Επιτρέπεται η επαφή του ενζύμου με μεγάλα υποστρώματα</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Απώλεια ενζυμικής ενεργότητας λόγω των αντιδράσεων σύνδεσης</li> <li>• Είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα μέθοδος και απαιτείται η χρήση ακριβών αντιδραστηρίων</li> </ul> |

Σήμερα μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομοιοπολική διαμοριακή σύνδεση ενζυμικών κρυστάλλων (Cross-linked enzyme crystals, CLECS) [Cao *et al.*, 2000; Illanes, 2008]. Η γλουταραλδεϋδη είναι το πλέον διαδεδομένο αντιδραστήριο διαμοριακής σύνδεσης που αντιδρά με την  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>- ομάδα της λυσίνης του ενζύμου [Silva *et al.*, 2004; van Langen *et al.*, 2005]. Στο Σχήμα 5.6 απεικονίζεται η σύνδεση της γλουταραλδεϋδης με την  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>-ομάδα της λυσίνης του ενζύμου. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι η αύξηση της θερμοσταθερότητας και ανεκτικότητας του ενζύμου σε πολικούς οργανικούς διαλύτες [Lopez-Serrano *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2004; Rajam and Abraham, 2008].



**Σχήμα 5.6.** Διαμοριακή σύνδεση ενζύμου με γλουταραλδεϋδη.

## 5.4 Φυλλόμορφοι άργιλοι

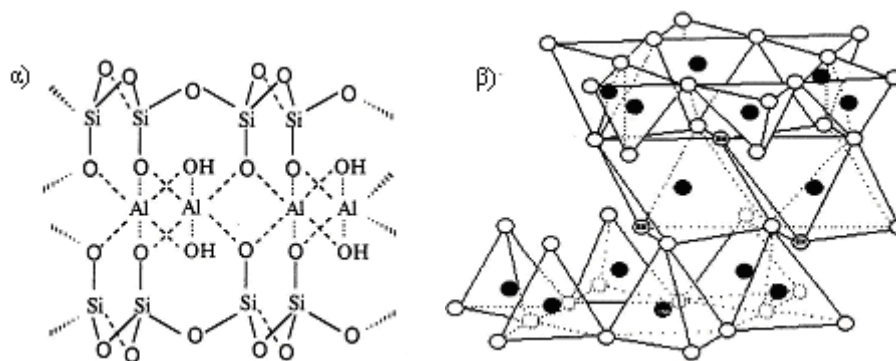
### 5.4.1 Εισαγωγή

Οι φυλλόμορφοι άργιλοι ή άργιλοι ή πηλοί είναι μικροκρυσταλλικά αργιλοπυριτικά ορυκτά με ορισμένη κρυσταλλική δομή και συνδυασμό ιδιοτήτων κατιοανταλλαγής, ένθεσης και διόγκωσης, που τους καθιστά μοναδικούς. Η Ελλάδα είναι η δεύτερη παραγωγός χώρα μετά τις Η.Π.Α. Η δομική μονάδα των φυλλόμορφων αργίλων αποτελείται από δύο τετραεδρικά φύλλα πυριτίου  $\text{Si}(\text{O},\text{OH})_4$  και από ένα οκταεδρικό φύλλο μετάλλου  $\text{M}(\text{O},\text{OH})_6$ , όπου  $\text{M} = \text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+,3+}$ , το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των τετραεδρικών φύλλων.

Οι φυλλόμορφοι άργιλοι έχουν την ικανότητα να προσροφούν οργανικά και ανόργανα κατιονικά μόρια ή ακόμη και ουδέτερα μόρια από διαλύματα. Εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων τους οι άργιλοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες [Ballantine,1986; Cornelis and Laszlo,1986], ως ‘οδηγοί’ στην οργανική σύνθεση [Georgakilas *et al.*, 2001, 2003] ή ως δομικοί λίθοι για σύνθετα υλικά. Η φύση του μικροπεριβάλλοντος μεταξύ των φυλλιδίων ρυθμίζει την τοπολογία των παρεμβαλλόμενων μορίων και επιδρά ίσως στις υπερμοριακές διευθετήσεις ή αντιδράσεις όπως στις διαδικασίες αυτοσυνάθροισης οι οποίες είναι δύσκολο να ελεγχθούν στα διαλύματα [Gournis *et al.*, 2006].

### 5.4.2 Σχηματισμός φυλλόμορφων αργίλων

Ο σχηματισμός των φυλλόμορφων αργίλων είναι αποτέλεσμα της συμπύκνωσης των τετραεδρικών πυριτικών φύλλων με τα οκταεδρικά. Η συμπύκνωση πραγματοποιείται με αμοιβαία συνεισφορά των ασύνδετων οξυγόνων του τετραεδρικού και οκταεδρικού φύλλου. Με τον τρόπο αυτό σχηματίζονται οι λεγόμενοι 1:1 άργιλοι ή αλλιώς TO (T = τετράεδρο, O = οκτάεδρο). Είναι επίσης δυνατόν να συνδεθεί ένα δεύτερο τετράεδρο κάτω από το οκτάεδρο, σχηματίζοντας τους λεγόμενους 2:1 αργίλους ή αλλιώς TOT (Σχήμα 5.7). Άλλοι τύποι αργίλων που συναντώνται είναι οι 2:2 ή 2:1:1.



**Σχήμα 5.7.** Σχηματισμός φυλλόμορφου αργίλου 2:1 ως αποτέλεσμα συμπίκνωσης δύο τετραεδρικών και ενός οκταεδρικού φύλλου: (α) δισδιάστατη και (β) τρισδιάστατη απεικόνιση.

#### 5.4.3 Ισόμορφη αντικατάσταση

Κατά το σχηματισμό των πηλών, τα οκταεδρικά ή τετραεδρικά κατιόντα υφίστανται αντικατάσταση από άλλα κατιόντα, τα οποία πρέπει να έχουν κατάλληλο μέγεθος ώστε να μπορούν να προσαρμοστούν στη δομή του φυλλόμορφου αργίλου. Παρατηρείται λοιπόν μερική αντικατάσταση των  $\text{Si}^{4+}$  από  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  στο τετραεδρικό φύλλο και των  $\text{Al}^{3+}$  από  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ή  $^{3+}$ ,  $\text{Li}^{+}$  στο οκταεδρικό φύλλο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ισόμορφη αντικατάσταση και ευθύνεται για μερικές από τις σημαντικότερες ιδιότητες των αργίλων. Η αντικατάσταση αυτή έχει σαν συνέπεια ο αρχικώς ουδέτερος άργιλος να αποκτά αρνητικό φορτίο, το οποίο και αντισταθμίζεται με προσρόφηση στον ενδοστρωματικό χώρο διαφόρων τύπων κατιόντα, όπως  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ . Τα κατιόντα αυτά ονομάζονται αντισταθμιστικά και βρίσκονται υπό εφυδατωμένη μορφή.

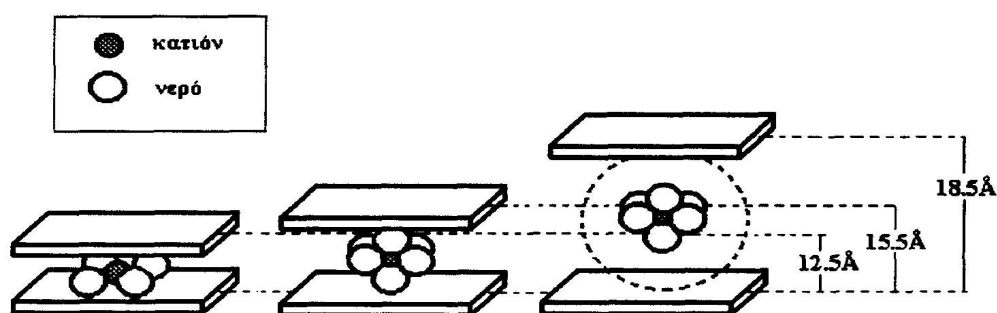
Όταν η ισόμορφη αντικατάσταση λαμβάνει χώρα στο τετραεδρικό φύλλο το αρνητικό φορτίο εντοπίζεται σε συγκεκριμένη θέση της επιφάνειας του φυλλιδίου, συνήθως βρίσκεται στη θέση του κατιόντος μικρότερου σθένους, όπως παρατηρείται στον μπεϊντιλίτη όπου το πυρίτιο αντικαθίσταται από αργίλιο. Στην περίπτωση που η αντικατάσταση γίνεται στο οκταεδρικό φύλλο, το αρνητικό φορτίο δεν είναι εντοπισμένο αλλά μοιράζεται σε δώδεκα οξυγόνα της επιφάνειας, δηλαδή το φυλλίδιο είναι αρνητικά φορτισμένο με ομοιογένεια, όπως συμβαίνει για παράδειγμα στο μοντμοριλλόνιτη.

Η ποσότητα του αρνητικού φορτίου, που αποκτά ο άργιλος σαν συνέπεια της ισόμορφης αντικατάστασης, είναι χαρακτηριστική για κάθε άργιλο, ονομάζεται

κατιοανταλλακτική ικανότητα (Cation Exchange Capacity ή CEC) και εκφράζεται σε meq των ανταλλάξιμων κατιόντων ανά ποσότητα μάζας του αργίλου [Kitsopoulos, 1999; Czimegova *et al.*, 2006]. Η κατιοανταλλακτική ικανότητα οφείλεται, εκτός από την ισόμορφη αντικατάσταση, σε σπασμένους δεσμούς στις άκρες των φύλλων, καθώς επίσης στην πρωτονίωση και αποπρωτονίωση των υδροξυλομάδων του κρυσταλλικού πλέγματος. Γενικά η CEC εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα του κρυστάλλου, το pH, τη θερμοκρασία, τον τύπο των αντισταθμιστικών κατιόντων και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της.

#### 5.4.4 Ικανότητα διόγκωσης των αργίλων

Τα αργιλοπυριτικά φύλλα συγκρατούνται το ένα πάνω στο άλλο μέσω δυνάμεων ηλεκτροστατικής φύσεως που αναπτύσσονται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων επιφανειών και των αντισταθμιστικών κατιόντων. Όταν ο άργιλος έρθει σε επαφή με ένα πολικό διαλύτη, τα πολωμένα μόρια του διαλύτη εισέρχονται στον ενδοστρωματικό χώρο του αργίλου, προκαλώντας την ενυδάτωση των κατιόντων και τη διόγκωση του αργίλου, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.8. Το φαινόμενο της διόγκωσης είναι αντιστρεπτό και ο άργιλος επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση με αφυδάτωση. Για την πραγματοποίηση της διόγκωσης απαιτείται το άθροισμα των απωστικών δυνάμεων να είναι μεγαλύτερο από το άθροισμα των ελκτικών δυνάμεων. Η διαδικασία της διόγκωσης εξαρτάται από το είδος του αντισταθμιστικού κατιόντος καθώς και από την πυκνότητα του φορτίου του αργίλου. Το μέγεθος της ενδοστρωματικής διόγκωσης εξαρτάται από τη φύση του παράγοντα διόγκωσης, το ιοανταλλακτικό κατιόν, το φορτίο του φύλλου καθώς και τη θέση του φορτίου.



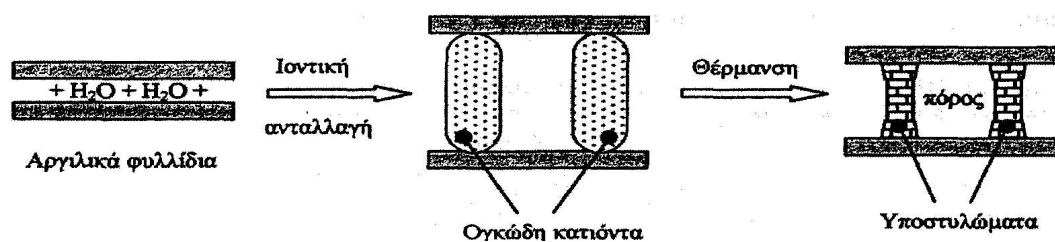
**Σχήμα 5.8.** Σχηματική αναπαράσταση της διόγκωσης ενός φυλλόμορφου αργίλου. Σχηματισμός μιας, δύο ή περισσότερων σφαιρών εφυδάτωσης γύρω από το αντισταθμιστικό κατιόν.

Αποτέλεσμα της διόγκωσης και αποφυλλοποίησης του αργίλου είναι η έκθεση των ενδοστρωματικών κατιόντων στο μέσο διασποράς και η διευκόλυνση των αντιδράσεων ιοανταλλαγής.

#### 5.4.5 Υποστυλωμένοι άργιλοι

Οι περισσότερες χρήσεις των αργίλων στηρίζονται στην ενυδάτωση και τη διόγκωση τους. Η αντιστρεψιμότητα όμως του φαινομένου της διόγκωσης περιορίζει τις εφαρμογές τους. Δηλαδή, η αφυδάτωση των αργίλων σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί απομάκρυνση του ενδοστρωματικού ύδατος και οδηγεί σε κατακρήμνιση των φύλλων και περιορισμό του διαθέσιμου ενδοστρωματικού χώρου. Για την αποφυγή της κατάρρευσης αναπτύχθηκαν ογκώδη κατιόντα τα οποία δρουν ως υποστυλωτές και κρατούν τα αργιλοπυριτικά φύλλα σε απόσταση.

Η διαδικασία παρασκευής υποστυλωτών περιλαμβάνει κατιοανταλλαγή των αντισταθμιστικών κατιόντων και ένθεση του υποστυλωτή, ο οποίος είναι συνήθως ένα ολιγοπυρηνικό μεταλλικό κατιόν. Το υλικό θερμαίνεται σε μεγάλη θερμοκρασία με απώτερο σκοπό τη δημιουργία οξειδίων των μετάλλων και τη σύνδεσή τους με τα αργιλοπυριτικά φύλλα. Στο Σχήμα 5.9 παρουσιάζεται η διαδικασία σύνθεσης των υποστυλωμένων αργίλων. Οι υποστυλωμένοι άργιλοι που δημιουργούνται με αυτό τον τρόπο διατηρούν μόνιμα διαθέσιμο τον ενδοστρωματικό τους χώρο. Το μέγεθος των πόρων προσδιορίζεται από το μέγεθος των υποστυλωτών και την απόσταση μεταξύ τους στον ενδοστρωματικό χώρο.

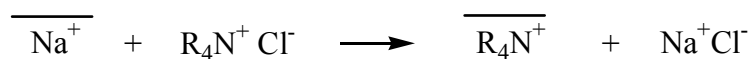


Σχήμα 5.9. Απεικόνιση της διεργασίας υποστυλώσεως.

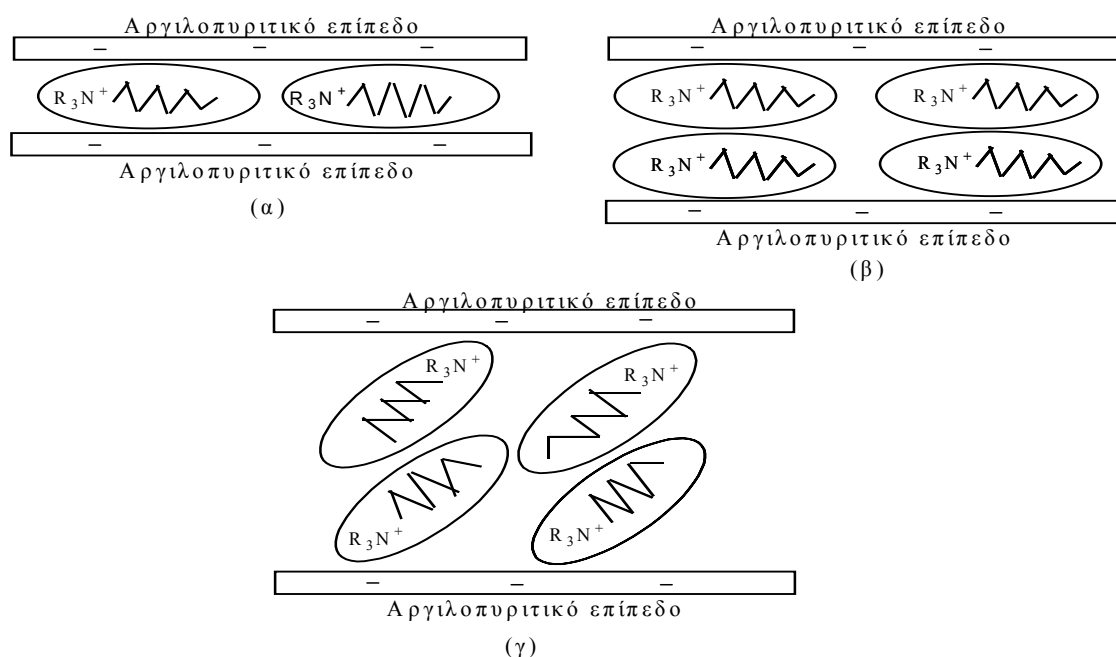
#### 5.4.6 Είδη υποστυλωτών

Ως υποστυλωτές χρησιμοποιούνται οργανικά μόρια [Barrer, 1989], πολυμερή [Giannelis, 1996], οργανομεταλλικοί κίονες [Endo *et al.*, 1980], χημικά σύμπλοκα [Figueras, 1988], οξείδια μετάλλων [Mishra and Parida, 1997], μεταλλικά συσσωματώματα, [Christiano

*et al.*, 1985] πολυοξοκατιόντα [Yamanaka *et al.*, 1987] καθώς και μικτά είδη υποστύλωσης. Η κυριότερη κατηγορία είναι τα οργανικά μόρια. Τα οργανικά μόρια που χρησιμοποιούνται κυρίως για υποστύλωση είναι ιόντα αλκυλαμμωνίου με διάφορα μήκη αλυσίδας [Kwolek *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Yilmaz and Yapar, 2004; Lee and Lee, 2004; de Paiva *et al.*, 2008]. Η προσρόφηση τετραλκυλαμμωνίων με ευθείες ανθρακικές αλυσίδες τροποποιεί την επιφάνεια των φύλλων των αργίλων από υδρόφιλη σε οργανόφιλη. Η τροποποίηση πραγματοποιείται με ανταλλαγή των αντισταθμιστικών κατιόντων (π.χ.  $\text{Na}^+$ ) με τα θετικά φορτισμένα μόρια των τετραλκυλαμμωνίων σε υδατικό αιώρημα:



Η θετικά φορτισμένη αμινομάδα προσκολλάται στις αρνητικές θέσεις των τετραεδρικών φύλλων του αργίλου απωθώντας τα μόρια του ενδοστρωματικού νερού. Η διευθέτηση των οργανικών κατιόντων των τετραλκυλαμμωνίων στον ενδοστρωματικό χώρο εξαρτάται από το μέγεθος των ανθρακικών αλυσίδων και την πυκνότητα φορτίου των φύλλων του αργίλου. Διακρίνονται λοιπόν τρεις περιπτώσεις διευθέτησης των ανθρακικών αλυσίδων στον ενδοστρωματικό χώρο. Όταν το τετραλκυλαμμωνιακό κατιόν έχει μέγεθος μικρότερο από την απόσταση μεταξύ δύο γειτονικών αρνητικών φορτίων στο τετραεδρικό φύλλο, τότε δημιουργείται ένα στρώμα (Σχήμα 5.10α).



**Σχήμα 5.10.** Τρεις περιπτώσεις διευθέτησης κατιόντων τετραλκυλαμμωνίου στον ενδοστρωματικό χώρο του αργίλου: (α) σχηματισμός μονοστρώματος, (β) σχηματισμός διπλού στρώματος, (γ) η ανθρακική αλυσίδα σχηματίζει γωνία με τα αργιλοπυριτικά επίπεδα.

Στην περίπτωση που το μέγεθος των ανθρακικών αλυσίδων ή της μίας αλυσίδας αυξάνει και γίνεται μεγαλύτερο της απόστασης δύο αρνητικών φορτίων, δεν αρκεί μία μόνο θέση προσρόφησης για την εξουδετέρωση του αρνητικού φορτίου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό δύο μοριακών στρωμάτων στον ενδοστρωματικό χώρο (Σχήμα 5.10β). Τέλος όταν ο φυλλόμορφος άργιλος έχει μεγάλη πυκνότητα φορτίου ή οι ανθρακικές αλυσίδες των τετρακυλαμμωνίων είναι πολύ μεγάλες ( $> C_{10}$ ), τότε αυτές διευθετούνται υπό γωνία ή είναι κάθετες στα φύλλα του αργίλου (Σχήμα 5.10γ). Η τροποποίηση της επιφάνειας του αργίλου σε οργανόφιλη επιτρέπει τη διασπορά των φυλλιδίων του αργίλου σε οργανικούς διαλύτες και μεταβάλλει επίσης τις προσροφητικές ιδιότητές του.

#### 5.4.7 Ακίνητοποίηση ενζύμων σε φυλλόμορφους αργίλλους

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 5.1, τα μειονεκτήματα που πηγάζουν από την ελεύθερη χρήση του ενζύμου μπορούν να αντιμετωπιστούν με την ακίνητοποίηση του σε κατάλληλο φορέα [Cao, 2005; Bornscheuer, 2003; Adamczak and Krishna, 2004; Krajewaska, 2004; Sheldon, 2007]. Σήμερα το ενδιαφέρον στα νανοϋλικά και στα νανοδομημένα υλικά ως φορείς για την ακίνητοποίηση των ενζύμων έχει αυξηθεί [Jia H., *et al.*, 2002; Drechsler *et al.*, 2004; Serefoglou *et al.*, 2008] δεδομένου ότι τα νανοϋλικά μπορούν να βελτιώσουν την ικανότητα των ακίνητοποιημένων ενζύμων, μειώνοντας τους περιορισμούς διάχυσης και αυξάνοντας την επιφάνεια ανά μονάδα μάζας [Kim J., *et al.*, 2006].

Οι άργιλοι οφείλουν την ευρεία εφαρμογή τους εξαιτίας των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, όπως είναι η διόγκωση, η κατιονανταλλακτική ικανότητα (Cation Exchange Capacity ή CEC) (όπως αναφέρεται στις παραγράφους 5.3.5 και 5.3.6) και η μηχανική και θερμική τους σταθερότητα [Gournis *et al.*, 2006]. Επιπλέον κάποιοι άργιλοι περιέχουν Fe, Na ή και άλλα μεταλλικά στοιχεία τα οποία του προσδίδουν φορτίο ή μαγνητικές ιδιότητες, επεκτείνοντας το πεδίο εφαρμογής τους [Lewkowitz-Shpuntoff *et al.*, 2009]. Γενικά οι άργιλοι σήμερα χρησιμοποιούνται σε ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών όπως στην ηλεκτρονική, στην ενίσχυση δομικών υλικών, ως ενισχυτές ιξώδους σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, και στον έλεγχο διαπερατότητας βιοιατρικών πλαστικών [Chen and Yoon, 2005; Loizou *et al.*, 2005]. Επίσης έχει αναφερθεί η χρήση τους και στον τομέα της ιατρικής ως φορείς για την μεταφορά γονιδίων [Lin *et al.*, 2006] και αντικαρκινικών φαρμάκων [Dong and Feng, 2005]. Τα τελευταία 25 χρόνια διάφορες ερευνητικές ομάδες

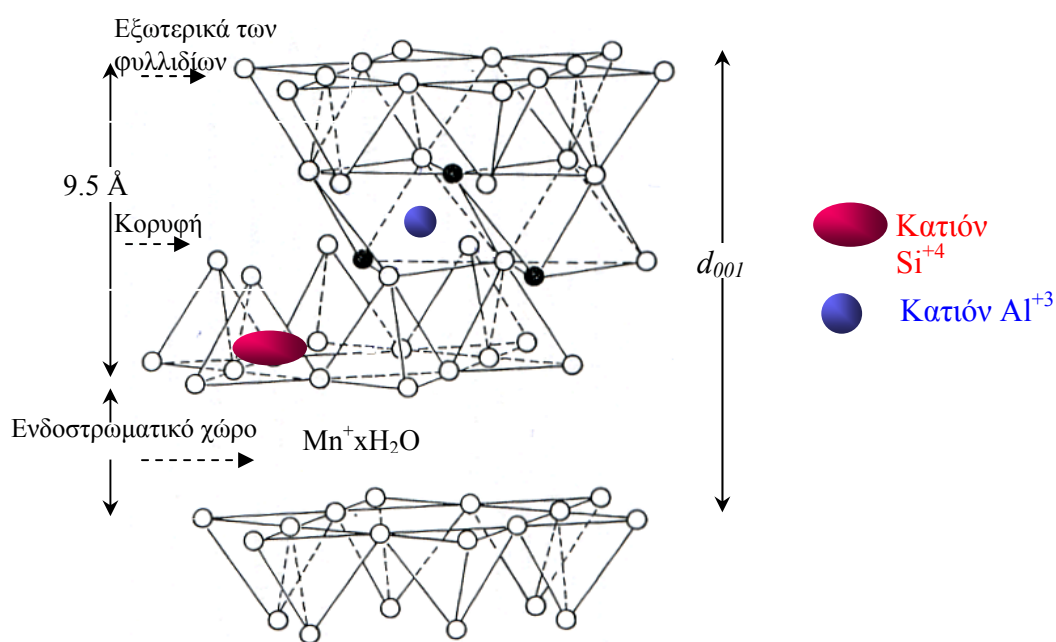
έχουν μελετήσει την ακινητοποίηση βιομορίων σε αργίλους [de Fuentes *et al.*, 2001; Serefoglou *et al.*, 2008; Gopinath and Suguan, 2007; Sanjay and Suguan, 2007; Secundo *et al.*, 2008]. Η ακινητοποίηση των βιομορίων γίνεται με τη μέθοδο της προσρόφησης (η οποία αναφέρεται στην παράγραφο 5.2.2). Τα βιομόρια μπορεί να είναι ένζυμα, πρωτεΐνες [De Cristofaro and Violante, 2001], κύτταρα [Massalha *et al.*, 2007; Jezequel and Lebeau, 2008; Akar *et al.*, 2009; Chen X.C., *et al.*, 2009]. Στον Πίνακα 5.7 παρουσιάζονται τα ένζυμα και οι αργίλοι που έχουν χρησιμοποιηθεί την τελευταία εξαετία.

**Πίνακας 5.7.** Ενδεικτικά παραδείγματα ακινητοποίησης ενζύμων σε διάφορους αργίλους.

| Αργίλος                               | Ένζυμο                                                                                 | Εφαρμογή                                   | Βιβλιογραφική αναφορά                  |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
| ▪ Μίγμα χιτοζάνης-λαπονίτη            | Γλυκόζη οξειδάση                                                                       | Βιοαισθητήρες ανίχνευσης γλυκόζης          | Shi <i>et al.</i> , 2008               |
| ▪ Μοντμοριλλονίτης                    | Γλυκοαμυλάση                                                                           | δ.α                                        | Gopinath and Suguan, 2007              |
| ▪ Αλλογενής άργιλος                   | Οξική φωσφατάση                                                                        | Υδρόλυση οργανικών υποστρωμάτων στο έδαφος | López and Rosas , 2008                 |
| ▪ Καολινίτης                          | Λακκάση απο <i>Trametes versicolor</i>                                                 | Οξειδωση ανθρακένιου                       | Dodor <i>et al.</i> , 2004             |
| ▪ Ασβεστώδης άργιλος                  | Λακκάση απο <i>Trametes versicolor</i>                                                 | Βιοαποικοδόμηση ατραζίνης                  | Bastos and Magan, 2009                 |
| ▪ Τροποποιημένος μπετονίτης           | Λιπάση από <i>Candida rugosa</i>                                                       | δ.α                                        | Ghiaci <i>et al.</i> , 2009            |
| ▪ Οργανοτροποποιημένοι άργιλοι        | Γλυκόζη οξειδάση από <i>Aspergillus Niger</i> και πολυφαινολική οξειδάση από μανιτάρια | Ηλεκτρόδια                                 | Kemmege Mbougouen <i>et al.</i> , 2006 |
| ▪ Καολινίτης και μπετονίτης           | Ένζυμο απο <i>Xanthomonas citri</i> (IFO 3835)                                         | Συνθεση αντιβιοτικού (Cephalexin)          | Choi <i>et al.</i> , 2004              |
| ▪ Λαπονίτης                           | Πολυφαινολική οξειδάση                                                                 | Αμπερομετρικός βιοαισθητήρας               | Shan <i>et al.</i> , 2003              |
| ▪ Λαπονίτης                           | Ουρεάση                                                                                | βιοαισθητήρες                              | de Melo, 2002                          |
| ▪ Ανιονικοί άργιλοι                   | Γλυκόζη οξειδάση                                                                       | Βιοαισθητήρες ανίχνευσης γλυκόζης          | Shan <i>et al.</i> , 2006              |
| ▪ Μοντμοριλλονίτης και καολινίτης     | Κυτταρινάση                                                                            | δ.α                                        | Pflug, 2007                            |
| ▪ Μοντμοριλλονίτης                    | Οξική φωσφατάση                                                                        | δ.α                                        | Leprince and Quiquampoix, 2005         |
| ▪ Μίγμα πολυμερους με μοντμοριλλονίτη | α-χυμοθρυψίνη καταλάση                                                                 | δ.α                                        | Chen G.-J., <i>et al.</i> , 2008       |

δ.α: δεν αναφέρεται εφαρμογή

Εξαιτίας της μεγάλης συγγένειας των διευρυμένων φυλλιδίων των αργίλων για την προσρόφηση πρωτεϊνών, η ακινητοποίηση ενζύμων σε αργίλους μελετήθηκε έντονα κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Η ακινητοποίηση του ενζύμου περιλαμβάνει την ένθεση του πρωτεϊνικού μορίου σε τρεις πιθανές θέσεις: α) εξωτερικά του αργίλου, β) στις κορυφές των φυλλιδίων και γ) στον ενδοστρωματικό χώρο του φυλλόμορφου αργίλου [De Cristofaro and Violante, 2001; Secundo *et al.*, 2008]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η προσρόφηση λαμβάνει χώρα στην εξωτερική επιφάνεια των αργίλων, ενώ σε μερικές περιπτώσεις όπως στην ακινητοποίηση της αλβουμίνης [De Cristofaro and Violante, 2001], της οξειδάσης της γλυκόζης [Garwood *et al.*, 1983] και της ασπαρτάσης [Naidja and Huang, 1996] έχει παρατηρηθεί μερική ένθεση του πρωτεϊνικού μορίου στον ενδοστρωματικό χώρο. Στο Σχήμα 5.11 απεικονίζονται οι πιθανοί χώροι πρόσδεσης του πρωτεϊνικού μορίου κατά την προσρόφηση του σε άργιλο.



**Σχήμα 5.11.** Ιδανική δομή αργίλου. (Ο) άτομο οξυγόνου, (●) ομάδα υδροξυλίου. Το πυρίτιο και μερικές φορές το αργίλιο καταλαμβάνουν τις θέσεις στο τετραεδρικό πλέγμα. Το Al, Mg, Fe, Li καταλαμβάνουν τις θέσεις στο οκταεδρικό πλέγμα. Το  $Mn^{2+} \cdot xH_2O$  αντιπροσωπεύει τα αντισταθμιστικά εφυδατωμένα κατιόντα στον ενδοστρωματικό χώρο. Με διακεκομμένα βέλη προσδιορίζονται οι πιθανές θέσεις ακινητοποίησης του ενζύμου: α) εξωτερικά του αργίλου, β) στις κορυφές των φυλλιδίων και γ) στον ενδοστρωματικό χώρο του ορυκτού.

Το πρωτεϊνικό μόριο συγκρατείται στον άργιλο μέσω δυνάμεων van der Waals, δεσμών υδρογόνου καθώς επίσης και με υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλοεπιδράσεις μεταξύ του αργίλου και των αμινοξέων της επιφάνειας της πρωτεΐνης [de Fuentes *et al.*, 2001; Secundo *et al.*, 2008; Serefoglou *et al.*, 2008]. Η προσρόφηση των ενζύμων στους αργίλους εξαρτάται από: α) την τιμή του pH και της θερμοκρασίας ακινητοποίησης, β) την κατιοανταλλακτική ικανότητα των αργίλων, και γ) την τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου και του μεγέθους του ενζύμου [Serefoglou *et al.*, 2008; Secundo *et al.*, 2008]. Γενικά η μέγιστη προσρόφηση του πρωτεϊνικού μορίου στον άργιλο λαμβάνει χώρα στο ισοηλεκτρικό σημείο (i.e.p. ή pI) των πρωτεϊνών (χαρακτηριστική τιμή pH στην οποία το μόριό του είναι ηλεκτρικά ουδέτερο). Σε τιμές κάτω από το ισοηλεκτρικό σημείο η θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη έλκεται από τον αρνητικά φορτισμένο άργιλο. Λόγω όμως των ηλεκτροστατικών αλληλοεπιδράσεων η πρωτεΐνη ξεδιπλώνεται στην επιφάνεια του αργίλου με αποτέλεσμα το φαινόμενο αυτό να αναστέλλει την ενζυμική δράση. Σε τιμές κοντά στο ισοηλεκτρικό σημείο η πρωτεΐνη προσροφάται από τον άργιλο με τις λιγότερο δυνατόν μεταβολές στην δομή του ενζυμικού μορίου, διατηρώντας έτσι τις καταλυτικές του ιδιότητες. Τέλος σε τιμές πάνω από το ισοηλεκτρικό σημείο (i.e.p. ή pI) η αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη απωθείται από τον αρνητικά φορτισμένο άργιλο με αποτέλεσμα το ποσοστό του προσροφημένου ενζύμου να είναι αρκετά χαμηλό [Quiquampoix *et al.*, 1993].

Τα τελευταία χρόνια επιχειρήθηκε η ακινητοποίηση ενζύμων σε τροποποιημένους αργίλους. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 5.3.8 οι ιδιότητες των αργίλων μπορούν να τροποποιηθούν με απλές χημικές μεθόδους όπως με ενεργοποίηση με οξέα, με ένθεση οργανικών ή ανόργανων μορίων, με διλειτουργικά μόρια όπως π.χ. γλουταρδεϋδη ενώ η υδροφοβικότητα τους μπορεί να αυξηθεί με ένθεση κάποιου οργανικού επιφανειοενεργού [Litina *et al.*, 2006]. Πιο συγκεκριμένα διάφορα μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί για την οργανοτροποποίηση των αργίλων [Prado *et al.*, 2005], όπως ακυλοαμμωνικά άλατα [Lee *et al.*, 2005; Hedley *et al.*, 2007; Vazquez *et al.*, 2008] και αμίνες [Yeh *et al.*, 2005]. Η ένθεση του οργανικού μορίου που γίνεται βάση της κατιοανταλλακτικής ικανότητας του αργίλου [Vazquez *et al.*, 2008] έχει ως αποτέλεσμα την διεύρυνση του ενδοστρωματικού χώρου του αργίλου και την μείωση της επιφανειακής ενέργειας του αργίλου καθιστώντας το συγγενές προς τους οργανικούς διαλύτες [Litina *et al.*, 2006].

Γενικά μελέτες πάνω στην αλληλοεπίδραση των αργίλων με οργανικά μόρια ξεκίνησαν στις αρχές του εικοστού αιώνα. Η ακινητοποίηση όμως ενζύμων σε οργανικά τροποποιημένους αργίλους είναι ακόμη σε πρώιμο στάδιο [Maria Chong and Zhao, 2004;

Hernando *et al.*, 2007; Nijdam *et al.*, 2007]. Μέχρι στιγμής υπάρχουν πολύ λίγες αναφορές σχετικά με την συνδυασμένη δράση οργανοφίλων αργίλων και ενζύμων με αποτέλεσμα η μελέτη των οργανοτροποποιημένων αργίλων ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων να είναι ένα μεγάλο πεδίο με τεράστιες δυνατότητες για περαιτέρω έρευνα.

Οι οργανικά τροποποιημένοι άργιλοι εξαιτίας των ιδιοτήτων τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα μεγάλο εύρος αναλυτικών και βιολογικών εφαρμογών [Lin *et al.*, 2006; Kemmegne Mbougouen *et al.*, 2006]. Επίσης είναι από τα πιο κυρίαρχα εμπορικά διαθέσιμα νανοϋλικά για την σύνθεση νανοςύνθετων πολυμερών σε αναλογία έως και 70% της τελικής μάζας [Markarian, 2005]. Οι πρακτικές εφαρμογές των προσροφημένων ενζύμων σε τροποποιημένους ή μη αργίλους φαίνονται στον Πίνακα 5.8.

**Πίνακας 5.8.** Ενδεικτικές εφαρμογές ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε αργίλους.

| Εφαρμογή                             | Βιβλιογραφική Αναφορά                                                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| Τεχνολογία τροφίμων                  | Spagna <i>et al.</i> , 1995                                                               |
| Σύνθεση πεπτιδίων                    | Ye <i>et al.</i> , 2000; Xing <i>et al.</i> , 2000                                        |
| Σύνθεση λιπιδίων                     | Lee and Akoh, 1998                                                                        |
| Φαρμακευτικά σκευάσματα              | Choi <i>et al.</i> , 2004                                                                 |
| Βιοαισθητήρες                        | Shi <i>et al.</i> , 2008; Shan <i>et al.</i> , 2003, 2006; de Melo <i>et al.</i> , 2002   |
| Βιοκαταλυτικές αντιδράσεις           | Dodor <i>et al.</i> , 2004; Secundo <i>et al.</i> , 2008; Serefoglou <i>et al.</i> , 2008 |
| Κατασκευή τροποποιημένων ηλεκτροδίων | Kemmengne Mbougouen <i>et al.</i> , 2006; Lojou and Bianco, 2006                          |
| Βιοαποκατάσταση εδάφους              | Quiquampoix and Mousain, 2005; López and Rosas, 2008; Bastos and Magan, 2009              |

Κατά την προσρόφιση των πρωτεϊνικών μορίων σε αργίλους είναι δυνατόν να αλλάξει η τριτοταγής δομή του ενζύμου σε σχέση με αυτή που έχει όταν βρίσκεται σε διαλύτη μορφή [Servagent-Noinville *et al.*, 2000; Noinville *et al.*, 2004; Quiquampoix and Burns, 2007; Serefoglou *et al.*, 2008]. Διαπιστώθηκε ότι η διαμόρφωση της δομής της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης σε άργιλο αλλάζει σε σύγκριση με αυτή που έχει σε ελεύθερη μορφή [Baron *et al.*, 1999; Servagent-Noinville *et al.*, 2000; Quiquampoix *et al.*, 2002; Serefoglou *et al.*, 2008].

## 5.5 Πηκτώματα Μικρογαλακτωμάτων

Με τον όρο πηκτώματα ή γέλες χαρακτηρίζονται τα στερεά ή ημιστερεά συστήματα που αποτελούνται από δυο τουλάχιστον συστατικά. Η μάζα τους είναι συμπυκνωμένη και αποτελείται από υγρό ενώ στο εσωτερικό τους μπορούν να εισέλθουν άλλα μόρια οργανικών ενώσεων ή και διαλυτών [Stamatis and Xenakis, 1999a]. Εάν το υγρό είναι νερό ονομάζονται υδρογέλες ή υδροπηκτώματα [Lee F., *et al.*, 2009], ενώ αν είναι έλαιο ονομάζονται οργανοπηκτώματα ή οργανογέλες. Στο Σχήμα 5.12 απεικονίζεται ο εγκλωβισμός του βιοκαταλύτη σε πολυμερές.



**Σχήμα 5.12.** Σχηματική απόδοση ακινητοποίησης βιοκαταλύτη με εγκλωβισμό του σε πολυμερές. Ο βιοκαταλύτης παριστάνεται με σφαιρίδια.

Έτσι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες είναι δυνατό ένα διάλυμα αντίστροφων μικκυλίων να μετατραπεί σε μία στερεή, οπτικά διαφανή γέλη με μεγάλο ιξώδες. Η παραγωγή τέτοιων οπτικά διαφανών γελών δημοσιεύτηκε πρώτα το 1986 [Haering and Luisi, 1986; Quellet and Eicke, 1986] χρησιμοποιώντας ως επιφανειοενεργό AOT ή λεκιθίνη. Αυτές οι γέλες χρησιμοποιούνται για την παγίδευση βιοπολυμερών, όπως πρωτεΐνες και ένζυμα, τα οποία διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα [Rees *et al.*, 1991; Jenta *et al.*, 1997; Delimitsou *et al.*, 2002; Zoumpantioti *et al.*, 2006b, 2008]. Οι οργανογέλες σε σχέση με τα συμβατικά μικρογαλακτώματα παρέχουν εύκολη επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου και εύκολο διαχωρισμό των προϊόντων [Delimitsou *et al.*, 2002]. Στον Πίνακα 5.9 παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα λιπασών που έχουν ακινητοποιηθεί σε γέλες.

**Πίνακας 5.9.** Ενδεικτικά παραδείγματα λιπασών ακινητοποιημένες σε γέλες.

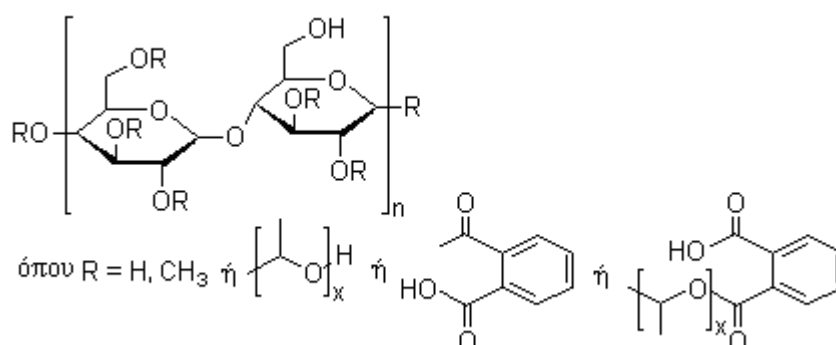
| Πηγή λιπάσης                                         | Επιφανειοενεργό        | Οργανικός φορέας                                | Βιβλιογραφική Αναφορά            |
|------------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Trichosporon capitatum</i>                        | AOT                    | ζελατίνη                                        | Song <i>et al.</i> , 2008        |
| <i>Rhizomucor miehei</i>                             | AOT ή λεκιθίνη         | υδροξυπροπυλμεθυλο<br>κυτταρίνη και<br>αγαρόζη  | Zoumpanioti <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Candida rugosa</i>                                | AOT                    | ζελατίνη                                        | Dandavate and Madamwar, 2008     |
| <i>Candida rugosa</i>                                | Triton X-100           | ζελατίνη                                        | Dave and Madamwar, 2008          |
| <i>Candida rugosa</i>                                | CTAB                   | ζελατίνη                                        | Nagayama <i>et al.</i> , 2008    |
| <i>Candida rugosa</i>                                | AOT, CTAB,<br>Tween 80 | ζελατίνη                                        | Dandavate and Madamwar, 2007     |
| <i>Candida rugosa</i>                                | Λεκιθίνη               | ζελατίνη                                        | Nagayama <i>et al.</i> , 2006    |
| <i>Candida antarctica</i> και<br><i>Mucor miehei</i> | AOT ή λεκιθίνη         | υδροξυπροπυλμεθυλο<br>κυτταρίνη και<br>ζελατίνη | Blattner <i>et al.</i> , 2006    |
| <i>Candida rugosa</i>                                | AOT ή λεκιθίνη         | υδροξυπροπυλμεθυλο<br>κυτταρίνη και<br>ζελατίνη | Domínguez de María, 2004         |

Το μεγαλύτερο ποσοστό των δημοσιεύσεων αναφέρονται σε ακινητοποίηση λιπάσης. Πιο συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι οι λιπάσες που ακινητοποιούνται σε τέτοια πηκτώματα, μπορούν να διατηρήσουν την καταλυτική τους δραστηριότητα και σταθερότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα [Stamatis and Xenakis, 1999a; Pastou *et al.*, 2000; Delimitsou *et al.*, 2002; Zoumpanioti *et al.*, 2006b, 2008]. Η υψηλή καταλυτική δραστηριότητα και σταθερότητα του ενζύμου στις οργανογέλες πιστεύεται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι το μέσο της ακινητοποίησης σταθεροποιεί την δομή του ενζύμου και του επιτρέπει να βρίσκεται σε διασπορά.

Διάφορα οργανικά υλικά όπως ζελατίνη, αγαρόζη, κ-καρραγενάνη, κυτταρίνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή οργανογελών [Stamatis and Xenakis, 1999a; Pastou *et al.*, 2000; Delimitou *et al.*, 2002; Blattner *et al.*, 2006]. Οι περισσότεροι οργανικοί φορείς δεν είναι τοξικοί, είναι βιοσυμβατοί, βιοαποικοδομίσιμοι και για αυτόν τον λόγο μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και στην βιομηχανία τροφίμων, αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία [Zoumpanioti *et al.*, 2004; Kumar and Katare, 2005]. Επίσης για την παρασκευή των

οργανογελών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα επιφανειοενεργά μόρια. Συνήθως η σύνθεση τους γίνεται κυρίως με ανιονικά μόρια [Song *et al.*, 2008; Dandavate and Madamwar, 2008], ενώ σε λίγες περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί η χρήση κατιονικών [Lopez *et al.*, 2004] και μη ιοντικών επιφανειοενεργών [Kantaria *et al.*, 1999; Murdan *et al.*, 1999; Dave and Madamwar, 2008].

Το βιοπολυμερές που χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την παρασκευή οργανοπηκτωμάτων είναι η κυτταρίνη και τα παράγωγα της [Domínguez de María, 2004; Blattner *et al.*, 2006 Zoumpanioti *et al.*, 2008]. Η κυτταρίνη ((C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)<sub>n</sub>), είναι ένας γραμμικός (ινώδης) πολυσακχαρίτης, που αποτελείται από 8-15x10<sup>3</sup> μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα μεταξύ τους με (1→4)-β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα παράγωγα της κυτταρίνης όταν διαλυθούν στο νερό διογκώνονται δίνοντας ένα διάλυμα υψηλού ιξώδους, δημιουργώντας υλικά με διαφορετικό πορώδες. Η υδροξυπροπυλμεθυλο κυτταρίνη (hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία διαλύεται τόσο στο νερό όσο και σε οργανικούς διαλύτες. Στο Σχήμα 5.13 παρουσιάζεται ο μοριακός τύπος της υδροξυπροπυλμεθυλο κυτταρίνης.



**Σχήμα 5.13.** Μοριακός τύπος της υδροξυπροπυλμεθυλο κυτταρίνης.

Χρησιμοποιείται ως παράγοντας ελέγχου του ιξώδους, παράγοντας πηκτωματοποίησης και γαλακτωματοποίησης, ως σταθεροποιητής κλπ. ενώ εφαρμογές της έχουν αναφερθεί σε φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα κλπ [Chambin *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2006; Rosell and Foegeding, 2007; Rosell *et al.*, 2009].

*Πειραματικό  
Μέρος*



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

### 6.1 Υλικά

#### 6.1.1 Ένζυμα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ένζυμα:

- Χλωροϋπεροξειδάση (EC 1.11.1.10) από το θαλάσσιο μύκητα *Caldariomyces fumago* από την εταιρεία Fluka (USA). Το ενζυμικό παρασκεύασμα περιέχει 22437units/ml και 24mg/ml πρωτεΐνη. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία καταλύει την μετατροπή 1.0  $\mu$ mole μονοχλωροδιμεδόνης σε διχλωροδιμεδόνη σε ένα λεπτό, σε pH 2.75 στους 25°C παρουσία KCl και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Λακκάση (EC 1.10.3.2) από τον μύκητα *Trametes versicolor* ήταν της εταιρείας Fluka (Germany). Το ενζυμικό διάλυμα περιέχει 23.1 units/mg και φυλάσσεται στους -18°C. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία απαιτείται για την οξείδωση 1  $\mu$ M ABTS το λεπτό.
- Λακκάση από τον μύκητα *Trametes hirsuta*. Το ενζυμικό διάλυμα έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.277 mg/ml και ενεργότητα 6 units/ml. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία απαιτείται για την οξείδωση 1  $\mu$ M ABTS το λεπτό.
- Λακκάση από τον μύκητα *Botrytis cinerea*. Το ενζυμικό διάλυμα έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.02481 mg/ml και ενεργότητα 2.5 units/ml. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία απαιτείται για την οξείδωση 1  $\mu$ M ABTS το λεπτό.
- $\beta$ -γλυκοσιδάση από αμύγδαλα από την εταιρεία Sigma (Germany). Το ενζυμικό παρασκεύασμα έχει 5.2 units/mg. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία απελευθερώνει 1  $\mu$ mole *p*-νιτροφαινόλης από το *p*-νιτροφαινυλ-γλυκοπυρανοζίδιο (pNPG) ανά λεπτό.
- Λιπάση από *Candida antarctica* (Lipozyme CaLB, Nonozyme Lono 2100, Germany). Το ενζυμικό παρασκεύασμα έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 25 mg/ml.
- Λιπάση από *Candida antarctica* από την εταιρεία Fluka (USA). Το λυοφιλιωμένο ενζυμικό παρασκεύασμα έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 120 mg/g και ενεργότητα 10.8 units/mg. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, η οποία ελευθερώνει 10<sup>-9</sup>

mole *p*-νιτροφαινόλης το λεπτό σε pH 7.2 στους 37°C χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα pNPB (παρα-νιτροφαινολικός εστέρας του βουτυρικού οξέος).

- Ακίνητοποιημένη λιπάση από *Candida antarctica* (Novozym 435<sup>®</sup>), από την εταιρεία NOVO industries. Το ένζυμο είναι ακίνητοποιημένο σε μακροπορώδη ανιονική ρητίνη, έχει συγκέντρωση πρωτεΐνης 100mg/g και ειδική ενεργότητα 7units/mg. 1 Units αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου, που χρειάζεται για τη σύνθεση 1μmol λαυρικού προπυλεστέρα ανά λεπτό στους 60°C.

## 6.1.2 Αντιδραστήρια

### 6.1.2.1 Υποστρώματα

Τα τερπένια:  $\alpha$ -πινένιο,  $\beta$ -μυρκένιο, νερόλη, γερανιόλη, λιναλοόλη, 1,2-εποξείδιο του (*R*)-(+)-λιμονένιου, βερμπενόνη και βερμπενόλη ήταν της εταιρείας Fluka. Το *d*-λιμονένιο, το εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, η περιλλύλ αλκοόλη, η περιλλ-αλδεΐδη και η κιτράλη ήταν από την Adrich. Το μαστιχέλαιο ήταν από την Ένωση Μαστιχοπαραγωγών Χίου.

Η μονοχλωροδιμεδόνη ήταν από την εταιρεία Sigma, ενώ το στυρένιο ήταν προϊόν της εταιρείας Merck. Το 1-μεθυλ-κυκλοεξένιο, το HBT (υδροξυβενζοτρίαζόλη), το ABTS (2,2-δισ αζινο- (3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ) ήταν από την εταιρεία Fluka, ενώ το *cis*-2-επτένιο, το TEMPO (ρίζα του *N*-οξειδίου της 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνης) και η συρινγκαλνταζίνη (SYR-syringaldazine) ήταν από την Aldrich (Germany).

Ο βινυλεστέρας του βουτυρικού οξέος ήταν προϊόν της εταιρείας Fluka, ενώ όλα τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν (οκτανοϊκό, δωδεκανοϊκό) ήταν από την εταιρία Sigma και ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (το ποσοστό δίνεται ως % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε νερό κ.β.) ήταν της εταιρείας Fluka. Το τριτοταγές βουτυλουπεροξείδιο του υδρογόνου (*t*-BHP) είτε ως διάλυμα σε δεκάνιο (5.0-6.0 mM, *t*-BHP<sub>d</sub>) είτε ως υδατικό διάλυμα (70% v/v) και το σύμπλοκο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ουρία (UHP: Urea Hydrogen Peroxide) ήταν προϊόντα της Aldrich.

### 6.1.2.2 Επιφανειοενεργές ουσίες

Το ανιοντικό επιφανειοενεργό δις-(2-αιθυλεξυλο) σουλφοηλεκτρικό νάτριο (AOT), ήταν της εταιρίας Sigma, ενώ το βρωμιούχο οκταδέκυλο τριμεθυλαμμώνιο  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}]$  ήταν της εταιρίας Merck.

### 6.1.2.3 Φορείς ακινητοποίησης

#### α) Άργιλοι

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί άργιλοι καθώς και τα αντίστοιχα οργανοτροποποιημένα παράγωγά τους (τα οποία παρασκευάζονται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.2.3.2). Οι άργιλοι αυτοί είναι: α) ο ελληνικής προέλευσης SWy-2. (μοντοριλλονίτης), β) ο κουνίτια (διοκταεδρικός μοντοριλλονίτης) με εμπορικό όνομα Kunipia και γ) ο λαπονίτης (συνθετικός τριοκταεδρικός σμεκτίτης από το είδος του εκτορίτη) από την Laporte Industries Ltd με εμπορικό όνομα Laponite. Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά των υπό μελέτη αργίλων.

**Πίνακας 6.1.** Χαρακτηριστικά αργίλων [Gournis *et al.*, 2006].

| Αργίλος | Μέγεθος<br>σωματιδίων<br>(nm) | CEC <sup>a</sup><br>(meq g <sup>-1</sup><br>αργίλου) | Πυκνότητα<br>φορτίου<br>(e <sup>-</sup> /μοναδιαία<br>κυψελίδα) <sup>b</sup> | Μοριακός Τύπος                                                                                                                                                        |
|---------|-------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LAP     | 20                            | 0.5                                                  | 0.5                                                                          | $\text{Na}_{0.56}[\text{Mg}_{5.4}\text{Li}_{0.4}]\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$                                                                               |
| KUN     | 200                           | 1.2                                                  | 0.9                                                                          | $\text{Na}_{0.87}[\text{Al}_{3.12}\text{Fe(III)}_{0.20}\text{Mg}_{0.61}\text{Ti}_{0.01}](\text{Si}_{7.90}\text{Al}_{0.10})\text{O}_{20}(\text{OH})_4$                 |
| SWy-2   | 200                           | 0.8                                                  | 0.6                                                                          | $\text{Na}_{0.62}[\text{Al}_{3.01}\text{Fe(III)}_{0.41}\text{Mg}_{0.54}\text{Mn}_{0.01}\text{Ti}_{0.02}](\text{Si}_{7.98}\text{Al}_{0.02})\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ |

<sup>a</sup> CEC: κατιοανταλλακτική ικανότητα

<sup>b</sup> Μοναδιαία κυψελίδα είναι η μονάδα  $\text{Si}_8\text{O}_{20}$

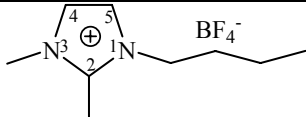
#### β) Κυτταρίνη

Ως παράγοντας πηκτωματοποίησης ήταν ένα παράγωγο της κυτταρίνης, η υδροξυ-προπυλομεθυλοκυτταρίνη (Hydroxy-Propyl-Methyl-Cellulose-HPMC) χαμηλού ιξώδους (υδατικό διάλυμα 2% στους 20°C παρουσιάζει ιξώδες 80-120cP).

#### 6.1.2.4 Οργανικοί διαλύτες

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες προέρχονταν από την Fluka, Sigma Aldrich, LAB SCAN και Panreac και ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι οργανικοί διαλύτες αφυδατώθηκαν πριν τη χρήση τους με τη χρήση μοριακών κόσκινων διαμέτρου 3 Å. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το ιοντικό υγρό 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο από την εταιρεία Fluka. Στον Πίνακα 6.2 παρουσιάζεται η δομή του προαναφερθέντος ιοντικού υγρού.

**Πίνακας 6.2.** Δομή και χαρακτηριστικά ιοντικού υγρού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.

| Όνομα                                           | Συντομογραφία            | Δομή                                                                               | Αναμιξιμότητα με<br>διαλύτες |        |
|-------------------------------------------------|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|--------|
|                                                 |                          |                                                                                    | H <sub>2</sub> O             | Εξάνιο |
| 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο | [bmim][BF <sub>4</sub> ] |  | Ναι                          | Όχι    |

#### 6.1.2.5 Άλλα υλικά και αντιδραστήρια

Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων (άλατα, οξέα και βάσεις) ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και προϊόντα των οίκων Riedel-deHaen, Sigma, Aldrich και Fluka. Τα υλικά ηλεκτροφόρησης ήταν προϊόντα της εταιρείας Biorad. Όλα τα άλλα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψίστου βαθμού καθαρότητας.

### 6.2 Όργανα

- Αέριος χρωματογράφος Shimadzu 17A εφοδιασμένος με β-DEX™ 120, στήλη (30m x 0.25mm x 0.25μm) της Supelco και ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο με σταθερό ρυθμό ροής 1.2 ml min<sup>-1</sup>. Ο χειρισμός του οργάνου και η ανάλυση των χρωματογραφημάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού CLASS-VP Chromatography Data System V.4.3
- UV-Visible φασματοφωτόμετρο της Shimadzu UV-1601. Ο χειρισμός του οργάνου και η ανάλυση των φασμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού CLASS-VP Chromatography Data System V.4.3

- Φασματοφωτόμετρα Elisa reader της Digital and Analog Systems (DAS) (Italy) και της Stat-fax 2100 (AWARENESS TECHNOLOGY ING).
- Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, HPLC. Για την ανάλυση χρησιμοποιείται η στήλη μBondapak C<sub>18</sub> της Waters (Ireland), με μέγεθος σωματιδίων 10 μm, διαστάσεις 3.9x300 mm, και ανιχνευτής UV/VIS photodiode array, SPD-M10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japan), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class-VP, V.6.1.
- Αέριος χρωματογράφος με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS). Ο αέριος χρωματογράφος Shimadzu 17A ήταν εφοδιασμένος με φασματογράφο μάζας QP 5000MS. β-DEX<sup>TM</sup> 120, στήλη ( 30m x 0.25mm x 0.25μm) της Supelco. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο (99.999%) με σταθερό ρυθμό ροής 1.0 ml min<sup>-1</sup>. Η θερμοκρασία συστήματος έγχυσης ήταν 205°C, η θερμοκρασία ανιχνευτή 270°C και η ενέργεια ιοντισμού 70eV.
- Φάσματα ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR). Η μελέτη έγινε με φασματόμετρο ER-200D Bruker (Rheinstetten Forchheim, Germany) εφοδιασμένο με κρυοστάτη Oxford ESR-9 και με μετρητή συχνότητας μικροκυμάτων Anritsu. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Επιστήμης Υλικών, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”.
- Περίθλαση ακτίνων-X. Η μελέτη των δειγμάτων με περίθλαση ακτίνων-X πραγματοποιήθηκε με περιθλασίμετρο D8 Advance Brüker. Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία CuK<sub>α</sub> (40kV, 40mA) και σύστημα μονοχρωματισμού περιθλώμενης δέσμης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Δίκτυο Εργαστηρίων, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS). Η μελέτη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με SSX-100 φωτοηλεκτρονικό φασματόμετρο εφοδιασμένο με σύστημα μονοχρωματισμού ακτίνων-X, Al K<sub>α</sub> (hν = 1486.6 eV). Η πίεση στο φασματόμετρο ήταν 10<sup>-10</sup> Torr και η ενέργεια ανάλυσης 1.16 eV. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Προηγμένων Υλικών, του Πανεπιστημίου του Γκρόνινγκεν στην Ολλανδία.
- Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC). Η μελέτη των δειγμάτων με διαφορική θερμιδομετρία σάρωση πραγματοποιήθηκε με την συσκευή DSC 131 της Setaram στο εργαστήριο Κεραμικών Υλικών, του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- Θερμική ανάλυση. Οι θερμοβαρυτομετρικές (TGA) και διαφορικές θερμικές (DTA) αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Perkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA στο εργαστήριο Κεραμικών Υλικών, του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

- Φάσματα υπερύθρου (IR): Τα φάσματα ελήφθησαν με το φασματοφωτόμετρο FT-IR 8400 (της εταιρίας SHIMADZU), το οποίο είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή τύπου DTGS. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Κεραμικών Υλικών, του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Οι εικόνες ελήφθησαν από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL HSM-5600V. Τα προς μελέτη δείγματα επικαλύφθηκαν με λεπτό υμένιο από αγωγίμο μέταλλο (Au), ώστε να αποφευχθούν τα προβλήματα φόρτισης στις εικόνες. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Δίκτυο Εργαστηρίων, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- pH-μετρο της WTW
- Επωαστήρας της GFL
- Συσκευή υπερδιήθησης και μεμβράνες PM-10 (Amicon)

### **6.3 Μέθοδοι**

#### **6.3.1 Παραγωγή λακασσών από τους μύκητες *Botrytis cinerea* και *Trametas hirsuta***

##### **6.3.1.1 Προετοιμασία υλικού εμβολιασμού**

Για την παραγωγή λακκάσης χρησιμοποιήθηκαν οι μύκητες *Botrytis cinerea* (DSMZ 877) και *Trametas hirsuta* (DSMZ 5072 και 3511). Οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε άγαρ από PDA σε 2 τρυβλία στους 30°C για 10 h. Για την προετοιμασία του υλικού εμβολιασμού ακολουθείται η εξής διαδικασία: κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 2 ml αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM οξικού οξέος, pH 4.6 και με ένα κρίκο εμβολιασμού απομακρύνονται οι μυκηλιακές υφές και το αιώρημα των σπορίων. Στη συνέχεια το αιώρημα των σπορίων που περιέχει περίπου  $10^6$  σπόρια/ml μεταφέρεται σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες που περιέχουν το θρεπτικό υλικό παραγωγής ενζύμου. Στο τέλος σε κάθε κωνική φιάλη το αιώρημα των σπορίων αντιστοιχεί περίπου στο 1%.

### 6.3.1.2 Προετοιμασία θρεπτικού υλικού παραγωγής λακκάσης

Η παραγωγή λακκάσης από *Botrytis cinerea* πραγματοποιήθηκε μέσα σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer) του 1l που περιέχουν 250ml θρεπτικό υπόστρωμα. Η παραγωγή ελέγχθηκε σε δυο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα. Το πρώτο θρεπτικό μέσο (N1) έχει την εξής σύνθεση (g/l): εκχύλισμα βύνης (20 g), εκχύλισμα ζύμης (2 g), γλυκόζη (20 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g),  $\text{CaCl}_2$  (0.5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g),  $\text{NaCl}$  (1.8 g) σε pH 4.0. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκαν: α) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη, β) 25 mM 2.5-ξυλιδίνη, γ) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g), δ)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g), ε) γαλλικό οξύ (0.1 g). Το δεύτερο θρεπτικό μέσο (N2) είναι της παρακάτω σύνθεσης (g/l): πίτυρο σίτου (20 g), γλυκόζη (20 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g),  $\text{CaCl}_2$  (0.5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5 g),  $\text{NaCl}$  (1.8 g) σε pH 3.6. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκε γαλλικό οξύ (1 g) και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g).

Η παραγωγή λακκάσης από *Trametes hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) πραγματοποιήθηκε μέσα σε κωνικές φιάλες (Erlenmeyer) του 1l που περιέχουν 250ml θρεπτικό υπόστρωμα. Η παραγωγή ελέγχθηκε επίσης σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα. Το πρώτο θρεπτικό μέσο (N3) είναι της παρακάτω σύνθεσης (g/l): εκχύλισμα βύνης (45 g), εκχύλισμα ζύμης (15 g), γλυκόζη (10 g),  $\text{CaCl}_2$  (0.1 g),  $\text{KCl}$  (0.5 g) σε pH 5.0. Το δεύτερο θρεπτικό μέσο (N4) έχει την εξής σύνθεση (g/l): πίτυρο σίτου (45 g), εκχύλισμα ζύμης (15 g), γλυκόζη (10 g),  $\text{CaCl}_2$  (0.1 g),  $\text{KCl}$  (0.5 g) σε pH 5.0. Ως ενεργοποιητές χρησιμοποιήθηκαν: α) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη, β) 25 mM 2.5-ξυλιδίνη, γ) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g), δ)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g), ε) γαλλικό οξύ (0.1 g).

### 6.3.1.3 Ζύμωση

Οι κωνικές φιάλες με το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρώνονται στους 121°C για 15 min και στη συνέχεια ψύχονται. Ύστερα το θρεπτικό υπόστρωμα εμβολιάζεται με 1% εμβόλιο (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.1.1) και οι κωνικές φιάλες τοποθετούνται στον παλινδρομητή ανακίνησης. Η θερμοκρασία του θαλάμου ελεγχόμενης θερμοκρασίας ρυθμίζεται στην περίπτωση του *Botrytis cinerea* στους 24-25°C ενώ στην περίπτωση του *T. hirsuta* στους 30°C. Η ταχύτητα ανάδευσης και στις δύο περιπτώσεις ρυθμίζεται στα 180 ~ 200 rpm. Κάθε μέρα λαμβάνονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες δείγματα από όλες τις κωνικές φιάλες και προσδιορίζεται το pH, η δραστητικότητα λακκάσης μέσω της οξείδωσης

του ABTS (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.α ) και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.2.5).

### **6.3.2 Πρωτόκολλο καθαρισμού πρωτεΐνης**

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας παραγωγής του ενζύμου από τους δύο μύκητες (*B. cinerea* και *T. hirsuta*) ξεκινάει η διαδικασία καθαρισμού της πρωτεΐνης. Αρχικά το υγρό της ζύμωσης φιλτράρεται σε μεμβράνη με διάμετρο πόρων 0.45 μm, προκειμένου να διαχωριστεί η στερεή βιομάζα από την υγρή. Το φιλτραρισμένο υγρό τη ζύμωσης φυλάσσεται σε ποτήρι ζέσεως. Στη συνέχεια η στερεή βιομάζα φυγοκεντρείται στις 2500 rpm για 15 min και το υπερκείμενο υγρό διαχωρίζεται από το ίζημα και αποθηκεύεται στο ίδιο ποτήρι ζέσεως που περιέχει το φιλτραρισμένο υγρό της ζύμωσης. Το διαυγές υπερκείμενο διάλυμα αποτέλεσε την πηγή των ενζύμων. Προκειμένου να καθαριστεί η πρωτεΐνη ακολουθείται η καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, η μοριακή διήθηση και η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

#### **6.3.2.1 Καταβύθιση με θειικό αμμώνιο**

##### Πειραματική διαδικασία

Το υπερκείμενο διάλυμα (που έχει προκύψει μετά τη διήθηση) τοποθετείται σε ένα ποτήρι ζέσεως και αναδεύεται σε μαγνητικό αναδευτήρα. Ύστερα προστίθεται θειικό αμμώνιο, έτσι ώστε να οδηγήσει το διήθημα σε κορεσμό 90%. Η ποσότητα του θειικού αμμωνίου που απαιτείται είναι 60 g σε 100 ml υπερκείμενου. Η ποσότητα του  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  προστίθεται αργά και σταδιακά, υπό συνεχή ανάδευση σε χαμηλή θερμοκρασία. Μετά το πέρας της προσθήκης του άλατος, το ενζυμικό διάλυμα φυγοκεντρείται για 10 min. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης αναδιαλύεται σε όση το δυνατόν μικρότερη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος 0.015 M οξικού οξέος pH 5.0.

#### **6.3.2.2 Χρωματογραφία πηκτής ή μοριακής διήθησης**

##### Πειραματική διαδικασία

Αρχικά οι στήλες μοριακής διήθησης PD-10 πηκτής Sephadex G-25 (οι οποίες έχουν εύρος διαχωρισμού 1-5 kDa) εξισορροπούνται με ρυθμιστικό διάλυμα 0.015M οξικού οξέος με pH 4.6. Για το σκοπό αυτό 2.5 ml από το ρυθμιστικό διάλυμα διαβιβάζονται στην κάθε

στήλη. Η έκλουση γίνεται με 3.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος 0.015M οξικού οξέος με pH 4.6. Από το υγρό έκλουσης που συλλέγεται στους δοκιμαστικούς σωλήνες λαμβάνεται ποσότητα ίση με 0.5 ml. Οι χρησιμοποιούμενες στήλες μοριακής διήθησης μετά από κάθε χρήση αναγεννούνται, με διαδοχικές πλύσεις υπερκάθαρου νερού, ρυθμιστικού διαλύματος 0.015 M οξικού οξέος με pH 4.6 και 0.2 M NaOH. Μετά την αναγέννηση αποθηκεύονται σε 0.2 M NaOH που περιέχει 20% αιθανόλη.

### **6.3.2.3 Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων**

#### Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως ιονανταλλακτική ρητίνη η DEAE-Sephadex. Η ρητίνη αυτή είναι ανιονανταλλακτική και έχει ως λειτουργική ομάδα την διαιθυλαμινοαιθύλο ομάδα. Κατά συνέπεια η ρητίνη είναι θετικά φορτισμένη με αποτέλεσμα μόνο οι θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες να κινούνται και να εξέρχονται από την στήλη. Αρχικά η στήλη ανταλλαγής ιόντων εξισορροπείται με ρυθμιστικό διάλυμα 0.015 M οξικού οξέος με pH 4.6. Στη συνέχεια προσθέτεται το ενζυμικό διάλυμα που συλλέχτηκε από τις στήλες μοριακής διήθησης. Η έκλουση του ενζύμου από τη στήλη γίνεται με βαθμίδωση της συγκέντρωσης του NaCl (0.1-0.5 M), ώστε με τη σταδιακή αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος έκλουσης, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ ανταλλάκτη – πρωτεϊνών να εξασθενούν, επιτρέποντας την απόσπαση τους από τον ανταλλάκτη και τον εκλεκτικό τους διαχωρισμό. Τα κλάσματα που εκλούνται, συλλέγονται και μετρίεται η απορρόφηση τους στα 280 nm. Ο έλεγχος της ενζυμικής δραστηριότητας για τη λακκάση γίνεται με βάση την οξειδωση του ABTS (όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.3.5.1.3.α). Τέλος τα κλάσματα που περιέχουν την επιθυμητή πρωτεΐνη συλλέγονται σε ποτήρι ζέσεως και συμπυκνώνονται με υπερδιήθηση μέσω της συσκευής υπερδιήθησης Amicon που είναι εφοδιασμένη με μεμβράνη PM 10 (10000 kDa). Ο χρησιμοποιούμενος ανταλλάκτης μετά από κάθε χρήση αναγεννάται με διαδοχικές πλύσεις οξέως και βάσεως.

### **6.3.2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS - PAGE)**

#### Πειραματική διαδικασία

Το σύστημα που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel), ύψους 3-4 cm και το πήκτωμα επιστοιβαξης

(stacking gel) όπου οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση 1 cm πριν εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Τα πηκτώματα που ήταν συγκέντρωσης 12% σε μίγμα ακρυλαμίδιο: Δις-ακρυλαμίδιο αναλογίας 29:1, επιτρέπουν σαφή διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού βάρους από 10-200 kD.

*Παρασκευή πηκτής:* Για την παρασκευή της πηκτής διαχωρισμού αναμιγνύονται 2.4 ml νερού, 2.5 ml ρυθμιστικό διάλυμα 1.5M Tris-base pH 8.8, 0.1ml SDS 10%, 0.02 ml τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνης (TEMED) και 4 ml διαλύματος ακρυλαμίδιου 30% (29.2% ακρυλαμίδιο και 0.8% δις-ακρυλαμίδιο). Την έναρξη του πολυμερισμού σηματοδοτεί η προσθήκη 0.1 ml διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10%. Στην επιφάνεια της πηκτής διαχωρισμού προστίθεται το διάλυμα της πηκτής επιστοίβαξης του δείγματος το οποίο περιέχει 3.6 ml νερού, 0.625 ml ρυθμιστικό διάλυμα 0.5 M Tris-base pH 6.8, 6 ml διαλύματος ακρυλαμίδιου 30%, 0.15 ml SDS 10%, 0.025 ml TEMED και 0.15ml διαλύματος υπερθειικού αμμωνίου 10%.

*Προετοιμασία δειγμάτων:* Τα υπό ανάλυση δείγματα διαλύονται σε 50μl ρυθμιστικό διάλυμα 0.5M Tris-base pH 6.8, το οποίο περιέχει 0.1% SDS, 14.8% γλυκερόλη, 13% 2-μερκαπτοαιθανόλη και 0.001% κυανού της βρωμοφαινόλης. Ύστερα τα δείγματα θερμαίνονται για 3 min στους 100°C, ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-πρωτεΐνης. Η β-μερκαπτοαιθανόλη που χρησιμοποιείται, ανάγει τους τυχόν δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους. Το ίδιο γίνεται και στα πρότυπα δείγματα μοριακών βαρών.

*Διαδικασία ηλεκτροφόρησης:* Στις δύο δεξαμενές της συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετείται ρυθμιστικό διάλυμα 0.025 M Tris-base, pH 8.3, το οποίο περιέχει 0.192 M γλυκίνη, 0.1% SDS. Η τάση του ρεύματος ρυθμίζεται στα 200 volts, 0.04 A για 60 min περίπου. Το πέρας της ηλεκτροφόρησης διαπιστώνεται όταν η κυανή χρωστική που περιέχεται σε όλα τα δείγματα φτάσει στο τέλος του πηκτώματος διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες πάνω στην πηκτή εμφανίζονται χρησιμοποιώντας χρώση κυανού του Coomassie, που αποκαλύπτει μια σειρά από ζώνες.

*Χρώση με Coomassie Brilliant Blue R-250:* Για την εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει 0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% οξικό οξύ, 50% μεθανόλη, όπου και ανακινείται για διάστημα 1 h. Στο διάλυμα αυτό γίνεται συγχρόνως και η καθήλωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή. Ο αποχρωματισμός της πηκτής γίνεται με ανακίνηση σε διάλυμα 5% οξικό οξύ, 30% μεθανόλη.

### **6.3.2.5. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

#### Πειραματική διαδικασία

Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης ετοιμάζονται εις διπλούν συγκεντρώσεις της BSA (αλβουμίνη από ορό βοδιού) με ανάμιξη 0, 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{l}$  με  $\text{H}_2\text{O}$ , ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200  $\mu\text{l}$ . Το ίδιο γίνεται και με το δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης (αραιώση πρωτεΐνης στα 200  $\mu\text{l}$ ). Στη συνέχεια προσθέτονται σε όλες τις αραιώσεις της καθαρής πρωτεΐνης και του δείγματος 0.8 ml του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση των διαλυμάτων. Μετά οι σωλήνες αφήνονται για ηρεμία 5 min. Έστερα τα δείγματα φωτομετρούνται στα 595 nm και γίνεται η γραφική παράσταση των τιμών τη απορρόφησης του φωτός συναρτήσει των γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με βάση την πρότυπη καμπύλη της πρωτεΐνης με γνωστή συγκέντρωση.

### **6.3.3 Πρωτόκολλα καθαρισμού αργίλων / Οργανοτροποποίησης αργίλων / Ακινητοποίησης ενζύμων σε φυλλόμορφους αργίλους και σε οργανοπηκτώματα.**

#### **6.3.3.1 Πρωτόκολλο καθαρισμού αργίλων**

Το πρωτόκολλο καθαρισμού των αργίλων περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

##### *α) Διασπορά*

Αρχικά 20 g SWy-2 διασπείρονται σε 500 ml απεσταγμένου-απιονισμένου νερού. Το αιώρημα αναδεύεται για μία ημέρα.

##### *β) Διαχωρισμός των μεγαλύτερων από 2 $\mu\text{m}$ κλασμάτων*

Μετά από μία ημέρα, το αιώρημα τοποθετείται σε ογκομετρικό κύλινδρο του 1 l και αφήνεται σε ηρεμία για 5-6 h. Όλο το υπερκείμενο υγρό, εκτός από τα τελευταία 5 ml, απομακρύνεται με απόχυση. Το αιώρημα τώρα περιέχει σωματίδια με ενεργή διάμετρο μικρότερη των 2  $\mu\text{m}$

##### *γ) Απομάκρυνση ανθρακικών*

Το αιώρημα του αργίλου φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 30 min και το ίζημα κατεργάζεται με 300 ml ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COONa}$  1M και  $\text{CH}_3\text{COOH}$  ρυθμισμένου σε pH~5. Το μίγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 70-80°C για περίπου 3 h (δηλαδή έως ότου δεν παρατηρούνται φυσαλίδες στο αιώρημα), ενώ αναδεύεται με γυάλινη

ράβδο ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Το δείγμα στη συνέχεια, ψύχεται, φυγοκεντρείται στις 3500 rpm για 30 min, επαναδιαλύεται σε 200 ml νερού και επαναφυγοκεντρείται.

δ) *Κορεσμός των κατιοανταλλακτικών θέσεων του αργίλου με αντισταθμιστικά κατιόντα (πχ  $\text{Na}^+$ )*

Το ίζημα διαλύεται σε 200ml  $\text{NaCl}$  1N και αναδεύεται για 30 min. Το αιώρημα φυγοκεντρείται και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για 2-3 φορές, για να επιτευχθεί κορεσμός.

ε) *Απομάκρυνση ιόντων  $\text{Cl}^-$*

Το ίζημα στη συνέχεια διαλύεται σε 300 ml νερού και αναδεύεται για 30 min. Στη συνέχεια το δείγμα τοποθετείται σε ημιπερατή μεμβράνη, η οποία επιτρέπει την έξοδο των  $\text{Cl}^-$  και την είσοδο μορίων νερού. Η ημιπερατή μεμβράνη εμβαπτίζεται σε ογκομετρικό κύλινδρο του 1 l, ο οποίος περιέχει απεσταγμένο-απιονισμένο νερό. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2 φορές την ημέρα), το νερό αλλάζεται, έτσι ώστε να απομακρυνθούν όλα τα  $\text{Cl}^-$  που φεύγουν από τον άργιλο. Η ανίχνευση των ιόντων  $\text{Cl}^-$  γίνεται προσθέτοντας 2-3 σταγόνες  $\text{AgNO}_3$  0.1 N σε περίπου 5 ml του υπερκείμενου νερού. Ύπαρξη θολώματος υποδηλώνει την ύπαρξη ιόντων  $\text{Cl}^-$  (λευκό ίζημα  $\text{AgCl}$ ).

Τέλος το αιώρημα του αργίλου εναποτίθεται σε γυάλινες πλάκες, αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια συλλέγεται και λειοτριβείται το στερεό υπόλειμμα σε γουδί από αχάτη.

### **6.3.3.2 Πρωτόκολλο οργανοτροποποίησης αργίλων**

Η παρασκευή των οργανόφιλων αργίλων γίνεται με βάση την κατιοανταλλακτική ικανότητα του αργίλου. Η γενική πορεία παρασκευής που ακολουθείται είναι η εξής:

α) *Διασπορά*

Αρχικά συγκεκριμένη ποσότητα αργίλου διασπείρεται σε ορισμένο όγκο απεσταγμένου-απιονισμένου νερού. Το αιώρημα αναδεύεται για μία ημέρα.

β) *Παρασκευή διαλύματος τασιενεργούς ένωσης.*

Στη συνέχεια σε ίσο όγκο απεσταγμένου-απιονισμένου νερού, που είχε διασπαρθεί ο άργιλος, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα τασιενεργούς ένωσης βρωμιούχου οκταδέκυλο τριμεθυλαμμωνίου  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}]$  και πραγματοποιείται ανάδευση με ελαφρά θέρμανση ( $\sim 500^\circ\text{C}$ ) για 30 min.

γ) *Ανάμιξη*

Το διάλυμα της τασιενεργούς ένωσης προστίθεται στο αιώρημα του αργίλου και το μίγμα που προκύπτει αναδεύεται για 24 h, ώστε να επιτευχθεί η αντικατάσταση των ανόργανων κατιόντων της τασιενεργούς ένωσης. Ακολουθεί απομάκρυνση του στερεού με φυγοκέντρηση, ενυδάτωση με απεσταγμένο νερό. Τέλος το αιώρημα του αργίλου εναποτίθεται σε γυάλινες πλάκες και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ακριβείς αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για τον κάθε άργιλο παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3.

**Πίνακας 6.3.** Αναλογίες πρόσμιξης για την παρασκευή οργανοτροποποιημένων αργίλων.

|                 | Ποσότητα αργίλου<br>(g) | Όγκος νερού<br>(ml) | Ποσότητα τασιενεργούς<br>ένωσης (g) |
|-----------------|-------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Λαπονίτης (LAP) | 0.74                    | 20                  | 0.203                               |
| Κουνίπια (KUN)  | 2.30                    | 50                  | 1.510                               |
| SWy-2           | 5.00                    | 80                  | 2.187                               |

#### 6.3.3.3 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης λιπάσης B από *Candida antarctica*

Αρχικά 50 mg αργίλου διασπείρονται σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM κιτρικών/φοσφορικών pH 6.0). Το αιώρημα αναδεύεται με σταθερή ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ημέρες. Μετά την πάροδο των 3 ημερών προσθέτεται η κατάλληλη ποσότητα CaLB, έτσι ώστε μεταβάλλοντας το λόγο του ενζύμου προς την μάζα του αργίλου να δημιουργούνται παράγωγα με διαφορετικό ποσοστό φόρτωσης πρωτεΐνης: LAP-R, ORLAP-R, KUN-R, ORKUN-R, SWy-2-R και ORSWy-2-R (όπου R=20, 50, 100, 200 mg ενζύμου προς g αργίλου, ενώ το πρόθεμα OR προσδιορίζει την χρήση οργανοτροποποιημένων αργίλων). Το αιώρημα αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ημέρα και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 2500 rpm για 30 min. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα (50 mM κιτρικών/φοσφορικών pH 6.0) και απλώνεται σε γυαλί όπου ξηραίνεται για 2-3 ημέρες σε ξηραντήρα στους 35°C. Το ποσό του ενζύμου που παρέμενε προσδεδεμένο στα νανοσωματίδια του αργίλου προσδιορίστηκε με βάση τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης η οποία παρέμεινε στο υπερκείμενο μετά την φυγοκέντρηση του αιωρήματος χρησιμοποιώντας την μέθοδο Bradford. Η ακινητοποιημένη λιπάση σε αργίλους μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή να διατηρηθεί υπό κατάψυξη (-20 °C) έως τη χρησιμοποίησή της.

#### **6.3.3.4 Πρωτόκολλο ακινητοποίησης β-γλυκοσιδάσης.**

Το πρωτοκόλλο ακινητοποίησης της β-γλυκοσιδάσης είναι όμοιο με αυτό που περιγράφηκε για την λιπάση (παράγραφος 6.3.3.3) με τη μόνη διαφορά ότι το ένζυμο αρχικά διασπείρονταν σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος (100 mM οξικών pH 5.0).

#### **6.3.3.5 Ακινητοποίηση λακκάσης σε οργανοπηκτώματα.**

Για την παρασκευή πηκτωμάτων παραγώγων κυτταρίνης (HPMC), αρχικά ενυδατώνουμε 1 g υδροξυ-προπυλ-μεθυλ-κυτταρίνη με 2 ml νερού (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 4.6) στους 25°C. Στη συνέχεια ετοιμάζουμε 1ml μικρογαλακτώματος ( $w_o = 40$ ) AOT/ ισοοκτάνιο (200 mM) το οποίο περιέχει λακκάση από *T. versicolor* (140 units, 2.5 mg πρωτεΐνης). Ακολουθεί καλή ανάδευση του μίγματος για 5-10 min με σπαθίδα, ώστε το υλικό να προσροφήσει όλη την ποσότητα του υγρού και το ένζυμο να κατανεμηθεί ομοιόμορφα σε όλη το πηκτώμα. Τα πηκτώματα που προκύπτουν με αυτή τη μέθοδο τεμαχίζονται σε μικρά τεμάχια με διαστάσεις περίπου 0.5 mm. Ακολουθεί ξήρανση στους 30°C για 24 h. Το ακινητοποιημένο ένζυμο έχει ποσοστό φόρτωσης πρωτεΐνης 2.5 mg ανά g κυτταρίνης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή να διατηρηθεί υπό κατάψυξη (-20°C) έως τη χρησιμοποίησή του.

### **6.3.4 Παρασκευή μέσων διεξαγωγής ενζυμικών αντιδράσεων**

#### **6.3.4.1 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο με επιφανειοενεργό**

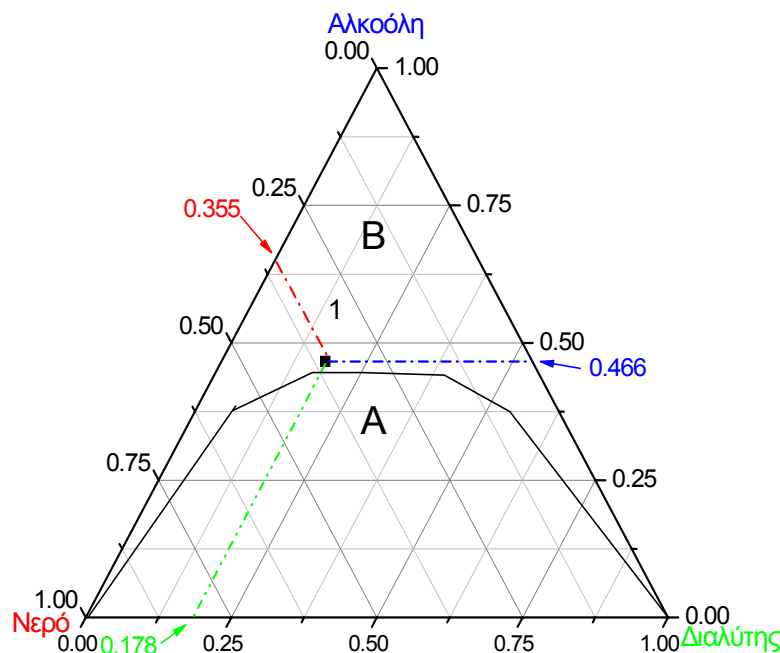
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο το οποίο σχηματίζεται από AOT/ισοοκτάνιο/νερό. Η σύνθεση του γίνεται ως εξής: αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα του επιφανειοενεργού AOT σε ισοοκτάνιο, συγκέντρωσης 0.1 M. Στη συνέχεια το μικρογαλάκτωμα σχηματίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (100 mM οξικού οξέος, pH 4.6). Μετά από ανάδευση για περίπου 60 sec το διάλυμα γίνεται διαυγές. Η διάμετρος των μικροσωματιδίων που σχηματίζονται, εξαρτάται άμεσα από τον βαθμό ενυδάτωσης,  $w_o$ , ο οποίος περιγράφεται από την σχέση:

$$w_o = \frac{[H_2O]}{[AOT]} \quad (6.1), \text{ με } [H_2O] \text{ ο γραμμομοριακός λόγος νερού και } [AOT] \text{ ο γραμμομοριακός}$$

λόγος AOT. Με βάση τον βαθμό ενυδάτωσης  $w_o$ , παρασκευάστηκαν αντίστροφα μικκύλια με  $w_o$  ίσο με 20, 30, 40, 50 και 60.

#### **6.3.4.2 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό.**

Τα τριαδικά συστήματα παρασκευάζονται με βάση τις ισοτροπικές ιδιότητες διάφορων μιγμάτων του οργανικού διαλύτη (εξάνιο,  $\alpha$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο), της αλκοόλης (2-προπανόλη, τριτοταγή βουτανόλη) και του νερού (ρυθμιστικό διάλυμα) στους 25°C [Zoumpanioti *et al.*, 2006a]. Τα συστήματα αυτά σχηματίζονται αν αρχικά διατηρηθούν σταθερά τα δυο από τα τρία συστατικά τα οποία στη συνέχεια τιτλοδοτούνται από το τρίτο συστατικό. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλων όγκων από τον οργανικό διαλύτη (15.8-71.1% κ.ο) και την αλκοόλη (27.7-74.7% κ.ο). Στη συνέχεια το μίγμα τιτλοδοτείται με νερό (1.2-18.9% κ.ο) το οποίο μπορεί να είναι ρυθμιστικό διάλυμα 100mM κιτρικών, pH 2.75 ή ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικών, pH 5.0. Ακολουθεί έντονη ανάδευση για περίπου 30 sec έως ότου επιτευχθεί ένα σταθερό και διαυγές διάλυμα. Η προσθήκη νερού που οδηγεί σε διαχωρισμό φάσεων οριοθετεί τα όρια φάσης των τριαδικών συστημάτων. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται κάθε φορά αλλάζοντας τη σύνθεση του αρχικού διαλύματος διαλύτη-αλκοόλης έως ότου δημιουργηθούν αρκετά σημεία τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην κατασκευή της γραμμής, η οποία διαχωρίζει την μονοφασική από την πολυφασική περιοχή. Η όλη εργασία πραγματοποιείται σε καλά κλεισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε σταθερή θερμοκρασία (25°C). Η γραφική παράσταση της σύστασης ενός συστήματος που αποτελείται από τρία συστατικά απεικονίζεται σε τριγωνικό διάγραμμα φάσεων (Σχήμα 6.1).



**Σχήμα 6.1.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεων για σύστημα διαλύτη/αλκοόλης/νερού. Διαδρομή υπολογισμού του γραμμομοριακού λόγου για το σημείο 1 (σύσταση σημείου 1: διαλύτης: 0.178/αλκοόλη:0.466/νερό: 0.355), το οποίο ανήκει στην μονοφασική περιοχή Β. Η περιοχή Α αντιστοιχεί σε πολυφασικά συστήματα.

Η κάθε κορυφή του τριγωνικού διαγράμματος φάσης αναπαριστά το κάθε συστατικό του τριαδικού συστήματος. Το εσωτερικό του τριγώνου χωρίζεται σε δυο περιοχές, στην μια που αποτελείται από πολυφασικά συστήματα και στην άλλη που τα συστήματα είναι διαυγή, οπτικώς ισότροπα. Στην περίπτωση της παρούσας διατριβής παρασκευάστηκαν τα τριγωνικά διαγράμματα φάσεων των τριαδικών συστημάτων: 1) εξάνιο/2-προπανόλη ή τριτοταγής βουτανόλη/νερό, 2)  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη ή τριτοταγής βουτανόλη/νερό, 3)  $d$ -λιμονένιο/τριτοταγής βουτανόλη/νερό. Η παρασκευή τους έγινε με τιτλοδότηση νερού σε σταθερή αναλογία διαλύτη/αλκοόλης όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μ'αυτόν τον τρόπο έγινε επιλογή της περιοχής εργασίας, που είναι η μονοφασική περιοχή των μικρογαλακτωμάτων.

#### 6.3.4.2.1 Μετρήσεις αγωγιμότητας σε μικρογαλακτωματα χωρίς επιφανειοενεργό

Οι μετρήσεις αγωγιμότητας έγιναν σε θερμοκρασία 25°C με την χρήση του αγωγιμόμετρου 64 conductometer της εταιρείας Metrohm όπως έχει περιγραφεί αλλού [Zoumpantioti *et al.*, 2006a]. Η σταθερά του ηλεκτροδίου ήταν 0.1 cm<sup>-1</sup>.

#### **6.3.4.3 Παρασκευή μονοφασικών συστημάτων με αναμίξιμους διαλύτες με το νερό**

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι μονοφασικών συστημάτων με αναμίξιμο διαλύτη με το νερό: α) μονοφασικό σύστημα τριτοταγής βουτανόλης/νερού και β) μονοφασικό σύστημα [bmim][BF<sub>4</sub>]/νερού. Η σύνθεση τους περιλαμβάνει την ανάμιξη κατάλληλης ποσότητας τριτοταγούς βουτανόλης ή ιοντικού υγρού [bmim][BF<sub>4</sub>] με ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM οξικού οξέος, pH 4.6, έτσι ώστε ο αναμίξιμος διαλύτης να έχει τελική σύνθεση από 10-80%.

#### **6.3.5. Ενζυμικές αντιδράσεις**

##### **6.3.5.1 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηριότητας ενζύμων**

##### **6.3.5.1.1 Μέτρηση δραστηριότητας χλωροϋπεροξειδάσης**

##### **α) Αντίδραση χλωρίωσης του MCD από την χλωροϋπεροξειδάση σε τριαδικά συστήματα**

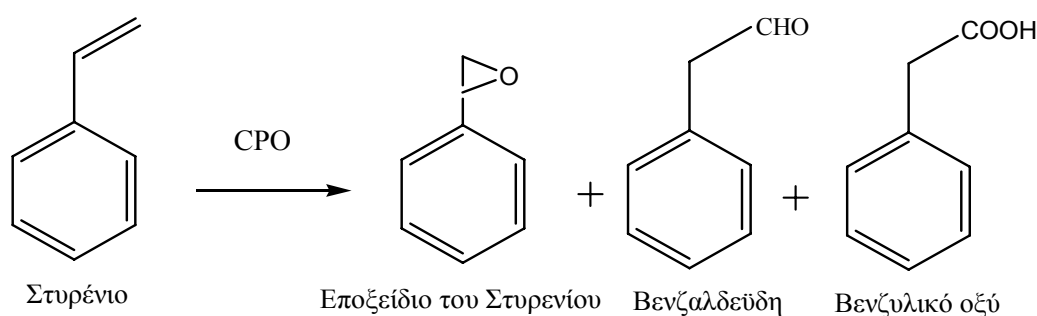
Η δραστηριότητα της χλωροϋπεροξειδάσης προσδιορίστηκε στους 25°C, παρακολουθώντας την μείωση της απορρόφησης στα 278 nm η οποία οφείλεται στη μετατροπή του MCD ( $\epsilon_{278}=12,200$ ) σε DCD [Loughlin and Hawkes, 2000; Seelbach *et al.*, 1997]. Η μετατροπή της μονοχλωροδιμεδόνης σε διχλωροδιμεδόνη απεικονίζεται στο Σχήμα 4.4 της παραγράφου 4.2.1.3. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλων όγκων από τον οργανικό διαλύτη, την αλκοόλη και την υδατική φάση (100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 2.75) η οποία περιέχει κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (2-10 units), MCD (0.1 mM) και KCl (6.67 mM). Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύεται μέχρι να γίνει οπτικά διαφανές. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του *t*-BHP (38.5 mM). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 1 ml. Όλα τα πειράματα γίνονταν εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου ή οξειδωτικού φορέα.

Επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του *t*-BHP και του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στην δραστηριότητα του ενζύμου (20 units) κατά την χλωρίωση του MCD σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο και το  $\alpha$ -πινένιο τα οποία είχαν περιεκτικότητας νερό 18.9% κ.ο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0-45 mM) και *t*-BHP (0-

80 mM). Η πειραματική διαδικασία προσδιορισμού της δραστηρότητας του ενζύμου είναι η ίδια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως.

β) Αντίδραση εποξείδωσης του στυρενίου από την χλωροϋπεροξειδάση σε τριαδικά συστήματα

Ο προσδιορισμός της δραστηρότητας εποξείδωσης της χλωροϋπεροξειδάσης βασίστηκε στην οξείδωση του στυρενίου στο αντίστοιχο εποξείδιο του από την χλωροϋπεροξειδάση στους 25°C, όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2.



**Σχήμα 6.2.** Αντίδραση εποξείδωσης στυρενίου από την χλωροϋπεροξειδάση.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλων όγκων από τον οργανικό διαλύτη, την αλκοόλη και την υδατική φάση (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 5.0) η οποία περιέχει την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (20 units). Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του οξειδωτικού φορέα *t*-BHP (200 mM) και ο τελικός όγκος της αντίδρασης ρυθμίζεται στο 1 ml. Δείγματα παραλαμβάνονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα και αναλύονται με την βοήθεια αέριου χρωματογράφου (GC), ο οποίος έδειξε ξεχωριστές κορυφές για το *R* και *S* εποξείδιο του στυρενίου. Τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου (CPO) ή οξειδωτικού φορέα (*t*-BHP).

γ) Αντιδράσεις οξείδωσης ολεφινών και τερπενολών από την χλωροϋπεροξειδάση σε τριαδικά συστήματα

Η ικανότητα της χλωροϋπεροξειδάσης να καταλύει αντιδράσεις οξείδωσης υδροφοβικών υποστρωμάτων σε τριαδικά συστήματα, διερευνήθηκε με την χρήση ολεφινών όπως το 1-μεθυλ-κυκλοξένιο και το *cis*-2-επτένιο καθώς και με τερπενόλες όπως νερόλη,

γερανιόλη και περιλλύλ αλκοόλη. Σε μια τυπική αντίδραση αρχικά αναμιγνύονται οι κατάλληλοι όγκοι από τον οργανικό διαλύτη, ο οποίος περιέχει το υπόστρωμα (50-200 mM), την αλκοόλη, και την υδατική φάση (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 5.0) η οποία περιέχει την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου ( $140 \text{ units ml}^{-1}$ ). Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του οξειδωτικού φορέα *t*-BHP (η συγκέντρωση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υποστρώματος) και το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Η πορεία της αντίδρασης μελετάται ως εξής: δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, εκχυλίζονται με διχλωρομεθάνιο και αναλύονται είτε με GC είτε με HPLC. Σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου (CPO) ή οξειδωτικού φορέα (*t*-BHP).

Τα προϊόντα της αντίδρασης απομονώθηκαν με στήλη χρωματογραφίας ή με παρασκευαστική TLC με παρόμοιο τρόπο με αυτό που έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία [Skouridou *et al.*, 2003a]. Η απόδοση της διαδικασίας απομόνωσης ήταν 20-30%. Υψηλής καθαρότητας οξυγονωμένα προϊόντα απομονώθηκαν με ημι-παρασκευαστική HPLC. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε στήλη  $\text{C}_{18}$  Discovery (μέγεθος σωματιδίων  $5 \mu\text{m}$ , μήκος  $250 \text{ mm}$ , διάμετρος  $10 \text{ mm}$ ). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με ακετονιτρίλιο στους  $27^{\circ}\text{C}$  με ρυθμό ροής  $4 \text{ ml min}^{-1}$ . Τα προϊόντα ανιχνεύτηκαν σε μήκος κύματος  $220$  ή  $240 \text{ nm}$ . Η ταυτοποίηση των προϊόντων έγινε με GC-MS. Η συσκευή GC-MS είχε στήλη ( $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ ) της Supelco. Η αρχική θερμοκρασία του φούρνου ήταν  $50^{\circ}\text{C}$ . Μετά από  $4 \text{ min}$  η θερμοκρασία της στήλης αυξήθηκε στους  $230^{\circ}\text{C}$  (με ρυθμό  $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) και τελικώς στους  $285^{\circ}\text{C}$  (με ρυθμό  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν  $31.5 \text{ min}$  και η ανάλυση των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό MSWS Chromatography (Varian).

#### **6.3.5.1.2 Μέτρηση δραστηρότητας $\beta$ -γλυκοσιδάσης**

##### α) Υδρόλυση του π-νιτροφαινυλ-γλυκοπυρανοζιδίου

Η καταλυτική δραστηρότητα της ακινητοποιημένης  $\beta$ -γλυκοσιδάσης σε αργίλους μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την αντίδραση μετατροπής του pNPG (π-νιτροφαινυλ-γλυκοπυρανοζιδίου) σε pNP (πάρα-νιτροφαινόλη). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την προετοιμασία  $900 \mu\text{l}$  διαλύματος pNPG  $1 \text{ mM}$  σε ρυθμιστικό με  $\text{pH}=5$  μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά την τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων σε παγόλουτρο, προσθέτονται στον καθένα χωριστά  $100 \mu\text{l}$  αιωρήματος ακινητοποιημένης  $\beta$ -γλυκοσιδάσης.

Υστερα αναδεύονται σε Vortex και τοποθετούνται στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C όπου παραμένουν για 15 min. Μετά το πέρας των 15 min μεταφέρονται σε παγόλουτρο όπου και γίνεται η προσθήκη σε κάθε ένα από τους δοκιμαστικούς σωλήνες από 250 µl διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> με σκοπό τον τερματισμό της ενζυμικής αντίδρασης. Η πορεία της αντίδρασης μελετάται ως εξής: δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 2 min (προκειμένου να απομακρυνθεί το ένζυμο) και αναλύονται με φωτόμετρο στα 410 nm. Σαν δείγματα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ακινητοποιημένου ενζύμου.

#### 6.3.5.1.3 Μέτρηση δραστηριότητας λακκασών

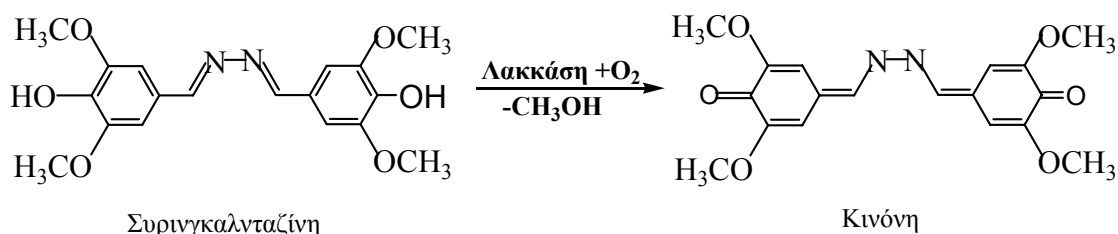
##### α) Αντίδραση οξείδωσης ABTS

Η καταλυτική δραστηριότητα των ελεύθερων λακκασών από *T. versicolor*, *T. hisruta* και *B. cinerea* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση την οξείδωση του ABTS. Η δραστηριότητα ελέγχθηκε σε ένα ευρύ φάσμα μέσων όπως: α) σε υδατικό διάλυμα, β) σε μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (10-50% κ.ο) ή νερού/[bmim][BF<sub>4</sub>] (10-50% κ.ο), γ) σε σύστημα αντίστροφων μικκυλίων με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης ( $w_0=20-60$ ), και δ) σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (100 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, pH 4.6). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη των κατάλληλων ποσοτήτων των διαλυτών με 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6, το οποίο περιέχει 1 mM ABTS και λακκάση είτε από *T. versicolor* είτε από *T. hisruta* ή *B. cinerea* (0.02-0.1 units). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 0.2 ml. Η πορεία της αντίδρασης προσδιορίζεται με φωτόμετρο τύπου Elisa reader σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η μέτρηση λαμβάνει χώρα στα 420 nm στους 25°C [Festa *et al.*, 2008]. Μία μονάδα λακκάσης καταλύει την οξείδωση 1.0  $\mu$ mole ABTS το λεπτό σε pH 4.6 και σε θερμοκρασία 25°C. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου.

Επιπλέον κατά την μέτρηση οξείδωσης του ABTS από τις λακκάσες (0.018 units) σε υδατικό διάλυμα προσδιορίστηκε η βέλτιστη τιμή pH (σε ένα εύρος τιμών από 2.5 έως 8.0) και θερμοκρασίας (από 20 έως 90°C) όπως περιγράφηκε προηγουμένως.

### β) Αντίδραση οξείδωσης της συρινγκαλνταζίνης (SYR)

Η καταλυτική δραστηριότητα ελεύθερης ή ακινητοποιημένης σε πηκτώματα οργανογελών λακκάσης από *T. versicolor* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας την αντίδραση οξείδωσης της συρινγκαλνταζίνης στην αντίστοιχη κινόνη. Η δραστηριότητα ελέγχθηκε σε ένα ευρύ φάσμα μέσων όπως: α) σε υδατικό διάλυμα, β) σε μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (50-80% κ.ο) ή νερού/[bmim][BF<sub>4</sub>] (25-80% κ.ο), γ) σε σύστημα αντίστροφων μικκυλίων με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης ( $w_o=20-60$ ), και δ) σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με  $\kappa$ -εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ - λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (100 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος, pH 4.6). Στο Σχήμα 6.3 παρουσιάζεται η αντίδραση οξείδωσης της συρινγκαλνταζίνης.



**Σχήμα 6.3.** Αντίδραση οξείδωσης συρινγκαλνταζίνης από λακκάση.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη των κατάλληλων ποσοτήτων των οργανικών διαλυτών, που περιέχουν 0.216 mM SYR σε μεθανόλη, με 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 mg ακινητοποιημένης λακκάσης από *T. versicolor* σε HPMC (14units) ή με ελεύθερη λακκάση από *T. versicolor* (0.1 units) καταλήγοντας σε τελικό όγκο αντίδρασης 0.2 ml. Η πορεία της αντίδρασης προσδιορίζεται με φωτόμετρο τύπου Elisa reader σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η μέτρηση λαμβάνει χώρα στα 526 nm στους 25°C. [Flores *et al.*, 2009].

### γ) Οξείδωση $\alpha$ -πινενίου

Οι αντιδράσεις οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές φιάλες των 4 ml σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση (περίπου 200 rpm) σε διάφορα μέσα όπως: α) σε υδατικό διάλυμα (100 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH 4.6), β) σε

μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (10% κ.ο.), γ) σε αντίστροφα μικκύλια με βαθμό ενυδάτωσης  $w_o=40$  και δ) σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με εξάνιο, είτε  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ - λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο.). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη των κατάλληλων ποσοτήτων των οργανικών διαλυτών, που περιέχουν  $\alpha$ -πινένιο (250-1000 mM) με την υδατική φάση που περιέχει ελεύθερη λακκάση από *T. versicolor* (10 units), ή λακκάση από *T. hirsuta* (6 units) ή λακκάση από *B. cinerea* (2.5 units) ή 50 mg ακινητοποιημένης λακκάσης από *T. versicolor* σε HMPC (2.5 mg πρωτεΐνης  $g^{-1}$  κυτταρίνης). Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του διαμεσολαβητή HBT (40 mM). Η πορεία της αντίδρασης μελετάται ως εξής: δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 2 min (προκειμένου να απομακρυνθεί το ένζυμο) και αναλύονται με GC. Σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου ή διαμεσολαβητή (HBT).

Επιπλέον κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο) μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του διαμεσολαβητή (HBT). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε αρχικά περιλαμβάνει την ανάμιξη του  $\alpha$ -πινενίου, με την τριτοταγή βουτανόλη, η οποία περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις του HBT (40-250 mM). Στη συνέχεια προσθέτεται η υδατική φάση, που περιέχει λακκάση από *T. versicolor* (10 units). Η πορεία της αντίδρασης μελετάται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

#### d) Οξείδωση d-λιμονενίου και μαστιχελαίου

Οι αντιδράσεις οξείδωσης του  $d$ -λιμονενίου ή του μαστιχελαίου πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές φιάλες των 4 ml σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση (περίπου 200 rpm) σε τριαδικό σύστημα με  $d$ - λιμονένιο ή μαστιχέλαιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο.). Ένα τυπικό μίγμα αντίδρασης περιέχει  $d$ - λιμονένιο (1 M) ή μαστιχέλαιο (1 M) και ελεύθερη λακκάση από *T. versicolor* (10 units) ή 50 mg ακινητοποιημένης λακκάσης από *T. versicolor* σε HMPC (2.5 mg πρωτεΐνης  $g^{-1}$  κυτταρίνης). Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του διαμεσολαβητή HBT (40 mM). Η πορεία της αντίδρασης μελετάται ως εξής: δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 2 min (προκειμένου να απομακρυνθεί το ένζυμο) και αναλύονται με GC. Σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ακινητοποιημένου ενζύμου ή διαμεσολαβητή (HBT).

#### 6.3.5.1.3.1 Επίδραση διαμεσολαβητών στην δραστικότητα της λακκάσης

Ο συνδυασμός διαφορετικών διαμεσολαβητών (ABTS, HBT, TEMPO, ασκορβικό οξύ) καθώς και η αναλογία τους μελετήθηκε κατά την α) οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου σε τριαδικό σύστημα αποτελούμενο το  $\alpha$ -πινένιο, την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό (18.9% κ.ο), β) οξείδωση του  $d$ -λιμονενίου σε τριαδικό σύστημα με  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο), γ) οξείδωση βασικών συστατικών του μαστιχέλαιου σε τριαδικό μονοφασικό σύστημα με μαστιχέλαιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο) χρησιμοποιώντας ελεύθερη (10 units) ή ακινητοποιημένη λακκάση από *T. versicolor* σε HMPC (2.5 mg πρωτεΐνης g<sup>-1</sup> κυτταρίνης). Η πορεία της αντίδρασης μελετάται όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως.

#### **6.3.5.1.4 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης CaLB σε αργίλους (οργανικά τροποποιημένους ή μη).**

##### α) Αντιδράσεις μετεστεροποίησης

Η ικανότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* να καταλύει αντιδράσεις μετεστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες, μελετήθηκε με την σύνθεση του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος από τον βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος και την 1-βουτανόλη. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη του βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος (50 mM) και της 1-βουτανόλης (50 mM) σε οργανικό διαλύτη (όπως πχ εξάνιο, τολουόλιο, ισοοκτάνιο, ακετόνη, ακετονιτρίλιο και τριτοταγή βουτανόλη) ο οποίος έχει προαφυδατωθεί με την χρήση μοριακών κοσκίων διαμέτρου 3 Å. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 mg ακινητοποιημένης CaLB (R=20-100 mg πρωτεΐνης g<sup>-1</sup> αργίλου) ή 10 mg λυοφιλιωμένου εξνιμικού παρασκευάσματος. Η αντίδραση πραγματοποιείται στους 50°C υπό συνεχή ανάδευση (περίπου 50 rpm). Ο τελικός αντίδρασης ρυθμίζεται στα 5ml. Η πορεία της αντίδρασης μελετάται μέσω του προσδιορισμού της αύξησης της συγκέντρωσης του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος για χρονικό διάστημα 2h. Πιο συγκεκριμένα δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 2 min (προκειμένου να απομακρυνθεί το ένζυμο) και αναλύονται με GC. Σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης που σχηματίζεται απουσία του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη.

### β) Χημειοενζυμική εποξειδωση τερπενίων και μαστιχελαιίου

Οι αντιδράσεις σύνθεσης εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ή του εποξειδίου του  $d$ -λιμονενίου πραγματοποιήθηκαν σε κλειστές φιάλες των 4 ml σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση (περίπου 200 rpm). Ένα τυπικό μίγμα αντίδρασης περιλαμβάνει  $\alpha$ -πινένιο (1 mmol) ή  $d$ -λιμονένιο (1 mmol) ή μαστιχέλαιο (1 mmol) και οκτανοϊκό οξύ (1 mmol) διαλυμένα σε 5 ml εξάνιου και λυοφιλιωμένη (10 mg) ή ακινητοποιημένη CaLB (50 mg,  $R=100$  mg πρωτεΐνης  $g^{-1}$  αργίλου). Η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη 1.1 mmol του οξειδωτικού παράγοντα ( $H_2O_2$  ή UHP). Η πορεία της αντίδρασης μελετάται ως εξής: δείγματα λαμβάνονται περιοδικά, φυγοκεντρούνται στις 4000 rpm για 2 min (προκειμένου να απομακρυνθεί το ένζυμο) και αναλύονται με GC. Σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου (CaLB) ή οξειδωτικού φορέα (UHP ή  $H_2O_2$ ).

#### **6.3.5.2 Μέθοδοι προσδιορισμού σταθερότητας των ενζύμων**

##### **6.3.5.2.1 Προσδιορισμός της σταθερότητας της χλωροϋπεροξειδάσης**

#### α) Επίδραση του υδατικού περιεχομένου του μέσου στη σταθερότητα

Η επίδραση του υδατικού περιεχομένου στην σταθερότητα της χλωροϋπεροξειδάσης μελετήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται από εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερο, στα οποία η υδατική φάση κυμαίνεται μεταξύ 0.4 και 18.9% κ.ο, όταν διατηρείται σταθερός ο λόγος αλκοόλης/διαλύτη. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλων όγκων από τον οργανικό διαλύτη, την αλκοόλη και την υδατική φάση (100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 2.75) η οποία περιέχει κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (2-10 units). Στη συνέχεια το μίγμα επωάζεται για καθορισμένα χρονικά διαστήματα (0-72 h) και σε διάφορες θερμοκρασίες από 25-50°C. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, στο μίγμα προσθέτεται MCD (0.1 mM), KCl (6.67 mM) και ο οξειδωτικός φορέας  $t$ -BHP (38.5 mM). Ύστερα η εναπομένουσα δραστητικότητα χλωρίωσης της χλωροϋπεροξειδάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 278 nm. Οι σταθερές αδρανοποίησης ( $k_d$ ) του ενζύμου υπολογίζονται μέσω κινητικών αδρανοποίησης πρώτης

τάξης [Aymard and Belarbi, 2000]. Η εξίσωση βάση της οποίας υπολογίζονται οι  $k_d$  δίνεται από την ακόλουθη σχέση:

$$\frac{(A)_t}{(A)_0} = \exp(-k_d * t) \quad (6.2)$$

Όπου  $(A)_t$  είναι η δραστηριότητα μετά από επώαση σε κάποια θερμοκρασία σε χρόνο  $t$ , και  $(A)_0$  είναι η αρχική δραστηριότητα του ενζύμου.

#### β) Επίδραση του υποστρώματος

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό της διατήρησης των καταλυτικών ιδιοτήτων της χλωροϋπεροξειδάσης σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται από εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερό παρουσία υποστρώματος (στυρένιο) περιγράφεται πιο κάτω: αρχικά αναμιγνύονται οι κατάλληλοι όγκοι από τον οργανικό διαλύτη, ο οποίος περιέχει στυρένιο (200mM), την αλκοόλη και την υδατική φάση (100 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 2.75) η οποία περιέχει κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (20 units). Στη συνέχεια το μίγμα επωάζεται στους 25-50°C. Με την ολοκλήρωση του χρόνου επώασης, η έναρξη της αντίδρασης πραγματοποιείται με την προσθήκη  $t$ -BHP (200mM). Η εναπομένουσα δραστηριότητα εποξειδωσης της χλωροϋπεροξειδάσης προσδιορίζεται με την χρήση GC όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.5.1.1β.

#### **6.3.5.2.2 Προσδιορισμός της σταθερότητας των $TnL$ , $ThL$ , $BcL$ .**

##### α) Επίδραση του μέσου στη σταθερότητα ελεύθερων λακκασών

Η σταθερότητα των ελεύθερων λακκασών μελετήθηκε σε διαφορά μέσα όπως: α) υδατικό διάλυμα (100mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH 4.6), β) μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (10% κ.ο), γ) αντίστροφα μικκύλια με βαθμό ενυδάτωσης  $w_o=40$  και δ) τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με εξάνιο, είτε με  $\alpha$ -πινένιο, ή με  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλης ποσότητας οργανικού διαλύτη και ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6, το οποίο περιέχει κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (0.02-0.1 units). Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανάδευση για 0-10 ημέρες στις ακόλουθες θερμοκρασίες: 30, 40, 50 και 60°C. Με την συμπλήρωση του χρόνου επώασης, η

εναπομένονσα ενζυμική δραστικότητα της οξείδωσης του ABTS από τις τρεις λακκάσες προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 420nm, με την προσθήκη 1 mM ABTS. Το Enzfitter (Biosoft Corp) ήταν το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των σταθερών απενεργοποίησης ( $k_d$ ).

#### β) Επίδραση του μέσου στη σταθερότητα ακινητοποιημένης λακκάσας από *Trametes versicolor*

Η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λακκάσας από *T. versicolor* σε οργανοπήκτωμα HPMC μετρήθηκε με βάση την οξείδωση της SYR σε διάφορα μέσα όπως: α) μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (70% κ.ο) ή νερού/[bmim][BF<sub>4</sub>] (70% κ.ο), β) σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με εξάνιο, είτε με  $\alpha$ -πινένιο, ή με  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο) και γ) σε διαλύτες όπως: εξάνιο,  $\alpha$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο και [bmim] [BF<sub>4</sub>]. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλης ποσότητας οργανικού διαλύτη, ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6, και 50mg ακινητοποιημένης λακκάσας σε HMPC (2.5 mg πρωτεΐνης g<sup>-1</sup> κυτταρίνης). Το μίγμα επωάζεται υπό ανάδευση για 2 ημέρες στις ακόλουθες θερμοκρασίες: 30, 40, 50 και 60°C. Με την συμπλήρωση του χρόνου επώασης γίνεται προσθήκη 0.216 mM SYR και η εναπομένονσα ενζυμική δραστικότητα της ακινητοποιημένης λακκάσας προσδιορίζεται φωτομετρικά στα 526 nm μέσω της οξείδωσης της SYR, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 6.3.5.1.3β.

#### **6.3.5.2.3 Προσδιορισμός της σταθερότητας ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB**

##### α) Θερμική σταθερότητα

Με σκοπό να μελετηθεί η θερμοσταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης, το ένζυμο επώασθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε οργανικό διαλύτη. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την επώαση ελεύθερης (10 mg) ή ακινητοποιημένης CaLB (R=100 mg πρωτεΐνης g<sup>-1</sup> αργίλου) σε εξάνιο. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανάδευση για 0 έως 72 h σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 40-60°C. Μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος επώασης, η δραστικότητα της λιπάσης προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση, την αντίδραση μετεστεροποίησης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.4α.

### β) Επίδραση οξειδωτικού φορέα

Η επίδραση του οξειδωτικού φορέα στην σταθερότητα της ελεύθερης ή της ακινητοποιημένης λιπάσης μελετήθηκε κατά την χημειοενζυμική εποξειδωση του  $\alpha$ -πινενίου. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την επώαση ελεύθερης (10 mg) ή της ακινητοποιημένης λιπάσης ( $R=100 \text{ mg πρωτεΐνης g}^{-1}$  αργίλου) παρουσία 1.1 mmol οξειδωτικού φορέα (UHP ή  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε εξάνιο. Η επώαση πραγματοποιείται υπό ανάδευση στους  $25^\circ\text{C}$  για 24h. Μετά την επώαση τα ενζυμικά παρασκευάσματα φιλτράρονται και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο, προκειμένου να προσδιοριστεί η εναπομένουσα δραστηριότητα της λιπάσης κατά την αντίδραση εποξειδωσης του  $\alpha$ -πινενίου όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.5.1.4β.

### γ) Επαναχρησιμοποίηση λιπάσης

Μελετήθηκε η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της α) ακινητοποιημένης CaLB σε αργίλους (50 mg,  $R=100 \text{ mg πρωτεΐνης g}^{-1}$  αργίλου), β) της εμπορικά ακινητοποιημένης CaLB (100 mg) και γ) της λυοφιλιωμένης (10 mg) σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης κατά την χημειο-ενζυμική σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό φορέα UHP (1.1 mmol). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.5.1.4β. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης τα ενζυμικά παρασκευάσματα απομακρύνονται από το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρονται και ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, διαιθυλαιθέρα και εξάνιο, προκειμένου να επαναχρησιμοποιηθούν. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 4 κύκλοι αντιδράσεων.

## **6.3.5.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων οξειδοαναγωγασών**

### **6.3.5.3.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων χλωροϋπεροξειδάσης**

#### Θεωρία

Οι χημικές αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα ακολουθούν γενικά την κινητική Michaelis-Menten. Η εξίσωση που περιγράφει αυτήν την κινητική συμπεριφορά είναι η εξής:

$$V = \frac{V_{\max} * [S]}{[S] + K_m} \quad (6.3)$$

$V_{\max}$ : η ταχύτητα της αντίδρασης σε συνθήκες κορεσμού του ενζύμου από το υπόστρωμα

$[S]$ : η συγκέντρωση του υποστρώματος και

$K_m$ : είναι η σταθερά Michaelis-Menten.

Μια άλλη καταλυτική σταθερά που προκύπτει από τη κινητική Michaelis-Menten είναι ο αριθμός μετατροπής  $k_{cat}$  ( $s^{-1}$ ) που σχετίζεται με την μέση ταχύτητα μέσω της εξίσωσης:

$$k_{cat} = \frac{V_{\max}}{[E_o]} \quad (6.4)$$

$[E_o]$ : η αρχική συγκέντρωση του ενζύμου.

### Πειραματική διαδικασία

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων της χλωροϋπεροξειδάσης σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζεται από εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (στυρένιο) περιγράφεται πιο κάτω: αρχικά γίνεται ανάμιξη της κατάλληλης ποσότητας του οργανικού διαλύτη (εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο), ο οποίος περιέχει το στυρένιο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (0-1000 mM), της 2-προπανόλης και της υδατικής φάσης (50 mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών/φωσφορικών pH 5.0), η οποία περιέχει την κατάλληλη ποσότητα ενζύμου (20 units). Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη του οξειδωτικού φορέα *t*-BHP (200mM). Δείγματα παραλαμβάνονται σε διάφορα χρονικά διαστήματα και αναλύονται με την βοήθεια του αέριου χρωματογράφου (GC). Τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου (CPO) ή οξειδωτικού φορέα (*t*-BHP). Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων, όπως της φαινομενικής μέγιστης ταχύτητας,  $V_{\max}^{app}$ , και οι σταθερές Michaelis-Menten,  $K_m^{app}$ , έγιναν με την βοήθεια του προγράμματος μη γραμμικής συσχέτισης Enz-Fit της εταιρείας BIOSOFT. Οι τιμές  $k_{cat}^{app}$  υπολογίστηκαν θεωρώντας ότι 100% του ενζύμου ήταν ενεργό.

#### **6.3.5.3.2 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων των *TnL*, *ThL*, *BcL*.**

##### α) Ελεύθερης λακκάσης από *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *B. cinerea*

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της ελεύθερης λακκάσης από *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *B. cinerea* πραγματοποιήθηκε σε τριαδικά συστήματα που

σχηματίζονται είτε με εξάνιο, είτε με  $\alpha$ -πινένιο, ή με  $d$ - λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο) χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (ABTS). Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη των κατάλληλων ποσοτήτων των διαλυτών με 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6, το οποίο περιέχει 0-1.5 mM ABTS και λακκάση είτε από *T. versicolor* είτε από *T. hisruta* ή *B. cinerea* (0.02-0.1 units). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 0.2 ml. Η πορεία της αντίδρασης προσδιορίζεται με φωτόμετρο τύπου Elisa reader σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η μέτρηση λαμβάνει χώρα στα 420 nm στους 25°C. Τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ενζύμου.

#### α) Ακίνητοποιημένης λακκάσης από *T. Versicolor* σε HPMC

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της ακίνητοποιημένης λακκάσης από *T. versicolor* σε HPMC πραγματοποιήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ - λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο) χρησιμοποιώντας διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (SYR). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη κατάλληλων ποσοτήτων των οργανικών διαλυτών, που περιέχουν 0 -1.2 mM SYR σε μεθανόλη, με 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6. Η έναρξη της αντίδρασης γίνεται με την προσθήκη 50 mg (14 units) ακίνητοποιημένης TvL σε HPMC. Η πορεία της αντίδρασης προσδιορίζεται με φωτόμετρο τύπου Elisa reader σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η μέτρηση λαμβάνει χώρα στα 526 nm στους 25°C. Τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν, ενώ σαν δείγμα αναφοράς χρησιμοποιείται μίγμα αντίδρασης απουσία ακίνητοποιημένης λακκάσης.

#### **6.3.5.4 Αναλυτικές μέθοδοι**

Η ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) α) της οξείδωσης του στυρενίου, και β) της χημειοενζυμικής εποξειδωσης των τερπενίων και του μαστιγελαίου έγινε χρησιμοποιώντας το ακόλουθο θερμοκρασιακό πρόγραμμα: η αρχική θερμοκρασία του φούρνου παρέμενε στους 100°C για 30 sec και στη συνέχεια με ρυθμό 15°C min<sup>-1</sup> αυξάνονταν σε τελική θερμοκρασία 180°C (συνολικός χρόνος προγράμματος 25.8 min). Μικρές τροποποιήσεις του θερμοκρασιακού προγράμματος εφαρμόστηκαν για την ανάλυση της οξείδωσης των ολεφινών και των τερπενολών με την χρήση της αέριας χρωματογραφίας. Η αρχική

θερμοκρασία του φούρνου ήταν 80°C για 1 min και με σταθερό ρυθμό (15°C min<sup>-1</sup>) αυξάνονταν στους 180°C (συνολικός χρόνος προγράμματος 27.6 min).

Για την ανάλυση των τερπενολών και των αντίστοιχων αλδεϋδών τους χρησιμοποιήθηκε η στήλη μBondapak C<sub>18</sub> της Waters (Ireland), με μέγεθος σωματιδίων 10 μm, διαστάσεις 3.9x300 mm και ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων UV/VIS (photodiode array), SPD-M10Avp (Shimadzu, Kyoto, Japan), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class-VP, v.6.1. Η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση από 50 έως 100% ακετονιτρίλιο σε νερό (που περιέχει οξικό οξύ 0.1%), για 22 min στους 27°C με ρυθμό ροής 1ml min<sup>-1</sup>. Πρότυπες καμπύλες προετοιμάστηκαν με διαφορετικές συγκεντρώσεις για τις τερπενόλες και τις αντίστοιχες αλδεϋδες. Τα προϊόντα ανιχνεύτηκαν σε μήκος κύματος 220 ή 240nm.

#### **6.3.5.5 Τεχνικές χαρακτηρισμού της δομής των ενζύμων εγκλωβισμένα σε τριαδικά συστήματα.**

##### **6.3.5.5.1 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)**

###### Αρχή της μεθόδου

Στο DSC ή DSC αντισταθμιζόμενη ισχύος (power compensated DSC), το δείγμα και η ουσία αναφοράς διατηρούνται συνεχώς στην ίδια θερμοκρασία ( $\Delta T = T_s - T_r = 0$ ) μέσω ενός ελεγχόμενου προγράμματος θέρμανσης. Γενικά η μελετώμενη ουσία και η ουσία αναφοράς περιέχονται σε παρόμοιες κάψες και τοποθετούνται σε ξεχωριστές θερμικά αγωγιμες βάσεις. Οι επαφές των θερμοστοιχείων ακουμπάνε στις βάσεις αυτές και έτσι δεν έρχονται κατευθείαν σε επαφή ούτε με το δείγμα ούτε με την ουσία αναφοράς. Συνέπεια της διάταξης αυτής είναι ότι το θερμικό σήμα να μην λαμβάνεται ταυτόχρονα με το θερμικό φαινόμενο αλλά με κάποια καθυστέρηση.

Εάν το δείγμα υποστεί μία ενδόθερμη μεταβολή, κατά την θέρμανση του, τότε ένα επιπλέον ποσό θερμότητας πρέπει να προστεθεί σ' αυτό ώστε η θερμοκρασία του να διατηρείται συνεχώς ίση με αυτήν της ουσίας αναφοράς. Το διάγραμμα που παίρνουμε στην περίπτωση αυτή παριστάνει την επιπλέον ισχύ  $dq/\Delta T$  που προσφέρεται στο δείγμα ώστε η θερμοκρασία του να διατηρείται συνεχώς ίση με αυτήν της ουσίας αναφοράς, σα συνάρτηση της θερμοκρασίας του φούρνου, T. Η μετρούμενη τιμή του  $\Delta T$  δίνεται από τη σχέση :

$$\Delta T = T_s - T_r = R \frac{dT/dt}{C_s - C_r} \quad (6.5)$$

Cs: οι θερμοχωρητικότητες της κάψας με το δείγμα

Cr: οι θερμοχωρητικότητες της κάψας με το δείγμα αναφοράς

R: εξαρτάται μόνο από το όργανο και τη θερμοκρασία

Γενικά δυο τύποι φαινομένων εμφανίζονται σε ένα διάγραμμα: α) ενδόθερμα φαινόμενα όπως τήξη, μετατροπή φάσης, μετάβαση στην υαλώδη κατάσταση, εξαέρωση κλπ. και β) εξώθερμα φαινόμενα όπως κρυστάλλωση, αποσύνθεση, οξειδωση, πολυμερισμός κλπ..

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης λόγω ότι προσδιορίζει τις αλλαγές που συμβαίνουν στην δομή κάποιου μορίου όταν λαβαίνει χώρα κάποια μεταβολή, έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την διερεύνηση των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων διαφόρων βιομορίων [Belopol'skaya *et al.*, 2000]. Πιο συγκεκριμένα η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της σταθερότητας διαφόρων ενζύμων, όπως οξειδάσες γλυκόζης [Zoldák *et al.*, 2004], λιπάσες [Orrego and Valencia, 2009], εστεράσες [Knoshaug *et al.*, 2008], κυτταρινάσες [Wu *et al.*, 2008], υπεροξειδάσες [Zamorano *et al.*, 2008], λακκάσες [Lopez-Cruz *et al.*, 2009],  $\alpha$ -χυμοτριψίνη [De Diego *et al.*, 2004].

### Πειραματική διαδικασία

Η συσκευή DSC 131 (Setaram) διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η θερμοκρασία μετουσίωσης ( $T_d$ ) α) της CPO όταν είναι εγκλωβισμένη σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, 2-προπανάλη και νερό (100mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών pH 2.75) και β) της TvL όταν είναι εγκλωβισμένη σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (100mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH 4.6) με περιεκτικότητα υδατικής φάσης 18.9% κ.ο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ειδικά καψάκια αλουμινίου για υδατικά διαλύματα με δυνατότητα χωρητικότητας όγκου έως και 100  $\mu$ l. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει αρχικά την εισαγωγή των δειγμάτων (100  $\mu$ l) CPO ή λακκάσης σε τριαδικά μέσα στα καψάκια, τα οποία στη συνέχεια σφραγίζονται με τοποθέτηση τους σε ειδικό μηχάνημα με πίεση και ζυγίζονται πριν την τοποθέτηση τους στο όργανο. Σε όλα τα πειράματα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι 0.1 mg ml<sup>-1</sup>. Ως δείγματα αναφοράς χρησιμοποιούνται τα ίδια μέσα απουσία πρωτεΐνης. Το πρόγραμμα θερμοκρασιών που τηρήθηκε για την ανάλυση όλων των δειγμάτων είναι το ακόλουθο: η αρχική θερμοκρασία παραμένει στους 35°C για 15min, ενώ στη συνέχεια με ρυθμό 0.3°C/min αυξάνεται στους 100°C.

#### 6.3.5.5.2 Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός (EPR)

##### Αρχή της μεθόδου

Η φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) ή συντονισμού ηλεκτρονικού spin (ESR) είναι μια τεχνική παρόμοια με την φασματοσκοπία NMR, αλλά στην περίπτωση του EPR το φάσμα παράγεται από τον συντονισμό του ηλεκτρονικού spin μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο και με την επίδραση της ακτινοβολίας.

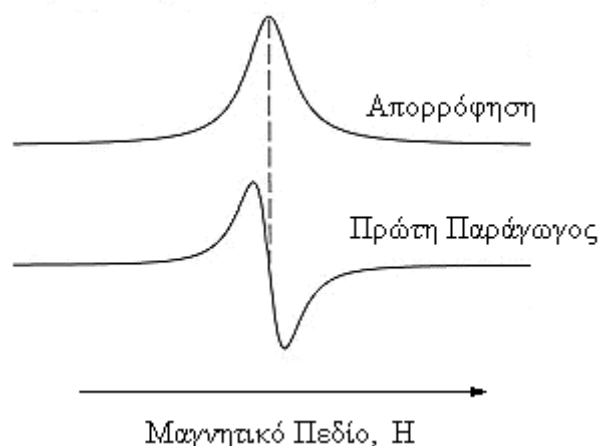
Η τεχνική του EPR οφείλεται στην αρχή ότι κάθε ατομικό σύστημα, το οποίο περιέχει ασύζευκτα ηλεκτρόνια, δημιουργεί μια καθαρή μαγνητική ροπή η οποία αλληλεπιδρά με ένα εφαρμοζόμενο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Στην απλούστερη περίπτωση όπου ένα ελεύθερο άτομο περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο με spin  $S = 1/2$ , το τελευταίο έχει μια από τις δυο πιθανές κατευθύνσεις του spin, που αντιστοιχούν τις επιτρεπόμενες τιμές του κβαντικού αριθμού του spin ( $m_s = +1/2$  ή  $-1/2$ ). Απόντος εξωτερικού μαγνητικού πεδίου οι ενέργειες των δύο καταστάσεων του spin είναι ίσες (εκφυλισμός). Κατά την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου, οι ενέργειες των δυο καταστάσεων του spin μεταβάλλονται και αυξάνουν αντίστοιχα κατά ένα ποσό  $1/2 g \beta H$ , όπου  $H$  είναι το μαγνητικό πεδίο,  $\beta$  η μαγνητόνη του Bohr ( $eh/4\pi mc$ ) ίση περίπου με 1.4 MHz/G και  $g$  ο γυρομαγνητικός λόγος. Ο παράγων  $g$  φανερώνει τη σχέση μαγνητικής ροπής και στροφορμής και ονομάζεται και παράγων Lande. Για το ελεύθερο ηλεκτρόνιο έχει την τιμή 2.0023. Επομένως σε μαγνητικό πεδίο ο διαχωρισμός μεταξύ των δυο ενεργειακών επιπέδων του spin (διαχωρισμός Zeeman) είναι ίσος με  $g \beta H$ . Μεταπτώσεις μεταξύ αυτών των σταθμών (αναστροφής της κατεύθυνσης του spin), μπορούν, κατ'αρχήν, να επαχθούν με ακτινοβολία συχνότητας  $\nu$  έτσι ώστε:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H \quad (6.6)$$

Όπου  $\Delta E$  η διαφορά ενέργειας των δύο καταστάσεων (μετρημένη σε Gauss),  $h$  είναι η σταθερά του Planck,  $\nu$  η συχνότητα της ακτινοβολίας. Η συχνότητα μέτρησης είναι στην περιοχή των μικροκυμάτων, ενώ οι τιμές του μαγνητικού πεδίου ( $H$ ), μεταβάλλονται, ώστε να επιτευχθεί ο συντονισμός. Η σχέση (6.6) αποτελεί την θεμελιώδη εξίσωση της φασματοσκοπίας EPR και είναι γνωστή και ως συνθήκη συντονισμού.

Τα φάσματα EPR, σε αντίθεση με τα φάσματα NMR, λαμβάνονται με σταθερή συχνότητα  $\nu$  και η συνθήκη συντονισμού επιτυγχάνεται με μεταβολή της έντασης του μαγνητικού πεδίου  $H$ . Τα περισσότερα φασματόμετρα EPR λειτουργούν με μικροκυματική ακτινοβολία  $\nu \sim 9.5$  GHz (X band) ή  $\nu \sim 35$  GHz (Q band), όπου το μαγνητικό πεδίο

συντονισμού είναι περί τα 3400 και 12500 G αντίστοιχα για σύστημα με σπιν  $S = 1/2$  και  $g = 2.0$ . Στα περισσότερα φάσματα EPR παρουσιάζεται όχι απευθείας η καμπύλη απορρόφησης αλλά η πρώτη παράγωγος του φάσματος απορρόφησης έναντι του μαγνητικού πεδίου  $H$ , όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.4. Η απλούστερη μορφή ενός φάσματος EPR είναι μόνο μια κορυφή, η οποία χαρακτηρίζεται από την μορφή, από το πλάτος της γραμμής, από τον παράγοντα  $g$  και από την ένταση του σήματος.



**Σχήμα 6.4.** Καμπύλη απορρόφησης και πρώτη παράγωγος του φάσματος απορρόφησης έναντι του μαγνητικού πεδίου  $H$ .

Αξιοσημείωτη είναι η μελέτη των μεταλλοπρωτεϊνών (πρωτεΐνες ενωμένες με ένα μέταλλο, πχ σίδηρο, όπως η αιμοσφαιρίνη) με τη φασματοσκοπία EPR. Πιο συγκεκριμένα εξαιτίας του μετάλλου που υπάρχει στο ενεργό κέντρο των μεταλλοπρωτεϊνών, είναι δυνατόν να μελετηθούν οι φασματοσκοπικές ιδιότητες του μετάλλου και να εξαχθούν σημαντικές πληροφορίες για το μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου του ενζύμου [Walker *et al.*, 1999; Horitani *et al.*, 2008].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ομάδα της αίμης της χλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago*, στην οποία ο σίδηρος είναι στη μορφή χαμηλού σπιν ( $S = 1/2$ ). Γενικά στον  $Fe^{3+}$  τα πέντε ηλεκτρόνια των  $d$  τροχιακών είναι έτσι ζευγαρωμένα ώστε το συνολικό σπιν να είναι  $S=1/2$ . Μια τέτοια περίπτωση προκύπτει όταν (όπως λέγεται) το κρυσταλλικό πεδίο γύρω από το  $Fe^{3+}$  είναι ισχυρό. Στην άλλη περίπτωση τα πέντε ηλεκτρόνια είναι παράλληλα μεταξύ τους και το συνολικό σπιν είναι  $S=5/2$ . Η περίπτωση αυτή εμφανίζεται όταν το κρυσταλλικό πεδίο είναι ασθενές. Οι δύο περιπτώσεις ( $S=1/2$  ή  $5/2$ ) δίνουν τελείως διαφορετικά φάσματα EPR. Στην περίπτωση της χλωροϋπεροξειδάσης, σε θερμοκρασία δωματίου ο σίδηρος είναι υψηλού σπιν γιατί έχει πέντε υποκαταστάτες (και άρα

ασθενέστερο κρυσταλλικό πεδίο). Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (υγρό άζωτο και κάτω) ο σίδηρος παίρνει και ένα έκτο υποκαταστάτη, με αποτέλεσμα το κρυσταλλικό πεδίο να γίνεται ισχυρότερο και τελικά το σπιν να είναι ίσο με  $S=1/2$  (το οποίο και καταγράφεται σε θερμοκρασίες υγρού ηλίου).

#### Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση του μέσου στην δομή της χλωροϋπεροξειδάσης με την χρήση του ηλεκτρικού παραμαγνητικού συντονισμού. Πιο συγκεκριμένα, το περιβάλλον τη αίμης της χλωροϋπεροξειδάσης μελετήθηκε σε διάφορα μέσα όπως: α) σε υδατικό διάλυμα (50mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών pH 5.0) και β) σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, 2-προπανόλη και νερό (50mM ρυθμιστικού διαλύματος κιτρικών pH 5.0). Τα φάσματα του ηλεκτρικού παραμαγνητικού συντονισμού (EPR) καταγράφηκαν με φασματόμετρο ER-200D Bruker λειτουργώντας σε X band. Τα δείγματα περιέχονταν σε σωλήνα κατάλληλο για οργανικά διαλύματα, 734- PQ-8, thin wall suprasil, EPR sample tubes (Wilmad Glass Co., Buena, NJ, USA). Οι ρυθμίσεις του οργάνου ήταν οι εξής: εύρος ρύθμισης 10 Gpp, μικροκυματική συχνότητα 9.41 GHz, μικροκυματική ισχύς 2.2mW και θερμοκρασία  $T = 15K$ . Οι θεωρητικές προσομοιώσεις έγιναν με λογισμικό που προσφέρθηκε από τον καθηγητή M.P. Hendrich, Dept. Of Chemistry, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA, USA.

#### **6.3.5.6 Τεχνικές χαρακτηρισμού της δομής των υλικών**

##### **6.3.5.6.1 Περίθλαση ακτίνων-X**

#### Αρχή της μεθόδου

Η αρχή λειτουργίας βασίζεται στην παραγωγή ηλεκτρονίων με θερμιονική εκπομπή ηλεκτρονίων και επιτάχυνση τους σε κενό. Τα επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια προσπίπτουν στην άνοδο και παράγουν ακτίνες-X. Η δέσμη των ακτίνων-X μέσω διαφραγμάτων προσπίπτει στο δείγμα (το οποίο μπορεί να είναι είτε λεπτή σκόνη είτε υμένια), το οποίο βρίσκεται σε ειδική υποδοχή. Η ανακλώμενη από το δείγμα ακτινοβολία, αφού περάσει από διαφράγματα, καταλήγει στον ανιχνευτή και καταγράφεται από ειδικό υπολογιστικό σύστημα. Το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X αποτελεί την καταγραφή της γωνίας και του αντίστοιχου αριθμού ακτίνων-X που ανιχνεύτηκαν στην συγκεκριμένη γωνία περίθλασης.

Με την τεχνική της περίθλασης ακτίνων-X, μελετώνται στερεά οποιασδήποτε χημικής φύσης όπως απλές και σύνθετες χημικές ενώσεις, κράματα μετάλλων και ορυκτά, οργανικά μόρια. Τα δείγματα περίθλασης ακτίνων-X σε δείγματα σκόνης δίνουν πληροφορίες όπως: α) για την σύνθεση και τον δομικό χαρακτηρισμό ενώσεων, β) για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της περιεκτικότητας του εξεταζόμενου δείγματος, γ) για την ανάλυση της σύστασης ορυκτών και χημικά επεξεργασμένων ορυκτών προϊόντων και δ) για την ανάλυση της σύστασης και δομής κεραμικών και άλλων σύνθετων υλικών, κρυσταλλικών και άμορφων, με μεγάλο τεχνολογικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Τα τελευταία χρόνια η τεχνική της περίθλασης ακτίνων-X έχει χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του ενδοστρωματικού χώρου των φυλλόμορφων υλικών μετά την ένθεση κάποιου επιφανειοενεργού ή βιομορίου σε φυλλόμορφα υλικά [Huang J., *et al.*, 2007, 2008; Serefoglou *et al.*, 2008].

#### Πειραματική διαδικασία

Για τη μελέτη της ακινητοποιημένης CaLB σε οργανικά τροποποιημένους ή μη αργίλους (20-200 mg ενζύμου /g αργίλου) με περίθλαση ακτίνων X χρησιμοποιήθηκε το πλήρως αυτοματοποιημένο περιθλασόμετρο ακτίνων X D8 Advance Brüker (ακτίνες X). Χρησιμοποιήθηκε ακτινοβολία  $\text{CuK}_\alpha$  (40kV, 40mA) και σύστημα μονοχρωματισμού περιθλώμενης δέσμης. Τα διαγράμματα των ακτίνων-X μετρήθηκαν στην περιοχή  $2\theta$  από  $2^\circ$  έως  $12^\circ$ , με βήμα περιστροφής  $0.02^\circ$  και χρόνο μέτρησης 2 sec ανά βήμα.

#### **6.3.5.6.2 Φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS)**

##### Αρχή της μεθόδου

Η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X, γνωστή και ως ηλεκτρονική φασματοσκοπία για χημική ανάλυση (ESCA) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό της σύνθεσης μιας επιφάνειας. Η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X, βασίζεται στις φωτοηλεκτρικές ιδιότητες [Einstein, 1905], και αναπτύχθηκε στα μέσα του 1960 από τον Kai Siegbahn και την ερευνητική του ομάδα στο πανεπιστήμιο της Uppsalla, στη Σουηδία [Siegbahn *et al.*, 1967]. Η ανάλυση ενός δείγματος γίνεται με ακτινοβολήση με χαμηλής ενέργειας ακτίνων-X, για να ιονιστούν τα άτομα και να απελευθερωθεί από τον πυρήνα-κέντρο τα φωτοηλεκτρόνια. Τα φωτοηλεκτρόνια συλλέγονται από ένα όργανο το οποίο προσδιορίζει την ενέργεια πρόσδεσης των φωτοηλεκτρονίων μέσω της εξίσωσης:

$$E_k = h\nu - E_b \quad (6.7)$$

Όπου  $E_k$  η κινητική ενεργεία φωτοηλεκτρονίων,  $h$  είναι η σταθερά του Planck,  $\nu$  η συχνότητα της ακτινοβολίας και  $E_b$  η ενέργεια πρόσδεσης.

Λόγω ότι κάθε στοιχείο έχει διαφορετική ενέργεια πρόσδεσης, η φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση διαφορετικών στοιχείων σε μία επιφάνεια. Στον Πίνακα 6.4 παρουσιάζονται οι ενέργειες πρόσδεσης διαφόρων λειτουργικών ομάδων. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατόν ο προσδιορισμός της ποσοτικής συγκέντρωσης του κάθε στοιχείου στην επιφάνεια του υλικού. Επιπλέον μικρές μετατοπίσεις στην ενέργεια πρόσδεσης (χημικές μετατοπίσεις) παρέχουν πληροφορίες για την χημική σύσταση του δείγματος

**Πίνακας 6.4.** Ενέργεια πρόσδεσης διαφόρων λειτουργικών ομάδων

| Λειτουργική Ομάδα  | Δεσμός       | Ενέργεια Πρόσδεσης (eV) |
|--------------------|--------------|-------------------------|
| Υδρογονάνθρακας    | C-H, C-C     | 285.0                   |
| Αμίνη              | C-N          | 286.0                   |
| Αλκοόλη, αιθέρας   | C-O-H, C-O-C | 286.5                   |
| Cl δεσμευμένο σε C | C-Cl         | 286.5                   |
| F δεσμευμένο σε C  | C-F          | 287.8                   |
| Καρβονύλιο         | C=O          | 288.0                   |
| Πρωτεΐνη           | C=O          | 288.5                   |

Το XPS είναι κατάλληλο για την ανάλυση τόσο αγώγιμων υλικών όσο και μονωτών. Επίσης χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό μορίων στην επιφάνεια στερεών φορέων μετά την ακινητοποίηση κάποιου βιομορίου πχ ενζύμου [Deng *et al.*, 2004; Mahapatro *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Serefoglou *et al.*, 2008].

#### Πειραματική διαδικασία

Η μελέτη της ακινητοποιημένης CaLB σε οργανόφιλους αργίλους (100 mg ενζύμου /g αργίλου) με φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X, έγινε με το φωτοηλεκτρονικό φασματόμετρο SSX-100 (Surface Science Instruments) εφοδιασμένο με μονοχρωματική Al  $K_{\alpha}$  πηγή ακτίνων X ( $h\nu = 1486.6$  eV). Η πίεση στο φασματόμετρο ρυθμίστηκε στα  $10^{-10}$  Torr, ενώ η ενέργεια ανάλυσης στα 1.16 eV προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος μέτρησης. Η θερμοκρασία στη γωνία εκτόξευσης του φωτοηλεκτρονίου ρυθμίστηκε στους 37°C, ενώ μια

αντλία ροής ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε για να αντισταθμίσει τη φόρτιση του δείγματος. Ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε άργιλο διασπείρεται σε απιονισμένο νερό, αναδεύεται και στη συνέχεια τοποθετείται σε μπανάκι υπερήχων για 10 λεπτά. Μια μικρή σταγόνα από το αιώρημα εναποτίθεται πάνω στο υπόστρωμα και αφήνεται να ξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Ταινίες χρυσού σε γυαλί εξυπηρετούν ως υποστρώματα. Οι ενέργειες πρόσδεσης του ακινητοποιημένου ενζύμου στον άργιλο ήταν σε αναφορά με την Si 2p ενέργεια πρόσδεσης των πυριτικών αργίλων (102.8 eV), ενώ η ενέργεια πρόσδεσης της ελεύθερης CaLB, ήταν σε αναφορά με την κορυφή των δεσμών C-C/C-H σε φάσμα C 1s στα 284.7 eV [Mahapatro *et al.*, 2006]. Η ανάλυση των φασμάτων του ακινητοποιημένου ενζύμου σε οργανόφιλους αργίλους έγινε με το λογισμικό WinSpec (LISE-Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Βέλγιο). Τα φάσματα των δειγμάτων αφαιρούνταν πάντα από τα δείγματα αναφοράς που ήταν σκέτος ο φορέας ακινητοποίησης. Ο διαχωρισμός των κορυφών έγινε κατά Gauss, ενώ για την καλύτερη προσαρμογή (fitting) των κορυφών, έγινε χρήση της χαμηλότερης πιθανής τιμής του παράγοντα  $\chi^2$ .

#### 6.3.5.6.3 Φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR)

##### Αρχή της μεθόδου

Η απορροφούμενη υπέρυθρη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει τα μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης, που είναι κβαντισμένες. Αυτό παρατηρείται όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών.

Στην περιοχή υπερύθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας παρατηρούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε εκτάσεις και κάμψεις των δεσμών των μορίων. Ζώνες απορρόφησης προκύπτουν και από άλλους τρόπους δόνησης, όπως είναι οι δονήσεις αιώρησης, συστροφής και παραμόρφωσης [Pecsok *et al.*, 1980]. Η ποσοτική σχέση μεταξύ της έντασης του φωτός, που διαπερνά το δείγμα της ουσίας και τη συγκέντρωσή της στην παστίλια δίνεται από το νόμο Beer-Lambert-Bouguer:

$$\log(I_0/I) = \epsilon c l \quad (6.8)$$

όπου  $\epsilon$ : ο συντελεστής απόσβεσης. Ο νόμος ισχύει μόνο για μονοχρωματικό φως και για μικρές συγκεντρώσεις. Εφόσον στα φάσματα καταγράφεται συνήθως η διαπερατότητα συναρτήσει της συχνότητας, σε κυματαριθμούς, η εξίσωση (6.8) μπορεί να γραφεί ώστε να δίνεται η διαπερατότητα (T) και η απορρόφηση (A).

$$A = \log(1/T) = \log(I_0/I) = \epsilon c l \quad (6.9)$$

Γενικά η υπέρυθη φασματοσκοπία (IR) είναι μια από τις σημαντικότερες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές στην ενόργανη ανάλυση. Πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τον χαρακτηρισμό των υλικών μετά την ακινητοποίηση κάποιου βιομορίου πχ ενζύμων [Serefoglou *et al.*, 2008; Huang J., *et al.*, 2008; Carja *et al.*, 2009b], καθώς στο εύρος της υπέρυθρης ακτινοβολίας απορροφούν τόσο οι αμιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών όσο και οι δεσμοί που είναι χαρακτηριστοί για τους φυλλόμορφους αργίλους. Οι χαρακτηριστικοί δεσμοί καθώς και η περιοχή εμφάνισης τους για τον άργιλο, το επιφανειοενεργό (για τους οργανοτροποποιημένους αργίλους) ή το ένζυμο παρατίθενται στον Πίνακα 6.5.

**Πίνακας 6.5.** Χαρακτηριστικοί δεσμοί για τον άργιλο, το επιφανειοενεργό και το ένζυμο

| Προέλευση       | Περιοχή (cm <sup>-1</sup> ) | Δεσμοί                                                 |
|-----------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------|
| Άργιλος         | 460                         | Δονήσεις τάσης Si-O                                    |
|                 | 1000                        | Δονήσεις τάσης Si-O-Si                                 |
|                 | 1600-1700                   | Amide I :δονήσεις έκτασης C=O                          |
|                 | 1480-1560                   | Amide II :δονήσεις κάμψης N-H                          |
| Ένζυμο          |                             | δονήσεις έκτασης N- C                                  |
|                 | 1200-1350                   | Amide III : δονήσεις κάμψης N-H                        |
|                 |                             | δονήσεις έκτασης N- C                                  |
| Επιφανειοενεργό | 2851                        | Δονήσεις έκτασης -CH <sub>2</sub> και -CH <sub>3</sub> |
|                 | 2928                        | Δονήσεις έκτασης -CH <sub>2</sub> και -CH <sub>3</sub> |

Επιπλέον η υπέρυθη φασματοσκοπία έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών [Fu *et al.*, 1999; Servagent-Noinville *et al.*, 2000; Natalello *et al.*, 2005]. Για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται κυρίως οι περιοχές Amide I και Amide III [Cai and Singh, 1999]. Η περιοχή Amide I εκτείνεται από 1600-1700 cm<sup>-1</sup> όπου ανιχνεύονται δονήσεις έκτασης C=O, ενώ η περιοχή Amide III εκτείνεται από 1200-1350 cm<sup>-1</sup> όπου ανιχνεύονται δονήσεις έκτασης N-C και δονήσεις κάμψης N-H [Yu, 2006].

#### α) Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της δομής των υλικών

Για τη μελέτη της ακινητοποιημένης CaLB σε οργανικά τροποποιημένους ή μη αργίλους (20 - 200 mg ενζύμου /g αργίλου) με φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου χρησιμοποιήθηκε το

φασματομέτρο FT-IR 8400 (της εταιρίας SHIMADZU), το οποίο είναι εφοδιασμένο με ανιχνευτή τύπου DTGS. Το κάθε φάσμα είναι ο μέσος όρος 32 φασμάτων, στην περιοχή  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  με διακριτική ικανότητα  $2.0\text{ cm}^{-1}$ . Τα δείγματα αναμιγνύονται με KBr και λειοτριβούνται σε γουδί από αχάτη ώστε τα σωματίδια να αποκτήσουν μέγεθος μικρότερο του μήκους κύματος του προσπίπτοντος φωτός από την πηγή του οργάνου. Ακολουθεί πίεση στα  $1000\text{ kg/cm}^2$  για το σχηματισμό των δισκίων μέτρησης που περιέχουν ~ 5% κ.β. δείγμα

#### β) Πειραματική διαδικασία για τη μελέτη της δομής του ακινητοποιημένου ενζύμου

Το φάσμα του υδατικού διαλύματος της CaLB (σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM κιτρικών/φοσφορικών pH 6.0, με συγκέντρωση πρωτεΐνης: 1.5 mg/ml) μετρήθηκε σε κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνίδιου με την τεχνική της εξασθένησης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflectance, ATR). Το φάσμα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε οργανόφιλους αργίλους (200 mg ενζύμου /g αργίλου) μετρήθηκε σε δισκίο (pellet) KBr (5 mg ακινητοποιημένου ενζύμου ανά 200 mg KBr). Κάθε φάσμα, ήταν ο μέσος όρος 32 σαρώσεων, με ανάλυση  $4\text{ cm}^{-1}$  στα  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Αναφέρεται ότι, τόσο στα υγρά όσο και στα στερεά πρωτεϊνικά σκευάσματα, τα πρωτεϊνικά φάσματα αποκτήθηκαν αφού πρώτα αφαιρέθηκε το φάσμα από το ρυθμιστικό διάλυμα και από τον φορέα ακινητοποίησης, ρυθμίζοντας τον παράγοντα αφαίρεσης έτσι ώστε να αποκτηθεί επίπεδη γραμμή (flat baseline) στην περιοχή  $2200-1800\text{ cm}^{-1}$ . Το λογισμικό WinSpec (LISE-Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, Βέλγιο) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων και την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Σε όλα τα φάσματα πραγματοποιήθηκε εξομάλυνση με την εξίσωση Savitsky-Golay 11 σημείων για την απομάκρυνση πιθανού θορύβου από την περιοχή Amide I [Serefoglou *et al.*, 2008]. Οι κορυφές που χρησιμοποιούνται είναι κορυφές κατά Gauss. Οι παράμετροι που εξετάζονται είναι η ένταση, η θέση και το πλάτος. Οι τιμές των θέσεων είναι οι τιμές των αρνητικών κρυφών από τη δεύτερη παράγωγο. Στην παράμετρο αυτή ορίζονται περιορισμοί απόκλισης  $\pm 2\text{ cm}^{-1}$  από τη θέση που έχουμε ορίσει. Το πλάτος για την περιοχή Amide I ορίζεται η τιμή  $11\text{ cm}^{-1}$ . Ουσιαστικά η παράμετρος αυτή ορίζεται ως Half-bandwidth (HW) και αντιπροσωπεύει το πλάτος στο μισό ύψος της κάθε κορυφής. Τα φάσματα επεξεργάζονται σταδιακά ξεκινώντας από την παράμετρο της έντασης έχοντας σταθερές τις άλλες δυο παραμέτρους στις αρχικές τιμές που ορίσαμε. Στη συνέχεια εισάγεται στην επεξεργασία η δεύτερη παράμετρος και τέλος η τρίτη. Μέσω της διαδικασίας αυτή επιτυγχάνεται καλύτερη

προσαρμογή (fitting) των κορυφών, ενώ η καλύτερη ανάλυση γίνεται στην χαμηλότερη πιθανή τιμή του παράγοντα  $\chi^2$ , ο οποίος υπολογίζεται σε κάθε κύκλο υπολογισμών.

#### **6.3.5.6.4 Θερμική Ανάλυση (TGA/DTA)**

##### Αρχή της μεθόδου

Ο όρος «θερμική ανάλυση» είναι γενικός και περιλαμβάνει μια ομάδα τεχνικών με τις οποίες μετρώνται οι φυσικές ιδιότητες ενός σώματος ή των προϊόντων της διάσπασής του, όταν αυτό θερμαίνεται ή ψύχεται με σταθερό ρυθμό θέρμανσης ή ψύξης. Τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά τη θερμική ανάλυση ενός δείγματος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, φυσικά και χημικά. Οι δυο κύριες τεχνικές της θερμικής ανάλυσης είναι:

Η θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TGA) στηρίζεται στη μέτρηση των αλλαγών του βάρους της μετασχηματιζόμενης ουσίας σε συνάρτηση με την θερμοκρασία. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η χημική σύσταση και η αναλογία των φάσεων σε κάποιο στερεό δείγμα και να μελετηθεί η κινητική μετασχηματισμού των φάσεων. Δηλαδή με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής υπολογίζεται η μεταβολή του βάρους κατά τη αύξηση της θερμοκρασίας, σε περιπτώσεις οξείδωσης, διάσπασης κ.τ.λ.

Η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) κατά την οποία μετράται η διαφορά θερμοκρασίας  $\Delta T$  μεταξύ του δείγματος και ενός θερμικά αδρανούς υλικού αναφοράς σε συνάρτηση της θερμοκρασίας. Μετράται δηλαδή διάφορα «θερμικού περιεχομένου». Πιο συγκεκριμένα τόσο το εξεταζόμενο δείγμα όσο και το υλικό αναφοράς (που είναι συνήθως  $\alpha$ -αλούμινα) υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή ψύξης, το οποίο είναι συνήθως γραμμικό σε σχέση με το χρόνο. Αρχικά, υπάρχει μία μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ δείγματος και υλικού αναφοράς, εφόσον το δείγμα δεν υπόκειται σε καμία φυσική ή χημική μεταβολή. Εάν ωστόσο λαμβάνει χώρα οποιαδήποτε διεργασία, τότε ανάμεσα στο δείγμα και το υλικό αναφοράς αναπτύσσεται μια θερμοκρασιακή διαφορά  $\Delta T$ .

Κατά τη διάρκεια μίας ενδόθερμης μεταβολής, όταν δηλαδή το δείγμα τήκεται ή εφυδατώνεται, η θερμοκρασία του δείγματος είναι κατώτερη από αυτήν του υλικού αναφοράς. Αυτή η κατάσταση είναι μεταβατική, διότι με την ολοκλήρωση της διεργασίας το δείγμα αποκτά εκ νέου μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά, συγκρινόμενο με το υλικό αναφοράς. Έστω ότι μία ενδόθερμη διεργασία λαμβάνει χώρα στο χώρο S (όπου ισχύει  $\Delta H > 0$ , όπως στην τήξη). Κατά την διάρκεια του φαινομένου αυτού η θερμοκρασία του δείγματος  $T_s$  εμφανίζεται μικρότερη από αυτήν της αναφοράς  $T_r$ , η οποία ακολουθεί την

προγραμματισμένη θέρμανση. Εάν η διαφορά θερμοκρασίας  $\Delta T = T_s - T_r$  καταγραφεί συναρτήσει του  $T_r$ , λαμβάνεται καμπύλη. Η επιφάνεια  $A$  είναι ανάλογη της διαφοράς ενθαλπίας  $\Delta H$  της διεργασίας. Στα σύγχρονα όργανα θερμικής ανάλυσης, το εμβαδόν  $A$  υπολογίζεται κατ' ευθείαν με ηλεκτρονική ολοκλήρωση. Στην συνέχεια το εμβαδόν συνδέεται με τη  $\Delta H$  μέσω της σχέσης:

$$\Delta H = A \cdot \frac{K}{m} \quad (6.10)$$

όπου  $m$ : η μάζα του δείγματος και  $K$ : η σταθερά βαθμονόμησης του οργάνου.

Η θερμική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την μελέτη των υλικών όταν υφίσταται μεταβολή της κατάστασης τους, αλλά και για τον χαρακτηρισμό των υλικών, όταν σε αυτά έχουν ακινητοποιηθεί ένζυμα [Serefoglou *et al.*, 2008; Yapar *et al.*, 2009; Carja *et al.*, 2009a].

#### Πειραματική διαδικασία

Για τις θερμοβαρυτομετρικές (TGA) και διαφορικές θερμικές (DTA) αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το όργανο Rerkin Elmer Pyris Diamond TG/DTA. Κάθε δείγμα (ακινητοποιημένη CaLB σε οργανικά τροποποιημένους ή μη αργίλους, με περιεκτικότητα πρωτεΐνης 20-200 mg ενζύμου /g αργίλου), βάρους περίπου 5 mg, θερμάνθηκε από τους 30°C έως τους 550°C, με ρυθμό 5°C/min. Ως υλικό αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η  $\alpha$ -αλούμινα.

#### **6.3.5.6.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM)**

##### Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση μιας δέσμης ηλεκτρονίων με άτομα στην επιφάνεια ενός στερεού, συνήθως σε περιβάλλον κενού. Η τεχνική SEM χρησιμοποιείται για τοπογραφικές μελέτες επιφανειών στο σύνολο σχεδόν των στερεών (μέταλλα, ημιαγωγοί, μονωτές, πολυμερή, βιολογικά υλικά κ.α.) με την προϋπόθεση ότι αυτά είναι σταθερά στο περιβάλλον κενού της μέτρησης και η επιφάνεια τους δεν τροποποιείται φυσικοχημικά από τη δέσμη ηλεκτρονίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης έχει διακριτική ικανότητα της τάξης των 10nm, πολύ μεγαλύτερη από εκείνη των πιο εξελεγμένων οπτικών μικροσκοπίων.

### Πειραματική διαδικασία

Οι εικόνες από την ακινητοποιημένη CaLB σε οργανικά τροποποιημένους ή μη αργίλους, με περιεκτικότητα πρωτεΐνης 20 - 200 mg ενζύμου /g αργίλου, ελήφθησαν από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης JEOL HSM-5600V στα 20 Kv. Τα προς μελέτη δείγματα τοποθετούνται σε λωρίδες αλουμινίου, οι οποίες έχουν επικαλυφθεί με άνθρακα και από τις δυο μεριές. Για την αποφυγή της ηλεκτρικής φόρτισης της επιφάνειας επιβάλλεται η χρήση αγώγιμων επικαλυπτικών στρωμάτων. Το στρώμα πρέπει να είναι αρκετά παχύ ούτως ώστε να δημιουργεί ένα αγώγιμο μονοπάτι, αλλά και όσο γίνεται πιο λεπτό, για να αποφευχθεί η κάλυψη των λεπτομερειών. Στη συγκεκριμένη εργασία τα δείγματα επικαλύφθηκαν με λεπτό υμένιο από αγώγιμο μέταλλο (Au).

---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

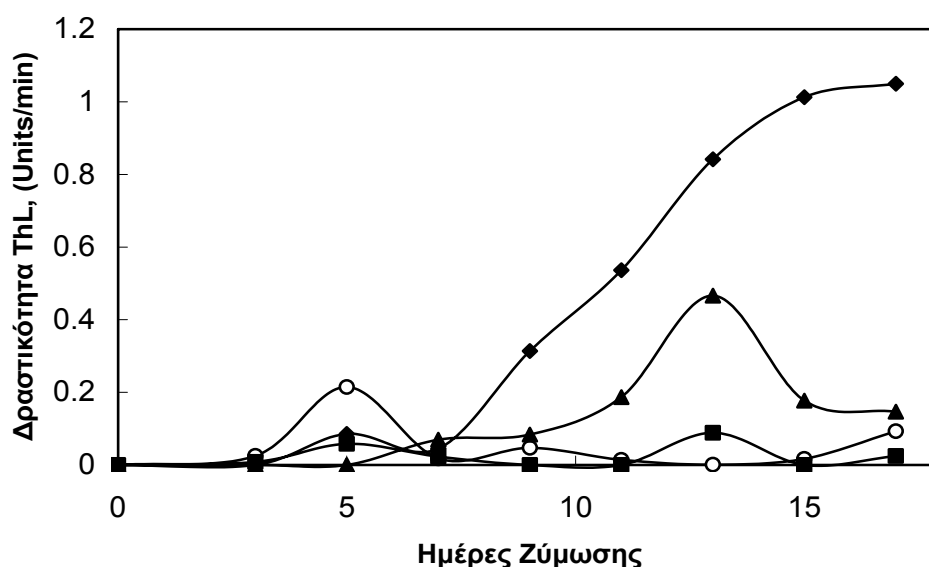
### **7.1 Παραγωγή λακκασών από τους μύκητες *Trametes hirsuta* και *Botrytis cinerea***

Στην παρούσα εργασία αρχικά διερευνήθηκε η ικανότητα παραγωγής λακκάσης από τους μικροοργανισμούς *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) και *B. cinerea* (DSMZ 877), με σκοπό να μελετηθεί η εφαρμογή των ενζύμων αυτών σε μη υδατοσυμβατά οργανικά μη τοξικά συστήματα για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών με στόχο την βιομετροπή ενώσεων φυτικής προέλευσης όπως αυτές που απατώνται στο μαστιχέλαιο. Προς την κατεύθυνση αυτή η παραγωγή των λακκασών σε μικρή κλίμακα από τους μύκητες *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) και *B. cinerea* (DSMZ 877) πραγματοποιήθηκε σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer του 1l. Οι βασικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τη ζύμωση αυτή, μελετήθηκαν με σκοπό την μεγιστοποίηση της ενζυμικής παραγωγής.

#### **7.1.1 Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στην παραγωγή λακκασών**

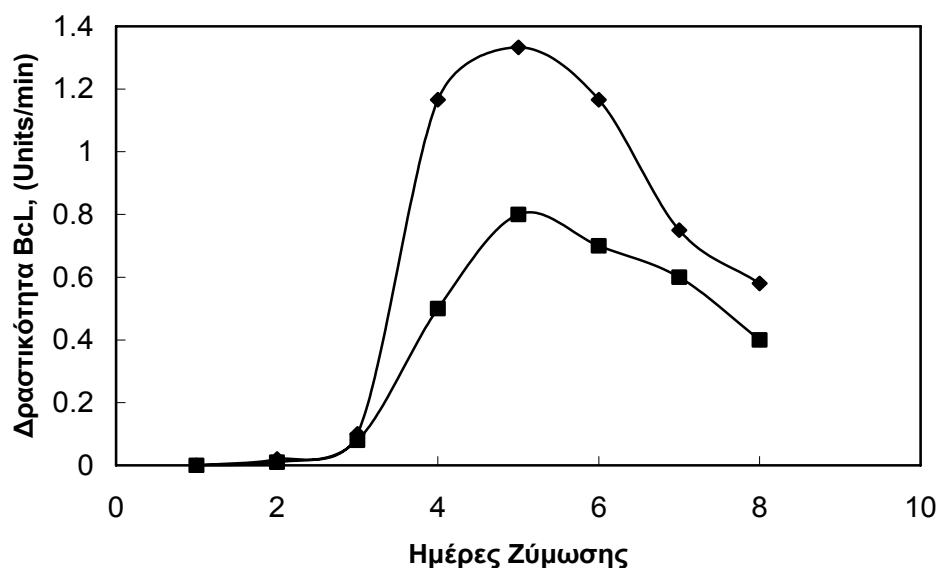
Η παραγωγή λακκάσης μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τόσο διαφορετικά είδη μυκήτων (*Trametes* ή *Botrytis*) όσο και διαφορετικά στελέχη του ίδιου είδους (*T. hirsuta* 3511 και 5072). Με σκοπό να επιλεγούν σε πρώτη φάση οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του κάθε μύκητα μελετήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος κατά την παραγωγή του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα για τον κάθε μύκητα χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.1.2, τα οποία διαφέρουν ως προς την πηγή του άνθρακα και του αζώτου, καθώς η πηγή των ανόργανων στοιχείων ήταν η ίδια σε όλες τις περιπτώσεις. Ως πηγή άνθρακα (εκτός από τη γλυκόζη) και αζώτου, δοκιμάστηκαν διάφορες ενώσεις ως προς την δυνατότητα τους να επάγουν την παραγωγή των εξεταζόμενων ενζύμων. Συγκεκριμένα για τον μύκητα *B. cinerea* η διαφορά στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν είναι ότι το θρεπτικό μέσο (N1) έχει εκχύλισμα βύνης και ζύμης ως πηγή αζώτου, ενώ το μέσο (N2) έχει πίτυρο σίτου το οποίο χρησιμοποιείται ως πηγή αζώτου και άνθρακα. Αντίστοιχα η διαφορά στα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για

τους μύκητες *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) είναι ότι το θρεπτικό μέσο (N3) έχει εκχύλισμα βύνης ως πηγή αζώτου, ενώ το θρεπτικό μέσο (N4) περιέχει πίτυρο σίτου ως πηγή αζώτου και άνθρακα. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.1, από τα λιγνοκυτταρινούχα υλικά, οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα και οι βιταμίνες που περιέχονται στο ακατέργαστο πίτυρο σίτου στο θρεπτικό μέσο N4, ήταν οι καλύτερες πηγές άνθρακα και αζώτου για την παραγωγή λακκασών από τον μύκητα *T. hirsuta* 5072 (ThL). Για το λόγο αυτό το θρεπτικό μέσο N4 χρησιμοποιήθηκε στις επόμενες μελέτες παραγωγής λακκάσης από το στέλεχος 5072 του μύκητα *T. hirsuta*.



**Σχήμα 7.1.** Επίδραση του στελέχους του μύκητα και του θρεπτικού υποστρώματος στην παραγωγή λακκάσης από *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072). Συμβολισμοί: (▲) *Trametes st.* 5072 θρεπτικό μέσο (N3), (◆) *Trametes st.* 5072 θρεπτικό μέσο (N4), (○) *Trametes st.* 3511 θρεπτικό μέσο (N3), (■) *Trametes st.* 3511 θρεπτικό μέσο (N4).

Αντίθετα, στην περίπτωση του *B. cinerea* οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα και οι βιταμίνες που περιέχονται στο πίτυρο σίτου στο θρεπτικό υπόστρωμα N2, δεν οδήγησαν σε αυξημένες αποδόσεις παραγωγής λακκάσης. Όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 7.2 η παραγωγή λακκάσης στο θρεπτικό μέσο N1, το οποίο σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα N2 περιέχει εκχύλισμα βύνης και εκχύλισμα ζύμης ως πηγή αζώτου, οδηγεί σε πιο αυξημένες αποδόσεις κατά 50%. Για το λόγο αυτό στις επόμενες μελέτες παραγωγής του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο N1.

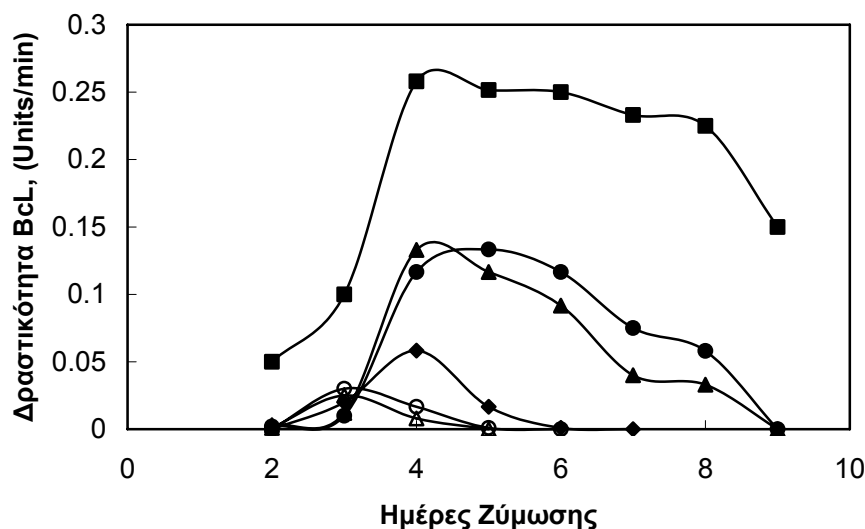


**Σχήμα 7.2.** Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στην παραγωγή λακκάσης από *B. cinerea*. Συμβολισμοί: (♦) θρεπτικό μέσο (N1), (■) θρεπτικό μέσο (N2).

### 7.1.2 Επίδραση του ενεργοποιητή στην παραγωγή λακκάσης

Μετά τον καθορισμό του θρεπτικού υποστρώματος για τον κάθε μύκητα, διάφοροι ενεργοποιητές (επαγωγείς-inducers) δοκιμάστηκαν ως προς την δυνατότητα τους να επάγουν την παραγωγή του εξεταζόμενου ενζύμου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του *Botrytis cinerea* εξετάστηκαν οι ακόλουθοι ενεργοποιητές: α) 2.5-ξυλιδίνη (5-25 mM), β)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g), γ) γαλλικό οξύ (0.1 g) και δ) ο συνδυασμός 2.5-ξυλιδίνη (5 mM) και  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g). Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι ούτε τα ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ , ούτε η 2.5-ξυλιδίνη, αλλά ούτε και ο συνδυασμός μεταξύ των δύο αναγνωρίστηκε ως εν δυνάμει ενεργοποιητής για την αύξηση της παραγωγής της λακκάσης. Σε αντίθετη περίπτωση, μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα ( $2.58 \text{ U ml}^{-1}$ ) παρατηρήθηκε όταν προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα γαλλικό οξύ. Μάλιστα η δραστηριότητα αυξήθηκε κατά 20 φορές και σε μικρότερο χρονικό διάστημα (4 ημέρες) εν συγκρίσει με την δραστηριότητα που αποκτήθηκε απουσία ενεργοποιητή. Γενικά η χρήση γαλλικού οξέος έχει παρατηρηθεί ότι επάγει την παραγωγή της λακκάσης [Fortina *et al.*, 1996]. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι η παραγωγή της λακκάσης που επιτεύχθηκε στην παρούσα εργασία από τον μύκητα *B. cinerea* με την χρήση του γαλλικού οξέος, υπερτερεί σε σχέση με άλλες δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες έχει υπολογιστεί ότι η παραγωγή της λακκάσης είναι κατά προσέγγιση  $1.6 \text{ U ml}^{-1}$  μετά από 15 ημέρες ζύμωσης [Minussi *et al.*, 2007]. Στο Σχήμα 7.3 παρουσιάζεται η επίδραση των

διαφόρων ενεργοποιητών στην παραγωγή της λακκάσης από *B. cinerea* (BcL) στο θρεπτικό μέσο N1.



**Σχήμα 7.3.** Επίδραση του ενεργοποιητή στην παραγωγή λακκάσης από *B. cinerea* στο θρεπτικό μέσο N1. Συμβολισμοί: (■) γαλλικό οξύ (0.1 g/l), (▲) 25 mM 2.5-ξυλιδίνη, (●) απουσία ενεργοποιητή, (◆) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1 g/l), (○) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη, (Δ) 5 mM 2.5-ξυλιδίνη και CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1 g/l).

Στην περίπτωση του μύκητα *T. hirsuta* 5072 εξετάστηκαν οι ακόλουθοι ενεργοποιητές στο θρεπτικό μέσο N4: α) 2.5-ξυλιδίνη (5-25 mM), β) CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1 g) και γ) ο συνδυασμός 2.5-ξυλιδίνη (5 mM) και CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0.1 g). Από τα αποτελέσματα χρήσης των παραπάνω ενεργοποιητών παρατηρήθηκε επαγωγή της παραγωγής της λακκάσης σχεδόν σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα η προσθήκη ιόντων Cu<sup>2+</sup> στο θρεπτικό μέσο οδήγησε σε αυξημένη, αν και καθυστερημένη, ενζυμική ενεργότητα. Παρόμοια παραγωγή ενζύμου και σε μικρότερο χρονικό διάστημα παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της 2.5-ξυλιδίνης (5 mM). Πράγματι βιβλιογραφικά έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή λακκάσης από τα στελέχη *Trametes* sp., όταν χρησιμοποιείται 2.5-ξυλιδίνη ως ενεργοποιητής [Jang *et al.*, 2006]. Η αύξηση όμως της συγκέντρωσης της 2.5-ξυλιδίνης κατά 5 φορές δεν αύξησε ανάλογα και την παραγωγή του εξεταζόμενου ενζύμου. Η μεγαλύτερη ενζυμική ενεργότητα (5.89 U ml<sup>-1</sup>) παρατηρήθηκε όταν προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα ταυτόχρονα ιόντα Cu<sup>2+</sup> και 2.5-ξυλιδίνη (5 mM). Η ενεργότητα που υπολογίστηκε σε αυτή την περίπτωση ήταν κατά 12.5 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την δραστηκότητα που αποκτήθηκε απουσία ενεργοποιητή. Στον Πίνακα 7.1 παρουσιάζονται τα συγκεντρωτικά

αποτελέσματα χρήσης των διαφόρων ενεργοποιητών κατά την παραγωγή λακκάσης από *B. cinerea* και *T. hirsuta*.

**Πίνακας 7.1.** Επίδραση της χρήσης διαφορετικών ενεργοποιητών στην παραγωγή λακκάσης από *B. cinerea* και *T. hirsuta* (DSMZ 5072).

| Συνθήκες ανάπτυξης                                                       | <i>Trametes hirsuta</i> (5072) |                               | <i>Botrytis cinerea</i>    |                               |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
|                                                                          | Δραστικότητα<br>(Units/ml)     | Χρόνος<br>Ζύμωσης<br>(ημέρες) | Δραστικότητα<br>(Units/ml) | Χρόνος<br>Ζύμωσης<br>(ημέρες) |
| Απουσία ενεργοποιητή                                                     | 0.47                           | 13                            | 0.13                       | 5                             |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (0.1 g/l)                           | 1.01                           | 15                            | 0.06                       | 4                             |
| 5 mM 2.5-ξυλιδίνη                                                        | 0.99                           | 11                            | 0.03                       | 3                             |
| 25 mM 2.5-ξυλιδίνη                                                       | 1.21                           | 11                            | 0.13                       | 4                             |
| 5 mM 2.5-ξυλιδίνη και<br>CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (0.1 g/l). | 5.89                           | 13                            | 0.03                       | 3                             |
| Γαλλικό οξύ (0.1 g/l)                                                    | δ.π                            | δ.π                           | 2.58                       | 4                             |

δ.π.: δεν προσδιορίστηκε

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, για την παραγωγή λακκάσης από τον μύκητα *Botrytis cinerea* επιλέχθηκε το θρεπτικό μέσο N1, χρησιμοποιώντας ως ενεργοποιητή το γαλλικό οξύ. Στην περίπτωση του μύκητα *T. hirsuta* 5072 η παραγωγή της λακκάσης επιχειρήθηκε στο θρεπτικό μέσο N1, χρησιμοποιώντας ως ενεργοποιητές την ταυτόχρονη χρήση 2.5-ξυλιδίνη και ιόντα Cu<sup>2+</sup>.

## 7.2 Καθαρισμός λακκασών από τους μύκητες *Trametes hirsuta* και *Botrytis cinerea*

Μετά την παραγωγή των λακκασών από τους δύο μύκητες (*B. cinerea* και *T. hirsuta* 5072) στις βέλτιστες συνθήκες ζύμωσης, επιχειρήθηκε ο μερικώς καθαρισμός των ενζύμων. Προς την κατεύθυνση αυτή ο μερικώς καθαρισμός της λακκάσης από τον μύκητα *Botrytis cinerea* πραγματοποιήθηκε με καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, ενώ ο μερικώς καθαρισμός της λακκάσης από τον μύκητα *T. hirsuta* 5072 πραγματοποιήθηκε με καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, με μοριακή διήθηση και με χρωματογραφία ιονανταλλαγής όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.2. Ο εμπλουτισμός (enrichment) ο οποίος επιτεύχθηκε για τον *T. hirsuta*

και *B. cinerea* ήταν 41 και 15, αντίστοιχα, ενώ οι αποδόσεις ήταν 27% και 36% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού φαίνονται στον Πίνακα 7.2.

**Πίνακας 7.2.** Σύγκριση αποτελεσμάτων καθαρισμού των λακκασών από *B. cinerea* και *T. hirsuta* με την εμπορική λακκάση από *T. versicolor* (TvL).

| Ένζυμο               | Συνολική πρωτεΐνη<br>(mg/ml) | Ενεργότητα<br>(units/ml) | Ειδική δραστηριότητα (συνολικά<br>units στο ml / συνολική πρωτεΐνη<br>στο ml) |
|----------------------|------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>T. hirsuta</i>    | 0.277                        | 6.0                      | 21.6                                                                          |
| <i>B. cinerea</i>    | 0.025                        | 2.5                      | 100.8                                                                         |
| <i>T. versicolor</i> | 0.262                        | 153                      | 584.0                                                                         |

Όπως διαπιστώνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, η ενεργότητα της ThL ήταν 6 units/ml, ενώ η ενεργότητα της BcL ήταν 2.5 units/ml. Στη συνέχεια με σκοπό να ελεγχθεί η καθαρότητα των κλασμάτων τόσο των παραγόμενων λακκασών ThL και BcL όσο και του εμπορικού σκευάσματος TvL πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE) όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 6.3.2.4. Από την ηλεκτροφόρηση προέκυψε ότι η παραγόμενη λακκάση από το μύκητα *B. cinerea* έχει μοριακό βάρος 74 kDa και η οποία τιμή είναι σε συμφωνία με αυτή που βρέθηκε και από άλλους ερευνητές [Thurston, 1994; Slomczynski *et al.*, 1995; Shleev *et al.*, 2004]. Γενικά το συγκεκριμένο μοριακό βάρος εντάσσεται στο εύρος των 70-80 kDa, που είναι χαρακτηριστικό για τις λακκάσες μυκητιακής προέλευσης [Vasdev and Kuhad, 1994; Eggert *et al.*, 1996; Chefetz *et al.*, 1998; Sadhasivam *et al.*, 2008].

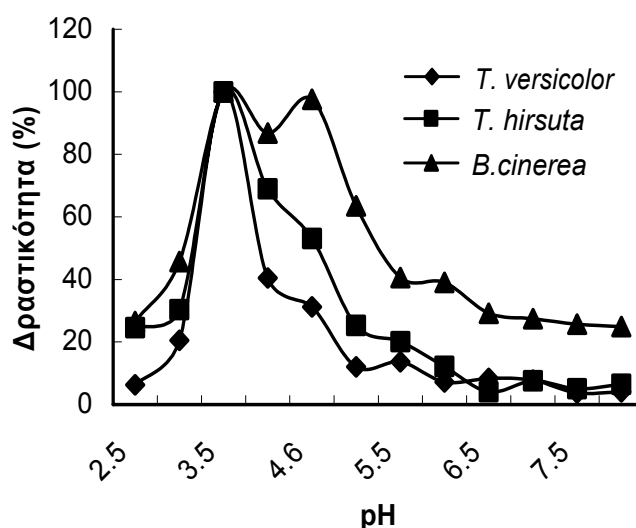
Η παραγόμενη λακκάση από τον μύκητα *T. hirsuta* βρέθηκε να έχει μοριακό βάρος 55 kDa, το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες [Koroleva- Skorobogat'ko *et al.*, 1998; Marjasvaara *et al.*, 2006]. Γενικά έχει αναφερθεί ότι οι λακκάσες που περιέχουν υδατάνθρακες σε ποσοστό 10-45% έχουν μοριακό βάρος το οποίο κυμαίνεται από 50-90 kDa [Peter and Wollenberger, 1997]. Το εμπορικό παρασκεύασμα της TvL βρέθηκε να παρουσιάζει τρία πρωτεϊνικά μόρια. Η πρώτη πρωτεϊνική ζώνη αντιστοιχεί σε μοριακό βάρος γύρω στα 68 kDa. Η τιμή αυτή, είναι πολύ κοντά με τα 70 kDa που αναφέρεται σε άλλες μελέτες [Solomon *et al.*, 1996; Piontek *et al.*, 2002].

### 7.3 Βιοχημικές ιδιότητες παραγόμενων λακκασών

#### 7.3.1 Προσδιορισμός βέλτιστου pH και θερμοκρασίας σε υδατικό διάλυμα

Ο προσδιορισμός της βέλτιστης τιμής του pH (σε ένα εύρος τιμών από 2.5 έως 8.0) και της θερμοκρασίας (από 20°C έως 90°C) της αντίδρασης εξετάστηκε τόσο στις παραγόμενες λακκάσες από *T. hirsuta* και *B. cinerea* όσο και στην εμπορικά διαθέσιμη λακκάση από *T. versicolor*. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος, pH 4.6, χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση την οξείδωση του ABTS, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.α.

Στο Σχήμα 7.4 παρουσιάζεται η επίδραση του pH στη δραστηριότητα των τριών λακκασών.

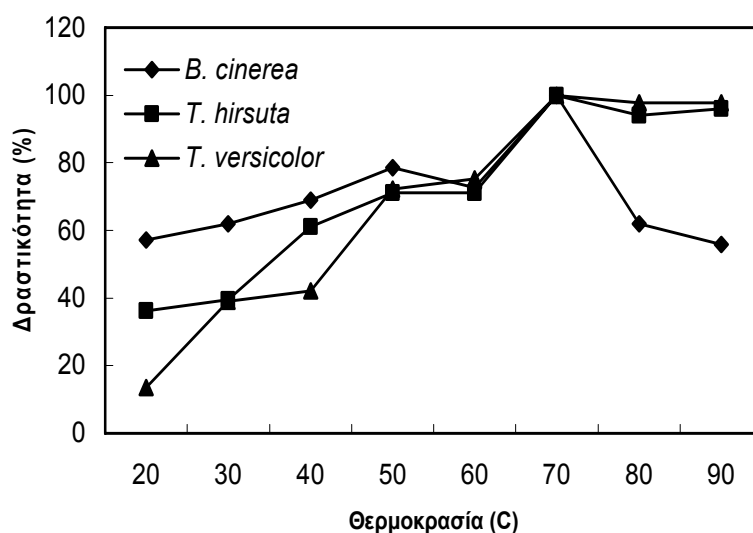


**Σχήμα 7.4.** Επίδραση του pH στην ενεργότητα των λακκασών από *T. versicolor*, *T. hirsuta* και *B. cinerea* κατά την οξείδωση του ABTS σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM οξικού οξέος, pH 4.6. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 0.02 U, ABTS 1 mM.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα και στις τρεις περιπτώσεις, μεγαλύτερη δραστηριότητα λακκάσης παρατηρήθηκε σε όξινες τιμές pH (3.5-4.6). Αντίθετα σε τιμές pH μεγαλύτερες από 3.5-4.6, η ενζυμική ενεργότητα μειώνεται σταδιακά, μέχρι την αδρανοποίηση της σε πιο αλκαλικές τιμές pH. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ερμηνευτεί από την διαφορά στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό που παρατηρείται μεταξύ του αναγόμενου

υποστρώματος και του χαλκού Τύπου T1 του ενεργού κέντρου του ενζύμου αλλά και από την αναστολή του χαλκού Τύπου T3 από ιόντα υδροξειδίου σε υψηλές τιμές pH [Xu, 1997].

Πιο συγκεκριμένα, οι λακκάσες από *T. versicolor* και *T. hirsuta* στην παρούσα εργασία παρουσίασαν βέλτιστη τιμή pH στα 3.5. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αρκετές μελέτες [Bar, 2001; Holker *et al.*, 2002a; Robles *et al.*, 2002; Kurniawati and Nicell, 2005] το εύρος των βέλτιστων τιμών pH των λακκασών κυμαίνεται από 4.0-5.0. Μάλιστα τα είδη των *T. hirsuta* [Rittstieg *et al.*, 2002] και *T. versicolor* [Lorenzo *et al.*, 2002] βρέθηκαν να έχουν βέλτιστη τιμή pH στο 4.6. Τέλος όπως φαίνεται και από το Σχήμα 7.4 η λακκάση από *B. cinerea* βρέθηκε να έχει βέλτιστο pH δράσης από 3.5-4.6. Σε παρόμοιο εύρος τιμών έχει παρατηρηθεί βιβλιογραφικά η βέλτιστη τιμή pH της συγκεκριμένης λακκάσης [Slomczynski *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1999]. Επίσης η δραστητικότητα των λακκασών μελετήθηκε συναρτήσει της θερμοκρασίας (Σχήμα 7.5).



**Σχήμα 7.5.** Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα των λακκασών από *T. versicolor*, *T. hirsuta* και *B. cinerea*. κατά την οξειδωση του ABTS σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 mM οξικού οξέος, pH 4.6. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 0.02 U, ABTS 1 mM.

Όπως διαπιστώνεται από το θερμοκρασιακό προφίλ των τριών λακκασών που παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.5, και τα τρία ένζυμα διατηρούν την καταλυτική τους δραστητικότητα σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (30-90°C), παρουσιάζοντας βέλτιστη τιμή στους 70°C. Σε πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές παρατηρήθηκε επίσης υψηλή βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των λακκασών [Freixo *et al.*, 2008]. Γενικά όμως σε θερμοκρασίες άνω των 70°C, η δραστητικότητα τους μειώνεται σημαντικά.

### 7.3.2 Προσδιορισμός σταθερότητας σε υδατικό διάλυμα.

Η σταθερότητα των τριών λακκασών μελετήθηκε σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικού οξέος pH 4.6, με βάση την οξειδωση του ABTS, κατά την επώαση τους σε διάφορες θερμοκρασίες (30-60°C) όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.2.2.α. Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων σταθερότητας διαπιστώθηκε ότι με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης (40-60°C) η σταθερότητα των ενζύμων μειώνεται. Ιδιαίτερα σταθερά ήταν κατά την επώαση τους, στους 30°C. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η TvL μετά από 17 ημέρες επώασης στους 30°C διατηρεί περίπου το 32% της αρχικής της δραστηρότητας ενώ η ThL διατηρεί περίπου το 34% της αρχικής της δραστηρότητας στις ίδιες συνθήκες. Αντίθετα η BcL, επιδεικνύει μικρότερη σταθερότητα σε σχέση με τις λακκάσες του γένους *Trametes*, καθώς σε παρόμοιες συνθήκες μετά από 6 h επώασης διατηρεί μόλις 15% της αρχικής της δραστηρότητας. Στον Πίνακα 7.3 παρουσιάζονται οι χρόνοι ημίσειας ζωής στους 30°C και οι ενέργειες απενεργοποίησης για τις TvL, ThL και BcL σε υδατικό διάλυμα με pH 4.6. Οι χρόνοι ημίσειας ζωής προσδιορίστηκαν με βάση την εξίσωση.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_d} \quad (7.1)$$

Όπου  $k_d$  η σταθερά απενεργοποίησης

**Πίνακας 7.3.** Ενέργειες απενεργοποίησης ( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) και χρόνος ημίσειας ζωής (h) για τις λακκάσες από *T. versicolor*, *T. hirsuta* και *B. cinerea* σε υδατικό διάλυμα με pH 4.6.

| Ένζυμο               | Χρόνος ημίσειας ζωής<br>στους 30°C, (h) | Ενέργεια απενεργοποίησης<br>( $\text{kcal mol}^{-1}$ ) |
|----------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>T. hirsuta</i>    | 277.3                                   | 39.4                                                   |
| <i>T. versicolor</i> | 58.7                                    | 28.6                                                   |
| <i>B. cinerea</i>    | 7.6                                     | 22.7                                                   |

Από τις τιμές του παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι το πιο σταθερό ένζυμο σε υδατικά διαλύματα είναι η ThL, το οποίο είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες [Haibo *et al.*, 2009], ενώ το πιο ασταθές ένζυμο είναι η BcL.

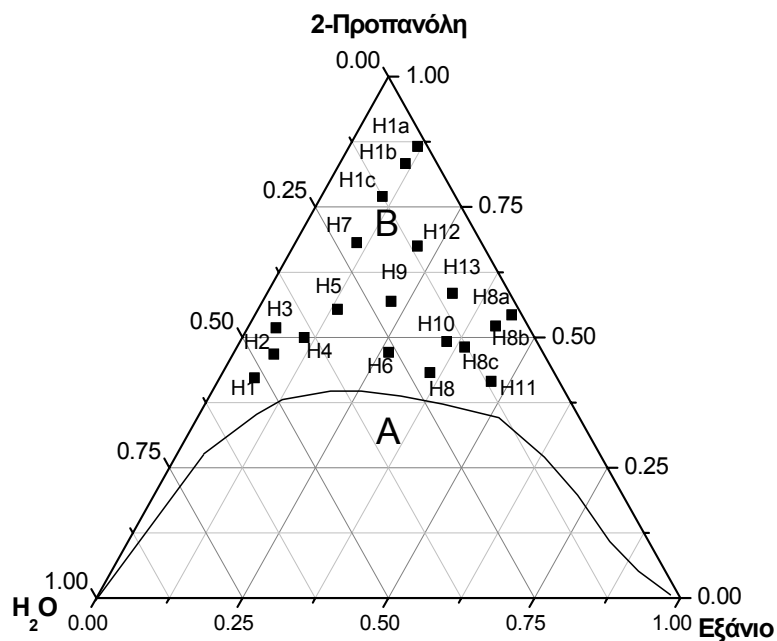
#### 7.4 Κατασκευή διαγραμμάτων φάσης τριαδικών συστημάτων χωρίς επιφανειοενεργό

Στην παρούσα εργασία τα τριαδικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αποτελούνται εκτός από εξάνιο/αλκοόλη/νερό αλλά και από φυσικά απαντώμενες ενώσεις όπως το  $\alpha$ -πινένιο και το  $d$ -λιμονένιο [Koutsoudaki *et al.*, 2005], στο ρόλο του οργανικού διαλύτη, επεκτείνοντας έτσι την εφαρμογή τέτοιων συστημάτων σε διεργασίες φιλικές προς το περιβάλλον.

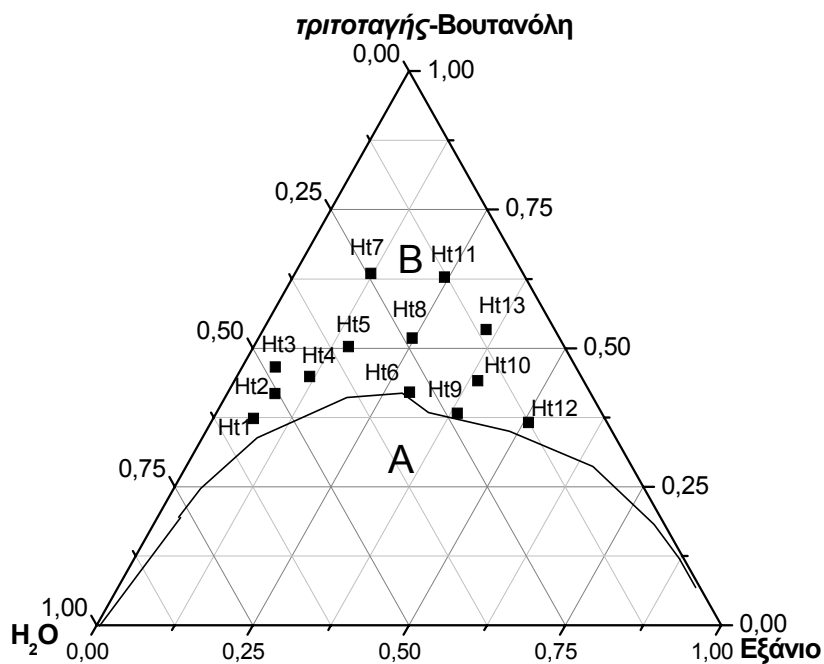
Πιο συγκεκριμένα, τρεις τύποι τριαδικών (οργανικός διαλύτης/αλκοόλη/νερό) συστημάτων χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει μίγματα εξανίου, αλκοόλης (2-προπανόλης ή τριτοταγής βουτανόλης) και νερού ενώ στο δεύτερο τύπο το εξάνιο έχει αντικατασταθεί από  $\alpha$ -πινένιο, και στον τρίτο τύπο από  $d$ -λιμονένιο. Τα τερπένια,  $\alpha$ -πινένιο και το  $d$ -λιμονένιο, είναι βασικά συστατικά του μαστιγελαίου [Koutsoudaki *et al.*, 2005] και χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η καταλυτική δράση οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε περιβάλλον που προσομοιάζει τα αιθέρια έλαια. Η προσέγγιση αυτή, μπορεί να επεκτείνει το φάσμα των εφαρμογών των ενζύμων υπό μελέτη, για την βιομετατροπή βιολογικά ενεργών ενώσεων, σε ένα περιβάλλον παρόμοιο με το φυσικό, ξεπερνώντας τα μειονεκτήματα που συνήθως πηγάζουν από την εφαρμογή συμβατικών χημικών μεθόδων ή οργανικών διαλυτών [Kaup *et al.*, 2007].

Η διαδικασία που ακολουθείται στην παρούσα εργασία είναι η σταδιακή τιτλοδότηση, η οποία έχει περιγραφεί αναλυτικά στην παράγραφο 6.3.4.2. Ακολουθεί πολύ προσεκτική οπτική παρατήρηση μετά από κάθε προσθήκη του τρίτου συστατικού (του νερού) προκειμένου να διαπιστωθεί εάν το σύστημα είναι μονοφασικό. Η αναφερόμενη ως υδατική φάση μπορεί να είναι ρυθμιστικό διάλυμα 100mM κιτρικών, pH 2.75 ή ρυθμιστικό διάλυμα 50mM κιτρικών, pH 5.0 ή ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM οξικών, pH 4.6, ενώ η μελέτη τους πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

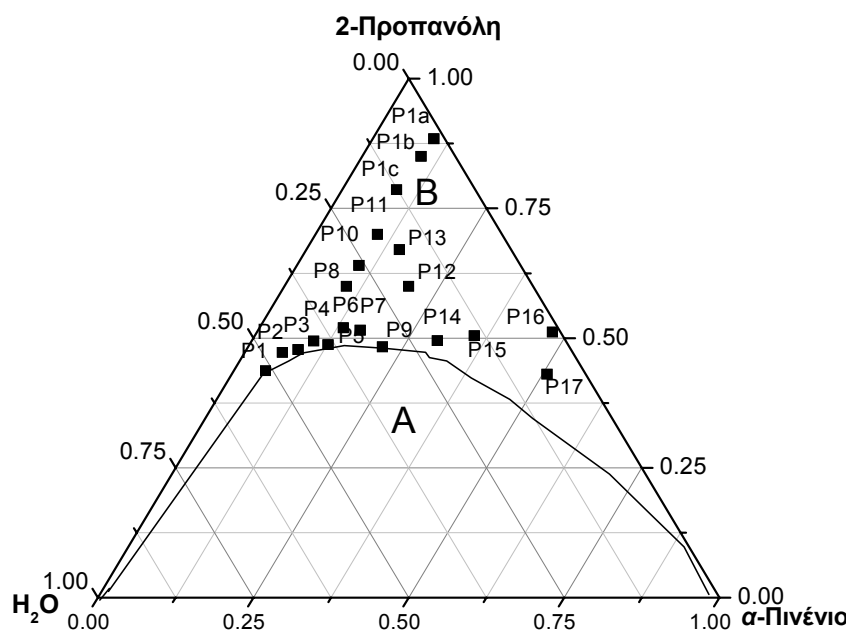
Τα τριγωνικά διαγράμματα φάσεων που προκύπτουν από τα μοριακά κλάσματα των τριών συστατικών του μίγματος φαίνονται στα Σχήματα 7.6.α-ε. Η περιοχή Α του τριγωνικού διαγράμματος αντιστοιχεί σε τριαδικά μίγματα τα οποία τείνουν να διαχωριστούν εύκολα σε δύο φάσεις, ενώ η περιοχή Β αντιστοιχεί σε μονοφασικά ομοιογενή οπτικώς διαυγή μίγματα. Από τα διαγράμματα αυτά επιλέχτηκαν αρκετά σημεία, τα οποία ανήκουν στην μονοφασική περιοχή και χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη των ενζύμων.



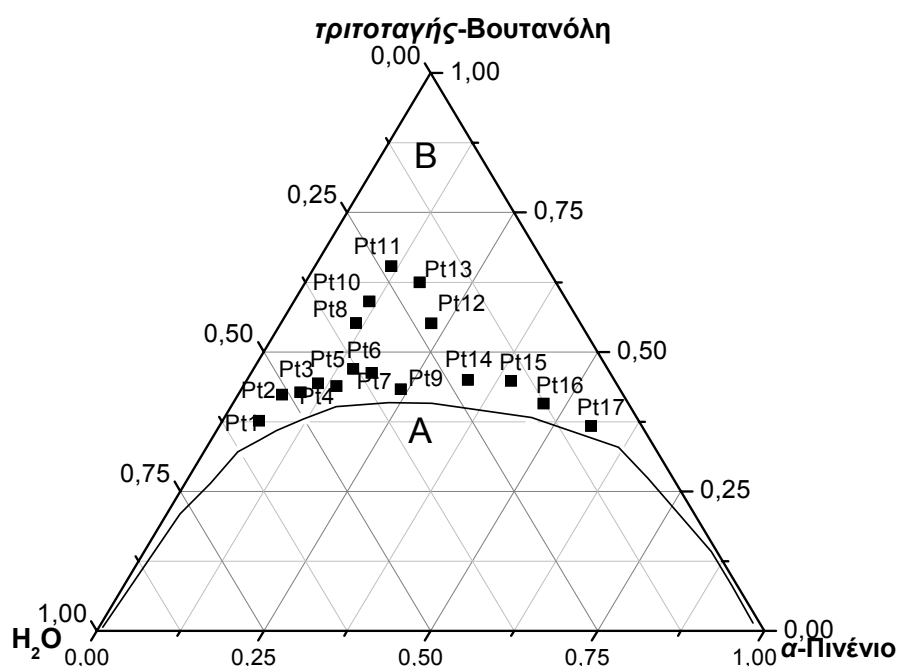
**Σχήμα 7.6.α.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεως εξανίου/2-προπανόλης/νερού. Τα όρια φάσης του συστήματος συμβολίζονται με (—), ενώ τα σύμβολα (■) εντός της περιοχής B αντιστοιχούν στα μονοφασικά τριαδικά συστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.



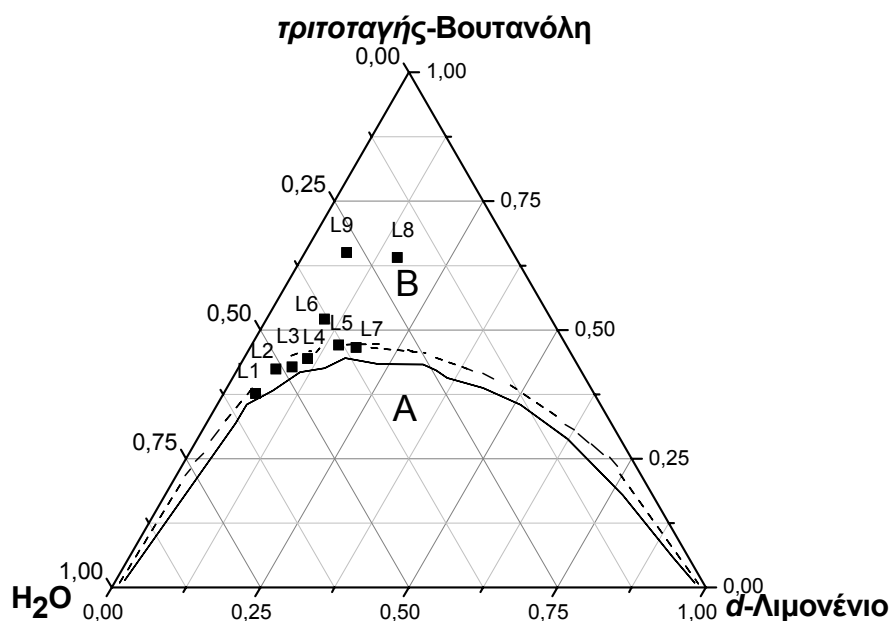
**Σχήμα 7.6.β.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεως εξανίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού. Τα όρια φάσης του συστήματος συμβολίζονται με (—), ενώ τα σύμβολα (■) εντός της περιοχής B αντιστοιχούν στα μονοφασικά τριαδικά συστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.



**Σχήμα 7.6.γ.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεως  $\alpha$ -πινενίου/2-προπανόλης/νερού. Τα όρια φάσης του συστήματος συμβολίζονται με (—), ενώ τα σύμβολα (■) εντός της περιοχής B αντιστοιχούν στα μονοφασικά τριαδικά συστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.



**Σχήμα 7.6.δ.** Τριγωνικό διάγραμμα φάσεως  $\alpha$ -πινενίου/ τριτοταγούς βουτανόλης/νερού. Τα όρια φάσης του συστήματος συμβολίζονται με (—), ενώ τα σύμβολα (■) εντός της περιοχής B αντιστοιχούν στα μονοφασικά τριαδικά συστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.



**Σχήμα 7.6.ε.** Τριγωνικό διάγραμμα *d*-λιμονενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού. Τα όρια φάσης του παραπάνω συστήματος συμβολίζονται με (—). Τα σύμβολα (■) εντός της περιοχής B αντιστοιχούν στα μονοφασικά τριαδικά συστήματα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία. Με (----) αποτυπώνονται τα όρια φάσης του *d*-λιμονενίου /2-προπανόλης /νερού σε μίγματα διαφόρων αναλογιών από το κάθε συστατικό.

Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται αρχικά ότι η αντικατάσταση του εξανίου με το  $\alpha$ -πινένιο ή το *d*-λιμονένιο οδηγεί σε ομοιογενή τριαδικά συστήματα, τα οποία περιέχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε αλκοόλη (τριτοταγή βουτανόλη ή 2-προπανόλη). Επίσης η αντικατάσταση της 2-προπανόλης από την τριτοταγή βουτανόλη οδήγησε σε αύξηση της μονοφασικής περιοχής σε όλους τους τύπους των συστημάτων. Ανάλογα τριαδικά μίγματα που αντιστοιχούν στην μονοφασική περιοχή B, χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων [Khmelnitsky *et al.*, 1988b; Zoumpanioti *et al.*, 2006a,b]. Η κατ'όγκο σύσταση των τριαδικών συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για την μελέτη ενζυμικών αντιδράσεων παρουσιάζεται στους Πίνακες Ι.α-γ του παραρτήματος .

Οι πέντε τύποι των τριαδικών συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή κωδικοποιούνται για λόγους ευκολίας με τους ακόλουθους συμβολισμούς:

|                                        |                                                       |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| (H1...H13)                             | → Συστήματα εξανίου/2-προπανόλης/νερού                |
| (H <sub>T</sub> 1...H <sub>T</sub> 13) | → Συστήματα εξανίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού      |
| (P1...P17)                             | → Συστήματα α-πινένιου/2-προπανόλης/νερού             |
| (P <sub>T</sub> 1...P <sub>T</sub> 17) | → Συστήματα α-πινένιου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού   |
| (L1...L9)                              | → Συστήματα d-λιμονενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού |

Γενικά τα παραπάνω μονοφασικά συστήματα αποτελούνται από υδατικά μικροσταγονίδια που διασκορπίζονται σε μια πλούσια φάση οργανικών διαλυτών, ή σε συστήματα στα οποία δεν έχει ανιχνευθεί καμία μικροδομή [Smith *et al.*, 1977; Khmel'nitsky *et al.*, 1988b; Zoumpanioti *et al.*, 2006a,b].

## **7.5 Μελέτες δραστηριότητας οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό**

Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε η δυνατότητα οξειδοαναγωγικών ενζύμων όπως π.χ. της γλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago* (CPO) και των λακκασών από τους μύκητες *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *B. cinerea*, να καταλύουν αντιδράσεις σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.

Με σκοπό να διευκρινιστεί η δράση των προαναφερθέντων οξειδοαναγωγικών ενζύμων κατά τον εγκλωβισμό τους σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό προσδιορίστηκαν στα πλαίσια αυτής της μελέτης οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα και την απόδοση των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, όπως ο βαθμός ενυδάτωσης του μικρογαλακτώματος, η σύσταση του συστήματος, η φύση του υποστρώματος, ο χρόνος επώασης, το είδος και η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιούνται σε κάθε αντίδραση.

### **7.5.1 Δραστηριότητα ενζύμων σε μικρογαλακτώματα**

#### **7.5.1.1 Αντίδραση χλωρίωσης του MCD που καταλύεται από την CPO σε τριαδικά συστήματα-Επίδραση οξειδωτικού φορέα**

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η ικανότητα της CPO να καταλύει αντιδράσεις χλωρίωσης σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται τόσο με βάση το εξάνιο, όσο και με βάση το  $\alpha$ -πινένιο σε 2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη και νερό. Κατά την αντίδραση χλωρίωσης, η μονοχλωροδιμεδόνη (MCD) μετατράπηκε σε διχλωροδιμεδόνη (DCD) παρουσία του ενζύμου και του οξειδωτικού φορέα (*t*-BHP), όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.4 της παραγράφου 4.2.1.3.

Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τριαδικά συστήματα που αντιστοιχούν στην μονοφασική περιοχή Β του τριγωνικού διαγράμματος φάσεως, τα οποία απεικονίζονται στο Σχήμα 7.6.α-δ. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 7.4 υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε συστήματα τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό ο φωτομετρικός προσδιορισμός της αντίδρασης

χλωρίωσης δεν ήταν εφικτός λόγω ότι το μίγμα της αντίδρασης ήταν θολό στις συνθήκες αυτές.

**Πίνακας 7.4.** Αρχική ταχύτητα χλωρίωσης του MCD από την CPO σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό. Συνθήκες αντίδρασης: CPO 20 U, *t*-BHP 38.5 mM, MCD 0.1 mM, KCl 6.64 mM. Συμβολισμοί: E/Π/N εξάνιο/2-προπανόλη/νερό, E/B/N: εξάνιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό, Π/Π/N  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερό, Π/B/N:  $\alpha$ -πινένιο/ τριτοταγή βουτανόλη/νερό.

| E/Π/N | Αρχική<br>ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) | E/B/N             | Αρχική<br>ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) | Π/Π/N | Αρχική<br>ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) | Π/B/N             | Αρχική<br>ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) |
|-------|--------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------------|
| H1    | 320 $\pm$ 26                                     | H <sub>T</sub> 1  | 332 $\pm$ 25                                     | P1    | 280 $\pm$ 22                                     | P <sub>T</sub> 1  | 286 $\pm$ 23                                     |
| H2    | 410 $\pm$ 21                                     | H <sub>T</sub> 2  | 395 $\pm$ 21                                     | P2    | 254 $\pm$ 21                                     | P <sub>T</sub> 2  | 263 $\pm$ 22                                     |
| H3    | 377 $\pm$ 27                                     | H <sub>T</sub> 3  | 382 $\pm$ 23                                     | P3    | 265 $\pm$ 24                                     | P <sub>T</sub> 3  | 258 $\pm$ 21                                     |
| H4    | 333 $\pm$ 25                                     | H <sub>T</sub> 4  | 341 $\pm$ 23                                     | P4    | 255 $\pm$ 19                                     | P <sub>T</sub> 4  | 250 $\pm$ 20                                     |
| H5    | 349 $\pm$ 26                                     | H <sub>T</sub> 5  | 340 $\pm$ 24                                     | P5    | 201 $\pm$ 18                                     | P <sub>T</sub> 5  | 234 $\pm$ 19                                     |
| H6    | 442 $\pm$ 28                                     | H <sub>T</sub> 6  | 341 $\pm$ 26                                     | P6    | 169 $\pm$ 14                                     | P <sub>T</sub> 6  | 185 $\pm$ 16                                     |
| H7    | 330 $\pm$ 26                                     | H <sub>T</sub> 7  | 337 $\pm$ 25                                     | P7    | 75 $\pm$ 9                                       | P <sub>T</sub> 7  | 93 $\pm$ 10                                      |
| H8    | 369 $\pm$ 27                                     | H <sub>T</sub> 8  | 358 $\pm$ 26                                     | P8    | 61 $\pm$ 8                                       | P <sub>T</sub> 8  | 74 $\pm$ 7                                       |
| H9    | 195 $\pm$ 16                                     | H <sub>T</sub> 9  | 201 $\pm$ 15                                     | P9    | 23 $\pm$ 3                                       | P <sub>T</sub> 9  | 39 $\pm$ 5                                       |
| H10   | 111 $\pm$ 17                                     | H <sub>T</sub> 10 | 102 $\pm$ 18                                     | P10   | 25 $\pm$ 3                                       | P <sub>T</sub> 10 | 26 $\pm$ 3                                       |
| H11   | $\delta.\pi$                                     | H <sub>T</sub> 11 | $\delta.\pi$                                     | P11   | 32 $\pm$ 4                                       | P <sub>T</sub> 11 | $\delta.\pi$                                     |
| H12   | $\delta.\pi$                                     | H <sub>T</sub> 12 | $\delta.\pi$                                     | P12   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 12 | $\delta.\pi$                                     |
| H13   | $\delta.\pi$                                     | H <sub>T</sub> 13 | $\delta.\pi$                                     | P13   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 13 | $\delta.\pi$                                     |
|       |                                                  |                   |                                                  | P14   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 14 | $\delta.\pi$                                     |
|       |                                                  |                   |                                                  | P15   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 15 | $\delta.\pi$                                     |
|       |                                                  |                   |                                                  | P16   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 16 | $\delta.\pi$                                     |
|       |                                                  |                   |                                                  | P17   | $\delta.\pi$                                     | P <sub>T</sub> 17 | $\delta.\pi$                                     |

$\delta.\pi$ : η ενζυμική δραστηριότητα δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί

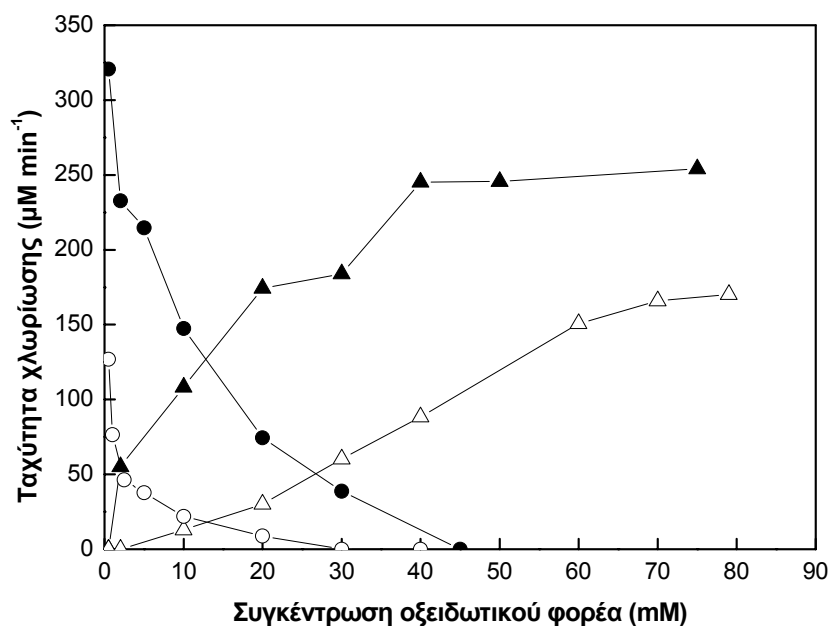
Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 7.4, μεγαλύτερη δραστηριότητα χλωρίωσης παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με βάση το εξάνιο. Πράγματι, η δραστηριότητα του ένζυμου κατά την χλωρίωση του MCD σε τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο ήταν 1.5-2 φορές μεγαλύτερη από αυτήν που παρατηρήθηκε σε συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο με παρόμοια περιεκτικότητα σε νερό. Επιπλέον η ενζυμική δραστηριότητα ήταν

υψηλότερη στα συστήματα που περιείχαν τριτοταγή βουτανόλη. Η υψηλή ενζυμική δραστικότητα που παρατηρήθηκε στα υπό εξέταση συστήματα κατά την χλωρίωση του MCD από την CPO είναι σε αντιστοιχία με την υψηλή ενζυμική δραστικότητα που παρατηρήθηκε σε αντιδράσεις εστεροποίησης που καταλύθηκαν από διάφορες λιπάσες [Zoumprianioti *et al.*, 2006a,b] αλλά και σε αντιδράσεις οξείδωσης της χοληστερόλης από την οξειδάση της χοληστερόλης [Khmelnitsky *et al.*, 1988b] σε παρόμοια τριαδικά συστήματα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την χλωρίωση του MCD από την CPO σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) και αέριου χρωματογράφου με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS), μερικά οξυγονωμένα παράγωγα του  $\alpha$ -πινενίου, όπως π.χ. εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη. Η οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου από την CPO είναι σε συμφωνία με άλλους ερευνητές, σύμφωνα με τους οποίους έχει ανακοινωθεί η οξείδωση τερπενίων όπως π.χ. του *d*-λιμονενίου [Águila *et al.*, 2008], του  $\alpha$ -,  $\beta$ -πινενίου, της γερανιόλης, νερόλης και κιτρονελλόλης [Kaup *et al.*, 2007] από την CPO με την χρήση οξειδωτικού φορέα.

Η επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης του οξειδωτικού φορέα, όπως του  $H_2O_2$  ή του *t*-BHP<sub>d</sub> (τριτοταγές βουτυλ-υπεροξείδιο του υδρογόνου σε δεκάνιο) μελετήθηκε κατά την αντίδραση αλογόνωσης του MCD από την CPO σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο (H1) και με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.7, σε μικρή γενικά συγκέντρωση του οξειδωτικού φορέα η ταχύτητα της αντίδρασης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη με  $H_2O_2$  από ότι με *t*-BHP<sub>d</sub>. Παρόλα αυτά, αύξηση της συγκέντρωσης του  $H_2O_2$  οδήγησε σε απότομη πτώση της ταχύτητας χλωρίωσης, ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 30mM  $H_2O_2$  παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης του ενζύμου και στα δύο συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν. Η ισχυρή ανασταλτική επίδραση του  $H_2O_2$  σχετίζεται με πιθανή αποδιάταξη της αίμης / ή με μετουσίωση της πρωτεΐνης [Park and Clark, 2006a], η οποία επίσης παρατηρήθηκε σε διαφορετικά συστήματα αντίδρασης [Santhanam and Dordick, 2002; Spreti *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2007]. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της συγκέντρωσης του *t*-BHP (είτε ως υδατικό διάλυμα είτε ως διάλυμα σε δεκάνιο) δεν ανέστειλε την καταλυτική δράση της CPO ακόμη και όταν ο οξειδωτικός φορέας είχε συγκέντρωση 80 mM. Η καταλυτική συμπεριφορά της CPO που παρατηρήθηκε στα πειράματα χλωρίωσης μπορεί να αποδοθεί στο διαφορετικό καταμερισμό και στη διαθεσιμότητα των οξειδωτικών φορέων ( $H_2O_2$  και *t*-BHP) στο μικροπεριβάλλον της CPO. Τα υδρόφιλα υποστρώματα (MCD, Cl<sup>-</sup>) καθώς επίσης και το υδατοδιαλυτό  $H_2O_2$  αναμένεται

να είναι πλήρως ενθυλακωμένα στις υδατικές μικροφάσεις του τριαδικού συστήματος και κατά συνέπεια σε κοντινή απόσταση με τα ενζυμικά μόρια (τα οποία είναι εγκλωβισμένα στις υδατικές μικροφάσεις). Έτσι η μείωση που παρατηρείται στην καταλυτική δραστηριότητα της CPO στις υψηλές συγκεντρώσεις του  $H_2O_2$ , μπορεί να αποδοθεί στις αυξημένες συγκεντρώσεις του οξειδωτικού φορέα στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου.



**Σχήμα 7.7.** Επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης του  $t\text{-BHP}_d$  (Δ για το H1 και ▲ για το P1) και του  $H_2O_2$  (○ για το H1 και ● για το P1) στην ταχύτητα χλωρίωσης του MCD από την CPO σε τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο και με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Συνθήκες αντίδρασης: CPO 20 U, MCD 0.1 mM, KCl 6.64 mM.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ισχυρή ανασταλτική επίδραση του  $H_2O_2$  που παρατηρήθηκε στην παρούσα εργασία, είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που ανακοινώθηκαν για άλλα συστήματα αντιδράσεων όπως π.χ. σε υδατικά [Spreti *et al.*, 2004], μη υδατικά [Santhanam and Dordick, 2002] καθώς και σε συστήματα αντιδράσεων μικρογαλακτωμάτων οργανικών/υδατικών [Park and Clark, 2006a,b] ή σε μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται παρουσία επιφανειοενεργού μορίου [Franssen *et al.*, 1988]. Αντίθετα, η υψηλή καταλυτική δραστηριότητα της CPO που παρατηρήθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις του  $t\text{-BHP}$ , μπορεί να συνδεθεί με την μειωμένη διαθεσιμότητα του υδρόφοβου οξειδωτικού στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου, λόγω του καταμερισμού του στην οργανική φάση. Παρόμοια επίδραση της διαθεσιμότητας του υποστρώματος στην καταλυτική του συμπεριφορά της CPO

παρατηρήθηκε πρόσφατα σε μικρογαλάκτωμα παρουσία επιφανειοενεργού [Park and Clark, 2006a]. Τέλος από την παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα υπό εξέταση συστήματα η κινητική της χλωρίωσης του MCD που καταλύεται από την CPO με την χρήση *t*-BHP, περιγράφεται από το μοντέλο Michaelis-Menten, που δίνεται από την εξίσωση (6.3) της παραγράφου 6.3.5.3.1. Οι τιμές των κινητικών παραμέτρων  $V_{\max}$  και  $K_m$  προσδιορίστηκαν ίσες με  $64 \text{ mM min}^{-1}$  and  $14 \text{ mM}$ , αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν το πλεονεκτήμα χρήσης του *t*-BHP για την δράση της CPO και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως ο οξειδωτικός φορέας για την διεκπεραίωση διάφορων οξειδωτικών αντιδράσεων σε τριαδικά μίγματα.

#### **7.5.1.2 Αντίδραση εποξείδωσης του στυρενίου από την CPO σε τριαδικά συστήματα.**

Όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος της διατριβής αυτής ένα από τα σημαντικά πλεονεκτήματα των μικρογαλακτωμάτων αποτελεί το γεγονός ότι στα μέσα αυτά υπάρχει η δυνατότητα ενζυμικής μετατροπής υδρόφιλων αλλά και υδρόφοβων ενώσεων. Με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα της CPO να καταλύσει την μετατροπή υδρόφοβων υποστρωμάτων σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση η εποξείδωση του στυρενίου προς το αντίστοιχο εποξείδιο του, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6.2 της παραγράφου 6.3.5.1.1.β.

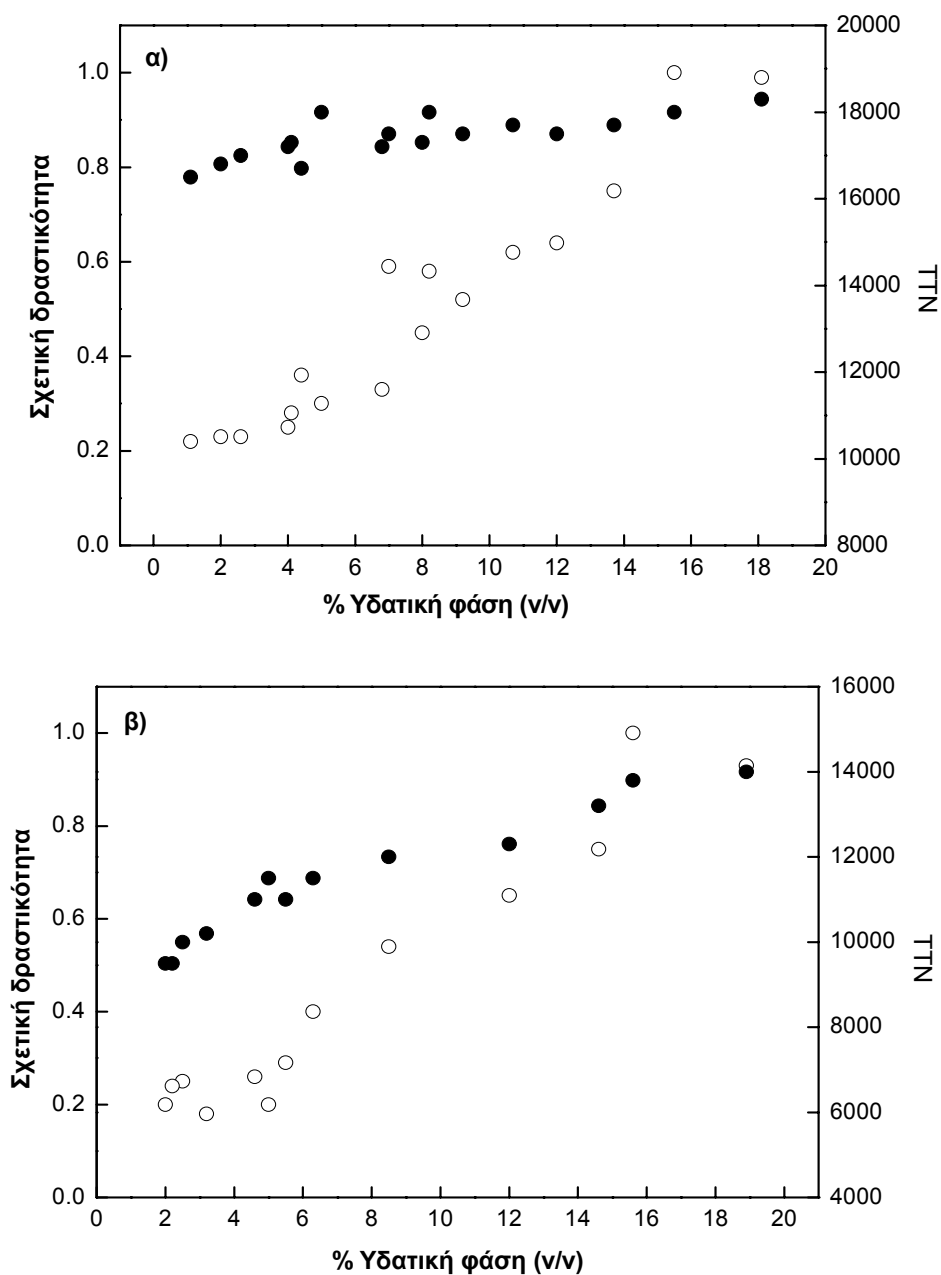
Κατά την ενζυμική οξείδωση του στυρενίου από την CPO, σε διάφορα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο ή το  $\alpha$ -πινένιο, παρατηρήθηκε η παραγωγή βενζαλδεϋδης και σε μερικές περιπτώσεις βενζυλικό οξύ. Επίσης σε όλες τις περιπτώσεις η εναντιομερική περίσσεια (enantiomeric excess, e.e) του οξειδίου του στυρενίου κυμαίνονταν από 47-49%, το οποίο είναι σε απόλυτη συμφωνία με αυτό που έχει αναφερθεί σε άλλα μέσα [Zaks and Dodds, 1995; Santhanam and Dordick, 2002; Zhu and Wang, 2005]. Στα τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, παρατηρήθηκαν κάποια οξυγονωμένα παράγωγα του  $\alpha$ -πινενίου, όπως το εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, η βερμπενόλη και η βερμπενόνη, τα οποία ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση HPLC και GC-MS. Από τον Πίνακα 7.5 διαπιστώνεται ότι μεγαλύτερη δραστηριότητα εποξείδωσης παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στον προστατευτικό ρόλο του  $\alpha$ -πινενίου στη δομή του ενζύμου (ο οποίος περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.3.1). Και στις δύο περιπτώσεις των τριαδικών συστημάτων που

χρησιμοποιήθηκαν, η ικανότητα εποξειδωσης της CPO μειώθηκε σημαντικά όταν η περιεκτικότητα σε νερό ήταν χαμηλή.

**Πίνακας 7.5.** Αρχική ταχύτητα εποξειδωσης του στυρενίου από την CPO σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό. *Συνθήκες αντίδρασης:* CPO 20 U, *t*-BHP 200 mM, στυρένιο 200 mM. Συμβολισμοί: E/Π/N εξάνιο/2-προπανόλη/νερό, Π/Π/N  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερό.

| E/Π/N | Αρχική ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) | Π/Π/N | Αρχική ταχύτητα<br>( $\mu\text{M min}^{-1}$ ) |
|-------|-----------------------------------------------|-------|-----------------------------------------------|
| H1    | 129 $\pm$ 10                                  | P1    | 138 $\pm$ 13                                  |
| H2    | 139 $\pm$ 6                                   | P2    | 140 $\pm$ 14                                  |
| H3    | 104 $\pm$ 6                                   | P3    | 105 $\pm$ 10                                  |
| H4    | 92 $\pm$ 11                                   | P4    | 89 $\pm$ 7                                    |
| H5    | 76 $\pm$ 9                                    | P5    | 87 $\pm$ 6                                    |
| H6    | 56 $\pm$ 5                                    | P6    | 73 $\pm$ 3                                    |
| H7    | 40 $\pm$ 6                                    | P7    | 79 $\pm$ 9                                    |
| H8    | 28 $\pm$ 2                                    | P8    | 63 $\pm$ 2                                    |
| H9    | 37 $\pm$ 3                                    | P9    | 81 $\pm$ 5                                    |
| H10   | 25 $\pm$ 2                                    | P10   | 47 $\pm$ 2                                    |
| H11   | 35 $\pm$ 2                                    | P11   | 43 $\pm$ 3                                    |
| H12   | 33 $\pm$ 2                                    | P12   | 52 $\pm$ 2                                    |
| H13   | 28 $\pm$ 2                                    | P13   | 49 $\pm$ 2                                    |
|       |                                               | P14   | 45 $\pm$ 5                                    |
|       |                                               | P15   | 42 $\pm$ 3                                    |
|       |                                               | P16   | 43 $\pm$ 3                                    |

Στα Σχήματα 7.8.α,β παρουσιάζεται η εξάρτηση της σχετικής δραστηριότητας της CPO, καθώς επίσης και του ολικού αριθμού μετατροπής (Total Turnover Number, TTN) κατά την παραγωγή του εποξειδίου του στυρενίου σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο και το εξάνιο αντίστοιχα. Ο ολικός αριθμός μετατροπής ισοδυναμεί με τα mol του υποστρώματος που καταλύονται από ένα ενζυμικό μόριο, όταν το ένζυμο βρίσκεται στην πιο ενεργή του περίοδο.



**Σχήμα 7.8.** Επίδραση του υδατικού περιεχομένου στην σχετική δραστηριότητα εποξειδωσης (○) της CPO και του TTN (●) σε τριαδικά συστήματα α) με βάση το  $\alpha$ -πινένιο και β) με βάση το εξάνιο. Συνθήκες αντίδρασης: CPO 20 U, *t*-BHP 200 mM, στυρένιο 200 mM. Η σχετική δραστηριότητα υπολογίστηκε με σύγκριση των αρχικών ταχυτήτων στα διάφορα μέσα με την αρχική ταχύτητα του H<sub>2</sub> και του P2 αντίστοιχα.

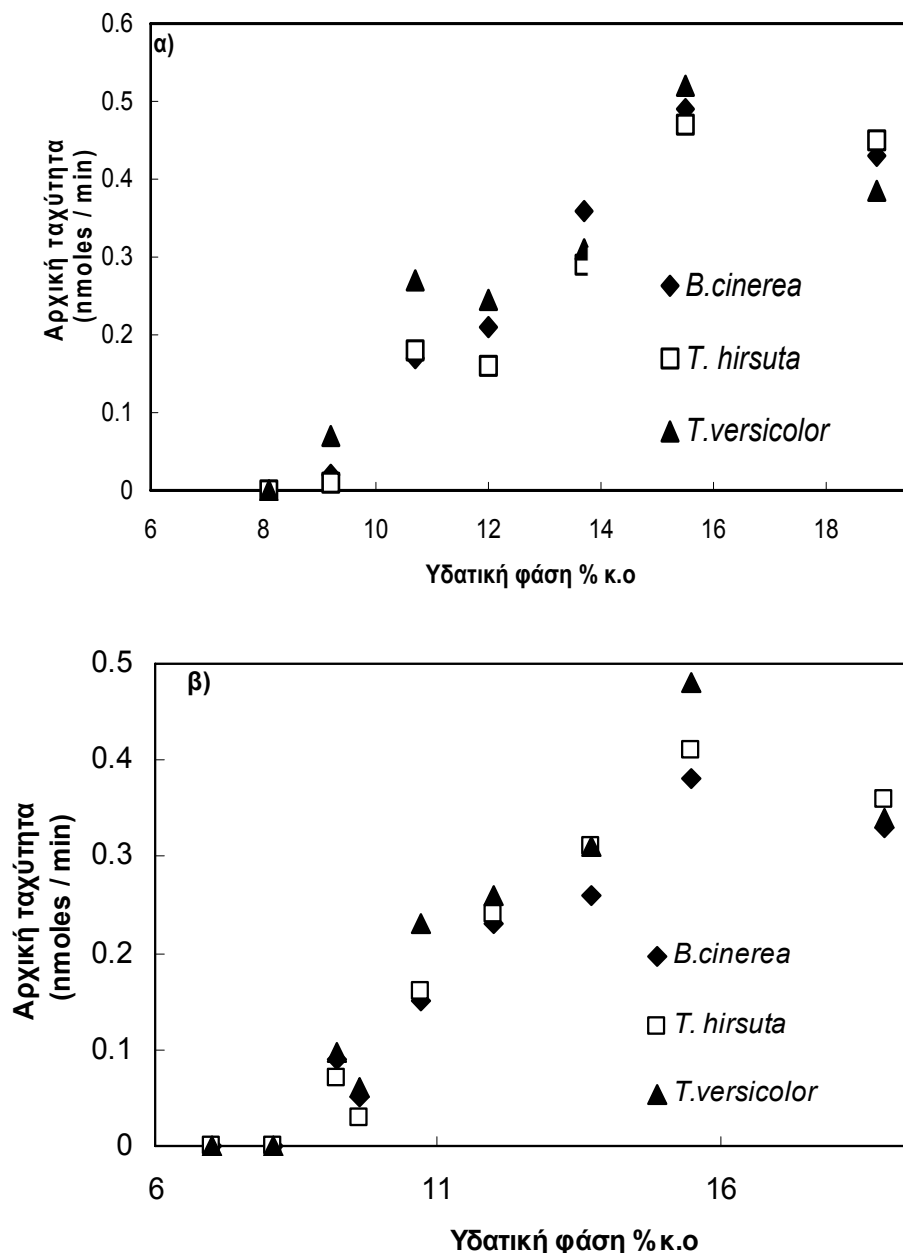
Γενικά, παρατηρείται ότι οι τιμές του TTN που παρατηρήθηκαν για τα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο, ήταν υψηλότερες σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε

νερό, ενώ στα τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο οι τιμές παρέμεναν υψηλές ακόμη και σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό. Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, η δραστηριότητα εποξειδωσης της CPO ήταν χαμηλή σε συστήματα με μικρή περιεκτικότητα σε νερό και υψηλή σε τριαδικά συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (όπως στα συστήματα H1-H4 και P1-P4). Η συμπεριφορά αυτή είναι σε συμφωνία με αυτή που έχει αναφερθεί κατά την βιοκαταλυτική τροποποίηση διάφορων υδρόφοβων υποστρωμάτων από λιπάσες [Zoumpantioti *et al.*, 2006a,b], και μπορεί να αποδοθεί στην κατανομή και στην περιορισμένη διαθεσιμότητα των υδρόφοβων υποστρωμάτων στο υδατικό μικροπεριβάλλον του ενζύμου. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι κατά την μελέτη της εποξειδωσης του στυρενίου σε τριαδικά συστήματα με τριτοταγή βουτανόλη αντί 2-προπανόλης οι αρχικές ταχύτητες εποξειδωσης αυξήθηκαν κατά 10%.

#### **7.5.1.3 Οξείδωση ABTS από τις *TnL*, *ThL* και *BcL* σε τριαδικά συστήματα.**

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα τριών λακκασών να καταλύσουν την αντίδραση οξείδωσης ενός υδρόφιλου υποστρώματος, του ABTS, σε διάφορα μη συμβατικά συστήματα. Έτσι με σκοπό να διευκρινιστεί η δράση των τριών διαφορετικών λακκασών κατά τον εγκλωβισμό τους σε μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα τριαδικά συστήματα χωρίς επιφανειοενεργό τα οποία διαφέρουν είτε ως προς τον διαλύτη (εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο) είτε ως προς την αλκοόλη (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη). Τα συστήματα αυτά αντιστοιχούν στην μονοφασική περιοχή B των τριγωνικών διαγραμμάτων φάσεως του Σχήματος 7.6.α-ε. Επιπλέον η δράση τους ελέγχθηκε σε μικρογαλακτώματα AOT σε ισοοκτάνιο, τα οποία έχουν διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης ( $w_o=20-60$ ), αλλά και σε μονοφασικά συστήματα όπως: α) μονοφασικό σύστημα τριτοταγούς βουτανόλης/νερού και β) μονοφασικό σύστημα [bmim][BF<sub>4</sub>]/νερού. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.α.

Στο Σχήματα 7.9.α,β παρουσιάζεται η εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της οξείδωσης του ABTS από τις τρεις διαφορετικές λακκάσες σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο και το  $d$ -λιμονένιο αντίστοιχα.



**Σχήμα 7.9.** Επίδραση της περιεκτικότητας σε νερό του συστήματος στην αρχική ταχύτητα οξείδωσης του ABTS από τις τρεις λακκάσες σε τριαδικά συστήματα: α)  $\alpha$ -πινενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού και β)  $d$ -λιμονενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού. Η σύσταση των συστημάτων δίνεται στον Πίνακα Ι,β,γ του παραρτήματος. *Συνθήκες αντίδρασης:* λακκάση: 0.1 U, ABTS: 1mM.

Από τα παραπάνω διαγράμματα φαίνεται η γενική επίδραση της περιεκτικότητας της υδατικής φάσης των μικρογαλακτωμάτων στην αρχική ταχύτητα οξείδωσης. Γενικά διαπιστώνεται ότι σε όλα τα συστήματα (είτε με  $\alpha$ -πινένιο είτε με  $d$ -λιμονένιο) και για όλες τις λακκάσες οι τιμές των αρχικών ταχυτήτων είναι υψηλότερες όταν αυξάνεται το

περιεχόμενο νερό. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για τις τρεις λακκάσες σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο. Μια πιθανή εξήγηση της υψηλής δραστηριότητας των λακκασών σε τριαδικά συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό είναι ότι στα συστήματα αυτά το ένζυμο και τα μόρια του υποστρώματος εντοπίζονται στην υδατική μικροφάση, γεγονός που διευκολύνει την προσέγγιση του υποστρώματος στο ένζυμο. Από την άλλη μεριά, η καταλυτική ικανότητα των λακκασών μειώνεται σημαντικά σε μικρογαλακτώματα με χαμηλό ποσοστό νερού (λιγότερο από 10% κ.ο). Αυτό συμβαίνει διότι τα συστήματα αυτά ανήκουν σε μια περιοχή του διαγράμματος φάσεως όπου εντοπίζονται υδατικά μικροσταγονίδια, τα οποία είναι διεσπαρμένα στην συνεχή φάση του οργανικού διαλύτη [Keiser *et al.*, 1979; Smith and Barden, 1982; Khmelnitsky *et al.*, 1988b]. Έτσι η χαμηλή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρείται στα συστήματα αυτά μπορεί πιθανά να αποδοθεί στο γεγονός ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα μπορεί να εντοπίζονται σε διαφορετικές μικροφάσεις του συστήματος, με αποτελέσματα να υπάρχει παρεμπόδιση στην μεταξύ τους αλληλοεπίδραση. Η εξάρτηση της καταλυτικής δραστηριότητας των λακκασών από την περιεκτικότητα της υδατικής φάσης των μικρογαλακτωμάτων είναι σε συμφωνία με αυτή που παρατηρήθηκε και από την CPO κατά την εποξειδωση του στυρενίου. Παρόμοια εξάρτηση διαπιστώθηκε και για άλλα ένζυμα σε αντίστοιχα τριαδικά συστήματα [Khmelnitsky *et al.*, 1988b; O'Connor and Cleverly, 1995; Zoumpantioti *et al.*, 2006a,b].

Με σκοπό να μελετηθεί η δράση τόσο των δύο παραγόμενων λακκασών από *T. hirsuta* και *B. cinerea*, όσο και της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης από *T. versicolor* και σε άλλα μέσα αντίδρασης, εξετάστηκε η χρήση τους σε μικρογαλακτώματα με AOT σε ισοοκτάνιο και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>]. Στον Πίνακα 7.6 παρουσιάζονται οι τιμές της αρχικής ταχύτητας οξειδωσης του ABTS (είτε ως nmoles/min ή nmoles/min μg πρωτεΐνη<sup>-1</sup>) και για τις τρεις λακκάσες στα διάφορα συστήματα. Παρατηρείται ότι και σε αυτά τα συστήματα αντίδρασης σημαντική ήταν η επίδραση της υδατικής φάσης του συστήματος στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Από τις τιμές του Πίνακα 7.6, διαπιστώνεται ότι στα μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>], παρατηρούνται μεγάλες ταχύτητες οξειδωσης όταν το ποσοστό της υδατικής φάσης είναι υψηλό. Αυτό συμβαίνει διότι στα μέσα αυτά το ένζυμο και τα μόρια του υδρόφιλου υποστρώματος εντοπίζονται στην υδατική μικροφάση του συστήματος, γεγονός που διευκολύνει την προσέγγιση του υποστρώματος στο ένζυμο.

**Πίνακας 7.6.** Αρχική ταχύτητα οξείδωσης του ABTS σε διάφορα μη συμβατικά μέσα με τη χρήση τριών διαφορετικών λακκασών. Η σύσταση των αντίστροφων μικκυλίων με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.4. Τα μονοφασικά συστήματα παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας διαφορετική % κ.ο (10-50%) αναλογία του αναμίξιμου διαλύτη με το νερό. *Συνθήκες αντίδρασης:* λακκάση: 0.1 U, ABTS: 1mM.

| Σύστημα Αντίδρασης                         |       | <i>B. cinerea</i> |                                            | <i>T. hirsuta</i> |                                            | <i>T. vericolor</i> |                                            |
|--------------------------------------------|-------|-------------------|--------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------------|---------------------|--------------------------------------------|
|                                            |       | nmoles/min        | nmoles/min<br>μg<br>πρωτεΐνη <sup>-1</sup> | nmoles/min        | nmoles/min<br>μg<br>πρωτεΐνη <sup>-1</sup> | nmoles/min          | nmoles/min<br>μg<br>πρωτεΐνη <sup>-1</sup> |
| Αντίστροφα<br>μικκύλια                     | Wo 20 | 0.74              | 0.92                                       | 0.22              | 0.05                                       | 1.62                | 10.11                                      |
|                                            | Wo 30 | 2.55              | 3.18                                       | 1.88              | 0.42                                       | 2.33                | 14.56                                      |
|                                            | Wo 40 | 3.95              | 4.94                                       | 2.18              | 0.48                                       | 2.11                | 13.19                                      |
|                                            | Wo 50 | 2.73              | 3.41                                       | 6.47              | 1.44                                       | 2.57                | 16.06                                      |
|                                            | Wo 60 | 3.44              | 4.30                                       | 7.51              | 1.67                                       | 3.10                | 19.37                                      |
| Μ.Σ<br>τριτοταγής<br>βουτανόλης<br>/ νερού | 10%   | 1.82              | 2.27                                       | 7.92              | 1.76                                       | 8.65                | 54.09                                      |
|                                            | 25%   | 1.24              | 1.55                                       | 4.82              | 1.07                                       | 6.87                | 42.95                                      |
|                                            | 50%   | 0.50              | 0.63                                       | 4.75              | 1.06                                       | 7.72                | 48.25                                      |
| [bmim][BF <sub>4</sub> ]<br>/ νερού        | 10%   | 0.26              | 0.33                                       | 0.97              | 0.22                                       | 1.30                | 8.11                                       |
|                                            | 25%   | 0                 | 0                                          | 0.07              | 0.02                                       | 0.13                | 0.80                                       |
|                                            | 50%   | 0                 | 0                                          | 0.003             | 0.0006                                     | 0.01                | 0.07                                       |

Αντίθετα με αύξηση του ποσοστού του αναμίξιμου διαλύτη οι αρχικές ταχύτητες ελαττώνονται. Με παρόμοιο τρόπο, μειώθηκε η δραστηριότητα της λακκάσης από *Trametes sp.* όταν η συγκέντρωση του ιοντικού υγρού (4-μεθυλ-N-βουτυλπυριδίνιο τετραφθοριούχο βόριο) ήταν πάνω από 50% κ.ο [Hinckley *et al.*, 2002]. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι χαμηλότερες ταχύτητες οξείδωσης παρατηρήθηκαν όταν το μονοφασικό σύστημα παρασκευάζονταν από [bmim][BF<sub>4</sub>] και για τις τρεις περιπτώσεις των λακκασών. Στην περίπτωση δε του *B. cinerea* δεν παρατηρήθηκε οξείδωση του ABTS όταν η συγκέντρωση του [bmim][BF<sub>4</sub>] ήταν πάνω από 10% κ.ο. Βάση των παραπάνω, συμπεραίνεται ότι σημαντική επίδραση στην καταλυτική συμπεριφορά των λακκασών έχει η σύσταση του μέσου αναφορικά με την φύση και την συγκέντρωση του αναμίξιμου διαλύτη στον τελικό όγκο της αντίδρασης.

Επίσης με βάση τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.6 διαπιστώνεται ότι η δραστηριότητα των ενζύμων σε αντίστροφα μικκύλια εξαρτάται από το βαθμό ενυδάτωσης. Πιο συγκεκριμένα σε αντίστροφα μικκύλια με χαμηλή περιεκτικότητα σε υδατική φάση (δηλ. με

μικρό βαθμό ενυδάτωσης) η ταχύτητα είναι χαμηλή. Από την άλλη πλευρά όσο αυξάνεται ο βαθμός ενυδάτωσης αυξάνεται και η ταχύτητα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που έχουν ανακοινωθεί πρόσφατα για την χρήση λακκάσων από *Pleurotus ostreatus* και *Phlebia radiata* σε αντίστροφα μικκύλια [Michizoe *et al.*, 2001]. Η μέγιστη ταχύτητα οξείδωσης του ABTS παρατηρήθηκε για τα στελέχη *Trametes* σε βαθμό ενυδάτωσης  $w_0$  60, ενώ για τον *B. cinerea* για  $w_0$  40.

#### **7.5.1.4 Οξείδωση συρινγκαλνταζίνης από την TvL σε μη συμβατικά συστήματα.**

Με σκοπό να μελετηθεί η ικανότητα της εμπορικά διαθέσιμης λακκάσης από *T. versicolor* να καταλύσει την μετατροπή υδρόφοβων υποστρωμάτων σε μη συμβατικά συστήματα, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση η οξείδωση της συρινγκαλνταζίνης (SYR), η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 6.3 της παραγράφου 6.3.5.1.3.β. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.β. Από την μελέτη της αρχικής ταχύτητας της οξείδωσης της SYR από την TvL σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο και με βάση τα τερπένια,  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, διαπιστώθηκε ότι σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, η αρχική ταχύτητα είναι μεγάλη. Παρόμοια εξάρτηση διαπιστώθηκε και κατά την οξείδωση του ABTS σε αντίστοιχα τριαδικά, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Η χαμηλή δραστηριότητα οξείδωσης της SYR σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλή διαθεσιμότητα των υδρόφοβων μορίων του υποστρώματος προς το υδατικό μικροπεριβάλλον του ενζύμου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η λακκάση επέδειξε καλύτερη καταλυτική δραστηριότητα στα τριαδικά συστήματα τα οποία σχηματίζονται με βάση τα τερπένια από ότι στα συστήματα με βάση το εξάνιο. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η παρουσία του  $\alpha$ -πινενίου (το οποίο αναγνωρίζεται και ως υπόστρωμα από την λακκάση) [Niku-Paavola and Viikari, 2000] ή του  $d$ -λιμονενίου επιδρά σταθεροποιητικά στο ένζυμο. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της CPO κατά την εποξείδωση του στυρενίου.

Επίσης η οξείδωση της SYR από την TvL μελετήθηκε σε μικρογαλακτώματα με AOT σε ισοοκτάνιο και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>]. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται από τον βαθμό ενυδάτωσης των μικρογαλακτωμάτων με AOT. Η μέγιστη ταχύτητα της λακκάσης παρατηρήθηκε σε βαθμό ενυδάτωσης  $w_0$  60. Επιπλέον κατά

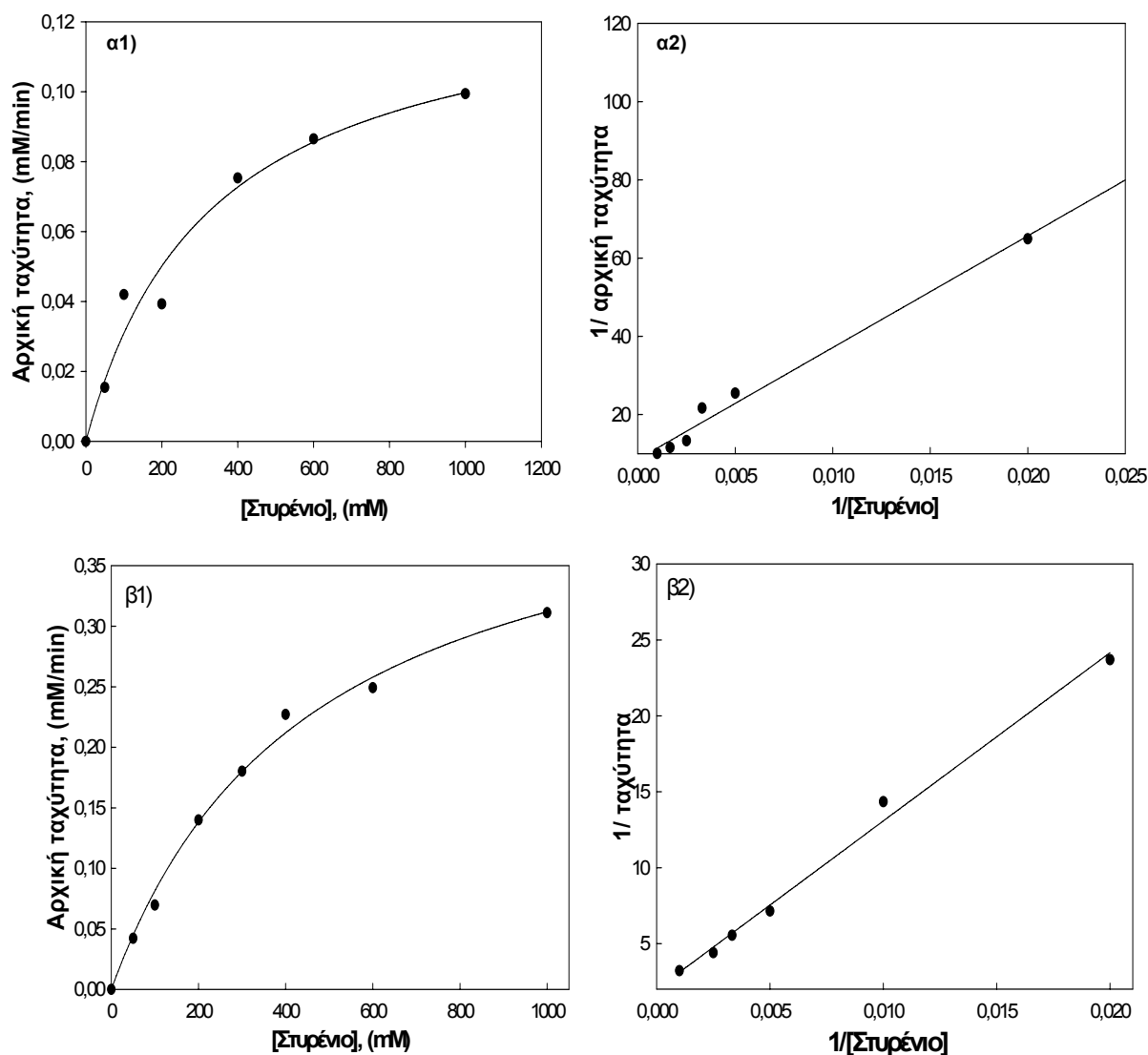
την οξείδωση του υδρόφοβου υποστρώματος της SYR, το ένζυμο διατηρεί την καταλυτική του δραστηριότητα σε μονοφασικά συστήματα με πολύ μεγαλύτερο ποσοστό μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη. Πιο συγκεκριμένα το ένζυμο κατάλυσε την οξείδωση της SYR ακόμη και όταν η τριτοταγή βουτανόλη ή το [bmim][BF<sub>4</sub>] ήταν 80% κ.ο. Επομένως συμπεραίνεται ότι η υδροφιλικότητα/υδροφοβικότητα του υποστρώματος επιδρά στην καταλυτική δράση του ενζύμου. Προφανώς η συμπεριφορά αυτή, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η παρουσία ενός υδρόφοβου υποστρώματος (όπως έγινε και στην περίπτωση του  $\alpha$ -πινενίου κατά την εποξείδωση του στυρενίου από την CPO) μπορεί να επιδρά σταθεροποιητικά στη δομή του ενζύμου.

### 7.5.2 Κινητικές μελέτες οξειδοαναγωγικών ενζύμων

Προς καλύτερη διερεύνηση της επίδρασης της σύστασης των συστημάτων στην καταλυτική συμπεριφορά των οξειδοαναγωγικών ενζύμων όπως π.χ. της χλωροϋπεροξειδάσης από *Caldariomyces fumago* και των λακκασών από τους μύκητες *T. versicolor*, *T. hirsuta*, *B. cinerea*, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές τόσο για υδρόφοβα όσο και για υδρόφιλα υποστρώματα σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό που αντιστοιχούν στην μονοφασική περιοχή B του διαγράμματος φάσεων του Σχήματος 7.6.α-ε.

#### 7.5.2.1 Κινητικές μελέτες χλωροϋπεροξειδάσης σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της σύνθεσης των τριαδικών συστημάτων στην καταλυτική συμπεριφορά της CPO, προσδιορίστηκαν οι φαινόμενες κινητικές σταθερές  $k_{cat}^{app}$  και  $K_m^{app}$  για το στυρένιο σε τρία συστήματα με βάση το εξάνιο (H1, H4, H9) και σε τρία συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1, P3, P9). Η κατ'όγκο σύσταση των υπό μελέτη τριαδικών συστημάτων δίνεται στους Πίνακες Ι.α.β του παραρτήματος. Διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα η κινητική της σύνθεσης του εποξειδίου του στυρενίου που καταλύεται από την CPO περιγράφεται από το μοντέλο Michaelis-Menten. Στο Σχήμα 7.10.α.β παρουσιάζονται ενδεικτικά διαγράμματα που αναπαριστούν τη συνάρτηση μεταξύ της συγκέντρωσης του υποστρώματος και της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης για την CPO σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο ή το  $\alpha$ -πινένιο, αντίστοιχα.



**Σχήμα 7.10.** Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της οξείδωσης του στυρενίου από την CPO, σε τριαδικά συστήματα με βάση: α1) το εξάνιο (σύστημα H9, με 4.6% κ.ο σε νερό) και β1) το  $\alpha$ -πινένιο (σύστημα P1 με 18.9% κ.ο σε νερό). Τα διαγράμματα α2, β2 αντιστοιχούν στα αντίστοιχα διαγράμματα Lineweaver-Burk.

Οι φαινόμενες κινητικές σταθερές  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$  και  $K_{\text{m}}^{\text{app}}$  δίνονται στον Πίνακα 7.7. Όπως φαίνεται, οι τιμές των κινητικών σταθερών όπως και η καταλυτική ικανότητα της CPO, όπως αυτή περιγράφεται από τον λόγο  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}/K_{\text{m}}^{\text{app}}$ , εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση του συστήματος καθώς επίσης και από την φύση του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται. Η καταλυτική δραστηριότητα της CPO (όπως αυτή καταδεικνύεται από την σταθερά  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ ), είναι ιδιαίτερα υψηλή σε συστήματα που σχηματίζονται με  $\alpha$ -πινένιο από ότι με εξάνιο, ενώ η φαινόμενη συγγένεια του ενζύμου για το στυρένιο (μετρούμενη από την σταθερά  $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ )

μειώνεται. Ο αριθμός μετατροπής  $k_{cat}$  υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση (6.4), της παραγράφου 6.3.5.3.1. Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι οι τιμές  $k_{cat}^{app}$  που παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι παρόμοιες ή υψηλότερες από αυτές που παρατηρήθηκαν κατά την οξείδωση του στυρενίου σε μονοφασικά μίγματα τριτοταγούς βουτανόλης/νερού [Santhanam and Dordick, 2002].

**Πίνακας 7.7.** Επίδραση της σύστασης του συστήματος αντίδρασης στις κινητικές σταθερές της οξείδωσης του στυρενίου από την CPO σε διάφορα τριαδικά συστήματα. *Συνθήκες αντίδρασης:* CPO 20 U (0.45  $\mu$ M), *t*-BHP σε νερό 200 mM.

| Σύστημα | $V_{max}^{app}$<br>(mM min <sup>-1</sup> ) | $K_m^{app}$<br>(mM) | $k_{cat}^{app}$<br>(min <sup>-1</sup> ) | $k_{cat}^{app} / K_m^{app}$<br>(mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) | TTN                            |             |
|---------|--------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------|
|         |                                            |                     |                                         |                                                                      | (mol προϊόντος/mol CPO)        |             |
|         |                                            |                     |                                         |                                                                      | Εποξειδίου<br>του<br>στυρενίου | Βενζαλδεϋδη |
| H1      | 0.328 ± 0.019                              | 324 ± 45            | 729                                     | 2.25                                                                 | 14000                          | 11000       |
| H4      | 0.160 ± 0.041                              | 195 ± 29            | 354                                     | 1.82                                                                 | 12500                          | 10000       |
| H9      | 0.133 ± 0.030                              | 321 ± 76            | 295                                     | 0.92                                                                 | 10500                          | 8000        |
| P1      | 0.455 ± 0.026                              | 458 ± 54            | 1012                                    | 2.21                                                                 | 18500                          | 14000       |
| P3      | 0.629 ± 0.055                              | 1131 ± 157          | 1398                                    | 1.24                                                                 | 17500                          | 13000       |
| P9      | 0.834 ± 0.050                              | 1668 ± 144          | 1853                                    | 0.90                                                                 | 17500                          | 13000       |

Όπως παρατηρείται και από τον παραπάνω πίνακα, σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, το άθροισμα των τιμών TTN που υπολογίστηκαν αναφορικά με το σχηματισμό του εποξειδίου του στυρενίου και της βενζαλδεϋδης, ήταν πάνω από 32000. Η τιμή αυτή είναι 10 φορές πιο υψηλή από αυτή που έχει δημοσιευτεί για υδατικά μέσα [Dexter and Hager, 1995; Zaks and Dodds, 1995] και περίπου 30% πιο υψηλή από την τιμή που πρόσφατα δημοσιεύτηκε σε μέσα που σχηματίζονται παρουσία επιφανειοενεργού [Park and Clark, 2006a]. Το γεγονός ότι σε συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, οι τιμές TTN παρέμειναν υψηλές ακόμη και σε συστήματα με χαμηλό ποσοστό σε νερό μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη σταθερότητα της CPO από το  $\alpha$ -πινένιο, όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 7.5.3.1.

Επιπλέον, η καταλυτική ικανότητα της CPO εξαρτάται ισχυρά από το ποσοστό του νερού στο τριαδικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερη καταλυτική δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα με υψηλό ποσοστό νερού (συστήματα H1 και P1). Η εξάρτηση της δραστηριότητας της CPO από την υδατική φάση του συστήματος, είναι όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την εστεροποίηση του λαυρικού οξέος με την 1-προπανόλη από λιπάσες [Zoumprioti *et al.*, 2006a,b], κατά την οξείδωση της χοληστερόλης από την οξειδάση της χοληστερόλης [Khmelnitsky *et al.*, 1988b] και κατά την υδρόλυση 4-νιτροφαινυλο εστέρων των λιπαρών οξέων από λιπάση του ανθρώπινου γάλακτος σε αντίστοιχα τριαδικά συστήματα [O'Connor and Cleverly, 1995]. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 7.5.1.2, μια πιθανή εξήγηση της παραπάνω συμπεριφοράς δίνεται από το γεγονός ότι στα συστήματα αυτά, στην περιοχή όπου το ποσοστό του νερού είναι υψηλό, δεν ανιχνεύονται μικροδομές [Smith *et al.*, 1977; Khmelnitsky *et al.*, 1988b]. Αυτό σημαίνει ότι το ένζυμο και τα μόρια του υποστρώματος εντοπίζονται στην υδατική μικροφάση του συστήματος, γεγονός που διευκολύνει την πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο. Από την άλλη μεριά, η καταλυτική αποτελεσματικότητα της CPO μειώνεται σημαντικά στα μικρογαλακτώματα με χαμηλό ποσοστό νερού. Τα συστήματα αυτά ανήκουν σε μια περιοχή του διαγράμματος φάσεως όπου εντοπίζονται υδατικές δομές διεσπαρμένες στον οργανικό διαλύτη. Η χαμηλή καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρείται στα σύστημα αυτά μπορεί πιθανά να αποδοθεί στο ότι το ένζυμο και το υπόστρωμα εντοπίζονται σε διαφορετική περιοχή, αφού μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικές μικροφάσεις του συστήματος.

#### **7.5.2.2 Κινητικές μελέτες λακκασών σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα**

Προς καλύτερη διερεύνηση της επίδρασης της σύστασης των τριαδικών συστημάτων στην καταλυτική συμπεριφορά των τριών λακκασών από *T. versicolor*, *T. hirsuta* και *B. cinerea*, προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές  $V_{\max}$  και  $K_m$  κατά την οξείδωση του ABTS σε τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο (H<sub>T</sub>1) ή τα μονοτερπένια  $\alpha$ -πινένιο (P<sub>T</sub>1) ή  $d$ -λιμονένιο (L<sub>T</sub>1), τα οποία είχαν το ίδιο ποσοστό υδατικής φάσης (18.9% κ.ο). Διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα υπό εξέταση συστήματα η κινητική της οξείδωσης του ABTS ακολούθησε το μοντέλο Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση (6.3) της παραγράφου 6.3.5.3.1. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.3.2.α. Οι τιμές των κινητικών σταθερών παρατίθενται στον Πίνακα 7.8.

**Πίνακας 7.8.** Τιμές κινητικών σταθερών που υπολογίστηκαν κατά την οξείδωση του ABTS από τις TvL, ThL και BcL στα τριαδικά συστήματα: α) H<sub>T</sub>1, β) P<sub>T</sub>1, γ) L<sub>T</sub>1. Η κατ'όγκο σύσταση των τριαδικών συστημάτων δίνεται στους Πίνακες Ι.α-γ του παραρτήματος. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 0.1U, ABTS 1mM.

| Τριαδικά<br>συστήματα | Πηγή ενζύμου         | V <sub>max</sub><br>(nmol/min) | K <sub>m</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub> / K <sub>m</sub> |
|-----------------------|----------------------|--------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| H <sub>T</sub> 1      | <i>T. versicolor</i> | 0.29±0.01                      | 0.34±0.03              | 0.8                               |
|                       | <i>T. hirsuta</i>    | 0.21±0.01                      | 0.51±0.07              | 0.4                               |
|                       | <i>B. cinerea</i>    | 0.08±0.01                      | 0.49±0.08              | 0.2                               |
| P <sub>T</sub> 1      | <i>T. versicolor</i> | 2.83±0.11                      | 0.46±0.06              | 6.1                               |
|                       | <i>T. hirsuta</i>    | 0.84±0.05                      | 0.34±0.06              | 2.5                               |
|                       | <i>B. cinerea</i>    | 0.66±0.02                      | 0.32±0.01              | 2.1                               |
| L <sub>T</sub> 1      | <i>T. versicolor</i> | 0.19±0.04                      | 0.13±0.09              | 1.4                               |
|                       | <i>T. hirsuta</i>    | 0.24±0.02                      | 0.61±0.13              | 0.4                               |
|                       | <i>B. cinerea</i>    | 0.26±0.01                      | 0.65±0.07              | 0.4                               |

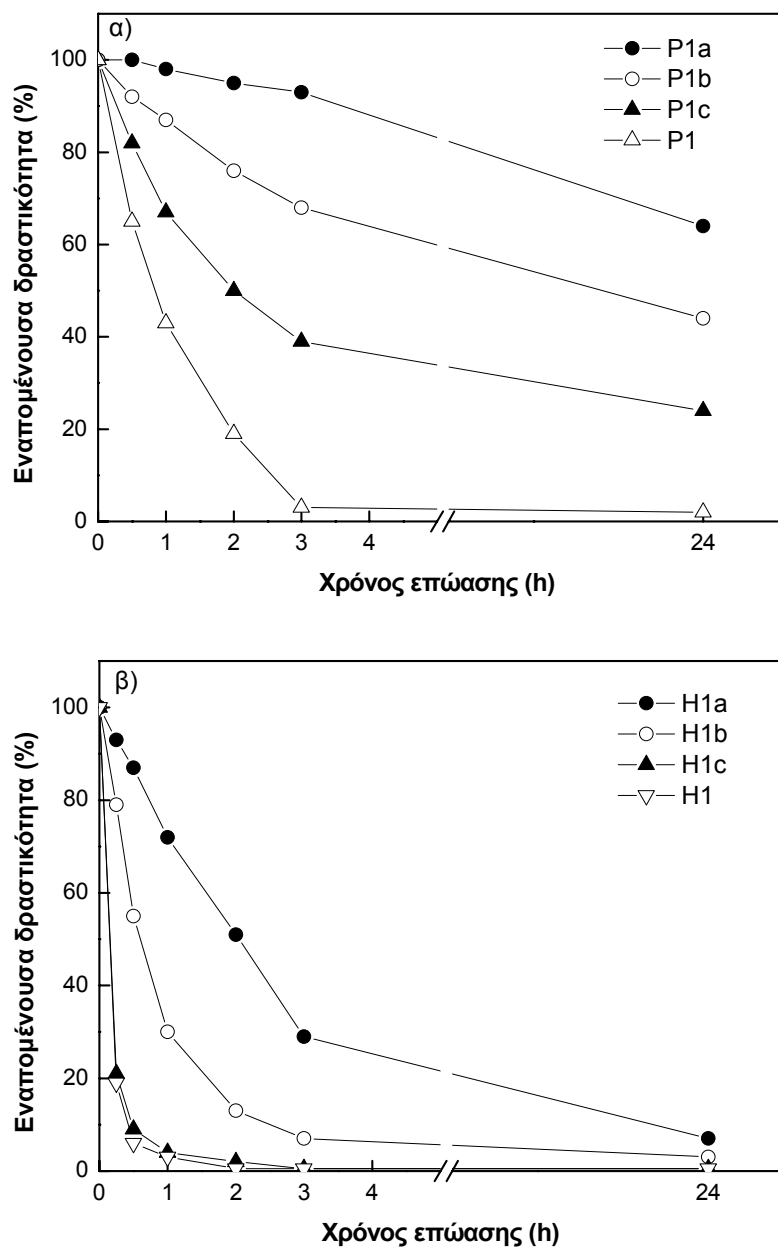
Όπως διαπιστώνεται από τον παραπάνω πίνακα, οι τιμές των κινητικών σταθερών όπως και η καταλυτική ικανότητα των τριών λακκασών, όπως αυτή περιγράφεται από τον λόγο V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>, εξαρτώνται από τη σύσταση του συστήματος καθώς επίσης και από την φύση του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, η καταλυτική δραστηριότητα των λακκασών, που είναι εγκλωβισμένες σε τριαδικά συστήματα, όπως αυτή καταδεικνύεται από την V<sub>max</sub> είναι σημαντικά μεγαλύτερη σε συστήματα που σχηματίζονται με τερπένια (ειδικά με α-πινένιο) αντί για εξάνιο, ενώ η συγγένεια του ενζύμου για το ABTS (όπως αυτή περιγράφεται από την σταθερά K<sub>m</sub>) μειώνεται. Η συμπεριφορά αυτή είναι παρόμοια με αυτή που επέδειξε η CPO κατά την εποξείδωση του στυρενίου σε διάφορα τριαδικά συστήματα. Η υψηλότερη δραστηριότητα που παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με μονοτερπένια, μπορεί να αποδοθεί στο ότι τα τερπένια ασκούν προστατευτική και σταθεροποιητική δράση στην ενζυμική δομή, σε σύγκριση με τα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο, τα οποία φαίνεται ότι επιταχύνουν την αδρανοποίηση του ενζύμου. Επίσης η καταλυτική δραστηριότητα των τριών λακκασών εξαρτάται από την πηγή του ενζύμου.

### **7.5.3 Σταθερότητα οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα.**

Η σταθερότητα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων σε διάφορα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό μελετήθηκε με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση της σύστασης του συστήματος (π.χ. η φύση του οργανικού διαλύτη, % περιεκτικότητα σε νερό), της θερμοκρασίας και του χρόνου επώασης στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων. Προς την κατεύθυνση αυτή η CPO και οι λακκάσες TnL, ThL και BcL επωάστηκαν σε διάφορα τριαδικά συστήματα με σκοπό την μελέτη των παραγόντων που σταθεροποιούν ή αδρανοποιούν τα παραπάνω ένζυμα.

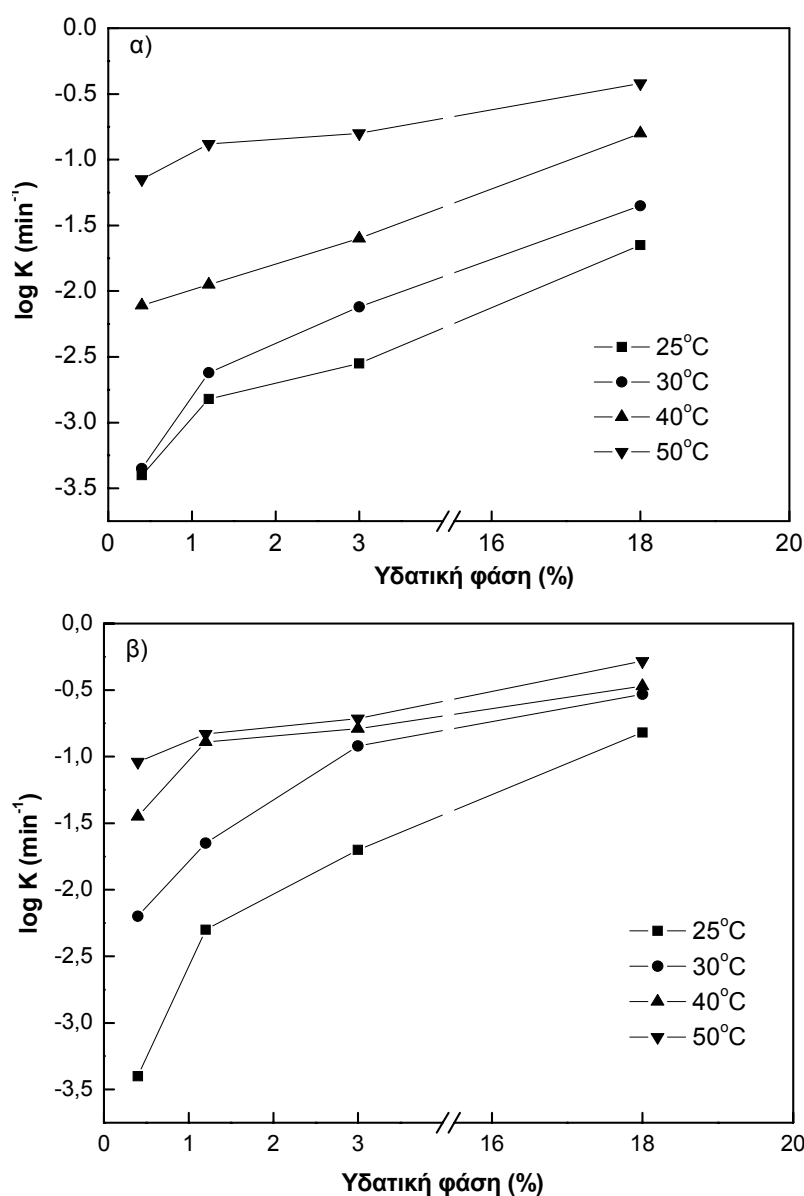
#### **7.5.3.1 Σταθερότητα CPO σε τριαδικά μονοφασικά συστήματα.**

Η σταθερότητα της CPO σε διάφορα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση χλωρίωσης του MCD και την αντίδραση οξείδωσης του στυρενίου. Στην περίπτωση μελέτης της ενζυμικής σταθερότητας μέσω της χλωρίωσης του MCD, η σταθερότητα του ενζύμου μελετήθηκε απουσία υποστρώματος σε διάφορες θερμοκρασίες (25-50°C) σε τριαδικά συστήματα με ποσοστό νερού που ποίκιλε από 0.4 έως 18.9% κ.ο (ή 1.7 έως 51.8% σε μοριακό κλάσμα). Στα συστήματα αυτά (H1a-c και P1a-c), ο λόγος της αλκοόλης προς τον οργανικό διαλύτη ήταν σταθερός. Η απενεργοποίηση της CPO κατά την επώαση της στους 30°C σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο (H1a-c) και με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1a-c) τα οποία έχουν διαφορετικό ποσοστό νερού, παρουσιάζεται στα Σχήματα 7.11.α,β αντίστοιχα. Όπως φαίνεται από τα παρακάτω διαγράμματα η εναπομένουσα δραστηριότητα της CPO ποικίλει ανάλογα με το υδατικό περιεχόμενο του συστήματος. Η υψηλότερη σταθερότητα παρατηρήθηκε σε τριαδικό σύστημα με  $\alpha$ -πινένιο, το οποίο έχει την χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό (P1a). Στο σύστημα αυτό η CPO μετά από 24h επώασης, διατήρησε το 65% αρχικής της δραστηριότητας, ποσοστό το οποίο είναι συγκριτικά μεγαλύτερο με αυτό που έχει δημοσιευτεί για άλλα οργανικά μέσα [Santhanam and Dordick, 2002].



**Σχήμα 7.11.** Εναπομένουσα δραστηριότητας της CPO (με βάση την χλωρίωση του MCD) κατά την επώαση της στους 30°C σε α) τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1a-c), και σε β) τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο (H1a-c) με διάφορα ποσοστά νερού. Ο λόγος του οργανικού διαλύτη προς την 2-προπανόλη ήταν 0.242. Η % κ.ο αναλογία του νερού στα συστήματα ήταν: 0.4% για τα H1a και P1a, 1.2% για τα H1b και P1b, 3.0% για τα H1c και P1c και 18.9% για τα H1 και P1

Στα Σχήματα 7.12.α,β παρουσιάζεται ο λογάριθμος της σταθεράς απενεργοποίησης ( $\log k_d$ ) συναρτήσει του ποσοστού του νερού των τριαδικών συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν (H1a-c και P1a-c), για τις διάφορες θερμοκρασίες επώασης.

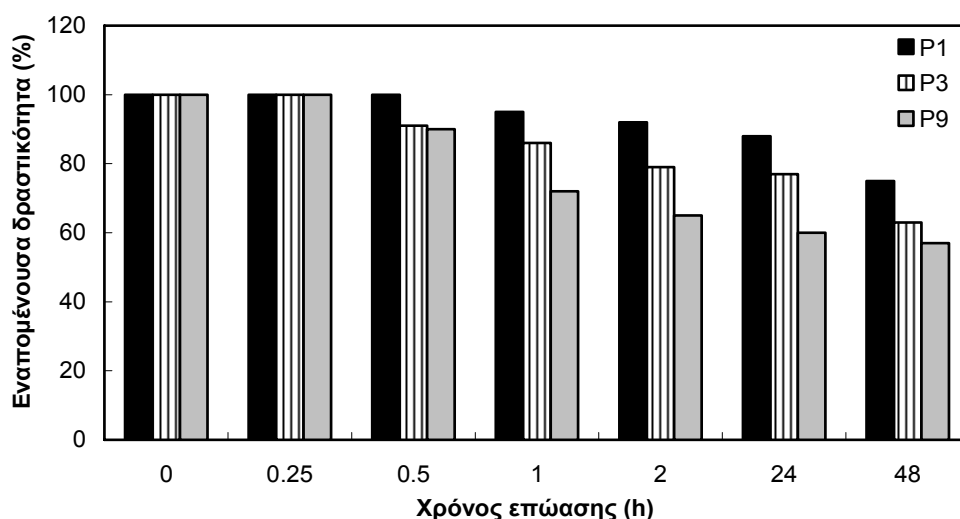


**Σχήμα 7.12.** Εξάρτηση του λογάριθμου της σταθεράς απενεργοποίησης ( $\log k_d$ ) συναρτήσει του ποσοστού του νερού των τριαδικών συστημάτων και της θερμοκρασίας επώασης σε α) τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1a-c), και σε β) τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο (H1a-c).

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, η σταθερότητα του ενζύμου εξαρτάται ισχυρά από την θερμοκρασία επώασης και από την περιεκτικότητα σε νερό του

συστήματος. Σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C, καθώς επίσης και σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, η ενζυμική σταθερότητα μειώνεται σημαντικά. Παρόμοια εξάρτηση της σταθερότητας της CPO από την θερμοκρασία επώασης αναφέρθηκε για χημικά τροποποιημένο [La Rotta Hernandez *et al.*, 2005] ή ακινητοποιημένο [Aburto *et al.*, 2005] ένζυμο σε υδατικά μέσα. Από την άλλη πλευρά, καθώς ο όγκος του νερού μειώνεται από 3.0 % σε 0.4%, ενώ οι άλλες μεταβλητές διατηρούνται σταθερές, οι τιμές της  $\log k_d$  μειώνονται, πράγμα το οποίο δείχνει ότι η σταθερότητα της CPO είναι σημαντικά υψηλότερη σε τριαδικά συστήματα με χαμηλό υδατικό περιεχόμενο. Πρέπει να σημειωθεί ότι, η σταθερότητα της εγκλωβισμένης CPO σε τριαδικά συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (συστήματα H1a, P1a), είναι μεγαλύτερη εν συγκρίσει με αυτή που έχει αναφερθεί σε διάφορα οργανικά μέσα, όπως π.χ. σε μονοφασικό σύστημα τριτοταγούς βουτανόλης/νερού [Santhanam and Dordick, 2002].

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η παρουσία μορίων υποστρώματος όπως π.χ. του στυρενίου στο περιβάλλον του ενζύμου είχε θετική επίδραση στην σταθερότητα της CPO κατά την επώαση της σε διάφορα τριαδικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα η CPO επώαστηκε παρουσία στυρενίου (200 mM) σε τρία συστήματα με βάση το εξάνιο (H1, H4, H9) και σε τρία συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1, P3, P9). Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα το ένζυμο διατήρησε μεγάλο ποσοστό της αρχικής του δραστηριότητας. Στο Σχήμα 7.13 παρουσιάζεται η σταθεροποιητική επίδραση του υποστρώματος στα συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1, P3, P9).

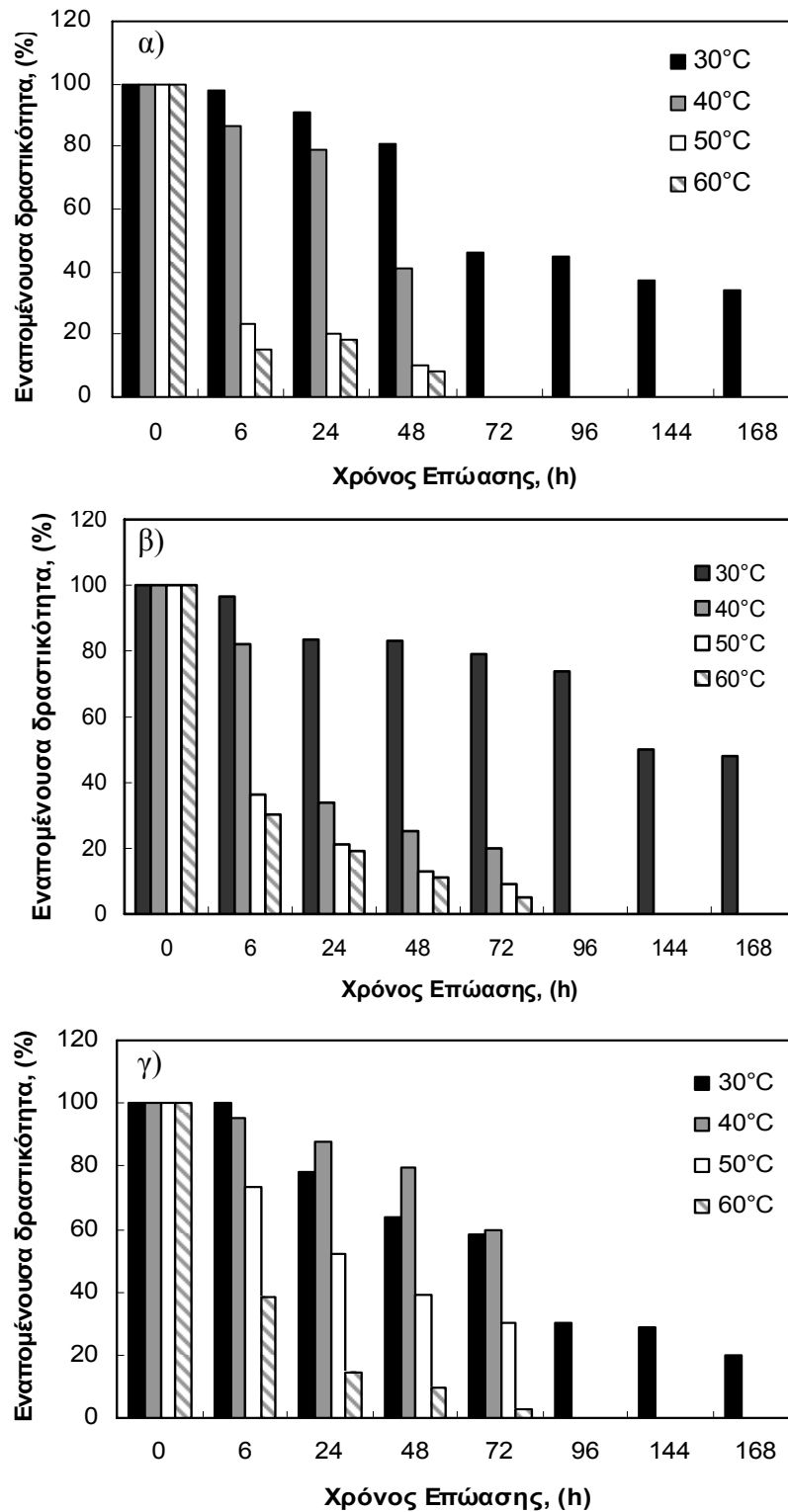


**Σχήμα 7.13.** Εναπομένουσα δραστηριότητας της CPO (με βάση την οξείδωση του στυρενίου) κατά την επώαση της στους 30°C σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1, P3, P9).

Όπως διαπιστώνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η επίδραση του υποστρώματος κατά την επώαση του ενζύμου έπαιξε καταλυτικό ρόλο, καθώς το ένζυμο διατήρησε μεγάλο μέρος της δραστηρότητας του για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ανάλογη εικόνα παρατηρήθηκε και κατά την επώαση του ενζύμου με στυρένιο σε τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο. Επίσης παρόμοια σταθεροποιητική δράση με αυτή του στυρενίου στην δραστηρότητα της CPO παρατηρήθηκε βιβλιογραφικά και σε διαλύματα με τριτοταγή βουτανόλη [Santhanam and Dordick, 2002]. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι στα συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο το ένζυμο επέδειξε μεγαλύτερη εναπομένουσα δραστηρότητα, σε σχέση με αυτή που παρουσίασε στα συστήματα με βάση το εξάνιο, πράγμα το οποίο σημαίνει ότι και το  $\alpha$ -πινένιο ασκεί σταθεροποιητική επίδραση στο ένζυμο. Η σταθεροποίηση του ενζύμου από το στυρένιο και το  $\alpha$ -πινένιο μπορεί να αποδοθεί τις υδρόφοβες αλληλοεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων μορίων και του ενεργού κέντρου της CPO. Τέτοια μόρια που σταθεροποιούν τη δομή του ενζύμου πιστεύεται ότι αλληλεπιδρούν με το ενεργό κέντρο του ενζύμου στη περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Γενικά η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος χαρακτηρίζεται από μια υδρόφοβη περιοχή η οποία συνδέει την επιφάνεια του ενζύμου με την περιοχή της αίμης. Αλληλοεπιδράσεις σαν και αυτές που αναφέρθηκαν παραπάνω είναι πιο έντονες σε συστήματα με μικρή περιεκτικότητα σε νερό. Αυτό συμβαίνει διότι σε συνθήκες με μειωμένη διαθεσιμότητα νερού, οι υδροφοβικές περιοχές του ενεργού κέντρου του ενζυμικού μορίου αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τα υδρόφοβα μόρια του συστήματος της αντίδρασης [Sundaramoorthy *et al.*, 1995].

#### **7.5.3.2 Σταθερότητα των TvL, ThL και BcL σε μη συμβατικά συστήματα.**

Η σταθερότητα των ελεύθερων τριών λακκασών προσδιορίστηκε σε διάφορα μικρογαλακτώματα με ή χωρίς επιφανειοενεργό αλλά και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται από τριτοταγή βουτανόλη ή [bmim][BF<sub>4</sub>], ακολουθώντας την οξείδωση του ABTS. Η ενζυμική σταθερότητα μελετήθηκε σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες (30-60°C) επώασης απουσία του υποστρώματος. Στα Σχήματα 7.14.α-γ που ακολουθούν παρουσιάζεται η σταθερότητα της TvL, ThL και της BcL σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό (P<sub>T</sub>1). Η κατ'όγκο σύσταση του συστήματος παρουσιάζεται στον Πίνακα Ι.β του παραρτήματος.



**Σχήμα 7.14.** Εναπομένονσα δραστηριότητας των λακκασών από: α) *T. versicolor*, β) *T. hirsuta* και γ) *B. cinerea* κατά την επώαση τους σε τριαδικό συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό (P<sub>T</sub>1). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση: 0.1 U, ABTS: 1mM.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα και οι τρεις λακκάσες είναι ιδιαίτερα σταθερές στο τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο κατά την επώαση τους στους 30°C και 40°C. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι οι TvL, ThL και BcL μετά από 168h επώασης στους 30°C, διατηρούν το 35%, 48% και το 20% της αρχικής τους δραστηριότητας, αντίστοιχα. Τα παραπάνω ποσοστά φανερώνουν ότι η ThL είναι πιο σταθερή σε σχέση με τις άλλες δύο, καθώς κάτω από παρόμοιες συνθήκες επώασης διατηρεί μεγαλύτερο ποσοστό της αρχικής της δραστηριότητας. Αξίζει να σημειωθεί ότι με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης η σταθερότητα μειώνεται και στα τρία ένζυμα. Ανάλογη συμπεριφορά με αυτή που παρατηρήθηκε στο σύστημα P<sub>T1</sub>, διαπιστώθηκε και κατά την επώαση των τριών λακκασών σε τριαδικό σύστημα με βάση το *d*-λιμονένιο, την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό (L<sub>T1</sub>). Αντίθετα κατά την μελέτη σταθερότητας των λακκασών σε τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο, την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό (H<sub>T1</sub>) παρατηρήθηκε ταχεία απενεργοποίηση των ενζύμων ακόμη και σε ήπιες συνθήκες επώασης (30°C). Η συμπεριφορά αυτή καταδεικνύει τον σταθεροποιητικό ρόλο των τερπενίων στην διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των τριών λακκασών. Παρόμοια συμπεριφορά είχε παρατηρηθεί και για την CPO κατά την επώαση της σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Όμοια πειράματα ενζυμικής σταθερότητας διεξάχθηκαν σε μικρογαλάκτωμα που σχηματίζονται με AOT σε ισοοκτανιο, με βαθμό ενυδάτωσης  $w_o = 40$ , και σε μονοφασικό σύστημα με τριτοταγή βουτανόλη 10% κ.ο και για τις τρεις λακκάσες. Στους Πίνακες 7.9 και 7.10 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής και της σταθεράς απενεργοποίησης ( $k_d$ ) για τα εξεταζόμενα μη συμβατικά συστήματα.

**Πίνακας 7.9.** Ενδεικτικές τιμές χρόνου ημίσειας ζωής των τριών λακκασών σε διάφορα μη συμβατικά μέσα.

| Σύστημα αντίδρασης                                                 | Χρόνος ημίσειας ζωής ( $t_{1/2}$ ) σε min |                   |                   |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                                    | <i>T. versicolor</i>                      | <i>T. hirsuta</i> | <i>B. cinerea</i> |
| Τριαδικό σύστημα με βάση το $\alpha$ -πινένιο (P <sub>T1</sub> )   | 126.0                                     | 134.4             | 60.0              |
| Τριαδικό σύστημα με βάση το <i>d</i> -λιμονένιο (L <sub>T1</sub> ) | 55.2                                      | 73.2              | 68.4              |
| Μικρογαλάκτωμα με AOT ( $w_o = 40$ )                               | 48.0                                      | 47.4              | 50.4              |
| Μ.Σ. με τριτοταγή βουτανόλη 10% κ.ο                                | 41.1                                      | 45.6              | 11.4              |

**Πίνακας 7.10.** Τιμές σταθεράς απενεργοποίησης ( $k_d$ ) σε  $h^{-1}$ , των τριών λακκασών για τα εξεταζόμενα μη συμβατικά συστήματα.

| Ένζυμο                      | Θερμοκρασία | Τριαδικό<br>σύστημα<br>P <sub>T1</sub> | Τριαδικό<br>σύστημα<br>L <sub>T1</sub> | Μικρογαλάκτωμα<br>με AOT<br>(w <sub>o</sub> =40) | Μ.Σ. από<br>τριτοταγή<br>βουτανόλη 10%<br>κ.ο |
|-----------------------------|-------------|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b><i>T. versicolor</i></b> | 30 °C       | 0.33                                   | 0.75                                   | 0.87                                             | 1.01                                          |
|                             | 40 °C       | 1.51                                   | 2.5                                    | 0.90                                             | 7.33                                          |
|                             | 50 °C       | 3.33                                   | 3.55                                   | 3.6                                              | 15.8                                          |
|                             | 60 °C       | 3.42                                   | 3.9                                    | 4.0                                              | >20                                           |
| <b><i>T. hirsuta</i></b>    | 30 °C       | 0.31                                   | 0.57                                   | 0.88                                             | 0.79                                          |
|                             | 40 °C       | 2.7                                    | 2.6                                    | 3.0                                              | 3.33                                          |
|                             | 50 °C       | 3.4                                    | 3.5                                    | 3.8                                              | 14.3                                          |
|                             | 60 °C       | 3.7                                    | 3.9                                    | 4.8                                              | >20                                           |
| <b><i>B. cinerea</i></b>    | 30 °C       | 0.69                                   | 0.61                                   | 0.83                                             | 6.3                                           |
|                             | 40 °C       | 2.66                                   | 1.75                                   | 2.9                                              | 12.1                                          |
|                             | 50 °C       | 5.1                                    | 3.5                                    | 5.1                                              | 16.2                                          |
|                             | 60 °C       | 5.3                                    | 4.8                                    | 6.6                                              | >20                                           |

Σύμφωνα με τις τιμές του χρόνου ημίσειας ζωής και τις τιμές σταθεράς απενεργοποίησης ( $k_d$ ) που δίνονται στους παραπάνω πίνακες, παρατηρείται αρχικά ότι σημαντική επίδραση στη σταθερότητα των ενζύμων διαδραματίζει το μέσο, η θερμοκρασία επώασης και η πηγή προέλευσης της λακκάσης. Πιο συγκεκριμένα σε όλα τα μη συμβατικά συστήματα με αύξηση της θερμοκρασίας επώασης η σταθερότητα μειώνεται και για τα τρία ένζυμα. Επίσης διαπιστώνεται ότι οι λακκάσες είναι πιο σταθερές όταν εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό που είναι πλούσια σε τερπένια όπως π.χ σε  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, από ότι όταν εγκλωβίζονται σε μικρογαλάκτωμα με AOT ή σε μονοφασικά συστήματα με τριτοταγή βουτανόλη και νερό. Τέλος η ThL φαίνεται να είναι το πιο σταθερό ένζυμο στις περισσότερες περιπτώσεις.

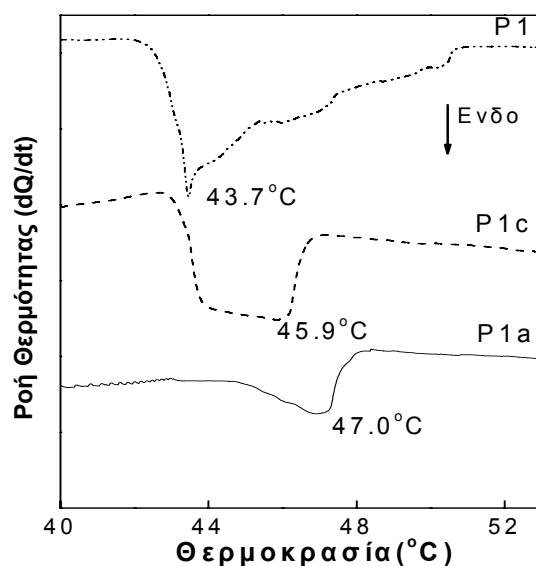
#### **7.5.4 Μελέτη της θερμοσταθερότητας των ενζύμων σε τριαδικά συστήματα με τη χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης.**

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της σύστασης των μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται απουσία επιφανειοενεργού (π.χ. η φύση του οργανικού διαλύτη, % περιεκτικότητα σε νερό), στη θερμοσταθερότητα της CPO και της TvL χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC). Η τεχνική αυτή καταγράφει τις αλλαγές που συμβαίνουν στην δομή ενός μορίου όταν λαμβάνει χώρα μια μετάβαση και έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για την μελέτη των θερμοδυναμικών ιδιοτήτων διαφόρων βιομορίων [Öste-Triantafyllou *et al.*, 1996; Koch-Schmidt and Mosbach, 1977; Bittar *et al.*, 2003]. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.5.1.

##### **7.5.4.1 Μελέτη θερμοσταθερότητας της CPO σε τριαδικά συστήματα.**

Για να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων επηρεάζει τα δομικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε μελέτη με τη μέθοδο της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Στην παρούσα εργασία, η θερμοκρασία μετουσίωσης  $T_d$  της CPO προσδιορίστηκε σε διάφορα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο και με βάση το  $\alpha$ -πινένιο τα οποία περιείχαν διαφορετικό ποσοστό νερού. Όταν τα δείγματα υποβλήθηκαν σε νέα ανάλυση με DSC δεν παρατηρήθηκε καμία κορυφή, ενώ καμία ενζυμική δραστηριότητα δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα που είχαν υποστεί θερμική ανάλυση, πράγμα το οποίο δείχνει ότι όλες οι μεταβολές που λαμβάνουν χώρα μετά τους 80°C είναι μη αντιστρεπτές. Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν παρατηρήθηκαν ενδόθερμες μεταβολές. Το  $T_d$  μπορεί να υπολογιστεί από το ελάχιστο κάθε καμπύλης, το οποίο αντιστοιχεί στο σημείο της θερμοκρασίας που συνδέεται με την δομική μετάπτωση της CPO σε καταστάσεις μετουσίωσης στις αντίστοιχες συνθήκες της αντίδρασης. Στο Σχήμα 7.15 παρουσιάζεται η επίδραση του τριαδικών συστημάτων με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, στην σταθερότητα της CPO.

Όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα οι τιμές  $T_d$  αυξήθηκαν μέχρι και 3.3°C καθώς το ποσοστό του νερού στα τριαδικά συστήματα με  $\alpha$ -πινένιο μειώθηκε από 18.9% σε 0.4% κ.ο. Βάση της παρατήρησης αυτής διαπιστώνεται ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό σε τριαδικά συστήματα, τα οποία περιέχουν μικρό ποσοστό υδατικής φάσης.



**Σχήμα 7.15.** Ενδοθερμικές καμπύλες της θερμικής αποσταθεροποίησης της CPO με χρήση της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης (DSC) στα τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο με % κ.ο σε νερό α) P1 18.9%, β) P1c 3.0% και γ) P1a 0.4%.

Στον Πίνακα 7.11 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές  $T_d$  και της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ) που παρατηρήθηκαν τόσο σε συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο όσο και με βάση το εξάνιο με διαφορετικό ποσοστό νερού.

**Πίνακας 7.11.** Τιμές θερμοκρασιακών μεταβολών ( $T_d$ ) και ενθαλπίας ( $\Delta H_{cal}$ ) που προσδιορίστηκαν από τις DSC μετρήσεις κατά την θερμική μελέτη της CPO σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό. Ο λόγος του οργανικού διαλύτη προς την 2-προπανόλη ήταν 0.242 σε όλα τα τριαδικά συστήματα. Η συγκέντρωση της CPO ήταν  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

| Σύστημα | Υδατική φάση<br>(% κ.ο) | $T_d$<br>(°C) | $\Delta H_{cal}$<br>(kJ g <sup>-1</sup> του διαλύματος) |
|---------|-------------------------|---------------|---------------------------------------------------------|
| P1a     | 0.4                     | 47.0          | 0.043                                                   |
| P1c     | 3.0                     | 45.9          | 0.162                                                   |
| P1      | 18.9                    | 43.7          | 0.178                                                   |
| H1a     | 0.4                     | 39.5          | 0.062                                                   |
| H1      | 18.9                    | 37.0          | 0.242                                                   |

Όπως φαίνεται και από τον παραπάνω πίνακα οι τιμές  $T_d$  αυξήθηκαν μέχρι και  $2.5^\circ\text{C}$  καθώς το ποσοστό του νερού στα τριαδικά συστήματα με εξάνιο μειώθηκε από 18.9% σε

0.4% κ.ο. Η υψηλότερη σταθερότητα της CPO που παρατηρείται σε τριαδικά συστήματα με χαμηλό ποσοστό σε νερό με βάση την τεχνική DSC, είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα σταθερότητας που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 7.5.3.1. Μια πιθανή εξήγηση της αυξημένης σταθερότητας του ενζύμου σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό διασπαρμένων υδατικών συναθροίσεων ή μικροσταγονιδίων που παρουσιάζονται σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [Smith *et al.*, 1977; Khmelnitsky *et al.*, 1988b]. Θεωρείται ότι σε τέτοια συστήματα, το ένζυμο πρέπει να είναι στην πιο σταθερή του κατάσταση επειδή μπορεί να μικροενηλακωθεί πλήρως στο νερό, αποφεύγοντας έτσι την άμεση επαφή με την οργανική φάση. Από την άλλη πλευρά, σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό η ευελιξία του πρωτεϊνικού μορίου αναμένεται να είναι πιο έντονη στα μέσα αυτά σε σχέση με τα συστήματα με χαμηλό ποσοστό σε νερό, οδηγώντας έτσι πιο εύκολα στην μετουσίωση του ενζύμου. Τα αποτελέσματα είναι σε αντιστοιχία με αυτά που έχουν παρατηρηθεί και για διάφορα άλλα ένζυμα σε μέσα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [Oste –Triantafyllou *et al.*, 1996, Stamatis *et al.*, 1998, 1999b; De Diego *et al.*, 2004; Zoumpanioti *et al.*, 2006b]. Επίσης από τις τιμές του παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι ο εγκλωβισμός της CPO σε συστήματα που σχηματίζονται με  $\alpha$ -πινένιο οδήγησε σε αύξηση των τιμών  $T_d$  κατά 7.0°C, σε σύγκριση με αυτές που παρατηρήθηκαν σε τριαδικά συστήματα με εξάνιο.

Επιπλέον, οι τιμές της ενθαλπίας ( $\Delta H_{cal}$ ), λόγω ότι αντιπροσωπεύουν τη συνολική θερμότητα που απορροφάται κατά τη διάρκεια των μη αντιστρεπτών αλλαγών στη διαμόρφωση του ενζύμου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτικοποίηση των διαφόρων επιδράσεων του συστήματος στο ένζυμο [De Diego *et al.*, 2004]. Γενικά διαπιστώθηκε ότι οι τιμές της ενθαλπίας αυξάνονται με αύξηση του υδατικού περιεχομένου του τριαδικού συστήματος. Η αύξηση των τιμών μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι στα συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό οι δεσμοί υδρογόνου είναι πιο ισχυροί, με αποτέλεσμα ένα σημαντικό μέρος της ενέργειας που καταναλώνεται να χρησιμοποιείται για την διάσπαση των ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου των πρωτεϊνικών μορίων και των δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πρωτεΐνης και του νερού.

#### **7.5.4.2 Μελέτη θερμοσταθερότητας της TvL σε τριαδικά συστήματα.**

Παρόμοια μελέτη πραγματοποιήθηκε και για την TvL σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, τα οποία έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε νερό στο τελικό όγκο του

συστήματος (18.9% κ.ο). Τα τριαδικά συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη αυτή σχηματίζονται είτε με βάση το εξάνιο είτε με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ή το  $d$ -λιμονένιο, την τριτοταγή βουτανόλη και το νερό. Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν παρατηρήθηκαν ενδόθερμες μεταβολές ενώ ο υπολογισμός του  $T_d$  έγινε όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Στον Πίνακα 7.12 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι τιμές της θερμοκρασίας μετουσίωσης ( $T_d$ ) της λακκάσης στα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο ή τα τερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο.

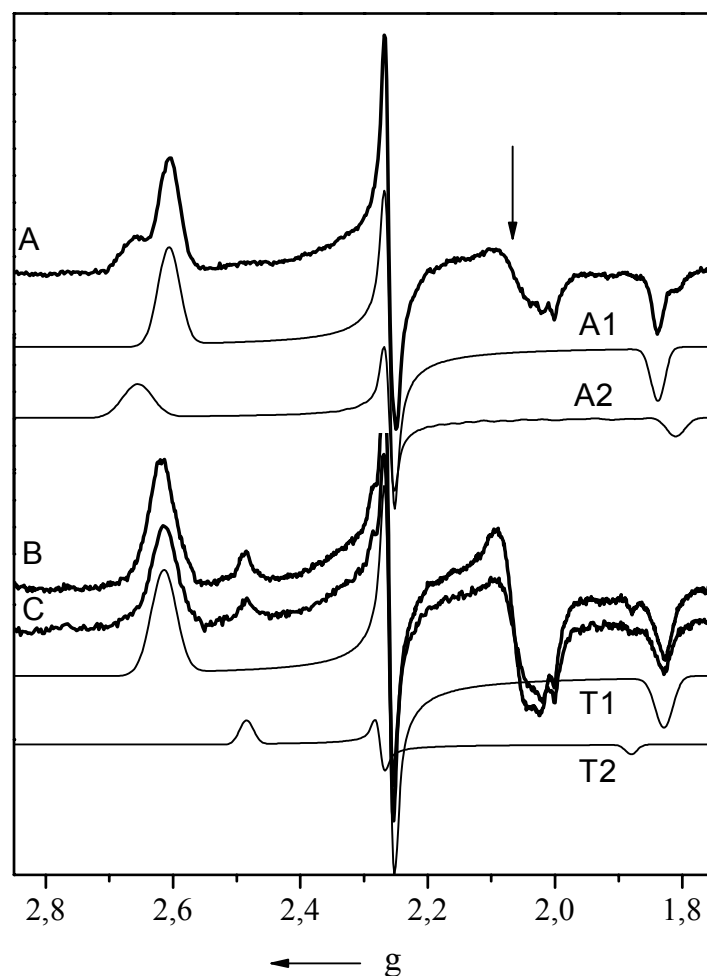
**Πίνακας 7.12.** Θερμοκρασιακές μεταβολές ( $T_d$ ) που προσδιορίστηκαν από το DSC κατά την θερμική μελέτη της TvL σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό. Η συγκέντρωση της λακκάσης ήταν  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$ .

| Σύστημα                                                          | $T_d$ (°C) |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| Τριαδικό σύστημα με βάση το $\alpha$ -πινένιο (P <sub>T1</sub> ) | 73.5       |
| Τριαδικό σύστημα με βάση το $d$ -λιμονένιο (L <sub>T1</sub> )    | 71.2       |
| Τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο (H <sub>T1</sub> )            | 69.0       |

Από τα αποτελέσματα του πίνακα, διαπιστώνεται ότι το ένζυμο υπέστη θερμοκρασιακές μεταβολές στις θερμοκρασίες 73.5°C, 71.2°C και 69.0°C στα συστήματα P<sub>T1</sub>, L<sub>T1</sub> και H<sub>T1</sub> αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές είναι σε συμφωνία με αυτές που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικός (~ 76.0°C) για άλλους τύπους λακκασών [Coll *et al.*, 1994; Lopez-Cruz *et al.*, 2006]. Επίσης παρατηρείται ότι το ένζυμο είναι πιο σταθερό στα τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με βάση τα τερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο σε σχέση με το τριαδικό σύστημα που σχηματίζεται με βάση το εξάνιο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντιστοιχία με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά τον εγκλωβισμό της CPO σε διάφορα τριαδικά συστήματα όπως αυτό περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.4.1. Τέλος στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η υψηλότερη σταθερότητα της λακκάσης που παρατηρείται σε τριαδικά συστήματα με  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, είναι σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα σταθερότητας που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 7.5.3.2.

### 7.5.5 Μελέτη του μικροπεριβάλλοντος της αίμης της CPO σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό με την τεχνική του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού.

Στην παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία EPR χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση του εγκλωβισμού της CPO σε διάφορα τριαδικά συστήματα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, λόγω των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων του σιδήρου στο κέντρο της αίμης. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.5.2. Τα αποτελέσματα της μελέτης της CPO αφορούν σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο με % κ.ο σε νερό, P1 18.9%, P1c 3.0% και σε τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο με % κ.ο σε νερό H1 18.9%, H1c 3.0%. Τα αντιπροσωπευτικά φάσματα, τα οποία καταγράφηκαν σε θερμοκρασία 15K, φαίνονται στο Σχήμα 7.16. Για τη σύγκριση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ως φάσμα αναφοράς υδατικό διάλυμα CPO σε pH 5.2, το οποίο αποτελούνταν από δύο ρομβικά σήματα  $S=1/2$ , το A1 και το A2. Οι θεωρητικές προσομοιώσεις για το κάθε σήμα επίσης απεικονίζονται στο Σχήμα 7.16. Το σήμα A1 με απορρόφηση  $g_1=2.607$ , παράγωγο  $g_2=2.260$ , και κοιλάδα  $g_3=1.838$  παρουσίασε σχεδόν ίδιες παραμέτρους με αυτές που έχουν αναφερθεί για διάλυμα χλωροϋπεροξειδάσης σε pH 5.2 [Sono *et al.*, 1991]. Το σήμα A2 είχε τιμές  $g_1=2.657$ ,  $g_2=2.260$ , και  $g_3=1.810$ . Οι διαφορετικές φασματοσκοπικές παράμετροι υποδηλώνουν κέντρα με διαφορετικές ιδιότητες. Για παράδειγμα ένα φάσμα με παρόμοιες παραμέτρους με του A2 παρατηρήθηκε σε διαλύματα χλωροϋπεροξειδάσης παρουσία  $Cl^-$  σε pH 5.2 [Hollenberg *et al.*, 1980]. Βάσει φασματοσκοπικών προσομοιώσεων, ο λόγος μεταξύ A1 και A2 είναι περίπου 2. Στο σχήμα 7.16 παρουσιάζονται επίσης τα φάσματα της CPO στα τριαδικά συστήματα H1c και P1c. Και στις δύο περιπτώσεις προέκυψαν παρόμοια φάσματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από δύο σήματα  $S=1/2$ , το T1 και το T2. Το σήμα T1 έχει τιμές  $g_1=2.615$ ,  $g_2=2.260$ ,  $g_3=1.828$ . Οι τιμές αυτές ήταν ελαφρώς διαφορετικές από αυτές της A1 που παρατηρήθηκε σε υδατικό διάλυμα σε pH 5.2. Το σήμα T2 έχει τιμές  $g_1=2.485$ ,  $g_2=2.275$ ,  $g_3=1.880$  ενώ η αναλογία T2/T1 ήταν 0.1. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (H1 και P1) το χαμηλού σπίν σήμα T2 αυξήθηκε και έτσι ο λόγος T2/T1 ήταν σχεδόν 1.



**Σχήμα 7.16.** EPR φάσματα χλωροϋπεροξειδάσης σε διαφορετικά περιβάλλοντα. **A.** Υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα (pH 5.2). **B.** τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, **C.** τριαδικό σύστημα με βάση το εξάνιο. Οι λεπτές γραμμές αντιστοιχούν σε θεωρητικά φάσματα  $S=1/2$  όπως περιγράφονται στο κείμενο. Το βέλος συμβολίζει ένα σήμα υποβάθρου από την κοιλότητα. Συνθήκες EPR: πλάτος διαμόρφωσης 10 Gpp, μικροκυματική συχνότητα 9.41 GHz, μικροκυματική ισχύς 2.2mW και θερμοκρασία  $T=15\text{K}$ .

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μορφή T1 παρουσιάζει παραμέτρους παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στην ενεργή μορφή του ενζύμου. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο πέμπτος υποκαταστάτης του σιδήρου της αίμης είναι η κυστεΐνη 29 ενώ η έκτη θέση είναι κατειλημμένη από ένα μόριο νερού. Στην περίπτωση της CPO που είναι εγκλωβισμένη σε τριαδικά συστήματα η πλειοψηφία των χαμηλών σπιν βρίσκονται στην ενεργή μορφή T1, το οποίο καταδεικνύει ότι κάτω από αυτές τις συνθήκες το περιβάλλον του σιδήρου δεν υφίσταται ισχυρές τροποποιήσεις. Επίσης παρατηρήθηκε μια μειοψηφία σημάτων  $S=1/2$ , της

μορφής T2. Είναι ενδιαφέρον ότι σήματα EPR με παραμέτρους παρόμοιες με αυτές της T2, έχουν παρατηρηθεί στο σίδηρο της CPO σε αλκαλικά υδατικά διαλύματα που είναι γνωστά ως C420 [Blanke *et al.*, 1996]. Οι μορφές αυτές έχουν συνδεθεί με μια συνεχόμενη απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου κάτω από τις συνθήκες αυτές. Έχει αναφερθεί ότι αυτές οι μορφές διατηρούν τη συλφιδρυλική πρόσδεση στη θέση του σιδήρου και ότι η απώλεια της δραστηριότητας αποδίδεται σε άλλους παράγοντες που επηρεάζουν το ενεργό κέντρο. Βάσει των ομοιοτήτων του σήματος T2 στην παρούσα περίπτωση με τη μορφή C420 είναι εύλογο να υποθέσει κανείς ότι η μορφή T2 προέρχεται από τις θέσεις του σιδήρου σε παρόμοιο περιβάλλον.

Συμπερασματικά τα φάσματα EPR που ελήφθησαν για την εγκλωβισμένη χλωροϋπεροξειδάση σε διάφορα τριαδικά συστήματα χαρακτηρίζονται από τα σήματα T1, το οποίο σχετίζεται με την ενεργή μορφή του ενζύμου, και T2, το οποίο συνδέεται με την ανενεργή μορφή του ενζύμου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Με βάση το λόγο T1/T2, συμπεραίνεται ότι σε συστήματα με μεγάλο ποσοστό υδατικής φάσης, τα σήματα T1 μετατρέπονται σε T2 σήματα, τα οποία συνδέονται με την ανενεργή μορφή του ενζύμου, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Από τα αποτελέσματα μπορούμε να υποθέσουμε ότι στο περιβάλλον των τριαδικών συστημάτων με μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό συμβαίνουν δομικές αλλαγές, οι οποίες επιδρούν στην περιοχή του σιδήρου της αίμης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με πιθανές συνέπειες στη δραστηριότητα του ενζύμου. Αντίθετα όταν η CPO ήταν εγκλωβισμένη σε συστήματα με μικρό ποσοστό υδατικής φάσης, η πλειοψηφία των σημάτων ήταν της μορφής T1, που σημαίνει ότι σε τέτοιες συνθήκες το περιβάλλον του σιδήρου του ενεργού κέντρου του ενζύμου δεν υφίσταται σοβαρές τροποποιήσεις. Τα αποτελέσματα αυτά, έρχονται σε συμφωνία τόσο με τα ευρήματα του DSC όσο και με τα αποτελέσματα των πειραμάτων σταθερότητας της CPO στα διάφορα τριαδικά μέσα.

#### **7.5.6 Εφαρμογή οξειδοαναγωγικών ενζύμων στην οξείδωση τερπενίων**

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα οξειδοαναγωγικών ενζύμων να καταλύουν την εκλεκτική τροποποίηση ενώσεων φυτικής προέλευσης, όπως αυτές που απτώνται στο μαστιχέλαιο, σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό που σχηματίζονται από εξάνιο, αλκοόλη (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη) και νερό ή από  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, αλκοόλη (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη) και νερό. Καθώς η

πλειοψηφία των βασικών συστατικών του μαστιχελαιίου (αιθέριο έλαιο, τερπένια, τερπενόλες) δεν είναι υδατοδιαλυτά, οι βιοκαταλυόμενες διεργασίες επιχειρήθηκαν στα παραπάνω τριαδικά συστήματα, λόγω ότι στα μέσα αυτά μπορούν να διαλυθούν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες ενώσεις. Το χαρακτηριστικό αυτό επιτρέπει την οξείδωση των υδρόφοβων μονοτερπενίων με την χρήση ελεύθερου ενζύμου, το οποίο εντοπίζεται στην υδατική φάση του συστήματος της αντίδρασης. Η παραγωγή οξυγονωμένων παραγώγων των μονοτερπενίων έχει ιδιαίτερη σημασία καθώς τα παράγωγα αυτά είναι υπεύθυνα για πλήθος βιολογικές δράσεις όπως π.χ για αντιμικροβιακή [Koutsoudaki *et al.*, 2005] και αντικαρκινική δράση [Loutrari *et al.*, 2004]. Επιπλέον η ενζυμική τροποποίηση των μονοτερπενίων προς τα αντίστοιχα εποξειδία, είναι ιδιαίτερα σημαντική λόγω της ευρείας χρήσης των εποξειδίων στην οργανική σύνθεση [de Vries and Janssen, 2003].

Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκε η CPO και οι τρεις λακκάσες TvL, ThL και BcL για την εκλεκτική τροποποίηση βασικών συστατικών του μαστιχελαιίου (τερπένια, τερπενόλες). Στα πλαίσια της μελέτης αυτής εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης οξείδωσης των τερπενίων, όπως ο βαθμός ενυδάτωσης του μικρογαλακτώματος, η σύσταση του συστήματος, το είδος και η ποσότητα του ενζύμου και των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην κάθε αντίδραση.

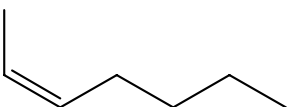
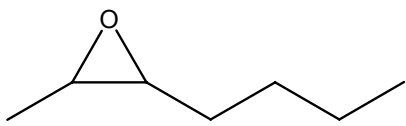
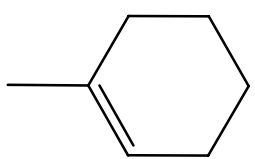
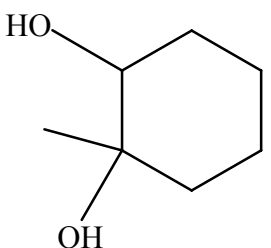
#### **7.5.6.1 Οξείδωση υδρόφοβων υποστρωμάτων από την CPO σε τριαδικά συστήματα**

Η ικανότητα της CPO να καταλύει την οξείδωση διάφορων υδροφοβικών υποστρωμάτων συμπεριλαμβανομένου των αλειφατικών και κυκλικών ολεφινών όπως του *cis*-2-επτενίου και του 1-μεθυλ-κυκλοεξενίου μελετήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με βάση τον οργανικό διαλύτη (εξάνιο ή το  $\alpha$ -πινένιο), είτε με βάση την αλκοόλη (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.1.γ.

Η οξείδωση του *cis*-2-επτενίου οδήγησε στον σχηματισμό ενός και μόνου προϊόντος (εποξειδίου) με εναντιομερική περίσσεια (enantiomeric excess) 96%, ποσοστό το οποίο είναι σε συμφωνία με αυτό που έχει ήδη αναφερθεί για την κατάλυση της συγκεκριμένης αντίδρασης από την CPO σε υδατικά μέσα [Zaks and Dodds 1995; van de Velde *et al.*, 2000]. Επιπλέον, η κατάλυση της οξείδωσης του *cis*-2-επτενίου σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P1 σύσταση του οποίου αναφέρεται στον Πίνακα Ι.β του παραρτήματος) οδήγησε σε τιμή TTN (22000 mol προϊόντος /mol CPO), η οποία είναι δύο φορές μεγαλύτερη από αυτή

που έχει αναφερθεί για άλλο μέσο αντίδρασης [van de Velde *et al.*, 2000]. Από την άλλη μεριά, η μετατροπή μιας κυκλικής ολεφίνης, όπως του 1-μεθυλ-κυκλοεξενίου οδήγησε στο σχηματισμό ενός μίγματος τεσσάρων ενώσεων, το οποίο είναι σε συμφωνία με αυτά που έχουν αναφερθεί από τους Zaks και Dodds [1995] σε υδατικό μέσο. Στην περίπτωση αυτή το κύριο προϊόν είναι το 1-μεθυλ-1,2-διυδροξυ κυκλοεξάνιο, το οποίο προέρχεται από την υδρόλυση του ενζυμικώς σχηματιζόμενου εποξειδίου. Στον Πίνακα 7.13 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των αντιδράσεων οξείδωσης των ολεφινών σε διάφορα τριαδικά συστήματα.

**Πίνακας 7.13.** Αποδόσεις (%) των αντιδράσεων οξείδωσης του *cis*-2-επτενίου και του 1-μεθυλ-κυκλοεξενίου μετά από 24 h στους 25°C. Οι ακριβείς συστάσεις των συστημάτων είναι αυτές που δίνονται στους Πίνακες I.α,β του παραρτήματος. Ο λόγος του οργανικού διαλύτη προς την αλκοόλη ήταν 0.242. *Συνθήκες αντίδρασης:* CPO 140 U, *t*-BHP 200 mM, υποστρώματα 200 mM.

| Υπόστρωμα                                                                                                    | Κύριο προϊόν <sup>1</sup>                                                                                                    | Απόδοση % |                  |      |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|------|------------------|
|                                                                                                              |                                                                                                                              | H1        | H <sub>T</sub> 1 | P1   | P <sub>T</sub> 1 |
| <br><i>cis</i> -2-επτένιο | <br>Εποξείδιο του <i>cis</i> -2-επτενίου  | 45.1      | 47.2             | 35.0 | 38.3             |
| <br>1-μεθυλοκυκλοεξένιο   | <br>1-μεθυλο-1,2-<br>διυδροξυ κυκλοεξάνιο | 33.5      | 34.9             | 29.0 | 31.6             |

<sup>1</sup>Σύμφωνα με Zaks and Dodds (1995)

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται ότι στα τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με τριτοταγή βουτανόλη (H<sub>T</sub>1 και P<sub>T</sub>1) οι αποδόσεις ήταν μεγαλύτερες και για τα δύο υποστρώματα. Παρόμοια εικόνα είχε παρουσιαστεί και κατά την αντίδραση χλωρίωσης του MCD από την CPO όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.4, της παραγράφου

7.5.1.1. Επιπλέον σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, παρατηρήθηκε η εμφάνιση οξυγονωμένων παραγώγων του  $\alpha$ -πινενίου, όπως του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, της βερμπενόλης και της βερμπενόνης, τα οποία ανιχνεύθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με την χρήση HPLC και GC-MS. Τα θραύσματα των ουσιών αυτών από το GC-MS είναι τα ακόλουθα:

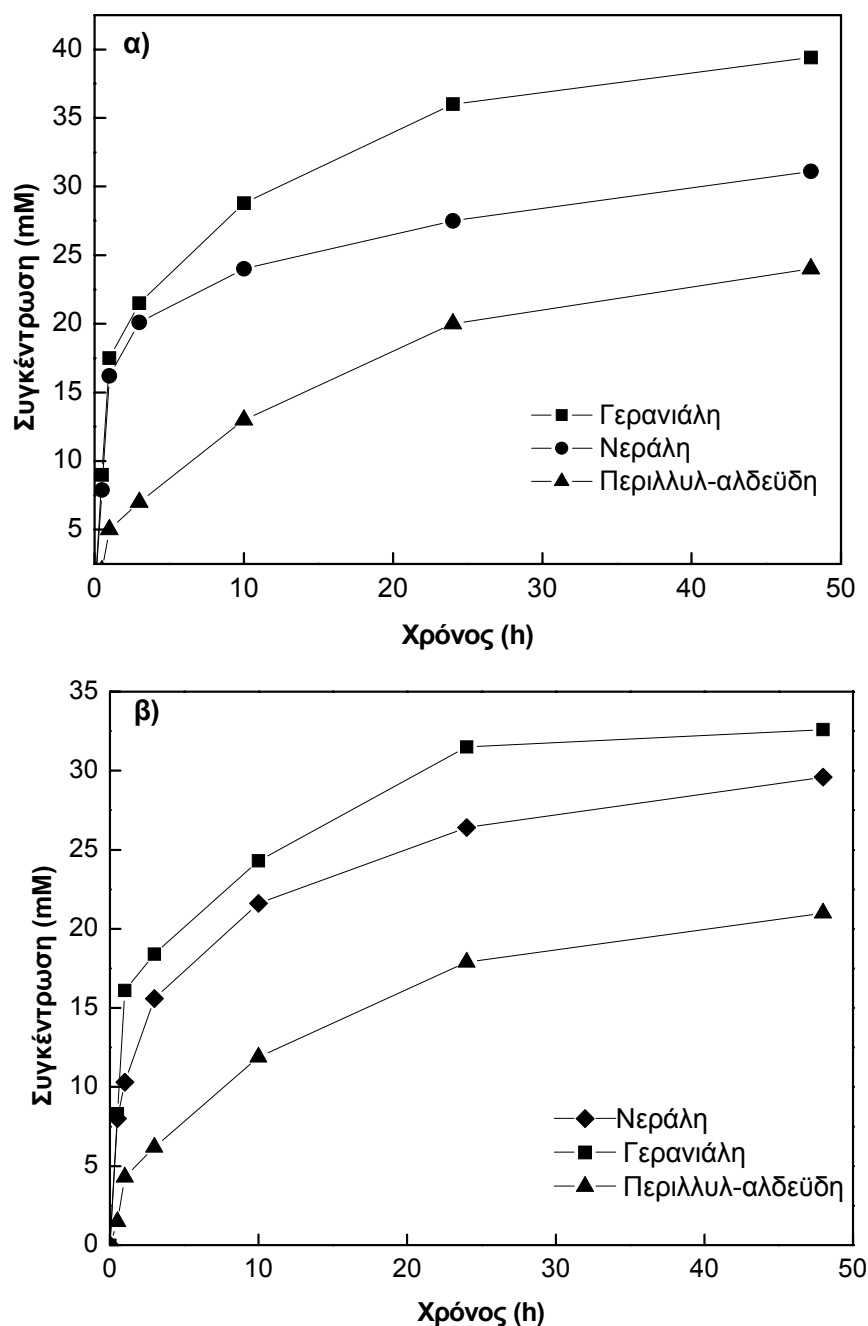
Βερμπενόλη: M-33 119(8), 93(100)

Βερμπενόνη: M+ 150(28), 135(68), 107(100), 91(75), 79(53)

Εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου: M-15 137(40), 135(66), 119(11), 109(100), 95(30), 66(28), 43(24)

Επίσης στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η ικανότητα της CPO να καταλύει την οξείδωση τερπενολών όπως π.χ. της νερόλης, της γερανιόλης και της περιλλύλ-αλδεΐδης. Λόγω ότι οι ενώσεις αυτές απαντώνται φυσικά σε διάφορα αιθέρια ελαία, μελετήθηκε η βιομετατροπή τους προς παράγωγα με υψηλή βιολογική δράση, σε συστήματα τα οποία προσομοιάζουν το φυσικό περιβάλλον. Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, λόγω ότι το  $\alpha$ -πινένιο είναι βασικό συστατικό πολλών αιθέριων ελαίων αλλά και εξαιτίας της σταθεροποιητικής δράσης που ασκεί στην CPO όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 7.5.3.1 και 7.5.4.1.

Στα Σχήματα 7.17.α,β παρουσιάζεται η πρόοδος της αντίδρασης οξείδωσης της γερανιόλης, νερόλης και περιλλύλ-αλκοόλης στις αντίστοιχες αλδεΐδες που καταλύεται από την CPO σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη ( $P_{T1}$ ) είτε με 2-προπανόλη (P1). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό φορέα το *t*-BHP, ενώ κατά την πορεία της αντίδρασης δεν παρατηρήθηκε επιπλέον οξείδωση των αλδεϋδών προς τα αντίστοιχα καρβοξυλικά οξέα. Όπως παρατηρείται και από τα αντίστοιχα διαγράμματα η βιομετατροπή και των τριών υποστρωμάτων ήταν μεγαλύτερη στο τριαδικό σύστημα που σχηματίζεται με τριτοταγή βουτανόλη ( $P_{T1}$ ), γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά την οξείδωση των ολεφινών. Πάντως και στα δύο συστήματα η βιομετατροπή της γερανιόλης ή της νερόλης οδήγησε στο σχηματισμό και των δύο ισομερών, της γερανιάλης ή αλλιώς *trans*-κιτράλης και της νεράλης ή αλλιώς *cis*-κιτράλης. Πιο συγκεκριμένα ο λόγος *cis/trans* μετά από 24 h αντίδρασης ήταν 5/95 για την οξείδωση της γερανιόλης και 85/15 για την οξείδωση της νερόλης.

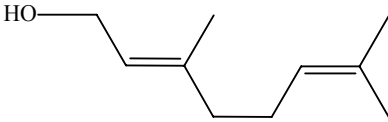
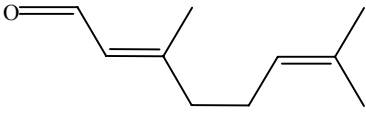
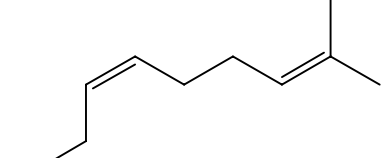
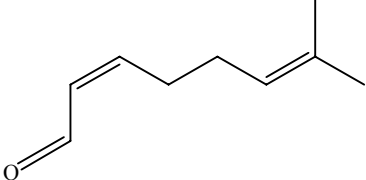
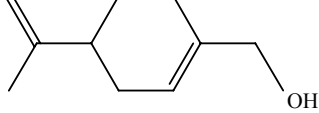
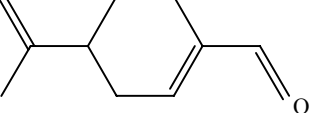


**Σχήμα 7.17.** Πορεία αντιδράσεων οξείδωσης διαφόρων τερπενολών (200mM) στις αντίστοιχες αλδεΰδες σε: α) τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (P<sub>T1</sub>) και σε β) τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο/2-προπανόλη/νερό (P<sub>1</sub>) στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: CPO:140U, *t*-BHP :200Mm.

Στον Πίνακα 7.14 παρουσιάζονται οι αποδόσεις και οι τιμές του TTN κατά την αντίδραση οξείδωσης των τερπενολών σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (P<sub>T1</sub>). Αξίζει να σημειωθεί ότι για πρώτη φορά αναφέρεται η βιομετατροπή

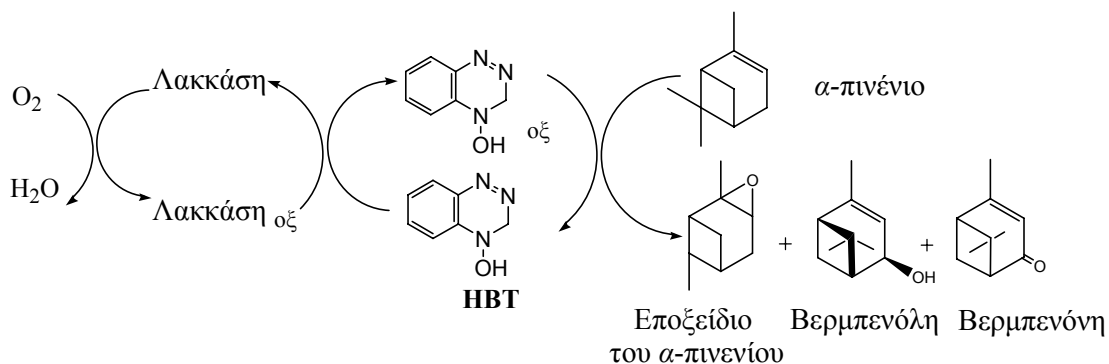
των τερπενολών (νερόλης, γερανιόλης και περιλλυλ-αλδεϋδης) από την CPO σε ένα στάδιο. Μάλιστα η συγκέντρωση των υποστρωμάτων που τροποποιήθηκαν στα τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, ήταν 100 φορές υψηλότερη σε σχέση με αυτή που έχει αναφερθεί σε άλλα μέσα [Zaks and Dodds, 1995; van de Velde *et al.*, 2000; Kaup *et al.*, 2007].

**Πίνακας 7.14.** Αποδόσεις (%) και TTN (εκφρασμένο σε mol προϊόντος/mol CPO) των αντιδράσεων οξείδωσης των τερπενολών σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (P<sub>T</sub>1) μετά από 24 h στους 25°C. Ο λόγος του  $\alpha$ -πινενίου προς την τριτοταγή βουτανόλη ήταν 0.242. *Συνθήκες αντίδρασης:* CPO 140 U, *t*-BHP 200 mM, υποστρώματα 200 mM.

| Υπόστρωμα                                                                                               | Κύριο προϊόν                                                                                             | Απόδοση (%) | TTN   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------|
| <br>Γερανιόλη         | <br>Γερανιάλη         | 40          | 25500 |
| <br>Νερόλη           | <br>Νεράλη           | 32          | 20000 |
| <br>Περιλλυλ-αλκοόλη | <br>Περιλλυλ- αλδεϋδη | 24          | 15500 |

#### 7.5.6.2 Οξείδωση τερπενίων και μαστιχελαίου από τις TvL, ThL και BcL

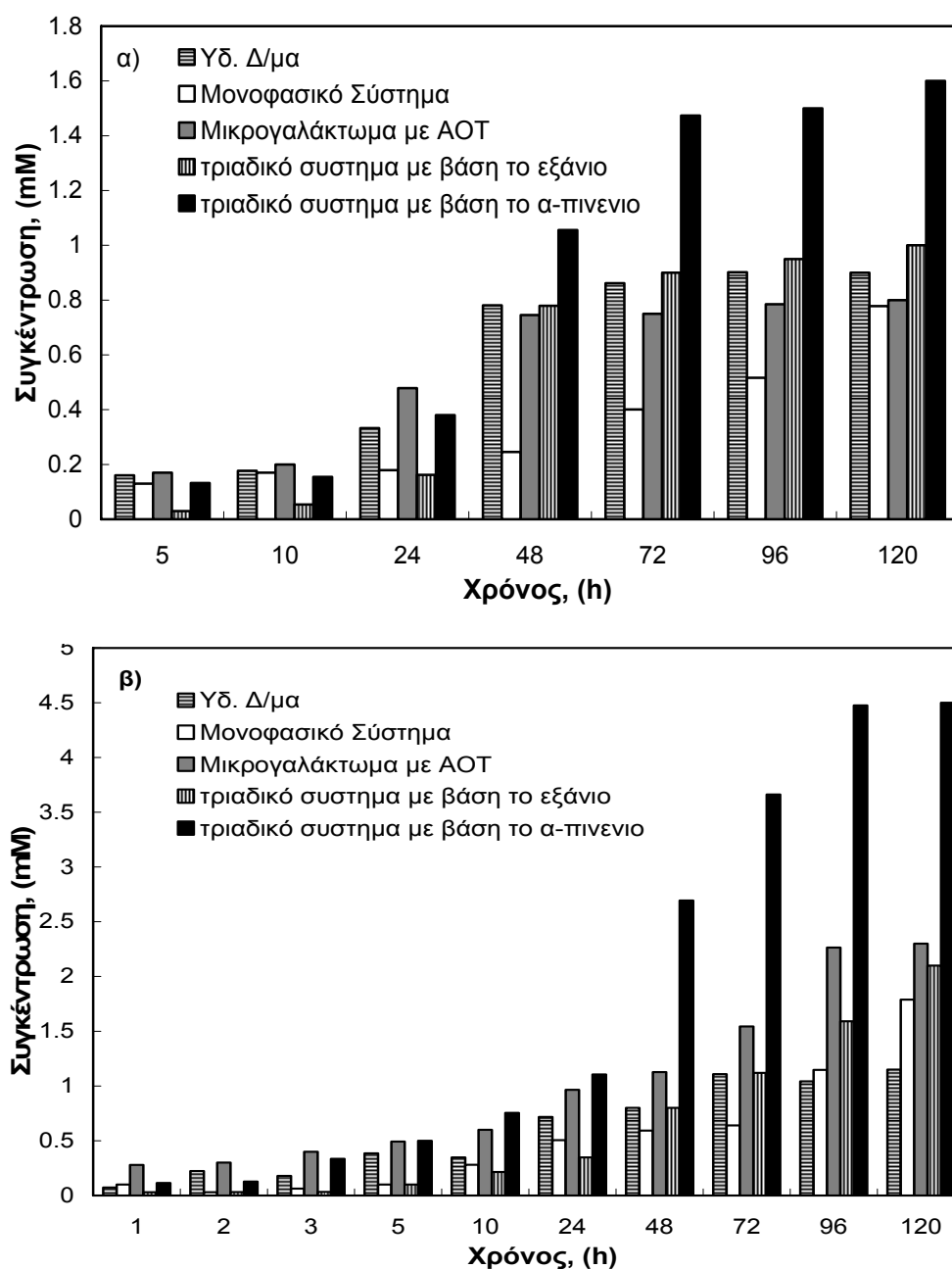
Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιοτεχνολογική αξιοποίηση ενώσεων φυτικής προέλευσης όπως αυτές που απαντώνται στο μαστιχέλαιο, με την εφαρμογή βιοκαταλυτικών μεθόδων. Για το σκοπό αυτό επιχειρήθηκε η βιομετατροπή τόσο των βασικών συστατικών του μαστιχελαίου όσο και του ίδιου του αιθέριου ελαίου με τη χρήση των TvL, ThL και BcL σε μη συμβατικά συστήματα. Πιο συγκεκριμένα το  $\alpha$ -πινένιο και το μαστιχέλαιο τροποποιήθηκαν ενζυμικά με τη χρήση λακκασών μέσω της παρουσίας του διαμεσολαβητή (μικρά μόρια τα οποία μεταφέρουν ηλεκτρόνια) προς στα αντίστοιχα οξυγονωμένα παράγωγα τους. Στο Σχήμα 7.18 παρουσιάζεται ο ρόλος του διαμεσολαβητή κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου προς τα οξυγονωμένα παράγωγα του (εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη). Όπως φαίνεται και από τον παρακάτω κύκλο αντίδρασης αρχικά η οξειδωμένη μορφή της λακκάσης οξειδώνει τον διαμεσολαβητή, ο οποίος στη συνέχεια απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο του ενζύμου προκειμένου να οξειδώσει το υπόστρωμα, το οποίο λόγω του μεγέθους του, δεν μπορεί να διεισδύσει απευθείας στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [Banci *et al.*, 1999, d'Acunzo *et al.*, 2002].



**Σχήμα 7.18.** Ο ρόλος του HBT (διαμεσολαβητής) κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου με την χρήση λακκάσης.

Η εκλεκτική τροποποίηση του μαστιχελαίου και των συστατικών του ( $\alpha$ -πινενίου και  $d$ -λιμονενίου) πραγματοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα (100 mM ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH 4.6) καθώς και σε μη συμβατικά μέσα όπως σε μονοφασικό σύστημα νερού/τριτοταγούς βουτανόλης (10%), σε αντίστροφα μικκύλια με βαθμό ενυδάτωσης  $w_o=40$  και σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με εξάνιο, είτε  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε

περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.γ,δ. Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζεται η οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου από την TvL σε διαφορά μέσα (Σχήμα 7.19).



**Σχήμα 7.19.** Πορεία της αντίδρασης οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου προς: α) βερμπενόλη και β) βερμπενόνη από την TvL σε υδατικό διάλυμα και σε διάφορα μη συμβατικά μέσα στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 10 U, HBT 40 mM,  $\alpha$ -πινένιο 250-1000 mM.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, η δραστηριότητα οξείδωσης της TvL είναι σημαντικά υψηλότερη σε μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται παρουσία (μικρογαλακτώματα με AOT) ή όχι επιφανειοενεργού μορίου (τριαδικά συστήματα) σε σχέση

με το υδατικό ή το μονοφασικό σύστημα με 10% τριτοταγή βουτανόλη. Σε κάθε περίπτωση η οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου, ήταν μεγαλύτερη όταν η TvL βρίσκονταν εγκλωβισμένη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο από την αντίστοιχη που επιτυγχάνεται σε κανονικά μικρογαλακτώματα με AOT. Άλλωστε η συμπεριφορά αυτή είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των πειραμάτων σταθερότητας των λακκάσων, βάση των οποίων οι λακκάσες είναι πιο σταθερές όταν εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, από ότι σε μικρογαλάκτωμα με AOT ή σε μονοφασικά συστήματα. Παρόμοια εικόνα διαπιστώθηκε και για τις λακκάσες από *T. hirsuta* και *B. cinerea* κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου σε ανάλογα μη συμβατικά συστήματα. Στον Πίνακα 7.15. παρουσιάζονται τα συγκριτικά αποτελέσματα των τριών λακκάσων κατά την παραγωγή βερμπενόλης και βερμπενόνης από την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου στα προαναφερόμενα συστήματα.

**Πίνακας 7.15.** Συγκεντρώσεις (mM) βερμπενόλης και βερμπενόνης κατά την αντίδραση οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου σε υδατικό διάλυμα και σε διάφορα μη συμβατικά μέσα ύστερα από 5 ημέρες στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: *T. versicolor* 10 U, *T. hirsuta* 6 U, *B. cinerea* 2.5 U, HBT 40 mM,  $\alpha$ -πινένιο 250-1000 mM.

| Μέσο                          | <i>T. versicolor</i> |            | <i>T.hirsuta</i> |            | <i>B.cinerea</i> |            |
|-------------------------------|----------------------|------------|------------------|------------|------------------|------------|
|                               | βερμπενόλη           | βερμπενόνη | βερμπενόλη       | βερμπενόνη | βερμπενόλη       | βερμπενόνη |
| Υδατικό                       | 0.9                  | 1.2        | 2.4              | 1.9        | 2.0              | 2.2        |
| M.Σ. <sup>α</sup>             | 0.77                 | 1.8        | 2.6              | 1.6        | 1.5              | 2.0        |
| M.AOT <sup>β</sup>            | 0.8                  | 2.3        | 0.9              | 1.0        | 2.4              | 2.8        |
| H <sub>T</sub> I <sup>γ</sup> | 1.0                  | 2.1        | 1.03             | 1.3        | 1.2              | 1.8        |
| P <sub>T</sub> I <sup>δ</sup> | 1.6                  | 4.5        | 1.7              | 2.2        | 1.6              | 2.1        |

<sup>α</sup> Μονοφασικό σύστημα με τριτοταγή βουτανόλη 10%

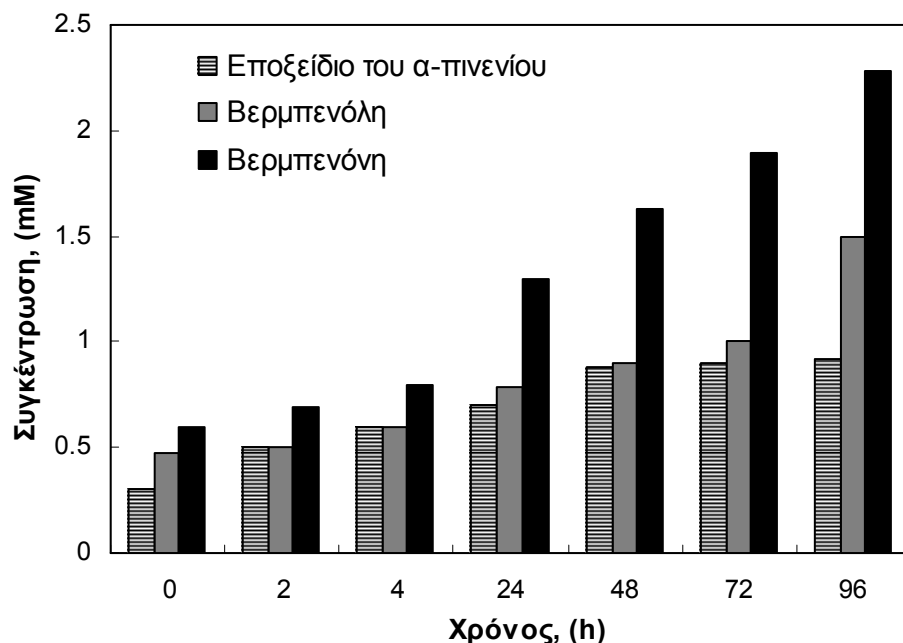
<sup>β</sup> Μικρογαλάκτωμα με AOT (W<sub>0</sub>=40)

<sup>γ</sup> εξάνιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (15.8/65.3/18.9 % κ.ο)

<sup>δ</sup>  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9 % κ.ο)

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα και οι τρεις λακκάσες μπορούν να τροποποιήσουν το  $\alpha$ -πινένιο προς βερμπενόλη και βερμπενόνη σε όλα τα εξεταζόμενα μη συμβατικά συστήματα. Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα της TvL να καταλύει την οξείδωση του μαστιγελαίου σε μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό, το οποίο σχηματίζεται από μαστιγέλαιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο) (Σχήμα 7.20). Λόγω ότι το μαστιγέλαιο αποτελείται από πολλές ενώσεις, είναι δυνατόν κατά την οξείδωση του με τη χρήση λακκάσης, να παραχθούν πλήθος οξυγονωμένων παραγώγων από

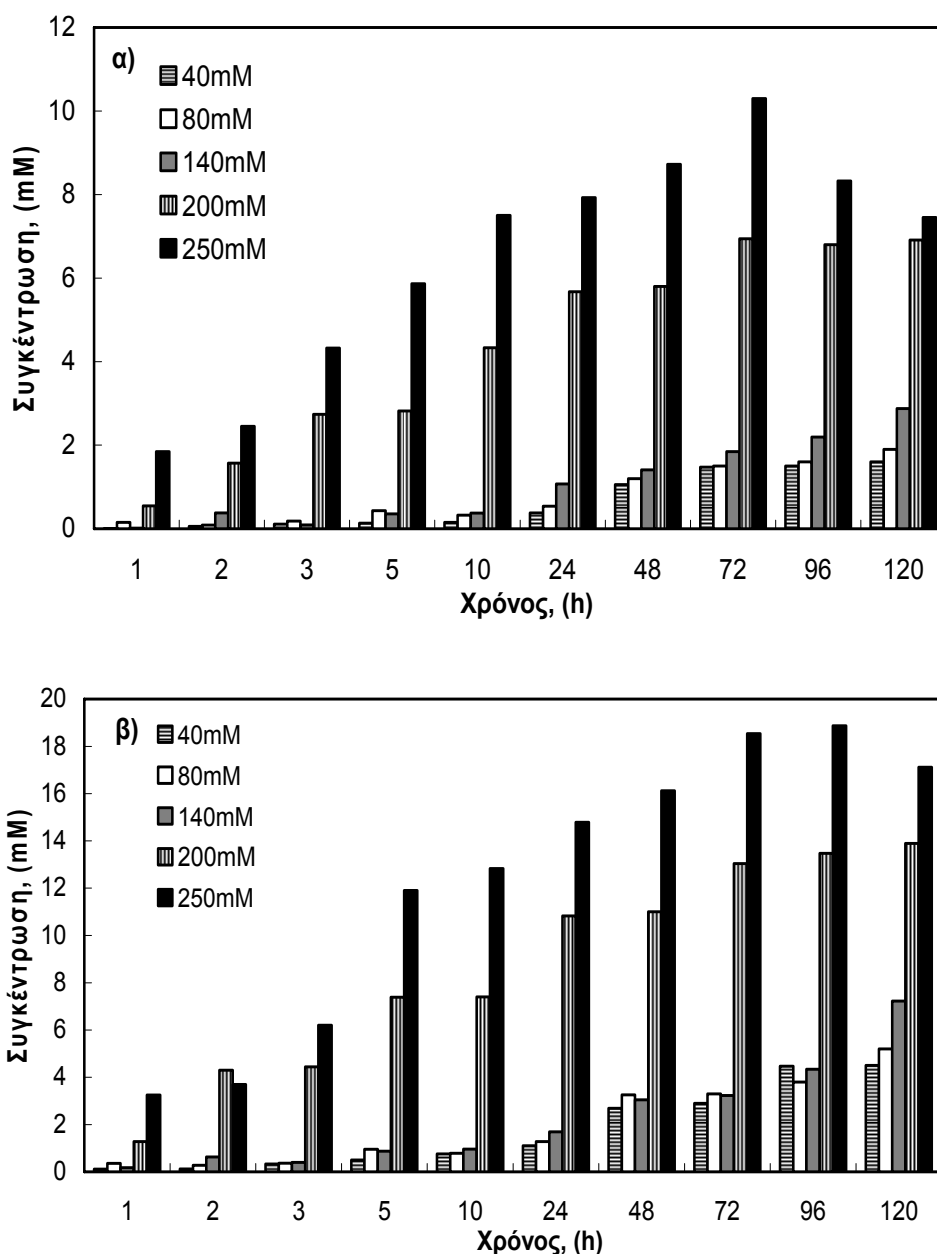
τα μονοτερπένια που περιέχει. Για το λόγω αυτό η παρακολούθηση της αντίδρασης έγινε με βάση την παραγωγή τριών βασικών οξυγονωμένων παραγώγων του, όπως του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, της βερμπενόλης και της βερμπενόνης.



**Σχήμα 7.20.** Πορεία της αντίδρασης οξείδωσης του μαστιχελαίου προς εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη από την TvL σε τριαδικό σύστημα με βάση το μαστιχέλαιο στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 10 U, HBT 40 mM,  $\alpha$ -πινένιο 250-1000 mM.

#### 7.5.6.2.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του διαμεσολαβητή (HBT)

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν την οξείδωση των τερπενίων από τις λακκάσες, αναμένεται να είναι η συγκέντρωση του διαμεσολαβητή στο μίγμα της αντίδρασης, λόγω της σπουδαιότητας του στον κύκλο της αντίδρασης όπως περιγράφηκε στο Σχήμα 7.18. Για το λόγω αυτό, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του HBT (διαμεσολαβητής) κατά την σύνθεση των οξυγονωμένων παραγώγων του  $\alpha$ -πινενίου (βερμπενόλης και βερμπενόνης) σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P<sub>T1</sub>:  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο)). Η χρονική εξέλιξη των αντιδράσεων παρουσιάζεται στα Σχήματα 7.21.α,β.



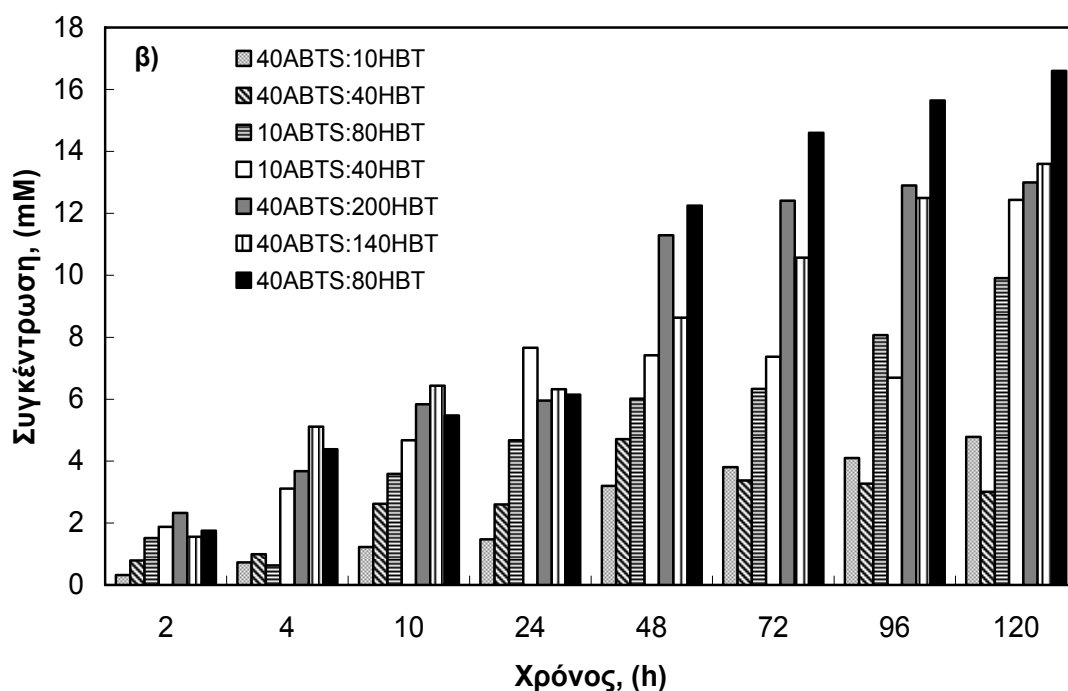
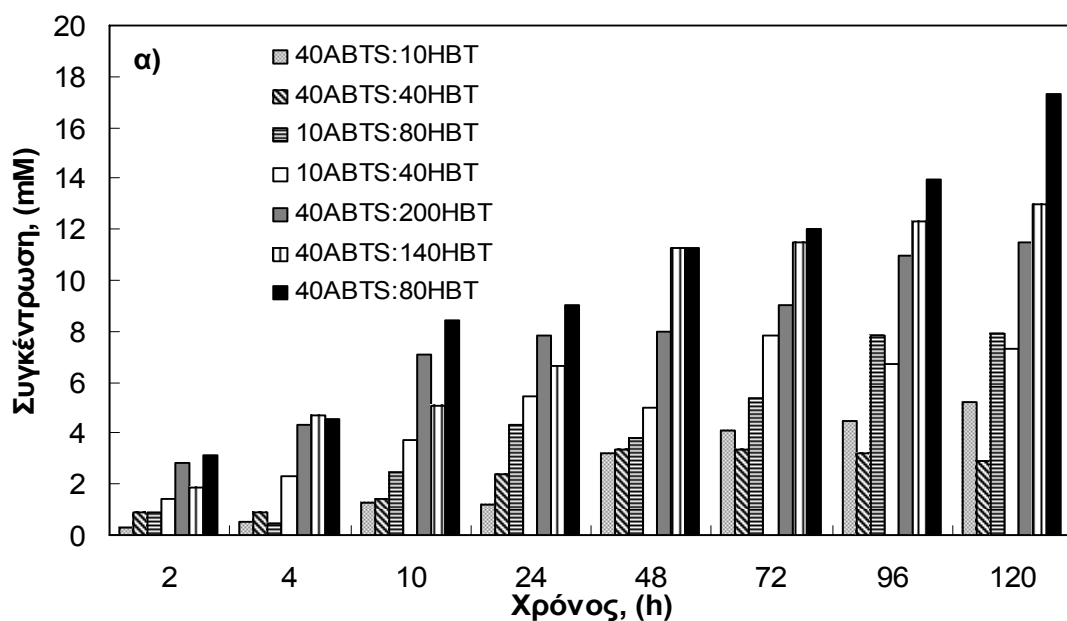
**Σχήμα 7.21.** Επίδραση της συγκέντρωσης του HBT κατά την τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου προς: α) βερμπενόλη και β) βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 10U, HBT 40-250mM,  $\alpha$ -πινένιο 1M.

Όπως φαίνεται, οι υψηλές συγκεντρώσεις του HBT, οδηγούν σε αυξημένες συγκεντρώσεις παραγωγής τόσο βερμπενόλης όσο και βερμπενόνης. Πράγματι, υπολογίστηκε ότι με την χρήση αρκετά υψηλής συγκέντρωσης HBT (250 mM), η συγκέντρωση της βερμπενόλης και της βερμπενόνης ήταν 10.3 mM και 18.5 mM, αντίστοιχα, μετά από 72 h αντίδρασης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του

διαμεσολαβητή αυξάνεται και ο αριθμός των οξειδωμένων μορίων του που προσεγγίζουν για οξείδωση το υπό μελέτη υπόστρωμα.

#### **7.5.6.2.2 Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών**

Γενικά η αποτελεσματικότητα της κατάλυσης ενός υποστρώματος από λακκάση εξαρτάται από την σωστή επιλογή του διαμεσολαβητή. Προς την κατεύθυνση αυτή μελετήθηκε η επίδραση του συνδυασμού διαφορετικών διαμεσολαβητών (π.χ του ABTS, του TEMPO και του HBT), η οποία αφορά τόσο τη συγκέντρωση τους όσο και την φύση τους (υδρόφιλος ή υδρόφοβος χαρακτήρας). Από τους διαμεσολαβητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία όλοι αποτελούσαν υπόστρωμα για τις λακκάσες, αλλά μόνο λίγες ενώσεις ήταν ικανές να οξειδώσουν το  $\alpha$ -πινένιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεμονωμένη χρήση του ABTS και του TEMPO δεν ήταν επαρκής για την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε κατά την οξείδωση της βερατρόλης [Bourbonnais and. Paice, 1990; Muheim *et al.*, 1992], του πυρενίου, του φλουορανθενίου [Pickard *et al.*, 1999] και του ανθρακενίου [Johannes *et al.*, 1996], η οποία δεν κατέστη εφικτή με την παρουσία μόνο του ABTS. Η εξήγηση που δόθηκε για την μη οξείδωση της βερατρόλης από την παρουσία μόνο του ABTS, είναι ότι το ABTS πρέπει να οξειδωθεί στο δισθενές  $\text{ABTS}^{2+}$  (όπως φαίνεται και από την εξίσωση 4.9) προκειμένου να φέρει σε πέρας την οξείδωση [Bourbonnais *et al.*, 1998]. Αυτό σημαίνει ότι κατά την οξείδωση μη-φαινολικών υποστρωμάτων το ένζυμο θα πρέπει πρώτα να οξειδώσει το  $\text{ABTS}^{2+}$  και στη συνέχεια να οξειδώσει το μη φαινολικό υπόστρωμα. Σε αντίθεση με το ABTS, η μεμονωμένη χρήση του HBT ήταν επαρκής για την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου, όπως περιγράφηκε στην παραγραφο 7.5.6.2.1. Έχει αναφερθεί ότι κατά την οξείδωση του HBT από την λακκάση παράγονται πιο δραστικές ενδιάμεσες ενώσεις, σε σχέση με αυτές που παράγονται κατά την οξείδωση του ABTS και του TEMPO, οι οποίες είναι ικανές να οξειδώσουν το υπό εξέταση τερπένιο. Στα Σχήματα 7.22.α,β παρουσιάζεται ο συνδυασμός δύο διαμεσολαβητών ενός υδρόφιλου (ABTS) και ενός υδρόφοβου (HBT) κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόλη και βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ), με την χρήση TvL.



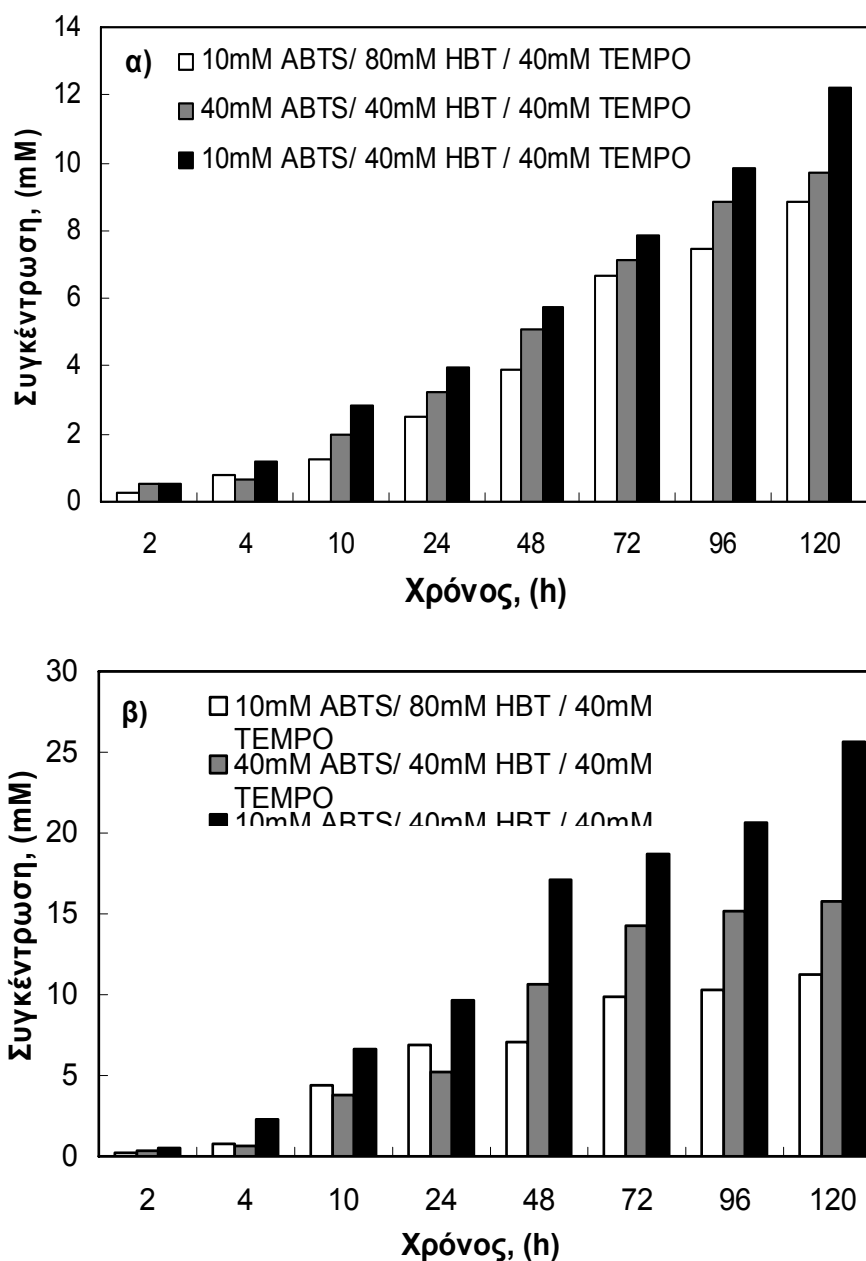
**Σχήμα 7.22.** Επίδραση του συνδυασμού δύο διαμεσολαβητών (ABTS και HBT) κατά την τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου σε: α) βερμπενόλη και β) βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 10U,  $\alpha$ -πινένιο 1M.

Όπως διαπιστώνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, η μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόλη και βερμπενόνη παρά την αρχική αύξηση που παρατηρείται με την αύξηση της συγκέντρωσης του ABTS και του HBT, φαίνεται να μειώνεται όταν χρησιμοποιούνται

υψηλότερες συγκεντρώσεις HBT (όπως π.χ. 140 και 200mM). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην μειωμένη σταθερότητα της TvL από την παραγωγή ελεύθερων ριζών, που παράγονται κατά την οξείδωση του διαμεσολαβητή από το ένζυμο. Επίσης παρατηρείται ότι εάν διατηρηθεί σταθερή η συγκέντρωση του HBT στα 80 mM, τότε η συγκέντρωση του ABTS (10 ή 40 mM) στο μίγμα της αντίδρασης παίζει σημαντικό ρόλο κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου. Πιο συγκεκριμένα όταν η συγκέντρωση του ABTS είναι 10 mM (και του HBT 80 mM), η αντίδραση οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου βαίνει πολύ πιο αργά οδηγώντας σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις των προϊόντων. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ανάγκη για υψηλή συγκέντρωση του ABTS στο σύστημα της αντίδρασης, προκειμένου να παραχθεί το υδρόφιλο  $\text{ABTS}^{2+}$ , το οποίο στην συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση του υδρόφοβου υποστρώματος. Για το λόγο αυτό ο συνδυασμός που αφορά συγκέντρωση 40 mM ABTS και 80 mM HBT, οδήγησε στο σχηματισμό μεγαλύτερων συγκεντρώσεων βερμπενόλης και βερμπενόνης. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η συγκέντρωση του διαμεσολαβητή παίζει κρίσιμο ρόλο στην διεξαγωγή της αντίδρασης.

Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος του TEMPO και του HBT στο ίδιο μίγμα της αντίδρασης κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου, εξετάστηκε ο συνδυασμός 40 mM TEMPO και 40 mM HBT. Από τα αποτελέσματα του πειράματος διαπιστώθηκε ότι η χρήση του TEMPO και του HBT πλεονεκτεί σε σχέση με την χρήση του ABTS και του HBT καθώς η τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόλη και βερμπενόνη ήταν κατά 3 φορές πιο υψηλή. Κατα συνέπεια ο συνδυασμός ενός υδρόφοβου (HBT) και ενός αμφίφιλου (TEMPO) διαμεσολαβητή καταλύει καλύτερα την οξείδωση ενός υδρόφοβου υποστρώματος. Έτσι προκύπτει ότι η φύση του διαμεσολαβητή επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την διεξαγωγή της αντίδρασης.

Επίσης στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συνεργιστική δράση τριών συνθετικών διαμεσολαβητών (TEMPO, HBT, ABTS) χρησιμοποιώντας τρεις διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων. Στα Σχήματα 7.23.α,β παρουσιάζεται η επίδραση των συνδυασμών αυτών κατά την μελέτη της πορείας αντίδρασης του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόλη και βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, με την χρήση TvL. Όπως διαπιστώνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, ο καλύτερος συνδυασμός για την μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόλη και βερμπενόνη είναι η συνθήκη 10mM ABTS / 40mM HBT / 40mM TEMPO.



**Σχήμα 7.23.** Επίδραση του συνδυασμού τριών διαμεσολαβητών (ABTS, HBT, TEMPO) κατά την τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου προς: α) βερμπενόλη και β) βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 10U,  $\alpha$ -πινένιο 1M.

Στον Πίνακα 7.16 παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών στην οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου προς τα οξυγονωμένα παράγωγα του μετά από 5 ημέρες αντίδρασης στους 25°C σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο.

**Πίνακας 7.16.** Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου προς τα οξυγονωμένα παράγωγα, εποξειδίο του  $\alpha$ -πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P<sub>T</sub>1:  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο)) ύστερα από 5 ημέρες στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: TvL 10 U,  $\alpha$ -πινένιο 1000 mM.

| Συνδυασμός διαμεσολαβητών                  | Εποξειδίο του $\alpha$ -πινενίου (mM) | Βερμπενόλη (mM) | Βερμπενόνη (mM) |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|-----------------|
| HBT (40 mM)                                | 0.40                                  | 1.60            | 4.50            |
| Ασκορβικό οξύ (40 mM) + HBT (40 mM)        | 0.70                                  | 4.24            | 1.90            |
| ABTS (10 mM) + HBT (40 mM)                 | 2.37                                  | 7.27            | 4.71            |
| ABTS (10 mM) + HBT (80 mM)                 | 1.78                                  | 7.89            | 9.90            |
| ABTS (40 mM) + HBT (10 mM)                 | 1.80                                  | 5.23            | 4.70            |
| ABTS (40 mM) + HBT (40 mM)                 | 0.50                                  | 3.00            | 3.00            |
| ABTS (40 mM) + HBT (80 mM)                 | 2.66                                  | 17.34           | 16.60           |
| ABTS (40 mM) + HBT (140 mM)                | 1.60                                  | 13.0            | 13.6            |
| ABTS (40 mM) + HBT (200 mM)                | 1.50                                  | 11.5            | 13.0            |
| TEMPO (40 mM) + HBT (40 mM)                | 1.81                                  | 3.19            | 9.33            |
| ABTS (10 mM) + HBT (80 mM) + TEMPO (40 mM) | 1.01                                  | 8.85            | 11.26           |
| ABTS (40 mM) + HBT (40 mM) + TEMPO (40 mM) | 1.29                                  | 9.69            | 15.76           |
| ABTS (10 mM) + HBT (40 mM) + TEMPO (40 mM) | 1.67                                  | 12.2            | 25.65           |

Από τις τιμές του Πίνακα 7.16 διαπιστώνεται ότι όλες οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν οδήγησαν στην βιομετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου, με την χρήση δύο ή τριών διαμεσολαβητών να πλεονεκτεί σε σχέση με την χρήση ενός. Επίσης, η χρήση δύο συγκεκριμένων συνθηκών (μιας με δύο διαμεσολαβητές: 40 mM ABTS / 80 mM HBT. και μιας με τρεις: 10mM ABTS / 40mM HBT / 40mM TEMPO) οδήγησαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις των οξυγονωμένων παραγώγων του  $\alpha$ -πινενίου. Η συνεργιστική δράση των διαμεσολαβητών που παρατηρήθηκε κατά την οξείδωση του συγκεκριμένου τερπενίου στην παρούσα εργασία είναι σε συμφωνία με τη συνεργιστική δράση διαφόρων διαμεσολαβητών όπως έχει αναφερθεί κατά την οξείδωση του ανθρακενίου [Pickard *et al.*, 1999; Vandertol – Vanier *et al.*, 2002] της βερατρόλης [Bourbonnais *et al.*, 1997], του βενζοπυρενίου [Cho *et al.*, 2002], του καρβαζολίου, του *N*-αίθυλοκαρβαζολίου, του φλουορενίου, του δι-βενζοθειοφαινίου [Bressler *et al.*, 2000] και της πενταχλωροφαινόλης [Jeon *et al.*, 2008] σε μη συμβατικά μέσα. Επίσης σε πρόσφατη μελέτη παρουσιάστηκε η συνεργιστική δράση σύνθετων (ABTS) και φυσικών διαμεσολαβητών (βανιλίνη και ακετοβανιλόνη), η οποία πλεονεκτούσε σε σχέση με την μεμονωμένη χρήση τους [Jeon *et al.*, 2008]. Στα πλαίσια της συνεργιστικής δράσης των διαμεσολαβητών, ερευνήθηκε ο συνδυασμός του ABTS και της

ανθρακινόνης (προϊόν οξείδωσης του ανθρακενίου) κατά την οξείδωση του ανθρακενίου και παρατηρήθηκε ότι το ενδιάμεσο προϊόν της αντίδρασης μπορεί να δράσει συνεργιστικά με το ABTS [Pozdnyakova *et al.*, 2006c]. Άλλωστε η ανθρακινόνη έχει χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα ως διαμεσολαβητής κατά την αποχρωματοποίηση συνθετικών βαφών που βρίσκουν εφαρμογή στην κλωστοϋφαντουργία [Wong and Yu, 1999]. Από τα παραπάνω είναι σαφές ότι η συνεργιστική δράση των διαμεσολαβητών έχει προκαλέσει το ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω της επίδρασης που έχει διαπιστωθεί να έχει στην απόδοση των λακκασών κατά την οξείδωση διάφορων υποστρωμάτων. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμη διατυπωθεί με σαφήνεια ο ακριβής μηχανισμός της παραπάνω δράσης.

## 7.6 Λακκάσες σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων

Όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 5.5 τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο μπορούν να αποτελέσουν την βάση για το σχηματισμό πηκτωμάτων με την προσθήκη υδατικού διαλύματος και ενός πολυμερούς. Στην ενότητα αυτή μελετάται η δυνατότητα χρησιμοποίησης των οργανοπηκτωμάτων ως φορείς ακινητοποίησης της λακκάσης από *T. versicolor*. Πιο συγκεκριμένα στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφεται η ικανότητα ενός παραγώγου της κυτταρίνης, της υδροξυπροπυλμεθυλο κυτταρίνης (HPMC), να σχηματίζει σταθερά πηκτώματα με μικρογαλάκτωμα που σχηματίζονται με AOT σε ισοοκτάνιο. Η προσπάθεια που επιτελέστηκε είχε σκοπό να διευκρινιστεί κατά πόσο τα οργανοπηκτώματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση της TvL, με σκοπό την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών σε μη συμβατικά συστήματα με στόχο την εκλεκτική τροποποίηση τερπενίων που αποτελούν βασικά συστατικά του μαστιχελαίου. Έτσι στα πλαίσια αυτής της μελέτης προσδιορίστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα και την απόδοση των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, όπως το μέσο της αντίδρασης, η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης στο πήκτωμα, το είδος του υποστρώματος και του διαμεσολαβητή.

### 7.6.1 Αντίδραση οξείδωσης SYR από ακινητοποιημένη TvL σε HPMC.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα ακινητοποίησης TvL σε HPMC. Προς την κατεύθυνση αυτή επιχειρήθηκε αρχικά ο εγκλωβισμός του ενζύμου σε μικρογαλάκτωμα AOT σε ισοοκτάνιο και στη συνέχεια η ένθεση του στο πολυμερές. Όπως έχει αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες ο οποίος φαίνεται να επιδρά στη δραστηριότητα των ενζύμων στα μικρογαλακτώματα με επιφανειοενεργό είναι ο βαθμός ενυδάτωσης του συστήματος ( $w_o$ ), ο οποίος ορίζεται από το μοριακό λόγο του νερού ως προς το επιφανειοενεργό (όπως περιγράφεται από την σχέση 3.2). Έτσι με βάση αυτή την γενική διατύπωση και σε συνδυασμό ότι η ελεύθερη TvL παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε μεγάλες τιμές μοριακού λόγου  $w_o$  (40-60) (όπως διαπιστώθηκε κατά την οξείδωση του ABTS και της συρινγκαλνταζίνης που περιγράφεται στις παραγράφους 7.5.1.3 και 7.5.1.4 αντίστοιχα), η τιμή  $w_o$  που επιλέχθηκε κατά τον εγκλωβισμό της λακκάσης στο μικρογαλάκτωμα, για τον σχηματισμό του οργανοπηκτώματος, ήταν 40. Τα οργανοπηκτώματα που προκύπτουν με

αυτό τον τρόπο είναι σταθερά και διατηρούν μακροσκοπικά τη δομική τους ακεραιότητα για αρκετές ημέρες όταν έρχονται σε επαφή με μη-πολικό οργανικό διαλύτη στους 25°C.

Γενικά η καταλυτική ικανότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης σε HPMC μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση την οξείδωση της συρινγκαλνταζίνης (SYR). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.1.3.β. Η ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου ελέγχθηκε: α) σε μικρογαλάκτωμα AOT σε ισοοκτάνιο με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης ( $w_o=20-60$ ), β) σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη/νερό είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>]/νερό και γ) σε τριαδικά συστήματα χωρίς επιφανειοενεργό τα οποία διαφέρουν είτε ως προς τον διαλύτη (εξάνιο ή *α*-πινένιο ή *d*-λιμονένιο) είτε ως προς την αλκοόλη (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη). Αρχικά εξετάστηκε η ενζυμική δραστηριότητα σε μικρογαλακτώματα AOT σε ισοοκτάνιο με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης ( $w_o=20-60$ ). Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης εξαρτάται άμεσα από τον αρχικό βαθμό ενυδάτωσης του συστήματος. Γενικά η αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης του συστήματος έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας, με αποτέλεσμα ο βέλτιστος βαθμός ενυδάτωσης να εντοπίζεται στην τιμή  $w_o=60$ . Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης δεν ήταν εφικτό να προσδιοριστεί σε μικρογαλάκτωμα με βαθμό ενυδάτωσης  $w_o > 60$ , καθώς το σύστημα της αντίδρασης ήταν θολό. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για την ελεύθερη TvL (στις παραγράφους 7.5.1.3 και 7.5.1.4), η οποία κατά την οξείδωση του ABTS και της SYR παρουσίασε ανάλογη εξάρτηση από το βαθμό ενυδάτωσης του συστήματος. Φαίνεται δηλαδή ότι η εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας από το μοριακό λόγο  $w_o$  είναι ανεξάρτητη από το είδος της αντίδρασης που καταλύεται και πρέπει να σχετίζεται αποκλειστικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Στη συνέχεια μελετήθηκε η καταλυτική ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη/νερό είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>]/νερό. Στον Πίνακα 7.17 παρουσιάζεται η επίδραση του ποσοστού του αναμίξιμου διαλύτη στην αρχική ταχύτητα οξείδωσης της SYR.

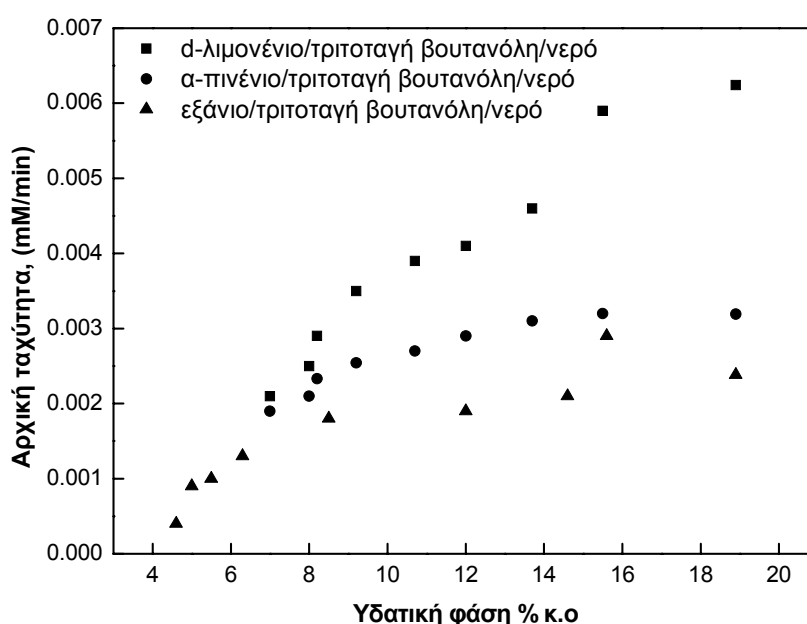
**Πίνακας 7.17.** Επίδραση της περιεκτικότητας του μονοφασικού συστήματος σε αναμίξιμο διαλύτη στην αρχική ταχύτητα οξείδωσης της SYR. Η αντίδραση καταλύεται από την ακινητοποιημένη TvL, σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη/νερό είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>]/νερό. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση 7 U (περιεκτικότητα πρωτεΐνης: 0.125 mg/ 50 mg πηκτώματος), SYR 0.216 mM.

| Σύστημα Αντίδρασης                   |     | Αρχική ταχύτητα |
|--------------------------------------|-----|-----------------|
|                                      |     | mM/min          |
| Μ.Σ τριτοταγούς βουτανόλης / νερού   | 50% | 0.122           |
|                                      | 70% | 0.013           |
|                                      | 80% | 0.003           |
|                                      | 25% | 0.032           |
| Μ.Σ [bmim][BF <sub>4</sub> ] / νερού | 50% | 0.005           |
|                                      | 70% | 0.005           |
|                                      | 80% | 0.0002          |

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.17, φαίνεται ότι και στους δύο τύπους μονοφασικών συστημάτων που σχηματίζονται είτε με τριτοταγή βουτανόλη είτε με [bmim][BF<sub>4</sub>], υψηλότερες ταχύτητες οξείδωσης παρατηρήθηκαν σε μέσα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Επίσης διαπιστώνεται ότι υψηλότερες ταχύτητες παρατηρήθηκαν στα μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται από τριτοταγή βουτανόλη και νερό. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και για την ελεύθερη λακκάση από *T. versicolor*, κατά την οξείδωση του ABTS και της SYR (στις παραγράφους 7.5.1.3 και 7.5.1.4) σε παρόμοια μονοφασικά συστήματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η οξείδωση της υδρόφοβης SYR από την λακκάση (είτε είναι σε ελεύθερη είτε σε ακινητοποιημένη μορφή), έγινε σε συστήματα που περιέχουν υψηλό ποσοστό αναμίξιμου οργανικού διαλύτη ή ιοντικού υγρού (ειδικότερα στην περίπτωση του [bmim][BF<sub>4</sub>]). Αντίθετα η οξείδωση του ABTS από την ελεύθερη λακκάση πραγματοποιήθηκε σε συστήματα με χαμηλό ποσοστό αναμίξιμου οργανικού διαλύτη ή ιοντικού υγρού. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι τα υδρόφοβα μόρια του υποστρώματος διαδραματίζουν προστατευτικό ρόλο στην διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων της λακκάσης (ελεύθερης και ακινητοποιημένης), επιτρέποντας την οξείδωση του υποστρώματος (SYR) σε συστήματα με μικρότερη περιεκτικότητα σε νερό. Επιπλέον ο φορέας ακινητοποίησης δρά προστατευτικά στην λακκάση επιτρέποντας την διεξαγωγή αντιδράσεων σε συστήματα με υψηλότερο ποσοστό μη αναμίξιμου διαλύτη. Αυτό

συμβαίνει διότι το ένζυμο πριν την ακινητοποίηση του στο στερεό φορέα έχει εγκλωβιστεί αρχικά στο εσωτερικό της υδατικής μικροφάσης του μικρογαλακτώματος που σχηματίζεται από το AOT σε ισοοκτάνιο. Κατά αυτόν τον τρόπο το ένζυμο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον οργανικό διαλύτη ή το ιοντικό υγρό του συστήματος, αφού είναι εγκλωβισμένο στο μικρογαλάκτωμα και ταυτόχρονα ακινητοποιημένο στην HPMC. Έτσι στην περίπτωση αυτή φαίνεται ότι η εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας από το ποσοστό του αναμίξιμου οργανικού διαλύτη εξαρτάται από το είδος της αντίδρασης που καταλύεται.

Παράλληλα η οξείδωση της SYR εξετάστηκε σε τριαδικά συστήματα τα οποία σχηματίζονται είτε με εξάνιο είτε με τα μονοτερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή *d*-λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό. Στα συστήματα αυτά αξιοσημείωτη είναι η εξάρτηση της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης TvL σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC, σε σχέση με τη υδατική φάση του συστήματος όπως αυτό εικονίζεται στο Σχήμα 7.24.



**Σχήμα 7.24.** Επίδραση της περιεκτικότητας του νερού του συστήματος στην αρχική ταχύτητα οξείδωσης της SYR από TvL σε τριαδικά συστήματα εξανίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού,  $\alpha$ -πινενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού και *d*-λιμονενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερού. Η σύσταση των συστημάτων δίνεται στον Πίνακα Ι.α,β,γ του παραρτήματος. Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση: 7 U, SYR: 0.216 mM.

Όπως φαίνεται, η ταχύτητα της εκάστοτε αντίδρασης εξαρτάται άμεσα τόσο από την υδατική φάση του συστήματος όσο και από την επιλογή του οργανικού διαλυτή (εξάνιο ή μονοτερπένια). Όσον αφορά την επίδραση της περιεκτικότητας του νερού στην αρχική ταχύτητα της οξειδωσης της SYR, διαπιστώνεται ότι παρόμοια συμπεριφορά επέδειξε η ελεύθερη λακκάση κατά την οξείδωση του ABTS και της SYR (παράγραφος 7.5.1.3 και 7.5.1.4 αντίστοιχα) καθώς επίσης και η CPO κατά την εποξείδωση του στυρενίου (παράγραφος 7.5.1.2). Η επίδραση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην περιορισμένη κατανομή των υδρόφοβων μορίων του υποστρώματος στο υδατικό μικροπεριβάλλον του ενζύμου σε συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [Zoumprianoti *et al.*, 2006a,b].

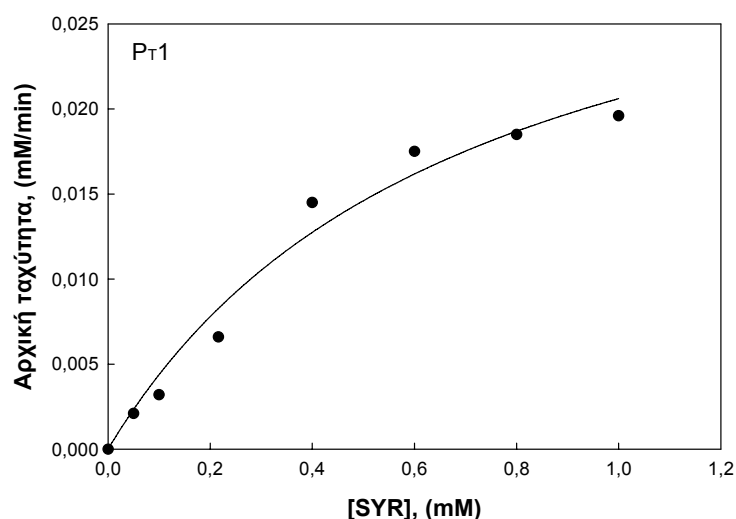
Επίσης η ακινητοποιημένη λακκάση επέδειξε μεγαλύτερη ενεργότητα στα τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με μονοτερπένια (ειδικότερα με βάση το *d*-λιμονένιο), από ότι στα συστήματα που σχηματίζονται με βάση το εξάνιο. Η συμπεριφορά αυτή που είναι όμοια με αυτή που έχει επιδείξει η ελεύθερη λακκάση κατά την οξείδωση της SYR σε αντίστοιχα μέσα, μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η παρουσία του  $\alpha$ -πινενίου (το οποίο αναγνωρίζεται και ως υπόστρωμα από την λακκάση) [Niku-Paavola and Viikari, 2000] ή του *d*-λιμονενίου και του φορέα ακινητοποίησης επιδρά σταθεροποιητικά στη δομή του ενζύμου. Παρόμοια προστατευτική δράση του υποστρώματος και του φορέα ακινητοποίησης έχει επισημανθεί και από άλλες ερευνητικές ομάδες για την περίπτωση της ισομεράσης της γλυκόζης [Converti and Del Borghi, 1997]. Ο προστατευτικός ρόλος που διαδραματίζει η παρουσία των υποστρωμάτων στη διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας σε μη συμβατικά συστήματα, θα μπορούσε να αποδοθεί στη σύνδεση του υποστρώματος με το ένζυμο, γεγονός το οποίο είναι γνωστό ότι συχνά οδηγεί στη σταθεροποίηση της καταλυτικής διαμόρφωσης του ενζυμικού μορίου [Khmelnitsky *et al.*, 1993]. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι οι αρχικές ταχύτητες που σημειώθηκαν στα συστήματα με AOT ήταν κατά 50% υψηλότερες σε σχέση με αυτές που παρατηρήθηκαν στα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.

#### **7.6.2 Κινητικές μελέτες ακινητοποιημένης TvL σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC κατά την οξείδωση της SYR.**

Προς καλύτερη διερεύνηση της επίδρασης της σύστασης των μέσων στην καταλυτική συμπεριφορά της ακινητοποιημένης λακκάσης προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές κατά την οξείδωση ενός υδρόφοβου υποστρώματος. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία, η αρχική ταχύτητα οξείδωσης της SYR, που καταλύεται από την ακινητοποιημένη TvL,

προσδιορίστηκε για σταθερές συγκεντρώσεις του υποστρώματος (0-1.2 mM). Τα μέσα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, ή  $d$ -λιμονένιο, τριτοταγή βουτανόλη και νερό (18.9% κ.ο). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.5.3.2.β.

Από τη μελέτη διαπιστώθηκε ότι σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα η κινητική της οξείδωσης της SYR που καταλύεται από την ακινητοποιημένη λακκάση ακολούθησε την κινητική Michaelis-Menten, που περιγράφεται από την εξίσωση (6.3) της παραγράφου 6.3.5.3.1. Στο Σχήματα 7.25 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P<sub>T1</sub>). Η κατ'όγκο σύσταση του συστήματος παρουσιάζεται στον Πίνακα I.β του παραρτήματος. Όπως φαίνεται η εξάρτηση αυτή φαίνεται να περιγράφεται από την κινητική Michaelis-Menten. Ανάλογη εξάρτηση παρατηρήθηκε και στα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο (H<sub>T1</sub>) ή το  $d$ -λιμονένιο (L<sub>T1</sub>).



**Σχήμα 7.25** Εξάρτηση της αρχικής ταχύτητας της οξείδωσης της SYR σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο (P<sub>T1</sub>) από την ακινητοποιημένη λακκάση σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC.

Στον Πίνακα 7.18 παρουσιάζονται οι τιμές των κινητικών σταθερών και οι τιμές του λόγου  $V_{\max} / K_m$  της ακινητοποιημένης λακκάσης για την οξείδωση της SYR.

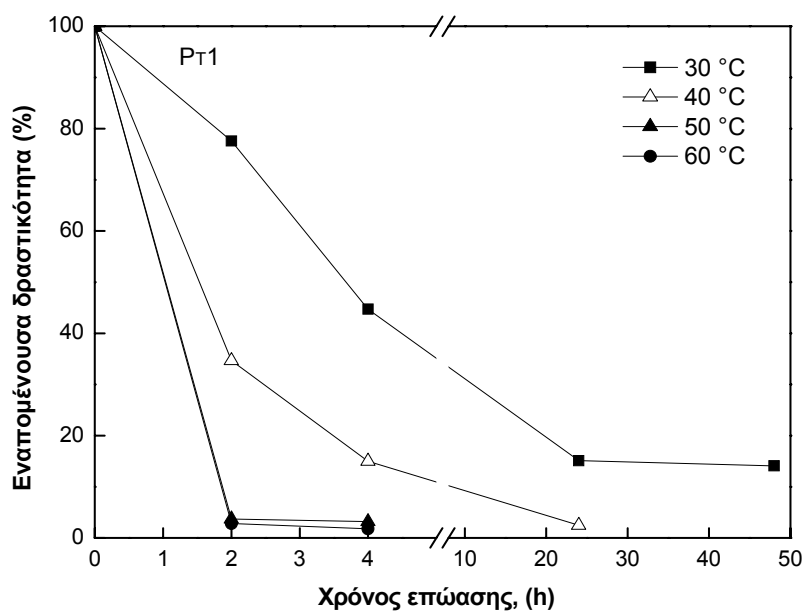
**Πίνακας 7.18.** Τιμές κινητικών σταθερών που υπολογίστηκαν κατά την οξείδωση της SYR από τη λακκάση από *T. versicolor* η οποία είχε ακινητοποιηθεί σε πήκτωμα HPMC με μικρογαλακτωμα με ΑΟΤ, σε τριαδικά συστήματα: α) H<sub>T</sub>1: εξάνιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (15.8/65.3/18.9% κ.ο), β) P<sub>T</sub>1: α-πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο), γ) L<sub>T</sub>1: d-λιμονένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση: 7 U, SYR: 0.216 mM

| Τριαδικό σύστημα | V <sub>max</sub><br>(mM/min) | K <sub>m</sub><br>(mM) | V <sub>max</sub> / K <sub>m</sub> |
|------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| H <sub>T</sub> 1 | 0.053                        | 1.240                  | 0.043                             |
| P <sub>T</sub> 1 | 0.035                        | 0.699                  | 0.050                             |
| L <sub>T</sub> 1 | 0.055                        | 1.154                  | 0.048                             |

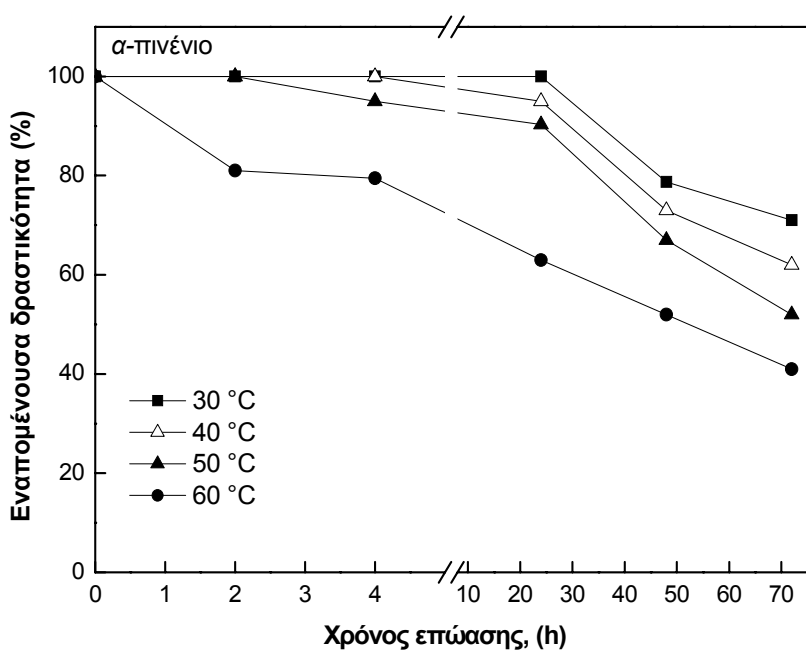
Όπως διαπιστώνεται από τον παραπάνω πίνακα, οι τιμές των κινητικών σταθερών όπως και η καταλυτική ικανότητα της ακινητοποιημένης TvL, όπως αυτή περιγράφεται από τον λόγο V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>, εξαρτάται από την φύση του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται (εξάνιο, α-πινένιο, d-λιμονένιο). Πιο συγκεκριμένα, η καταλυτική δραστηριότητα των λακκασών, που είναι εγκλωβισμένες σε τριαδικά συστήματα με βάση το d-λιμονένιο, όπως αυτή καταδεικνύεται από την V<sub>max</sub> είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τα υπόλοιπα συστήματα, ενώ η συγγένεια του ενζύμου για τη SYR (όπως αυτή περιγράφεται από την σταθερά K<sub>m</sub>) μειώνεται. Η καταλυτική ικανότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης, με βάση το τον λόγο V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>, είναι μεγαλύτερη στο σύστημα που σχηματίζεται με α-πινένιο. Η συμπεριφορά αυτή είναι παρόμοια με αυτή που επέδειξε η ελεύθερη λακκάση από *T. versicolor* κατά την οξείδωση του ABTS και η CPO κατά την εποξειδωση του στυρενίου σε αντίστοιχα τριαδικά συστήματα. Η υψηλότερη καταλυτική δραστηριότητα που παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με μονοτερπένια, μπορεί να αποδοθεί στην προστατευτική δράση που ασκούν τα συγκεκριμένα μονοτερπένια στο ένζυμο, τα οποία πιθανώς να σταθεροποιούν την καταλυτική διαμόρφωση του ενζυμικού μορίου.

### 7.6.3 Σταθερότητα ακινητοποιημένης TvL σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.

Η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης ελέγχθηκε σε διάφορα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό ( $H_{T1}$ ,  $P_{T1}$ ,  $L_{T1}$ ) ακολουθώντας την οξείδωση της SYR. Η ενζυμική σταθερότητα μελετήθηκε σε διάφορους χρόνους και θερμοκρασίες (30-60°C) επώασης απουσία του υποστρώματος. Αρχικά διερευνήθηκε η σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου στα ακόλουθα τριαδικά συστήματα, α)  $H_{T1}$ : εξάνιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (15.8/65.3/18.9% κ.ο), β)  $P_{T1}$ :  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο), γ)  $L_{T1}$ :  $d$ -λιμονένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο). Στο Σχήμα 7.26 παρουσιάζεται η εναπομένουσα δραστικότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης ως συνάρτηση του χρόνου επώασης στο τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ). Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα του σχήματος 7.26, η ακινητοποιημένη λακκάση διατηρεί παρά πολύ χαμηλό ποσοστό της αρχικής της δραστικότητας σε όλες τις συνθήκες επώασης. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια σταθερότητα επέδειξε και στα τριαδικά συστήματα με εξάνιο ( $H_{T1}$ ) ή  $d$ -λιμονένιο ( $L_{T1}$ ). Το μικρό χρονικό διάστημα, για το οποίο η ακινητοποιημένη λακκάση φαίνεται να διατηρεί την καταλυτική της σταθερότητα σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, οδηγεί στο ερώτημα κατά πόσο η μειωμένη αυτή σταθερότητα είναι αποτέλεσμα της αποσταθεροποίησης του πηκτώματος ή οφείλεται σε πιθανή αδρανοποίηση του ενζύμου. Με σκοπό να δοθεί απάντηση στο πιο πάνω ερώτημα, η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης μελετήθηκε μόνο στον αντίστοιχο οργανικό διαλύτη (εξάνιο,  $\alpha$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο) απουσία αλκοόλης ή νερού. Στο Σχήμα 7.27 παρουσιάζεται ενδεικτικά η εναπομένουσα δραστικότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης ως συνάρτηση του χρόνου επώασης στο  $\alpha$ -πινένιο.



**Σχήμα 7.26.** Εναπομένουσα δραστηριότητας της ακινητοποιημένης TnL σε HPMC κατά την επώαση σε διαφορεές θερμοκρασίες σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ).



**Σχήμα 7.27.** Εναπομένουσα δραστηριότητας της ακινητοποιημένης TnL σε HPMC κατά την επώαση σε διαφορεές θερμοκρασίες σε  $\alpha$ -πινένιο.

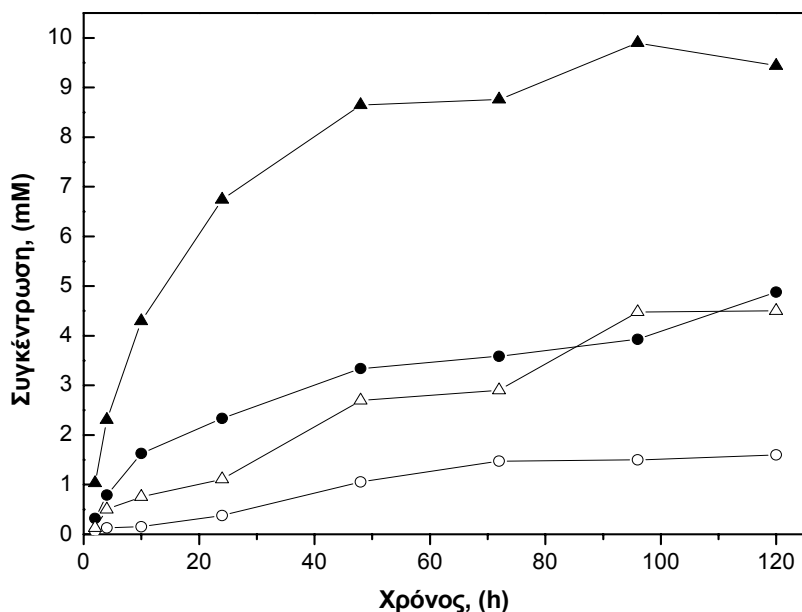
Από τα αποτελέσματα των παραπάνω διαγραμμάτων συμπεραίνεται ότι ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης κατά την επώαση του σε άνυδρα συστήματα οργανικών διαλυτών, εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη σταθερότητα σε σύγκριση με την επώαση του σε

μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, τα οποία περιέχουν υψηλό ποσοστό υδατικής φάσης. Προφανώς το πήκτωμα κατά την επώαση του σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (18.9% κ.ο), απορροφά μέρος της υδατικής φάσης οδηγώντας το σε αποσταθεροποίηση. Κατά συνεπεία το υδρόφιλο περιβάλλον που σχηματίζεται γύρω από το ένζυμο να ευνοεί την αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου. Για το λόγο αυτό ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης παρουσιάζει μειωμένη σταθερότητα σε συστήματα που περιέχουν ικανοποιητική ποσότητα υδατικής φάσης.

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η ακινητοποιημένη λακκάση επιδεικνύει μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την επώαση της σε μονοτερπένια (και ιδιαίτερα στο  $\alpha$ -πινένιο) από ότι σε σχέση με το εξάνιο. Το φαινόμενο αυτό επιβεβαιώνει την παρατήρηση που διατυπώθηκε σε προηγούμενες παραγράφους, σχετικά με τον προστατευτικό ρόλο που διαδραματίζει η παρουσία υποστρωμάτων στη διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων της λακκάσης. Παρόμοια συμπεριφορά, δηλαδή υψηλή σταθερότητα σε συστήματα πλούσια σε μονοτερπένια, παρουσίασαν η CPO και οι ελεύθερες λακκάσες από *T. versicolor*, *T. hirsuta* και *B. cinerea* όπως περιγράφηκε στις παραγράφους 7.5.3.1 και 7.5.3.2 αντίστοιχα.

#### 7.6.4 Εφαρμογή ακινητοποιημένης TvL στην οξείδωση τερπενίων

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα της ακινητοποιημένης TvL σε HPMC να καταλύσει την εκλεκτική τροποποίηση βασικών συστατικών της μαστίχας Χίου (όπως π.χ. τερπένια και αιθέριο έλαιο). Δεδομένου ότι τα τερπένια και το αιθέριο έλαιο δεν είναι υδατοδιαλυτά, τα τριαδικά συστήματα διευκολύνουν την εκλεκτική τροποποίηση των παραπάνω ενώσεων, αφού στα μέσα αυτά μπορούν να διαλυθούν τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα υποστρώματα. Έτσι στα πλαίσια της μελέτης αυτής εξετάστηκαν οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης οξείδωσης των τερπενίων, όπως η σύσταση του συστήματος και το είδος του διαμεσολαβητή που χρησιμοποιείται στην κάθε αντίδραση. Αρχικά μελετήθηκε η οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου από την ακινητοποιημένη λακκάση προς βερμπενόλη και βερμπενόνη με την χρήση HBT ως διαμεσολαβητή (Σχήμα 7.28).



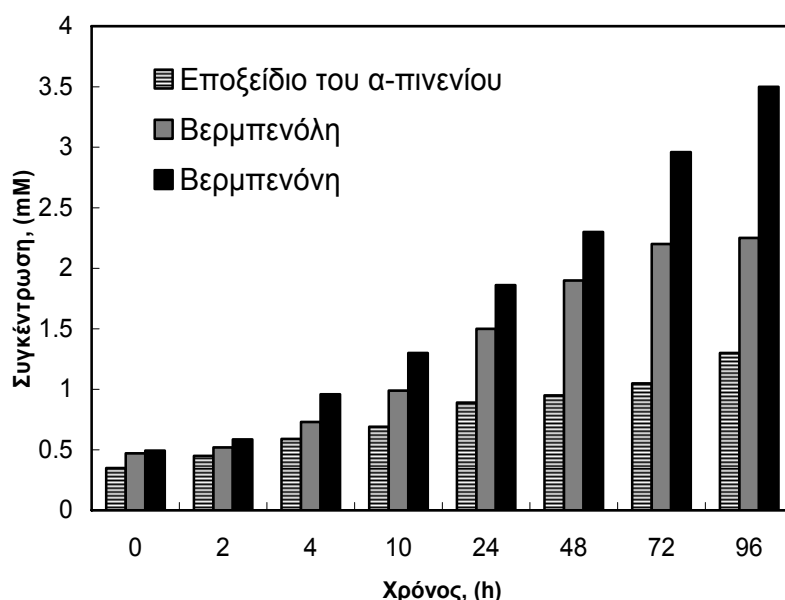
**Σχήμα 7.28.** Παραγωγή βερμπενόλης (●, ○) και βερμπενόνης (▲, △) από ελεύθερη TvL (λευκά σύμβολα) και από την ακινητοποιημένη TvL (μαύρα σύμβολα) σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο: P<sub>T1</sub>:  $\alpha$ -πινένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο). Συνθήκες αντίδρασης: λακκάση: 7U (ακινητοποιημένη) ή 10 U (ελεύθερη), HBT: 40 mM.

Από το διάγραμμα διαπιστώνεται ότι η χρήση της ακινητοποιημένης λακκάσης οδήγησε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παραγωγής βερμπενόλης και βερμπενόνης σε σύγκριση με την ελεύθερη. Το αξιοσημείωτο είναι ότι οι συγκεντρώσεις των οξυγονωμένων παραγώγων του  $\alpha$ -πινενίου που επιτεύχθηκαν με την χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου έγιναν με μικρότερη ποσότητα λακκάσης σε σχέση με την ελεύθερη. Το πλεονέκτημα της χρησιμοποίησης ακινητοποιημένης λακκάσης για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών εφαρμογών (όπως η τροποποίηση των τερπενίων που μελετάται στην εργασία αυτή) είναι σε συμφωνία με άλλες αναφορές [Zhu *et al.*, 2007; Rekuć *et al.*, 2009].

Επίσης στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η βιομετατροπή ενός ακόμη βασικού συστατικού του μαστιχέλαιου, του *d*-λιμονενίου. Η οξείδωση του *d*-λιμονενίου προς το αντίστοιχο εποξειδίο του, που καταλύεται από την ακινητοποιημένη λακκάση, μελετήθηκε συγκριτικά με την ελεύθερη λακκάση σε τριαδικό σύστημα με βάση το *d*-λιμονένιο (L<sub>T1</sub>: *d*-λιμονένιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο)). Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η χρήση της ακινητοποιημένης λακκάσης πλεονεκτεί σε σχέση με την ελεύθερη, ακόμη και στην περίπτωση που ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης βρίσκεται σε

μικρότερη ποσότητα στο μίγμα της αντίδρασης. Η εικόνα αυτή είναι όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στην περίπτωση της οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η ικανότητα της ακινητοποιημένης TvL να καταλύει την οξείδωση του μαστιχελαίου (Σχήμα 7.29) σε τριαδικό σύστημα με βάση το μαστιχέλαιο ( $M_{T1}$ : μαστιχέλαιο/τριτοταγή βουτανόλη/νερό (16.0/65.1/18.9% κ.ο). Το τριαδικό αυτό σύστημα είναι μονοφασικό και διαυγές και χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελεγχθεί η δράση του ενζύμου σε ένα περιβάλλον που προσομοιάζει το φυσικό. Κατά την οξείδωση του μαστιχελαίου, λόγω ότι αποτελείται από πολλές ενώσεις (όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1 του Κεφαλαίου 2), είναι αναμενόμενο η εκλεκτική τροποποίηση του από την λακκάση να οδηγήσει στην παραγωγή πλήθος οξυγονωμένων προϊόντων. Στην εργασία αυτή κατά την οξείδωση του μαστιχελαίου εστίασαμε στην παραγωγή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, της βερμπενόλης και της βερμπενόνης.



**Σχήμα 7.29.** Πορεία της αντίδρασης οξείδωσης του μαστιχελαίου προς εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη από την ακινητοποιημένη TvL σε τριαδικό σύστημα με βάση το μαστιχέλαιο στους 25°C. Συνθήκες αντίδρασης: ακινητοποιημένη λακκάση 7 U (περιεκτικότητα πρωτεΐνης: 0.125 mg/50 mg πηκτώματος), HBT 40 mM.

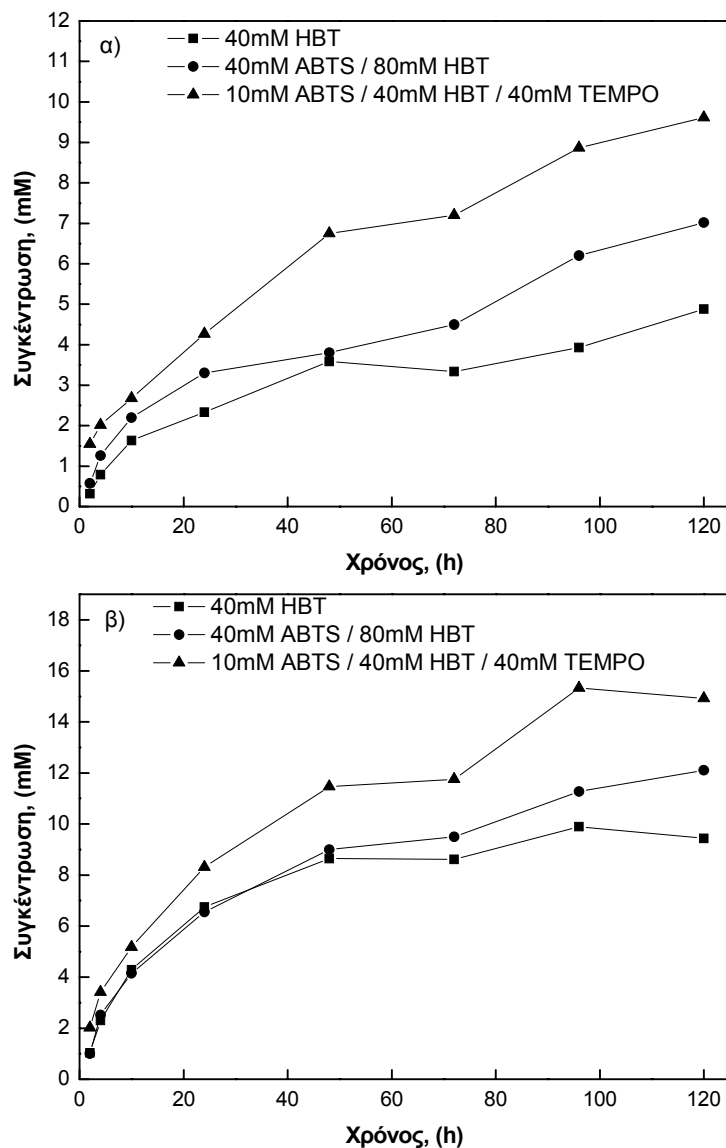
Από το παραπάνω σχήμα παρατηρείται ότι σε χρόνο 96 h παράχθηκαν 4.2 mM βερμπενόνης και 2.3 mM βερμπενόλης. Σύμφωνα με το Σχήμα 7.20 (παράγραφος 7.5.6.2) παρατηρείται ότι με τη χρήση ελεύθερης λακκάσης οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις προϊόντων που παράχθηκαν στον ίδιο χρόνο είναι για την βερμπενόνη 2.28 mM και για την βερμπενόλη

1.5 mM. Και σε αυτή την περίπτωση η χρήση ακινητοποιημένου ενζύμου οδήγησε σε διπλάσια συγκέντρωση προϊόντων σε σχέση με αυτή που παρατηρείται όταν η ίδια αντίδραση καταλύεται από ελεύθερο ένζυμο. Αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου προς βερμπενόνη και βερμπενόλη με τη χρήση ακινητοποιημένης λακκάσης (Σχήμα 7.28) διαπιστώθηκε ότι σε χρόνο 96 h οι συγκεντρώσεις τους ήταν 9.9 mM και 3.9 mM, αντίστοιχα. Οι συγκεντρώσεις αυτές είναι σχεδόν δύο φορές μεγαλύτερες από αυτές που παρατηρήθηκαν κατά την οξείδωση του μαστιχελαίου.

#### **7.6.4.1 Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών στην καταλυτική δράση της κινητοποιημένης λακκάσης**

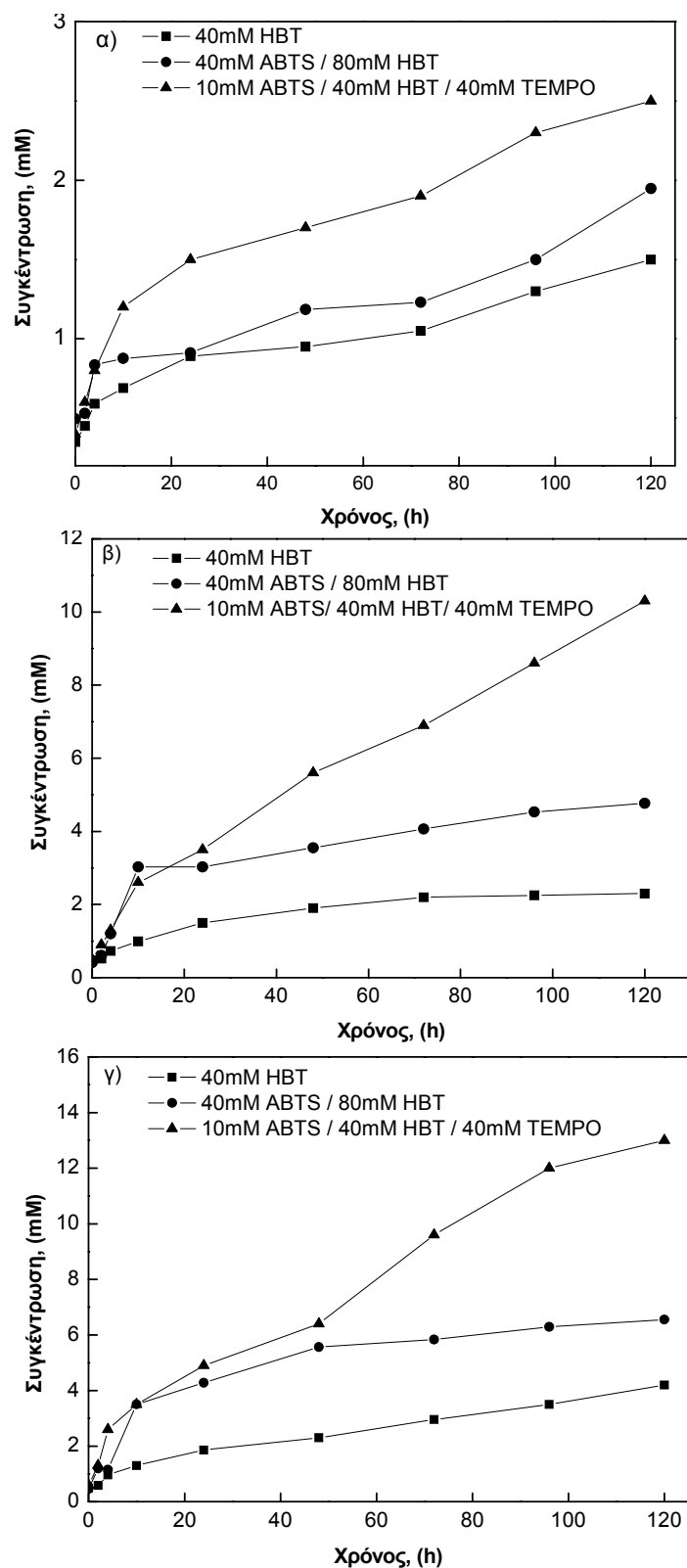
Όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 7.5.6.2.2 η αποτελεσματικότητα της βιομετατροπής του  $\alpha$ -πινενίου από την ελεύθερη λακκάση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την σωστή επιλογή του διαμεσολαβητή ή καλύτερα από την σωστή επιλογή του συνδυασμού των μεσολαβητών. Οι συνθήκες που οδήγησαν σε υψηλότερες αποδόσεις οξυγονωμένων παραγωγών με την χρήση ελεύθερης λακκάσης ήταν 40mM ABTS / 80mM HBT και 10mM ABTS / 40mM HBT / 40mM TEMPO. Προς την κατεύθυνση αυτή οι δύο προηγούμενες συνθήκες εξετάστηκαν και συγκρίθηκαν με την μεμονωμένη χρήση του HBT (40mM) κατά την ενζυμική οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου με την χρήση ακινητοποιημένης λακκάσης (Σχήμα 7.30). Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η χρήση μόνο του HBT υστερεί σε σχέση με τον συνδυασμό δύο ή και τριών διαμεσολαβητών. Αντίθετα η ταυτόχρονη χρήση των τριών διαμεσολαβητών τόσο κατά την παραγωγή της βερμπενόλης όσο και της βερμπενόνης οδήγησε στις πιο υψηλές συγκεντρώσεις των προϊόντων. Πιο συγκεκριμένα μετά από 120 h αντίδρασης διαπιστώθηκε ότι η συγκέντρωση της βερμπενόλης ήταν 4.87 mM, 7.0 mM και 9.61 mM κατά την χρήση ενός, δύο και τριών διαμεσολαβητών αντίστοιχα. Παρόμοια η συγκέντρωση της βερμπενόνης ήταν 9.4 mM, 12.1 mM και 14.92 mM κατά την χρήση ενός, δύο και τριών διαμεσολαβητών αντίστοιχα. Με βάση τα παραπάνω επιβεβαιώνεται ότι με κατάλληλο συνδυασμό των μεσολαβητών είναι δυνατόν να βελτιωθεί η βιομετατροπή του τερπενίου προς οξυγονωμένα παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να ερμηνευτεί από το γεγονός ότι υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ των δύο ή των τριών διαμεσολαβητών [Cho *et al.*, 2002; Vandertol –Vanier *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2008]. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την

οξείδωση του *d*-λιμονενίου από την ακινητοποιημένη λακκάση με τη χρήση 40mM ABTS / 80mM HBT και 10mM ABTS / 40mM HBT / 40mM TEMPO.



**Σχήμα 7.30.** Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών στην πορεία οξείδωσης του *α*-πινενίου από την ακινητοποιημένη λακκάση (περιεκτικότητα πρωτεΐνης: 0.125 mg/50 mg πηκτώματος) προς: α) βερμπενόλη και β) βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το *α*-πινένιο (P<sub>T1</sub>) στους 25°C.

Ανάλογη εικόνα διαπιστώθηκε κατά την οξείδωση του μαστιχελαίου σε εποξείδιο του *α*-πινενίου, βερμπενόλη και βερμπενόνη από την ακινητοποιημένη λακκάση *T. versicolor* κατά την συγκριτική χρήση των τριών συνθηκών (Σχήμα 7.31).



**Σχήμα 7.31.** Επίδραση του συνδυασμού των διαμεσολαβητών στην πορεία οξείδωσης του μαστιγελαίου από την ακινητοποιημένη TvL προς: α) εποξείδιο του α-πινενίου, β) βερμπενόλη και γ) βερμπενόνη σε τριαδικό σύστημα με βάση το μαστιγέλαιο (M<sub>T1</sub>) τους 25°C. (περιεκτικότητα πρωτεΐνης: 2.5 mg/g πηκτώματος).

## 7.7 Ακίνητοποίηση λιπάσης B από *Candida antarctica* σε φυλλόμορφους αργίλους.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα της λιπάσης B από *Candida antarctica* (CaLB) να τροποποιήσει βασικά συστατικά του μαστιγελαίου. Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες παραγράφους η πλειοψηφία των υποστρωμάτων που αποτελούν συστατικά της μαστίχας (αιθέρια έλαια, τερπένια, τερπενόλες) είναι υδρόφοβες ενώσεις, με αποτέλεσμα να μην είναι η εφικτή η βιομετατροπή των ενώσεων αυτών σε υδατικά συστήματα. Προς την κατεύθυνση αυτή επιχειρήθηκε η ακίνητοποίηση της CaLB σε φυλλόμορφους αργίλους, προκειμένου να αναπτυχθούν βιοκαταλυτικές διεργασίες σε μη συμβατικά συστήματα, στα οποία τα παραπάνω υποστρώματα είναι διαλυτά. Στην εργασία αυτή ως φορείς ακίνητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί άργιλοι: α) ο λαπονίτης (LAP: συνθετικός τριοκταεδρικός σμεκτίτης από το είδος του εκτορίτη), β) ο κουνίπια (KUN: μοντοριλλονίτης) και ο γ) SWy-2. (μοντοριλλονίτης) καθώς και τα αντίστοιχα οργανοτροποποιημένα παράγωγά τους (το πρωτόκολλο οργανοτροποποίησης των αργίλων παρουσιάζεται αναλυτικά στην παράγραφο 6.3.3.2). Στον Πίνακα 6.1 της παραγράφου 6.1.2.3 παρουσιάζονται οι βασικές ιδιότητες των αργίλων αυτών.

Όπως διαπιστώνεται και από τον Πίνακα 6.1, οι τρεις άργιλοι διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των σωματιδίων, την πυκνότητα του φορτίου και την κατιονανταλλακτική τους ικανότητα (CEC). Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι οι οργανοτροποποιημένοι άργιλοι (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) έχουν οργανόφιλο χαρακτήρα σε σχέση με τους πρόδρομους αργίλους (LAP, KUN, SWy-2) που είναι υδρόφιλοι. Η αλλαγή αυτή οφείλεται στην διαδικασία της οργανοτροποποίησης τους, κατά την οποία έχει προστεθεί συγκεκριμένη ποσότητα τασιενεργούς ένωσης βρωμιούχου οκταδέκυλο τριμεθυλαμμωνίου  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Br}]$  με βάση την κατιονανταλλακτική ικανότητα του κάθε αργίλου (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.3.3.2).

Η ακίνητοποίηση της CaLB έλαβε χώρα στο ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου (pH 6.0). Σε αυτή την τιμή του pH, (η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου σε υδατικό διάλυμα είναι πολύ υψηλή) το συνολικό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν με αποτέλεσμα να μην εμποδίζεται η προσρόφηση του στην αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια του αργίλου. Στον Πίνακα 7.19 παρουσιάζονται τα ποσοστά ακίνητοποίησης της λιπάσης στους διάφορους αργίλους. Σε όλες τις περιπτώσεις η εκτίμηση του ποσοστού ακίνητοποίησης έγινε μέσω του

προσδιορισμού της πρωτεΐνης [Bradford, 1976] πριν και μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου.

**Πίνακας 7.19.** Ποσοστά (%) ακινητοποίησης και ειδική ενεργότητα (με βάση την μετεστεροποίηση του βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος με την 1-βουτανόλη) της ακινητοποιημένης CaLB στους φυσικούς και στους οργανοτροποποιημένους αργίλους.

| Αργίλος | Αρχική Ποσότητα<br>Πρωτεΐνης<br>(mg g <sup>-1</sup> φορέα) | Ακινητοποιημένη<br>Πρωτεΐνη<br>(mg g <sup>-1</sup> φορέα) | Ποσοστό<br>Ακινητοποίησης<br>(%) | Ειδική Ενεργότητα<br>(mM h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup><br>πρωτεΐνης) |
|---------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| LAP     | 20                                                         | 17.0                                                      | 85                               | 0.850                                                                   |
|         | 50                                                         | 39.5                                                      | 79                               | 0.844                                                                   |
|         | 100                                                        | 76.0                                                      | 76                               | 0.839                                                                   |
|         | 200                                                        | 146.0                                                     | 73                               | 0.832                                                                   |
| KUN     | 20                                                         | 16.6                                                      | 83                               | 0.968                                                                   |
|         | 50                                                         | 37.5                                                      | 75                               | 0.951                                                                   |
|         | 100                                                        | 70.0                                                      | 70                               | 0.945                                                                   |
|         | 200                                                        | 132.0                                                     | 66                               | 0.943                                                                   |
| SWy-2   | 20                                                         | 16.6                                                      | 83                               | 0.847                                                                   |
|         | 50                                                         | 38.5                                                      | 77                               | 0.836                                                                   |
|         | 100                                                        | 69.0                                                      | 69                               | 0.821                                                                   |
|         | 200                                                        | 130.0                                                     | 65                               | 0.822                                                                   |
| ORLAP   | 20                                                         | 19.2                                                      | 96                               | 2.172                                                                   |
|         | 50                                                         | 47.5                                                      | 95                               | 2.239                                                                   |
|         | 100                                                        | 80.0                                                      | 80                               | 2.393                                                                   |
|         | 200                                                        | 183.8                                                     | 92                               | 2.399                                                                   |
| ORKUN   | 20                                                         | 18.7                                                      | 94                               | 2.219                                                                   |
|         | 50                                                         | 46.0                                                      | 92                               | 2.223                                                                   |
|         | 100                                                        | 81.0                                                      | 81                               | 2.222                                                                   |
|         | 200                                                        | 176.0                                                     | 88                               | 2.278                                                                   |
| ORSWy-2 | 20                                                         | 19.0                                                      | 95                               | 2.590                                                                   |
|         | 50                                                         | 45.5                                                      | 91                               | 2.678                                                                   |
|         | 100                                                        | 80.0                                                      | 80                               | 2.750                                                                   |
|         | 200                                                        | 180.0                                                     | 90                               | 2.780                                                                   |

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα το ποσοστό της ακινητοποιημένης λιπάσης στους αργίλους κυμαίνεται από 65% έως 96% του αρχικού ποσοστού του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κατά την διαδικασία της ακινητοποίησης. Γενικά διαπιστώνεται ότι οι άργιλοι κουνίπια (KUN) και SWy-2, προσρόφησαν παρόμοια ποσότητα ενζύμου ενώ αντίθετα ο λαπονίτης (LAP) που έχει μικρότερο μέγεθος σωματιδίων και χαμηλότερη πυκνότητα φορτίου (Πίνακας 6.1) προσρόφησε την μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στα οργανοτροποποιημένα παράγωγα (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2), τα οποία λόγω της παρουσίας του επιφανειοενεργού έχουν υδρόφοβο χαρακτήρα, παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού ακινητοποίησης κατά 10% σε σχέση με τους πρόδρομους αργίλους (LAP, KUN, SWy-2). Παρόμοια συμπεριφορά αυξημένου ποσοστού ακινητοποίησης ενζύμου σε υδρόφοβους αργίλους, παρατηρήθηκε κατά την ακινητοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης σε υδρόφοβες επιφάνειες μπεντονίτη [Tang *et al.*, 1993]. Επίσης το υψηλό ποσοστό ακινητοποίησης της λιπάσης στους αργίλους είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που ανακοινώθηκαν κατά την ακινητοποίηση της β-γλυκοσιδάσης σε λαπονίτη και κουνίπια [Serefoglou *et al.*, 2008]. Με βάση τον Πίνακα 7.20 παρατηρείται ότι μεγαλύτερο ποσοστό ακινητοποίησης της β-γλυκοσιδάσης επιτεύχθηκε στο λαπονίτη.

**Πίνακας 7.20.** Ποσοστά (%) ακινητοποίησης της β-γλυκοσιδάσης στους αργίλους (KUN, LAP) και αρχική ταχύτητα υδρόλυσης του pNPG σε pNP από την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση.

| Αρχικό ποσοστό<br>πρωτεΐνης<br>(mg g <sup>-1</sup> φορέα) | Ποσοστό ακινητοποίησης<br>(%) |     | Αρχική ταχύτητα<br>(μmoles min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> βιοκαταλύτη) |             |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|-----|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                                           | LAP                           | KUN | LAP                                                                       | KUN         |
| 20                                                        | 91                            | 85  | 0.50 ± 0.17                                                               | δ.π.        |
| 50                                                        | 88                            | 82  | 1.48 ± 0.33                                                               | 1.45 ± 0.10 |
| 100                                                       | 85                            | 78  | 1.69 ± 0.23                                                               | 1.85 ± 0.06 |
| 200                                                       | 79                            | 70  | 4.08 ± 0.36                                                               | 2.30 ± 0.37 |

δ.π.: δεν προσδιορίστηκε

Στην περίπτωση της λιπάσης, σύμφωνα με τον Πίνακα 7.19, διαπιστώθηκε πως καθώς η ποσότητα του ενζύμου προς τον άργιλο αυξάνει, περισσότερη ποσότητα ενζύμου ακινητοποιείται στους φυλλόμορφους αργίλους, πράγμα που σημαίνει ότι στις συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη δεν έχει επιτευχθεί κορεσμός του αργίλου με το ένζυμο.

Η προσροφητική ικανότητα των αργίλων που αναφέρεται στην παρούσα εργασία είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτή που έχει δημοσιευτεί για την ακινητοποίηση λιπασών όταν χρησιμοποιούνται διαφορετικοί φορείς ή μέθοδοι ακινητοποίησης [Yadav and Jadhav, 2005; Won *et al.*, 2005; Peter *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006]. Επίσης και στην περίπτωση της  $\beta$ -γλυκοσιδάσης παρατηρήθηκε και βιβλιογραφικά υψηλό ποσοστό ακινητοποίησης σε αργίλους [Sarkar *et al.*, 1989]. Αντίθετα σε άλλους φορείς όπως αλούμινα [Fadda *et al.*, 1989], ζελατίνη [Nagatomo *et al.*, 2005], πυριτικά υλικά [O'Neill *et al.*, 2002] κλπ. το ποσοστό ακινητοποίησης της ήταν χαμηλό.

Προκειμένου να εξεταστεί η καταλυτική ικανότητα τόσο της ακινητοποιημένης CaLB όσο και της  $\beta$ -γλυκοσιδάσης από αμύγδαλα μελετήθηκε αντίστοιχα η μετεστεροποίηση του βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος με την 1-βουτανόλη και η υδρόλυση του pNPG (*p*-νιτροφαινυλ-γλυκοπυρανοζιδίου) σε pNP (*p*-νιτροφαινόλη). Στους Πίνακες 7.19 και 7.20, δίνονται οι τιμές της ειδικής ενεργότητας της CaLB που υπολογίστηκε με βάση την αντίδραση μετεστεροποίησης και οι αρχικές ταχύτητες υδρόλυσης του pNPG, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι καθώς το ποσοστό του ενζύμου (CaLB ή  $\beta$ -γλυκοσιδάση) αυξάνεται από 20 σε 200 mg πρωτεΐνης ανά g φορέα, οι αρχικές ταχύτητες επίσης αυξάνονται. Ειδικά στην περίπτωση της CaLB, το ένζυμο επέδειξε μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα στους οργανοτροποποιημένους αργίλους σε σχέση με τους απλούς. Με σκοπό να μελετηθεί αναλυτικά η επίδραση της φύσης του φορέα (υδρόφιλου ή υδρόφοβου) στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της CaLB, οι ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν από μια σειρά τεχνικών χαρακτηρισμού υλικών, ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκαν πειράματα δραστηριότητας και σταθερότητας σε οργανικούς διαλύτες. Τα αποτελέσματα των παραπάνω μετρήσεων και πειραμάτων παρατίθενται αναλυτικά στις επόμενες ενότητες.

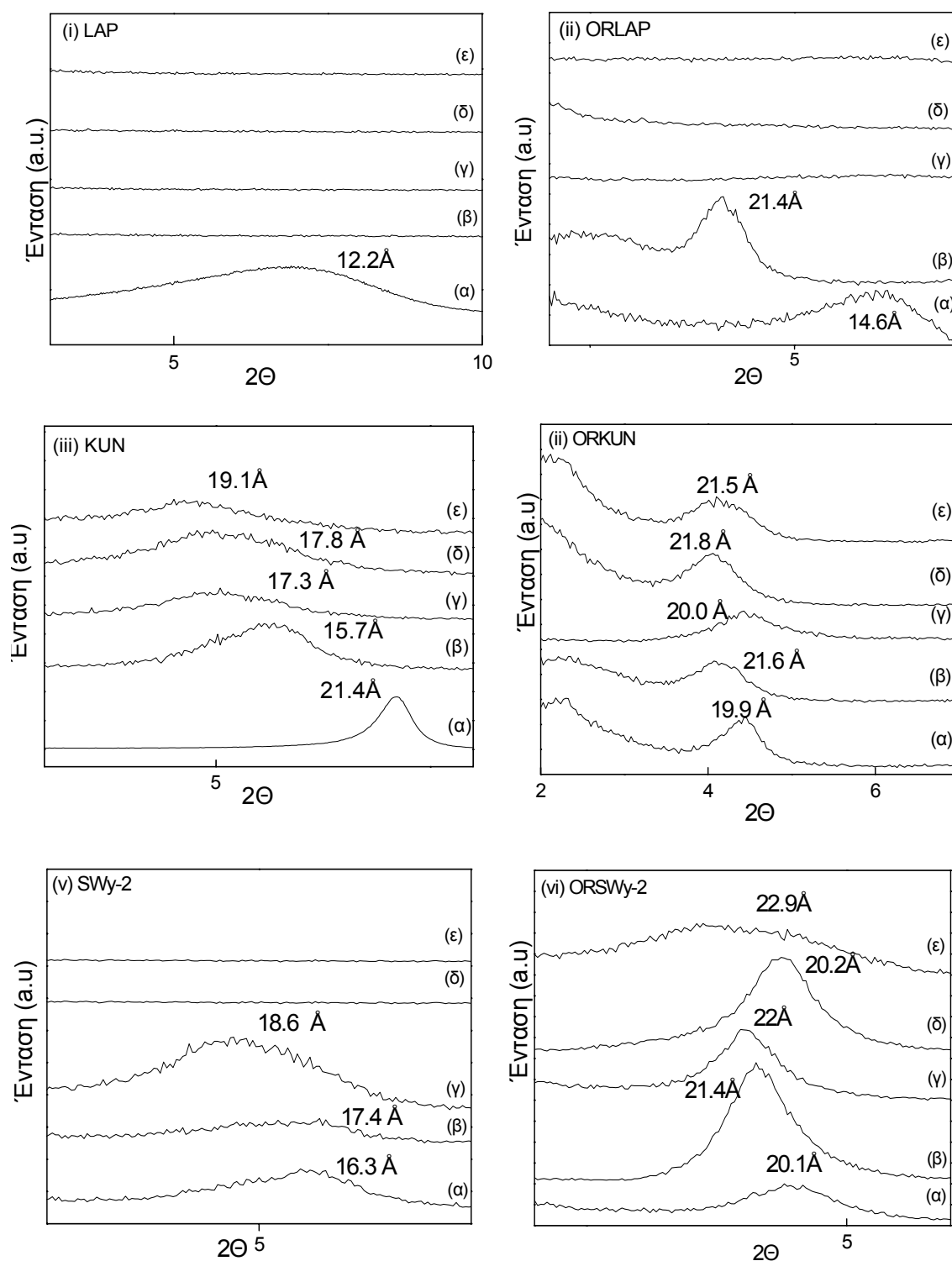
### 7.7.1 Δομικός χαρακτηρισμός βιοκαταλυτών

Οι ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με περίθλαση ακτίνων-X (XRD), θερμική ανάλυση (DTA/ TGA), φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS), ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) καθώς και με φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR), με την οποία μελετήθηκε η διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής του ακινητοποιημένου ενζύμου.

### 7.7.1.1 Χαρακτηρισμός με περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

Κατά την ανάλυση των αργίλων με περίθλαση ακτίνων-X στα φάσματα εμφανίζονται μόνο οι ανακλάσεις (001) που αντιστοιχούν σε επίπεδα που είναι κάθετα προς την κρυσταλλογραφική διεύθυνση [001]. Η διεύθυνση [001] είναι η διεύθυνση ανάπτυξης των φυλλόμορφων στρωμάτων. Στους αργίλους η απόσταση  $d_{001}$  είναι το άθροισμα του πάχους του φυλλιδίου και του ύψους του ενδοστρωματικού χώρου. Όταν θερμανθεί ο άργιλος στους 300°C για 24 h παρατηρείται σύγκλιση των αργιλοπυριτικών φυλλιδίων, η οποία οφείλεται στην απομάκρυνση των ενδοστρωματικών μορίων νερού, με αποτέλεσμα την συρρίκνωση της δομής του αργίλου και έτσι η απόσταση  $d_{001}$  μειώνεται στα 9.6 Å [Theng, 1974]. Η τιμή αυτή των 9.6 Å αντιστοιχεί στο πάχος του φυλλιδίου του αργίλου. Προφανώς, για τον υπολογισμό της ενδοστρωματικής απόστασης αφαιρείται η πιο πάνω τιμή του πάχους του φυλλιδίου, από την υπολογισμένη τιμή  $d_{001}$  για το κάθε δείγμα, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5.11 της παραγράφου 5.4.7.

Γενικά η περίθλαση ακτίνων-X (XRD) είναι ένα πολύτιμο εργαλείο, με το οποίο μπορούν να εκτιμηθούν οι αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον του αργίλου. Προκειμένου να μελετηθεί τόσο το μικροπεριβάλλον του αργίλου μετά την ένθεση της CaLB αλλά και να αποτυπωθεί ποιοτικά η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου επιχειρήθηκε η μελέτη των υβριδικών βιοκαταλυτών με ακτίνες-X τόσο για τους απλούς (LAP, KUN, SWy-2) όσο και για τους οργανοτροποποιημένους αργίλους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2). Στο Σχήμα 7.32.i-vi παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X και για τους έξι τύπους υβριδικών βιοκαταλυτών. Με βάση το διάγραμμα i) που αφορά ακινητοποιημένη CaLB σε LAP, για διάφορα ποσοστά φόρτωσης παρατηρείται ότι η απόσταση  $d_{001}$  είναι 12.2Å, οπότε ο ενδοστρωματικός χώρος του αργίλου πριν χρησιμοποιηθεί για ακινητοποίηση (φάσμα (α)) είναι  $\Delta = 12.2 - 9.6 = 2.6\text{Å}$ , όπου 9.6Å είναι το πάχος του φυλλιδίου [Theng, 1974]. Αντίθετα κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου, σε διάφορα ποσοστά φόρτωσης στον LAP (φάσματα (β-ε)) παρατηρείται απουσία του  $d_{001}$  πράγμα το οποίο σημαίνει ότι μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου, ο άργιλος έχει αποφυλλοποιηθεί (δηλ. τα φυλλίδια του αργίλου δεν έχουν παράλληλη διεύθυνση). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και για τον ORLAP. Πιο συγκεκριμένα ο ενδοστρωματικός χώρος του οργανόφιλου λαπονίτη είναι  $\Delta = 14.6 - 9.6 = 5\text{Å}$ . Κατά την ακινητοποίηση 20mg πρωτεΐνης/g αργίλου παρατηρείται αύξηση του ενδοστρωματικού χώρου σε 11.8 Å.



**Σχήμα 7.32.** Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X για την ακινητοποιημένη CaLB σε i) LAP, ii) ORLAP, iii) KUN, iv) ORKUN, v) SWy-2 και vi) ORSWy-2 για διάφορα ποσοστά φόρτωσης (α) άργιλος χωρίς ένζυμο, (β) 20mg πρωτεΐνης/g αργίλου, (γ) 50mg πρωτεΐνης/g αργίλου, (δ) 100mg πρωτεΐνης/g αργίλου, (ε) 200mg πρωτεΐνης/g αργίλου.

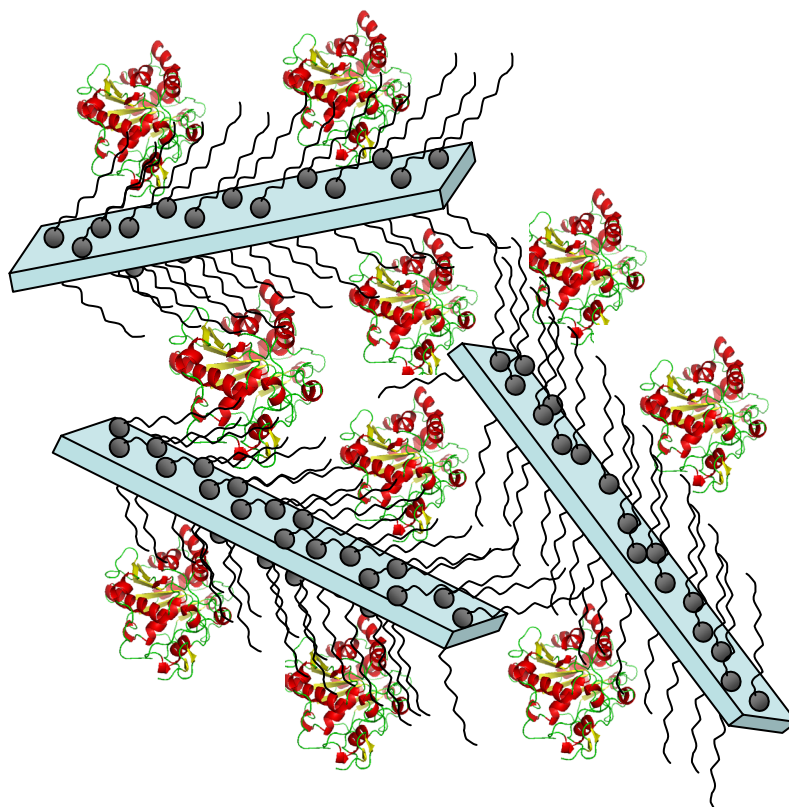
Για περαιτέρω προσθήκη ενζύμου (50-200 mg πρωτεΐνης/g αργίλου) δεν παρατηρείται κορυφή  $d_{001}$ , οπότε διαπιστώνεται ότι μετά την ένθεση της CaLB ο οργανόφιλος λαπονίτης αποφυλλοποιείται πλήρως. Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου σε KUN, ORKUN, SWy-2, ORSWy-2 (διαγράμματα iii-vi). Γενικά στα παραπάνω υλικά παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης του ενζύμου, αυξάνεται ο ενδοστρωματικός χώρος του αργίλου. Η αποφυλλοποίηση των υλικών αυτών παρατηρήθηκε σε μεγάλα ποσοστά φόρτωσης του ενζύμου ( $\geq 100$  mg πρωτεΐνης/g αργίλου). Επιπλέον ο αριθμός των φυλλιδίων που είναι σε παράλληλη διεύθυνση μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο  $N = \frac{t}{d}$  (7.1)

Όπου  $N$  είναι ο αριθμός των φυλλιδίων που είναι σε παράλληλη διεύθυνση με τον άξονα  $c$  ενώ  $d$  είναι η απόσταση  $d_{001}$  (σε Å) [Gournis *et al.*, 2006]. Ο αριθμός των φυλλιδίων που υπολογίστηκε να είναι σε παράλληλη διεύθυνση για τους υβριδικούς βιοκαταλύτες SWy-2-20, SWy-2-50, SWy-2-100, SWy-2-200 ήταν 4, 2, 2, 0 και 0, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές σημαίνουν πως καθώς αυξάνει το ποσοστό του ακινητοποιημένου ενζύμου στον άργιλο, το ορυκτό αποφυλλοποιείται, εφόσον όλο και μικρότερος αριθμός φυλλιδίων είναι σε παράλληλη διεύθυνση. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση των υπόλοιπων υβριδικών βιοκαταλυτών (LAP, ORLAP, KUN, ORKUN και ORSWy-2).

Όσον αφορά τα οργανοτροποποιημένα παράγωγα (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) αξίζει να σημειωθεί ότι η αλληλοεπίδραση μεταξύ του αργίλου και του επιφανειοενεργού οδήγησε τόσο σε αύξηση όσο και σε μετατόπιση της κορυφής  $d_{001}$  σε μικρότερες τιμές  $2\theta$ , το οποίο ουσιαστικά υποδηλώνει την διεύρυνση του ενδοστρωματικού χώρου εξαιτίας της ένθεσης του επιφανειοενεργού μορίου.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι οι διαστάσεις του ενζυμικού μορίου είναι μεγάλες (30 Å x 40 Å x 50 Å) [Uppenberg *et al.*, 1994, 1995], αναμένεται ένα μέρος του ενζύμου να ακινητοποιείται στον ενδοστρωματικό χώρο του ορυκτού ενώ το υπόλοιπο να ακινητοποιείται είτε εξωτερικά είτε στις άκρες των κορυφών των φυλλιδίων όπως παρουσιάστηκε στο Σχήμα 5.11. Άλλωστε το γεγονός ότι η κορυφή  $d_{001}$  των υβριδικών βιοκαταλυτών παρουσιάστηκε σε μικρότερες τιμές  $2\theta$  από τους καθαρούς αργίλους, είναι αποδεικτικό ότι όντως ένα μέρος του ενζύμου ακινητοποιήθηκε στον ενδοστρωματικό χώρο του ορυκτού. Παρόμοια αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και κατά την ακινητοποίηση  $\beta$ -γλυκοσιδάσης σε αργίλους [Serefoglou *et al.*, 2008]. Θεωρείται ότι οι πλευρικές αλυσίδες διαφόρων καταλοίπων των αμινοξέων ακινητοποιούνται εντός του ενδοστρωματικού χώρου, ενώ η κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα

τοποθετείται εκτός του ενδοστρωματικού χώρου. Η διαπίστωση αυτή είναι σε συμφωνία με άλλες δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες έχει παρατηρηθεί ότι κατά την προσρόφηση διαφόρων ενζύμων, όπως π.χ. της  $\alpha$ -αμυλάσης, της γλυκοαμυλάσης και της ιμπερτάσης σε συνθετικούς μοντιμοριλλονίτες, μόνο οι πλευρικές αλυσίδες των διαφόρων καταλοίπων των αμινοξέων ακινητοποιούνται εντός του ενδοστρωματικού χώρου [Gopinath and Sugunan, 2007; Sanjay and Sugunan, 2007; Gougeon *et al.*, 2003]. Η μερική ακινητοποίηση της CaLB σε φυλλόμορφα υλικά είναι σε συμφωνία με την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης [Garwood *et al.*, 1983], της  $\beta$ -γλυκοσιδάσης [Serefoglou *et al.*, 2008] και της κυτταρινάσης [Safari *et al.*, 2005] σε αργίλους. Στο Σχήμα 7.33 παρατίθεται μια σχηματική απεικόνιση της ακινητοποιημένης λιπάσης σε έναν αποφυλλωμένο οργανόφιλο άργιλο.

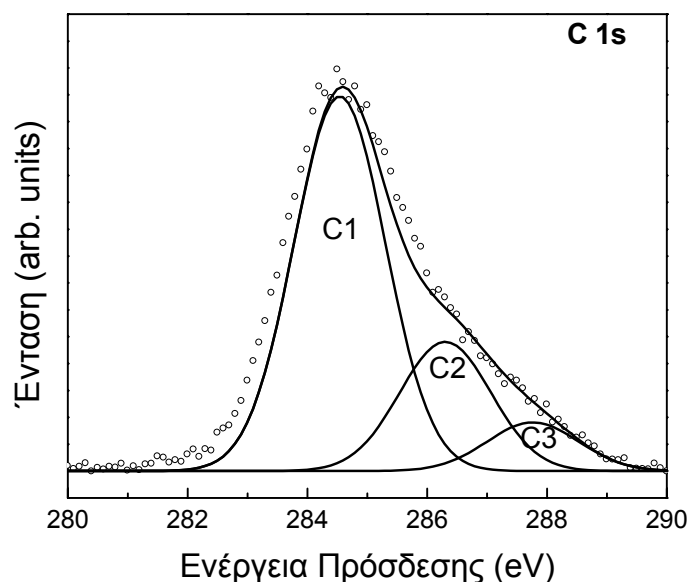


**Σχήμα 7.33.** Σχηματική απεικόνιση του αποφυλλωμένου οργανόφιλου υβριδικού βιοκαταλύτη. Στην εικόνα παρουσιάζονται τα φυλλίδια του αργίλου, τα πρωτεϊνικά μόρια και τα επιφανειοενεργά (με τις πολικές κεφαλές και τις υδρόφοβες αλυσίδες).

#### 7.7.1.2 Χαρακτηρισμός με φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS)

Το XPS αποτελεί μια άμεση μέθοδο για την διερεύνηση του τρόπου που η CaLB προσδένεται στην επιφάνεια των σιλοξανίων (οργανοπυριτικές ενώσεις που περιέχουν

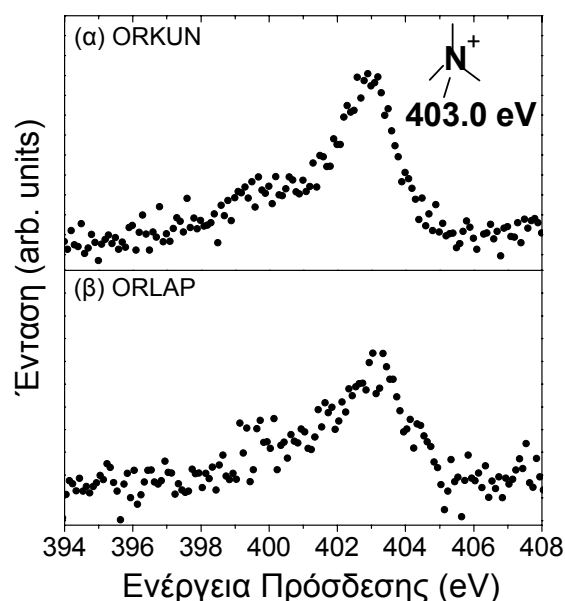
δεσμούς Si-O-Si, με γραμμικά ή κυκλικά μόρια) του αργίλου, καθώς μπορεί να διακρίνει μεταξύ των αλειφατικών και των καρβονυλίων ατόμων άνθρακα, αλλά όχι μεταξύ των διαφορετικών τύπων των καρβονυλο-ομάδων ( $>C=O$ ) που υπάρχουν στο μόριο. Στο Σχήμα 7.34 παρατίθεται το C 1s φωτοηλεκτρονικό φάσμα για τον βιοκαταλύτη KUN-100 (ποσοστό φόρτωσης ενζύμου 100mg πρωτεΐνης/g αργίλου).



**Σχήμα 7.34.** Φωτοηλεκτρονικό φάσμα ακτίνων-X για το C 1s του βιοκαταλύτη KUN-100.

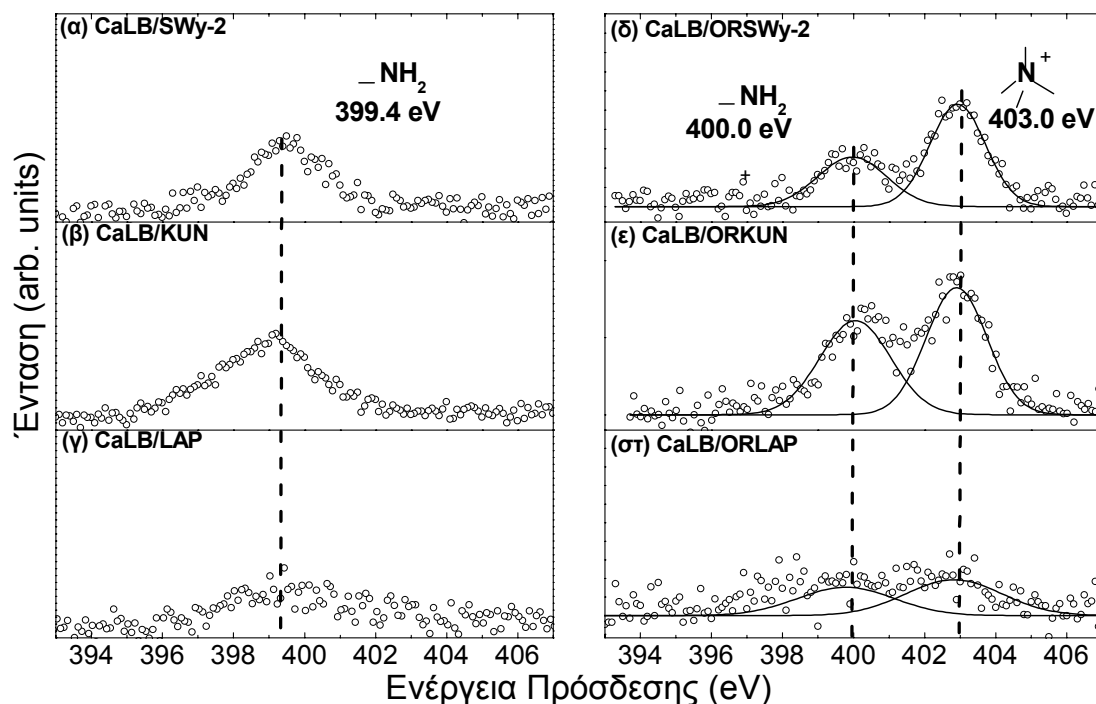
Τα πειραματικά δεδομένα έχουν προσαρμοστεί υποθέτοντας ένα μόριο με τρεις ευδιάκριτες χημικές μετατοπίσεις των εκπομπών του C 1s που συμβαίνουν στις ενέργειες πρόσδεσης στα 284.7, 286.3 και 287.8 eV. Η κορυφή στα 284.7 eV (C1) αποδίδεται στους δεσμούς C-C/C-H των αλειφατικών ατόμων άνθρακα. Οι κορυφές στα 286.3 eV (C2) και στα 287.8 eV (C3) οφείλονται στους δεσμούς C-N/C-O και  $C=O$ , αντίστοιχα, και αποδίδονται στις αμιδικές ομάδες. Οι τιμές αυτές είναι σε συμφωνία με αυτές που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για την Novozym 435<sup>®</sup> [Mahapatro *et al.*, 2006]. Η παρουσία των αμιδικών ομάδων επιβεβαιώθηκε και κατά την ανάλυση των ενεργειών πρόσδεσης των φασμάτων N 1s που παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.35. Πράγματι η κορυφή με ενέργεια πρόσδεσης στα 400.1 eV οφείλεται στις αμιδικές ομάδες του ενζύμου. Παρόμοια κορυφή N1s παρατηρήθηκε σε όλους τους υβριδικούς βιοκαταλύτες, υποδεικνύοντας ότι κατά την ακινητοποίηση της CaLB τόσο στους απλούς όσο και στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στις ηλεκτρονικές και στις χημικές ιδιότητες του πρωτεϊνικού μορίου.

Επιπλέον η ενέργεια πρόσδεσης στα  $E_B=403.0$  eV οφείλεται στην παρουσία του επιφανειοενεργού μορίου στους οργανοτροποποιημένους αργίλους.



**Σχήμα 7.35.** Φωτοηλεκτρονικό φάσμα ακτίνων-X για το N 1s των οργανοτροποποιημένων αργίλων (α) ORKUN και (β) ORLAP.

Στο Σχήμα 7.36.α-στ παρουσιάζονται τόσο τα φωτοηλεκτρονικά φάσματα του N 1s για τους απλούς αργίλους (SWy-2, KUN, LAP) στους οποίους έχει ακινητοποιηθεί CaLB με ποσοστό φόρτωσης 100 mg/g αργίλου (SWy-2-100, KUN-100 και LAP-100) όσο και τα αντίστοιχα φάσματα των οργανοτροποποιημένων αργίλων με παρόμοιο ποσοστό φόρτωσης ενζύμου (ORSWy-2-100, ORKUN-100 και ORLAP-100). Πιο συγκεκριμένα στα φάσματα που αφορούν την ακινητοποιημένη CaLB σε απλούς αργίλους (Σχήμα 7.36.α-γ) διαπιστώνεται μόνο μια κορυφή με ενέργεια πρόσδεσης στα 399.4 eV, η οποία οφείλεται στις αμιδικές ομάδες της CaLB. Αντίθετα στα φάσματα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε οργανοτροποποιημένους αργίλους (Σχήμα 7.36.δ-στ) παρατηρήθηκε μια παρόμοια κορυφή, η οποία όμως είχε μετατοπισθεί σε περιοχές με μεγαλύτερη ενέργεια πρόσδεσης (400.0 eV). Η μετατόπιση αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση των αμιδικών ομάδων του ενζύμου με το επιφανειοενεργό του οργανοτροποποιημένου αργίλου.

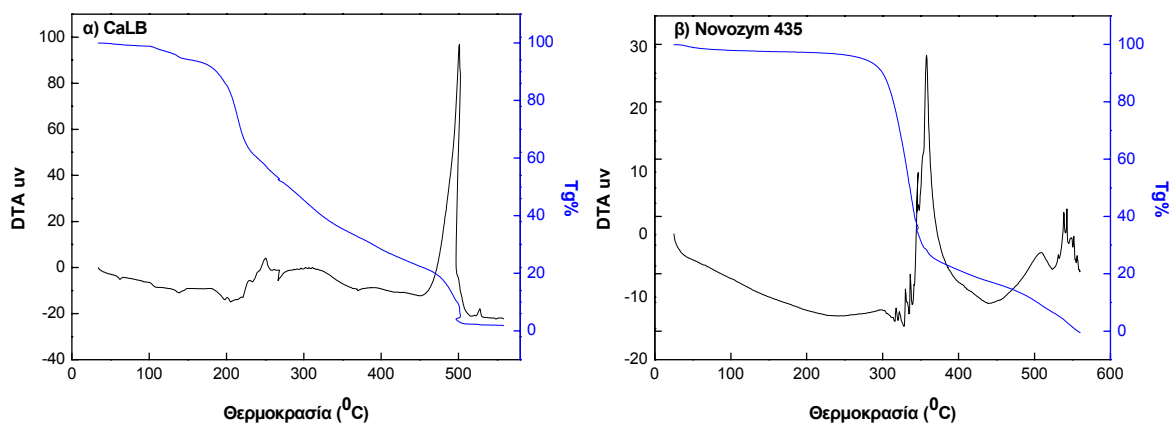


**Σχήμα 7.36.** Φωτοηλεκτρονικό φάσμα ακτίνων-X για το N 1s των νανοσύνθετων: (α) SWy-2-100, (β) KUN-100, (γ) LAP-100, (δ) ORSWy-2-100, (ε) ORKUN-100 and (στ) ORLAP-100.

Στην περίπτωση του ORKUN-100 η ένταση των κορυφών στα 400.0 eV και 403.0 eV είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με τους υπόλοιπους οργανοτροποποιημένους βιοκαταλύτες με το ίδιο ποσοστό φόρτωσης (ORSWy-2-100, ORLAP-100). Λόγω ότι ο κουνίπια έχει μεγαλύτερη κατιονανταλλακτική ικανότητα (C.E.C 1.2 meq/g), σε σύγκριση με τους άλλους δύο αργίλους (όπως φαίνεται τον Πίνακα 6.1), αναμένεται η ποσότητα του επιφανειοενεργού να είναι μεγαλύτερη λόγω του υψηλότερου C.E.C. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνεύσει την μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου που έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του οργανικά τροποποιημένου κουνίπια. Αντίθετα στην περίπτωση του ORLAP-100, το σήμα N1s είναι εξαιρετικά αδύναμο και σχεδόν μη ορατό (καμπύλη στ). Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνεται η προσρόφηση της CaLB τόσο σε απλούς όσο και σε οργανοτροποποιημένους αργίλους.

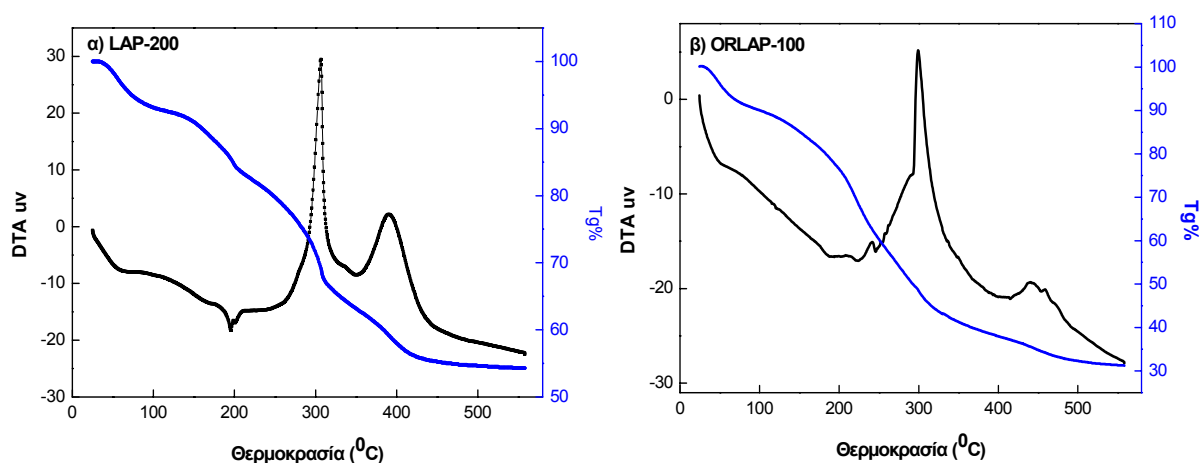
### **7.7.1.3 Χαρακτηρισμός με θερμική ανάλυση (TGA/DTA)**

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν θερμοβαρυτομετρικές (TGA) και διαφορικές θερμικές (DTA) αναλύσεις τόσο για τους φορείς ακινητοποίησης (LAP, KUN, SWy-2, ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) όσο και για τους υβριδικούς βιοκαταλύτες που προέκυψαν μετά την ακινητοποίηση της CaLB στους αργίλους και για όλα τα ποσοστά φόρτωσης (20-20mg πρωτεΐνης/g αργίλου). Με σκοπό να προσδιοριστούν οι αλλαγές που συμβαίνουν στα ορυκτά με τα την ένθεση της πρωτεΐνης χαρακτηρίστηκαν με θερμική ανάλυση (TGA/DTA) δύο πρωτεϊνικά σκευάσματα: α) ελεύθερη CaLB και β) εμπορικά ακινητοποιημένη CaLB (Novozym 435<sup>®</sup>) (Σχήμα 37.α,β αντίστοιχα). Από το διάγραμμα θερμικής ανάλυσης του ελεύθερου ενζύμου CaLB (Σχήμα 7.37.α) παρατηρείται αρχικά από τη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) απώλεια βάρους 6.2% μέχρι τους 163°C, η οποία οφείλεται σε προσρόφηση μορίων νερού από το ένζυμο και άλλων πτητικών διαλυτών στους οποίους είναι διαλυμένο το ένζυμο. Στη συνέχεια διαπιστώνεται μια σειρά εξώθερμων μεταβολών οι οποίες ξεκινούν στους 163°C και ολοκληρώνονται στους 467°C. Οι μεταβολές αυτές σύμφωνα με την θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TGA) αντιστοιχούν σε απώλεια βάρους 73.5% και οφείλονται στην καύση του ενζύμου. Όσον αφορά το διάγραμμα θερμικής ανάλυσης της εμπορικά ακινητοποιημένης CaLB (Novozym 435<sup>®</sup>) (Σχήμα 7.37.β) παρατηρείται σύμφωνα με τη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) απώλεια βάρους 3.2% μέχρι τους 209°C η οποία οφείλεται σε προσρόφηση μορίων νερού από το ένζυμο ή από το φορέα ακινητοποίησης. Ύστερα διαπιστώνεται μια εξώθερμη μεταβολή η οποία ξεκινά στους 258°C και τελειώνουν στους 442°C η οποία σύμφωνα με την θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TGA) αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους 73.3% η οποία οφείλεται στην καύση του ενζύμου. Τέλος η εξώθερμη μεταβολή η οποία ξεκινάει στους 443°C και σταματά στους 555°C αποδίδεται στην καύση της ρητίνης στην οποία είναι ακινητοποιημένο το ένζυμο. Από τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι οι μεταβολές που συμβαίνουν λόγω καύσης του ενζύμου λαμβάνουν χώρα από τους 260 έως τους 450°C.



**Σχήμα 7.37.** Θερμοβαρυτομετρική (—) και διαφορική θερμική ανάλυση (—) για την: α) ελεύθερη λιπάση (CaLB), β) ακινητοποιημένη (Novozym 435®).

Γενικά κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου στους απλούς αργίλους και για όλα τα ποσοστά φόρτωσης (20-20mg πρωτεΐνης/g αργίλου) παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές εξώθερμες μεταβολές οι οποίες οφείλονται από την καύση του ενζύμου. Αντίθετα κατά την ακινητοποίηση της CaLB στους οργανικά τροποποιημένους αργίλους και για όλα τα ποσοστά φόρτωσης παρατηρήθηκαν χαρακτηριστικές εξώθερμες μεταβολές οι οποίες οφείλονται στην καύση του ενζύμου και των οργανικών μορίων (τετραλκυλαμμώνια). Χαρακτηριστικά παρουσιάζονται ενδεικτικά διαγράμματα θερμικής ανάλυσης κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου τόσο σε απλό όσο και σε οργανοτροποποιημένο φορέα (Σχήμα 7.38.α,β).



**Σχήμα 7.38.** Θερμοβαρυτομετρική (—) και διαφορική θερμική ανάλυση (—) για την α) ακινητοποιημένη CaLB στον LAP με ποσοστό φόρτωσης 200mg/g αργίλου και β) ακινητοποιημένη CaLB στον ORLAP με ποσοστό φόρτωσης 100mg/g αργίλου

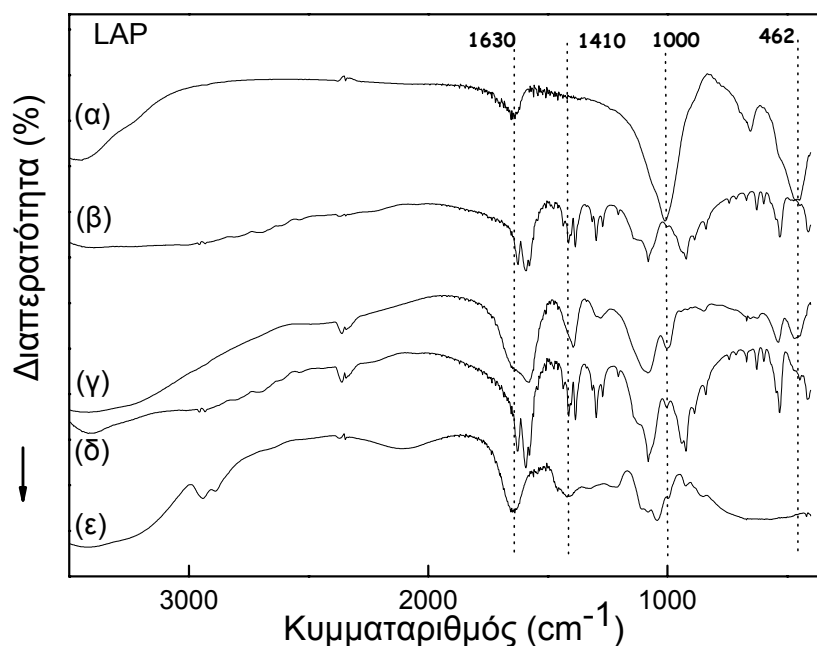
Σύμφωνα με τη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) κατά την ακινητοποίηση της CaLB στον LAP εμφανίζεται μια ενδόθερμη μεταβολή η οποία ξεκινάει από τους 50°C και τελειώνει στους 122°C. Η ενδόθερμη αυτή μεταβολή σύμφωνα με την θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TGA) αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους 7.8% και αποδίδεται στην απομάκρυνση του νερού και άλλων πτητικών διαλυτών στους οποίους είναι διαλυμένο το ένζυμο ή είναι δεσμευμένοι στον φορέα ακινητοποίησης. Ακολουθούν δύο έντονα εξώθερμες μεταβολές στους 300°C και στους 390°C, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια βάρους 16.5% και 11.2% αντίστοιχα και οφείλονται στην καύση του ενζύμου. Στο τέλος της ανάλυσης στους 557°C έχει απομείνει 65.3% του αρχικού βάρους του καθαρού αργίλου. Γενικά η εξώθερμη μεταβολή στους 390°C αντιστοιχεί σε ενζυμικά μόρια τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του αργίλου ή στις άκρες των φυλλιδίων και έτσι είναι πιο προστατευμένα, με αποτέλεσμα η καύση τους να πραγματοποιείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Αντίθετα η μεταβολή στους 300°C αφορά ενζυμικά μόρια τα οποία δεν είναι άμεσα ακινητοποιημένα πάνω στον φορέα, αλλά προσδεδεμένα σε άλλα ενζυμικά μόρια τα οποία έρχονται σε επαφή με τον άργιλο. Για το λόγο αυτό τα μόρια αυτά είναι 'απροστάτευτα' και έτσι η καύση τους πραγματοποιείται σε μικρότερη θερμοκρασία. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά την προσρόφηση του ενζύμου και στους υπόλοιπους απλούς αργίλους (KUN, SWy-2).

Κατά την ακινητοποίηση της CaLB στον ORLAP σύμφωνα με τη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) εμφανίζεται μια ενδόθερμη μεταβολή (από τους 53°C έως τους 113°C), η οποία σύμφωνα με την θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TGA) αντιστοιχεί σε απώλεια βάρους 11%. Η απώλεια βάρους αποδίδεται στην απομάκρυνση του νερού και άλλων πτητικών διαλυτών στους οποίους είναι διαλυμένο το ένζυμο ή είναι δεσμευμένοι στον φορέα ακινητοποίησης. Ύστερα ακολουθούν δύο εξώθερμες μεταβολές στους 300°C και στους 450°C, οι οποίες οδηγούν σε απώλεια βάρους 49.6% και 8.5% αντίστοιχα και οφείλονται στην καύση του ενζύμου και των οργανικών μορίων του επιφανειοενεργού. Στο τέλος της ανάλυσης σε θερμοκρασία 563.8°C έχει απομείνει 30.9% του αρχικού βάρους του καθαρού αργίλου. Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως η εξώθερμη μεταβολή στους 450°C αντιστοιχεί σε ενζυμικά μόρια τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του αργίλου ή στις άκρες των φυλλιδίων και έτσι είναι πιο προστατευμένα, ενώ η μεταβολή στους 300°C αφορά ενζυμικά μόρια τα οποία δεν είναι άμεσα ακινητοποιημένα πάνω στον φορέα, με αποτέλεσμα να είναι 'απροστάτευτα' και έτσι η καύση τους πραγματοποιείται σε μικρότερη θερμοκρασία. Φυσικά και στις δύο εξώθερμες μεταβολές λαμβάνεται υπόψη και η καύση του

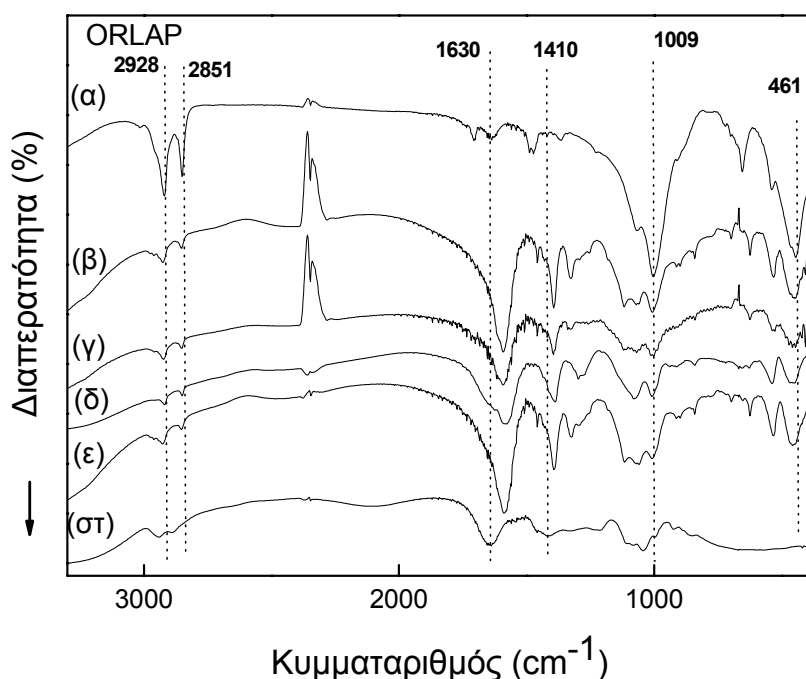
επιφανειοενεργού. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν κατά την προσρόφηση του ενζύμου και στους υπόλοιπους οργανοτροποποιημένους αργίλους (ORKUN, ORSWy-2).

#### 7.7.1.4 Χαρακτηρισμός με φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR)

Με σκοπό να διαπιστωθεί η επιτυχής ακινητοποίηση CaLB σε φυλλόμορφους αργίλους (απλούς και οργανοτροποποιημένους), οι υβριδικοί βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR). Λόγω ότι με βάση την τεχνική αυτή είναι δυνατόν να ανιχνευτούν οι χαρακτηριστικοί δεσμοί που οφείλονται στον άργιλο ή στο ένζυμο μελετήθηκαν τα φάσματα FT-IR των απλών (LAP, KUN, SWy-2) και των οργανοτροποποιημένων αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2), στους οποίους είχε ακινητοποιηθεί CaLB με διάφορα ποσοστά φόρτωσης (20-100 πρωτεΐνης mg/g αργίλου). Ενδεικτικά παρατίθενται τα φάσματα FT-IR για την ακινητοποιημένη λιπάση σε LAP (Σχήμα 7.39) και ORLAP (Σχήμα 7.40).



**Σχήμα 7.39.** Φάσματα FT-IR για την ακινητοποιημένη CaLB σε LAP: (α) LAP (χωρίς ένζυμο), (β) LAP-20, (γ) LAP-50, (δ) LAP-200, (ε) ελεύθερη CaLB.



**Σχήμα 7.40.** Φάσματα FT-IR για την ακινητοποιημένη CaLB σε ORLAP: (α) ORLAP (χωρίς ένζυμο), (β) ORLAP-20, (γ) ORLAP-50, (δ) ORLAP-100, (ε) ORLAP-200, (στ) ελεύθερη CaLB.

Όπως διαπιστώνεται στα φάσματα όλων των υβριδικών βιοκαταλυτών παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του αργίλου και της CaLB, χωρίς σημαντικές αλλαγές, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει την παρουσία της CaLB στον άργιλο. Πιο συγκεκριμένα και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται η εμφάνιση των κορυφών στα  $461\text{ cm}^{-1}$  και  $1009\text{ cm}^{-1}$  που αποδίδονται στις δονήσεις των δεσμών Si-O και Si-O-Si, αντίστοιχα. Οι κορυφές στα  $1630\text{ cm}^{-1}$  και  $1410\text{ cm}^{-1}$  που παρατηρούνται στα φάσματα των υβριδικών βιοκαταλυτών πηγάζουν από το ένζυμο και οφείλονται στις δονήσεις των πεπτιδικών δεσμών. Τέλος η εμφάνιση των κορυφών στα  $2851\text{ cm}^{-1}$  και  $2928\text{ cm}^{-1}$  σε όλα τα φάσματα της ακινητοποιημένης CaLB στον οργανοτροποποιημένο λαπονίτη (Σχήμα 7.40), αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης  $-\text{CH}_2$  και  $-\text{CH}_3$  και προέρχονται από το επιφανειοενεργό μόριο. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσίαζαν και τα φάσματα της ακινητοποιημένης CaLB σε KUN, ORKUN, SWy-2 και ORSWy-2. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται η ένθεση του ενζύμου στους αργίλους.

Προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές που πιθανώς να έχει υποστεί η δευτεροταγής δομή του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση του τόσο στους απλούς όσο και στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του υπεριώδους φάσματος

στην περιοχή Amide I (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 6.3.5.6.3.β). Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως η περιοχή Amide I όπου έγινε η ανάλυση εκτείνεται από 1600-1700  $\text{cm}^{-1}$  και ανιχνεύονται δονήσεις έκτασης C=O [Yu, 2006]. Η περιοχή ανάλυσης των βασικών στοιχείων ( $\alpha$ -έλικες,  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες,  $\beta$ -στροφές, τυχαίο σπείραμα) της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης για την περιοχή Amide I δίνεται στον Πίνακα 7.21 [Natalello *et al.*, 2005].

**Πίνακας 7.21.** Περιοχή ανάλυσης των βασικών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής του ενζύμου για την περιοχή Amide I.

| Στοιχεία δευτεροταγούς δομής                | Περιοχή ανάλυσης ( $\text{cm}^{-1}$ ) |
|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες                | 1620-1640                             |
| τυχαίο σπείραμα                             | 1640-1650                             |
| $\alpha$ -έλικες                            | 1650-1665                             |
| $\beta$ -στροφές                            | 1665-1685                             |
| Αντιπαράλληλες $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες | 1610-1620 και 1685-1695               |

Τα στοιχεία τη δευτεροταγούς δομής της λιπάσης είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ακινητοποιημένη σε απλούς (LA, KUN, SWy-2) ή οργανοτροποποιημένους αργίλους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) παρουσιάζονται τον Πίνακα 7.22.

**Πίνακας 7.22.** Ανάλυση (%) της δευτεροταγούς δομής της CaLB σε ελεύθερη και σε ακινητοποιημένη μορφή στην περιοχή Amide I. Συγκέντρωση πρωτεΐνης σε α) ελεύθερη μορφή: 1.5 mg/ml και σε β) ακινητοποιημένη μορφή: 200 mg πρωτεΐνης/g αργίλου.

| Ένζυμο          | $\alpha$ -έλικα | $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες | $\beta$ -στροφές | τυχαίο σπείραμα |
|-----------------|-----------------|------------------------------|------------------|-----------------|
| Υδατικό διάλυμα | 30.4            | 23.6                         | 24.7             | 21.3            |
| ORKUN           | 26.2            | 39.1                         | 14.1             | 20.6            |
| ORLAP           | 32.7            | 5.3                          | 42.6             | 19.4            |
| ORSWy-2         | 32.7            | 12.7                         | 39.3             | 15.3            |
| KUN             | 29.1            | 27.6                         | 33.2             | 10.1            |
| LAP             | 21.5            | 26.4                         | 38.9             | 13.2            |
| SWy-2           | 20.2            | 24.0                         | 38.5             | 17.3            |

Τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της CaLB σε υδατικό διάλυμα, όπως υπολογίστηκαν από το φάσμα FTIR στην περιοχή Amide I, είναι σε συμφωνία με πρόσφατες βιβλιογραφικές αναφορές [Mei *et al.*, 2003; McCabe *et al.*, 2005]. Αντίθετα μετά την ακινητοποίηση διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλαγές στην δευτεροταγή δομή του ενζύμου σε σύγκριση με τη δομή του που παρατηρείται στο νερό. Παρόμοιες αλλαγές στην δευτεροταγή δομή παρατηρήθηκαν και σε άλλες ακινητοποιημένες πρωτεΐνες [Fu *et al.*, 1999; Servagent-Noinville *et al.*, 2000] ή σε ελεύθερα ένζυμα [Brown *et al.*, 1993; Otero, 1995; Griebenow and Klibanov, 1997; De Diego *et al.*, 2005] σε μη συμβατικά συστήματα. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 7.22 στην περίπτωση της ακινητοποιημένης CaLB σε ORLAP, ORWy-2 παρατηρείται αύξηση του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας και μείωση του ποσοστού στις  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες. Η αύξηση του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας του ενζύμου στα ORLAP και ORWy-2, μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη υδροφοβικότητα των αργίλων αυτών σε σχέση με τους αντίστοιχους απλούς (LAP, SWy-2). Πρόσφατα ανακοινώθηκε ότι οι υδρόφοβοι φορείς ακινητοποίησης οδηγούν σε αύξηση του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας του ενζύμου, το οποίο οδηγεί σε αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα του βιοκαταλύτη [Mena *et al.*, 2008]. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός με τον οποίο οι υδρόφοβοι φορείς αυξάνουν το ποσοστό της  $\alpha$ -έλικας της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης είναι ακόμη υπό διερεύνηση.

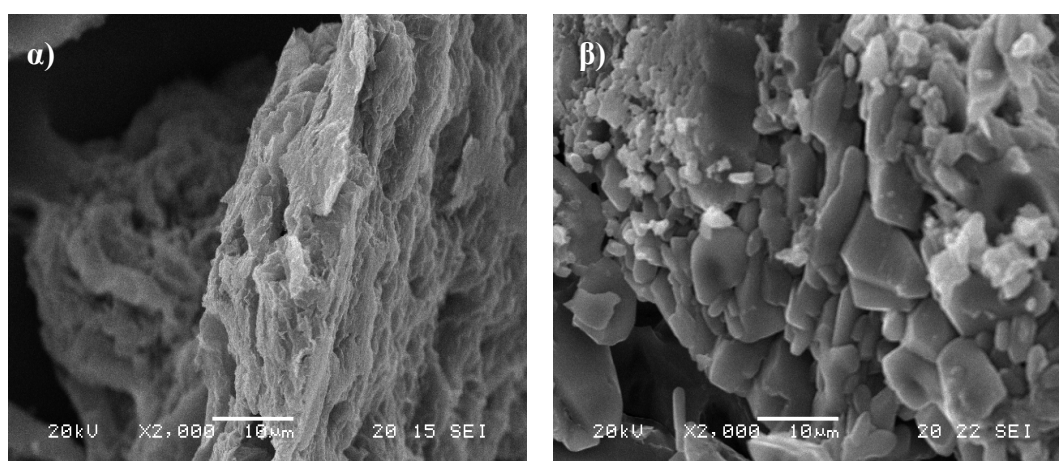
Επιπλέον οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στο ποσοστό των  $\beta$ -πτυχωτών επιφανειών, θα μπορούσαν να αποδοθούν στους διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου που προκαλούνται από τις αλληλοεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης [Vecchio *et al.*, 1999]. Οι αλληλοεπιδράσεις αυτές πιθανόν να οφείλονται στην διαστρωματική προσρόφηση του ενζύμου (π.χ. όταν ένα ενζυμικό μόριο προσροφάται πάνω σε ένα άλλο ήδη προσροφημένο ένζυμο).

Αντίθετη εικόνα διαπιστώθηκε κατά την ακινητοποίηση της CaLB σε ORKUN και σε LAP, KUN, SWy-2. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού του τυχαίου σπειράματος, το οποίο σημαίνει ότι η λιπάση στους φορείς αυτούς υιοθετεί μια πιο οργανωμένη και άκαμπτη δομή. Η διαφορά αυτές μπορούν να αποδοθούν σε διάφορους παράγοντες όπως στη διαφορετική θέση ακινητοποίησης του ενζύμου (εξωτερικά του αργίλου, στις κορυφές των φυλλιδίων ή στον ενδοστρωματικό χώρο), στο διαφορετικό ποσοστό του ενζύμου που προσροφάται εξωτερικά του αργίλου και στις αλληλοεπιδράσεις του ενζύμου με τον φορέα ακινητοποίησης και με το επιφανειοενεργό μόριο των οργανοτροποποιημένων αργίλων. Γενικά η αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου επηρεάζει την καταλυτική του συμπεριφορά του, κάτι το οποίο μπορεί να συσχετίζεται με τις διαφοροποιήσεις στην δομή του. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σχεδόν σε όλους του φορείς

ακινητοποίησης το ποσοστό του τυχαίου σπειράματος της CaLB είναι χαμηλό σε σχέση με αυτό που παρατηρείται όταν το ένζυμο είναι σε υδατικό διάλυμα. Το χαμηλό ποσοστό του τυχαίου σπειράματος δείχνει ότι δεν παρατηρείται αποδιάταξη της CaLB κατά την ακινητοποίηση της. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων δραστηριότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης, από τα οποία διαπιστώνεται αυξημένη δραστηριότητα και σταθερότητα.

#### **7.7.1.5 Χαρακτηρισμός με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)**

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλα τα πεδία που ενδιαφέρει η γεωμετρία και η σύσταση της μικροδομής. Η ευρεία χρήση του έγκειται στη μεγάλη δυνατότητα εστίασης, στην αλλαγή μεγέθυνσης σε ένα ευρύ πεδίο και στην ελάχιστη προετοιμασία του δείγματος. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORWy-2) πριν και μετά την ακινητοποίηση της CaLB με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Στο Σχήμα 7.41 παρουσιάζονται οι εικόνες από τον οργανοτροποποιημένο άργιλο ORKUN πριν και μετά την ακινητοποίηση της CaLB (συγκέντρωση πρωτεΐνης: 200mg/g αργίλου).



**Σχήμα 7.41.** Εικόνες SEM για τον α) άργιλο ORKUN και για τον β) βιοκαταλύτη ORKUN-200.

Από τις παραπάνω εικόνες διαπιστώνεται ότι η μορφολογία του αργίλου αλλάζει μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου. Η νέα μορφολογία που αποκτήθηκε αποδίδεται στην ένθεση του ενζύμου στο φορέα της ακινητοποίησης. Παρόμοια εικόνα παρατηρήθηκε και για τον ORLAP και ORWy-2 μετά την προσρόφηση της CaLB. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε

συμφωνία με αυτά που ανακοινώθηκαν κατά την ακινητοποίηση λιπάσης [de Fuentes *et al.*, 2001], ιμβερτάσης,  $\alpha$ -αμυλάσης και γλυκοαμυλάσης [Gopinath and Sugunan, 2007] σε μοντμοριλλονίτη.

### **7.7.2 Καταλυτικά χαρακτηριστικά δραστηριότητα ακινητοποιημένης CaLB**

#### **7.7.2.1 Δραστηριότητα ακινητοποιημένης CaLB**

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως, με στόχο την μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων της ακινητοποιημένης CaLB τόσο σε απλούς (KUN, SWy-2, LAP) όσο και σε οργανοτροποποιημένους αργίλους (ORKUN, ORSWy-2, ORLAP) μελετήθηκε η ενζυμική αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε εξάνιο. Με βάση τον Πίνακα 7.18 παρατηρείται ότι η ακινητοποίηση της λιπάσης σε διάφορους αργίλους, οδήγησε στη σύνθεση ενεργών βιοκαταλυτών, με ποσοστό φόρτωσης πρωτεΐνης που κυμαίνεται από 20-200 mg πρωτεΐνης ανά g φορέα. Γενικά αξίζει να σημειωθεί ότι το ποσοστό φόρτωσης του ενζύμου στον άργιλο, επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα του βιοκαταλύτη. Στην περίπτωση των LAP, KUN, SWy-2, παρατηρείται ότι καθώς αυξάνει το ποσοστό του ενζύμου στον φορέα, η ειδική ενεργότητα της CaLB μειώνεται ελαφρώς. Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και από άλλες ακινητοποιημένες λιπάσες όπως π.χ. *Rhizomucor miehei*, *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia* σε αργίλους κατά την κατάλυση παρόμοιων αντιδράσεων [de Fuentes *et al.*, 2001; Secundo *et al.*, 2008]. Η χαμηλότερη ενζυμική δραστηριότητα που παρατηρείται κατά την αύξηση του ποσοστού φόρτωσης του ενζύμου, πιθανώς να οφείλεται σε προβλήματα διάχυσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Από την άλλη πλευρά, η χρήση οργανοτροποποιημένων αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) ως φορείς ακινητοποίησης, οδήγησε στην σύνθεση βιοκαταλυτών με υψηλότερη ειδική ενεργότητα. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η διαμόρφωση και η καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, ειδικά σε οργανικά μέσα, εξαρτάται από τον βαθμό ενυδάτωσης και επιπλέον από την κατανομή του νερού μεταξύ του οργανικού διαλύτη και του ενζυμικού μορίου [Carrea *et al.*, 2000]. Ο υδροφοβικός/υδροφιλικός χαρακτήρας του φορέα ακινητοποίησης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο διαθέσιμο νερό που υπάρχει στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου, επηρεάζοντας την κατανομή των υποστρωμάτων και των προϊόντων μεταξύ του μέσου και του ενζύμου [Petkar

*et al.*, 2006]. Γενικά οι υδρόφιλοι άργιλοι (KUN, LAP, SWy-2) αναμένεται να εγκλωβίζουν περισσότερο νερό στο μικροπεριβάλλον της λιπάσης, ευνοώντας τις αντιδράσεις υδρόλυσης και όχι σύνθεσης. Αντίθετα το υδρόφοβο μικροπεριβάλλον που δημιουργείται γύρω από το ένζυμο στους οργανοτροποποιημένους άργιλους αναμένεται να διευκολύνει την διάχυση των υδρόφοβων υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου, οδηγώντας σε υψηλότερες ταχύτητες μετεστεροποίησης.

Επιπλέον με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης του ακινητοποιημένου ενζύμου, στους οργανοτροποποιημένους άργιλους, παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η υψηλότερη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης CaLB τόσο σε απλούς όσο και σε οργανοτροποποιημένους άργιλους παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις όπου η CaLB είχε το μεγαλύτερο ποσοστό  $\alpha$ -έλικας και το χαμηλότερο ποσοστό τυχαίου σπειράματος (όπως διαπιστώνεται από τον Πίνακα 7.22). Η αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου στους οργανοτροποποιημένους άργιλους μπορεί να αποδοθεί στις αλλαγές διάταξης της δευτεροταγούς δομής του πρωτεϊνικού μορίου, οι οποίες προφανώς επηρεάζουν την καταλυτική δράση του ενζύμου [Menaar *et al.*, 2008].

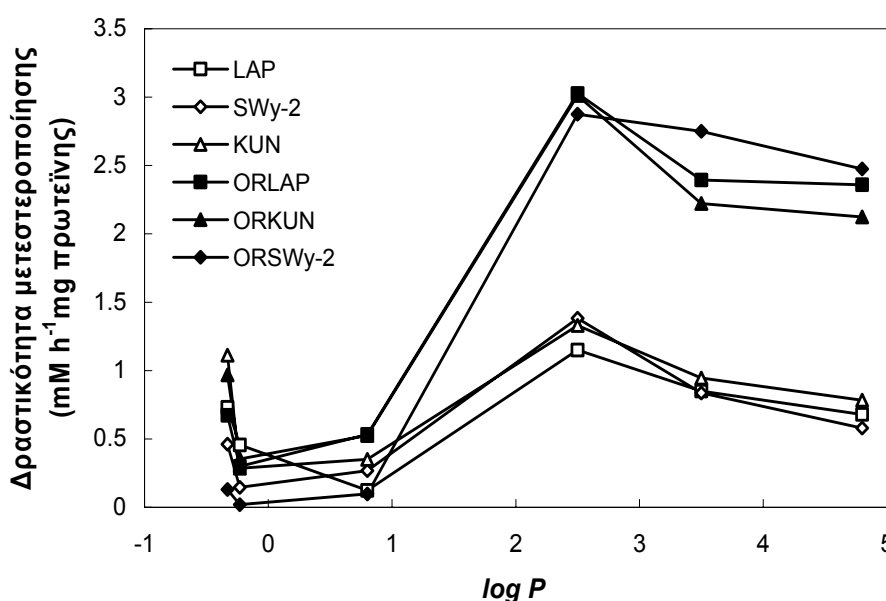
#### **7.7.2.2 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη**

Μετά τη μελέτη της επίδρασης της φύσης του φορέα ακινητοποίησης και του ποσοστού φόρτωσης του ενζύμου στον άργιλο, κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη των αντιδράσεων μετεστεροποίησης σε διαφορετικούς διαλύτες. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης της φύσης του οργανικού διαλύτη στην καταλυτική δράση της ακινητοποιημένης CaLB.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 6 οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας: υψηλής πολικότητας (ακετονιτρίλιο, ακετόνη, τριτοταγή βουτανόλη με  $\log P$  -0.33, -0.23 και 0.8 αντίστοιχα), μέσης πολικότητας (τολουόλιο με  $\log P$  2.5) και χαμηλής πολικότητας (εξάνιο και ισοοκτάνιο με  $\log P$  3.5 και 4.8 αντίστοιχα). Το  $\log P$  εκφράζει το λόγο καταμερισμού του διαλύτη σε σύστημα οκτανόλης-1/νερού, όπου διαλύτες με  $\log P < 2$  θεωρούνται πολικοί, ενώ όταν το  $\log P$  είναι μεγαλύτερο από 4 οι διαλύτες θεωρούνται άπολοι. Διαλύτες με  $2 < \log P < 4$  θεωρούνται ενδιάμεσης πολικότητας [Laane *et al.*, 1987]. Όλοι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (εξάνιο, τολουόλιο, ισοοκτάνιο, ακετόνη, ακετονιτρίλιο και τριτοταγή βουτανόλη) ήταν προαφυδατωμένοι με τη χρήση μοριακών κόσκινων διαμέτρου 3 Å. Η πορεία των αντιδράσεων μελετήθηκε σε διάστημα 24h. Στο Σχήμα 7.42 παρουσιάζεται η δραστηριότητα μετεστεροποίησης της

ακίνητοποιημένης CaLB (σε απλούς και οργανοτροποποιημένους αργίλους) στους διάφορους οργανικούς διαλύτες. Όπως παρουσιάζεται και στο Σχήμα 7.42 η ακίνητοποιημένη λιπάση στους οργανοτροποποιημένους αργίλους επέδειξε μεγαλύτερη καταλυτική δραστικότητα σε σχέση με την ακίνητοποιημένη CaLB στους απλούς αργίλους, σε όλες τις περιπτώσεις των οργανικών διαλυτών. Η εικόνα αυτή επιβεβαιώνει τα συμπεράσματα της προηγούμενης παραγράφου ότι οι υδρόφοβοι φορείς ακινητοποίησης ευνοούν την κατάλυση αντιδράσεων σύνθεσης.

Όσον αφορά την υδροφοβικότητα των οργανικών διαλυτών παρατηρήθηκε ότι υψηλότεροι ρυθμοί αντίδρασης παρατηρήθηκαν στους διαλύτες με υψηλή τιμή  $\log P$  ( $\log P > 2.5$ ) όπως π.χ. στο τολουόλιο, στο εξάνιο και στο ισοοκτάνιο. Γενικά οι διαλύτες αυτοί λόγω ότι έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό δεν αποσπούν μόρια νερού από το μικροπεριβάλλον του ενζύμου, με αποτέλεσμα το ένζυμο να βρίσκεται στην ενεργή του διαμόρφωση [Laane *et al*, 1987].



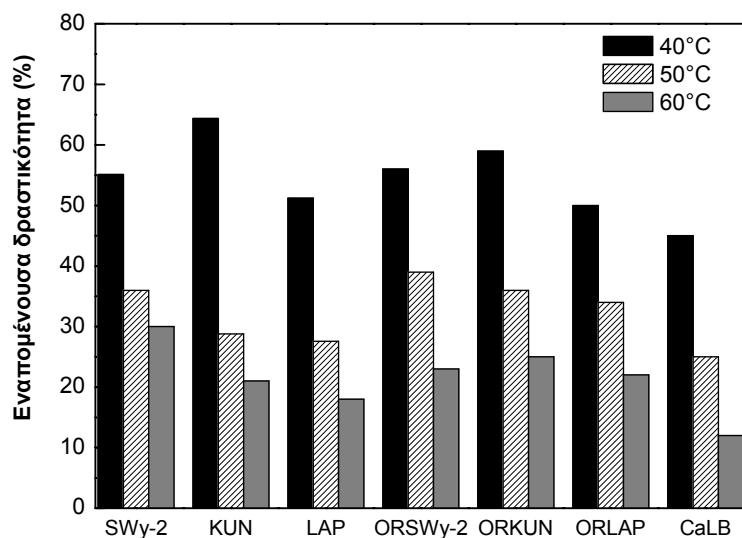
**Σχήμα 7.42.** Επίδραση της υδροφοβικότητας των οργανικών διαλυτών στη δραστικότητα μετεστεροποίησης της ακίνητοποιημένης CaLB σε απλούς και οργανοτροποποιημένους αργίλους. *Συνθήκες αντίδρασης:* βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος: 50mM, 1-βουτανόλη: 50mM, CaLB: 20mg (100mg πρωτεΐνης/g αργίλου).

Αντίθετα χαμηλότερη καταλυτική δραστικότητα παρουσίασε η ακίνητοποιημένη CaLB στους υδρόφιλους οργανικούς διαλύτες ( $\log P > 2.5$ ) όπως π.χ. στο ακετονιτρίλιο, στην

ακετόνη και στην τριτοταγή βουτανόλη. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι οι διαλύτες αυτοί έχουν την τάση να αποσπούν νερό από τα ενζυμικά μόρια, το οποίο είναι απαραίτητο για την καταλυτική τους δράση. [Yadav and Lathi, 2004]. Παρόμοια εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας από τις τιμές του  $\log P$  του οργανικού διαλύτη παρατηρήθηκε επίσης και σε άλλες ακινητοποιημένες λιπάσες [Mustranta, 1992; Silva and Jesus, 2003].

### 7.7.2.3 Μελέτη θερμοσταθερότητας της ακινητοποιημένης CaLB

Τέλος κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη θερμοσταθερότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* και στους έξι φορείς ακινητοποίησης κατά την επώαση της σε εξάνιο για 0 έως 72h σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 40-60°C, πριν τη χρήση της σε αντίδραση μετεστεροποίησης του βινυλεστέρα του βουτυρικού οξέος με την 1-βουτανόλη. Το ποσοστό φόρτωσης του ενζύμου στον κάθε φορέα ήταν ίσο με 100 mg πρωτεΐνης ανα g φορέα. Επίσης μελετήθηκε η σταθερότητα της λυοφιλιωμένης CaLB, με σκοπό την σύγκριση της με τη σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Στο Σχήμα 7.43 παρουσιάζεται η εναπομένουσα δραστηριότητα της ελεύθερης (CaLB) και της ακινητοποιημένης λιπάσης μετά από 72h επώασης σε εξάνιο στους 40°C, 50°C και 60°C.



**Σχήμα 7.43.** Εναπομένουσα δραστηριότητα της ακινητοποιημένης και της λυοφιλιωμένης CaLB μετά την επώαση της σε εξάνιο για 72h σε διάφορες θερμοκρασίες (40-60°C).

Όπως διαπιστώνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης επηρεάζει την σταθερότητα της ακινητοποιημένης αλλά και της ελεύθερης λιπάσης

μειώνεται. Πιο συγκεκριμένα η αύξηση της θερμοκρασίας επώασης οδηγεί σε μικρότερα ποσοστά εναπομένουσας δραστηριότητας του ενζύμου. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την επώαση των ενζύμων για 24h σε ανάλογες συνθήκες. Επίσης η ακινητοποιημένη λιπάση (ιδιαίτερα σε οργανοτροποποιημένους αργίλους) επιδεικνύει μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με την λυοφιλιωμένη. Η υψηλή σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης στους οργανικά τροποποιημένους αργίλους είναι αποτέλεσμα της νέας διαμόρφωσης που έχει αποκτήσει το ένζυμο στη δευτεροταγή δομή του μετά την προσρόφηση στους υδρόφοβους φορείς (όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.7.1.4 ).

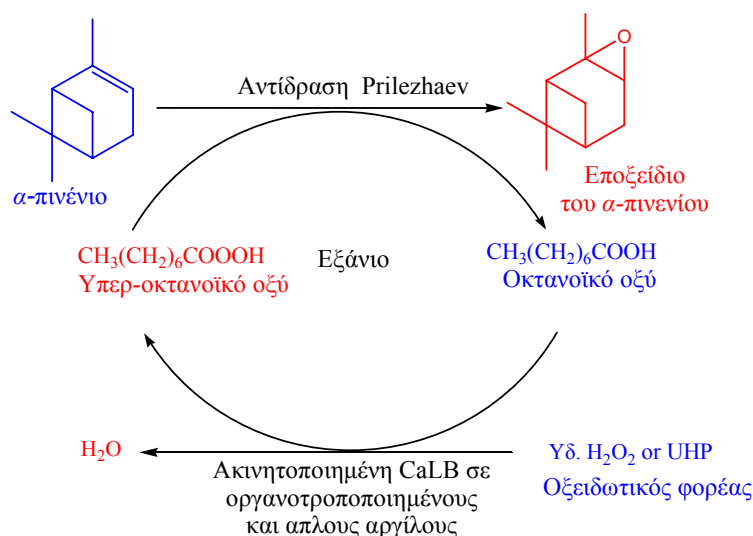
### 7.7.3 Χημειοενζυμική εποξειδωση τερπενίων και μαστιχελαίου

Η βιοκαταλυτική τροποποίηση του μαστιχελαίου και των βασικών συστατικών του (όπως π.χ. του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου) εξετάστηκε σε ένα τριφασικό σύστημα. Στο σύστημα αυτό αρχικά μέσω της ενδιάμεσης ενζυμικής δράσης, σχηματίζεται υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ από ελεύθερο λιπαρό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου, ενώ στη συνέχεια, μέσω της χημικής αντίδρασης Prilezhaev, το υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ αντιδρά με το αλκένιο με αποτέλεσμα τη σύνθεση του εποξειδίου [Skouridou *et al.*, 2003b,c]. Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης ελεύθερων λιπασών στο παραπάνω σύστημα είναι η χαμηλή σταθερότητα του ενζύμου στις δραστηκές συνθήκες της αντίδρασης που οφείλονται στην χρήση του οξειδωτικού φορέα [Yadav and Devi, 2002; Carboni-Oerlemans *et al.*, 2006; Svedendahl *et al.*, 2008] και στην σύνθεση του υπεροξυ-καρβοξυλικού οξέος [Kramer *et al.*, 1994]. Με στόχο την σταθεροποίηση του ενζύμου στις συνθήκες της αντίδρασης, η ελεύθερη CaLB ακινητοποιήθηκε σε απλούς ή οργανοτροποποιημένους αργίλους και στη συνέχεια μελετήθηκε η δράση της στην χημειοενζυμική σύνθεση των εποξειδίων των μονοτερπενίων.

Όπως ειπώθηκε και προηγουμένως η σύνθεση των εποξειδίων του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου πραγματοποιήθηκε μέσω ενζυμικής οξειδωσης των αντίστοιχων τερπενίων σε ένα τριφασικό σύστημα. Το τριφασικό αυτό σύστημα συνίσταται από την οργανική φάση, δηλαδή το διαλύτη (εξάνιο) και τα υδρόφοβα υποστρώματα που διαλύονται σε αυτόν ( $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο, οκτανοϊκό οξύ και τα προϊόντα των δύο αντιδράσεων), την υδατική φάση (το υδατικό διάλυμα του υπεροξειδίου του υδρογόνου όπως και το νερό που απελευθερώνεται ως προϊόν) και τη στερεή φάση, δηλαδή το ακινητοποιημένο ένζυμο (Σχήματα 7.44 και 7.45).

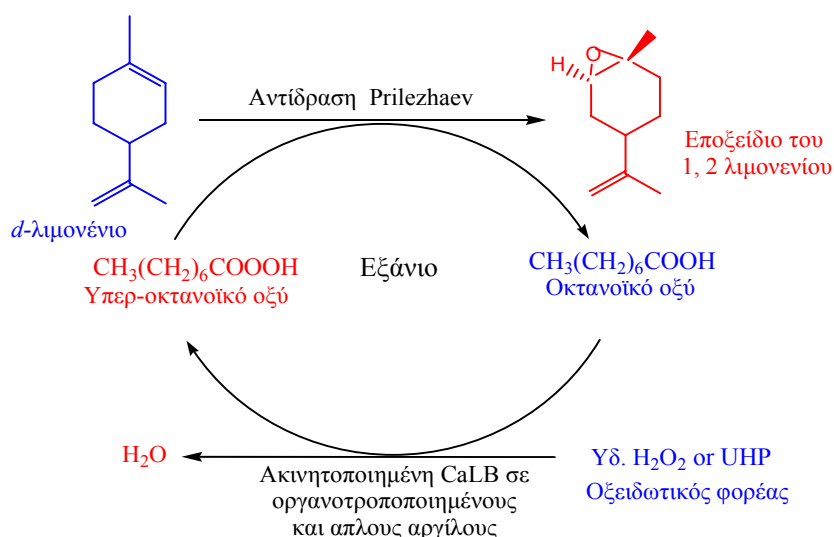
Εκτός από το υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (30% κ.ο), εξετάστηκε και η χρησιμοποίηση είτε του τριτοταγούς βουτυλ-υπεροξειδίου του υδρογόνου (*t*-BHP) σε

δεκάνιο (5.0-6.0 mM, t-BHP<sub>d</sub>) είτε του άνυδρου συμπλόκου υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ουρία (UHP), το οποίο απελευθερώνει H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> με ελεγχόμενο τρόπο [Taliensky, 2005; Ankudey *et al.*, 2005].



**Σχήμα 7.44.** Χημειο-ενζυμική σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου. Με μπλε και κόκκινο χρώμα συμβολίζονται τα υποστρώματα και τα προϊόντα της αντίδρασης, αντίστοιχα.

Η πορεία της αντίδρασης αρχικά περιλαμβάνει την ενζυμική σύνθεση του υπεροξυ-καρβοξυλικού οξέος (σε αυτήν την περίπτωση του υπερ-οκτανοϊκού οξέος) από το οκτανοϊκό οξύ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου με την χρήση της ακίνητοποιημένης CaLB. Στη συνέχεια, μέσω της χημικής αντίδρασης Prilezhaev, το σχηματιζόμενο υπεροξύ αντιδρά επί τόπου με το αλκένιο, δηλαδή το  $\alpha$ -πινένιο, με αποτέλεσμα τη σύνθεση του επιθυμητού προϊόντος, του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης παρατηρήθηκε και η σύνθεση δύο άλλων οξυγονωμένων παραγώγων του  $\alpha$ -πινενίου, της βερμπενόλης και της βερμπενόνης, τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω GC-MS. Σε παρόμοιο τριφασικό σύστημα μελετήθηκε και η σύνθεση του 1,2 εποξειδίου του λιμονενίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης του *d*-λιμονενίου. Και στην περίπτωση αυτή παράχθηκαν πλήθος οξυγονωμένων παραγώγων του *d*-λιμονενίου.



**Σχήμα 7.45.** Χημειο-ενζυμική σύνθεση του εποξειδίου του *d*-λιμονενίου. Με μπλε και κόκκινο χρώμα συμβολίζονται τα υποστρώματα και τα προϊόντα της αντίδρασης, αντίστοιχα.

Για να κατανοηθεί καλύτερα η δράση της ακίνητοποιημένης λιπάσης σε ένα τέτοιο σύστημα με τελικό στόχο το σχεδιασμό μιας βέλτιστης διαδικασίας σύνθεσης υπεροξέων και εποξειδίων σε μεγάλη κλίμακα, μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων στη σύνθεση του τελικού προϊόντος.

#### 7.7.3.1 Επίδραση της φύσης και του ρυθμού προσθήκης του οξειδωτικού φορέα

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στη χημειο-ενζυμική εποξείδωση των αλκενίων αναμένεται να είναι η φύση και ο ρυθμός προσθήκης του οξειδωτικού φορέα στο μίγμα αντίδρασης, λόγω του οξειδωτικού του χαρακτήρα και τις πιθανές του επιπτώσεις στην καταλυτική δράση του ενζύμου [Bjorkling *et al.*, 1990, 1992; Skouridou *et al.*, 2003b,c]. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της επίδρασης της φύσης και του ρυθμού προσθήκης του οξειδωτικού φορέα κατά τη σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου. Προς την κατεύθυνση αυτή εξεταστήκαν τρεις διαφορετικοί οξειδωτικοί φορείς: α) υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (30% κ.ο), β) τριτοταγές βουτυλ-υπεροξείδιο του υδρογόνου (t-BHP) σε δεκάνιο και γ) το σύμπλοκο υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ουρία (UHP).

Η προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου έγινε είτε άμεσα είτε σε μικρές δόσεις, σε διάστημα 8h. Αντίστοιχα και το τριτοταγές βουτυλ-υπεροξείδιο του υδρογόνου (t-BHP) σε δεκάνιο προστέθηκε στο μίγμα αντίδρασης σε μικρές δόσεις, σε διάστημα 4h. Τέλος το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ουρία (UHP) προστέθηκε από την αρχή στο μίγμα αντίδρασης

καθώς το υπεροξειδίο του υδρογόνου απελευθερώνεται σταδιακά από το σύμπλοκο. Και στις τρεις περιπτώσεις οι τελικές συγκεντρώσεις ήταν ίσες με 1.1mmol. Στον Πίνακα 7.23 παρουσιάζεται η μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου στο αντίστοιχο εποξειδίο του από την ακινητοποιημένη λιπάση σε οργανοτροποποιημένους αργίλους μετά από 24 h ώρες αντίδρασης σε θερμοκρασία δωματίου χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό φορέα είτε υδατικό διάλυμα  $H_2O_2$  είτε UHP.

**Πίνακας 7.23.** Επίδραση της φύσης και του ρυθμού προσθήκης του οξειδωτικού φορέα κατά την χημειοενζυμική εποξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου. *Συνθήκες αντίδρασης:* 1 mmol  $\alpha$ -πινενίου, 1 mmol οκτανοϊκού οξέος, 50 mg ακινητοποιημένης λιπάσης (100mg/g), 1.1 mmol  $H_2O_2$  ή 1.1 mmol UHP. Οι συγκεντρώσεις και τα ποσοστά μετατροπής υπολογίστηκαν μετά από 24h αντίδρασης.

| Φορείς | (Ποσοστά μετατροπής του $\alpha$ -πινενίου (%))    |                                         |                    |
|--------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
|        | Συγκέντρωση εποξειδίου του $\alpha$ -πινενίου (mM) |                                         |                    |
|        | $H_2O_2$<br>[απευθείας]                            | $H_2O_2$<br>[προστέθηκε σε διάστημα 8h] | UHP<br>[απευθείας] |
| ORLAP  | (17.8) 121.8                                       | (23.3) 160                              | (79.0) 450         |
| ORKUN  | (14.0) 95.8                                        | (20.4) 140                              | (61.0) 336         |
| ORSWy  | (14.3) 98.0                                        | (22.0) 148                              | (63.1) 348         |

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ως οξειδωτικός φορέας το τριτοταγές βουτυλ-υπεροξειδίο του υδρογόνου, η αντίδραση σύνθεσης του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου δεν πραγματοποιήθηκε. Αυτό πιθανώς να οφείλεται σε φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης, καθώς λόγω του μεγάλου μεγέθους του τριτοταγούς βουτυλ-υπεροξειδίου του υδρογόνου, ο οξειδωτικός φορέας δεν είναι δυνατόν να προσεγγίσει το ενεργό κέντρο της ακινητοποιημένης CaLB.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, ο ταχύς εμπλουτισμός του συστήματος σε υπεροξειδίο του υδρογόνου προάγει την απενεργοποίηση της λιπάσης με αποτέλεσμα να παρατηρούνται χαμηλότερες μετατροπές του  $\alpha$ -πινενίου. Πράγματι σε παρόμοιες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η λιπάση δεν είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στις τόσο δραστικές συνθήκες της αντίδρασης που οφείλονται στη χρήση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της παρουσίας των υπέρ-καρβοξυλικών οξέων σε μεγάλες συγκεντρώσεις [Yadav and Devi, 2002 and Carboni-

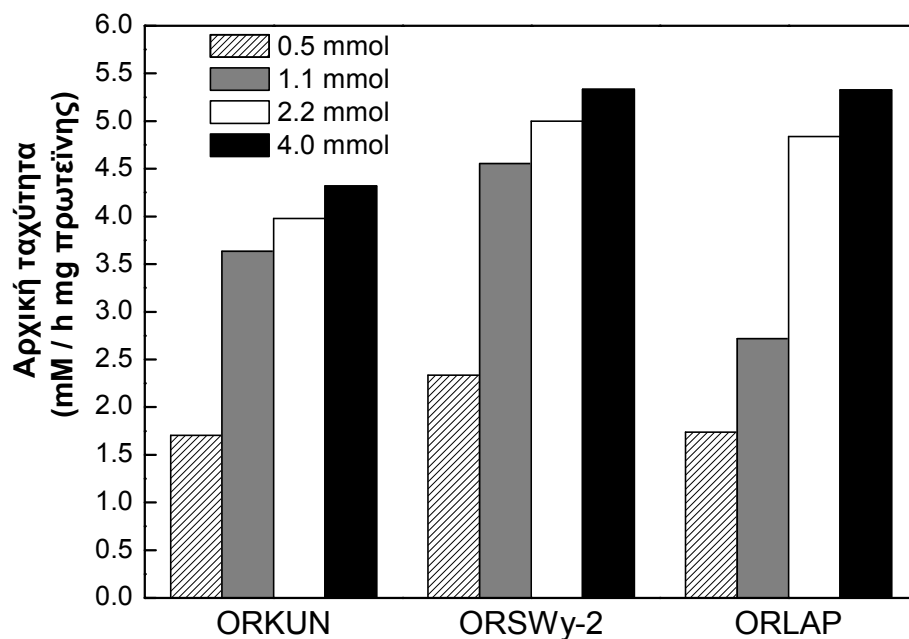
Oerlemans *et al.*, 2006]. Έχει διαπιστωθεί ότι το  $\text{H}_2\text{O}_2$  οξειδώνει κάποια κατάλοιπα αμινοξέων (όπως π.χ. μεθειονίνη, ιστιδίνη, τρυπτοφάνη, κυστεΐνη, και τυροσίνη) της CaLB, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η πρωτεϊνική διαμόρφωση και κατ'επέκταση η ενζυμική δραστηριότητα [Davies, 2005; Tornvall *et al.*, 2007].

Αντίθετα η αργή προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μίγμα της αντίδρασης (σε πέντε δόσεις σε διάστημα 8h) οδήγησε σε υψηλότερες μετατροπές του  $\alpha$ -πινενίου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που ανακοινώθηκαν για τη δράση ακινητοποιημένων λιπασών σε παρόμοια συστήματα [Bjorkling *et al.*, 1992; Skouridou *et al.*, 2003b,c; Corellana-Coca *et al.*, 2005] και υποδεικνύουν πως η αργή προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μίγμα αντίδρασης, προάγει τη σύνθεση του  $\alpha$ -πινενίου καθώς δεν οδηγεί σε αδρανοποίηση του ενζύμου.

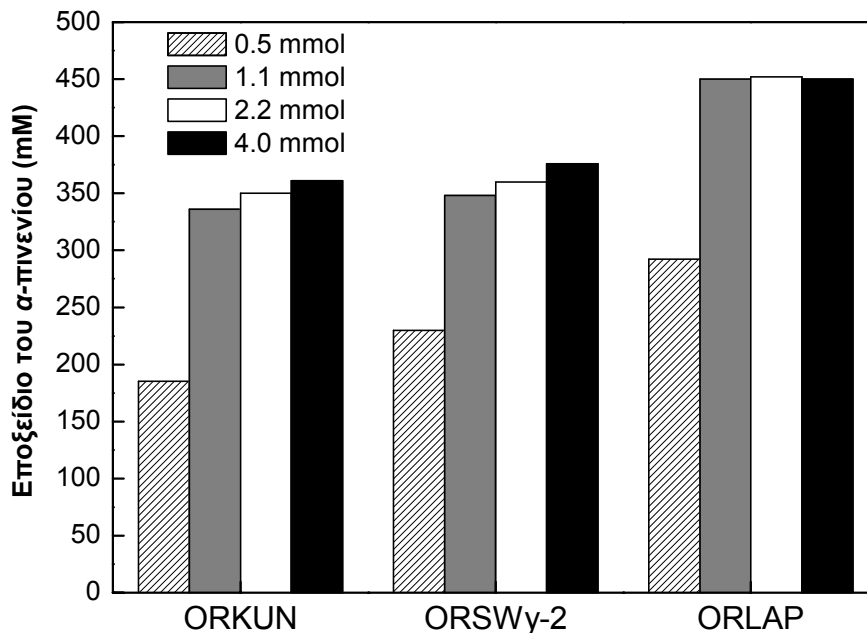
Τέλος όπως διαπιστώνεται από τις τιμές του πίνακα η χρήση του UHP οδήγησε σε μεγαλύτερη μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου (μέχρι και 79% μετά από 24h αντίδρασης με την χρήση της ακινητοποιημένης CaLB σε ORLAP) σε σύγκριση με την μετατροπή που επιτεύχθηκε με το  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία με αυτό που πρόσφατα ανακοινώθηκε από τον Ankudey και τους συνεργάτες του (2006) κατά την χημειοενζυμική υπερυδρόλυση καρβοξυλικών οξέων σε οργανικά μέσα με την χρήση της Novozym 435<sup>®</sup> και του UHP [Ankudey *et al.*, 2005]. Γενικά η χρήση του UHP πλεονεκτεί διότι το  $\text{H}_2\text{O}_2$  απελευθερώνεται από την ουρία σταδιακά, με αποτέλεσμα να μην απενεργοποιείται γρήγορα η ακινητοποιημένη λιπάση. Έτσι με σκοπό να προαχθεί η σύνθεση των αντίστοιχων εποξειδίων αλλά και να διατηρηθεί η καταλυτική ενεργότητα της λιπάσης, η χημειο-ενζυμική εποξειδωση των τερπενίων μελετήθηκε στη συνέχεια με την χρήση του UHP ως οξειδωτικού φορέα.

#### 7.7.3.2 Επίδραση της συγκέντρωσης του UHP

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του UHP στην σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου χρησιμοποιώντας 0.5, 1.1, 2.2 και 4 mmol UHP. Το UHP σε όλες τις περιπτώσεις προστέθηκε στην αρχή στο μίγμα της αντίδρασης. Στο Σχήμα 7.46 παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες εποξειδωσης του  $\alpha$ -πινενίου με βάση την σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, ενώ στο Σχήμα 7.47 παρουσιάζεται οι τελικές συγκεντρώσεις του εποξειδίου



**Σχήμα 7.46.** Επίδραση της συγκέντρωσης του UHP στην αρχική ταχύτητα εποξειδωσης του  $\alpha$ -πινενίου, που καταλύεται από την CaLB ακινητοποιημένη στους ORLAP, ORKUN και ORSWy-2. Συνθήκες αντίδρασης: 1 mmol  $\alpha$ -πινενίου, 1 mmol οκτανοϊκό οξύ, 50 mg ακινητοποιημένης CaLB (100mg/g), 0.5-4.0 mmol UHP.

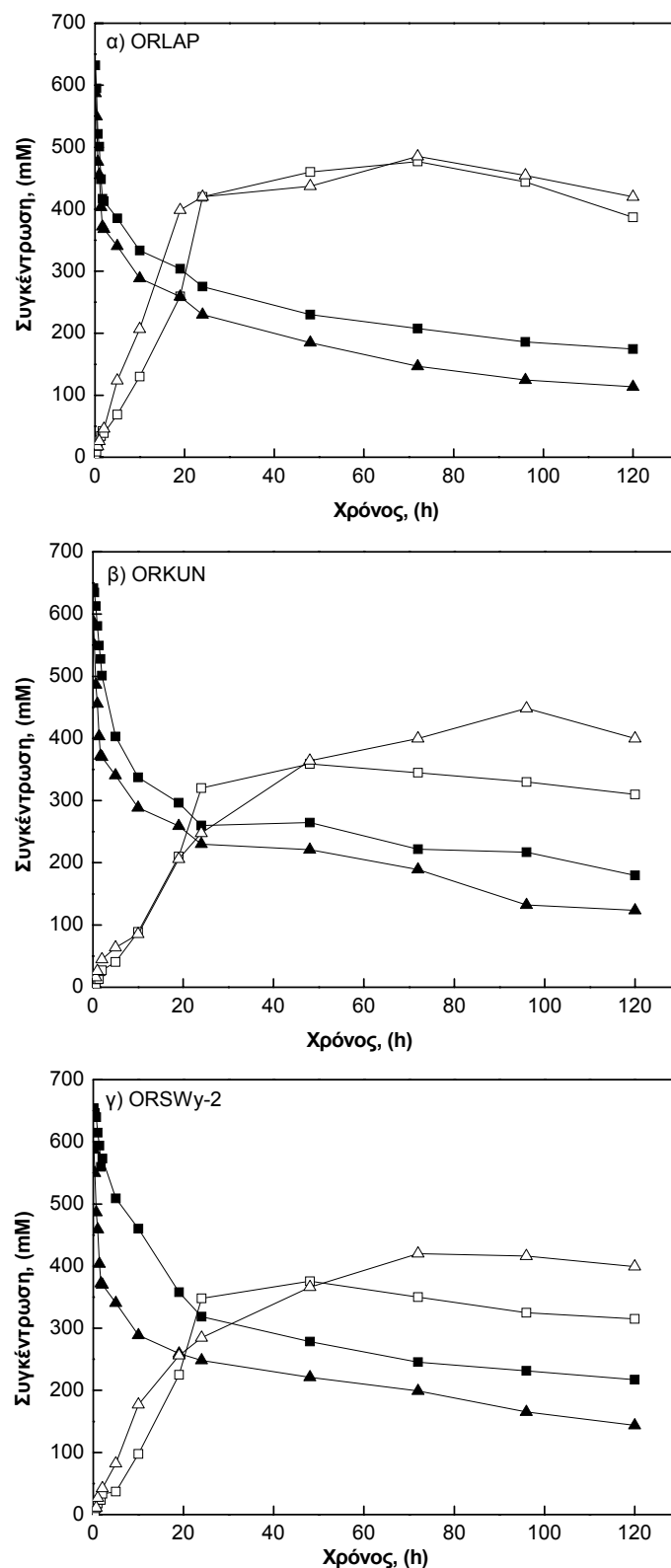


**Σχήμα 7.47.** Επίδραση της συγκέντρωσης του UHP στην συγκέντρωση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, που καταλύεται από την CaLB όντας ακινητοποιημένη στους ORLAP, ORKUN και ORSWy-2. Συνθήκες αντίδρασης: 1 mmol  $\alpha$ -πινενίου, 1 mmol οκτανοϊκό οξύ, 50 mg ακινητοποιημένης CaLB (100mg/g), 0.5-4.0 mmol UHP.

Όπως διαπιστώνεται από το διάγραμμα του Σχήματος 7.46, οι αρχικές ταχύτητες οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου αυξάνουν με αύξηση της συγκέντρωσης του UHP σε όλες τις περιπτώσεις της ακινητοποιημένης λιπάσης. Ο ρυθμός παραγωγής του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου είναι υψηλός σε μεγάλες συγκεντρώσεις του UHP, καθώς το μίγμα της αντίδρασης εμπλουτίζεται γρήγορα με το  $H_2O_2$ , με αποτέλεσμα να συνθέτετε άμεσα το υπεροξυκαρβοξυλικό οξύ το οποίο στη συνέχεια μέσω της αντίδρασης Prilezhaev οξειδώνει το  $\alpha$ -πινένιο. Παρόλα αυτά η αύξηση της συγκέντρωσης του UHP πάνω από 1.1 mmol δεν επιδρά σημαντικά στην τελική συγκέντρωση του προϊόντος στις 24h όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.47.

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του UHP σε σύστημα χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης αλκενίων με την χρήση λιπάσης [Ankudey *et al.*, 2006]. Έτσι προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή αδρανοποίηση του ενζύμου ως αποτέλεσμα της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης  $H_2O_2$ , η εποξείδωση των τερπενίων μελετήθηκε στη συνέχεια με την χρήση 1.1 mmol UHP.

Στο Σχήμα 7.48.α-γ που ακολουθεί, παρουσιάζεται η πορεία των αντιδράσεων οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου από την ακινητοποιημένη λιπάση στους οργανόφιλους αργίλους, χρησιμοποιώντας UHP 1.1 mmol. Από τα διαγράμματα που ακολουθούν, παρατηρείται ότι ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης και στις τρεις περιπτώσεις (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100) κατέλυσε την χημειο-ενζυμική εποξείδωση τόσο του  $\alpha$ -πινενίου όσο και του  $d$ -λιμονενίου. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από το κύριο προϊόν (εποξείδιο) της αντίδρασης, παράχθηκαν επίσης και αλλά οξυγονωμένα παράγωγα όπως η βερμπενόλη και η βερμπενόλη στην περίπτωση του  $\alpha$ -πινενίου και η καρβόνη και η καρβεόλη στην περίπτωση του  $d$ -λιμονενίου. Η ταυτοποίηση των οξυγονωμένων μονοτερπενίων έγινε με την χρήση τη HPLC και του GC-MS.



**Σχήμα 7.48.** Πορεία αντίδρασης κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου (■) ή του  $d$ -λιμονενίου (▲) στα αντίστοιχα εποξειδία (εποξειδίο του  $\alpha$ -πινενίου (□), εποξειδίο του  $d$ -λιμονενίου (Δ)) από την ακινητοποιημένη λιπάση στον α) ORLAP, β) ORKUN, γ) ORSWy-2. Συνθήκες αντίδρασης: 1 mmol τερπενίου, 1.1 mmol UHP.

Στον Πίνακα 7.24 παρουσιάζεται η αρχική ταχύτητα καθώς και η συγκέντρωση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μετά από 24 h αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αυτά παρατίθενται συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που αποκτήθηκαν κατά την χρήση της εμπορικά ακινητοποιημένης λιπάσης (Novozym 435<sup>®</sup>) και της λυοφιλιωμένης CaLB.

**Πίνακας 7.24.** Αρχικοί ρυθμοί οξείδωσης (mM/h) του  $\alpha$ -πινενίου, καθώς επίσης και συγκέντρωση του παραγόμενου εποξειδίου μετά από 24 h αντίδρασης. *Συνθήκες αντίδρασης:* 1 mmol  $\alpha$ -πινενίου, 1 mmol οκτανοϊκό οξύ, 1.1 mmol UHP. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην ακινητοποιημένη λιπάση ήταν 9.5 mg ενώ της λυοφιλιωμένης ήταν 1.2 mg.

| Βιοκαταλύτες             | Αρχική ταχύτητα<br>(mM / h mg<br>πρωτεΐνης) | Εποξείδιο του<br>$\alpha$ -πινενίου (mM) | Ποσοστό<br>μετατροπής του<br>$\alpha$ -πινενίου (%) |
|--------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| ORLAP                    | 2.7                                         | 453                                      | 80.3                                                |
| ORKUN                    | 3.6                                         | 360                                      | 65.5                                                |
| ORSWy-2                  | 4.5                                         | 359                                      | 65.0                                                |
| Novozym 435 <sup>®</sup> | 4.1                                         | 211                                      | 54.1                                                |
| Λυοφιλιωμένη CaLB        | 10.0                                        | 190                                      | 50.0                                                |

Όπως διαπιστώνεται από τις τιμές του παραπάνω πίνακα, οι αρχικές ταχύτητες που παρατηρήθηκαν από τους βιοκαταλύτες ORLAP-100, ORKUN-100 και ORSWy-2-100, ήταν συγκρίσιμες με αυτή που παρατηρήθηκε κατά την χρήση της Novozym 435<sup>®</sup>. Επιπλέον η χρήση των οργανοτροποποιημένων αργίλων (ιδιαίτερα του ORLAP), ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων, οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά μετατροπής του  $\alpha$ -πινενίου σε σχέση με την Novozym 435<sup>®</sup> ή το λυοφιλιωμένο ένζυμο. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στην μεγαλύτερη σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, καταδεικνύοντας ότι η φύση του φορέα επηρεάζει όχι μόνο την ενζυμική δραστηριότητα αλλά και την λειτουργική σταθερότητα του βιοκαταλύτη στη βιοκαταλυτική διεργασία. Πρέπει να σημειωθεί ότι η χαμηλή δραστηριότητα της Novozym 435<sup>®</sup>, πιθανώς να οφείλεται στη χαμηλή σταθερότητα του ενζύμου στο σύστημα της αντίδρασης. Γενικά σε παρόμοιες διεργασίες παρατηρήθηκε επίσης μειωμένη σταθερότητα της Novozym 435<sup>®</sup> και αποδόθηκε στην οξειδωτική δράση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> καθώς επίσης και στον απεγκλωβισμό του

ενζύμου από τον φορέα προς την υδατική φάση που σχηματίζεται κατά την διάρκεια της βιοκαταλυτικής διεργασίας [Orellana-Coca, 2005; Tornvall *et al.*, 2007]. Με σκοπό να διερευνηθεί εάν η απώλεια της δραστηριότητας των λιπασών, οφείλεται στον απεγκλωβισμό της λιπάσης από τους φορείς ακινητοποίησης, οι ακινητοποιημένες λιπάσες επώαστηκαν σε νερό και στη συνέχεια η υδατική φάση ελέγχθηκε για την ύπαρξη ενζυμικής δράσης. Μετά από επώαση 24h στους 25°C, παρατηρήθηκε ότι σε όλα τα υδατικά διαλύματα που είχαν επωαστεί οι υβριδικοί βιοκαταλύτες (ORLAP-100, ORKUN-100 και ORSWy-2-100) ανιχνεύτηκε ενζυμική δράση (μέχρι και 10% τη αρχικής), η οποία είναι παρόμοια με αυτή που διαπιστώθηκε για την Novozym 435<sup>®</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι η συμπεριφορά των βιοκαταλυτών που περιγράφεται στον Πίνακα 7.24, δεν μπορεί να αποδοθεί στον απεγκλωβισμό του ενζύμου από τον φορέα ακινητοποίησης.

Επίσης μελετήθηκε η συμπεριφορά των βιοκαταλυτών ORLAP-100, ORKUN-100 και ORSWy-2-100, συγκριτικά με την Novozym 435<sup>®</sup> και στην περίπτωση της χημειοενζυμικής εποξειδωσης του *d*-λιμονενίου. Στον Πίνακα 7.25 παρουσιάζεται η αρχική ταχύτητα καθώς και η συγκέντρωση του εποξειδίου του *d*-λιμονενίου μετά από 24 h αντίδρασης.

**Πίνακας 7.25.** Αρχικοί ρυθμοί οξειδωσης (mM/h) του *d*-λιμονενίου, καθώς επίσης και συγκέντρωση του παραγόμενου εποξειδίου μετά από 24 h αντίδρασης. *Συνθήκες αντίδρασης:* 1 mmol *d*-λιμονενίου, 1 mmol οκτανοϊκό οξύ, 1.1 mmol UHP. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην ακινητοποιημένη λιπάση ήταν 9.5 mg .

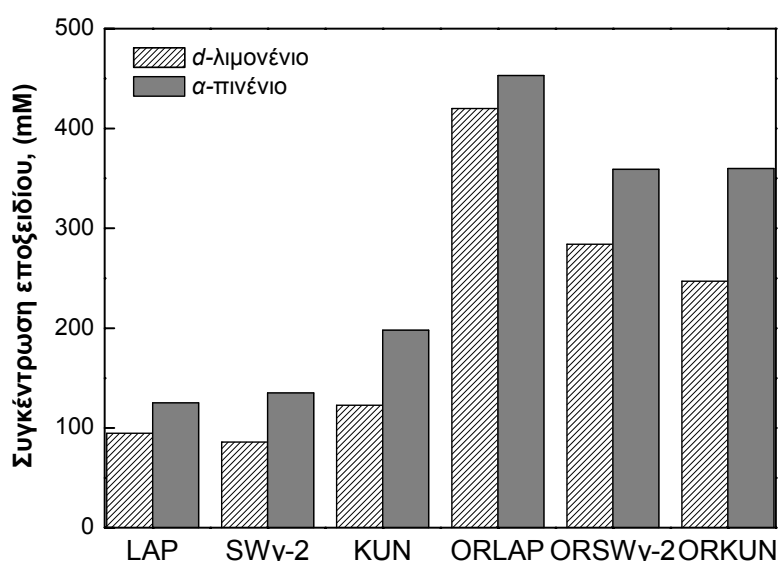
| Βιοκαταλύτες             | Αρχική ταχύτητα (mM / h<br>mg πρωτεΐνης) | Εποξείδιο του<br><i>d</i> -λιμονενίου (mM) |
|--------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| ORLAP                    | 4.89                                     | 420                                        |
| ORKUN                    | 3.52                                     | 247                                        |
| ORSWy                    | 3.77                                     | 284                                        |
| Novozym 435 <sup>®</sup> | 4.80                                     | 350                                        |

Όπως διαπιστώνεται από τον Πίνακα 7.25 παρόμοια συμπεριφορά με τη χημιο-ενζυμική εποξειδωση του  $\alpha$ -πινενίου, παρατηρείται και στην περίπτωση της χημιο-ενζυμικής εποξειδωσης του *d*-λιμονενίου. Πιο συγκεκριμένα οι αρχικές ταχύτητες των υβριδικών βιοκαταλυτών ήταν παρόμοιες με αυτή της Novozym 435<sup>®</sup>, ενώ η συγκέντρωση του τελικού προϊόντος ήταν μεγαλύτερη στις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε λιπάση ακινητοποιημένη

σε οργανοτροποποιημένους αργίλους (ειδικά σε ORLAP). Βάση όλων των παραπάνω συμπεραίνεται ότι η χρήση οργανοτροποποιημένων αργίλων, ως φορείς ακινητοποίησης για την λιπάση, οδηγεί στην σύνθεση υψηλών συγκεντρώσεων εποξειδίων.

### 7.7.3.3 Επίδραση του φορέα ακινητοποίησης

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στη χημειο-ενζυμική οξείδωση των αλκενίων αναμένεται να είναι ο φορέας ακινητοποίησης του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη και των έξι φορέων ακινητοποίησης της λιπάσης B από *Candida antarctica* (απλών και οργανοτροποποιημένων αργίλων) κατά τη χημειο-ενζυμική οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου. Στο Σχήμα 7.49 παρουσιάζεται η εξάρτηση της συγκέντρωσης του τελικού προϊόντος (σε 24 h αντίδρασης) από τον φορέα που βρίσκεται ακινητοποιημένος ο βιοκαταλύτης.



**Σχήμα 7.49.** Επίδραση του φορέα ακινητοποίησης κατά την αντίδραση σύνθεσης του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και του εποξειδίου του  $d$ -λιμονενίου. Συνθήκες αντίδρασης: 1mmol τερπενίου, 1mmol οκτανοϊκό οξύ, CaLB: 50mg (100mg/g), UHP:1.1mmol

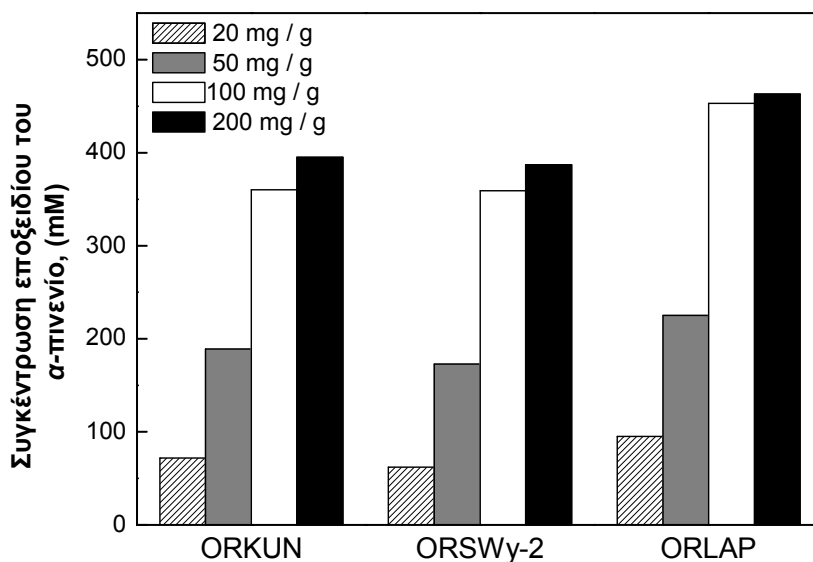
Από το Σχήμα 7.49, παρατηρείται ότι τόσο κατά την χημειο-ενζυμική οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου όσο και κατά την χημειο-ενζυμική οξείδωση του  $d$ -λιμονενίου οι οργανοτροποποιημένοι άργιλοι αποτέλεσαν καλύτεροι φορείς ακινητοποίησης της λιπάσης, καθώς με το ίδιο ποσοστό φόρτωσης οδήγησαν σε μεγαλύτερες τελικές συγκεντρώσεις

εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και εποξειδίου του  $d$ -λιμονενίου. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στον υδρόφιλο ή στον υδρόφοβο χαρακτήρα του φορέα ακινητοποίησης. Όπως έχει ειπωθεί οι οργανοτροποποιημένοι άργιλοι λόγω της παρουσίας του επιφανειοενεργού μορίου, έχουν αποκτήσει υδρόφοβο χαρακτήρα. Αντίθετα οι απλοί άργιλοι από την φύση τους είναι υδρόφιλοι. Η διαφορά αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στο διαθέσιμο νερό που υπάρχει στο μικροπεριβάλλον της λιπάσης, επηρεάζοντας την κατανομή των υποστρωμάτων και των προϊόντων μεταξύ του μέσου και του μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου [Petkar *et al.*, 2006]. Αυτό σημαίνει ότι οι υδρόφιλοι άργιλοι (KUN, LAP, SWy-2) αναμένεται να εγκλωβίζουν περισσότερο νερό ή  $H_2O_2$  μικροπεριβάλλον της λιπάσης, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της σταθερότητας του ενζύμου [Davies, 2005; Tornvall *et al.*, 2007]. Από την άλλη μεριά στους υδρόφοβους αργίλους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) αναμένεται η διάχυση των υδρόφοβων υποστρωμάτων να είναι πιο εύκολη προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επίσης η παρουσία του επιφανειοενεργού μορίου στους αργίλους αυτούς μπορεί να δρα προστατευτικά, καθώς εγκλωβίζει το πρωτεϊνικό μόριο μέσα στην περιοχή που σχηματίζεται από τις υδρόφιλες κεφαλές του. Αυτό συνεπάγεται ότι το ένζυμο προστατεύεται από την άμεση επαφή με το  $H_2O_2$ , με αποτέλεσμα να διατηρείται καταλυτικά ενεργό έτσι ώστε να οδηγεί στην σύνθεση υψηλών συγκεντρώσεων εποξειδίου. Αντίθετα στους απλούς αργίλους η ακινητοποιημένη λιπάση είναι πιο εκτεθειμένη στην οξειδωτική δράση του  $H_2O_2$  με αποτέλεσμα να απενεργοποιείται πιο γρήγορα.

Επιπλέον με βάση τα δομικά χαρακτηριστικά των παραπάνω ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, όπως έχει περιγραφεί στην παράγραφο 7.7.1.4, παρατηρείται ότι η διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής της ακινητοποιημένης λιπάσης διαφέρει ανάλογα με τον χαρακτήρα του φορέα (υδρόφιλο ή υδρόφοβο). Στους υδρόφοβους φορείς παρατηρήθηκε (Πίνακας 7.22) αύξηση του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας και μείωση του ποσοστού του τυχαίου σπειράματος, αλλαγές που σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, οδηγούν σε αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα του βιοκαταλύτη [Menaar *et al.*, 2008]. Έτσι διαπιστώνεται ότι η λιπάση στους οργανοτροποποιημένους φορείς βρίσκεται σε πιο ενεργή μορφή από ότι όταν ακινητοποιείται στους απλούς αργίλους. Κατά συνέπεια μπορεί να οδηγήσει σε υψηλότερες αποδόσεις τελικού προϊόντος. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την αντίδραση μετεστεροποίησης από την ακινητοποιημένη λιπάση σε απλούς και οργανοτροποποιημένους αργίλους όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.18..

#### 7.7.3.4 Επίδραση του ποσοστού φόρτωσης

Σε μία κινητικά ελεγχόμενη ενζυμική αντίδραση, η εξάρτηση του ρυθμού από τη συγκέντρωση του ενζύμου πρέπει να είναι γραμμική. Λόγω της φύσης της διεργασίας (ενζυμική αντίδραση που ακολουθείται από μία χημική), κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση του ποσοστού φόρτωσης της λιπάσης στη σύνθεση του τελικού προϊόντος, που είναι και το προϊόν της χημικής αντίδρασης, δηλαδή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου. Προς την κατεύθυνση αυτή μελετήθηκε το ποσοστό φόρτωσης της πρωτεΐνης (20-200 mg πρωτεΐνης/g αργίλου) και στις τρεις περιπτώσεις των οργανοτροποποιημένων αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.50, η αύξηση του ποσοστού φόρτωσης της λιπάσης οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του εποξειδίου μετά από 24h αντίδρασης.



**Σχήμα 7.50.** Επίδραση του ποσοστού φόρτωσης του ενζύμου στην τελική συγκέντρωση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μετά από 24h αντίδρασης. *Συνθήκες αντίδρασης:* 1mmol  $\alpha$ -πινενίου, 1mmol οκτανοϊκό οξύ, UHP:1.1mmol.

Με τη χρήση μέχρι και 100 mg πρωτεΐνης/g φορέα, η σχέση μεταξύ ποσότητας λιπάσης και συγκέντρωσης εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ήταν γραμμική. Η απόκλιση από τη γραμμική σχέση που παρατηρείται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις πιθανώς να οφείλεται σε προβλήματα μεταφοράς μάζας στο τριφασικό σύστημα καθώς επίσης και στη χημική αντίδραση μεταξύ υπεροξέος και  $\alpha$ -πινενίου προς την παραγωγή εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου. Παρόμοια επίδραση του ποσοστού φόρτωσης της πρωτεΐνης στους οργανοτροποποιημένους

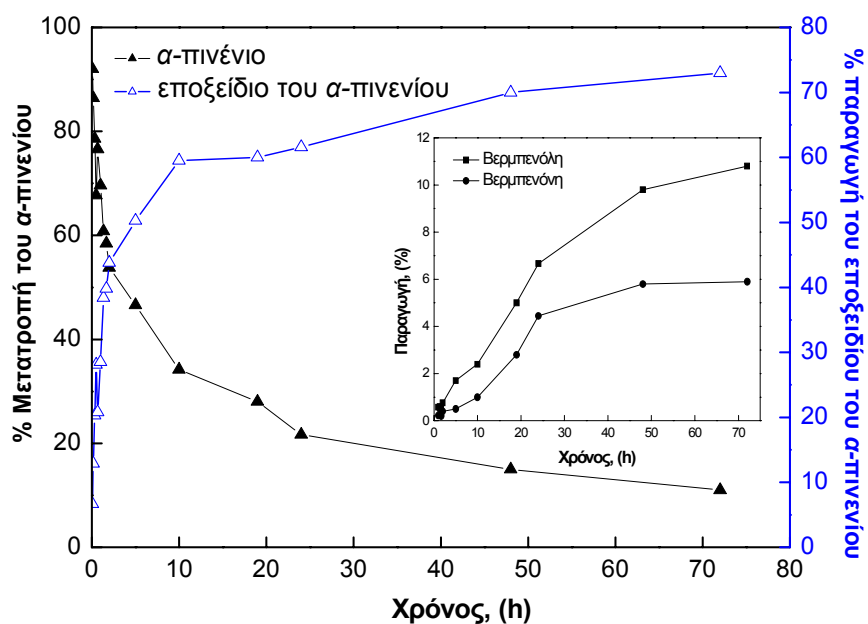
αργίλους (ORKUN, ORSWy-2, ORLAP) παρατηρήθηκε και στην αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε εξάνιο, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.7.2.1.

#### 7.7.3.5 Επίδραση της φύσης του οργανικού διαλύτη

Μετά τη μελέτη της επίδρασης των παραπάνω παραγόντων στην χημειο-ενζυμική σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη των αντιδράσεων σε διαφορετικούς διαλύτες. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης της φύσης του οργανικού διαλύτη στην καταλυτική δράση της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* και στα τρία οργανοτροποποιημένα υλικά σε ένα περίπλοκο σύστημα, το οποίο περιλαμβάνει ένα στάδιο ενζυμικής δράσης, ακολουθούμενο από ένα στάδιο χημικής αντίδρασης. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 3 οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας: υψηλής πολικότητας (ακετονιτρίλιο με  $\log P$  -0.33), μέσης πολικότητας (τολουόλιο με  $\log P$  2.5) και χαμηλής πολικότητας (εξάνιο με  $\log P$  3.5) [Laane *et al.*, 1987].

Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η αρχική ταχύτητα οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου ήταν αυξημένη σε διαλύτες μέσης πολικότητας (υδρόφοβους) όπως είναι το τολουόλιο (και για τις τρεις περιπτώσεις ακινητοποίησης της λιπάσης B), ενώ σε διαλύτες υψηλής και χαμηλής πολικότητας όπως είναι το ακετονιτρίλιο και το εξάνιο ήταν χαμηλή. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε αντιστοιχία με αυτά που παρατηρήθηκαν κατά την σύνθεση του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (παράγραφος 7.7.2.2), καθώς και σε παρόμοιες μελέτες χημειοενζυμικής σύνθεσης εποξειδίων που αφορούν στην εφαρμογή του εμπορικού σκευασματος της Novozym 435<sup>®</sup> [Bjorkling *et al.*, 1990; Ankudey *et al.*, 2006].

Γενικά θεωρείται πως οι λιπάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερη καταλυτική ικανότητα όταν δρουν σε μέσης και χαμηλής πολικότητας διαλύτες, ενώ σε πολύ πολικούς διαλύτες παρατηρείται χαμηλότερη δράση, καθώς αυτοί έχουν την τάση να αποσπούν νερό από τα ενζυμικά μόρια, το οποίο είναι απαραίτητο για την καταλυτική τους δράση [Zaks and Klibanov, 1988a; Yadav and Lathi, 2004]. Στο Σχήμα 7.51 παρουσιάζεται η εκατοστιαία μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου προς το εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου, την βερμπενόλη και την βερμπενόνη σε τολουόλιο.

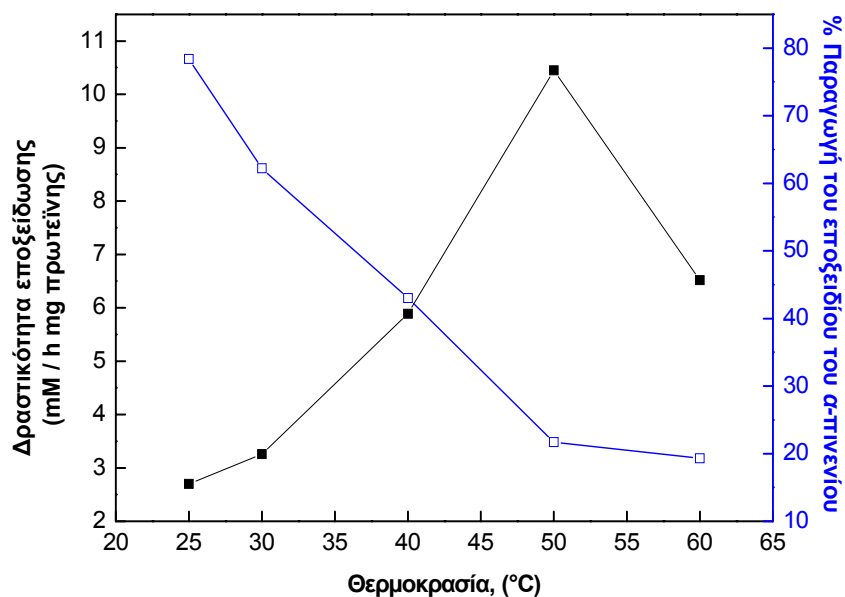


**Σχήμα 7.51.** Πορεία αντίδρασης κατά την οξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου, μέσω της καταλυτικής δράσης του βιοκαταλύτη ORLAP-100. Συνθήκες αντίδρασης:  $\alpha$ -πινένιο:1mmol, οκτανοϊκό οξύ: 1mmol, CaLB: 50mg (100mg/g), UHP:1.1mmol,

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως η πορεία τροποποίησης του  $\alpha$ -πινενίου είναι όμοια και στις τρεις περιπτώσεις των βιοκαταλυτών (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100). Πιο συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια της αντίδρασης το  $\alpha$ -πινένιο οξειδώνεται σχεδόν αποκλειστικά σε εποξείδιο του  $\alpha$ -πινενίου. Με την πρόοδο του χρόνου αντίδρασης, και κυρίως μετά τις 24h, διαπιστώνεται η παραγωγή και άλλων οξυγονωμένων προϊόντων, εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν με HPLC και GC-MS η βερμπενόλη και η βερμπενόνη.

### 7.7.3.6 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η επίδραση της θερμοκρασίας της αντίδρασης στην σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μελετήθηκε στο εύρος των 25-60°C, όταν η ενζυμική αντίδραση καταλύεται από τον βιοκαταλύτη ORLAP-100. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.52 με αύξηση της θερμοκρασίας της αντίδρασης αυξάνεται η αρχική ταχύτητα σύνθεσης του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μέχρι τους 50°C (βέλτιστη θερμοκρασία οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες των 50°C, η αρχική ταχύτητα οξείδωσης μειώνεται.



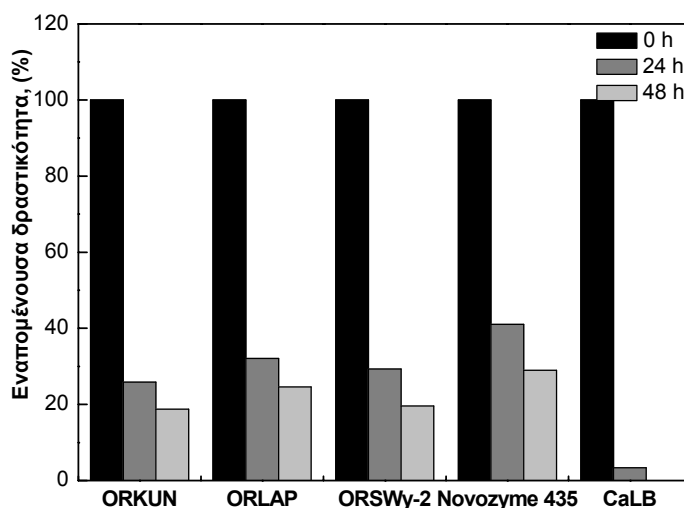
**Σχήμα 7.52.** Επίδραση της θερμοκρασίας στην αρχική ταχύτητα οξείδωση του α-πινενίου (■) και στην % σύνθεση του εποξειδίου του α-πινενίου (□). Συνθήκες αντίδρασης: α-πινένιο: 1mmol, οκτανοϊκό οξύ: 1mmol, ORLAP-100, UHP: 1.1mmol.

Αντίθετα η άριστη θερμοκρασία όσον αφορά την % σύνθεση του εποξειδίου του α-πινενίου είναι οι 25°C. Παρόμοια βέλτιστη θερμοκρασία ανακοινώθηκε πρόσφατα κατά την χημειο-ενζυμική σύνθεση εποξειδίου σε ανάλογο σύστημα αντίδρασης [Vleck and Petrovic, 2006]. Γενικά διαπιστώνεται ότι σε χαμηλές θερμοκρασίες ευνοείται η παραγωγή του τελικού προϊόντος. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται το γεγονός ότι σε υψηλές θερμοκρασίες το ένζυμο απενεργοποιείται ταχύτερα [Yadav and Manjula Devi, 2001, 2002]. Βάση των παραπάνω συμπεραίνεται ότι σε υψηλές θερμοκρασίες ευνοείται ο ρυθμός μετατροπής του α-πινενίου ενώ η παραγωγή του εποξειδίου βαίνει μειούμενη, λόγω γρήγορης απενεργοποίησης του ενζύμου από την θερμοκρασία της αντίδρασης.

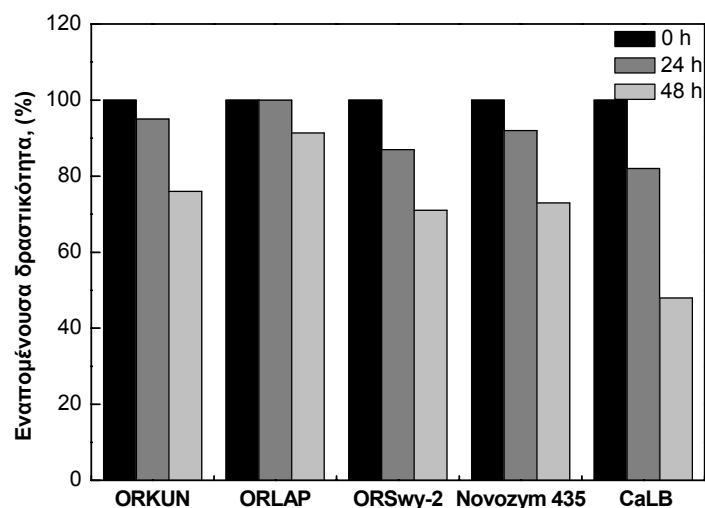
#### 7.7.3.7 Επίδραση του $H_2O_2$ και του UHP στη σταθερότητα της λιπάσης

Για να μελετηθεί η επίδραση του  $H_2O_2$  ή του UHP στην ενεργότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100), μια ποσότητα ενζύμου (50mg) εκτέθηκε σε 1.1 mmol  $H_2O_2$  ή UHP για 0, 1 και 2 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την έκθεση της, η ακινητοποιημένη λιπάση χρησιμοποιήθηκε για την οξείδωση του α-πινενίου σε θερμοκρασία δωματίου. Στο διαλύτη της αντίδρασης (εξάνιο) προστέθηκαν 1 mmol α-πινενίου και 1 mmol οκτανοϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα

σταθερότητας παρατίθενται συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές που αποκτήθηκαν κατά την επώαση της εμπορικά ακινητοποιημένης λιπάσης (Novozym 435<sup>®</sup>) και της λυοφιλιωμένης CaLB σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή σε UHP (Σχήματα 7.53 και 7.54 αντίστοιχα). Όπως διαπιστώνεται από τα παρακάτω διαγράμματα, βρέθηκε πως η σταθερότητα της ακινητοποιημένης ή της ελεύθερης λιπάσης επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Με αύξηση του χρόνου επώασης παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας των ακινητοποιημένων λιπασών (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100) κατά μέσο όρο 70% μετά από 1 ημέρα επώασης. Επίσης η λυοφιλιωμένη CaLB διατήρησε μόλις το 3.4% της αρχική της δραστηριότητας. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνεται ότι η ακινητοποίηση της λιπάσης στους οργανόφιλους αργίλους έδρασε σταθεροποιητικά προς το ένζυμο έναντι των δραστικών συνθηκών του συστήματος επώασης. Αυτό συμβαίνει διότι οι υδρόφοβοι φορείς δεν προσροφούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή το παραγόμενο νερό από το σύστημα της αντίδρασης με αποτέλεσμα η ακινητοποιημένη λιπάση να μην είναι εκτεθειμένη στις οξειδωτικές συνθήκες του συστήματος επώασης ή αντίδρασης. Γενικά όμως η ταχεία απενεργοποίηση των λιπασών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην οξείδωση αμινοξέων του ενζύμου που βρίσκονται κοντά στην περιοχή του ενεργού κέντρου [Davies, 2005; Tornvall *et al.*, 2007], όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με αυτά που ανακοινώθηκαν από τη Skouridou και τους συνεργάτες της [2003b], στα οποία η ενεργότητα της εμπορικά ακινητοποιημένης λιπάσης (Novozym 435<sup>®</sup>), μειώθηκε κατά 50% όταν αυτή εκτέθηκε σε υπεροξείδιο του υδρογόνου για 0.5 h.



**Σχήμα 7.53.** Επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης και της ελεύθερης (λυοφιλιωμένη CaLB) λιπάσης. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην ακινητοποιημένη λιπάση ήταν 9.5 mg ενώ της λυοφιλιωμένης ήταν 1.2 mg.



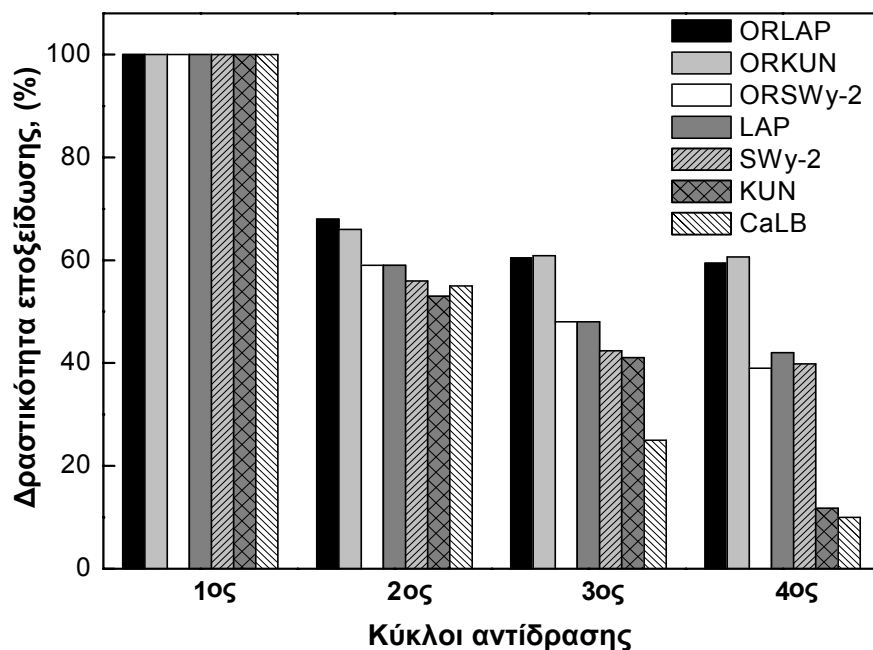
**Σχήμα 7.54.** Επίδραση του UHP στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSwy-2-100, Novozym 435<sup>®</sup>) και της ελεύθερης (λυοφιλωμένη CaLB) λιπάσης. *Συνθήκες αντίδρασης:* α-πινένιο: 1 mmol, οκτανοϊκό οξύ: 1 mmol, UHP: 1.1 mmol. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στην ακινητοποιημένη λιπάση ήταν 9.5 mg ενώ της λυοφιλωμένης ήταν 1.2 mg.

Με βάση το διάγραμμα του σχήματος 7.54 διαπιστώνεται ότι η σταθερότητα της ακινητοποιημένης ή της ελεύθερης λιπάσης επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από το UHP σε σχέση με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Πράγματι μετά από 1 ημέρα επώασης ο βιοκαταλύτης ORLAP-100 βρέθηκε να διατηρεί το 100% της αρχικής του δραστηριότητας. Επίσης η σταθερότητα των υβριδικών βιοκαταλυτών (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSwy-2-100) είναι συγκρίσιμη με αυτή της Novozym 435<sup>®</sup>. Αξίζει να σημειωθεί ότι στο σύστημα επώασης με UHP η λυοφιλωμένη CaLB διατήρησε το 48% της αρχικής της δραστηριότητας μετά από 2 ημέρες επώασης. Το ποσοστό αυτό είναι ιδιαίτερα υψηλό σε σχέση με την 100% απώλεια που παρατηρήθηκε στην λυοφιλωμένη CaLB όταν επώαστηκε σε υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου για το ίδιο χρονικό διάστημα. Η σταθερότητα αυτή που παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις της λιπάσης, αποδίδεται στο γεγονός ότι η απελευθέρωση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από το σύμπλοκο UHP γίνεται σταδιακά στο σύστημα της επώασης [Taliensky, 2005; Ankudey *et al.*, 2005]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η λιπάση να μην απενεργοποιείται γρήγορα και έτσι να διατηρεί μεγάλο μέρος της δραστηριότητας της.

#### 7.7.3.8 Επαναλαμβανόμενη χρήση ακινητοποιημένης λιπάσης

Η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης (στους απλούς και στους οργανοτροποποιημένους αργίλους) μελετήθηκε σε 4 κύκλους αντίδρασης τόσο κατά την παραγωγή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου όσο και κατά την παραγωγή του εποξειδίου του  $d$ -λιμονενίου. Τα συστήματα της αντίδρασης περιείχαν 1 mmol  $\alpha$ -πινενίου ή 1 mmol  $d$ -λιμονενίου, 1 mmol οκτανοϊκού οξέος, 50 mg ακινητοποιημένης λιπάσης (με ποσοστό φόρτωσης 100 mg πρωτεΐνης/g φορέα) και 1.1mmol UHP σε 1.5 ml τολουολίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 24 h στους 25°C. Με την ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου αντίδρασης, η ακινητοποιημένη λιπάση μετά από διαδοχικές πλύσεις με τολουόλιο, χρησιμοποιούνταν εκ νέου για την κατάλυση δεύτερου κύκλου αντίδρασης. Στο Σχήμα 7.55 παρουσιάζεται η δραστηριότητα τόσο των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών όσο και της λυοφιλιωμένης CaLB σε 4 κύκλους αντίδρασης κατά την χημειο-ενζυμική εποξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου.

Όπως διαπιστώνεται από το παρακάτω διάγραμμα η λειτουργική σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης επηρεάζεται ανάλογα με τον φορέα ακινητοποίησης. Πιο συγκεκριμένα η ακινητοποίηση της λιπάσης σε οργανόφιλους αργίλους σε σχέση με τους απλούς, οδήγησε στην σύνθεση βιοκαταλυτών με αυξημένη λειτουργική σταθερότητα. Πράγματι οι υβριδικοί βιοκαταλύτες ORLAP-100, ORKUN-100 και ORSWy-2-100, επέδειξαν λειτουργική σταθερότητα κατά 22% περισσότερο σε σχέση με τους LAP-100, KUN-100 και SWy-2-100 μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων.



**Σχήμα 7.55.** Επί τοις εκατό δραστικότητα της ακινητοποιημένης και της ελεύθερης CaLB μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων χρησιμοποιώντας διαφορετικούς φορείς ακινητοποίησης (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2, LAP, KUN, SWy-2).

Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στον υδρόφοβο χαρακτήρα των οργανοτροποποιημένων αργίλων. Όπως έχει ήδη ειπωθεί και σε προηγούμενες παραγράφους, το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται γύρω από το πρωτεϊνικό μόριο στους οργανόφιλους αργίλους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2), σταθεροποιεί την δομή του καθώς το επιφανειοενεργό μόριο αποτρέπει την άμεση επαφή του ενζύμου με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα άλλα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Τέλος παρατηρείται ότι όλοι οι υβριδικοί βιοκαταλύτες (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100, LAP-100, KUN-100 και SWy-2-100) επέδειξαν καλύτερη λειτουργική σταθερότητα σε σχέση με την λυοφιλιωμένη CaLB μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων. Αυτό σημαίνει ότι η ακινητοποίηση σταθεροποίησε το ένζυμο έναντι των δραστικών συνθηκών της αντίδρασης, διευρύνοντας έτσι με χαμηλότερο κόστος το πλήθος των εφαρμογών της λιπάσης. Επιπλέον σημαντικό ρόλο κατά την επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου διαδραμάτισε και η χρήση του συμπλόκου UHP, το οποίο λόγω της σταδιακής απελευθέρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου δεν δημιούργησε έντονες οξειδωτικές συνθήκες από την αρχή της αντίδρασης. Αντίθετα οι Yadav και Manjula Devi [2001] παρατήρησαν ότι κατά την πρώτη χρήση της λιπάσης CaLB στην αυτό-εποξειδωση του

ολεϊκού οξέος με υπεροξειδίο του υδρογόνου (διάλυμα 30% σε νερό), το ένζυμο έχασε περίπου το 50% της ενεργότητάς του, ενώ ακόμα πιο δραστική μείωση της ενεργότητας παρατηρήθηκε κατά τη δεύτερη χρήση της λιπάσης.

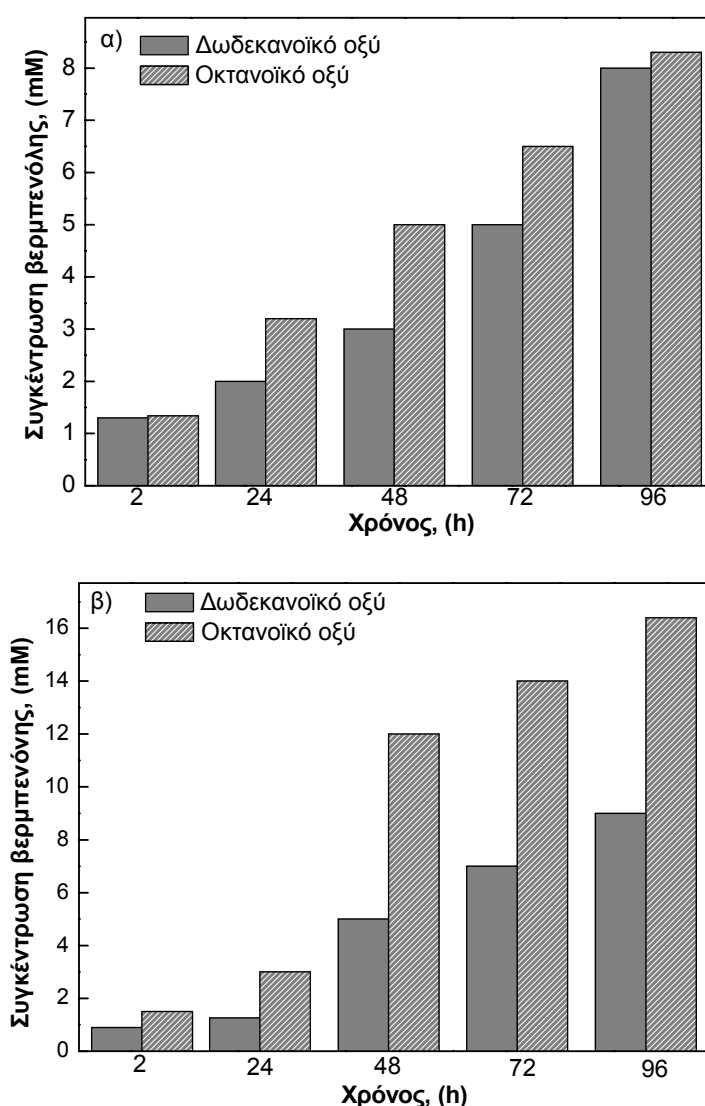
Ανάλογη μελέτη πραγματοποιήθηκε και κατά την χημειο-ενζυμική εποξειδωση του *d*-λιμονενίου, από την οποία διαπιστώθηκε ότι η ακινητοποιημένη CaLB επέδειξε καλύτερη λειτουργική σταθερότητα όντας ακινητοποιημένη σε οργανόφιλους αργίλους. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στον σταθεροποιητικό χαρακτήρα των οργανόφιλων αργίλων προς το ένζυμο, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Βάση αυτών συμπεραίνεται ότι οι οργανόφιλοι άργιλοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ακινητοποίησης της CaLB για την παραγωγή εποξειδίων σε μεγάλη κλίμακα με ταυτόχρονο οικονομικό όφελος.

### **7.7.3.9 Τροποποίηση μαστιχελαίου**

Το αιθέριο έλαιο που περιέχεται την μαστίχα Χίου, το μαστιχέλαιο, αποτελείται κυρίως από διαφορά μονοτερπένια με κυριότερα συστατικά το  $\alpha$ -πινένιο, το  $\beta$ -μυρκενίο, το  $\beta$ -πινένιο, το καμφένιο και το καρυοφυλένιο. Αναλυτικά η σύσταση του μαστιχελαίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.1 (παράγραφος 2.1.2). Η ενζυμική τροποποίηση του μαστιχελαίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης των βασικών συστατικών του, έχει ως στόχο την εκλεκτική οξειδωση των περιεχόμενων μονοτερπενίων σε παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία. Μέσω της επεξεργασίας αυτής αναμένεται να προκύψει μαστιχέλαιο με ελεγχόμενες μεταβολές των ιδιοτήτων του, εφόσον η επεξεργασία στοχεύει σε συγκεκριμένες ενώσεις. Τα οξυγονωμένα παράγωγα των μονοτερπενίων είναι πολύ σημαντικές ουσίες στη βιομηχανία ως πρόσθετα γεύσης και αρώματος, και χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα [Kobilinsky *et al.*, 2007; Trytek *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008].

Στην παρούσα ενότητα η τροποποίηση του μαστιχελαίου πραγματοποιήθηκε μέσω της χημειο-ενζυμικής οξειδωσης των βασικών μονοτερπενίων του, με την χρήση ακινητοποιημένης CaLB σε οργανόφιλους αργίλους σε σύστημα με ή χωρίς διαλύτη. Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην τροποποίηση του μαστιχελαίου (10%) σε εξάνιο. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 2 λιπαρά οξέα ένα μεσαίου μήκους (οκτανοϊκό με 8 άτομα άνθρακα) και ένα μεγάλου μήκους (δωδεκανοϊκό με 12 άτομα άνθρακα). Η ανάλυση του μαστιχελαίου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφηκε στην παράγραφο 6.3.5.1.4, ενώ η χρονική εξέλιξη των αντιδράσεων μελετήθηκε για 96 h. Μετά από σύγκριση του χρωματογραφήματος

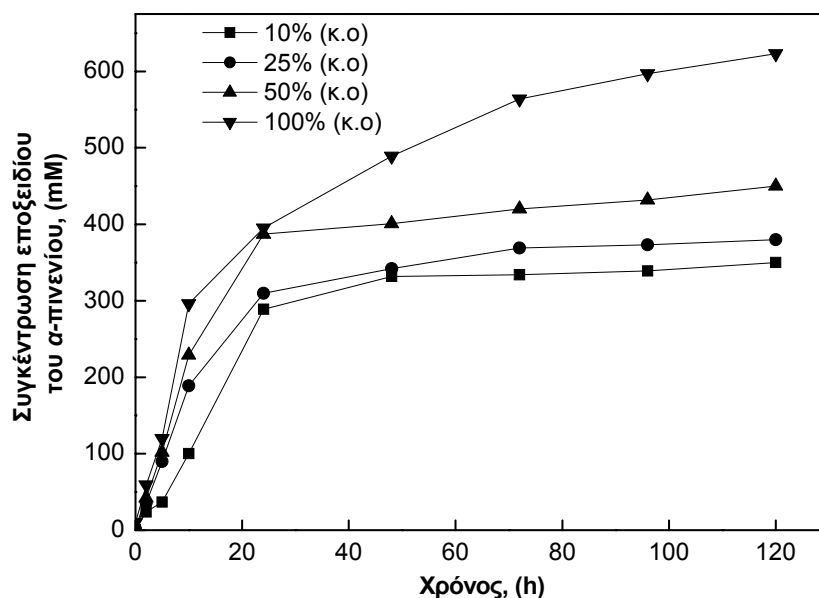
του μαστιχελαίου που υποβλήθηκε σε ενζυμική επεξεργασία και του δείγματος ελέγχου, παρατηρήθηκε η ύπαρξη αρκετών οξυγονωμένων παραγωγών που προέρχονται από το  $\alpha$ -πινένιο, το  $\beta$ -πινένιο, το μυρκενίο, το  $d$ -λιμονένιο και από πολλά άλλα βασικά μονοτερπένια. Για λόγους ευκολίας η μελέτη της ενζυμικής επεξεργασίας του μαστιχελαίου πραγματοποιήθηκε με βάση τα οξυγονωμένα παράγωγα του  $\alpha$ -πινενίου. Έτσι στο Σχήμα 7.56 παρατίθενται ενδεικτικά η χρονική εξέλιξη των αντιδράσεων οξείδωσης του μαστιχελαίου με βάση την παραγωγή της βερμπενόλης και της βερμπενόνης.



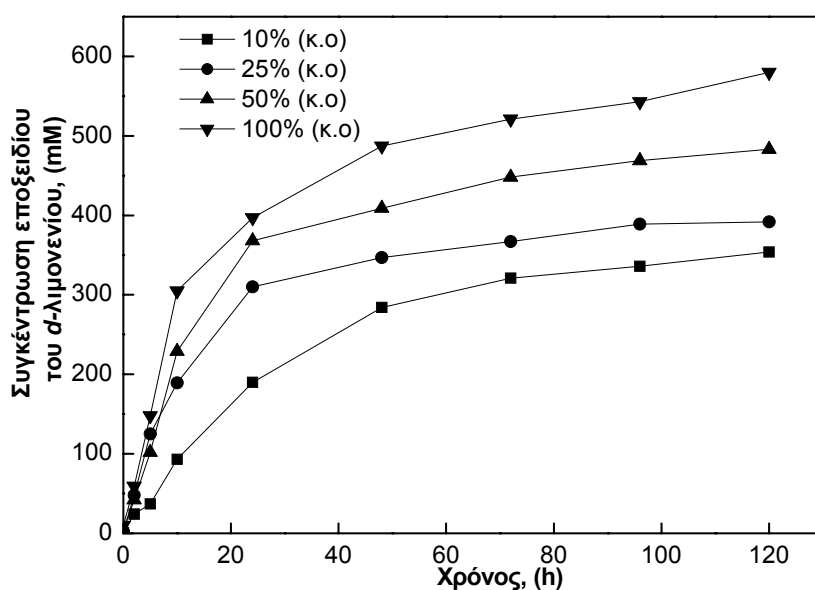
**Σχήμα 7.56.** Επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος κατά την παραγωγή: α) βερμπενόλης και β) βερμπενόνης μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης του μαστιχελαίου. Συνθήκες αντίδρασης: μαστιχέλαιο (10%), ORLAP-100, λιπαρό οξύ: 1 mmol, UHP:1.1 mmol.

Όπως διαπιστώνεται από τα διαγράμματα του σχήματος 7.56 και στις δύο περιπτώσεις, μεγαλύτερη παραγωγή οξυγονωμένου παραγώγου επιτεύχθηκε με τη χρήση του οκτανοϊκού οξέος, δηλαδή με τη χρήση λιπαρού οξέος με οκτώ άτομα άνθρακα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν λιπαρά οξέα μεσαίου και μεγάλου μήκους ανθρακικής αλυσίδας σε παρόμοια συστήματα και από τα οποία διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή σε υπεροξύ επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη απόδοση όταν χρησιμοποιείται λιπαρό οξύ με μικρό μήκος ανθρακικής αλυσίδας [Bjorkling *et al.*, 1990; Rusch gen Klaas and Warwel, 1997; Moreira and Nascimento, 2007].

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων η τροποποίηση του μαστιγελαίου στα επόμενα πειράματα επιχειρήθηκε αποκλειστικά με την χρήση οκτανοϊκού οξέος. Στη συνέχεια μελετήθηκε η συγκέντρωση του μαστιγελαίου στο τελικό όγκο της αντίδρασης. Προς την κατεύθυνση αυτή το μέσο της αντίδρασης περιείχε αυξανόμενα ποσοστά σε μαστιγέλαιο, από 10 έως 100% (κ.ο) σε εξάνιο. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στους 25°C υπό σταθερή ανάδευση (180 rpm) με τη χρήση 50 mg ακινητοποιημένης CaLB (ORLAP-100) ως βιοκαταλύτη. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 7.57 και 7.58, η % περιεκτικότητα του μαστιγελαίου επιδρά κατά την σύνθεση α) του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και β) του εποξειδίου του  $d$ -λιμονενίου, αντίστοιχα.



**Σχήμα 7.57.** Επίδραση της % περιεκτικότητας του μαστιγελαίου κατά την παραγωγή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης του μαστιγελαίου. Συνθήκες αντίδρασης: μαστιγέλαιο (10-100%), ORLAP-100, οκτανοϊκό οξύ: 1 mmol, UHP:1.1 mmol.



**Σχήμα 7.58.** Επίδραση της % περιεκτικότητα του μαστιχελαίου κατά την παραγωγή του εποξειδίου του *d*-λιμονενίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης του μαστιχελαίου. Συνθήκες αντίδρασης: μαστιχέλαιο (10-100%), ORLAP-100, οκτανοϊκό οξύ: 1 mmol, UHP:1.1 mmol.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα, η αύξηση της συγκέντρωσης του μαστιχελαίου δεν οδηγεί σε γραμμική αύξηση της παραγωγής των δύο εποξειδίων. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε κατά την χημειο-ενζυμική σύνθεση εποξειδίου με την χρήση της Novozym 435<sup>®</sup> σε ανάλογα συστήματα οργανικών διαλυτών [Vleck and Petrovic, 2006]. Το φαινόμενο αυτό ενδεχομένως μπορεί να αποδοθεί σε περιορισμούς στη μεταφορά μάζας. Γενικά τα υποστρώματα της ενζυμικής αντίδρασης (υπεροξειδίο του υδρογόνου και οκτανοϊκό οξύ) πιθανώς να έχουν μειωμένη διαλυτότητα στο μαστιχέλαιο σε σχέση με το εξάνιο και να παρουσιάζεται έτσι δυσκολία στη μεταφορά τους από το μέσο αντίδρασης στο μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Επίσης διαπιστώνεται ότι με την πάροδο του χρόνου αντίδρασης (ιδιαίτερα μετά τις 24h) η συγκέντρωση των παραγόμενων εποξειδίων δεν αυξάνεται αλλά σταθεροποιείται. Η σταθεροποίηση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε δύο κυρίως λόγους. Ο πρώτος αφορά την μετατροπή των παραγόμενων εποξειδίων προς άλλα οξυγονωμένα παράγωγα όπως π.χ βερμπενόλης και βερμπενόνης στην περίπτωση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και καρβεόλης και καρβόνης στην περίπτωση του εποξειδίου του *d*-λιμονενίου (η ταυτοποίηση των ενώσεων αυτών κατέστη δυνατή με την χρήση της HPLC και του GC-MS). Ο δεύτερος λόγος αφορά την υδρόλυση των εποξειδίων

προς τις αντίστοιχες διόλες, λόγω ότι με την πρόοδο της αντίδραση το παραγόμενο νερό στο σύστημα της αντίδρασης αυξάνεται, με αποτέλεσμα να ευνοούνται οι αντιδράσεις υδρόλυσης. Στον Πίνακα 7.26 δίνονται οι συγκεντρώσεις των οξυγονωμένων παραγώγων του μαστιχελαίου μετά από 5 ημέρες αντίδρασης.

**Πίνακας 7.26.** Επίδραση της % περιεκτικότητας του μαστιχελαίου (10-100% στο σύστημα της αντίδρασης) στην συγκέντρωση των εποξειδίων του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου, της βερμπενόλης και βερμπενόνης μετά από 120h αντίδρασης. *Συνθήκες αντίδρασης:* μαστιχέλαιο (10-100%), ORLAP-100, οκτανοϊκό οξύ: 1 mmol, UHP:1.1 mmol

| % Περιεκτικότητα<br>Μαστιχελαίου (κ.ο) | Συγκέντρωση (mM)                    |                                  |            |            |
|----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|------------|------------|
|                                        | Εποξείδιο του<br>$\alpha$ -πινενίου | Εποξείδιο του<br>$d$ -λιμονενίου | Βερμπενόλη | Βερμπενόνη |
| 10                                     | 350                                 | 354                              | 8.3        | 16.4       |
| 25                                     | 380                                 | 392                              | 8.5        | 20.0       |
| 50                                     | 450                                 | 483                              | 13.1       | 20.5       |
| 100                                    | 623                                 | 580                              | 33.1       | 19.0       |

Από τον παραπάνω πίνακα διαπιστώνεται ότι η χημειο-ενζυμική τροποποίηση του μαστιχελαίου, οδήγησε στο σχηματισμό τροποποιημένου μαστιχελαίου το οποίο είναι εμπλουτισμένο με οξυγονωμένα παράγωγα. Η σπουδαιότητα των οξυγονωμένων παραγώγων των μονοτερπενίων είναι μεγάλη, καθώς σε πρόσφατες μελέτες έχουν αναφερθεί πλήθος βιολογικών εφαρμογών τους [Loutrari *et al.*, 2004; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Martino *et al.*, 2008]. Έτσι από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι επιτεύχθηκε η τροποποίηση τόσο των βασικών συστατικών του μαστιχελαίου όσο και του ίδιου του αιθέριου ελαίου σε παράγωγα με αυξημένη βιολογική δράση, με τη βοήθεια διάφορων ενζυμικών βιοδιεργασιών σε πράσινα μέσα.



---

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης βιοκαταλυτικών διεργασιών για την τροποποίηση των βασικών συστατικών του μαστιχέλαιου. Όπως έχει αναφερθεί το μαστιχέλαιο αποτελείται από διάφορα μονοτερπένια, με κυριότερα συστατικά το  $\alpha$ -πινένιο (77.1%) και το  $\beta$ -μυρκένιο (12.27%). Η αντιμικροβιακή και πιθανή αντικαρκινική του δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στα διάφορα μονοτερπένια που περιέχει, όπως είναι το  $\alpha$ -πινένιο,  $\beta$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο, καθώς και σε οξυγονωμένα παράγωγα αυτών όπως π.χ. η βερμπενόνη,  $\alpha$ -τερπινεδόλη, και περιλλυλ-αλκοόλη. Η τροποποίηση του μαστιχέλαιου και των επιμέρους συστατικών του, μέσω ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, σε οξυγονωμένα προϊόντα με πιθανή υψηλή βιολογική δράση αποτέλεσε το αντικείμενο της εργασίας αυτής. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής τόσο οξειδοαναγωγικών ενζύμων όπως της χλωροϋπεροξειδάσης και των λακκασών όσο και υδρολυτικών ενζύμων όπως των λιπασών, σε μη συμβατικά συστήματα για την τροποποίηση των παραπάνω ενώσεων φυτικής προέλευσης. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν είτε σε ελεύθερη μορφή (ως υδατικά διαλύματα) είτε ως ακινητοποιημένα ενζυμικά σκευάσματα. Η επιλογή των μη συμβατικών συστημάτων έγινε με γνώμονα: i) τη δυνατότητα διαλυτοποίησης τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων υποστρωμάτων των παραπάνω ενζύμων, ii) τη δυνατότητα διατήρησης της ενζυμικής ενεργότητας στα παραπάνω συστήματα. Η ενζυμική τροποποίηση των επιμέρους συστατικών του μαστιχέλαιου καθώς και του ίδιου του μαστιχέλαιου μελετήθηκε σε μια σειρά μη συμβατικών συστημάτων όπως σε μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται παρουσία ή απουσία επιφανειοενεργού μορίου, σε μονοφασικά συστήματα αναμίξιμων οργανικών διαλυτών με το νερό, σε οργανικούς διαλύτες ή και σε συστήματα απουσία διαλύτη.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν η χλωροϋπεροξειδάση από τον μύκητα *Caldariomyces fumago* (CPO), οι λακκάσες από *Trametes versicolor* (TvL), *Trametes hirsuta* (ThL) και *Botrytis cinerea* (BcL), η λιπάση B από *Candida antartica* (CaLB) (σε υδατική ή σε λυοφιλιωμένη μορφή) καθώς και η Novozym 435<sup>®</sup>. Τα ένζυμα CPO, TvL, CaLB και Novozym 435<sup>®</sup> ήταν εμπορικώς διαθέσιμα και χρησιμοποιήθηκαν χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Αντίθετα τα ένζυμα ThL και BcL παρήχθησαν και

απομονώθηκαν στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής λακκάσης από τους μικροοργανισμούς *T. hirsuta* (DSMZ 3511 και 5072) και *B. cinerea* (DSMZ 877) μέσω της μελέτης της σύστασης του θρεπτικού υποστρώματος και της χρήση διαφορετικών ενεργοποιητών (επαγωγέων) κατά την παραγωγή του επιθυμητού ενζύμου. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο μύκητας *T. hirsuta* αναπτύσσεται καλύτερα σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο εκτός των ανόργανων στοιχείων και της γλυκόζης περιείχε πίτυρο σίτου ως πηγή αζώτου και άνθρακα και ενεργοποίητη τον συνδυασμό 2.5-ξυλιδίνη και ιόντα  $\text{Cu}^{2+}$ . Αντίστοιχα ο μύκητας *Botrytis cinerea* αναπτύχθηκε καλύτερα σε θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο εκτός των ανόργανων στοιχείων και της γλυκόζης περιείχε εκχύλισμα βύνης και ζύμης ως πηγή αζώτου καθώς και γαλλικό οξύ, ως ενεργοποιητή. Ο καθαρισμός των ενζύμων (με συνδυασμό τεχνικών όπως καταβύθιση με θειικό αμμώνιο, με μοριακή διήθηση και με χρωματογραφία ιονανταλλαγής) πραγματοποιήθηκε με απώτερο σκοπό την χρησιμοποίηση των μερικώς καθαρισμένων λακκασών στην κατάλυση αντιδράσεων οξειδωσης των τερπενίων σε μη συμβατικά συστήματα. Μετά τον καθαρισμό των ενζύμων προέκυψε λακκάση από *T. hirsuta* με δραστικότητα 6 units/ml και λακκάση από *B. cinerea* με δραστικότητα 2.5 units/ml.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δυνατότητα διατήρησης της καταλυτικής ικανότητας των ενζύμων CPO, TvL, ThL και BcL σε ψευδομονοφασικά συστήματα. Τέτοια τριαδικά συστήματα αποτελούνται από έναν μη πολικό οργανικό διαλύτη, μία αλκοόλη με μικρή αλυσίδα και νερό. Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν τρεις τύποι τριαδικών συστημάτων. Ο πρώτος τύπος περιλαμβάνει μίγματα εξανίου, αλκοόλης (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη) και νερού ενώ στο δεύτερο τύπο το εξάνιο έχει αντικατασταθεί από  $\alpha$ -πινένιο, και στον τρίτο τύπο από  $d$ -λιμονένιο. Η χρήση των τερπενίων,  $\alpha$ -πινενίου και  $d$ -λιμονενίου, έγινε με γνώμονα το γεγονός ότι αυτά τα βασικά συστατικά του μαστιχέλαιου μπορούν να διαδραματίσουν το ρόλο τόσο του διαλύτη όσο και του υποστρώματος στο σύστημα της αντίδρασης. Σε όλα τα παραπάνω μονοφασικά τριαδικά συστήματα, διαπιστώθηκε ότι είναι δυνατή η διαλυτοποίηση τόσο της CPO όσο και των TvL, ThL, BcL για τα οποία διαπιστώθηκε ότι διατηρούν τις καταλυτικές τους ικανότητες σε μεγάλο βαθμό. Η διατήρηση της καταλυτικής δραστικότητας των ενζύμων σχετίζεται με το γεγονός ότι τα ενζυμικά μόρια εγκλωβίζονται μέσα στους υδάτινους θύλακες που σχηματίζονται στα τριαδικά αυτά συστήματα, γεγονός που φαίνεται να περιορίζει την ανεπιθύμητη επαφή με την

συνεχή οργανική φάση που μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση και απώλεια της ενζυμικής δράσης. Με βάση τα παραπάνω τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, αποτελούν κατάλληλα μέσα για την επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων με τη συμμετοχή τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων υποστρωμάτων.

Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της CPO διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο μπορεί στα συστήματα αυτά να καταλύσει τόσο την αντίδραση αλογόνωσης του υδρόφιλου MCD όσο και την αντίδραση εποξειδωσης του υδρόφοβου στυρενίου. Αντίστοιχα με την χρήση των λακκασών πραγματοποιήθηκε η οξειδωση του υδρόφιλου ABTS και της υδρόφοβης συρινγκαλνταζίνης (SYR) τόσο σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό όσο και στα συμβατικά μικρογαλακτώματα που περιέχουν επιφανειοενεργό αλλά και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται από μίγματα νερού με τριτοταγή βουτανόλη ή ιοντικό υγρό ([bmim][BF<sub>4</sub>]).

Κατά την χρήση των μικρογαλακτωμάτων αυτών ως μέσα για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων διαπιστώθηκε ότι η σύσταση του μικρογαλακτώματος και ειδικότερα η περιεκτικότητα του σε νερό, η φύση του οργανικού διαλύτη (εξάνιο ή μονοτερπένιο) και της αλκοόλης (2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη) επιδρά τόσο στην ταχύτητα που πραγματοποιείται η αντίδραση όσο και στην απόδοση του τελικού προϊόντος. Ειδικότερα στην περίπτωση της CPO υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε συστήματα που περιείχαν τριτοταγή βουτανόλη και τα οποία είχαν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Επιπλέον η δράση του ενζύμου επηρεάστηκε από την φύση και τη συγκέντρωση του οξειδωτικού φορέα (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ή του *t*-BHP<sub>d</sub>). Γενικά παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> η ταχύτητας χλωρίωσης του MCD (υδρόφιλο υπόστρωμα) μειώθηκε σημαντικά, ενώ σε συγκεντρώσεις πάνω από 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> παρατηρήθηκε σχεδόν πλήρης αναστολή της δράσης του ενζύμου. Η ισχυρή ανασταλτική επίδραση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σχετίζεται με πιθανή αποδιάταξη της αίμης / ή με μετουσίωση της πρωτεΐνης [Park and Clark, 2006a], η οποία επίσης παρατηρήθηκε και σε άλλα συστήματα αντίδρασης [Santhanam and Dordick, 2002; Spreti *et al.*, 2004; Narayanan *et al.*, 2007]. Αντίθετα με αύξηση της συγκέντρωσης του *t*-BHP, η καταλυτική δράση της CPO δεν αναστάλθηκε ακόμη και όταν ο οξειδωτικός φορέας είχε συγκέντρωση 80 mM. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι μεγαλύτερες ταχύτητες εποξειδωσης του στυρενίου (ενός υδρόφοβου υποστρώματος) παρατηρήθηκαν σε συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο από ότι σε συστήματα με βάση το εξάνιο.

Ανάλογη συμπεριφορά επέδειξαν και οι λακκάσες TvL, ThL και BcL, οι οποίες είχαν αυξημένη δραστηριότητα σε τριαδικά συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα τόσο σε

μονοτερπένια ( $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο) όσο και σε νερό. Μια πιθανή εξήγηση της αυξημένης δραστηριότητας των ενζύμων σε τριαδικά συστήματα με αυξημένο ποσοστό υδατικής φάσης είναι ότι τόσο τα μόρια του ενζύμου όσο και τα μόρια του υποστρώματος (κυρίως των υδρόφιλων) εντοπίζονται στην υδατική μικροφάση, γεγονός που διευκολύνει την προσέγγιση του υποστρώματος στο ένζυμο. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την υψηλή δραστηριότητα των λιπασών [Zoumpanioti *et al.*, 2006a,b] και της οξειδάσης της χοληστερόλης [Khmelnitsky *et al.*, 1988b] που παρατηρήθηκε κατά την κατάλυση άλλου τύπου αντιδράσεων σε παρόμοια τριαδικά συστήματα.

Από τα αποτελέσματα σταθερότητας της CPO στα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ή το εξάνιο, παρατηρήθηκε ότι η σταθερότητα του ενζύμου εξαρτάται ισχυρά από την θερμοκρασία επώασης και από την περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό. Γενικά σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C, καθώς επίσης και σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, η ενζυμική σταθερότητα μειώνεται σημαντικά. Το συμπέρασμα αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μελέτης της συμπεριφοράς του ενζύμου στα αντίστοιχα τριαδικά συστήματα με την χρήση της φασματοσκοπίας EPR ή της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης. Πιο συγκεκριμένα τα φάσματα EPR που ελήφθησαν για την εγκλωβισμένη CPO σε διάφορα τριαδικά συστήματα χαρακτηρίζονται από σήματα T1 (τα οποία σχετίζονται με την ενεργή μορφή του ενζύμου) και T2 (τα οποία συνδέονται με την ανενεργή μορφή του ενζύμου). Γενικά όταν η CPO ήταν εγκλωβισμένη σε συστήματα με μικρό ποσοστό υδατικής φάσης, η πλειοψηφία των σημάτων ήταν της μορφής T1, που σημαίνει ότι στις συνθήκες αυτές το περιβάλλον του σιδήρου που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν υφίσταται σοβαρές τροποποιήσεις. Αντίθετα σε τριαδικά συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό τα σήματα T1 μετατρέπονται σε σήματα T2, τα οποία συνδέονται με την ανενεργή μορφή του ενζύμου. Αυτό σημαίνει ότι στα συστήματα αυτά συμβαίνουν δομικές αλλαγές, οι οποίες επιδρούν στην περιοχή του σιδήρου της αίμης που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, με πιθανές συνέπειες στη δραστηριότητα του ενζύμου. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυψαν από την εφαρμογή της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC, σύμφωνα με τα οποία η CPO είναι πιο σταθερή σε τριαδικά συστήματα πλούσια με  $\alpha$ -πινένιο και με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό.

Από τη μελέτη σταθερότητας των λακκασών, που πραγματοποιήθηκε τόσο σε μικρογαλακτώματα με ή χωρίς επιφανειοενεργό όσο και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται από μίγματα νερού με τριτοταγή βουτανόλη, διαπιστώθηκε ότι η σύσταση του μέσου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των

ενζύμων. Πιο αναλυτικά και οι τρεις λακκάσες ήταν πιο σταθερές όταν εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό (ιδιαίτερα με βάση τα τερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο), από ότι όταν εγκλωβίζονται σε μικρογαλάκτωμα με AOT ή σε μοσοφασικά συστήματα. Τέλος με βάση τα αποτελέσματα της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC, διαπιστώθηκε ότι η TvL είναι πιο σταθερή στα τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με βάση τα τερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο σε σύγκριση με τα συστήματα που σχηματίζονται με βάση το εξάνιο.

Σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα η κινητική της σύνθεσης του εποξειδίου του στυρενίου καταλυόμενη από την CPO ακολούθησε την κινητική Michaelis-Menten που περιγράφεται από την εξίσωση (6.3) της παραγράφου 6.3.5.3.1. Από τις τιμές των κινητικών σταθερών που προέκυψαν φαίνεται ότι η καταλυτική ικανότητα της CPO, όπως αυτή περιγράφεται από τον λόγο  $k_{cat}^{app}/K_m^{app}$ , εξαρτάται ισχυρά από την σύνθεση του συστήματος καθώς επίσης και από την φύση του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται. Παρόμοια συμπεράσματα προέκυψαν κατά την μελέτη της κινητικής της οξείδωσης του ABTS που καταλύεται από τις λακκάσες TvL, ThL και BcL, η οποία επίσης ακολούθησε την κινητική Michaelis-Menten. Γενικά υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με μονοτερπένια, λόγω ότι τα τερπένια ασκούν προστατευτική και σταθεροποιητική δράση στην ενζυμική δομή, σε σύγκριση με τα τριαδικά συστήματα με βάση το εξάνιο, τα οποία φαίνεται ότι επιταχύνουν την αδρανοποίηση του ενζύμου.

Τέλος στα συστήματα αυτά μελετήθηκε η αντίδρασης οξείδωσης της γερανιόλης, νερόλης και περιλλύλ-αλκοόλης στις αντίστοιχες αλδεϋδες από την CPO. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στα τριαδικά συστήματα τα οποία σχηματίζονται με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι μετά από 24 h στους 25°C οι αποδόσεις σε γερανιάλη, νεράλη και περιλλυλ-αλδεϋδη ήταν 40%, 32% και 24%, αντίστοιχα σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Επίσης με την χρήση των τριών λακκασών επιχειρήθηκε η βιομετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου και του μαστιγελαίου με τη χρήση διαμεσολαβητών (μικρά μόρια τα οποία μεταφέρουν ηλεκτρόνια) σε διάφορα μη συμβατικά μέσα. Η απόδοση των αντιδράσεων οξείδωσης και στις δύο περιπτώσεις, προσδιορίστηκε με βάση τη συγκέντρωση του παραγόμενου εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, της βερπενόλης και της βερμπενόνης. Παρατηρήθηκε ότι η αντίδραση οξείδωσης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την σύσταση του μέσου και από την φύση και τη συγκέντρωση του διαμεσολαβητή. Επιπλέον μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προϊόντων παράχθηκαν μέσω του συνδυασμού δύο ή τριών διαμεσολαβητών. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι

με την χρήση τριών μεσολαβητών διαπιστώθηκε η μέγιστη παραγωγή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου, της βερπενόλης και της βερμπενόνης, η οποία ανέρχεται σε 2.66 mM, 17.73 mM και 16.60 mM, αντίστοιχα. Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στην συνεργιστική δράση των διαμεσολαβητών.

Με σκοπό την περαιτέρω αύξηση της σταθερότητας των λακκασών μελετήθηκε η δυνατότητα ακινητοποίησης της TvL σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC, τα οποία είναι σταθερά και διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα για αρκετές ημέρες, όταν έρχονται σε επαφή με μη-πολικό οργανικό διαλύτη. Αρχικά εξετάστηκε η καταλυτική ικανότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση την οξείδωση της συρινγκαλνταζίνης (SYR), σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό (με βάση το εξάνιο ή το  $\alpha$ -πινένιο ή το  $d$ -λιμονένιο), ή με AOT σε ισοοκτάνιο ( $w_o=20-60$ ) και σε μονοφασικά συστήματα που σχηματίζονται από μίγματα νερού με τριτοταγή βουτανόλη ή [bmim][BF<sub>4</sub>]. Διαπιστώθηκε ότι η σύσταση του μέσου αντίδρασης και ειδικότερα ο βαθμός ενυδάτωσης του συστήματος, η φύση του οργανικού διαλύτη (εξάνιο ή μονοτερπένιο) καθώς και το ποσοστό του αναμίξιμου διαλύτη επιδρούν σημαντικά στην ταχύτητα οξείδωσης της SYR.

Με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της σύστασης των τριαδικών συστημάτων στην καταλυτική συμπεριφορά της ακινητοποιημένης λακκάσης προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές κατά την οξείδωση της SYR, η οποία ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten. Παρατηρήθηκε ότι η καταλυτική ικανότητα της ακινητοποιημένης λακκάσης, με βάση τον λόγο  $V_{max}/K_m$ , είναι μεγαλύτερη σε συστήματα με τερπένια και ιδιαίτερα με  $\alpha$ -πινένιο. Επίσης από τη μελέτη σταθερότητας της ακινητοποιημένης λακκάσης διαπιστώθηκε ότι το οργανοπηκτώμα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC διατηρεί την δομή του σε άνυδρα συστήματα, με αποτέλεσμα η εναπομένουσα ενζυμική δραστηριότητα να είναι μεγαλύτερη σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες (ιδιαίτερα σε  $\alpha$ -πινένιο και  $d$ -λιμονένιο). Έτσι σε σχέση με τα αποτελέσματα σταθερότητας της ελεύθερης TvL, διαπιστώνεται ότι το ένζυμο μετά την ακινητοποίηση του σε στερεό φορέα είναι πιο σταθερό σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες από ότι όταν βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή.

Επιπλέον ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε για την εκλεκτική τροποποίηση του  $\alpha$ -πινενίου, του  $d$ -λιμονενίου και του αιθέριου ελαίου της μαστίχας Χίου με τη χρήση διαμεσολαβητή σε τριαδικά συστήματα. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η οξείδωση των παραπάνω υποστρωμάτων στα αντίστοιχα οξυγονωμένα παράγωγα, με τη χρήση ακινητοποιημένης TvL, επηρεάζεται από την φύση και τη συγκέντρωση του

διαμεσολαβητή. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μέγιστη παραγωγή των οξυγονωμένων παραγωγών των μονοτερπενίων του  $\alpha$ -πινενίου, του  $d$ -λιμονενίου και του μαστιχελαιίου πραγματοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση με την χρήση τριών διαμεσολαβητών. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η συγκέντρωση της βερμπενόλης και της βερμπενόνης ήταν 9.61 mM και 14.92 mM αντίστοιχα μετά από 120 h αντίδρασης σε τριαδικό σύστημα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο ( $P_{T1}$ ) στους 25°C. Έτσι με βάση τα παραπάνω διαπιστώνεται ότι με κατάλληλο συνδυασμό των διαμεσολαβητών είναι δυνατόν να βελτιωθεί η βιομετατροπή του τερπενίου προς οξυγονωμένα παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των οξυγονωμένων παραγωγών του  $\alpha$ -πινενίου, του  $d$ -λιμονενίου και του μαστιχελαιίου που επιτεύχθηκαν με την χρήση του ακινητοποιημένου ενζύμου έγιναν με μικρότερη ποσότητα λακκάσης σε σχέση με την ελεύθερη. Το πλεονέκτημα αυτό είναι αποτέλεσμα της αυξημένης σταθερότητας της ακινητοποιημένης TvL σε μέσα αποτελούμενα από  $\alpha$ -πινένιο και  $d$ -λιμονένιο, τα οποία και αποτελούν τα υποστρώματα των αντιδράσεων.

Τέλος στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η ακινητοποίηση της λιπάσης B από *Candida antarctica* σε φυλλόμορφους αργίλους, προκειμένου να αναπτυχθούν βιοκαταλυτικές διεργασίες για την χημειο-ενζυμική τροποποίηση του μαστιχελαιίου και των βασικών συστατικών του σε μη συμβατικά συστήματα, μέσω αντιδράσεων όπου ως υποστρώματα του ενζύμου χρησιμοποιείται υπεροξείδιο του υδρογόνου και λιπαρό οξύ. Προς την κατεύθυνση αυτή ως φορείς ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικοί άργιλοι: α) ο λαπονίτης (LAP), β) ο κουνίπια (KUN) και ο γ) SWy-2 καθώς και τα αντίστοιχα οργανοτροποποιημένα παράγωγά τους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2). Το ποσοστό φόρτωσης της πρωτεΐνης στον φορέα κυμάνθηκε από 20-200 mg πρωτεΐνης/g αργίλου, ενώ το ποσοστό της επιτυχούς ακινητοποίησης της λιπάσης κυμάνθηκε από 65% έως 96%. Με σκοπό να μελετηθεί αναλυτικά η επίδραση της φύσης του φορέα (απλού ή οργανοτροποποιημένου αργίλου) στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της CaLB, οι ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν από μια σειρά τεχνικών χαρακτηρισμού υλικών καθώς και φασματοσκοπικών τεχνικών ανάλυσης δομής πρωτεΐνης.

Αρχικά επιχειρήθηκε ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORWy-2) πριν και μετά την ακινητοποίηση της CaLB με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Από τις εικόνες διαπιστώθηκε ότι η μορφολογία του αργίλου αλλάζει μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου. Στη συνέχεια οι υβριδικοί βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με περίθλαση ακτίνων-X (XRD), μέσω της οποίας διαπιστώθηκε η επιτυχής ένθεση της λιπάσης στους αργίλους. Γενικά λαμβάνοντας υπόψη ότι οι διαστάσεις του ενζυμικού μορίου

είναι μεγάλες (30 Å x 40 Å x 50 Å) [Uppenberg *et al.*, 1994, 1995] και δεδομένου της μικρής απόστασης του ενδοστρωματικού χώρου του αργίλου, όπως αυτή υπολογίστηκε από την εν λόγω τεχνική, διαπιστώνεται ότι μόνο οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων ακινητοποιούνται εντός του ενδοστρωματικού χώρου ενώ η κύρια πολυπεπτιδική αλυσίδα τοποθετείται εκτός του ενδοστρωματικού χώρου. Η διαπίστωση αυτή είναι σε συμφωνία με άλλες δημοσιευμένες εργασίες στις οποίες έχει παρατηρηθεί ότι κατά την προσρόφηση διαφόρων ενζύμων, όπως π.χ. της  $\alpha$ -αμυλάσης, της γλυκοαμυλάσης και της ιμπερτάσης σε συνθετικούς μοντιμοριλλονίτες, μόνο οι πλευρικές αλυσίδες των διαφόρων καταλοίπων των αμινοξέων ακινητοποιούνται εντός του ενδοστρωματικού χώρου [Gougeon *et al.*, 2003; Gopinath and Sugunan, 2007; Sanjay and Sugunan, 2007]. Επίσης παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, ότι με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης της λιπάσης στον άργιλο, το ορυκτό αποφυλλοποιείται. Παράλληλα με την εφαρμογή της φωτοηλεκτρονικής φασματοσκοπίας ακτίνων-X (XPS) διερευνήθηκε ο τρόπος με τον οποίο η CaLB προσδέθηκε στην επιφάνεια των σιλοξανίων του αργίλου. Έτσι από τα C 1s και N 1s φωτοηλεκτρονικά φάσματα προσδιορίστηκαν οι ενέργειες πρόσδεσης που αποδίδονται στις αμιδικές ομάδες του ενζύμου. Οι τιμές των ενεργειών πρόσδεσης ήταν σε συμφωνία με αυτές που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για την Novozym 435<sup>®</sup> [Mahapatro *et al.*, 2006]. Επίσης, οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στους αργίλους μετά την ένθεση του ενζύμου διερευνήθηκαν με θερμική ανάλυση (TGA/DTA). Με βάση τη φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR) διαπιστώθηκε η επιτυχής ακινητοποίηση της CaLB στους φυλλόμορφους αργίλους (απλούς και οργανοτροποποιημένους). Επιπλέον προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές που πιθανώς να έχει υποστεί η δευτεροταγής δομή του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση του τόσο στους απλούς όσο και στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, πραγματοποιήθηκε ανάλυση του υπερύθρου φάσματος με μετασχηματισμό κατά (FT-IR) στην περιοχή Amide I. Από την ανάλυση διαπιστώθηκαν σημαντικές αλλαγές στην δευτεροταγή δομή του ενζύμου μετά την ακινητοποίησή του, σε σύγκριση με τη δομή του που παρατηρείται στο νερό. Πιο συγκεκριμένα στα οργανοτροποποιημένα παράγωγα παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας, το οποίο σχετίζεται με αυξημένη καταλυτική ικανότητα του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη [Menaar *et al.*, 2008]. Παρόμοιες αλλαγές στην δευτεροταγή δομή παρατηρήθηκαν και σε άλλες ακινητοποιημένες πρωτεΐνες [Fu *et al.*, 1999; Servagent-Noinville *et al.*, 2000] ή σε ελεύθερα ένζυμα [Brown *et al.*, 1993; Otero, 1995; Griebenow and Klibanov, 1997; De Diego *et al.*, 2005] σε μη συμβατικά συστήματα.

Στη συνέχεια με στόχο την μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων της ακινητοποιημένης CaLB τόσο σε απλούς (KUN, SWy-2, LAP) όσο και σε οργανοτροποποιημένους αργίλους (ORKUN, ORSWy-2, ORLAP) μελετήθηκε η ενζυμική αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε εξάνιο. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό φόρτωσης του ενζύμου στον άργιλο, επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα του βιοκαταλύτη. Στην περίπτωση των LAP, KUN, SWy-2, διαπιστώθηκε ότι καθώς αυξάνει το ποσοστό του ενζύμου στον φορέα, η ειδική ενεργότητα της CaLB μειώνεται ελαφρώς. Αντίθετα με αύξηση του ποσοστού φόρτωσης του ακινητοποιημένου ενζύμου, στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, παρατηρήθηκε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Γενικά αξίζει να σημειωθεί ότι η χρήση οργανοτροποποιημένων αργίλων (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) ως φορείς ακινητοποίησης, οδήγησε στην παρασκευή ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών με υψηλότερη ενεργότητα. Η διαφορά αυτή αποδίδεται στο υδρόφοβο μικροπεριβάλλον που δημιουργείται γύρω από το ένζυμο στους οργανοτροποποιημένους αργίλους, το οποίο φαίνεται ότι διευκολύνει την διάχυση των υδρόφοβων υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου, οδηγώντας σε υψηλότερες ταχύτητες μετεστεροποίησης. Επίσης η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την υδροφοβικότητα του οργανικού διαλύτη στον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση. Γενικά παρατηρήθηκε ότι η αρχική ταχύτητα μετεστεροποίησης παρουσιάζεται αυξημένη σε υδρόφοβους διαλύτες (π.χ. τολουόλιο), ενώ μειώνεται σε υδρόφιλους διαλύτες (π.χ. ακετονιτρίλιο). Τέλος διαπιστώθηκε ότι με αύξηση του χρόνου και της θερμοκρασίας (40-60°C) επώασης η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης (ιδιαίτερα όταν ακινητοποιείται σε οργανοτροποποιημένους αργίλους) είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την λυοφιλιωμένη CaLB (75% μετά από 24 h επώασης σε εξάνιο στους 60°C). Η υψηλή σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης στους οργανικά τροποποιημένους αργίλους φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της νέας διαμόρφωσης που έχει αποκτήσει το ένζυμο στη δευτεροταγή δομή του μετά την προσρόφηση στους υδρόφοβους φορείς.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε τόσο η τροποποίηση μεμονωμένων συστατικών του μαστιγελαίου, όπως του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου, όσο και του ιδίου του αιθέριου ελαίου με τη χρήση ακινητοποιημένης CaLB, με απώτερο στόχο το σχεδιασμό της βέλτιστης διαδικασίας σύνθεσης εποξειδίων και άλλων οξυγονωμένων παραγώγων σε μεγάλη κλίμακα. Γενικά η τροποποίηση των μονοτερπενίων στα αντίστοιχα οξυγονωμένα προϊόντα αναμένεται να αυξήσει το πεδίο εφαρμογών τους εφόσον χρησιμοποιούνται είτε ως δομικοί λίθοι σε πληθώρα αντιδράσεων στην οργανική σύνθεση είτε ως παράγωγα με υψηλή βιολογική

δράση. Η μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου στα αντίστοιχα εποξειδία μελετήθηκε σε ένα τριφασικό σύστημα, όπου, μέσω της ενδιάμεσης ενζυμικής δράσης της ακινητοποιημένης CaLB, σχηματίζεται υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ από ελεύθερο λιπαρό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου σε ένα κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Στη συνέχεια, μέσω της χημικής αντίδρασης Prilezhaev, το υπεροξυ-καρβοξυλικό οξύ οξειδώνει το αλκένιο με αποτέλεσμα τη σύνθεση του εποξειδίου [Skouridou *et al.*, 2003b,c]. Η παρούσα βιοκαταλυτική διεργασία αποτελεί μία ήπια και απλή εναλλακτική μέθοδο σύνθεσης υπεροξέων και εποξειδίων σε σχέση με τις συνθήκες της χημικής σύνθεσης που απαιτεί τη χρήση καταλυτών και ιδιαίτερα όξινων συνθηκών. Η σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου πραγματοποιήθηκε σε τολουόλιο ή εξάνιο και η λιπάση που χρησιμοποιήθηκε για να καταλύσει τη σύνθεση του υπεροξυ-οκτανοϊκού οξέος από οκτανοϊκό οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου ήταν ακινητοποιημένη σε φυλλόμορφους αργίλους. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στη χημειο-ενζυμική οξειδωση των αλκενίων εφόσον είναι ένα από τα υποστρώματα της ενζυμικής αντίδρασης, αλλά και ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας [Carboni-Oerlemans *et al.*, 2006; Svedendahl *et al.*, 2008]. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η χρήση είτε υδατικού διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (30% κ.ο) είτε του άνυδρου συμπλόκου υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ουρία (UHP), το οποίο απελευθερώνει  $H_2O_2$  με ελεγχόμενο τρόπο στο μέσο της αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι ο ρυθμός προσθήκης του υδατικού διαλύματος του  $H_2O_2$  στο μίγμα αντίδρασης αποτελεί κρίσιμο παράγοντα τόσο για την σύνθεση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου όσο και για την διατήρηση της καταλυτικής ενεργότητας της λιπάσης. Αντίθετα παρατηρήθηκε ότι η χρήση του UHP οδηγεί σε μεγαλύτερη μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου προς το αντίστοιχο εποξείδιο σε σύγκριση με την μετατροπή που επιτεύχθηκε με το υδ.  $H_2O_2$ . Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η ακινητοποιημένη CaLB σε ORLAP, με τη χρήση του UHP μετέτρεψε το 79% του  $\alpha$ -πινενίου, προς τα αντίστοιχα οξυγονωμένα. σε σχέση με το 17.8% (ποσοστό μετατροπής του  $\alpha$ -πινενίου) που παρατηρήθηκε με την χρήση του υδατικού διαλύματος του  $H_2O_2$ . Η συμπεριφορά αυτή αποδίδεται στο γεγονός ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου απελευθερώνεται από την ουρία σταδιακά προς το μίγμα της αντίδρασης [Taliensky, 2005; Ankudey *et al.*, 2005] με αποτέλεσμα να μην απενεργοποιείται γρήγορα η ακινητοποιημένη λιπάση. Έτσι με σκοπό να προαχθεί η σύνθεση των αντίστοιχων εποξειδίων αλλά και να διατηρηθεί η καταλυτική ενεργότητα της λιπάσης, η χημειο-ενζυμική εποξείδωση των τερπενίων μελετήθηκε αποκλειστικά με την χρήση του UHP ως οξειδωτικού φορέα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του UHP (0.5, 1.1, 2.2 και 4 mmol). Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι παρά την αρχική αύξηση της ταχύτητας οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου με την αύξηση της συγκέντρωσης του UHP, η τελική συγκέντρωση του εποξειδίου δεν αυξάνεται με αύξηση του UHP. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παρόμοια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του UHP σε σύστημα χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης αλκενίων με την χρήση λιπάσης [Ankudey *et al.*, 2006]. Έτσι προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή αδρανοποίηση του ενζύμου ως αποτέλεσμα της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης  $H_2O_2$  στο διάλυμα της αντίδρασης, η εποξείδωση των τερπενίων μελετήθηκε με την χρήση 1.1 mmol UHP.

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του φορέα ακινητοποίησης κατά την αντίδραση σύνθεσης του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου εξετάστηκαν και οι έξι φορείς ακινητοποίησης (LAP, KUN, SWy-2, ORLAP, ORKUN, ORSWy-2) της λιπάσης. Παρατηρήθηκε ότι οι οργανοτροποποιημένοι άργιλοι ήταν πιο αποτελεσματικοί φορείς ακινητοποίησης της λιπάσης, καθώς με το ίδιο ποσοστό φόρτωσης οδήγησαν σε μεγαλύτερες τελικές συγκεντρώσεις εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου. Αυτό οφείλεται κυρίως σε τρεις λόγους: α) στον υδρόφοβο χαρακτήρα του φορέα ακινητοποίησης, ο οποίος ευνοεί την διάχυση των υδρόφοβων υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, β) στην παρουσία του επιφανειοενεργού μορίου που δρα προστατευτικά προς το ένζυμο, καθώς εγκλωβίζει το πρωτεϊνικό μόριο μέσα στην περιοχή που σχηματίζεται από τις υδρόφιλες κεφαλές του, και γ) στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς δομής της λιπάσης που αποκτά όταν ακινητοποιείται στους φορείς αυτούς.

Επίσης η συγκέντρωση του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου φάνηκε να επηρεάζεται από το ποσοστό φόρτωσης του ενζύμου στο φορέα. Πιο συγκεκριμένα με τη χρήση μέχρι και 100 mg πρωτεΐνης/g φορέα, η σχέση μεταξύ ποσότητας λιπάσης και συγκέντρωσης εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ήταν γραμμική, ενώ με τη χρήση βιοκαταλύτη με ποσοστό φόρτωσης πάνω από 100 mg πρωτεΐνης/g φορέα παρατηρήθηκε μη-γραμμική σχέση, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί σε προβλήματα μεταφοράς μάζας στο τριφασικό σύστημα. Επιπλέον βρέθηκε ότι η αρχική ταχύτητα οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου παρουσιάζεται αυξημένη σε διαλύτες μέσης πολικότητας (π.χ. το τολουόλιο), ενώ σε διαλύτες υψηλής και χαμηλής πολικότητας όπως είναι το ακετονιτρίλιο και το εξάνιο, οι ταχύτητες παρουσιάζονται μειωμένες. Όσον αφορά την θερμοκρασία πραγματοποίησης των αντιδράσεων, βρέθηκε ακόμα πως η αύξηση της οδηγεί σε αύξηση της αρχικής ταχύτητας οξείδωσης του  $\alpha$ -πινενίου, με άριστη θερμοκρασία τους

50°C. Αντίθετα η μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου σε εποξειδίο του  $\alpha$ -πινενίου ευνοείται σε χαμηλές θερμοκρασίες, με βέλτιστη στους 25°C.

Κατά τη μελέτη της επίδρασης του  $H_2O_2$  και του UHP στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης διαπιστώθηκε μείωση της ενεργότητας των ακινητοποιημένων λιπασών (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100) κατά μέσο όρο 70% μετά από 24 h επώασης παρουσίας υδατικού διαλύματος  $H_2O_2$ . Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι η ταχεία απενεργοποίηση της CaLB, οφείλεται κατά κύριο λόγο στην οξειδωση αμινοξέων του ενζύμου που βρίσκονται κοντά στην περιοχή του ενεργού κέντρου [Davies, 2005; Tornvall *et al.*, 2007]. Από την άλλη μεριά η σταθερότητα της ακινητοποιημένης ή τη ελεύθερης λιπάσης επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από το UHP σε σχέση με το υδ.  $H_2O_2$ . Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η ακινητοποιημένη CaLB σε ORLAP, διατήρησε το 92% της αρχικής της δραστηρότητας μετά από 48h επώασης με UHP. Η σταθερότητα αυτή, αποδίδεται στο γεγονός ότι η απελευθέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από το σύμπλοκο UHP γίνεται σταδιακά [Taliensky, 2005; Ankudey *et al.*, 2005], με αποτέλεσμα η λιπάση να διατηρεί τις καταλυτικές της ικανότητες για σημαντικό χρονικό διάστημα. Κατά την επαναλαμβανόμενη χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης για την παραγωγή του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου, διαπιστώθηκε πως το ένζυμο στους οργανόφιλους αργίλους παρουσίασε αυξημένη λειτουργική σταθερότητα ακόμη και μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων (συνολική λειτουργία 96h). Επίσης παρατηρήθηκε ότι η λειτουργική σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης επηρεάζεται ανάλογα με τον φορέα ακινητοποίησης. Πράγματι οι υβριδικοί βιοκαταλύτες ORLAP-100, ORKUN-100 και ORSWy-2-100, επέδειξαν αυξημένη λειτουργική σταθερότητα κατά 22% σε σχέση με τους LAP-100, KUN-100 και SWy-2-100 μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων στην περίπτωση χημειο-ενζυμικής εποξειδωσης του  $\alpha$ -πινενίου. Ανάλογη συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την χημειοενζυμική εποξειδωση του  $d$ -λιμονενίου και η οποία μπορεί να αποδοθεί στον υδρόφοβο χαρακτήρα των οργανοτροποποιημένων αργίλων. Γενικά το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται γύρω από το πρωτεϊνικό μόριο στους οργανόφιλους αργίλους (ORLAP, ORKUN, ORSWy-2), σταθεροποιεί την δομή του καθώς το επιφανειοενεργό μόριο αποτρέπει την άμεση επαφή του ενζύμου με το υπεροξειδίο του υδρογόνου και τα άλλα οξειδωτικά προϊόντα που παράγονται κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Τέλος στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι υβριδικοί βιοκαταλύτες (ORLAP-100, ORKUN-100, ORSWy-2-100, LAP-100, KUN-100 και SWy-2-100) επέδειξαν καλύτερη λειτουργική σταθερότητα σε σχέση με την

λυοφιλιωμένη CaLB μετά από 4 κύκλους αντιδράσεων κατά την χημειοενζυμική εποξείδωση του  $\alpha$ -πινενίου.

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η μετατροπή του μαστιχελαίου μέσω της χημειο-ενζυμικής εποξείδωσης των βασικών συστατικών του, με απώτερο στόχο την εκλεκτική οξείδωση των περιεχόμενων μονοτερεπενίων σε παράγωγα με υψηλή βιολογική αξία. Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος στην τροποποίηση του μαστιχελαίου, χρησιμοποιώντας οκτανοϊκό ή δωδεκανοϊκό οξύ. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με βάση την παραγωγή της βερμπενόλης και της βερμπενόνης. Διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερη παραγωγή οξυγονωμένου παραγώγου επιτεύχθηκε με τη χρήση του οκτανοϊκού οξέος από ότι με δωδεκανοϊκό οξύ, δηλαδή με τη χρήση λιπαρού οξέος με λιγότερα άτομα άνθρακα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι η συγκέντρωση της βερμπενόνης ήταν κατά 50% μεγαλύτερη με την χρήση οκτανοϊκού οξέος σε σχέση με τη χρήση δωδεκανοϊκού οξέος. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με παρόμοιες μελέτες στις οποίες εξετάστηκαν λιπαρά οξέα μεσαίου και μεγάλου μήκους ανθρακικής αλυσίδας σε παρόμοια συστήματα και από τα οποία διαπιστώθηκε ότι η παραγωγή σε υπεροξύ επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη απόδοση όταν χρησιμοποιείται λιπαρό οξύ με μικρό μήκος ανθρακικής αλυσίδας [Bjorkling *et al.*, 1990; Rusch gen Klaas and Warwel, 1997; Moreira and Nascimento, 2007].

Σε μια προσπάθεια μίμησης του φυσικού περιβάλλοντος του μαστιχελαίου, η ενζυμικά καταλύσιμη οξείδωση του πραγματοποιήθηκε σε μίγματα μαστιχελαίου και εξανίου. Προς την κατεύθυνση αυτή το μέσο της αντίδρασης περιείχε αυξανόμενα ποσοστά σε μαστιχέλαιο, από 10 έως 100% (κ.ο) και αντίστοιχα μειωμένα ποσοστά εξανίου από 90 έως 0% (κ.ο). Βρέθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του μαστιχελαίου δεν οδηγεί σε γραμμική αύξηση της παραγωγής του εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου. Παρόμοια συμπεριφορά παρατηρήθηκε κατά την χημειο-ενζυμική σύνθεση εποξειδίου με την χρήση της Novozym 435<sup>®</sup> σε ανάλογα συστήματα οργανικών διαλυτών [Vleck and Petrovic, 2006]. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί σε περιορισμούς στη μεταφορά μάζας των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Γενικά τα υποστρώματα της ενζυμικής αντίδρασης (υπεροξειδίο του υδρογόνου και οκτανοϊκό οξύ) πιθανώς να έχουν μειωμένη διαλυτότητα στο μαστιχέλαιο σε σχέση με το εξάνιο και έτσι να παρουσιάζεται δυσκολία στη μεταφορά τους από το μέσο αντίδρασης στο μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι με την χρήση 100% (κ.ο) μαστιχελαίου η συγκέντρωση των εποξειδίων του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου, της βερμπενόλης και βερμπενόνης μετά

από 120 h αντίδρασης ήταν 623 mM, 580 mM, 33.1 mM και 19.0 mM, αντίστοιχα. Τα παραπάνω οξυγονωμένα παράγωγα είναι πολύ σημαντικές ουσίες στη βιομηχανία ως πρόσθετα γεύσης και αρώματος, και χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα, καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα [Loutrari *et al.*, 2004; Koutsoudaki *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007; Kobilinsky *et al.*, 2007; Trytek *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Martino *et al.*, 2008].

Η μελέτη της βιολογικής δράσης τόσο των οξυγονωμένων παραγώγων του μαστιγελαίου όσο και του ιδίου του αιθέριου ελαίου έναντι στην επαγόμενη από όγκους αγγειογένεση, μελετήθηκε με την εφαρμογή τεχνικών που εξετάζουν: α) τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό LLC (Lewis lung carcinoma, κύτταρα αδενοκαρκινώματος από πνεύμονα ποντικού) και β) τα επίπεδα VEGF (vascular endothelial growth factor) από τα καρκινικά κύτταρα. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι τόσο τα οξυγονωμένα παράγωγα του  $\alpha$ -πινενίου (εποξειδίου του  $\alpha$ -πινενίου και κυρίως βερμπενόνη και βερμπενόλη) όσο και το μαστιχέλαιο παρεμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου του πνεύμονα των ποντικών και προκαλούν ελάττωση της έκκρισης του VEGF, ενός πολύ σημαντικού προ-αγγειογενετικού παράγοντα, από τα καρκινικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, αξίζει να σημειωθεί ότι με την χρήση τόσο οξειδοαναγωγικών ενζύμων όπως της CPO και των TvL, ThL και BcL όσο και υδρολυτικών όπως της CaLB πραγματοποιήθηκε η τροποποίηση βασικών συστατικών του μαστιγελαίου σε μια σειρά μη συμβατικών συστημάτων. Αναφορικά με τη CPO παρατηρήθηκε ότι διατήρησε τις καταλυτικές της ιδιότητες σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζουντα απουσία επιφανειοενεργού μορίου, κατά την κατάλυση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων υποστρωμάτων. Η δράση της στα συστήματα αυτά επηρεάστηκε από τη σύσταση του μέσου (εάν σχηματίζονταν από εξάνιο ή  $\alpha$ -πινένιο, 2-προπανόλη ή τριτοταγή βουτανόλη, ή από το ποσοστό της υδατικής φάσης) καθώς και από την φύση του οξειδωτικού φορέα ( $H_2O_2$  ή του  $t$ -BHP<sub>d</sub>). Μετά τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών δράσης της CPO, επιχειρήθηκε η τροποποίηση τερπενολών (βασικών συστατικών του μαστιγελαίου) προς τις αντίστοιχες αλδεϋδες σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε η σύνθεση υψηλών συγκεντρώσεων γερανιάλης, νεράλης και περιλλυλ-αλδεϋδης κάτω από ήπιες βιοκαταλυτικές διεργασίες.

Αντίστοιχα οι καταλυτικές ιδιότητες της εμπορικά διαθέσιμης TvL (ελεύθερης ή ακινητοποιημένης σε οργανοπήκτωμα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC), καθώς και των ενζύμων ThL και BcL που παρήχθησαν και απομονώθηκαν στο εργαστήριο βιοτεχνολογίας εξετάστηκαν σε διάφορα μη συμβατικά μέσα, από τα οποία διαπιστώθηκε ότι

η οξειδωση τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων υποστρώματων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη σύσταση του μέσου. Επίσης η ακινητοποίηση της TvL σε οργανοπήκτωμα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC, αύξησε την σταθερότητα του ενζύμου σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες (π.χ  $\alpha$ -πινενιο,  $d$ -λιμονένιο) σε σύγκριση με την ελεύθερη TvL. Επιπλέον η βιομετατροπή τόσο βασικών συστατικών του μαστιχελαίου όσο και του ίδιου του αιθέριου ελαίου με την ταυτόχρονη χρήση τριών διαφορετικών διαμεσολαβητών, οδήγησε στην σύνθεση οξυγονωμένων προϊόντων, των οποίων η συγκέντρωση στο τελικό προϊόν ήταν αυξημένη.

Τέλος με σκοπό την τροποποίηση των υδρόφοβων συστατικών του μαστιχελαίου σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση της CaLB σε φυλλόμορφους αργίλους. Από την ακινητοποίηση του ενζύμου προέκυψαν καταλυτικά ενεργοί βιοκαταλύτες, ιδιαίτερα στην περίπτωση που ως φορείς ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν οργανόφιλοι άργιλοι. Η επιτυχής ένθεση του βιομορίου στον άργιλο επιβεβαιώθηκε με την χρήση διαφορετικών τεχνικών (SEM, XRD, XPS, DTA/TGA, FTIR), ενώ η διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής της λιπάσης έγινε με χρήση υπερύθρου φάσματος με μετασχηματισμό κατά (FT-IR) στην περιοχή Amide I. Οι βιοκαταλύτες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την μετατροπή του  $\alpha$ -πινενίου, του  $d$ -λιμονενίου και του μαστιχελαίου σε ένα σύστημα που περιλαμβάνει αρχικά μια ενζυμική αντίδραση που ακολουθείται από μια χημική. Προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων ήταν τα οξυγονωμένα παράγωγα των αντίστοιχων μονοτερπενίων τα οποία και ανιχνεύτηκαν σε πάρα πολύ υψηλές συγκεντρώσεις. Έτσι με βάση τα αποτελέσματα αυτά η χρήση των λιπασών ήταν από τις πιο ευνοϊκές για την βιομετατροπή των μονοτερπενίων κάτω από ήπιες βιοδιεργασίες.



---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η δυνατότητα ανάπτυξης βιοκαταλυτικών διεργασιών για την τροποποίηση των βασικών συστατικών του μαστιγελαίου με στόχο την αύξηση της βιολογικής τους δράσης. Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η δυνατότητα βιομετατροπής τόσο του αιθέριου ελαίου όσο και των βασικών συστατικών του όπως π.χ του  $\alpha$ -πινενίου και του  $d$ -λιμονενίου, με τη χρήση απομονωμένων ενζύμων όπως η χλωροϋπεροξειδάση από τον μύκητα *Caldariomyces fumago* (CPO) και οι λακκάσες από τους μύκητες *Trametes versicolor* (TvL), *Trametes hirsuta* (ThL) και *Botrytis cinerea* (BcL), αλλά και υδρολυτικών ενζύμων όπως η λιπάση B από *Candida antarctica* (CaLB), σε μη συμβατικά συστήματα. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιήθηκαν είτε σε ελεύθερη μορφή (ως υδατικά διαλύματα) είτε ως ακινητοποιημένα ενζυμικά σκευάσματα. Η ενζυμικά καταλυόμενη τροποποίηση των υδρόφοβων μονοτερπενίων εξετάστηκε σε μη συμβατικά συστήματα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό (μικρογαλακτώματα, τριαδικά συστήματα, οργανικά μέσα) που σχηματίζονται με βάση τα κύρια συστατικά του μαστιγελαίου ( $\alpha$ -πινένιο,  $d$ -λιμονένιο).

Με στόχο τη μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων της CPO σε μικρογαλακτώματα, η επίδραση της σύστασης και του βαθμού ενυδάτωσης του συστήματος, της φύσης του οξειδωτικού φορέα καθώς επίσης και η διαθεσιμότητα του υποστρώματος μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπες αντιδράσεις τη χλωρίωση της μονοχλωροδιμεδόνης (MCD) και την εποξειδωση του στυρενίου. Διαπιστώθηκε ότι στα συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο τα οποία έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, η σταθερότητα της CPO είναι σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με άλλα μέσα (μέχρι και 65% εναπομένουσα δραστηριότητα μετά από 24 h επώσης στους 30°C). Η αυξημένη σταθερότητα της CPO επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα της διαφορικής θερμιδομετρίας σάρωσης DSC. Η μελέτη με τη χρήση του ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού, (EPR) έδειξε ότι στα συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό το μικροπεριβάλλον του σιδήρου της αίμης του ενεργού κέντρου του ενζύμου δεν υφίσταται σοβαρές τροποποιήσεις. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι σε όλες τις περιπτώσεις ακολουθείται η κινητική Michaelis-Menten και ότι οι κινητικές σταθερές της CPO εξαρτώνται ισχυρά από τη σύσταση του τριαδικού συστήματος και ιδιαίτερα από την περιεκτικότητά του σε νερό. Αξιοσημείωτη είναι η επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων

αντιδράσεων οξείδωσης τόσο ολεφινών όσο και τερπενολών (γερανιόλης, νερόλης και περιλλύλ-αλκοόλης) που καταλύονται από τη CPO σε διάφορα τριαδικά συστήματα. Ο ολικός αριθμός μετατροπής (TTN) που προσδιορίστηκε κατά την οξείδωση διαφόρων ολεφινών και τερπενολών σε τριαδικά συστήματα με βάση το  $\alpha$ -πινένιο, είχε τιμές μέχρι και 25000, οι οποίες είναι 2-170 φορές υψηλότερες από αυτές που έχουν μέχρι τώρα δημοσιευτεί.

Τα ένζυμα TvL, ThL, BcL επέδειξαν βελτιωμένη καταλυτική δραστηριότητα (5 έως 10 φορές) σε μέσα πλούσια σε  $\alpha$ -πινένιο, ενώ παράλληλα βέλτιστες ταχύτητες οξείδωσης παρατηρήθηκαν σε συστήματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (15.5% v/v). Επίσης από την κινητική μελέτη της οξείδωσης του ABTS που καταλύεται από τις λακκάσες διαπιστώθηκε ότι οι κινητικές σταθερές των ενζύμων εξαρτώνται από τη σύσταση του τριαδικού συστήματος. Επιπλέον η σταθερότητα των λακκασών ήταν αυξημένη σε τριαδικά συστήματα που σχηματίζονται με βάση τα μονοτερπένια  $\alpha$ -πινένιο ή  $d$ -λιμονένιο (μέχρι και 90% εναπομένουσα δραστηριότητα μετά από 24h επώασης στους 30°C) σε σύγκριση με άλλα μη συμβατικά συστήματα. Διαπιστώθηκε ότι η ενζυμική τροποποίηση τόσο των τερπενίων ( $\alpha$ -πινενίου,  $d$ -λιμονενίου) όσο και του ιδίου του μαστιχελαιίου που καταλύεται τόσο από ελεύθερες όσο και ακινητοποιημένες λακκάσες εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση και τη συγκέντρωση των διαμεσολαβητών.

Στην εργασία μελετήθηκε η τροποποίηση των συστατικών του μαστιχελαιίου μέσω της χημειο-ενζυμικής οξείδωσής τους με τη χρήση ακινητοποιημένης λιπάσης. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η δυνατότητα ακινητοποίησης της λιπάσης CaLB σε φυλλόμορφους αργίλους (απλούς και οργανοτροποποιημένους). Οι υβριδικοί βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν από μια σειρά τεχνικών όπως περίθλαση ακτίνων-X (XRD), φωτοηλεκτρονική φασματοσκοπία ακτίνων-X (XPS), θερμική ανάλυση (TGA/DTA), φασματοσκοπία μέσω υπερύθρου (FTIR) και με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Ο δομικός και ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της ακινητοποιημένης λιπάσης αποκάλυψε ότι το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται στους οργανικά τροποποιημένους αργίλους, δημιουργεί ευνοϊκές αλλαγές στην δομή και στην βιοκαταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου, οδηγώντας σε αυξημένη θερμική σταθερότητα (75% μετά από 24h επώασης σε εξάνιο στους 60°C). Επιπλέον από την ανάλυση του υπερύθρου φάσματος με μετασχηματισμό κατά (FT-IR) στην περιοχή Amide I, διαπιστώθηκε ότι η δευτεροταγής δομής του ενζύμου αλλάζει μετά την ακινητοποίηση του ανάλογα με τον φορέα ακινητοποίησης. Επίσης με την χρήση της ακινητοποιημένης λιπάσης επιτεύχθηκε τόσο η μετατροπή του μαστιχελαιίου όσο και του  $\alpha$ -πινενίου ή του  $d$ -λιμονενίου, στα αντίστοιχα εποξειδία. Η απόδοση του παραγόμενου εποξειδίου επηρεάζεται σε μεγάλο

βαθμό από το φορέα ακινητοποίησης, τη φύση και τη συγκέντρωση του οξειδωτικού φορέα καθώς επίσης και από την πολικότητα του οργανικού διαλύτη. Ακόμη η ακινητοποιημένη CaLB διατήρησε μέχρι και το 90% της αρχικής της δραστηρότητας, ακόμη και μετά από 48h επώασης παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα ( $H_2O_2$ ) καθώς και μέχρι 60% μετά από τέσσερις κύκλους αντίδρασης (96h συνολικής αντίδρασης στους  $50^\circ C$ ). Γενικά η δραστηρότητα και η σταθερότητα της λιπάσης σε αυτή τη βιοκαταλυτική διεργασία είναι από τις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Συμπερασματικά τόσο τα οξειδοαναγωγικά (CPO, TvL, ThL, BcL) όσο και τα υδρολυτικά (CaLB) ένζυμα είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά σε μη τοξικά συστήματα αποτελούμενα από τα βασικά συστατικά του μαστιγελαίου για την ανάπτυξη βιοδιεργασιών που θα στοχεύουν στην τροποποίηση τους και την παρασκευή παραγώγων (βερμπενόλη, βερμπενόνη) με αυξημένη βιολογική δράση.



---

## ABSTRACT

---

In the present PhD thesis, it was studied the development of biocatalytic process for the modification of main constituents of mastic oil, with ultimate target the increasement of their biological action. For this purpose, it was investigated the biotransformation of the essential oil and its main constituents such as  $\alpha$ -pinene and *d*-limonene, with the use of enzymes such as chloroperoxidase from the fungus *Caldariomyces fumago* (CPO) and laccases from the fungus *Trametes versicolor* (TvL), *Trametes hirsuta* (ThL) and *Botrytis cinerea* (BcL), as well as with the use of hydrolytic enzymes such as lipase B from *Candida antarctica* (CaLB), in non conventional media. These enzymes were used either in free form or immobilized on solid supports. The enzymatic biotransformation of the hydrophobics monoterepenes were examined in non conventional media with low water content (microemulsions, ternary systems, organic media) which are formed with main constituents of mastic oil ( $\alpha$ -pinene, *d*-limonene).

With the aim to maximize the catalytic performance of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* (CPO) in surfactant free ternary systems, the influence of the composition and the hydration state of the system, the nature of the oxidizing agent as well as substrate availability on the catalytic behavior and stability of the enzyme was investigated, using the chlorination of monochlorodimedone (MCD) and the epoxidation of styrene as model reactions. It was concluded that in low water systems formulated with  $\alpha$ -pinene CPO stability is significantly increased compared to other reaction media (up to 65% residual activity after 24 h of incubation at 30°C). The increased stability was in accordance with differential scanning calorimetry (DSC) findings. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy indicated that in low water content systems the ferric environment of the active site of CPO does not undergo severe modifications. The kinetic analysis in all cases followed the Michaelis-Menten kinetic and the results revealed that the catalytic efficiency of CPO strongly depended on the composition and the water content of ternary systems. Notable is the accomplishment of the enzymatic oxidation of various olefins and terpenols (geraniol, nerol, perillyl alcohol) catalyzed by CPO in various ternary systems. Total turnover numbers (TTN) obtained for the oxidation of terpenols in  $\alpha$ -pinene-based systems, were up to 25,000 which is 2–170 times higher than previously reported values.

The enzymes TvL, ThL, BcL exhibited improved catalytic efficiency (5 to 10-fold) in  $\alpha$ -pinene-rich environment, while optimal reaction rates were observed in high-water content systems (15.5% v/v). Also the kinetic study, which was based on laccase-catalyzed oxidation of ABTS, revealed that the kinetic constants of the enzymes are strongly affected by the composition of the ternary systems. Moreover laccases stability significantly improved in monoterpene-based systems (up to 90% residual enzyme activity after 24 hours at 30°C) in comparison with other non conventional media. Finally the enzymatic modification of the terpenes ( $\alpha$ -pinene, *d*-limonene) and of the mastic oil, which is catalyzed by free or immobilized laccases, depend from the nature and the concentration of the mediator.

Also in the present study the modification of the main constituents of mastic oil was studied through their chemoenzymatic oxidation with the use of immobilized lipase. For this reason it was investigated the immobilization of the lipase CaLB onto nanoclays (parent or organic-modified clays). The resulting hybrid biocatalysts were characterized by a combination of powder X-ray diffraction (XRD), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), thermogravimetric and differential thermal analysis (TGA/DTA) infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron spectroscopy (SEM). Structural and biochemical characterization of immobilized lipase revealed that the microenvironment created by the organically modified clays induces beneficial changes on the structure and biocatalytic behaviour resulting in enhanced thermal stability (75% after incubation for 24 hours in *n*-hexane at 60°C). Moreover from the FT-IR spectroscopy in the Amide I region, it was concluded that the secondary structure of the enzyme upon immobilization into parent or organomodified clays changed. With the use of the immobilized lipase it was successfully achieved the chemoenzymatic epoxidation of mastic oil,  $\alpha$ -pinene and *d*-limonene. The production yield of the epoxide is strongly affected by the carrier, the nature and the concentration of the oxidizing agent as well as from the polarity of the organic solvent. The enzyme retains up to 90% of its initial activity, even after 48 hours of incubation in the presence of oxidant (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and up to 60% after four reaction cycles (96 hours of total reaction time at 50°C). Generally the activity and stability of immobilized CaLB in this biocatalytic process is of the highest that have been mentioned in the literature. By inference, both oxidoreductase (CPO, TvL, ThL, BcL) and hydrolase (CaLB) enzymes can be efficiently employed in non toxic systems, which are composed by the basic components of mastic oil, for the development of bioconversions, which main target is the modification of terpenes into oxygenated products (verbenol, verbenone) with increased biological action.

---

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

### Α

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K.H., Cavaco-Paulo A., and Gubitz, G.M., (2000), Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**:3357-3362.
- Abian, O., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., (2001), Stabilization of immobilized enzymes against water soluble organic cosolvents and generation of hyper-hydrophilic microenvironments surrounding enzyme molecules, *Biocatal. Biotransfor.*, **19**:489-504.
- Aburto, J., Ayala, M., Bustos-Jaimes, I., Montiel, C., Terres, E., Dominguez, J.M., Torres, E., (2005), Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials, *Microp. Mesop. Mat.*, **83**:193-200.
- Adam W., Lazarus, M., Saha-Moller, C.R., Weichold, O., Hoch, U., Haring, D., Schreier, P., (1999), in: T. Scheper (editor), *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 73-108.
- Adamczak, M., Hari Krishna, S., (2004), Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis, *Food Technol. Biotechnol.*, **42**(4):251-264.
- Adams, A., Demyttenaere, J.C.R., De Kimpe, N., (2003), Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene to  $\alpha$ -terpineol by *Penicillium digitatum*- investigation of the culture conditions, *Food Chem.*, **80**: 525-534.
- Aehle, W., (2004), *Enzymes in Industry*, WILEY-VCH Verlag GmbH and Co KGaA, Weinheim.
- Agostini, E., Hernandez-Ruiz, J., Arnao, M.B., Milrand, S.R., Tigier, H.A., Acosta, M., (2002), A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root culture inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **35**:1-7.
- Águila, S., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Rivera, M., Pecchi, G., Alderete, J.B., (2008), Stereoselective oxidation of R-(+)-limonene by chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*, *Green Chem.*, **10**(6):647-653.
- Ahmad, A.L., Oh, P.C., Shukor S.R.Abd., (2009), Sustainable biocatalytic synthesis of L-homophenylalanine as pharmaceutical drug precursor, *Biotechnol. Adv.*, **27**(3):286-296.
- Akar, S.T., Akar, T., Kaynak, Z., Anilan, B., Cabuk, A., Tabak, Ö., Demir, T.A., Gedikbey, T., (2009), Removal of copper(II) ions from synthetic solution and real wastewater by the combined action of dried *Trametes versicolor* cells and montmorillonite, *Hydrometallurgy*, **97**(1-2):98-104.
- Akoh, C.C., Lee, G.C., Liaw, Y.C., Huang, T.H., Shaw, J.F., (2004), GDSL family of serine esterases/lipases, *Progr. Lipid Res.*, **43**:534-552.
- Aktas, N., Çiçek, H., Ünal, A.T., Kibarar, G., Kolankaya, N., Tanyolaç, A., (2001), Reaction kinetics for laccase-catalyzed polymerization of 1-naphthol, *Bioresour. Technol.*, **80**:29-36.
- Aktas, N., Tanyolac, A., (2003), Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol, *Bioresour. Technol.*, **87**:209-214.
- Akutagawa, S., (1992), A practical synthesis of menthol with the Rh-BINAP catalyst. In: A.N. Collins et al., Editors, *Chirality in industry*, pp. 313-323.
- Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Greb-Markiewicz B., Peczynska-Czoch, W., (2002), Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers, *Process Biochem.*, **37**(12):1387-1394.
- Alcalde, M., (2007), Laccase: biological functions, molecular structure and industrial applications. In *Industrial Enzymes: structure, function and applications* Edited by: J Polaina J, MacCabe AP. New York, Springer, pp 459-474.
- Allgaier, C., (2006), Red biotechnology in the 21st century, *Pharm. Ind.*, **68**(2):157-169.

Al-Said, M. S., Ageel, A. M., Parmar, N. S., Tariq, M., (1986), Evaluation of mastic, a crude drug obtained from *Pistacia lentiscus* for gastric and duodenal anti-ulcer activity. *J. Ethnopharmacol.*, **15** (3):271-278.

Anarbaev, R.O., Rogozina, A.L., Lavrik O.I., (2009), DNA polymerase  $\beta$  reveals enhanced activity and processivity in reverse micelles, *Biophys. Chem.*, **141**:11-20.

Anderson, AE, Larsson, KM, Kirk, O., (1998), One biocatalyst: many applications. The use of *Candida antarctica* lipase B in organic synthesis, *Biocatal. Biotransfor.*, **16**:181-204.

Andrade, L.H., Silva, A.V., (2008), First chemoenzymatic synthesis of organoselenium amines and amides, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **19**(10):1175-1181.

Andrade, S.L.A., Brondino, C.D., Kamenskaya, E.O., Levashov, A.V., Moura, J.J.G., (2003), Kinetic behavior of *Desulfovibrio gigas* aldehyde oxidoreductase encapsulated in reverse micelles, *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **308**:73-78.

Andre, P., (2001), D'un Syst'eme Colloidal aux Propri'et'es de Surface. PhD thesis, Universit'e Pierre et Marie Curie (Paris VI).

Andrikopoulos, N.K., Kaliora, A.C., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., (2003), Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against in vitro LDL oxidation, *Phytotherapy Res.*, **17**:501-507.

Ankudey, E.G., Horacio O.F., Peeples, T.L., (2006), Lipase-mediated epoxidation utilizing urea-hydrogen peroxide in ethyl acetate, *Green Chem.*, **8**:923-926.

Aoun, S., Baboulène, M., (1998), Regioselective bromohydroxylation of alkenes catalyzed by chloroperoxidase: Advantages of the immobilization of enzyme on talc, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **4**:101-109.

Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T., (2007), Lipase applications in food industry, *Indian J. Biotechnol.*, **6**(2):141-158.

Arends, I.W.C.E., Li, Y.-X., Sheldon, R.A., (2006), Stabilities and rates in the laccase/TEMPO-catalyzed oxidation of alcohols, *Biocatal. Biotransform.*, **24**:443-448.

Arnold, F.H., (2001), Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design, *Nature*, **409**: 253-257.

Asuri, P., Bale, S.S., Karajanagi, S.S., Kane, R.S., (2006), The protein-nanomaterial interface, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**:562-568.

Atwood, J.A., Rehm, B.H.A., (2009), Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads, *Biotechnol. Lett.*, **31**(1):131-137.

Auffret, (2008), Microscopic and macroscopic properties of AOT/Isooctane/Water sheared lyotropic lamellar phases, phd.

Avramiotis, S., Lianos, P., Xenakis, A., (1997), Trypsin in lecithin based w/o microemulsions. Fluorescence and enzyme activity studies, *Biocatal. Biotransform.*, **14**:299-316.

Ayala, M., Horjales, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R., (2002), Cross-linked crystals of chloroperoxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **295**:828-831.

Aymard, C., Belarbi, A., (2000), Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism, *Enzyme Microb. Technol.*, **27**:612-618.

## B

Bae, E., Bannen, R.M., Phillips, G.N.Jr., (2008), Bioinformatic method for protein thermal stabilization by structural entropy optimization, *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **105**:9594-9597.

Bai, C., Jiang, Y., Hu, M., Li, S., Zhai, Q., (2009), Improvement of Chloroperoxidase catalytic activities by chitosan and thioglycolic acid, *Catal. Lett.*, **129**:457-461.

Baiocco, P., Barreca, A.M., Fabbrini, M., Galli C., Gentili, P., (2003), Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems, *Org. Biomol. Chem.*, **1**:191-197.

Baker, W.L., Sabapathy, K., Vibat, M., Lonergan, G., (1996), Laccase catalyzes formation of an indamine dye between 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-dimethylaminobenzoic acid, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**:90-94.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck D., Idaomar, M., (2008), Biological effects of essential oils-a review, *Food Chem. Toxicol.*, **46**:446-475.
- Bakker, M., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2000), Highly efficient immobilization of glycosylated enzymes into polyurethane foams, *Biotechnol. Bioeng.*, **70**:342-348.
- Balan, K.V., Demetzos, C., Prince, J., Dimas, K., Cladaras, M., Han, Z., Wyche, J.H., Pantazis, P., (2005), Induction of apoptosis in human colon cancer HCT116 cells treated with an extract of the plant product, Chios mastic gum, *In Vivo*, **19**:93-102.
- Balan, K.V., Prince, J., Han, Z., Dimas, K., Cladaras, M., Wyche, J.H., Sitaras, N.M., Pantazis, P., (2007), Antiproliferative activity and induction of apoptosis in human colon cancer cells treated in vitro with constituents of a product derived from *Pistacia lentiscus* L. var. *chia*, *Phytomedicine*, **14**(4):263-72.
- Baldascini, H., Janssen, D.B., (2005), Interfacial inactivation of epoxide hydrolase in a two-liquid-phase system, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**(2-3):285-293.
- Baldrian, P., (2006), Fungal laccases: occurrence and properties, *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**:215-242.
- Ballantine, J.A., (1986), NATO ASI-Ser., Ser. C., **165**:197.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D., (2005), Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.*, **78**:431-441.
- Banci, L., Ciofi-Baffoni, S., Tien, M., (1999), Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers, *Biochemistry-US*, **38**(10):3205-3210.
- Bannen, R.M., Suresh, V., Phillips, G.N., Jr, Stephen J. Wright, S.J., Mitchell. J.C., (2008), Optimal design of thermally stable proteins, *Bioinformatics*. **24**(20):2339-2343.
- Bar, M., (2001), Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases, (Master of Science), University of the Free State, Bloemfontein.
- Baratto, L., Candido, A., Marzorati, M., Sagui, F., Riva, S., Danieli, B., (2006), Laccase-mediated oxidation of natural glycosides, *J. Mol. Cat. B. Enzym.*, **39**:3-8.
- Barberis, S., Quiroga, E., Arribere, M.C. Priolo, N., (2002), Peptide synthesis in aqueous-organic biphasic systems catalyzed by a protease isolated from *Morrenia brachystephana* (Asclepiadaceae), *J. Mol. Catal. B. Enzym.*, **17**:39-47.
- Bardon, S., Foussard, V., Fournel, S., Loubat, A., (2002), Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression, *Cancer Lett.*, **181**(2):187-94.
- Bardy, S.L., Sandy, Y.M.Ng., Carnegie D.S., Jarrell K.F., (2005), Site-directed mutagenesis analysis of amino acids critical for activity of the type I signal peptidase of the archaeon *Methanococcus voltae*, *J. Bacteriol.*, **187**(3):1188-1191.
- Baron, M.H., Revault, M., Servagent-Noinville S., Abadie J., Quiquampoix, H., (1999), Chymotrypsin adsorption on montmorillonite: enzymatic activity and kinetic FTIR structural analysis, *J. Colloid Interf. Sci.*, **214**:319-332.
- Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., Angioni, A., (2007), Characterization of the volatile constituents in the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from different origins and its antifungal and antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(17):7093-7098.
- Barreca, A.M., Gren, B.S., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P., (2004), Catalytic efficiency of some mediators in laccase-catalyzed alcohol oxidation, *Biocatal. Biotransfor.*, **22**(2):105-112.
- Barrer, R.M., (1989), Shape-selective sorbents based on clay minerals: a review, *Clay Clay Miner.*, **37**:385-395.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., Guisan, J.M., (1998), A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports, *Biotechnol. Bioeng.*, **58**:486-493.
- Bastos, A.C., Magan, N., (2009), *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **63**(4):389-394.

- Bauer, C.G., Kuehn, A., Gajovic, N., Skorobogatko, O., Holt, P.J., Bruce, N.C., Makower, A., Lowe, C.R., Scheller, F.W., (1999), New enzyme sensors for morphine and codeine based on morphine dehydrogenase and laccase, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **364**:179-183.
- Bayramoglu, G., Kiralp, S., Yilmaz, M., Toppare, L., M., Arica Y., (2008), Covalent immobilization of chloroperoxidase onto magnetic beads: Catalytic properties and stability, *Biochem. Eng. J.*, **38**:180-188.
- Belanger, J.T., (1998), Perillyl alcohol: applications in oncology. *Altern Med Rev.*, **3**(6):448-57.
- Bello-Ramirez, A.M., Carreon-Garabito B.Y., Nava-Ocampo, A.A., (2000), A theoretical approach to the mechanism of biological oxidation of organophosphorus pesticides, *Toxicology*, **149**:63-68.
- Belopolskaya, T.V., Tsereteli, G.I., Grunina, N.A., Vaveliou, O.L., (2000), DSC study of the postdenaturated structures in biopolymer.water systems, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **62**:75-88.
- Benhammou, N., Bekkara, F.A., and Tatjana Kadifkova Panovska, T.K., (2008), Antioxidant and antimicrobial activities of the *Pistacia lentiscus* and *Pistacia atlantica* extracts, *Afr. J. Pharmacy Pharmacol.*, **2**(2):22-28.
- Benz, P. Muntwyler, R., Wohlgemuth, R., (2007), Chemoenzymatic synthesis of chiral carboxylic acids via nitriles, *J. Chem.Technol. Biotechnol.*, **82**(12):1087-1098.
- Berchtold, C.M., Chen, K.S., Miyamoto, S., Gould, M.N., (2005), Perillyl alcohol inhibits a calcium-dependent constitutive nuclear factor -kB pathway. *Cancer Res.* **65**: 8558-8566.
- Bertrand, G., (1896), Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons, *C. R .Hebd. Seances Acad. Sci.*, 123:463-465.
- Bertrand, T., Jolival, C., Brioso, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., Mougin, C., (2002), Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics, *Biochemistry* **41**:7325-7333.
- Betancor, L., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., (2004), Prevention of interfacial inactivation of enzymes by coating the enzyme surface with dextran-aldehyde, *J. Biotechnol.*, **110**(2):201-207.
- Biles, C.L., Martyn, R.D., (1993), Peroxidase, polyphenol oxidase and shikimate dehydrogenase isozymes in relation to the tissue type, maturity and pathogen induction of watermelon seedlings, *Plant Physiol. Biochem.*, **31**:499-506.
- Bittar, E.R., Caldeira, F.R., Santos, A.M.C., Günther, A.R., Rogana, E., Santoro, M.M., (2003), Characterization of  $\beta$ -trypsin at acid pH by differential scanning calorimetry, *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **36**:1621-1627.
- Bjorkling, F., Godtfredsen, S.E., Kirk, O., (1990), Lipase-mediated formation of peroxycarboxylic acids used in catalytic oxidation of alkenes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1301-1303.
- Bjorkling, F., Frykman, H., Godtfredsen, S.E., Kirk, O., (1992), Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidations, *Tetrahedron*, **48**:4587-4592.
- Blanford, C.F., Heath R.S., nd Armstrong, F.A., (2007), A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O<sub>2</sub> reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface, *Chem. Commun.*, (17):1710-1712.
- Blanke, S.R., Martinis, S.A., Sligar, S.G., Hager, L.P., Rux, J.J., Dawson, J.H., (1996), Probing the heme iron coordination structure of *alkaline chloroperoxidase*, *Biochemistry-US.*, **35**:14537-14543.
- Blattner, C., Zoumpantioti, M., Kröner, J., Schmeer, G., Xenakis, A., Kunz, W., (2006), Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluid*, **36**(3):182-193.
- Bock, G., Benda I., Schreier P., (1986), Biotransformation of linalool by *Botrytis cinerea*, *J. Food Sci.*, **51**(3):659-662.
- Bogel-Lukasik, R., Najdanovic-Visak, V., Barreiros S., Nunes da Ponte M., (2008), Distribution ratios of lipase-catalyzed reaction products in ionic liquid supercritical CO<sub>2</sub> systems: resolution of 2-octanol enantiomers, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47**(13):4473-4480.
- Bommarius, A.S., Riebel, B.R., (2004), Biocatalysis, *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim.
- Bommarius, A.S., Broering, J.M., (2005), Established and novel tools to investigate biocatalyst stability, *Biocatal. Biotransfor.*, **23**(3-4):125-139.

- Bonomo, R.P., Cennamo, G., Purrello, R., Santoro A.M., Zappala, R., (2001), Comparison of three fungal laccases from *Rigidoporus lignosus* and *Pleurotus ostreatus*: correlation between conformation changes and catalytic activity, *J. Inorg. Biochem.*, **83**:67-75.
- Boon, P.J.M., van der Boon, D., Mulder G.J., (2000), Cytotoxicity and biotransformation of the anticancer drug perillyl alcohol in PC12 cells and in the rat, *Toxicology Appl. Pharmacol.*, **167**(1):55-62.
- Bordusa, F., (2002), Proteases in organic synthesis, *Chem. Rev.*, **102**:4817-4867.
- Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J., (1999), Hydrolases in organic synthesis, *Wiley-VCH*, Weinheim.
- Bornscheuer, U.T., Pohl M., (2001), Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**(2):137-43
- Bornscheuer, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H., (2002), Optimizing lipases and related enzymes for efficient application, *Trends Biotechnol.*, **20**(10):433-437.
- Bornscheuer, U.T., (2003), Immobilizing enzymes: how to create more suitable biocatalysts, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**:3336-3337.
- Boskin, A., Tran C.D., Franko, M., (2008), Oxidation of organophosphorus pesticides with chloroperoxidase enzyme in the presence of an ionic liquid as co-solvent, *Environ. Chem. Lett.*, DOI 10.1007/s10311-008-0161-2
- Bougioukou, D.J., Smonou, I., (2002), Chloroperoxidase catalyzed oxidation of conjugated dienoic esters, *Tetrahedron Lett.*, **43**:339-342.
- Boumans, J.W.L., Nagtegaal, R.M.A., Dunnewind, A., Happe, R.P., Bos, M.A., Faegemand, M., Degn, P., (2006), A method for enzymatic cross-linking of a protein, cross-linked protein thus obtained and use thereof. WO Patent 2006/016809 2006.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., (1990), Oxidation of non-phenolic substrates an expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Lett.*, **267**:99-102.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. Yaguchi, M., (1995), Lignin oxidation by laccase enzymes from *Trametes versicolor* and the role of the mediator in 2,2'-azinobis(3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) kraft lignin depolymerization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**:1876-1880.
- Bourbonnais, R., Paice, M.G., Freiermuth, B., Bodie, E., Borneman, S., (1997), Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds, *Appl. Environ. Microb.* **63**:4627-4632.
- Bourbonnais, R., Leech, D., Paice, M.G., (1998), Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds, *Biochim. Biophys. Acta*, **1379**:381-390.
- Bradford, M.M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.*, **72**:248-254.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Huge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U., (1990), A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase, *Nature*, **343**:767-770.
- Brenda, H., Jennings, C., Akoh, C., Eun, J.-B., (2007), Lipase-catalyzed modification of sesame oil to incorporate capric acid, *J. Food Lipids*, **7**(1):21-30.
- Bressler, D.C., Fedorak, P.M., Pickard, M.A., (2000), Oxidation of carbazole, N-ethylcarbazole, fluorene, and dibenzothiophene by the laccase of *Corioloopsis gallica*, *Biotechnol. Lett.*, **22**:1119-1125.
- Brockman, H.L., Momsen, W.E., Tsujita, T., (1988), Lipid-lipid complexes: properties, *JAOCS*, **65**: 891-896.
- Browicz, K., (1987), *Pistacia lentiscus* cv. Chia (Anacardiaceae) on Chios island, *Pl. Syst. Evol.*, **155**:189-195.
- Brown, E.D., Yada, R.Y., Marangoni, A.G., (1993), The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**(1):66-72.

Bruggink, A., Straathof, A.J.J., van der Wielen, L.A.M., (2003), Fine chemical industry for life science products: green solutions to chemical challenges. In: *Advances in biochemical engineering/ biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **80**:69-113.

Burke, R.M., Cairney, J.W.G., (2002), Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi, *Mycorrhiza*, **12**:105-116.

Burke, Y.D., Stark, M.J., Roach, S.L., Sen, S.E., Crowell, P.L., (1997), Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary isoprenoids farnesol and geraniol, *Lipids*, **32**(2):151-156.

Burton, S.G., (2003), Oxidizing enzymes as biocatalysts, *Trends Biotechnol.*, **21**:543-549.

## C

Cai, S., Singh, B.R., (1999), Identification of beta-turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins, *Biophys. Chem.*, **80**(1):7-20.

Call, H.P., (1996), Mehrkomponentensystem zum Verändern, Abbau oder Bleichen von Lignin, ligninhaltigen Materialien oder ähnlichen Stoffen sowie Verfahren zu seiner Anwendung. EP 0717143A1.

Call, H.P., Mucke, I., (1997), History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym<sup>®</sup>-process), *J. Biotechnol.*, **53**:163-202.

Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M.J., Martínez, A.T., (2005), Lignin-derived compounds as efficient laccase-mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes, *Appl. Environ. Microb.* **71**:1775-1784.

Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K.H., Cavaco-Paulo A., Gübitz G.M., (2001), Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*, *J. Biotechnol.*, **89**:131-139.

Cañas, A., Alcalde, M., Plou, F.J., Martínez, M.J., Martínez, A.T., Camarero, S., (2007), Transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase is strongly enhanced by phenolic compounds present in soil, *Environ. Sci. Technol.*, **41**:2964-2971

Canfora, L., Iamarino, G., Rao, M.A., Gianfreda, L., (2008), Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase, *J. Agr. Food Chem.*, **56**(4):1398-1407.

Cao, L., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2000), Cross-Linked enzyme aggregates: a simple and effective method for the immobilization of *Penicillin acylase*, *Org. Lett.*, **2**(10):1361-1364.

Cao, L., (2005), Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**:217-226.

Cao, L., (2006), Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, application and design. Wiley-VCH, Weinheim, pp 563.

Caramyshev, A.V., Lobachov, V.M., Selivanov, D.V., Sheval, E.V., Vorobiev, A.Kh., Katasova, O.N., Polyakov, V.Y., Makarov, A.A., Sakharov, I.Yu., (2007), Micellar peroxidase-catalyzed synthesis of chiral polyaniline, *Biomacromolecules*, **8**(8):2549-2555.

Carboni-Oerlemans, C., Dominguez de Maria, P., Tuin, B., Bargeman, G., van der Meer, A., van Gemert, R., (2006), Hydrolase-catalysed synthesis of peroxycarboxylic acids: Biocatalytic promiscuity for practical applications, *J. Biotechnol.*, **126**(2):140-151.

Carja, G., Ciobanu, G., Apostolescu, G., Dranca, S., Apostolescu, N., (2009a), Hydrotalcite-like anionic clays substituted with iron / laccase, composites for biosensors applications, *P I Soc. Opt. Eng.*, **7297**:15.

Cârjă, G., Răţtoi, S., Ciobanu, G., Balasanian, I., (2009b), Glucose oxidase-Vanadium substituted anionic clay as bionanocomposite formulations for biosensors applications, *Environ. Eng. Manage. J.*, **8**(1):55-58.

Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Durantou, B., Gosse, F., Seiler, N., Raul F., (2001), Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**:197-200.

Carnesecchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F., Raul, F., (2002), Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-fluorouracil treatment, *Pharmacology*, **301**(2):625-630.

Carrea, G., Riva, S., (2000), Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**:2226-2254.

- Carrez, D., (2006), Impact of industrial biotechnology, *Europabio*.
- Carvalho, C.M.L., Cabral, J.M.S., (2000), Reverse micelles as reaction media for lipases, *Biochimie*, **82**:1063-1085.
- Casey, W.H., (2002), The fate of chlorine in soils, *Science*, **295**:985-986.
- Cassells, J.M., Halling, P.J., (1990), Protease-catalyzed peptide synthesis in aqueous-organic two-phase system, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**:755-759.
- Castillo, B., Méndez, J., Al-Azzam W., Barletta, G., Griebenow, K., (2006), On the relationship between the activity and structure of PEG- $\alpha$ -chymotrypsin conjugates in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, **94**(3):565-574.
- Castro, G.R., Knubovets, T., (2003), Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **23**(3):195-231.
- Chaiwut, P., Kanasawud, P., Halling, P.J., (2007), Solid-to-solid peptide synthesis by glycyl endopeptidase, *Enzyme Microb. Technol.*, **40**(4):954-960.
- Chambin, O., Champion, D., Debray, C., Rochat-Gonthier, M.H., Le Meste M., Pourcelot, Y., (2004), Effects of different cellulose derivatives on drug release mechanism studied at a preformulation stage, *J. Control. Release*, **95**(1):101-108.
- Chang, H-J., Kim, H.J., Chun, H.S., (2007), Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids, *Life Sci.*, **80**(9):835-841.
- Chefetz, B., Chen, Y., Hadar, Y., (1998), Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:3175-3179.
- Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A., (2009), Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **59**(1-3):206-211.
- Chen, G.-J., Yen, M.-C., Wang, J.-M., Lin, J.-J., Chiu, H.-C., (2008), Layered inorganic/enzyme nanohybrids with selectivity and structural stability upon interacting with biomolecules, *Bioconjugate Chem.*, **19**:138-144.
- Chen, G.X., Yoon, J.S., (2005), Clay functionalization and organization for delamination of the silicate tactoids in poly(L-lactide) matrix, *Macromol. Rapid. Commun.*, **26**(11):899-904.
- Chen, J., Zhang, J., Han, B., Li, J., Li, Z., Feng, X., (2006), Effect of compressed CO<sub>2</sub> on the chloroperoxidase catalyzed halogenation of 1,3-dihydroxybenzene in reverse micelles, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**(7):877-881.
- Chen, L.-Y., (2009), Monitoring conformational changes of immobilized RNase A and Lysozyme in reductive unfolding by surface plasmon resonance, *Anal. Chim. Acta*, **631**:96-101.
- Chen, W., Chen, H., Xia, Y., Yang, J., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H.P., Zhang, H., (2009), Immobilization of recombinant thermostable  $\beta$ -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus* for lactose hydrolysis in milk, *J. Dairy Sci.*, **92**(2):491-498.
- Chen, X.C., Hu, S.P., Shen, C.F., Dou, C.M., Shi J.Y., Chen, Y.X., (2009), Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution, *Bioresour. Technol.*, **100**(1):330-337.
- Chen, Y.Z., Yang, C.T., Ching, C.B., Xu, R., (2008), Immobilization of lipases on hydrophobized zirconia nanoparticles: highly enantioselective and reusable biocatalysts, *Langmuir*, **24**(16):8877-8884.
- Cheng, J., Yu, S. M., Zuo, P., (2006), Horseradish peroxidase immobilized on aluminum pillared interlayer clay for the catalytic oxidation of phenolic water, *Water Res.*, **40**:283-290.
- Ghiaci, M., Aghaei, H., Soleimanian, S., Sedaghat, M.E., (2009), Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase, *Appl. Clay Sci.*, **43**(3-4):289-295.
- Chiacchierini, E., Restuccia, D., Vinci, G., (2004), Bioremediation of food industry effluents: recent applications of free and immobilised polyphenoloxidases, *Food Sci. Technol. Int.*, **10**(6):373-382.
- Chiang, T.H., Hsieh T.-E., (2008), A study of UV-curable epoxide resins containing thermal accelerator -Tertiary amines, *React. Funct. Polym.*, **68**(2):601-612.
- Chiappe, C., Neri, L., Pieraccini, D., (2006), Application of hydrophilic ionic liquids as co-solvents in chloroperoxidase catalyzed oxidations, *Tetrahed. Lett.*, **47**:5089-5093.

- Cho, S.-J., Park, S.J., Lim, J.-S., Rhee, Y.H., Shin, K.-S., (2002), Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase of *Coriolus hirsutus*, *Biotechnol. Lett.*, **24**:1337-1340.
- Cho, S.-H., Shim, J., Moon, S.-H., (2009), Detoxification of simulated textile wastewater using a membraneless electrochemical reactor with immobilized peroxidase, *J. Hazard. Mat.*, **162**(1-3):1014-1018.
- Choi, W.G., Lee, S.B., Ryu, D.D.Y., (2004), Cephalixin synthesis by partially purified and immobilized enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**(2):361-371.
- Christiano, S.P., Wang, J., Pinnavaia, T.J., (1985), Intercalation of niobium and tantalum  $M_6Cl_{12}^{n+}$  cluster cations in montmorillonite: a new route to pillared clays, *Inorg. Chem.*, **24**:1222-1227.
- Çiftçi, O.N., Fadilolu, S., Göüş, F., (2009), Conversion of olive pomace oil to cocoa butter-like fat in a packed-bed enzyme reactor, *Bioresource Technol.*, **100**(1):324-329.
- Cinelli, G., Cuomo, F., Hochkoepler, A., Ceglie, A., Lopez, F., (2006), Use of *Rhodotorula minuta* live cells hosted in water-in-oil macroemulsion for biotransformation reaction, *Biotechnol. Prog.*, **22**:689-695.
- Claus, H., Filip, Z., (1997), The evidence for a laccase-like enzyme activity in a *Bacillus sphaericus* strain, *Microbiol. Res.*, **152**:209-216.
- Claus, H., (2003), Laccases and their occurrence in prokaryotes, *Arch. Microbiol.*, **179**:145-150.
- Claus, H., (2004), Laccases: structure, reactions, distribution, *Micron.*, **35**:93-96.
- Cole, B.J.W., Fort, Jr., R.C., Nguyen, M., Overly, K.R., Pedro, R., (2005), Selectivity in the oxidation of carbohydrate-bound lignin. I. Docking of lignin models to the laccase from *Trametes versicolor*, *Appita Annu. Conference*, **3**:87-92.
- Coll, P.M., Perez, P., Villar, E., Shnyrov, V.L., (1994), Domain structure of laccase I from the lignin-degrading basidiomycete PM1 revealed by differential scanning calorimetry, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**(6):1091-1098.
- Collado, I.G., Hanson, J.R., Macías-Sánchez, A.J., Mobbs, D., (1998), The Biotransformation of Some Clovanes by *Botrytis cinerea*, *J. Nat. Prod.*, **61**(11):1348-1351.
- Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., Pasta, P., (1992), Chloroperoxidase and hydrogen-peroxide-an efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **3**:95-106.
- Colonna, S., Gaggero, N., Richelmi, C., Pasta, P., (1999), Recent biotechnological developments in the use of peroxidase, *Rev.*, **17**:163-168.
- Coman, V., Vaz-Domínguez, C., Ludwig, R., Harreither, W., Haltrich, D., De Lacey, A.L., Ruzgas, T., Gorton, L., Shleev, S., (2008), A membrane-, mediator-, cofactor-less glucose/oxygen biofuel cell, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**:6093-6096.
- Conesa, A., van de Velde, F., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., (2001), Expression of the *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase in *Aspergillus niger* and characterisation of the recombinant enzyme, *J. Biol. Chem.*, **276**:17635-17640.
- Conesa, A., Punt, P.J., van den Hondel, C.A.M.J.J., (2002), Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, *J. Biotechnol.*, **93**:143-158.
- Converti, A., Del Borghi, M., (1997), Simultaneous effects of immobilization and substrate protection on the thermodynamics of glucose isomerase activity and inactivation, *Enzyme Microb. Technol.*, **21**:511-517.
- Cooney, C.L., Hueter, J., (1974), Enzyme catalysis in the presence of nonaqueous solvents using chloroperoxidase, *Biotechnol. Bioeng.*, **16**:1045-1053.
- Cordova, A., Iverson, T., Hult, K., (1998), Lipase catalysed formation of macrocycles by the ring opening polymerisation of caprolactone, *Polymer*, **39**(25):6519-24.
- Cornelis A, Laszlo, P., (1986), NATO ASI Ser Ser C, *Math. Phys. Sci.*, **165**:213.
- Cotoras, M., Silva, E., (2005), Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape, *Mycologia*, **97**(2):485-492.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., Hofer, D., Gübitz, G.M., (2004), Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization of dyes from a leather factory, *Eng. Life Sci.*, **4**(3):233-238.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., (2005), Novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions. Application to lissamine green B decolourization, *J. Food Eng.*, **71**(2):208-213.

Couto, S.R., Rosales E., Sanromán, M.A., (2006), Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors, *Chemosphere*, **62**(9):1558-1563.

Couto, S.R., (2009), Dye removal by immobilised fungi, (2009), *Biotechnol. Adv.*, **27**(3):227-235.

Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M., (1997), Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.*, **60**:52-60.

Cragg, G.M., Newman, D.J., (2004/Rev.2006), Plants as a source of anti-cancer agents, in *Ethnopharmacology*, [Eds. Elaine Elisabetsky, Nina L. Etkin], in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, [<http://www.eolss.net>].

Crowell, P.L., Chang, R.R., Ren, Z., Elson, C.E., Gould, M.N., (1991), Selective inhibition of isoprenylation of 21–26 kDa proteins by the anticarcinogen *d*-limonene and its metabolites, *J. Biol. Chem.*, **266**:17679-17685.

Crowell, P.L., Elegbede, J.A., Elson, C.E., Lin, S., Bailey, H.H., Vedejs, E., Gould, M.N., (1994a), Human metabolism of the antitumor agent *d*-limonene, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **35**:31-37.

Crowell, P.L., Gould, M.N., (1994b), Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene, *Crit. Rev. Oncog.*, **5**:1-22.

Crowell, P.L., (1999), Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes, *J. Nutr.*, **129**:775S-778S.

Cygler, M., Schrag, J.D., Sussman, J.L., Harel, M., Silman, J., Gentry, M.K., Dector, B.P., (1993), Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases and related proteins, *Protein Sci.*, **2**:336-382.

Czimerova, A., Bujdak J., Dohrmann, R., (2006), Traditional and novel methods for estimating the layer charge of smectites, *Appl. Clay Sci.*, **34**(1-4):2-13.

## D

d'Acunzo, F., Galli, C., Masci, B., (2002), Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems: Solubility and steric issues, *Eur. J. Biochem.*, **269**:5330-5335.

d'Acunzo, F., Galli, C., (2003), First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models, *Eur. J. Biochem.* **270**:3634-3640.

d'Acunzo, F., Galli, C., Gentili, P., Sergi, F., (2006), Mechanistic and steric issues in the oxidation of phenolic and non-phenolic compounds by laccase or laccase-mediator systems. The case of bifunctional substrates, *New J. Chem.*, **30**:583-591.

Dai, L., Klibanov, A.M., (1999), Striking activation of oxidative enzymes suspended in nonaqueous media, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**:9475-9478.

Daifas, D.P., Smith, J.P., Blanchfield, B., Sanders, G., Austin, J.W., Koukoutisis, J., (2004), Effects of mastic resin and its essential oil on the growth of proteolytic *Clostridium botulinum*, *Int. J. Food Microbiol.*, **94**:313-322.

Dandavate, V., Madamwar, D., (2007), Novel approach for the synthesis of ethyl isovalerate using surfactant coated *Candida rugosa* lipase immobilized in microemulsion based organogels, *Enzyme Microb. Tech.*, **41**(3):265-270.

Dandavate, V., Madamwar, D., (2008), Reusability of surfactant-coated *Candida rugosa* lipase immobilized in gelatin microemulsion-based organogels for ethyl isovalerate synthesis, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**(4):735-741.

Danielsson, I., Lindman, B., (1982), The definition of microemulsions., *Colloids Surf.*, **3**:391.

Darder, M., Aranda, P., Hernández-Vélez, M., Manova E., and Ruiz-Hitzky E., (2006), Encapsulation of enzymes in alumina membranes of controlled pore size, *Thin Solid Films*, **459**(1-2):321-326.

Dasgupta, A., Das, D., Mitra, R.N., Das, P.K., (2005), Surfactant tail length-dependent lipase activity profile in cationic water-in-oil microemulsions, *J. Colloid Interf. Sci.*, **289**:566-573.

- Dave, R., Madamwar, D., (2008), *Candida rugosa* lipase immobilized in Triton-X100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis, *Process Biochem.*, **43**(1):70-75.
- Davies, M.J., (2005), The oxidative environment and protein damage, *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**:93-109.
- Davis, P. H., (1967), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*; Edinburgh University Press, Edinburgh, UK, **2**:546.
- Dawson, J.H., Sono, M., (1987), Cytochrome P-450 and chloroperoxidase: Thiolate-ligated heme enzymes. Spectroscopic determination of their active site structures and mechanistic implications of thiolate ligation, *Chem. Rev.*, **87**, 1257-1273.
- Debrunner, P.G., Dexter, A.F., Schulz, C.E., Xia, Y-M., Hager, L.P., (1996), Mössbauer and electron paramagnetic resonance studies of chloroperoxidase following mechanism-based inactivation with allylbenzene, *PNAS*, **93**(23):12791-12798.
- De Cristofaro, A., Violante, A., (2001), Effect of hydroxy-aluminium species on the sorption and interlayering of albumin onto montmorillonite, *Appl. Clay Sci.*, **19**:59-67.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., (2004), Fluorescence and cd spectroscopic analysis of the  $\alpha$ -Chymotrypsin stabilization by the ionic liquid, 1-Ethyl-3-methylimidazolium Bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]amide, *Biotechnol. Bioeng.*, **88**(7):916-924.
- De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M., Iborra, J.L., (2005), Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid, *Biomacromolecules* **6**:1457-1464.
- De Diego, T., Lozano, P., Abad, M.A., Steffensky, K., Vaultier, M., Iborra, J.L., (2009), On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis, *J. Biotechnol.*, **140**:234-241.
- de Fuentes, I.E., Viseras, C.A., Ubiali, D., Terreni, M., Alcantara, A.R., (2001), Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **11**(4-6):657-663.
- Degn, P., Pedersen, L.H., Duus, J., Zimmerman, W., (1999), Lipase catalysed synthesis of glucose fatty acid esters in *t*-butanol, *Biotechnol. Lett.*, **21**:275-280.
- De Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A., (1998), Enzymes in low water systems, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**:53-89.
- de Lathouder, K.M., van Benthem, D.T.J, Wallin, S.A., Mateo, C., Lafuente, R.F., Guisan, J.M., Kapteijn, F, Moulijn, J.A., (2008), Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: Preparation and performance, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **50**(1):20-27.
- Delimitsou, C., Zoumpantioti, M., Xenakis, A., Stamatis, H., (2002), Activity and stability studies of *mucor miehei* lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels, *Biocatal. Biotransfor.*, **20**(5):319-327.
- De los Ríos, A.P., Hernández-Fernández, F.J., Tomás-Alonso, F., Gómez, D., Villora, G., (2008), Synthesis of flavour esters using free *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids, *Flavour. Fragr. J.*, **23**:319-322.
- De Martino, L., Iorio, M., Coppola, G., Campana, A., Savastano, C., Fusco, B.M., De Feo, V., (2008), Verbena officinalis essential oil and citral as apoptotic inducers in leukocytes of healthy subjects and chronic myeloid leukemic patients, *Pharmacology*, **2**:170-175.
- de Melo, J.V., Cosnier, S., Mousty, C., Martelet, C., Jaffrezic-Renault, N., (2002), Urea biosensors based on immobilization of urease into two oppositely charged clays (laponite and Zn-Al layered double hydroxides), *Anal Chem.*, **74**(16):4037-4043.
- Deng, H.-T., Xua, Z.-K., Wu, J., Ye, P., Liu, Z.-M., Seta, P., (2004), A comparative study on lipase immobilized polypropylene microfiltration membranes modified by sugar-containing polymer and polypeptide, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **28**:95-100.
- De-Oliveira, A.C.A.X., Ribeiro-Pinto, L.F., Paumgarten, F.J.R., (1997), In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by  $\beta$ -myrcene and other monoterpenoid compounds, *Toxicol. Lett.*, **92**(1):39-46.
- de Paiva, L.B., A.R., Morales, Valenzuela Díaz F.R., (2008), Organoclays: Properties, preparation and applications, *Appl. Clay Sci.*, **42**(1-2):8-24.
- Derewenda, U., Brzozowski, A.M., Lawson, A.M., Derewenda, Z.S., (1992), Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase, *Biochem.*, **31**:1532-1541.

- Desnuelle, P., Sarda, L., Ailhaud, G., (1960), Inhibition de la lipase pancreatique par le diethyl-p-nitrophenylphosphate en émulsion, *Biochim. Biophys. Acta*, **37**:570-571.
- De Vries, E.J., Janssen, B.D., (2003), Biocatalytic conversion of epoxides, *Curr. Opin. Biotech.*, **14**(4):414-420.
- Dexter, A.F., Lakner, F.J., Campbell, R.A., Hager, L.P., (1995), Highly enantioselective epoxidation of 1,1-disubstituted alkenes catalyzed by Chloroperoxidase, *J. Am. Chem. Soc.*, **117** (23):6412-6413.
- Diamantidis, G., Effosse, A., Potier, P., Bally, R., (2001), Purification and characterization of the first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*, *Soil Biol. Biochem.*, **32**:919-927.
- Dietrich, D.R., Swenberg, J.A., (1991), The presence of alpha 2μ-globulin is necessary for *d*-limonene promotion of male rat kidney tumors, *Cancer Res.*, **51**:3512-3521.
- Digrak, M., Alma, M. H., Heim, A., (2001), Antibacterial and antifungal activities of Turkish plants, *Pharm. Biol.*, **39**:346-350.
- Dittmer, N.T., Suderman, R.J., Jiang, H., Zhu, Y.C., Gorman, M.J., Kramer, K.J., Kanost, M.R., (2004), Characterization of cDNAs encoding putative laccase- like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **34**:29-41.
- Dizge, N., Aydinler, C., Imer, D.Y., Bayramoglu, M., Tanriseven, A., Keskinler, B., (2009), Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer, *Bioresource Technol.*, **100**(6):1983-1991.
- Dodor, D.E., Hwang, H.-M., Ekunwe, S.I.N., (2004), Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*, *Enzyme Microb. Technol.*, **35**(2-3):210-217.
- Doi, K., Wei, M., Kitano, M., Uematsu, N., Inoue M., Wanibuchi, H., (2009), Enhancement of preneoplastic lesion yield by Chios Mastic Gum in a rat liver medium-term carcinogenesis bioassay, *Toxicol. Appl. Pharm.*, **1**(1):135-142.
- Dominguez, A., Couto S.R., and Sanroman MA., (2005), Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads, *World J. Microbiol., Biotechnol.*, **21**:405-409
- Domínguez, A., Gómez, J., Lorenzo, M., Sanromán, Á., (2007), Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**:367-373.
- Dominguez de Matia, P., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., van der Meer, A., van Gemert, R., (2005), Biotechnological applications of *Candida Antarctica* lipase A: State-of-the-art, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **37**(1-6):36-46.
- Dong, Y., Feng, S.-S., (2005), Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, **26**(30):6068-6076.
- Doukas, C., (2003), Cosmetics that contain mastic gum and mastic oil, *Chem. Chron.*, **12**:36-39.
- Dove, A., (1998), Pulling green biotechnology out of the red, *Nat. Biotechnol.*, **16**:1022-1024.
- Drechsler, U., Fischer N.O., Frankamp B.L., Rotello, V.M., (2004), Highly efficient biocatalysts via covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on ethylene glycol-modified gold-silica nanocomposites, *Adv. Mat.*, **16**(3):271-274.
- Dudai, N., Weinstein, Y Krup, M, Rabinski, T, Ofir, R., (2005), Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines, *Planta Med.*, **71**(5):484-488.
- Durán, N., Esposito, E., (2000), Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Appl. Catalysis B: Environ.*, **28**:83-99.
- Durán, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L., (2002), Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. *Enzyme Microb. Technol.*, **31**:907-931.
- Duran, R., Corrales, E., Hernández-Galán, R., Collado, I.G., (1999), Biotransformation of caryophyllene oxide by *Botrytis cinerea*, *J. Nat. Prod.*, **62**(1):41-44.

Durand, J., Teuma, E., Gómez, M., (2007), Ionic liquids as a medium for enantioselective catalysis, *CR Chim.*, **10**(3):152-177.

Durao, P., Chen, Z., Fernandes A.T., Hildebrandt, P., Murgida, D.H., Todorovic, S., Pereira, M.M., Melo E.P., Martins L.O., (2008), Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**:183-193.

## E

Eggert, C., Temp U., Eriksson, K.E.L., (1996), The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:1151-1158.

Eijsink, V.G., Bjørk, A., Gaseidnes, S., Sirevag, R., Synstad, B., van den Burg, B., Vriend, G., (2004), Rational engineering of enzyme stability, *J. Biotechnol.*, **113**:105-120.

Eijsink, V.G., Gaseidnes, S., Borchert, T.V., van den Burg, B., (2005), Directed evolution of enzyme stability, *Biomol. Eng.*, **22**:21-30.

Einstein, A., (1905), On a heuristic point of view concerning the production and transformation of light, *Ann. Physik*, **17**:132-148.

Elegbede, J.A., Elson, C.E., Tanner, M.A., Qureshi, A., Gould, M.N., (1986). Regression of rat primary mammary tumors following dietary *d*-limonene, *J. Natl. Cancer Inst.*, **76**:323-325.

Elson, C.E., Yu, S.G., (1994), The chemoprevention of cancer by mevalonate-derived constituents of fruits and vegetables. *J. Nutr.*, **124**: 607-614.

Endo, T., Martland, M.M., Pinnavaia, T.J., (1980), Intercalated of silica in smectite, *Clay Clay Miner.*, **28**:105-110.

Ergül, F.E., Sargin, S., Öngen, G., Sukan, F.V., (2009), Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*, *Int. Biodeter. Biodegr.*, **63**(1):1-6.

## F

Fadda, M.B., Dessi, M.R., Rinaldi, A., Satta, G., (1989), Sandy alumina as substrate for economic and highly efficient immobilization of beta-glucosidase, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**:777-779.

Fan, K-K., Ouyang, P., Wu, X., Lu, Z., (2001), A model of interfacial inactivation for papain in aqueous organic biphasic systems, *Enzyme Microb. Technol.*, **28**(1):3-7.

Fan, Z., Yuan, L., Chatterjee, R., (2009). Increased Hydrogen Production by Genetic Engineering of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 4(2): e4432. doi: 10.1371 / journal. pone. 0004432

Farinas, E.T., Bulter, T., Arnold, F.H, (2001), Directed enzyme evolution, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**(6):545-551.

Farooq, A., Tahara, S., Choudhary, M.I., Rahmana, A., Ahmed, Z., Can Baser, K.H., Demirci F., (2002), Biotransformation of  $\alpha$ -pinene by *Botrytis cinerea*, *Z. Naturforsch.*, **57**(3-4):303-306.

Fedorak, P.M., Semple, K.M., Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D.W.S., (1993), Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**:429-437.

Feliu, J.A., Mas, C., Lopez-Santin, J., (1995), Studies on papain action in the synthesis of Gly-Phe in two-liquid-phase media, *Enzyme Microb. Technol.*, **17**:882-887.

Fernández-Sánchez, C., Tzanov, T., Gübitz G.M., and Cavaco Paulo, A., (2002), Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions, *Bioelectrochemistry* **58**:149-156.

Ferraroni M., Myasoedova, N.M., Schmatchenko, V., Leontievsky, A.A., Golovleva, L.A., Scozzafava, A., Briganti F., (2007), Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases, *BMC Structural Biology*, **7**:60

Fessner, W.D., Jones, J.B., (2001), Biocatalysis and biotransformation from discovery to application, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**: 103-105.

Festa, G., Autore, F., Fraternali, F., Giardina, P., Sannia, G., (2008), Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses, *Proteins*, **72**:25-34.

Figueras, F., (1988), Pillared clays as catalysts, *Catal. Rev., Sci. Eng.*, **30**:457-499.

Figuerola-Espinoza, M.C., Rouau, X., (1998), Oxidative cross-linking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylated arabinoxylans, *Cereal Chem.*, **75**(2):259-265.

Flachsmann, F., Gautschi, M., Bachmann, J.-P., Brunner, G., (2008), Enzyme-triggered and self-cleaving fragrant alcohol precursors, *Chem. Biodiversity*, **5**(6):1115-1136.

Fletcher, P.D.I., Robinson, B.H., Freedman, R.B., Oldfield, C., (1985), Activity of lipase in water-in-oil microemulsions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **81**:2667-2679.

Flores, C., Vidal, C., Trejo-Hernández, M.R., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., (2009), Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures, *J. Appl. Microbiol.*, **106**:249-257.

Fontes, N., Harper, N., Halling, P.J., Barreiros, S., (2003), Salt hydrates for in situ water activity control have acid-base effects on enzymes in nonaqueous media, *Biotechnol. Bioeng.*, **82**(7):802-808.

Fortina, M.G., Acquati, A., Rossi P., Manachini P.L., and Gennaro C.Di., (1996), Production of laccase by *Botrytis cinerea* and fermentation studies with strain F226, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **17**:69-72.

Franssen, M.C.R., Weijnen J.G.J., Vincken J.P., Laane C., VanderPlas H.C., (1988), Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of apolar compounds using reversed micelles, *Biocatalysis*, **1**:205-216.

Franzios, G., Mirosou, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou, P., (1997), Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils, *J. Agric. Food Chem.*, **45**:2690-2694.

Freire, R.S., Pessoa, C.A., Mello, L.D., Kubota, L.T., (2003), Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity, *J. Brazil. Chem. Soc.*, **114**(2):230-243.

Freixo, M.R., Frazão, A.K.C., Arteiro, J.M., (2008), Production of laccase and xylanase from *Coriolus versicolor* grown on tomato pomace and their chromatographic behaviour on immobilized metal chelates, *Process Biochem.*, **43**(1):1265-1274.

Fritz-Langhals, E., Kunath, B., (1998), Synthesis of aromatic aldehydes by laccase mediator assisted oxidation, *Tetrahedron Lett.*, **39**:5955-5956.

Frohn M., Shi Y., (2000), Chiral ketone-catalyzed asymmetric epoxidation of olefins. *Synthesis* 2000, **14**:1979-2000.

Fu, K., Griebenow, K., Hsieh, L., Klibanov, A.M., Langer, R., (1999), FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres, *J Control. Release*, **58**:357-366.

## G

Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T., Poulos, T.L., (1997), Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 angstrom resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**:1032-1038.

Galli, C., Gentili, P., (2004), Chemical messengers: mediated oxidations with the enzyme laccase, *J. Phys. Org. Chem.*, **17**:973-977.

Garwood, G.A., Mortland, M.M., Pinnavaia, T.J., (1983), Immobilization of glucose oxidase on montmorillonite clay: hydrophobic and ionic modes of binding, *J. Mol. Catal.*, **22**:153-163.

Georgakilas, V., Gournis, D., Petridis, D., (2001), Organoclay derivatives in the synthesis of macrocycles, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**:4286-4288.

Georgakilas, V., Gournis, D., Bourlinos, A.B. Karakassides, M.A., Petridis, D., (2003), Clays as a host matrix in the synthesis of organic macrocycles, *Chem. Eur. J.*, **9**(16):3904-3908.

Gianfreda, L., Xu, F., Bollag, J.M., (1999), Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes, *Bioremed. J.*, **3**:1-25.

Gianfreda, L., Iamarino, G., Scelza, R., Rao, M.A., (2006), Oxidative catalysts for the transformation of phenolic pollutants: a brief review, *Biocatal. Biotransfor.*, **24**:177-187.

Giannelis, E.P., (1996), Polymer layered silicate nanocomposites, *Adv. Mater.*, **8**(1):29-35.

- Glidewell, C., (1991), Monoterpenes. An easily accessible but neglected class of natural products, *J. Chem. Edu.*, **68**:267-269.
- Gogoi, S., Pathak, M.G., Dutta, A., Dutta, N.N., (2008), Porcine pancreas lipase catalyzed synthesis of lauryl laurate in organic solvent media: A kinetic study, *Indian J. Biochem. Bio.*, **45**(3):192-197.
- Gomez-Flores, R., Verastegui-Rodriguez, L., Quintanilla-Licea, R., Tamez-Guerra, P., Monreal-Cuevas, E. Tamez-Guerra, R., Rodriguez-Padilla, C., (2009), Antitumor properties of *Gymnosperma Glutinosum* leaf extracts, *Cancer Invest.*, **27**(2):149-155.
- Gopinath, S., Sugunan, S., (2007), Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity, *Appl. Clay Sci.*, **35**(1-2):67-75.
- Gorbacheva, M., Morozova, O., Shumakovich, G., Streltsov, A., Shleev, S., Yaropolov, A., (2009), Enzymatic oxidation of manganese ions catalysed by laccase, *Bioorg. Chem.*, **37**(1):1-5.
- Gordaliza, M., (2007), Natural products as leads to anticancer drugs. *Clin. Translational Oncol.*, **9**(12):767-776.
- Goto, M., Momota, A., Ono, T., (2004), DNA extraction by cationic reverse micelles, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **37**:662-668.
- Gotor, V., (2002), Biocatalysis applied to the preparation of pharmaceuticals, *Org. Process Res. Dev.*, **6**:420-426.
- Gotor-Fernandez, V., Busto, E., Gotor, V., (2006), *Candida antarctica* Lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds, *Adv. Synth. Catal.*, **348**:797-812.
- Gougeon, R.D., Soulard, M., Reinholdt, M., Miehe-Brendle, J., Chezeau, J.M., Le Dred, R., Marchal, R., Jeandet, P., (2003), Polypeptide adsorption on a synthetic montmorillonite: A combined solid-state NMR spectroscopy, X-ray diffraction, thermal analysis and N<sub>2</sub> adsorption study, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (7):1366-72.
- Gournis, D., Jankovic, L., Maccallini, E., Benne, D., Rudolf, P., Colomer, J.F., Sooambar, C., Georgakilas, V., Prato, M., Fanti, M., Zerbetto, F., Sarova, G.H., Guldi, D.M., (2006), Clay-fulleropyrrolidine nanocomposites, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**:6154-63.
- Gould, M.N., Moore, C.J., Zhang, R., Wang, B., Kennan, W.S., Haag, J.D., (1994), Limonene chemoprevention of mammary carcinoma induction following direct *in situ* transfer of v-Ha-ras, *Cancer Res.*, **54**:3540-3543.
- Govere, E.M., Tonegawa, M., Bruns, M.A., Wheeler, E.F., Kephart, K.B., Voigt, J.W., Dec, J., (2007), Using minced horseradish roots and peroxidase for the deodorization of swine manure: A pilot scale study. *Bioresource Technol.*, **98**:1191-1198.
- Graham, J.G., Quinn, M.L., Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., (2000), Plants used against cancer - An extension of the work of Jonathan Hartwell, *J. Ethnopharmacol.*, **73**(3):347-377.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Dornisch, K., Ronhert, U., Beushner, N., Elstner, E.F., (2000), Antioxidant properties of essential oils. Possible explanation for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittelforschung*, **50**:135-139.
- Grey, C.E., Rundback, F., Adlercreutz, P., (2008), Improved operational stability of chloroperoxidase through use of antioxidants, *J. Biotechnol.*, **135**:196-201.
- Griebenow, K., Klibanov, A.M., (1997), Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carlsberg in organic solvents? *Biotechnol. Bioeng.*, **53**(4):351-362.
- Griebenow K, Vidal, M., Baez, C., Santos, A.M., Barletta, G., (2001), Native enzyme properties are important for optimum activity in neat organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**:5380-5381.
- Grisham, MB., (1991), Chloroperoxidase: a review. In: Everse J, Everse KE, Grisham MB, editor. Peroxidase in chemistry and Biology. Boca Raton, FL, CRC Press, pp. 85-137.
- Grönqvist, S., Rantanen, K., Raimo, A., Mattinen, M., Buchert, J., Viikari, L., (2006), Laccase-catalysed functionalization of TMP with tyramine, *Holzforschung*, **60**:503-508.
- Guebitz, GM, Buchert, J, Cavaco-Paulo, A, Heine, E., (2006), Advances in biotechnology for fibre processing, *Biotechnol. Lett.*, **28**:679-680.

Guisan, J.M., (2006), Immobilization of enzymes and cells, 2nd edn. Methods in biotechnology 22M, Humana Press, Totowa, pp 500.

Guo, Y., Clark, D.S., (2001), Activation of enzymes for nonaqueous biocatalysis by denaturing concentrations of urea. *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**:406-411.

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

Gutiérrez, A., Rencores, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., del Río, J.C., Martínez, A.T., (2007), Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators, *Environ. Sci. Technol.*, **41**:4124-4129.

Guzman, F., Barberis, S., Illanes, A., (2007), Peptide synthesis: chemical or enzymatic, *Electron J. Biotechnol.*, **10**(2):279-314.

## $\mathcal{H}$

Ha, S.H., Lanb, M.N., Lee, S.H., Hwang, S.M., Koo, Y.-M., (2007), Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**:480-483.

Habulin, M., Primožič, M., Knez, Ž., (2007a), Supercritical fluids as solvents for enzymatic reactions, *Acta Chim. Slov.*, **54**(4): 667-677

Habulin, M., Šabeder, S., Paljevac, M., Primožič, M., Knez, Ž., (2007b), Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media, *J. Supercrit. Fluids*, **43**(2):199-203.

Haering, G., Luisi, P.L., (1986), Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions, *J. Phys. Chem.*, **90**:5892-5895.

Hager, L.P., Morris, D.R., Brown, F.S., Eberwein, H., (1966), Chloroperoxidase II. Utilization of halogen anions, *J. Biol. Chem.*, **241**:1769-1777.

Haibo, Z., Yinglong, Z., Feng, H., Peiji, G., Jiachuan C., (2009), Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsute*, *Biotechnol. Lett.*, **31**:837-843.

Halling, P.J., (2004), What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? *Philos. Trans. R. Soc. Lond B. Biol. Sci.*, **359**:1287-1296.

Hamid, M., Khalil-ur-Rehman, (2009), Potential applications of peroxidases, *Food Chem.*, **115**:1177-1186.

Harper, N., Dolman, M., Moore, B.D., Halling, P.J., (2001), Effect of water activity on the rate profile of subtilisin Carlsberg in toluene in the presence of an organo-soluble acid-base buffer, *Enzyme Microb. Technol.*, **29**(6-7):413-416.

Harris, D.M., Westerlaken, I., Schipper, D., van der Krogt, Z.A., Gombert, A.K., Sutherland, J., Raamsdonk, L.M., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A.L., Pronk, J.T., Daran, J.-M., (2009), Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor, *Metab. Eng.*, **11**(2):125-137.

Hasan, F., Shah, A.A., Hameed, A., (2006), Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, **39**:235-251.

Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, N.N., Hazarika, A.K., (2002), Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents, *Chem. Engin. J.*, **85**(1):61-68.

He, M.L., Yuan, H.Q., Jiang, A.L., Gong, A.Y., Chen, W.W., Zhang, P.J., Young, C.Y., Zhang, J.Y., (2006), Gum mastic inhibits the expression and function of the androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer*, **106**:2547-2555.

Hedley, C.B., Yuan, G., Theng, B.K.G., (2007), Thermal analysis of montmorillonites modified with quaternary phosphonium and ammonium surfactants, *Appl. Clay Sci.*, **35**(3-4):180-188.

Hernando, J., Pourrostami, T., Garrido, J.A., Williams, O.A., Gruen, D.M., Kromka, A., Steinmüller, D., Martin, S.M., (2007), Immobilization of horseradish peroxidase via an amino silane on oxidized ultrananocrystalline diamond, *Diamond Relat. Mater.*, **16**:138-143.

Hilker, I., Bothe, D., Pruck, J., Warnecke, H.-J., (2001), Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated plant oils, *Chem. Eng. Sci.*, **56**:427-432.

- Hill, A.C., (1898), Reversible zymohydrolysis, *J. Chem. Soc.*, **73**:634-658.
- Hinckley, G., Mozhaev, V.V., Budde, C., Khmelnitsky, Y.L., (2002), Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnol. Lett.*, **24**:2083-2087.
- Hirakawa, H., Kamiya, N., Kawarabayashi, Y., Nagamune T., (2005), Log P effect of organic solvents on a thermophilic alcohol dehydrogenase, *BBA Proteins Proteom.*, **1748**(1):94-99.
- Hochkoeppler, A., Luisi P.L., (1989), Solubilization of soybean mitochondria in AOT/isooctane water-in-oil microemulsions. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**:1477-1481.
- Hoet, S., Stévinny, C., Hérent, M.F., Quetin-Leclercq, J., (2006), Antitrypanosomal compounds from leaf essential oil of *Strychnos spinosa*, *Planta Med.* **72**:480-482.
- Hoegh, I., Patkar, S., Halkier, T., Hansen, M.T., (1995) Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*, *Cun. J. Bot.*, **73**:8869-8875.
- Holker, U., Dohse, J., Hofer, M., (2002a), Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*, *Folia Microbiol.*, **47**:423-427.
- Holker, U., Schmiere, H., Große, S., Winkelhöfer, M., Polsakiewicz, M., Ludwig, S., Dohse, J., Höfer, M., (2002b), Solubilization of low-rank coal *Trichoderma atroviride*: evidence for the involvement of hydrolytic and oxidative enzymes by using <sup>14</sup>C-labelled lignite, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **28**:207-212.
- Hollenberg, P.F., Hagern, L.P., Blumberg, W.E., Peisach, J., (1980), An electron paramagnetic resonance study of the high and low spin forms of Chloroperoxidase, *J. Biol. Chem.*, **255**(10):480-487.
- Hong-Mei, L., Nicell, J.A., (2008), Biocatalytic oxidation of bisphenol A in a reverse micelle system using horseradish peroxidase, *Bioresour. Technol.*, **99**(10):4428-4437.
- Horitani, M., Yashiro, H., Hagiwara, M., Hori, H., (2008), Multi-frequency and high-field EPR study of manganese(III) protoporphyrin IX reconstituted myoglobin with an S=2 integer electron spin, *J. Inorg. Biochem.*, **102**(4):781-788.
- Hosny M., Rosazza, J.P.N., (2002), Novel oxidations of (+)-catechin by horseradish peroxidase and laccase, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(20):5539-5545.
- Hrapovic, S., Male, K.B., Liu, Y., Luong, J.H.T., (2008), Preparation of polymer-carbon nanotube composite materials and their applications for enzyme entrapment, *Anal. Lett.*, **41**:278-288.
- Hu, X., Zhao X., Hwang, H., (2007), Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite, *Chemosphere*, **66**(9):1618-1626.
- Hu, K., Li, J., Li, B., Webster, J.M., Chen, G., (2006), A novel antimicrobial epoxide isolated from larval *Galleria mellonella* infected by the nematode symbiont, *Photorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae), *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(13):4677-4681.
- Huang, J., Liu, Y., Jin, Q., Wang, X., Yang, J., (2007), Adsorption studies of a water soluble dye, Reactive Red MF-3B, using sonication-surfactant-modified attapulgite clay, *J. Hazard. Mat.*, **143**:541-548.
- Huang, J., Liu Y., Wang, X., (2008), Influence of differently modified palygorskites in the immobilization of a lipase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **55**(1-2):49-54.
- Huang, L., Cheng, Z-M., (2008), Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis, *Chem. Eng. J.*, **144**(1):103-109.
- Hudson, E.P., Eppler, R.K., Clark, D.S., (2005), Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**(6):637-643.
- Huisman, G.W., Gray D., (2002), Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**:1-7.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H., Przybylski, P., (2008), Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, *Food Chem.*, **108**(3):986-995.

- Huszcza, E., Dmochowska-Gadysz, J., (2003), Transformations of testosterone and related, *Phytochemistry*, **62**(2):155-158.
- Huttermann, A., Mai, C., Kharazipour, A., (2001), Modification of lignin for the production of new compounded materials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**:387-394.
- Huwez, F. U., Thirlwell, D., Cockayne, A., Ala'Aldeen, D.A.A., (1999), Mastic gum kills *Helicobacter pylori*, *N. Engl. J. Med.*, **340**(7):576.
- Hwang, H.M., Hu, X., Zhao, X., (2007), Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques, *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **25**:313-352

## I

- Iafisco, M., Palazzo, B., Falini, G., Di Foggia, M., Bonora, S., Nicolis, S., Casella, L., Roveri, N., (2008), Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate, *Langmuir*, **24**(9):4924-4930.
- Illanes, A., Wilson, L., Caballero E., Fernández-Lafuente, R.;Guisán, J., (2006), Crosslinked penicillin acylase aggregates for synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics in organic medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **133**:189-202.
- Illanes, A., (2008), Enzyme Biocatalysis, Springer.
- Imm, J-Y., Kim, S-C., (2009), Convenient partial purification of polyphenol oxidase from apple skin by cationic reversed micellar extraction, *Food Chem.*, **113**:302-306.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuglu M., Can Baser K.H., (2005), Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella/microsomal* test, *Food Chem.*, **93**:551-556.

## J

- Jacobsen, E.N., (1993), in Catalytic Asymmetric Synthesis, ed. Ojima, I. (VCH, New York), pp. 159-202
- Jacobsen, E.N., (2000), Asymmetric catalysis of epoxide ring-opening reactions. *Acc. Chem. Res.* **33**:421-431.
- Jaeger, KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, van Heuvel M, Misset O., (1994), Bacterial lipases, *FEMS Microbiol. Rev.*, **15**(1):29-63.
- Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T., (1999), Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases, *Ann. Rev. Microbiol.*, **53**:315-351.
- Jaeger K.E., Eggert, T., (2002), Lipase for biotechnology, *Curr. Opin. Biotech.*, **13**:390-397.
- Jain, N., Kumar, A., Chauhan, S., Chauhan. S.M.S., (2005), Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron*, **61**, 1015-1060.
- Janakat, S., Al-Merie, H., (2002), Evaluation of hepatoprotective effect of *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea latifolia* and *Nicotiana glauca*, *J. Ethnopharmacol.*, **83**(1-2):135-138.
- Jang, M.Y., Ryu, W.Y., Cho, M.H., (2006), Enhanced production of laccase from *Trametes* sp. by combination of various inducers, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **11**(2):96-99.
- Jenkin, E.M., Shallcross, D.E., Harvey, J.N., (2000), Development and application of a possible mechanism for the generation of cis-pinic acid from the ozonolysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene, *Atmos. Environ.*, **34**(18):2837-2850.
- Jenta, T.R.J., Batts, G., Rees, G.D. and Robinson, B.H., (1997), Biocatalysis using gelatin microemulsion-based organogels containing immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**:121-131.
- Jeon, J-R., Murugesan, K., Kim, Y-M., Kim, E-J., Chang, Y-S., (2008), Synergistic effect of laccase mediators on pentachlorophenol removal by *Ganoderma lucidum* laccase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**:783-790.
- Jézéquel, K., Lebeau, T., (2008), Soil bioaugmentation by free and immobilized bacteria to reduce potentially phytoavailable cadmium, *Bioresource Technol.*, **99**(4):690-698.

Jia, H., Zhu, G., Vugrinovich, B., Kataphinan, W., Reneker, D.H., Wang, P., (2002), Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts, *Biotechnol. Progr.*, **18**(5):1027-1032.

Jia, J.B., Wang, B.Q., Wu, A.G., Cheng, G.J., Li, Z., Dong, S.J., (2002), A method to construct a third generation horseradish peroxidase biosensor; self assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network, *Anal. Chem.*, **74**:2217-2223.

Jiang, Y., Guo, C., Xia, H., Mahmood, I., Liu C., Liu H., (2009), Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **58**(1-4):103-109.

Johannes, C., Majcherczyk, A., Hüttermann, A., (1996), Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**:313-317.

Johannes, C., Majcherczyk, A., (2000), Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase-mediator systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**:524-528.

John, R.P., Nampoothiri, K., Pandey, A., (2007), Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives, *Appl. Microb. Biot.*, **74**(3):524-534.

Jung, D., Hartmann, M., (2008), Oxidation of Indole with CPO and GOx Immobilized on SBA-15, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **174**(B):1045-1050.

Jung, D., Streb, C., Hartmann, M., (2008), Oxidation of indole using chloroperoxidase and glucose oxidase immobilized on SBA-15 as tandem biocatalyst, *Microp. Mesop. Mat.*, **113**:523-529.

Jung, C., (2008), Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to study structural properties of cytochromes P450 (CYPs), *Anal. Bioanal. Chem.*, **392**:1031-1058.

Jung, Y.A., Row, K.H., (1998), Extraction and purification of perillyl alcohol from Korean orange peel by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **828**(1):445-449.

## K

Kaar, J.L., Jesionowski, A.M., Berberich, J.A., Moulton R., Russel, A., (2003), Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(14):4125-4131.

Kahlweit, M., Busse, G., Faulhaber, B., (1995), Preparing microemulsions with lecithins, *Langmuir*, **11**:1576-1583.

Kaliora, A.C., Mylona, A., Chiou, A., Petsios, D.G., Andrikopoulos, N.K., (2004), Detection and identification of simple phenolics in *Pistacia lentiscus* resin, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **27**(2):289-300.

Kang, K-H., Dec, J., Park H., Bollag, J-M., (2002), Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid, *Water Res.*, **36**(19):4907-4915.

Kantaria, S., Rees, G.D., Lawrence, M.J., (1999), Gelatin-stabilised microemulsionbased organogels. Rheology and application in iontophoretic transdermal drug delivery systems, *J. Control. Release*, **60**:355-365.

Karamyshev, A.V., Shleev, S.C., Koroleva, O.V., Yaropolov, A.I., Sakharov, I.Y., (2003), Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline, *Enzyme Microb. Tech.*, **33**:556-564.

Karmee, S.K., Casiraghi, L., Greiner, L., (2007), Technical aspects of biocatalysis in non-CO<sub>2</sub>-based supercritical fluids, *Biotechnol. J.*, **3**(1):104-111.

Kastle, J.H., Loevenhart, A.S., (1900), Concerning lipase, the fat-splitting enzyme, and the reversibility of its action, *Am. Chem. J.*, **24**:91-525.

Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Tsironis, L., Tselepis, A.D., H. Stamatis, H., (2006), Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency, *J. Biotechnol.*, **123**(4):491-503.

Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Katapodis, P., Kolis, F.N., Stamatis H., (2007), Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids, *Process Biochem.*, **42**(9):1326-1334.

Kaup, B.A., Piantini, U., Schrader, M.W.J., (2007), Monoterpenes as novel substrates for oxidation and halo-hydroxylation with chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **73**:1087-1096.

- Kawai, S., Umezawa, T., Higuchi, T., (1989), Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldahyde, *Wood Res.*, **76**:10-16.
- Keh, E., Valeur, B., (1981), Investigation of water-containing inverted micelles by fluorescence polarization. Determination of size and internal fluidity, *J. Colloid Interf. Sci.*, **79**:465-478.
- Keiser, B.A., Varie, D., Barden, R.E., Holt, S.L., (1979), Detergentless water/oil microemulsions composed of hexane, water, and 2-propanol. 2. Nuclear magnetic resonance studies, effect of added NaCl, *J. Phys. Chem.*, **83**:1276-1280.
- Kelly, R.M., Dijkhuizen, L., Leemhuis, H., (2009), Starch and  $\alpha$ -glucan acting enzymes, modulating their properties by directed evolution, *J. Biotechnol.*, **140**(3-4):184-193.
- Kemmegne Mbougouen, J., Ngameni, E., Walcarius, A., (2006), Organoclay-enzyme film electrodes, *Anal. Chim. Acta*, **578**:145-155.
- Keum Y.S., Li, Q.X., (2004), Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls, *Chemosphere*, **56**:23-30.
- Khosla, C., Harbury, P.B., (2001), Modular enzymes, *Nature*, **409**:247-252.
- Kiefer M., Bresler F., Salisbury S., Pandergrass S., (1994), Investigation of D Limonene use during aircraft maintenance degreasing operations. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, **9**:303-311.
- Kiernan, J.A., (2000), Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do, *Microsc. Today*, **1**:8-12.
- Kiljunen, E., Kanerva, L.T., (2000), Chloroperoxidase-catalyzed oxidation of alcohols to aldehydes, *J. Mol. Cat. B-Enzym.*, **9**:163-172.
- Kim, J., Grate, J.W., Wang, P., (2006), Nanostructures for enzyme stabilization, *Chem. Eng. Sci.*, **61**(3):1017-1026.
- Kim, M.-K., (2002), Enzyme-assisted delignification of several pulps by laccase from botrytis cinerea Palpu Chongi Gisul/Journal of Korea Technical Association of the Pulp and Paper Industry, **34**(2):67.
- Kim, S., López, C., Güebitz, G., Cavaco-Paulo, A., (2008), Biological Coloration of Flax Fabrics with Flavonoids using Laccase from *Trametes hirsuta*, *Eng. Life Sci.*, **8**(3):324-330.
- Kim, S.H., Perera, R., Hager, L.P., Dawson, J., Hoffman, B.M., (2006), Rapid freeze-quench ENDOR study of chloroperoxidase compound I: the site of the radical, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(17):5598-5599.
- Kim, S.W., Lee, D.H., Lee, J.H., Lim, J.S., (2007), Optimization for biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases, *J. Biotechnol.*, **131**(2):S123.
- Kim, S.W., Lee, J.H., (2008), Biodiesel production by enzymatic process, *J. Biotechnol.*, **136**(1):S372-S373.
- Kim, Y.-J., Nicell, J.A., (2006), Laccase-catalyzed oxidation of bisphenol A with the aid of additives, *Process Biochem.*, **41**:1029-1037.
- Kircher, M., (2006), White biotechnology: ready to partner and invest in. *Biotechnol. J.*, **1**(7-8):787-794.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C., (2002), Industrial enzyme applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**:345-351.
- Kirk, O., Christensen, W., (2002), Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin, *Org. Proc. Res. Dev.*, **6**:446-451.
- Kitsopoulos, K.P., (1999), Cation-exchange capacity (CEC) of zeolitic volcanoclastic materials: applicability of the ammonium acetate saturation (AMAS) method, *Clay Clay Miner.*, **47**(6):688-696.
- Khmelnitsky, Yu.L., Zharinova, I.N., Berezin, I.V., Levashov, A.V., Martinek, K., (1986), *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **289**:1178-1181.
- Khmelnitsky, Yu. L., Zharinova, I. N., Berezin, I. V., Levashov, A. V., Martinek, K. (1987), Detergentless microemulsion- a new microheterogeneous medium for enzymatic reaction, *Ann. NY Acad. Sci.*, **501**:161-164.

- Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., Klyachko N.L., Martinek, K., (1988a), Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**:710-724.
- Khmelnitsky, Y.L., Hilhorst, R. and Veeger, C., (1988b), Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions-cholesterol oxidation catalyzed by cholesterol oxidase, *Eur. J. Biochem.* **176**:265-271.
- Khmelnitsky, Y.L., van Hoek, A., Veeger, C., Visser, A.J.W.G., (1989), Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions. Spectroscopic and ultracentrifugation studies, *J. Phys. Chem.*, **93**:872-878.
- Khmelnitsky, Y.L., Hilhorst, R., Visser, J.W.G., Veeger, C., (1993), Enzyme inactivation and protection during entrapment in reverse micelles, *Eur. J. Biochem.*, **211**:73-77.
- Klibanov, A., Samokhin, G.P., Martinek, K., Berezin, I.V., (1977), A new approach to preparative enzymatic synthesis, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**(9):1351-61.
- Klibanov, A.M., (1986), Enzymes that work in organic solvents, *Chem. Technology*, **16**:354-359.
- Klibanov, A.M., (1990), Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents, *Acc. Chem. Res.*, **23**(4):14-120.
- Klibanov, A.M., (1997), Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol.* **15**(3):97-101.
- Klibanov, A.M., (2001), Improving enzymes by using them in organic solvents, *Nature*, **409**:241-246.
- Knez, Z., (2009), Enzymatic reactions in dense gases, *J. Supercrit. Fluid*, **47**(3):357-372.
- Knoshaug, E.P., Selig, M.J., Baker, J.O., Decker, S.R., Himmel, M.E., Adney, W.S., (2008), Heterologous expression of two ferulic acid esterases from *Penicillium funiculosum*, *Appl. Biochem. Biotech.*, **146**(1-3):79-87.
- Kobilinsky, A., Nazer, A.I., Dubois-Brissonnet, F., (2007), Modeling the inhibition of Salmonella typhimurium growth by combination of food antimicrobials, *Int. J. Food Microbiol.*, **115**(1):95-109.
- Koch-Schmidt, A.-C., Mosbach, K., (1977), Studies on conformation of soluble and immobilized enzymes using differential scanning calorimetry. 1. Thermal stability of nicotinamide adenine dinucleotide dependent dehydrogenases, *Biochemistry-US*, **16**:2101-2105.
- Koeller, K.M., Wong, C.H., (2001), Enzymes for chemical synthesis, *Nature*, **409**:247-252.
- Kohlmann, C., Lütz, S., (2006), Electroenzymatic synthesis of chiral sulfoxides, *Eng. Life Sci.*, **6**(2):170-174.
- Kordali, S., Cakir A., Zengin H., Duru M. E., (2003), Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey, *Fitoterapia*, **74**:164-167.
- Koroleva-Skorobogat'ko, O., Stepanova, E., Gavrilova, V., Morozova, O., Lubimova, N., Dzchafarova, A., Yaropolov, A., Makower, A., (1998), Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis, *J. Biotechnol. Appl. Biochem.*, **28**:47-54.
- Kotlarchyk, M., Stephens, R.B., Huang, J.S., (1988), Study of Schultz distribution to model polydispersity of microemulsion droplets, *J. Phys. Chem.*, **92** (6):1533-1538.
- Kouptsova, O.S., Klyachko, N.L., Levashov, A.V., (2001), Synthesis of alkyl glycosides catalyzed by  $\beta$  glycosidases in a system of reverse micelles, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **27**(6):380-384.
- Koutsoudaki, C., Krsek, M., Rodger, A., (2005), Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil and the Gum of *Pistacia lentiscus* Var. Chia, *Agric. Food Chem.*, **53**(20):7681-7685.
- Krajewska, B., (2004), Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, *Enzyme Microb. Technol.*, **35**:126-139.
- Kramer, G.F.H., Bouwer, S.T., van Gemert, R.W., Derksen, J.T.P., Cuperus, F.P., (1994), Enzymatic peroxycarboxylic acid formation in a hollow-fibre membrane reactor: kinetics and mass transfer, *Catal. Today*, **22**(3):537-547.
- Kramer, K.J., Kanost, M.R., Hopkins, T.L., Jing, H., Zhu, Y.C., Xhu, R., Kerwin, J.L., Turecek, F., (2001), Oxidative conjugation of catechols with proteins in insect skeletal systems, *Tetrahedron*, **57**:385-392.

Kreiner, M., Parker, M.-C., (2005), Protein-coated microcrystals for use in organic solvents: application to oxidoreductases, *Biotechnol. Lett.*, **27**(20):1571-1577.

Krieger, N., Bhatnagar, T., Baratti, J.C., Baron, A.M., De Lima, V.M., Mitchell, D., (2004), Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems, *Food Technol. Biotechnol.*, **42**(4):279-286.

Krings, U., Hapetta, D., Berger, R.G., (2008), A labeling study on the formation of perillene by submerged cultured oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**:533-541.

Krishna, S.H., (2002), Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnol. Adv.*, **20**:239-267.

Krishna, H., Karanth, N.G., (2002), Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in non-aqueous media, *Catal. Rev. Sci. Eng.*, **44**:499-591.

Krügener, S., Schaper, C., Krings, U., Berger, R.G., (2009), *Pleurotus* species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides, *Bioresource Technol.*, **100**(11):2855-2860.

Kudanga, T., Prasetyo, E.N., Sipilä, J., Nousiainen, P., Widsten, P., Kandelbauer, A., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G., (2008), Laccase-Mediated wood surface functionalization, *Eng. Life Sci.*, **8**(3):297-302.

Kulys, J., Vidziunaite, R., Schneider, P., (2003), Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers, *Enzyme Microb. Technol.*, **32**:455-463.

Kumar, R., Katore, O.P., (2005), Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: A review, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **6**(2):298-310.

Kumari, A., Mahapatra, P., Kumar, G.V., Banerjee, R., (2008), Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel, *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **31**(4):291-298.

Kumari, A., Mahapatra, P., Garlapati, V.K., Banerjee, R., Dasgupta, S., (2009), Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor, *Food Technol. Biotechnol.*, **47**(1):13-18.

Kunamneni, A., Plou, F.J., Alcalde, M., Ballesteros, A., (2008a), Laccases and their applications: A patent review, *Recent Patent Biotechnol.*, **2**:10-24.

Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J., Alcalde, M., (2008b), Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process Biochem.*, **43**:169-178.

Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F.J., Ballesteros, A., Alcalde, M., (2008c), Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis, *Microb. Cell Factor.*, **7**:32

Kurisawa, M., Chung, J.E., Uyama, H., Kobayashi, S., (2003), Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin), *Macromol. Biosci.*, **3**:758-764.

Kurniawati, S., Nicell, J.A., (2005), Kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol, Wiley InterScience.

Kurniawati, S., Nicell, J.A., (2008), Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol, *Bioresource Technol.*, **99**(16):7825-7834.

Kwolek, T., Hodorowicz, M., Standnick, K., Czapkiewicz, J., (2003), Adsorption isotherms of homologous alkyltrimethylbenzylammonium bromides on sodium montmorillonite, *J. Colloid Interface Sci.*, **264**:14-19.

## L

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C., (1987), Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**:81-87.

Laborde, L., (1896), Sur laccase des vins, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **223**:1074-1075.

Langermann, J., Mell, A., Paetzold, E., Daußmann, Th., Kragl, U., (2007), Hydroxynitrile Lyase in Organic Solvent-Free Systems to Overcome Thermodynamic Limitations, *Adv. Synth. Catal.*, **349**(8-9):1418-1424.

Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, Spettoli, P., (2000), Biodegradation of phenols immobilised in a membrane reactor, *Process Biochem.*, **36**:51-58.

- La Rotta Hernandez, C.E., Lutz, S., Liese, A., Bon, E.P.S., (2005), Activity and stability of *Caldariomyces fumago* chloroperoxidase modified by reductive alkylation, amidation and cross-linking, *Enzyme Microb. Technol.*, **37**:582-588.
- Larsson, S., Cassland, P., Jonsson, L.J., (2001), Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:1163-1170.
- Laszlo, J.A., Compton, D.L., (2002), Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **18**:109-120.
- Lauk, L., Ragusa, S., Rapisadra, A., Franco, S., Nicolosi, V. M., (1996), In vitro antimicrobial activity of *Pistacia lentiscus* L. extracts: Preliminary report. *J. Chemother.* **8**(3):207-209.
- Lebedeva, I.V., Zhao-zhong Su, Z-Z., Vozhilla N., Chatman, L., Sarkar, D., Dent, P., Athar, M., Fisher, P.B., (2008), Chemoprevention by perillyl alcohol coupled with viral gene therapy reduces pancreatic cancer pathogenesis, *Mol Cancer Ther.*, **7**(7):2042-2050.
- Lee, C.-H., Lin, T.-S., Mou, C.-Y., (2009), Mesoporous materials for encapsulating enzymes, *Nano Today*, **4**:165-179.
- Lee, D-G., Ponvel, K.M., Kim, M., Hwang, S., Ahn, I-S., Lee C-H., (2009), Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **54**(1-4):62-66.
- Lee, F., Chung, J.E., Kurisawa, M., (2009), An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery, *J. Control. Release*, **134**(3):186-193.
- Lee, J.Y., Lee, H.K., (2004), Characterization of organobentonite used for polymer nanocomposites, *Mater. Chem. Phys.*, **85**:410-415.
- Lee, K.-T., Akoh, C., (1998), Immobilization of lipases on clay, Celite 545, diethylaminoethyl-, and carboxymethyl-Sephadex and their interesterification activity, *Biotechnol., Tech.*, **12**(5):381-384.
- Lee, S.Y., Cho, W.J., Kim, K.J., Ahn J.H., Lee, M., (2005), Interaction between cationic surfactants and montmorillonites under nonequilibrium condition, *J. Colloid Interf. Sci.*, **284** (2):667-673.
- Lee, S.Y., Jang, S.H., (2006), White biotechnology, *APBN*, **10**(10):559-563.
- Leisola, M., Turunen, O., (2007), Protein engineering: opportunities and challenges, *Appl Microbiol. Biotechnol.*, **75**(6):1225-1232.
- Leonowicz, A., Cho, N.S., Luterek, J., Wilkolazka, A., Wojtas-Wasilewska, M., Matuszewska, A., Hofrichter, M., Wesenberg, D., Rogalski, J., (2001), Fungal laccase: properties and activity on lignin, *J. Basic. Microbiol.*, **41**:185-227.
- Leprince, F., Quiquampoix, H., (2005), Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*, *Eur. J. Soil Sci.*, **47**(4):511-522.
- Lesuisse, E., Schanck, K., and Colson, C., (1993), Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme, *Eur. J. Biochem.*, **216**:155-160.
- Lewkowicz-Shpuntoff, H.M., Wen, M.C., Singh A., Brenner N., Gambino R., Pernodet N., Isseroff, R., Rafailovich, M., Sokolov, J., (2009), The effect of organo clay and adsorbed FeO<sub>3</sub> nanoparticles on cells cultured on ethylene vinyl acetate substrates and fibers. *Biomaterials*, **30**(1):8-18.
- Li, F., Wang, S., Liu W., Chen, G., (2008), Purification and characterization of poly(l-lactic acid)-degrading enzymes from *Amycolatopsis orientalis* ssp. *Orientalis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **282**(1):52-58.
- Li, K., Xu, F., Eriksson, K.-E.L., (1999), Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a non-phenolic lignin model compound, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2654-2660.
- Li, S-F., Wu, W-T., (2009), Lipase-immobilized electrospun PAN nanofibrous membranes for soybean oil hydrolysis, *Biochem. Eng. J.*, **45**:48-53.
- Liang, J., Chen, Y., Ren, X., Wu, R., Barnes, K., Worley, S. D., Broughton, R. M., Cho, U., Kocer, H., Huang, T. S., (2007), Fabric Treated with Antimicrobial N-Halamine Epoxides, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46**(20):6425-6429.

- Lichtenecker, R.J., Schmid, W., (2009), Application of various ionic liquids as cosolvents for chloroperoxidase-catalysed biotransformations, *Monatsh. Chem.*, **140**:509-512.
- Lin, C-T., Chen, C-J., Lin, T-Y., Tung, J.C., Wang, S.Y., (2008), Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata, *Bioresource Technol.*, **99**(18):8783-8787.
- Lin, F.-H., Chen, C.-H., Cheng, W.T.K., Kuo, T.-F., (2006), Modified montmorillonite as vector for gene delivery, *Biomaterials*, **27**(17):3333-3338.
- Lindley, P.F., (2001), In: Bertini I, Sigel A, Sigel H (eds) Handbook on metalloproteins. Dekker, New York, pp 763-811.
- Litina, K., Miriouni, A., Gournis, D., Karakassides, M.A., Georgiou, N., Klontzas, E., Ntoukas, E., Avgeropoulos, A., (2006), Nanocomposites of polystyrene-b-polyisoprene copolymer with layered silicates and carbon nanotubes, *Eur. Polym. J.*, **42**(9):2098-107.
- Litthauer, D., Vuuren, M.J.V., Tonder, A.V., Wolfaardt, F.W., (2007), Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108), *Enzyme Microb. Technol.*, **40**:563-568.
- Littlechild, J., (1999), Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**:28-34.
- Liu, B., Qian, X., Wu, Q., Lin, X., (2008), Two lipase-catalyzed sequential synthesis of drug derivatives in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, **43**(4-5):375-380.
- Liu, F, Ye, X.-S., Wu, T., Wang, C.-T., Shen, J.-W., Kang, Y., (2008), Conformational mobility of GOx coenzyme complex on single-wall carbon nanotubes, *Sensors*, **8**(12):8453-8462.
- Liu, H.I., Sono, M., Kadkhodayan, S., Hager, L.P., Hedman, B., Hodgson, K.O., Dawson, J.H., (1995), X-ray Absorption Near Edge Studies of Cytochrome P-450-CAM, Chloroperoxidase, and Myoglobin, *J. Biol. Chem.*, **270**:10544-10550.
- Liu, J.-Z., Wang, M., (2007), Improvement of activity and stability of chloroperoxidase by chemical modification, *BMC Biotechnol.*, **7**:23
- Liu, K.K.C., Wong, C.H., (1992), Enzymatic halohydration of glycols, *J. Org. Chem.*, **57**:3748-3750.
- Liu, Z., Sun, Z., Leng, Y., (2006), Directed evolution and characterization of a novel d-pantono-hydrolase from *Fusarium moniliforme*, *J. Agric. Food Chem.*, **54** (16):5823-5830.
- Liu, Z.H., Shao, M., Cai, R., Shen, P., (2006), Online kinetic studies on intermediates of laccase-catalyzed reaction in reversed micelle, *J. Colloid Interf. Sci.*, **294**:122-128.
- Ljubuncic, P., Song, H., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A., (2005), The effects of aqueous extracts prepared from the leaves of *Pistacia lentiscus* in experimental liver disease, *J. Ethnopharmacol.*, **100**(1-2):198-204.
- Loizou, E., Butler, P.D., Porcar, L., Talmon, Y., Kesselman, E., Schmidt, G., (2005), Large scale structures in nanocomposite hydrogels, *Macromolecules*, **38**:2047-2049.
- Lojou, E., Bianco, P., (2006), Layer-by-layer assemblies of montmorillonite and bacterial cytochromes for bioelectrocatalytic devices, *Electroanal.*, **18**:2426-2434.
- Longoria, A., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., (2008), Chloroperoxidase mediated transformation of highly halogenated monoaromatic compounds, *Chemosphere*, **72**:485-490.
- Lopez, F., Venditti, F., Ambrosone, L., Colafemmina, G., Ceglie, A., Palazzo, G., (2004), Gelatin microemulsion-based gels with the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide: a self-diffusion and conductivity study, *Langmuir*, **20**:9449-9452.
- López, R., Rosas, A., (2008), Effect of acid Phosphatase Immobilized in Allophanic clay on p availability in soil, 5th International Symposium ISMOM 2008 November 24-28th, Pucón, Chile.
- Lopez-Cruz, J.I., Viniegra-Gonzalez, G., Hernandez-Arana, A., (2006), Thermostability of native and pegylated myceliophthora thermophila laccase in aqueous and mixed solvents, *Bioconjugate Chem.*, **17**:1093-1098.
- López-Serrano, P., Cao, L., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2002), Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: Application to lipases, *Biotechnol. Lett.*, **24**:1379-1383.

- Lorenzo, M., Moldes, D., Rodriguez Couto, S., Sanroman, A., (2002), Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*, *Bioresource Technol.*, **82**(2):109-113.
- Loutrari, H., Hatzia Apostolou, M., Skouridou, V., Papadimitriou, E., Roussos, Ch., Kolisis, F.N., Papapetropoulos, A., (2004), Perillyl alcohol is an angiogenesis inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**(2):568-575.
- Loutrari, H., Magkouta, S., Pyriochou, A., Koika, V., Kolisis, F.N., Papapetropoulos A., Roussos, C., (2006), Mastic oil from *Pistacia lentiscus* var. chia inhibits growth and survival of human K562 leukemia cells and attenuates angiogenesis, *Nutr. Cancer*, **55**: 86-93.
- Loughlin, W.A., Hawkes D.B., (2000), Effect of organic solvents on a chloroperoxidase biotransformation. *Bioresour. Technol.*, **71**:167-172.
- Loughlin W. A., (2000), Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technol.*, **74**:49-62.
- Lu, X.G., Zhan, L.B., Feng, B.A., Qu, M.Y., Yu, L.H., Xie, J.H., (2004), Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by *d*-limonene, *World J. Gastroenterol.*, **10**:2140-2144.
- Lubary, M., ter Horst, J.H., Hofland G.W., Jansens, P.J., (2009), Lipase-catalyzed ethanolysis of milk fat with a focus on short-chain fatty acid selectivity, *J. Agric. Food Chem.*, **57**(1):116-121.
- Lue, B.M., Karboune, S., Yeboah, F.K., Kermasha, S., (2005), Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media, *J. Chem. Technol. and Biotechnol.*, **80**:462-468.
- Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H., (1988), Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules, *Biochim. Biophys. Acta*, **947**:209-246.
- Luisi, P.L., Magid, L.J., (1986), Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **20**:409-474.
- Lund, G., Holt, S.L., (1980), Detergentless water/oil microemulsions: IV. The ternary pseudo-phase diagram for and properties of the system toluene/2-propanol/water, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **57**:264-267.
- Lutz, S., (2004), Engineering lipase B from *Candida antarctica*, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **15**:2743-2748.

## M

- Ma, L., Persson, M., Adlercreutz, P., (2002), Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions, *Enzyme Microb. Technol.*, **31**(7):1024-1029.
- Ma, Y., Russell, A.T., Marston, G., (2008), Mechanisms for the formation of secondary organic aerosol components from the gas-phase ozonolysis of  $\alpha$ -pinene, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **10**(29):4294-4312.
- Maeda, T., Sanchez-Torres, V., Wood, T.K., (2008), Protein engineering of hydrogenase 3 to enhance hydrogen production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **79**(1):77-86.
- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A. L., Chinou, I. B., Mitaku, S., (1999), Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. chia. *Planta Med.*, **65**:749-752.
- Mahapatro, A., Johnson, D.M., Patel, D.N., Feldman, M.D., Ayon, A.A., Agrawal, C.M., (2006), Surface modification of functional self-assembled monolayers on 316l stainless steel via lipase catalysis, *Langmuir*, **22**:901-905.
- Mahmood, I., Guo, C., Xia, H., Ma, J., Jiang, Y., Liu, H., (2008), Lipase immobilization on oleic acid-pluronic (l-64) block copolymer coated magnetic nanoparticles, for hydrolysis at the oil/water interface, *Indian Eng. Chem. Res.*, **47**(17):6379-6385.
- Mamma, D., Hatzinikolaou, D., Kekos, D., Stamatis, H., Kalogeris, E., (2009), Adsorption of major endoglucanase from *Thermoascus aurantiacus* on cellulosic substrates, *World J. Microb. Biot.*, **25**(5):781-788.
- Manoj, K.M., Lakner, F.J., Hager L.P., (2000), Epoxidation of indene by chloroperoxidase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **9**:107-111.
- Mansur, M., Suarez, T., Gonzales, A., (1998), Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197), *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**:771-774.

- Mansur, M., (2003), The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities, *Mycologia*, **95**:1013-1020.
- Mantha, R., Biswas, N., Taylor, K.E., Bewtra, J.K., (2002), Removal of nitroaromatics from synthetic waste water using two-step zero valent ion reduction and peroxidase catalyzed oxidative polymerization, *Water Environ. Res.*, **74**:280-287.
- Maria Chong A.S., Zhao, X.S., (2004), Functionalized nanoporous silicas for the immobilization of penicillin acylase, *Appl. Surf. Sci.*, **237**:398-404.
- Marjasvaara, A., Torvinen, M., Vainiotalo, P., (2004), Laccase-catalyzed mediated oxidation of benzyl alcohol: the role of TEMPO and formation of products including benzonitrile studied by nanoelectrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **39**:1139-1146.
- Marjasvaara, A., Kruus, K., Vainiotalo, P., (2006), A laccase study by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance MS: copper depletion, glycoforms and stability, *J. Mass Spectrom.*, **41**:91-97.
- Marjasvaara, A., Jänis, J., Vainiotalo P., (2008), Oxidation of a laccase mediator ABTS as studied by ESI-FTICR mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **43**(4):470-477.
- Markarian, J., (2005), Automotive and packaging offer growth opportunities for nanocomposites, *Plast. Addit. Compound*, **7**(6):18-21.
- Marone, P., Bono, L., Leone, E., Bona, S., Carretto, E., Pervesi, L., (2001), Bactericidal activity of *Pistacia lentiscus* mastic gum against *Helicobacter pylori*, *J. Chemotherapy*, **13**:611-614.
- Marques De Souza, C.G., Peralta, R.M., (2003), Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium, *J. Basic. Microbiol.*, **43**(4):278-286.
- Martin, J.R., Nus, M., Gago, J.V.S., Sanchez-Montero, J.M., (2008), Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at high temperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenulatus*: A comparative study, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **52-53**:162-167.
- Martín-Luengo, M.A., Yates, M., Martínez Domingo, M.J., Casal, B., Iglesias, M., Esteban, M., Ruiz-Hitzky, E., (2008), Synthesis of *p*-cymene from limonene, a renewable feedstock, *Appl. Catal. B: Env.*, **81**(3-4):218-224.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Berezin, I.V., (1977), Catalysis by water-soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzymes against denaturation (inactivation) through their inclusion in reversed micelles. *Dokl Akad. Nauk SSSR (Russ)*, **236**:920-923.
- Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmelnitski, Y.L., Berezin I.V., (1986), Micellar enzymology. *Eur. J. Biochem.*, **155**:453-68.
- Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmelnitsky, Y.L., Levashov A.V., (1989), enzymology – its relation to membranology, *Biochim. Biophys. Acta*, **981**:161-172.
- Martinelle, M., Holmquist, M., Hult, K., (1995), On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Hionicirla lanuginosa* lipase, *Biochini. Biophys. Acta*, **1258**:272-276.
- Martinez, C., De Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., Cambillau, C., (1992), *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with catalytic serine accessible to solvents, *Nature*, **356**:615-618.
- Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Gutierrez, A., del Rio, J.C., (2005), Biodegradation of lignocelluloses: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin, *Int. Microbiol.*, **8**:195-204.
- Marzorati, M., Danieli, B., Haltrich, D., Riva, S., (2005), Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives, *Green Chem.*, **7**:310-315.
- Massalha, N., Basheer, S., Sabbah I., (2007), Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **46**:6820-6824.
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Grazu, V., Pessela, B.C.C., Giacomini, C., Irazoqui, G., Villarino, A., Ovsejevi, K., Batista-Viera, F., Fernandez-Lafuente, R., Guisán, J.M., (2005), Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins, *Enzyme Microb. Technol.*, **37**:456-462.

- Mateo C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R., (2007), Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.*, **40**(6):1451-1463.
- Mattiasson, B., Adlercreutz, P., (1991), Tailoring the microenvironment of enzymes in water-poor systems, *Trends Biotechnol.*, **9**:394-398.
- Mattinen, M.L., Hellman, M., Permi, P., Autio, K., Kalkkinen, N., Buchert, J., (2006), Effect of protein structure on laccase-catalyzed protein oligomerization, *J. Agric. Food Chem.*, **54**:8883-8890.
- Matzke, S.F., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Prausnitz, J.M., Blanch, H.W., (1992), Mechanisms of protein solubilization in reversed micelles, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**:91-102.
- Mayer, A.M., Staples, R.C., (2002), Laccase: new functions for an old enzyme, *Phytochemistry*, **60**:551-565.
- Mazzer, C., Ferreira, L.R., Tedesco Rodella, J.R., Moriwaki, C., Matioli, G., (2008), Cyclodextrin production by *Bacillus firmus* strain 37 immobilized on inorganic matrices and alginate gel, *Biochem. Eng. J.*, **41**(1):79-86.
- Mazzola, P.G., Lopes, A.M., Hasmann, F.A., Jozala, A.F., Penna, T.C.V., Magalhaes, P.O., Rangel-Yagui C.O., Pessoa Jr, A., (2008), Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**:143-157.
- McCabe, R.W., Rodger, A., Taylor, A. 2005. A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements, *Enzyme Microb. Technol.*, **36**:70-74.
- McKinsey, (2006), "Industrial Biotech: Today and Tomorrow", *Norwegian Bioindustry Association*.
- McNeff, C.V., McNeff, L.C., Yan, B., Nowlan, D.T., Rasmussen, M., Gyberg, A.E., Krohn, B.J., Fedie R.L., Hoyer, T.R., (2008), A continuous catalytic system for biodiesel production, *Appl. Catal. A-Gen.*, **343**(1-2):39-48.
- Mehta, S.K., Kaur, K., Bhawna, Bhasin K.K., (2009), Effect on the water pool properties of reverse micelles by addition of glycols, *Colloid. Surface A.*, **339**:217-223.
- Mei, Y., Miller, L., Gao, W., Gross, R.A., (2003), Imaging the distribution and secondary structure of immobilized enzymes using infrared microspectroscopy, *Biomacromolecules*, **4**:70-74.
- Mellou, F., Lazari, D., Skaltsa, H., Tselepis, A.D., Kolisis, F.N., Stamatis, H., (2005), Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity, *J. Biotechnol.*, **116**:295-304.
- Menaa, B., Herrero, M., Rives, V., Lavrenko, M., Eggers, D.K., (2008), Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified silica glasses, *Biomaterials*, **29**:2710-2718.
- Miao S., Zhang S., Su Z., Wang P., (2008), Chemoenzymatic synthesis of oleic acid-based polyesters for use as highly stable biomaterials, *J. Polym. Sci. Part a: Polym. Chem.*, **46**(12):4243-4248.
- Micard, V., Thibault, J.-F., (1999), Oxidative gelation of sugar-beet pectins: use of laccases and hydration properties of the cross-linked pectins, *Carbohydr. Polym.*, **39**(3):265-273.
- Michiyo, L., (1988), Positionally nonspecific lipase from *Candida* sp. a method for producing it, its use and a recombinant DNA process for producing it, European Patent No. 0 287 634.
- Michizoe, J., Goto, M., Furusaki, S., (2001), Catalytic activity of laccase hosted in reversed micelles, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(1):67-71.
- Michizoe, J., Ichinose, H., Kamiya, N., Maruyama T., Goto, M., (2005), Biodegradation of Phenolic Environmental Pollutants by a Surfactant-Laccase Complex in Organic Media, *J. Biosci. Bioeng.*, **99**(6):642-647.
- Mikolasch, A., Hammer, E., Jonas, U., Popowski, K., Stielow, A., Schauer, F., (2002), Synthesis of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase, *Tetrahedron*, **58**:7589-7593.
- Mikolasch, A., Schauer, F., (2009), Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **82**:605-624.
- Min, K.L., Kim, Y.H., Kim, Y.W., Jung, H.S., Hah, Y.C., (2001), Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **392**:286-297.

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N., (2002), Potential applications of laccase in the food industry, *Trends Food Sci. Technol.*, **13**:205-216.

Minussi, R.C., Pastore, G.M., Duran, N., (2007), Laccase induction in fungi and laccase /N-OH mediator systems applied in paper mill effluent, *Bioresource Technol.*, **98**:158-164.

Mishra, T. and Parida, K.M., (1997), Transition metal oxide pillared clay: Part (III). A comparative study of textural and acidic properties of manganese (III) pillared montmorillonite and pillared acid activated montmorillonite, *J. Mater. Chem.*, **7**:147-151.

Misiorowski, R.L., Wells, M.A., (1974), The activity of phospholipase A, in reversed micelles of phosphatidylcholine in diethyl ether, *Biochemistry* **13**:4921-4927.

Mitchell, D.J., Ninham, B.W., (1981), Micelles, vesicles and microemulsions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **77**:601-629.

Mocciutti, P., Zanuttini, M., Kruus, K., Suurnäkki, A., (2008), Improvement of the fiber-bonding capacity of unbleached recycled pulp by the laccase/mediator treatment, *Tappi J.*, **7**(10):17-22.

Mohan, S.V., Prasad, K.K., Rao, N.C., Sarma, P.N., (2005), Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process, *Chemosphere*, **58**:1097-1105.

Moniruzzaman, M., Hayashi, Y., Talukder, Md.M.R., Saito, E., Kawanishi, T., (2006), Effect of aprotic solvents on the enzymatic activity of lipase in AOT reverse micelles, *Biochem. Eng. J.*, **30**:237-244.

Moniruzzaman, M., Talukder, M.R., Hayashi, Y., Kawanishi, T., (2007), Effect of the pretreatment of lipase with organic solvents on its conformation and activity in reverse micelles, *Appl. Biochem. Biotech.*, **142**(3):253-262.

Moniruzzaman, M., Kamiya, N., Nakashima, K., Goto, M., (2008), Water-in-ionic liquid microemulsions as a new medium for enzymatic reactions, *Green Chem.*, **10**:497-500.

Montero, J.M.S., (2007), White biotechnology and pharmaceutical industry, *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **73**(2): 501-535.

Moreira M.A., Bergler Bitencourt, T., Da Graca Nascimento, M., (2005), Optimization of chemo-enzymatic epoxidation of cyclohexene mediated by lipases, *Synthetic Commun.*, **35**:2107-2114.

Moreira, M A., Nascimento, MG., (2007), Chemo-enzymatic epoxidation of (+)-3-carene, *Catal. Commun.*, **8**:2043-2047.

Morris, D.R., Hager, L.P., (1996), Chloroperoxidase I: isolation and properties of the crystalline glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, **241**:1763-1768.

Motlekar, N.A., Bhagwat, S.S., (2001), Activity of horseradish peroxidase in aqueous and reverse micelles and back-extraction from reverse-micellar phases, *J. Chem. Techn. Biotechn.*, **76**(6):643-649.

Muheim, A., Fiechter, A., Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., (1992), On the mechanism of oxidation of non-phenolic lignin model compounds by the laccase-ABTS couple, *Holzforschung*, **46**:121-126.

Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N., Ghosh, A.C., (2001), Advances in cancer therapy with plant based natural products, *Curr. Med. Chem.*, **8**(12):1467-1486.

Murdan, S., Gregoriadis, G., Florence, A.T., (1999), Interaction of non-ionic surfactants-based organogels with aqueous media, *Int. J. Pharm.*, **180**:211-214.

Murphy, C.D., (2007), Fluorophenol oxidation by fungal chloroperoxidase, *Biotechnol. Lett.*, **29**:45-49.

Mustranta, A., (1992), Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen, *Appl. Microbiol. Biot.*, **38**:61-66.

Nagatomo, H., Matsushita, Y., Sugamoto, K., Matsui, T., (2005), Preparation and properties of gelatin-immobilized beta-glucosidase from *Pyrococcus furiosus*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**:128-136.

## N

Nagayama, K., Katakura, R., Hata, T., Naoe, K., Imai, M., (2008), Reactivity of *Candida rugosa* lipase in cetyltrimethylammonium bromide microemulsion-gelatin complex organogels, *Biochem. Eng. J.*, **38**(2):274-276.

- Nagayama, K., Fukuyama, K., Imai, M., (2006), Comparative study of *Candida rugosa* lipase activity in lecithin microemulsion-based organogels by two species of gelatine, *Kagaku Kogaku Ronbun.*, **32**(4):372-375.
- Naidja, A., Huang, P.M., (1996), Deamination of aspartic acid by aspartase-Ca-montmorillonite complex, *J. Mol., Catal., A-Chem.*, **106**:255-265
- Nakamura, S., Qu, Y., Xu, F., Matsuda, H., Yoshikawa, M., (2008), Structures of new monoterpenes from Thai herbal medicine *Curcuma comosa*, *Chem. Pharmac. Bull.*, **56**(11):1604-1606.
- Narayanan, R., Zhu, G., Wang, P., (2007), Stabilization of interface-binding chloroperoxidase for interfacial biotransformation, *J. Biotechnol.*, **128**(1):86-92.
- Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M., Doglia, S.M., (2005), Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Biochem. J.*, **385**:511-517.
- Ncanana, S., Baratto, L., Roncaglia, L., Riva, S., Burton, S.G., (2007), Laccase-mediated oxidation of totarol, *Adv. Synth. Catal.*, **349**:1507-1513.
- Nie, H.-L., Zhu, L.-M., (2007), Adsorption of papain with Cibacron Blue F3GA carrying chitosan-coated nylon affinity membranes, *J. Biol. Macromolecules*, **40**(3):261-267.
- Niedan, V., Pavasars I., Oberg, G., (2000), Chloroperoxidase-mediated chlorination of aromatic groups in fulvic acid, *Chemosphere*, **41**:779-785.
- Nijdam, A.J., Cheng, M.M.-C., Geho, D.H., Fedele, R., Herrmann, P., Killian, K., Virginia, E., Petricoin III, E.F., Liotta L.A., Ferrari, M., (2007), Physicochemically modified silicon as a substrate for protein microarrays, *Biomaterials*, **28**:550-558.
- Niku-Paavola, M.-L., Viikari, L., (2000), Enzymatic oxidation of alkenes, *Biotechnol. Food Res.*, **10**(4):435-444.
- Noble, M.E.M., Cleasby, A., Johnson, L.N., Egmond, M.R., Frenken, L.G.J., (1993), The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartase, *FEBS Lett.*, **331**:123-128.
- Noh, K.H., Rhee, M.S., Imm, J.Y., (2005), Separation of lactoferrin from model whey protein mixture by reverse micelles formed by cationic surfactant, *Food Sci. Biotechnol.*, **14**:131-136.
- Noinville, S., Revault, M., Baron, M.H., Tiss, A., Yapoudjian, S., Ivanova, M., Verger, R., (2002), Conformational changes and orientation of *Humicola lanuginosa* lipase on a solid hydrophobic surface: an in situ interface Fourier transform infrared-attenuated total reflexion study, *Biophys. J.*, **82**:2709-2719.
- Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., Baron, M.H., (2004), Structural effects of drying and rehydration for enzymes in soils: a kinetics-FTIR analysis of  $\alpha$ -chymotrypsin adsorbed on montmorillonite, *J. Colloid Interface Sci.*, **273**:414-425.
- Norin, M., Haeffner, F., Achour, A., Norin T., Hult, K., (1994), Computer modeling of substrate binding to lipases from *Rhizomucor miehei*, *Humicola lanuginosa*, and *Candida rugosa*, *Protein Sci.*, **3**:1493-1503.

## O

- O'Connor, C.J., Cleverly, D.R., (1995), Bile salt simulated human milk lipase catalyzed ester hydrolysis in detergentless microemulsion media, *Biocatal. Biotransfor.*, **12**:193-204.
- Oldfield, C., Freedman, R.B., Robinson, B.H., (2005), Enzyme hyperactivity in AOT water-in-oil microemulsions is induced by 'lone' sodium counterions in the water-pool, *Faraday Discuss.*, **129**:247-263.
- O'Neill, H., Angley, C.V., Hemery, I., Evans, B.R., Dai, S., Woodward, J., (2002), Properties of carbohydrate-metabolizing enzymes immobilized in sol-gel beads: stabilization of invertase and  $\beta$ -glucosidase by blue dextran, *Biotechnol. Lett.*, **24**(10):783-790.
- Orellana-Coca, C., Tornvall, U., Adlercreutz, D., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R., (2005a), Chemo-enzymatic epoxidation of oleic acid and methyl oleate in solvent-free medium, *Biocatal. Biotransfor.*, **23**(6):431-437.
- Orellana-Coca, C., Camocho, S., Adlercreutz, D., Mattiasson, B., Hatti-Kaul, R., (2005b), Chemo-enzymatic epoxidation of linoleic acid: Parameters influencing the reaction, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **107**:864-870.

- Orlich, B., Schomäcker, R., (2002), Enzyme catalysis in reverse micelles, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **75**:185-208.
- Orrego, C.E., Valencia, J.S., (2009), Preparation and characterization of chitosan membranes by using a combined freeze gelation and mild crosslinking method, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**:197-206.
- Ortiz-Bermudez, P., Srebotnik E., Hammel, K.E., (2003), Chlorination and cleavage of lignin structures by fungal chloroperoxidases, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:5015-5018.
- Osborne, R.L., Raner, G.M., Hager, L.P., Dawson, J.H., (2006), *Caldariomyces fumago* Chloroperoxidase is also a dehaloperoxidase: oxidative dehalogenation of halophenols, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**:1036-1037.
- Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Fernyhough A., (2007), The laccase/ABTS system oxidizes (+)-catechin to oligomeric products, *Enzyme and Microb. Technol.*, **40**:1272-1279.
- Öste-Triantafyllou, A., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., (1996), Calorimetric studies on solid  $\alpha$ -chymotrypsin preparations in air and in organic solvents, *Biochim. Biophys. Acta*, **1295**:110-118.
- Osuna, L., Moyano, E., Mangas, S., Bonfill, M., Cusidó, R.M., Piñol, M.T., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Palazón, J., (2008), Immobilization of *Galphimia glauca* plant cell suspensions for the production of enhanced amounts of Galphimine-B, *Planta Med.*, **74**(1):94-99.
- Otero, C., (1995), Influence of the hydrophobicity of lipase isoenzymes from *Candida rugosa* on its hydrolytic activity in reverse micelles, *FEBS Lett.*, **360**(2):202-206.
- Ottosson, J., Fransson, L., Hult, K., (2002), Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase, *Protein Sci.*, **11**(6):1462-1471.
- $\mathcal{P}$
- Pahujani, S., Kanwar, S.S., Chauhan, G., Gupta, R., (2008), Glutaraldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability, *Bioresource Technol.*, **99**(7):2566-2570.
- Paiva, A.L., Balcão, V.M., Malcata, F.X., (2000), Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme Microb. Technol.*, **27**:187-204.
- Palevitch, D., Yaniv, Z., (2000), Medicinal Plants of the Holy Land. Modan Publishing House, Tel Aviv, Israel.
- Papadimitriou, V., Pispas, S., Syriou, S., Pournara, A., Zoumpanioti, M., Sotiroudis, Th.G., Xenakis, A., (2008), Biocompatible microemulsions based on limonene: formulation, structure, and applications, *Langmuir*, **24**:3380-3386
- Papageorgiou, V., Mellidis, A., Argyriadou, N., (1991), The chemical composition of the essential oil of mastic gum, *J. Ess. Oil Res.*, **3**:107-110.
- Park, J.B., Clark D.S., (2006a), Deactivation mechanisms of chloroperoxidase during biotransformations. *Biotech. Bioeng.*, **93**(6):1190-1195
- Park, J.B., Clark, D.S., (2006b), New reaction system for hydrocarbon oxidation by chloroperoxidase, *Biotech. Bioeng.*, **55**:283-288.
- Park, S., Kazlauskas, R., (2003), Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**(4):432-437.
- Pastou, A., Stamatis, H., Xenakis, A., (2000), Microemulsion-based organogels containing lipase: Application in the synthesis of esters, *Progr. Colloid. Polym. Sci.*, **115**:192-195.
- Patel R.N., (2002), Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals, *Enzyme Microb. Technol.*, **31**:804-826.
- Patel, R.N., (2008), Chemo-enzymatic synthesis of pharmaceutical intermediates, *Expert Opin. Drug Disc.*, **3**(2):187-245.
- Peana, A.T., D'Aquila, P.S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., Moretti, M.D.L., (2002), Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils, *Phytomedicine*, **9**(8):721-726
- Pecsok, R.L., Shields, L.D., Cairns, T., McWilliam, I.G., (1981), *Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση*, Εκδόσεις Γ. Α. Πνευματικός, Αθήνα.

- Pérez, O.E., Wargona, V., Pilosof, A.M.R., (2006), Gelation and structural characteristics of incompatible wheyproteins/hydroxypropylmethylcellulose mixtures, *Food Hydrocolloid*, **20**(7):966-974.
- Perez, V.H., Miranda, E.A., Valença, G.P., (2007), Kinetics of gas-phase hydrolysis of ethyl acetate catalyzed by immobilized lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136**(1):23-37.
- Perikos, J., (1993), The Chios gum mastic, Print All Ltd. Graphic Arts, Athens, Greece.
- Persson, M., Costes, D., Wehtje, E., Adlercreutz, P., (2002), Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity, *Enzyme Microb. Technol.*, **30**:916-923.
- Persson, M., Bornscheuer, U.T., (2003), Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **22**:21-27.
- Peter, F., Poppe, L., Kiss, C., Szocs-Biro, E., Preda, G., Zarcu, C., Olteanu, A., (2005), Influence of precursors and additives on microbial lipases stabilized by sol-gel entrapment, *Biocatal. Biotransfor.*, **23**:251-260.
- Peter, M.G., Wollenberger, U., (1997), Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. In: Scheller FW, Schubert F, Fedorowicz J, editors. *Frontiers in biosensorics vol 1 EXS 80*, Basel: Birkhauser; p. 63-82
- Petersen, J.F.W., Kadziola, A., Larsen, S., (1994), Three-dimensional structure of a recombinant peroxidase from *Coprinus cinereus* at 2.6 Å resolution. *FEBS Lett.*, **339**:291-296.
- Petersen, M.T.N., Fojan, P., Petersen, S.B., (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution, *J. Biotechnol.*, **85**:115-147.
- Petkar, M., Lali, A., Caimi, P., Daminati M., (2006), Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis, *J. Mol. Catal B-Enzym.*, **39**(1-4):83-90.
- Petri, A., Gambicorti, T., Salvadori, P., (2004), Covalent immobilization of chloroperoxidase on silica gel and properties of the immobilized biocatalyst, *J. Molecul. Catal. B-Enzym.*, **27**:103-106.
- Petrounia, I.P., Arnold F.H., (2000), Designed evolution of enzymatic properties, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**(4):325-30.
- Pflug, W., (2007), Effect of clay minerals on the activity of polysaccharide cleaving soil enzymes, *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.*, **145**(5):493-502.
- Pickard, M.A., Roman, R., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., (1999), Polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism by white rot fungi and oxidation by *Coriopsis gallica* UAMH 8260 laccase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**:3805-3809.
- Pileni, M-P., (1993), Water in oil colloidal droplets used as microreactors, *Adv. Colloid Interfac. Sci.*, **46**:139-163.
- Piontek, K., Antorini, M., Choinowski, T., (2002), Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers, *J. Biol. Chem.*, **277**: 37663-37669.
- Pires-Cabral, P., da Fonseca M.M.R., Ferreira-Dias, S., (2009), Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study, *Biochem. Eng. J.*, **43**(3):327-332.
- Platis, D., Kotzia, G.A., Axarli, I.A., Labrou, N.E., (2005), *Enzyme Engineering and Technology*, Blackwell Publishing Company USA Ed: Hui Y.H., pp. 175-222.
- Pleiss, J., Fischer, M., Schmid, R.D., (1998), Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chem. Phys. Lipids*, **93**(1-2):67-80.
- Pleiss J., Fischer M., Peiker M., Thiele C., Schmid, R., (2000), Lipase engineering database: understanding and exploiting sequence-structure-function relationships, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **10**:491-508.
- Polizzi, K.M., Bommarius, A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers, J.F., (2007), Stability of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**:220-225.
- Pollard, D.J., Woodley, J.M., (2007), Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *TRENDS Biotechnol.*, **25**(2):66-73.

Poulos, T.L., Freer, S.T., Alden, R.A., Edwards, S.L., Skogland, U., Takio K., Eriksson, B., Xuong, N., Yonetani, T., Kraut, J., (1980), The crystal structure of cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **255**:575-580.

Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H., Gold, M.H., (1993), Crystallographic refinement of lignin peroxidase at 2 Å, *J. Biol. Chem.*, **268**:4429-4440.

Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O.V., (2006a), Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **30**:19-24.

Pozdnyakova, N.N., Turkovskaya, O.V., Yudina, E.N., Rodakiewicz-Nowak Y., (2006b), Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **42**:56-61.

Pozdnyakova, N.N., Rodakiewicz-Nowak, J., Turkovskaya, O.V., Haber, J., (2006c), Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators, *Enzyme Microb. Tech.*, **39**(6):1242-1249.

Prado, L.A.S. de A., Karthikeyan, C.S., Schulte, K., Nunes, S.P., de Torriani, I.L., (2005), Organic modification of layered silicates: structural and thermal characterizations, *J. Non-Cryst. Solids*, **351**:970-975.

Prilezhaev N., (1909), Mitteilungen oxydation ungesättigter verbindungen mittels organischer superoxyde, *Ber.*, **42**(4):4811-4815.

Protopapa, E.E., Heliou, A., Tsigonia, A., Kefala, V., Triantafyllou, A., Tsaknis, J., (2001), The antiphlogistic action of the Chios mastic essential oil: Treatment of skin irritations resulting from hair epilation and peeling with lotions containing mastic essential oil, *Rev. Clin. Pharmacol. Pharmacokinetics Int. Ed.*, **15**(3):203-205.

## Q

Quellet, C., Eicke, H.-F., (1986), "Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsions", *Chimia*, **40**:233-238.

Qiu, H., Xu, C., Huang, X., Ding, Y., Qu, Y., Gao, P., (2008), Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them, *J. Phys. Chem. C*, **112**:25.

Quiquampoix, H., Stauton, S., Baron, M.-H., Ratcliffé, R.G., (1993), Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil, *Colloids Surfaces A-Physicochem. Eng. Aspects*, **75**:85-93.

Quiquampoix, H., Servagent-Noinville, S., Baron, M.H., (2002), Enzyme adsorption on soil mineral surfaces and consequences for the catalytic activity. In: Burns R.G and Dick R.P. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, Inc. New York, pp 285-306.

Quiquampoix, H., Mousain, D., (2005), Enzymatic hydrolysis of organic phosphorus. In: Turner B.L., Frossard E. and Baldwin D., *Organic Phosphorus in the Environment*. CAB International. Wallingford, pp. 89-112.

Quiquampoix, H., Burns, R.G., (2007), Interactions between proteins and soil mineral surfaces: environmental and health consequences, *Elements*, **3**(6):401-406.

## R

Rahman Talukder, M.M., Wu, J.C., Lau, S.K., Cui, L.C., Shimin, G., Lim, A., (2009), Comparison of Novozym 435 and amberlyst 15 as heterogeneous catalyst for production of biodiesel from palm fatty acid distillate, *Energ. Fuels*, **23**(1):1-4.

Rai G.P., Sakai S., Florez A.M., Mogollon L., Hager L.P., (2001), Directed evolution of chloroperoxidase for improved epoxidation and chlorination catalysis, *Adv. Synth. Catal.*, **343**:638-645.

Rajan, A., Abraham, T.E., (2008), Studies on crystallization and cross-linking of lipase for biocatalysis, *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **31**(2):87-94.

Ramanavicius, A., Ramanaviciene A., (2009), Hemoproteins in design of biofuel cells, *Fuel Cells*, **9**(1):25-36.

Ran N., Frost, J.W., (2007), Directed evolution of 2-Keto-3-deoxy-6 phosphogalactonate aldolase to replace 3-deoxy-d-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate synthase, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**(19):6130-6139.

- Ran, N, Rui, E., Liu, J., Tao, J., (2009), Chemoenzymatic synthesis of small molecule human therapeutics, *Curr. Pharm. Design.*, **15**(2):134-152.
- Ratledge, C., Kristiansen, B., (2001), Basic Biotechnology, Second edition, Cambridge university press.
- Ravizza, R., Gariboldi, M.B., Molteni, R., Monti, E., (2008), Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells, *Oncol. Rep.*, **20**(3):625-630.
- Rees, G.D., Nascimento, M.G., Jenta, T.R.J., Robinson, B.H., (1991), Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels, *Biochim. Biophys. Acta*, **1073**:493-501.
- Rees, G.D., Robinson, B.H., Stephenson, G.R., (1995), Macrocyclic lactone synthesis by lipases in water-in-oil microemulsions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1257**:239-248.
- Reina, R.G., Leri A.C., Myneni, S.C.B., (2004), Cl K-edge X-ray spectroscopic investigation of enzymatic formation of organochlorines in weathering plant material, *Environ. Sci. Technol.*, **38**:783-789.
- Reinhammar, B., (1997), Kinetic Studies on Polyporus and Tree Laccases. In Multi-Copper Oxidases. Edited by: Messerschmidt A. Singapore, World Scientific Publishing, 167-200.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R., (2009), Lipases at interfaces: A review, *Adv. Colloid Interface*, **147-148**: 237-250.
- Rekuć, A., Bryjak, J., Szymańska, K., Jarzębski, A.B., (2009), Laccase immobilization on mesostructured cellular foams affords preparations with ultra high activity, *Process Biochem.*, **44**(2):191-198.
- Renirie, R., Pierlot, C., Aubry, J.M., Hartog, A.F., Schoemaker, H.E., Alsters, P.L., Wever, R., (2003), Vanadium chloroperoxidase as a catalyst for hydrogen peroxide disproportionation to singlet oxygen in mildly acidic aqueous environment, *Adv. Synth. Catal.*, **345**:849-858.
- Renirie, R., Pierlot, C., Wever, R., Aubry, J-M., (2009), Singlet oxygenation in microemulsion catalysed by vanadium chloroperoxidase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **56**:259-264.
- Reshmi, R., Sanjay, G. Sugunan, S., (2006), Enhanced activity and stability of  $\alpha$ -amylase immobilized on alumina, *Catal. Commun.*, **7**(7):460-465.
- Riazi, S., Wirawan, R.E., Badmaev, V., Chikindas, M.L., (2009), Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050, *J. Appl. Microbiol.*, **106**(4):1370-1377.
- Rittstieg, K., Suurnakki, A., Suortti, T., Kruus, K., Guebitz, G., Buchert, J., (2002), Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC, *Enzyme Microb. Tech.*, **31**:403-410.
- Riva, S., (2006), Laccases: Blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.*, **24**:219–226.
- Roach, P., Farrar, D., Perry, C.C., (2006), Surface Tailoring for Controlled Protein Adsorption: Effect of Topography at the Nanometer Scale and Chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(12):3939-3945.
- Roberge, C., Amos, D., Pollard, D., Devine, P., (2009), Preparation and application of cross-linked aggregates of chloroperoxidase with enhanced hydrogen peroxide tolerance, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **56**:41-45.
- Robles, A., Lucas R., Martinez-Canamero, M., Omar, N.B., Perez, R., Galvez, A., (2002), Characterisation of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (syn. *Thielaviopsis*) *paradoxa* CH 32, *Enzyme Microb. Technol.*, **31**:516-522.
- Rodríguez-Baño, J., Alcalá, J., Cisneros, J.M., Grill, F., Oliver, A., Horcajada, J.P., Tórtola, T., Mirelis, B., Navarro, G., Cuenca, M., Esteve, M., Peña, C., Llanos, A.C., Cantón, R. Pascual, A., (2009), *Escherichia coli* producing SHV-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase is a significant cause of community-acquired infection, *J. Antimicrob. Chemoth.*, **63**(4):781-784.
- Rosell, C.M., Foegeding, A., (2007), Interaction of hydroxypropylmethylcellulose with gluten proteins: Small deformation properties during thermal treatment, *Food Hydrocolloid*, **21**:1092-1100.
- Rosell, C.M., Santos E., Collar, C., (2009), Physico-chemical properties of commercial fibres from different sources: A comparative approach, *Food Res. Int.*, **42**(1):176-184.

Roy, J.J., Abraham, T.E., Abhijith, K.S., Sujith Kumar P.V., Thakur, M.S., (2005), Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase *Biosens. Bioelectron.*, **21**(1):206-211.

Roy, J.J., Abraham, T.E., (2006), Preparation and characterization of cross-linked enzyme crystals of laccase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **38**(1):31-36.

Rozzell, J. D., (1999), Commercial Scale Biocatalysis: Myths and Realities. *Bioorgan. Med. Chem*, **7**:2253-2261.

Rüsch Gen Klaas, M., Warwel, S., (1995), Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated carboxylic acids, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **1**:29-35.

Rusch Gen Klaas, M., Warwel, S., (1996), Chemoenzymatic epoxidation of unsaturated fatty acid esters and plant oils, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**(11):1453-1457.

Rusch Gen Klaas, M., Warwel, S., (1997), Lipase-catalysed preparation of peroxy acids and their use for epoxidation, *J. Molecul. Catal. B-Enzym.*, **117**:311-319.

Rusch Gen Klaas, M., Warwel, S., (1999a), Chemoenzymatic epoxidation of alkenes by dimethyl carbonate and hydrogen peroxide, *Org. Lett.*, **1**(7):1025-1026.

Rusch Gen Klaas, M., Warwel, S., (1999b), Complete and partial epoxidation of plant oils by lipase-catalyzed perhydrolysis, *Ind. Crop. Prod.*, **9**(2):125-132.

Russin, W.A., Hoesly, J.D., Elson, C.E., Tanner, M. A., Gould, M.N., (1989), Inhibition of rat mammary carcinogenesis by monoterpenoids. *Carcinogenesis*, **10**:2161-2165.

Rutter, R., Hager, L.P., Dhonau, H., Hendrich, M., Valentine, M., Debrunner, P., (1984), *Biochemistry*, **23**:6809-6816.

Rutter, R., Hager, L.P., (1982), The detection of two electron paramagnetic resonance radical signals associated with Chloroperoxidase Compound I, *J. Biol. Chem.*, **257**(14):795-796.

## S

Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., Lin, F.-H., (2008), Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1, *Process Biochem.*, **43**:736-742.

Safari Sinegani, A.A., Emtiazi, G., Shariatmadari, H., (2005), Sorption and immobilization of cellulase on silicate clay minerals, *J. Colloid Interf. Sci.*, **290**(1):39-44.

Sakharov, I.Y., Vorobiev, A.C., Leon, J.J.C., (2003), Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree Peroxidase, *Enzyme Microb. Technol.*, **33**:661-667.

Salminen, A., Lehtonen, M., Suuronen, T., Kaarniranta, K., Huuskonen, J., (2008), Terpenoids: natural inhibitors of NF- $\kappa$ B signalling, with anti-inflammatory and anticancer potential, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**:2979-2999.

Salumi, T.F.C., Baron, A.M., Zago, E., Turra, V., Baratti, J., Mitchell, D.A., Krieger, N., (2008), An efficient system for catalyzing ester synthesis using a lipase from a newly isolated *Burkholderia cepacia* strain, *Biocatal. Biotransfor.*, **26**(3):197-203.

Sanfilippo, C., Nicolosi, G., (2002), Catalytic behaviour of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in the oxidation of cyclic conjugated dienes, *Tetrahedron-Asymmetr.*, **13**:1889-1892.

Sanfilippo, C., D'Antona, N., Nicolosi, G., (2004), Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* is active in the presence of an ionic liquid as co-solvent, *Biotechnol. Lett.*, **26**:1815-1819.

Sangeetha, K., Morris, V.B., Emilia Abraham, T., (2008), Stability and catalytic properties of encapsulated subtilisin in xerogels of alkoxisilanes, *Appl. Catal. A-Gen.*, **341**(1-2):168-173.

Sanjay, G., Sugunan S., (2007), Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Influence of nature of binding on surface properties of clay-support and activity of enzyme, *J. Porous Mat.*, **14**(2):127-36.

Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.Y., Dashwood, R.H., (2001), Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay, *Mutat. Res.*, **495**:61-74.

- Santhanam, L., Dordick, J.S., (2002), Chloroperoxidase-catalyzed epoxidation of styrene in aqueous and nonaqueous media, *Biocatal. Biotransform.*, **20**:265-274.
- Santos, F.K.G., Neto, E.L.B., Moura, M.C.P.A., Dantas, T.N.C., Neto, A.A.D., (2009), Molecular behavior of ionic and nonionic surfactants in saline medium, *Colloid Surface A.*, **333**(1-3):156-162.
- Sarda, L., Densuelle, P., (1958), Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsions, *Biochim. Biophys. Acta*, **30**:513-521.
- Sarkar, J.M., Leonowicz, A.J., Bollag, J.-M., (1989), Immobilization of enzymes on clays and soils, *Soil Biol. Biochem.*, **21**(2):223-230.
- Sawada, K., Ueda, M., (2001), Enzyme processing of textiles in reverse micellar solution, *J. Biotechnol.*, **89**(2-3):263-269.
- Saxena, R.K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, W.S., (2003), Purification strategies for microbial lipases, *J. Microbiol. Meth.*, **52**:1-18.
- Schäfer, A., Specht, M., Hetzheim, A., Francke, W., Schauer, F., (2001), Synthesis of substituted imidazoles and dimerization products using cells and laccase from *Trametes versicolor*, *Tetrahedron*, **57**:7693-7699.
- Schmid, A., Dordick, J. S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B., (2001), Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature*, **409**:258-268.
- Schneider, P., Caspersen, M.B., Mondorf, K., Halkier, T., Skov, L.K., Østergaard, P.R., Brown, K.M., Brown, S.H., Xu, F., (1999), Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase, *Enzyme Microb. Tech.*, **25**(6):502-508.
- Schrader, J., Etschmann, M.M., Sell, D., Hilmer, J.M., Rabenhorst, J., (2004), Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds-current industrial processes and future prospects, *Biotechnol. Lett.*, **26**:463-472.
- Schrag, J.D., Cygler, M., (1997), Lipases and  $\alpha/\beta$  hydrolase fold, In: *Methods in Enzymology*, Vol. 284 (B. Rubin and E. A. Dennis, Eds.). New York: Academic Press, pp. 85-107
- Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B., McPherson, A., Poulos, T.L., (1996), The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure*, **4**:311-332.
- Secundo, F., Carrea, G., (2005), Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation, *Biotechnol. Bioeng.*, **92**(4):438-446.
- Secundo, F., Miehe-Brendle, J., Chelaru, C., Ferrandi, E.E., Dumitriu, E., (2008), Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **109**:350-61.
- Seelbach, K., vanDeurzen, M.P.J., vanRantwijk, F., Sheldon, R.A., Kragl, U., (1997), Improvement of the total turnover number and space-time yield for chloroperoxidase catalyzed oxidation, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**:283-288.
- Serebryakova, L.T., Zorin N.A., Karyakin, A.A., (2009), Improvement of hydrogenase enzyme activity by water-miscible organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, **44**(5):329-333.
- Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I.V., Stamatis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., Rudolf, P., (2008), Smectite clays as solid supports for immobilization of  $\beta$ -glucosidase: synthesis, characterization, and biochemical properties, *Chem. Mater.*, **20**:4106-4115.
- Sereti, V., Stamatis, H., Kollis, F.N., (2000), Strategies for the lipase-catalyzed regioselective acylation of polyols in organic media. Lipases and Lipids: Structure Function and Biotechnological Applications (G. Kokotos eds.), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp. 349-364, ISBN 960-524-111-0
- Serra, S., Fuganti C., Brenna. E., (2005), Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends Biotechnol.*, **23**(4):193-198.
- Servagent-Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., Baron, M.H., (2000), Conformational changes of bovine serum albumin induced by adsorption on different clay surfaces: FTIR analysis, *J. Colloid. Interf. Sci.*, **221**:273-83.
- Setti, L., Giuliani, S., Spinazzi, G., Pifferi, P.G., (1999), Laccase catalyzed oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols., *Enzyme Microb. Technol.*, **25**:285-289.

- Shah, S., Gupta, M.N., (2007), Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system, *Process Biochem.*, **42**(3):409-414.
- Shah, S., Solanki, K., Gupta, M.N., (2007), Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes, *Chem. Cent. J.*, **1**(1):30.
- Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S., Mu, S., (2003), A new polyphenol oxidase biosensor mediated by azure B in laponite clay matrix, *Electroanal.*, **15**(19):1506-1512.
- Shan, D., Yao, W., Xue, H., (2006), Amperometric detection of glucose with *glucose oxidase* immobilized in layered double hydroxides, *Electroanal.*, **18**(15):1485-1491.
- Shaw, P.D., Hager, L.P., (1961), Chlorination. VI. Chloroperoxidase: A component of the  $\beta$ -ketoadipate chlorinase system, *J. Biol. Chem.*, **236**:1626-1630.
- Shekarchizadeh, H., Kadivar, M., Ghaziaskar, H.S., Rezayat, M., (2009), Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM), *J. of Supercrit. Fluids*, **49**(2):209-215.
- Sheldon, R.A., (2007), Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal.*, **349**:1289-130.
- Shi, Q., Yang, D., Su, Y., Li, J., Jiang, Z., Jiang, Y., Yuan, W., (2007), Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by lipase, *J. Nanopart. Res.*, **9**:1205-1210
- Shi, Q., Li, Q., Shan, D., Fan Q., H., Xue, (2008), Biopolymer-clay nanoparticles composite system (Chitosan-laponite) for electrochemical sensing based on glucose oxidase, *Mater. Sci. Eng. C*, **28**(8):1372-1375.
- Shinoda, K., Araki, M., Sadaghiani, A., Khan, A., Lindman, B., (1991), Lecithin-based microemulsions: phase behaviour and microstructure, *J. Phys. Chem.*, **95**:989-993.
- Shipovskov, S., Gunaratne, H.Q.N., Seddon K.R., and Stephens, G., (2008), Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids, *Green Chem.*, **10**:806-810.
- Shleev, S.V., Morozova, O.V., Nikitina, O.V., Gorshina, E.S., Rusinova, T.V., Serezhenkov, V.A., Burbaev, D.S., Gazaryan, I.G., Yaropolov, A.I., (2004), Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes, *Biochimie*, **86**:693-703.
- Shleev, S., Persson, P., Shumakovich, G., Mazhugo, Y., Yaropolov, A., Ruzgas, T., Gorton L., (2006a), Laccase-based biosensors for monitoring lignin, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**(4):835-840.
- Shleev, S., Pita, M., Yaropolov, A.I., Ruzgas, T., Gorton, L., (2006b), Direct heterogeneous electron transfer reactions of *Trametes hirsuta* laccase at bare and thiol-modified gold electrodes, *Electroanalysis*, **18**:1901-1908.
- Shoff, S.M., Grummer, M., Yatvin, M.B., Elson, C.E., (1991), Concentration-dependent increase of murine P388 and B16 population doubling time by the acyclic monoterpene geraniol, *Cancer Res.*, **51**:37-42.
- Siegbahn K., Gelius, U., Basilier, E., Malmquist, P.A., Svensson, S., Lindberg, B., (1967), ESCA Atomic, Molecular and Solid State Structure Studied by Means of Electron Spectroscopy, Almqvist and Wiksells, *Nova Acta Regiae Soc. Sci. Ser IV*, VOL. **20**.
- Silva, J.E.S., Jesus, P.C., (2003), Evaluation of the catalytic activity of lipases immobilized on chrysotile for esterification, *An. Acad. Bras. Ciknc.*, **75**(2):157-162.
- Silva, C.J.S.M., Sousa, F., Gübitz, G., Cavaco-Paul, A., (2004), Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde, *Food Technol. Biotechnol.*, **42**(1):51-56.
- Silva, C., Silva, C.J., Zille, A., Guebitz, G.M., Cavaco-Paulo, A., (2007), Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**(6-7):867-875.
- Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, A.F., Alves, P.B., Marçal R.M., Cavalcanti, S.C.H., (2008), Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides, *Bioresource Technol.*, **99**(8):3251-3255.
- Silveira, M.M., Jonas, R., (2002), The biotechnological production of sorbitol. *Appl. Microbiol. Biot.*, **59**(4-5):400-408.

- Singh, H.P., Batish, D. R., Kaur, S., Arora, K., Kohli, R.K., (2006),  $\alpha$ -Pinene inhibits growth and induces oxidative stress in roots, *Ann. Bot. London*, **98**:1261-1269.
- Skouridou, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., (2003a), Use of essential oils as media for the enantioselective esterification of the monoterpene perillyl alcohol catalyzed by lipase, *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **105** (3-4):115-120.
- Skouridou V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., (2003b), A study on the process of lipase-catalyzed synthesis of  $\alpha$ -pinene oxide in organic solvents, *Biocat. Biotrans.*, **21**:285-290.
- Skouridou V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., (2003c), Lipase-mediated epoxidation of  $\alpha$ -pinene, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **21**:67-69.
- Slomczynski, D., Nakas J.P., Tanenbaum, S.W., (1995), Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**(3):907-912.
- Smith, G.D, Donelan, C.E, Barden, R.E, (1977), Oil continuous microemulsions composed of hexane, water and 2-propanol, *J. Colloid Interf. Sci.*, **60**:488-96.
- Smith, G.D., Barden, R.E., (1982), Solution behaviour of surfactants (Mittal, K.L. & Fendler, E.J., eds) vol. 2, pp.1225-1235, Plenum Press, New York.
- Smith, J. E., (2009), Biotechnology, fifth edition, Cambridge University Press, UK
- Soetaert, W., Vandamme, E.J., (2006), The impact of industrial biotechnology. *Biotechnol. J.*, **1**(7-8):756-769.
- Solden, D.M., and Dobson, D.W., (2001), Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*, *Microbiology*, **147**:1755-1763.
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., (1996), Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev.*, **96**:2563-2605.
- Solomon E.I., Chen P., Metz M., Lee S.K., Palmer A.E., (2001), Oxygen binding, activation, and reduction to water by copper proteins, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**:4570-4590.
- Song, X., Qi X., Qu, Y., (2008), Resolution of (R,S)-( $\pm$ )-glycidyl butyrate with immobilized Y-11 *Trichosporon capitatum* lipase in gelatin-containing microemulsion-based organogels, *Colloids Surfaces B*, **67**(1):127-131.
- Sono M., Dawson, J.H., (1984), The Generation of a hyperporphyrin spectrum upon thiol binding to ferric Chloroperoxidase, *J. Biol. Chem.*, **259**(21):13209-13216.
- Sono, M., Eble, K.S, Dawson, J.H., Hager, L.P., (1985), Preparation and properties of ferrous Chloroperoxidase complexes with dioxygen, nitric oxide, and an alkyl isocyanide, *J. Biol. Chem.*, **260**(29):15530-15535.
- Sono, M., Hager, L.P., Dawson, J.H., (1991), Electron paramagnetic resonance investigations of exogenous ligand complexes of low-spin ferric chloroperoxidase: further support for endogenous thiolate ligation to the heme iron, *Biochim. Bioph. Acta*, **1078**:351-359.
- Spagna, G., Pifferi, P.G., Gilioli, E., (1995), Immobilization of a pectinlyase from *Aspergillus niger* for application in food technology, *Enzyme Microb., Tech.*, **17**(8):729-738.
- Speelmans, G., Bijlsma, A., Eggink, G., (1998), Limonene bioconversion to high concentrations of a single and stable product, perillic acid, by a solvent resistant *Pseudomonas putida* strain, *Appl. Microbiol. Biot.*, **50**:538-544.
- Spreti, N., Germani, R., Incani, A., Savelli, G., (2004), Stabilization of chloroperoxidase by polyethylene glycols in aqueous media: Kinetic studies and synthetic applications, *Biotechnol. Prog.*, **20**:96-101.
- Stamatis, H., Xenakis A., Provelegiou, M., Kolisis, F.N., (1993), Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions. The role of enzyme localization in relation to its selectivity, *Biotechnol. and Bioeng.*, **42**:103-110.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Dimitriadis, E., Kolisis, F.N., (1995), Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in w/o microemulsions, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**:33-41.
- Stamatis, H., Macris J., Kolisis F.N., (1996), Esterification of hydrophilic diols catalysed by lipase in microemulsions. *Biotechnol. Lett.*, **18**(5):541-546.

- Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B.J., Kolisis, F., (1998), Enzymatic acylation of cellulose acetate in organic media, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **4**:229-236.
- Stamatis, H., Xenakis, A., (1999a), Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **6**(4):399-406.
- Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N., (1999b), Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipase, *Biotechnol. Adv.*, **17**:293-318.
- Steflitsch, W., Steflitsch, M., (2008), Clinical aromatherapy, *J. Men's Health*, **5**(1):74-85.
- Stoj, C.S., Kosman, D.J., (2005), In: King RB (ed) Encyclopedia of inorganic chemistry, vol II, 2nd edn. Wiley, New York, pp 1134-1159.
- Stone, K.L., Behan, R.K., Green M.T., (2006), Resonance Raman spectroscopy of chloroperoxidase compound II provides direct evidence for the existence of an iron(IV)–hydroxide, *PNAS*, **103**(33):12307-12310.
- Straathof, J.J., Panke, S., Schmid, A., (2002), The production of fine chemicals by biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002):548-556.
- Stupishina, E.A., Khamidullin, R.N., Vylegzhanina, N.N., Faizullin, D.A., Zuev, Yu.F., (2006), Ethylene glycol and the thermostability of trypsin in a reverse micelle system, *Biochemistry (Moscow)*, **71**(5):533-537.
- Su, C.K., Chiang, B.H., (2003), Extraction of immunoglobulin-G from colostral whey by reverse micelles, *J. Dairy Sci.*, **86**:1639-1645.
- Suderman, R.J., Dittmer, N.T., Kanost, M.R., Kramer, K.J., (2006), Model reactions for insect cuticle sclerotization: Crosslinking of recombinant proteins upon their laccase-catalyzed oxidative conjugation with catechols, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **36**:353-365.
- Sundaramoorthy, M., Turner, J., Poulos, T.L., (1995), The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid, *Structure*, **3**:1367-1377.
- Sundaramoorthy, M., Turner, J., Poulos, T.L. (1998), Stereochemistry of the chloroperoxidase active site: crystallographic and molecular-modeling studies, *Chem. Biol.*, **5**:461-473.
- Susheel, J.N., Harjani, J.R., Salunkhe, M.M., Mane, A.T., Wadgaonkar, P.P., (2003), Lipase-catalysed polyester synthesis in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid, *Tetrahedron Lett.*, **44**(7):1371-1373.
- Svedendahl, M., Carlqvist, P., Branneby, C., Allner, O., Frise, A., Hult, K., Berglund, P., Brinck, T., (2008), Direct epoxidation in *Candida antarctica* lipase B studied by experiment and theory, *ChemBioChem*, **9**:2443-2451.
- Sylvestre, J., Chautard, H., Cedrone F., Delcourt M., (2006), Directed evolution of biocatalysts. *Org. Proc. Res. Dev.*, **10**(3):562-571.
- Szakonyi, Z., Martinek, T., Hetényi, A., Fülöp, F., (2000), Synthesis and transformations of enantiomeric 1,2-disubstituted monoterpene derivatives, *Tetrahedron Asymmetr.*, **11**(22):4571-4579.
- Szakonyi, Z., Balázs, Á., Martinek, T.A., Fülöp, F., (2006), Enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes catalyzed by  $\gamma$ -amino alcohols derived from (+)- and (-)- $\alpha$ -pinene, *Tetrahedron Asymmetr.*, **17**(2):199-204.
- Szakonyi, Z., Hetényi, A., Fülöp, F., (2008), Synthesis and application of monoterpene-based chiral aminodiols, *Tetrahedron*, **64**(6):1034-1039.
- Szczesna Antczak, M., Kubiak, A., Antczak, T., Bielecki, S., (2009), Enzymatic biodiesel synthesis-Key factors affecting efficiency of the process, *Renew. Energ.*, **34**:1185-1194.

## T

- Taliansky, S., (2005), Urea-hydrogen peroxide complex, *Synlett.*, (12):1962-1963.
- Tamamushi, N.W., Watanabe, N., (1980), The formation of molecular aggregation structure in ternary system: Aerosol / water / isooctane, *Colloid Polym. Sci.*, **258**:174-178.

- Tan, Y., Deng, W., Ge, B., Xie, Q., Huang, J., Yao, S., (2009), Biofuel cell and phenolic biosensor based on acid-resistant laccase-glutaraldehyde functionalized chitosan-multiwalled carbon nanotubes nanocomposite film, *Biosens. Bioelectron.*, **24**:2225-2231.
- Tang, X., Shen Y.f., Suib, S.L., Coughlin, R.W., Vinopal, R., (1993), Immobilization of alkaline phosphatase on protamine-intercalated bentonite, *Micropor. Mat.*, **2**:65-71.
- Tang, Y., Hu, Y., Song, L., Gui, Z., Chen, Z., Fan, W., (2003), Preparation and thermal stability of polypropylene/montmorillonite nanocomposites, *Polym. Degrad. Stab.*, **82**:127-131.
- Tanino, T., Aoki, T., Chung, W.-Y., Watanabe, Y., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A., (2009), Improvement of a *Candida antarctica* lipase B-displaying yeast whole-cell biocatalyst and its application to the polyester synthesis reaction, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **82**(1):59-66.
- Tao, J., Zhao, L., Ran, N., (2007), Recent advances in developing chemoenzymatic processes for active pharmaceutical ingredients, *Org. Process Res. Dev.*, **11**:259-267.
- Tassou, C.C., Nychas, G.J.E., (1995), Antimicrobial Activity of the Essential oil of Mastic gum (*Pistacia lentiscus* var. chiaj on Gram positive and Gram negative bacteria in broth and model food system, *Internat. Biodeterior., Biodegrad.*, **36**:411-420.
- Tavares, A.P., Rodriguez, O., Macedo, E.A., (2008) Ionic liquids as alternative co-solvents for laccase: Study of enzyme activity and stability, *Biotechnol. Bioeng.*, **101**:201-207.
- Terrés, E., Montiel, M., Le Borgne, S., Torres, E., (2008), Immobilization of chloroperoxidase on mesoporous materials for the oxidation of 4,6-dimethyldibenzothiophene, a recalcitrant organic sulfur compound present in petroleum fractions, *Biotechnol. Lett.*, **30**(1):173-179.
- Theng, B.K.G., (1974), The chemistry of clay-organic reactions, Adam Hilger, London.
- Theodosiou, E., Katsoura, M.H., Loutrari, H., Purchartova, K., Kren, V., Kolisis, F.N., Stamatis, H., (2008), Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquids media and evaluation of their anti-tumor proliferative activity, *Biocatal. Biotransfor.*, **27**(3):161-169.
- Thomas, J.A., Hager, L.P., (1969), Molecular iodine as an obligate intermediate in the iodination of tyrosine by chloroperoxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 444-450.
- Thomas, J.A., Morris, D.R., Hager, L.P., (1970), Chloroperoxidase. VII. Classical Peroxidatic, Catalatic, and Halogenating Forms of the Enzyme, *J. Biol. Chem.*, **245**, 3129-3134.
- Thomas, S.M., DiCosimo, R., Nagarajan, R., (2002), Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry, *TRENDS Biotechnol.*, **20**:238-242.
- Thurston, C.F., (1994), The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, **140**:19-26.
- Tong, P., Hong, Y., Xiao, Y., Zhang, M., Tu X., Cui T., (2007), High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp, *Biotechnol. Lett.*, **29**:295-301
- Tonova, K., Lazarova, Z., (2008), Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion, *Biotechnol. Adv.*, **26**:516-532.
- Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., (1993), Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water/organic solvent mixtures, *J. Biotechnol.* **102**:33-44.
- Topakas, E., Vafiadi, C., Stamatis, H., Christakopoulos, P., (2005), *Sporotrichum thermophile* type C ferulol esterase(stFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis, *Enzyme Microb. Tech.*, **36**:729-736.
- Tornvall, U., Orellana-Coca, C., Hatti-Kaul, R., Adlercreutz, D., (2007), Stability of immobilized *Candida antarctica* lipase B during chemo-enzymatic epoxidation of fatty acids, *Enzyme Microb. Technol.*, **40**(3):447-451.
- Torrecilla, J.S., Mena, M.L., Yáñez-Sedeno P., García, J., (2007), Quantification of phenolic compounds in olive oil mill wastewater by artificial neural network/laccase biosensor, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(18):7418-7426.

Toti, P., Petri, A., Gambicorti, T., Osman, A.M., Bauer, C., (2005), Kinetic and stability studies on the chloroperoxidase complexes in presence of tert-butyl hydroperoxide, *Biophys. Chem.*, **113**:105-113.

Toti, P., Petri, A., Gambicorti, T., Osman, A.M., Bauer, C., (2006), Inactivation studies on native and silica gel non-homogeneous immobilized chloroperoxidase, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **38**:65-72.

Triantafyllou, A., Chaviaras, N., Sergeantanis, T.N., Protopapa, E., Tsaknis, J., (2007), Chios mastic gum modulates serum biochemical parameters in a human population, *J. Ethnopharmacol.*, **111**:43-49.

Trytek, M., Paduch, R., Fiedurek, J., Kandefer-Szerszeń, M., (2007), Monoterpenes-Old compounds, new applications, and biotechnological methods of their production, *Biotechnologia*, **76**(1):135-155.

Tse, M.K., Jiao, H., Anilkumar, G., Bitterlich, B., Gelalcha, F.G., Beller, M., (2006), Synthetic, spectral and catalytic activity studies of ruthenium bipyridine and terpyridine complexes: Implications in the mechanism of the ruthenium(pyridine-2,6-bisoxazoline)(pyridine-2,6-dicarboxylate)-catalyzed asymmetric epoxidation of olefins utilizing hydrogen peroxide, *J. Organomet. Chem.*, **19**(4):4419-4433.

Tsuda, H., Ohshima, Y., Nomoo, H., Fujita, K., Matsuda, E., Iigo, M., Takasuka, N., Moore, M.A., (2004), Cancer prevention by natural compounds, *Drug metab. pharmacokinetics*, **19**(4):245-263.

Tsukamoto, J., Haebel, S., Valenc G.P., Martin G. Peter, M.G., Franco T.T., (2008), Enzymatic direct synthesis of acrylic acid esters of mono- and disaccharides, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**:1486-1492.

Tuena de Gomez-Puyou, M., Tuena Gomez-Puyou, A., (1998), Enzymes in low water systems, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **33**:53-89.

Tufvesson P., Adlercreutz D., Lundmark S., Manea M., Hatti-Kaul R., (2008), Production of glycidyl ethers by chemo-enzymatic epoxidation of allyl ethers, *J. Molecul. Catal. B-Enzym.*, **54**:1-6.

Turner, N.J., (2003), Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis, *Trends Biotechnol.*, **21**(11):474-478.

## U

Uchida, H., Fukuda, T., Miyamoto, H., Kawabata, T., Suzuki, M., Uwajima, T., (2001), Polymerization of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **287**:355-358.

Uedo, N., Tatsuta, M., Iishi, H., Baba, M., Sakai, N., Yano, H., Otani, T., (1999), Inhibition by limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats, *Cancer Lett.*, **137**(2):131-136.

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., (1994), Sequence, crystal-structure determination and refinement of 2 crystal forms of lipase-B from *Candida antarctica*, *Structure*, **2**(4):293-308.

Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G.J., Patkar, S., Waagen V., Anthonsen T., Jones T.A., (1995), Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols, *Biochemistry*, **34**(51):16838-16851.

Uyama, H., Kobayashi, S., (2002), Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers, *J Mol. Catal. B. Enzym.*, **19-20**:117-127.

## V

Vaidya, A., Gera, G., Ramakrishna, S., (2008), Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **24**:2987-2995.

Vaidyanathan, R., Hesmondhalgh, L., Hu, S., (2007), A chemoenzymatic synthesis of an androgen receptor antagonist, *Org. Process Res. Dev.*, **11**(5):903-906.

van Beilen, J.B., Holtackers, R., Lüscher, D., Bauer, U., Witholt, B., Duetz, W.A., (2005), Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. Cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(4):1737-1744.

Van den Berg, K.J., van der Horst, J., Boon J.J., Sudmeijer, O.O., (1998), cis-1,4-poly- $\beta$ -myrcene: the structure of the polymeric fraction of mastic resin (*Pistacia lentiscus* L.) elucidated, *Tetrahedron Lett.*, **39**:2645-2648.

- Vandertol-Vanier, H.A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., Pickard, M.A., (2002), Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of *Coriolopsis gallica* laccase, *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **29**:214-220.
- Van Deurzen, M.P.J., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (1997a), Selective oxidations catalysed by peroxidases. *Tetrahedron*, **53**:13183-13220.
- Van Deurzen, M.P.J., Remkes, I.J., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (1997b) Chloroperoxidase catalyzed oxidations in t-butyl alcohol/water mixtures, *J. Mol. Catal. A: Chemical*, **117**:329-337.
- Van Deurzen, M.P.J., Seelbach K., van Rantwijk F., Kragl U., Sheldon R.A., (1997c), Chloroperoxidase: Use of a hydrogen peroxide-stat for controlling reactions and improving enzyme performance, *Biocatal, Biotransfor.*, **15**:1-16.
- Van de Velde, F., Lourenco, N.D., Bakker, M., Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2000), Improved operational stability of peroxidases by coimmobilization with glucose oxidase, *Biotechnol. Bioeng.*, **69**:286-291.
- Van de Velde, F., Bakker, M., van Rantwijk, F., Rai, G.P., Hager, L.P. Sheldon, R.A. (2001a), Engineering chloroperoxidase for activity and stability, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **11**:765-769.
- Van de Velde, F., Bakker, M., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2001b), Chloroperoxidase-Catalysed enantioselective oxidations in hydrophobic organic media, *Biotechnol. Bioeng.*, **72**(5):523-529.
- Vanek, T., Halík, J., Vanková, R., Valterová, I., (2005), Formation of trans-verbenol and verbenone from  $\alpha$ -pinene catalysed by immobilised picea abies cells, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **69**(2):321-325.
- van Langen, L.M., Selassa, R.P., van Rantwijk, F., Sheldon R.A., (2005), Cross-linked aggregates of (r)-oxynitrilase: a stable, recyclable biocatalyst for enantioselective hydrocyanation, *Org. Lett.*, **7**(2):327-329.
- Van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., (2000), Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**:554-564.
- van Rantwijk, F., and Sheldon, R.A., (2007), Biocatalysis in Ionic Liquids, *Chem. Rev.*, **107**:2757-2785.
- Vasdev, K., Kuhad, R.C., (1994), Induction of laccase production in *Cyathus bulleri* under shaking and static culture conditions, *Folia Microbiol.*, **39**:326-330.
- Vasil'eva, I.S., Morozova, O.V., Shumakovich, G.P., Yaropolov. A.I., (2009), Synthesis of Electroconductive polyaniline using immobilized laccase, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **45**(1):27-30.
- Vazquez, A., López, M., Kortaberria, G., Martín, L., Mondragon, I., (2008), Modification of montmorillonite with cationic surfactants. Thermal and chemical analysis including CEC determination, *Appl. Clay Sci.*, **41**(1-2):24-36.
- Vecchio, G., Zambianchi, F., Zacchetti, P., Secundo, F., Carrea, G., (1999), Fourier-transform infrared spectroscopy study of dehydrated lipases from *Candida antarctica* B and *Pseudomonas cepacia*, *Biotechnol. Bioeng.*, **64**(5):545-551.
- Verma, M.L., Azmi, W., Kanwar, S.S., (2008), Microbial lipases: At the interface of aqueous and non-aqueous media, *Acta Microbiol. Immunol. Hungarica*, **55**(3):265-294.
- Vermue, M.H., and Tramper, J., (1995), Biocatalysis in nonconventional media: medium engineering aspects (Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, **67**:346.
- Vianello, F., Cambria, A., Ragusa, S., Cambria, M.T., Zennaro L., Rigo, A., (2004), A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element, *Biosens. Bioelectron.*, **20**:315-321.
- Vianello, F., Ragusa, S., Cambria M.T., Rigo, A., (2006), A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element, *Biosens. Bioelectron.*, **21**:2155-2160.
- Vidya, C.M, Agrawal, R., (2004), Production of verbenol, a high valued food flavourant from a fusant strain of *Aspergillus niger*, *Appl. Microbiol. Biot.*, **62**(4):421-422.
- Vlcek, T., Petrovic, S.Z., (2006), Optimization of the chemoenzymatic epoxidation of soybean oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **83**(3):247-252.
- Volckaert, F.A.M.J, Barbier, M., Canário, A.V.M., Olsen, J.L., Wesnigk, J., Clark, M, Boyen, C., (2008), Empowering marine science through genomics, *Mar. Genomics*, **1**(1):33-35.

Vulfson, E.N., Ahmed, G., Gill, I., Kozlov, I.A., Goodenough, P.W., Law, B.A., (1991), Alterations to the catalytic properties of polyphenoloxidase in detergentless microemulsions and ternary water–organic solvent mixtures, *Biotechnol. Lett.*, **13**:91-96.

## W

Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, T., Halker, T., Kauppinen, S., Pederon, A., Schneider P., (1996), The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*, *Curr. Genet.*, **29**:395-403.

Wakamatsu, K., Takahama, U., (1993), Changes in peroxidase activity and inperoxidase isozymes in carrot callus. *Physiol. Plant*, **68**:167-171.

Walker, F.A., Ribeiro, J.M., Montfort, W.R. (1999), Novel nitric oxide-liberating heme proteins from the saliva of bloodsucking insects, *Met. Ions Biol. Syst.*, **36**:621-663.

Walser, M.L., Desyaterik, Y., Laskin, J., Laskin, A., Nizkorodov, S.A., (2008), High-resolution mass spectrometric analysis of secondary organic aerosol produced by ozonation of limonene, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **10**(7):1009-1022.

Wang, P.-Y., Tsai S.-W., Chen, T.-L., (2008), Improvement of enantioselectivity and stability of *Klebsiella oxytoca* hydrolase immobilized on Eupergit C 250L, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**:1518-1525.

Wang, S., Xu, B., Zhang, Y., He, J.X., (2009), Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney, *Meat Sci.*, **82**(1):53-58.

Wang, T., Li, H., Nie, K., Tan, T., (2006), Immobilization of lipase on epoxy activated (1-3)- $\alpha$ -D-glucan isolated from *Penicillium chrysogenum*, *Biosci. Biotech. Bioch.*, **70**:2883-2888.

Wang, X., Tachikawa, H., Yi, X., Manoj, K.M., Hager, L.P., (2003), Two-dimensional NMR study of the heme active site structure of Chloroperoxidase, *J. Biol. Chem.*, **278**:7765-7774.

Wang, X., Gai, Z., Yu, B., Feng, J., Xu, C., Yuan, Y., Lin, Z., Xu, P., (2007), Degradation of carbazole by microbial cells immobilized in magnetic gellan gum gel beads, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(20):6421-6428.

Wang, Z.-G., Wan, L.-S., Liu, Z.-M., Huang, X.-J., Xu, Z.-K., (2009), Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **56**:189-195.

Wehtje, E., Costes, D., Adlercreutz, P., (1997), Enantioselectivity of lipases: effects of water activity, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **3**(5): 221-230.

Wells, A., Teria, M., Eve, T., (2006), Green oxidations with laccase–mediator systems, *Biochem. Soc. Transact.*, **34**(2).

Weng, J.K., Li, X., Bonawitz, N.D., Chapple, C., (2008), Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **19**:166-172.

Wennerstrom, H., (2007), Ternary phase diagrams in surfactant science, *J. Disper. Sci. Technol.*, **28**:31-37.

Welton, T., (2004), Ionic liquids in catalysis, *Coordin. Chem. Rev.*, **248**:2459-2477.

Wever, R., Renirie, R., Hasan, Z., in: R. Bruce King (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, second ed., 2006.

Widsten, P., Kandelbauer, A., (2008), Laccase applications in the forest products industry: A review, *Enzyme Microb. Technol.*, **42**:293-307.

Wilk, K.A., Zielińska, K., Hamerska-Dudra, A., Jezierski, A., (2009), Biocompatible microemulsions of dicapalic aldonamide-type surfactants: Formulation, structure and temperature influence, *J. Colloid Interf. Sci.*, **334**(1):87-95.

Wilson, L., Illanes, A., Abián, O., Pessela, B.C.C., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M., (2004), Co-aggregation of *Penicillin G acylase* and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media, *Biomacromolecules*, **5**(3):852-857.

Wilson, L., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, R., Illanes, A., Guisan, J.M., Palomo, J.M., (2006), CLEAs of lipases and polyionic polymers: a simple way of preparing stable biocatalysts with improved properties. *Enzyme Microb. Technol.* **39**:750-755.

- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Hunziker, W., (1990), Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, **343**:771-774.
- Wiseman, A., Goldfarb, P.S., Woods, L., Ridgway, T., (2001), Novel biocatalytic enzymes by directed evolution, *Trends Biotechnol.*, **19**(10):382.
- Won, K., Kim, S., Kim, K.J., Park H.W., Moon, S.J., (2005), Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads, *Process Biochem.*, **40**:2149-2154.
- Wong, H., Schotz, M.C., (2002), The lipase gene family, *J. Lipid Res.*, **43**:993-999.
- Wong, M., Thomas, J.K., Graetzel, M., (1976), Fluorescence probing of inverted micelles. The state of solubilized water clusters in alkane/diisooctyl sulfosuccinate (aerosol OT) solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**:2391-2397.
- Wong, Y., Yu, J., (1999), Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes, *Water Res.*, **33**:3512-3520.
- Wu, M., Zhang, L., Li, D., Wang, Y., Zhang, Z., Mao, Z., (2008), Conditions study of cellulase and acid protease production during the process of solid-state fermentation of flaxseed meal, *Am. Soc. Agr. Biol. Eng. Annu. Int. Meeting*, **11**:6499-6509.

### X

- Xing, G.-W., Li, X.-W., Tian G.-L., Ye, Y.-H., (2000), Enzymatic peptide synthesis in organic solvent with different zeolites as immobilization matrixes, *Tetrahedron*, **56**(22):3517-3522.
- Xu, F., Shin, W.S., Brown, S.H., Wahleithner, J.A., Sundaram U.M., Solomon, E.I., (1996), A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.*, **1292**:303-311.
- Xu, F., (1997), Effect of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases, *J. Biol. Chem.*, **272**:924-928.
- Xu, F., (1999), Recent progress in laccase study: properties, enzymology, production, and applications. In *The encyclopedia of bioprocessing technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation* Edited by: Flickinger MC, Drew SW. NY, John Wiley & Sons, pp. 1545-1554.
- Xu, F., Kulys, J.J., Duke, K., Li, K., Krikstopaitis, K., Deussen, H.-J.W., Abbate, E., Galinyte V., and Schneider, P., (2000), Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of *N*-hydroxy compounds, *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2052-2056.
- Xu, F., (2005), Applications of oxidoreductases: recent progress, *Industrial Biotechnol.*, **1**:38-50.

### Y

- Yadav, G.D., Borkar, V.I., (2006), Kinetic modeling of microwave-assisted chemoenzymatic epoxidation of styrene, *AIChE J.*, **52**(3):1235-1247.
- Yadav, G.D., Devi, K.M., (2002), Enzymatic synthesis of perlauric acid using Novozym 435, *Biochem. Eng. J.*, **10**:93-101.
- Yadav, G.D., Jadhav, S.R., (2005), Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **86**:215-22.
- Yadav, G.D., Lathi, P. S., (2004), Synthesis of Citronellol Laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies, *J. M. Catal. B-Enzym.*, **27**:113-119.
- Yadav, G.D., Lathi, P. S., (2005), Synergism of microwaves and immobilized enzyme catalysis in synthesis of adipic acid esters in nonaqueous media, *Synthet. Commun.*, **35**:1699-1705.
- Yaipakdee, P., Robertson, L.W., (2001), Enzymatic halogenation of flavanones and flavones, *Phytochemistry*, **57**(3):341-347.
- Yamada, H., Itoh, N., Izumi, Y., (1985), Chloroperoxidase-catalyzed halogenation of trans-cinnamic acid and its derivatives, *J. Biol. Chem.*, **260**(22):11962-11969.
- Yamanaka, S., Nishihara, T. and Htori, M., (1987), Preparation and properties of titania pillared clay, *Mater. Chem. Phys.*, **17**:87-101

Yang, Q.X., Yang, M., Pritsch, K., Yediler, A., Hagn, A., Schlöter, M., Kettrup A., (2003), Decolourization of synthetic dyes and production of manganese dependent peroxidase by new fungal isolates, *Biotechnol.Lett.*, **25**:709-713.

Yang, Z., (2005), Fundamentals of biocatalysis in organic solvents, *Prog. Chem.*, **17**(5):924-930.

Yang, Z., Si, S., Zhang, C., (2008), Study on the activity and stability of urease immobilized onto nanoporous alumina membranes, *Micropor. Mesopor. Mat.*, **111**(1-3):359-366.

Yapar, E., Kayahan, S.K., Bozkurt, A., Toppare, L., (2009), Immobilizing cholesterol oxidase in chitosan–alginate network, *Carbohydr. Polym.*, **76**(3):430-436.

Yaropolov, A.I., Skorobogatko, O.V., Vartanov, S.S., Varfolomeyev, S.D., (1994), Laccase properties, catalytic mechanism and applicability, *Appl. Biochem. Biotech.*, **49**:257-279.

Yaver, D.S., Xu, F., Golightly, E.J., Brown, K.M., Brown, S.H., Rey, M.W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K., Dalboge, H., (1996), Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:834-841.

Ye, Y.-H., Xing, G.-W., Tian G.-L., Li, C.-X., (2000), Immobilization of  $\alpha$ -Chymotrypsin on zeolite for peptide synthesis in organic solvent, *Peptides Biology and Chemistry*, pp. 21-25.

Yeh, M.H., Hwang W.S., Kuo, W.J., (2005), Dispersibility of amphibious montmorillonite, *Jpn. J. Appl. Phys. Part 1*, **44** (9):6838-6846.

Yi, X., Conesa, A., Punt, P.J., Hager, L.P., (2003), Examining the role of glutamic acid 183 in chloroperoxidase catalysis, *J Biol Chem.*, **278**:13855-13859.

Yilmaz, N., Yapar, S., (2004), Adsorption properties of tetradecyl- and hexadecyl trimethylammonium bentonites, *Appl. Clay Sci.*, **27**:223-228.

Yoshizawa-Fujita, M., Saito, C., Takeoka, Y., Rikukawa M., (2008), Lipase-catalyzed polymerization of L-lactide in ionic liquids, *Polym. Adv. Technol.*, **19**:1396-1400.

Yu, S.G., Hildebrandt, L.A., Elson, C.E., (1995), Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice, *J. Nutr.*, **125**:2763-2767.

Yu, P., (2006), Synchrotron IR microspectroscopy for protein structure analysis: potential and question, *Spectroscopy*, **20**:229-251.

Yuan, S.L.G.Y., Xu, Cai, Z.T., Dyn M., (2002) Simulation study on phase diagram of Aerosol OT/isooctane/water system, *Chinese Chem. Lett.*, **13**(10):1025-10284.

## Z

Zacharis, E., Omar, I. C., Partridge, J., Robb, D.A., Halling, P.J., (1997), Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**(2):367-374.

Zamorano, L.S., Pina, D.G., Arellano, J.B., Bursakov, S.A., Zhadan, A.P., Calvete, J.J., Sanz, L., Nielsen, P.R., Villar, E., Gavel, O., Roig, M.G., Watanabe, L., Polikarpov, I., Shnyrov, V.L., (2008), Thermodynamic characterization of the palm tree *Roystonea regia* peroxidase stability, *Biochimie*, **90**:1737-1749.

Zaks, A., Dodds, D.R., (1995), Chloroperoxidase-catalysed asymmetric oxidations: substrate specificity and mechanistic study, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**:10419-10424.

Zaks, A., Klibanov, A.M., (1986), Substrate specificity of enzymes in organic solvents vs. water is reversed, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**:2767-2768.

Zaks A., Klibanov A.M., (1988a), Enzymatic catalysis in non-aqueous solvents, *J. Biol. Chem.*, **263**:3194-3201.

Zaks, A., Klibanov, A.M., (1988b), The effect of water on enzyme action in organic media, *J. Biol. Chem.*, **263**(17):8017-8021.

Zen, J.-M., Lo, C.-W., Chen, P.-J., (1997), An enzymatic clay-modified electrode for aerobic glucose monitoring with dopamine as mediator, *Anal. Chem.*, **69**(8):1669-1673.

- Zhang, D.-H., Bai, S., Ren, M.-Y., Sun, Y., (2008), Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ( $\pm$ )-menthol in ionic liquid, *Food Chem.*, **109**:72-80.
- Zhang, H.-X., Wu, X.-Q., Hou, W.-J., Lu, Z.-Q., Xie, W., Wang, R., Li, H.-X., (2008), Catalytic chlorination of MCD using chloroperoxidase coated by single-wall carbon nanotubes films on GC electrodes, *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chem. J. Chinese Univ.*, **29**(9):1863-1865.
- Zhang, Y., Zeng, G.M., Tang, L., Huang, D.L., Jiang X.Y., Chen, Y.N., (2007), A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode, *Biosens. Bioelectron.*, **22**:2121-2126.
- Zhang, Y., Huang, X.-R., Huang, F., Li, Y.-Z., Qu, Y.-B., Gao, P.-J., (2008), Catalytic performance of lignin peroxidase in a novel reverse micelle, *Colloid Surface B.*, **65**:50-53.
- Zhao, H., Chockalingam, K., Chen, Z., (2002), Directed evolution of enzymes and pathways for industrial biocatalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**(2):104-110.
- Zheng, Y., Quan, J., Ning, X., Zhu, L.-M., Jiang, B., He, Z.-Y., (2009), Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**:41-46.
- Zhi, L., Jiang, Y., Wang, Y., Hu, M., Li, S., Ma Y., (2007), Effects of Additives on the Thermostability of Chloroperoxidase, *Biotechnol. Prog.*, **23**:729-733.
- Zhou, G.-P., Zhang, Y., Huang, X.-R., Shi, C.-H., Liu, W.-F., Li, Y.-Z., Qu, Y.-B., Gao, P.-J., (2008), Catalytic activities of fungal oxidases in hydrophobic ionic liquid 1-butyl-3 methylimidazolium hexafluorophosphate-based microemulsion, *Colloid Surfaces B.*, **66**:146-149.
- Zhu, G., Wang, P., (2005), Novel interface-binding chloroperoxidase for interfacial epoxidation of styrene, *J. Biotechnol.*, **117**:137-213.
- Zhu, Y., Kaskel, S., Shi, J., Wage T., van Pée, K.-H., (2007), Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres, *Chem. Mater.*, **19**(26):6408-6413.
- Zoldák, G., Zubrik, A., Musatov, A., Stupák, M., Sedlák, E., (2004), Irreversible thermal denaturation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* is the transition to the denatured state with residual structure, *J. Biol. Chem.*, **279**(46):47601-47609.
- Zoumpantoti, M., Karavas, E., Skopelitis, C., Stamatis, H., Xenakis, A., (2004), Lecithin organogels as model carriers of pharmaceuticals, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **123**:199-202.
- Zoumpantoti, M., Stamatis, H., Papadimitriou, V., Xenakis, A., (2006a), Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane-1-propanol-water surfactantless microemulsion systems, *Colloid Surface B.*, **47**(1):1-9.
- Zoumpantoti M., Karali, M., Xenakis, A., Stamatis, H., (2006b), Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels, *Enzyme Microb. Technol.*, **39**:531-539.
- Zoumpantoti, M., Parmaklis, P., Domínguez de María, P., Stamatis, H., Sinisterra, J.V., Xenakis, A., (2008), Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels: effect of temperature and substrate diffusion, *Biotechnol. Lett.*, **30**:1627-1631.
- Zulauf, M., Eicke, H.-F., (1979), Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H<sub>2</sub>O/aerosol ot/isooctane as studied by photon spectroscopy, *J. Phys. Chem.*, **83**:480-486.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. Κατ'όγκο σύσταση τριαδικών συστημάτων

**Πίνακας Ι.α** Κατ'όγκο σύσταση του εξάνιο/2-προπανόλης ή τριτοταγούς βουτανόλης/νερό που σχηματίζεται χωρίς επιφανειοενεργό.

| Σύστημα | Εξάνιο | 2-Προπανόλη<br>ή τριτοταγής<br>βουτανόλη | Υδατική Φάση |
|---------|--------|------------------------------------------|--------------|
|         |        | (% v/v)                                  |              |
| H1      | 15.8   | 65.3                                     | 18.9         |
| H2      | 17.2   | 67.2                                     | 15.6         |
| H3      | 11.7   | 73.7                                     | 14.6         |
| H4      | 23.4   | 64.6                                     | 12.0         |
| H5      | 27.1   | 64.4                                     | 8.5          |
| H6      | 46.0   | 47.7                                     | 6.3          |
| H7      | 19.9   | 74.6                                     | 5.5          |
| H8      | 37.8   | 57.2                                     | 5.0          |
| H9      | 55.8   | 39.6                                     | 4.6          |
| H10     | 53.4   | 43.4                                     | 3.2          |
| H11     | 34.1   | 63.4                                     | 2.5          |
| H12     | 64.5   | 33.3                                     | 2.2          |
| H13     | 47.3   | 50.7                                     | 2.0          |

**Πίνακας Ι.β.** Κατ'όγκο σύσταση του α-πινενίου/2-προπανόλης ή τριτοταγούς βουτανόλης/νερό που σχηματίζεται χωρίς επιφανειοενεργό.

| Σύστημα | 2-Προπανόλη<br>ή τριτοταγής<br>βουτανόλη |              |      |
|---------|------------------------------------------|--------------|------|
|         | α-πινένιο                                | Υδατική Φάση |      |
|         | (% v/v)                                  |              |      |
| P1      | 16.0                                     | 65.1         | 18.9 |
| P2      | 17.6                                     | 66.9         | 15.5 |
| P3      | 22.9                                     | 63.4         | 13.7 |
| P4      | 26.0                                     | 62.0         | 12.0 |
| P5      | 31.3                                     | 58.0         | 10.7 |
| P6      | 31.8                                     | 59.0         | 9.2  |
| P7      | 36.5                                     | 55.3         | 8.2  |
| P8      | 23.6                                     | 68.4         | 8.0  |
| P9      | 44.9                                     | 48.1         | 7.0  |
| P10     | 22.8                                     | 70.4         | 6.8  |
| P11     | 21.7                                     | 73.3         | 5.0  |
| P12     | 39.1                                     | 56.5         | 4.4  |
| P13     | 30.4                                     | 65.5         | 4.1  |
| P14     | 53.2                                     | 42.8         | 4.0  |
| P15     | 58.4                                     | 39.0         | 2.6  |
| P16     | 64.6                                     | 33.4         | 2.0  |
| P17     | 71.2                                     | 27.7         | 1.1  |

**Πίνακας Ι.γ.** Κατ'όγκο σύσταση του *d*-λιμονενίου/τριτοταγούς βουτανόλης/νερό που σχηματίζεται χωρίς επιφανειοενεργό.

| Σύστημα | <i>d</i> -λιμονένιο | Τριτοταγής<br>βουτανόλη | Υδατική Φάση |
|---------|---------------------|-------------------------|--------------|
|         | (% v/v)             |                         |              |
| LT1     | 16.0                | 65.1                    | 18.9         |
| LT2     | 17.6                | 66.9                    | 15.5         |
| LT3     | 22.9                | 63.4                    | 13.7         |
| LT4     | 26.0                | 62.0                    | 12.0         |
| LT5     | 31.3                | 58.0                    | 10.7         |
| LT6     | 31.8                | 59.0                    | 9.2          |
| LT7     | 22.1                | 68.3                    | 9.6          |
| LT8     | 36.6                | 55.3                    | 8.1          |
| LT9     | 44.9                | 48.1                    | 7.0          |